

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN İN
VİTRO ETKİSİ**

NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE NUR ANILMIŞ

HAZİRAN 2018

BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN İN
VİTRO ETKİSİ**

NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve Nur ANILMIŞ

DANIŞMAN: Doç. Dr. Ebru KILIÇAY

ZONGULDAK

Haziran 2018

KABUL:

Merve Nur ANILMIŞ tarafından hazırlanan “Kanser Hücreleri Üzerinde siRNA Yüklü Nanopartiküllerin in vitro Etkisi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 29/05/2018

Danışman: Doç. Dr. Ebru KILIÇAY

Bülent Ecevit Üniversitesi, Zonguldak Meslek Yüksek Okulu, Elektronik ve Otomasyon Bölümü

Üye: Prof. Dr. Baki HAZER

Kapadokya Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Uçak Gövde Motor Bölümü

Üye: Doç. Dr. Barış AVAR

Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./..../20....



Doç. Dr. Ahmet ÖZARSLAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”



Merve Nur ANILMIŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN İN VİTRO ETKİSİ

Merve Nur ANILMIŞ

Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ebru KILIÇAY

Mayıs 2018, 87 sayfa

RNA interferans (RNAi), susturma kompleksine sahip olan (RISC) RNA aracılığıyla ve küçük müdahaleci RNA'lar (siRNAs) tarafından spesifik mRNA'nın degradasyonuna neden olan hücresel seçici gen susturma mekanizmasıdır. Bu prosesin ardındaki moleküler düzenek, kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisini tasarlamaya yöneliktir. Hedef genin susturulması, siRNA'nın hücrenin aktif bölgesine salınmasını gerektirmektedir. Bu amaca ulaşmada, toksik olmayan, seçilen hücreye hedeflenebilen ve siRNA'yı koruyan etkin taşıyıcıya gereksinim vardır. siRNA molekülleri hidrofilik doğası ve anyonik yapısı nedeniyle hücre membranından kolaylıkla difüze olamamaktadır. Bu sebeple salım cihazları, siRNA'yı hedef hücrenin sitoplazmasına kolaylıkla aktarabilme özelliğine sahip olmalı ve aynı zamanda siRNA'yı biyolojik sıvı içerisinde korumalıdır. siRNA salımı için iki farklı yaklaşım geliştirilmiştir: viral ve viral olmayan taşıyıcılar. Viral olmayan taşıyıcılar (aynı zamanda nanopartiküller olarak adlandırılmaktadır), in vitro ve in vivo ortamda nükleik asiti güvenli ve etkin bir şekilde salmak için formüle edilmektedir. Ek olarak, nanopartiküller, geniş ölçekli

ÖZET (devam ediyor)

üretimi, düşük toksisiteyi, düşük immunojenisiteyi ve spesifik hücelere hedeflemeyi sağlamak için tasarlanması nedeniyle pek çok avantaja ve potansiyele sahiptir. Bu çerçevede, yeni nesil nanopartiküller, hücre membranı ile etkileşimi iyileştirmek amacıyla tasarlanmıştır.

Sunulan çalışmada basit, tek basamaklı ve kolaylıkla ölçeklendirilebilen bir prosedür kullanılarak polistiren ve polilinoleik asit temeline dayanan poli(stiren)-graft-poli(linoleikasit) (PS-PLina) ve poli(stiren)-graft-poli(linoleikasit)-graft-poli(etilenglikol) (PS-PLina-PEG) nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu nedenle ilk olarak, PS-PLina ve PS-PLina-PEG graft kopolimerler sentezlenerek fizikokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Sonrasında PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküller üretilip poli(L-lizin) (PLL) ile modifiye edildikten sonra yüzeylerine siRNA bağlanarak nanopartiküller optimize ve karakterize edilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin liyofilize edilen formları sırasıyla +4 °C depolama sıcaklığında 1 ay süreyle stabilite testine tabi tutulmuştur. Morfolojik değerlendirmeler SEM ve FTIR kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nükleik asit yükleme ve salım profilleri araştırılmıştır. siRNA ile konjuge edilen taşıyıcıların A549 kanser ve L929 fare fibroblast hücre hatları üzerindeki in vitro etkinlikleri ikili boyama metodu, sitotoksosite testi (MTT) ve akış sitometrisi yoluyla araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: PS-PLina nanopartikül, PS-PLina-PEG nanopartikül, siRNA, A549, L929.

Bilim Kodu:

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

IN VITRO EFFICIENCY OF siRNA LOADED NANOPARTICLES ON CANCER CELL

Merve Nur ANILMIŞ

Bülent Ecevit University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Nanotechnology Engineering

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru KILIÇAY

May 2018, 87 pages

RNA interference (RNAi) is a cellular mechanism of selective gene silencing, based on degradation of specific mRNA by small interfering RNAs (siRNAs), and mediated by an RNA-induced silencing complex (RISC). The molecular machinery behind this process has helped in designing therapies for a variety of diseases, including cancer. Silencing of target genes requires that siRNA is delivered into the cell in its active state. To achieve this, an effective vector protecting siRNA that is non-toxic and can be targeted at selected cells is necessary. siRNA molecules can-not readily diffuse across cellular membranes due to their anionic backbone and hydrophilic nature. Thus, delivery vehicles must be used to protect the siRNA within biological fluids, while facilitating its transfection to the cytoplasm of the target cells. Two different approaches for siRNA delivery have been developed: viral and non-viral vectors. Non-viral vectors (also named nanoparticles) have been formulated to associate and to efficiently and safely deliver nucleic acids both in vitro and in vivo, opening many possible

ABSTRACT (continued)

applications. Furthermore, they have many advantages and potentialities including large scale manufacture, low toxicity and low immunogenicity and the possibility to customize them to target specific cell types. In this frame, novel nanoparticles (NPs) designed in order to improve the interaction with the cell membrane.

In the present study poly(styrene)-graft-poly(linoleic acid) (PS-PLina) and poly(styrene)-graft-poly(linoleic acid)-graft-poly(ethylene glycol) (PS-PLina-PEG) NPs based on polystyrene and polylinoleic acid were prepared using a simple, one step and easily scalable procedure. Therefore, first of all PS-PLina and PS-Plina-PEG graft copolymers were synthesized and characterized. After the PS-PLina and PS-Plina-PEG nanoparticles were produced and modified with poly(L-lysine) (PLL), the siRNA were bound to their surfaces and the nanoparticles optimized and characterized. Optimized NPs formulations in the freeze dried form were assessed with their stability for 1 months of storage at +4 °C. Morphological evaluations were carried out by using SEM and FTIR. Nucleic acid loading and release profiles were investigated. In vitro efficacy of the conjugated with siRNA carrier were investigated using double staining method, cytotoxicity test (MTT) and flow cytometry analysis. A549 cancer cell and L929 mice fibroblast cell were employed to evaluate nanocarrier systems.

Keywords: PS-PLina nanoparticle, PS-PLina-PEG nanoparticle, siRNA, A549, L929.

Science Code:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımını ve yol göstericiliğini eksik etmeyen, yaşadığım her sorunda destek olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ebru KILIÇAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Baki HAZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a, yardımlarından dolayı Arş. Gör. Gökür KARA'ya ve Biyopolimerik Sistem Araştırma Grubu'na teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemin sebebi, her soruma cevap bulduğum, bana sorumluluğu ve sorgulamayı öğreten, başarılarım için teşekkür eden fedakâr canım babam Mustafa ANILMIŞ'a, bana güç veren, her konuda desteğini esirgemeyip elimi hiç bırakmayan çok değerli canım annem Adile ANILMIŞ'a ve hayat boyu her konuda güvenini, sevgisini eksik etmeyen, kardeşi olmaktan gurur duyduğum, akıl hocam, canım ağabeyim Murat ANILMIŞ'a sonsuz şükran ve minnet duygularımı sunarım.

Hayat boyu arkamda olan, her zorluğu göğüslerken yanımda bulduğum değerli halalarım Selma, Asiye ve Berrin ANILMIŞ'a şükranlarımı sunarım.

Bana tez aşamasında yılmadan sabırla yol gösteren, lise yıllarımdan beri dostluk görevini başarıyla sürdüren sevgili Ayşegül ALTUNTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tezi 2016-33496813-01 kod numaralı Yüksek Lisans BAP Projesi tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
1.1 KANSER NEDİR?.....	1
1.2 KANSERİN YAPISI VE BİYOLOJİSİ.....	2
1.3 KANSER ÇEŞİTLERİ.....	5
1.4 KANSERE NEDEN OLAN ETKENLER.....	7
1.5 KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN GELENEKSEL YÖNTEMLER.....	9
1.5.1 Cerrahi.....	9
1.5.2 Kemoterapi.....	9
1.5.3 Radyoterapi.....	10
1.5.4 İmmünoterapi.....	10
1.6 KONTROLLÜ İLAÇ SALIM SİSTEMİ VE ÖZELLİKLERİ.....	11
1.7 İLAÇ HEDEFLEME YÖNTEMLERİ.....	12
1.7.1 Pasif Hedefleme.....	13
1.7.2 Aktif Hedefleme.....	14
1.8 KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER.....	15
1.8.1 Mikroküreler.....	16
1.8.2 Mikrokapsüller.....	16

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
1.8.3 Nanopartiküller	16
1.8.3.1 Nanopartikül Üretim Yöntemleri	18
1.9 KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİNDE KULLANILAN POLİMERLER.....	21
1.9.1 Kopolimerler	24
1.10 PS-g-PLina VE PS-g-PLina-g-PEG GRAFT KOPOLİMERLERİ.....	26
1.11 PEG'İN TAŞIYICI SİSTEMLERDEKİ ÖNEMİ.....	28
1.12 KANSER TEDAVİSİNDE TAŞIYICI SİSTEMLERDE KULLANILAN ETKEN MADDELER.....	29
BÖLÜM 2 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35
2.1 KULLANILAN KİMYASALLAR VE EKİPMANLAR.....	35
2.2 LİNOLEİK ASİTİN OTOOKSİDASYONU	36
2.3 PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG GRAFT KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU.....	37
2.3.1 PS-g-PLina Graft Kopolimerlerinin Hazırlanışı	37
2.3.2 PS-g-PLina-g-PEG Graft Kopolimerinin Hazırlanışı	37
2.4 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANIŞI VE KARAKTERİZASYONU	38
2.5 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN STABİLİTE TESTİ	39
2.6 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN PLL İLE MODİFİYE EDİLMESİ	39
2.7 PLL İLE MODİFİYE EDİLMİŞ PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNE siRNA BAĞLANMASI VE BAĞLANMA VERİMİNİN HESAPLANMASI.....	40
2.8 NANOPARTİKÜLLERİN siRNA SALIM PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ.....	41
2.9 HÜCRELERİN HAZIRLANMASI VE siRNA İLE KONJUGE EDİLEN PARTİKÜLLERİN HÜCRELERE TRANSFEKSİYONU	41
2.9.1 Hücrelerin Hazırlanması	42
2.9.2 siRNA ile Konjuge Edilen Partiküllerin Hücrelere Transfeksiyonu.....	43
2.9.3 Sitotoksosite Testi (MTT).....	43

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

2.10 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI	44
2.11 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN L929 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI	45
2.12 APOPTOTİK-NEKROTİK ANALİZLER.....	46
2.12.1 Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) ile Annexin V-PI Analizi	46
2.12.2 Floresan Mikroskopi Analizi	47
BÖLÜM 3 SONUÇLAR VE TARTIŞMA	49
3.1 PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG GRAFT KOPOLİMERLERİ ve PS-PLina ve PS-PLina- PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU...49	
3.2 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN YÜZEY MORFOLOJİSİ. 51	
3.2.1 Partiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler.....	52
3.3 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN STABİLİTE TESTİ	54
3.4 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN PLL İLE MODİFİYE EDİLMESİ	54
3.5 PLL İLE MODİFİYE EDİLMİŞ PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNE siRNA BAĞLANMASI VE BAĞLANMA VERİMİNİN HESAPLANMASI.....	55
3.6 NANOPARTİKÜLLERİN siRNA SALIM PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ.....	57
3.7 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI	59
3.8 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN L929 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI	63
3.9 APOPTOTİK-NEKROTİK ANALİZLER.....	65
3.9.1 Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) ile Annexin V-PI Analizi	65
3.9.2 Floresan Mikroskopi Analizi	71
3.10 BULGULAR VE DEĞERLENDİRME	72
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ.....	87



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Kanseri oluşumunun gösterimi.....	2
Şekil 1.2 Kanseri özellikleri.....	4
Şekil 1.3 Kadınlarda en sık görülen kanseri türleri	6
Şekil 1.4 Erkeklerde en sık görülen kanseri türleri	7
Şekil 1.5 Kanseri riskini artıran faktörler	8
Şekil 1.6 İlacın geleneksel yöntem ve kontrollü sisteme göre iletimi	11
Şekil 1.7 İlaç hedefleme yöntemleri.....	13
Şekil 1.8 Enkapsülasyon mekanizması modeli: hapsedilen, yüzeye dağılan ve adsorplanan ilaç (a) nanokapsüller (b) nanoküreler.....	17
Şekil 1.9 Birkaç nanopartikül hazırlama yönteminin şematik gösterimi	19
Şekil 1.10 Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi	20
Şekil 1.11 Kopolimer Türleri	24
Şekil 1.12 Pegilasyon işleminin başlıca avantajları	29
Şekil 1.13 RNAi mekanizmasının şematik gösterimi	32
Şekil 2.1 Linoleik asidin otooksidasyonuna ait kimyasal reaksiyon basamağı.....	36
Şekil 2.2 PS-g-PLina graft kopolimerinin sentezlenmesine ait kimyasal reaksiyon basamağı	37
Şekil 2.3 PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerinin sentezlenmesine ait kimyasal reaksiyon basamağı.....	38
Şekil 2.4 A549 hücrelerinin görüntüsü	42
Şekil 2.5 MTT yapısında tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesinin şematik gösterimi	44
Şekil 3.1 PS-g-PLina, PS-PLina NP'leri, PS-g-PLina-g-PEG ve PS-PLina-PEG NP'lerine ait FTIR spektrumları.	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.2 (a) PS-g-PLina ve (b) PS-g-PLina-g-PEG'e ait ¹ H NMR spektrumları.....	50
Şekil 3.3 PS-g-PLina ve PS-g-Plina-g-PEG graft kopolimerlerinin TGA eğrisi	51
Şekil 3.4 (a) PS-PLina nanopartiküllerin ve (b) PS-PLina-PEG nanopartiküllerin SEM görüntüleri..52	
Şekil 3.5 PS-PLina-PLL NP'leri ve PS-PLina-PEG-PLL NP'lerinin FTIR spektrumları.....	55
Şekil 3.6 PS-PLina-PLL nanopartiküllerinden siRNA salımı	58
Şekil 3.7 PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinden siRNA salımı.....	59
Şekil 3.8 (a) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (b) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin, (c) Kontrol grubu için boş NP'lerin ve çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın A549 hücreleriyle 24 saatlik etkileşimleri neticesinde in vitro sitotoksosite sonuçları	60
Şekil 3.9 (a) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (b) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin, (c) Kontrol grubu için boş NP'lerin ve çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın A549 hücreleriyle 48 saatlik etkileşimleri neticesinde in vitro sitotoksosite sonuçları	61
Şekil 3.10 (a) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (b) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin, (c) Kontrol grubu için boş NP'lerin ve çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın A549 hücreleriyle 72 saatlik etkileşimleri neticesinde in vitro sitotoksosite sonuçları	62
Şekil 3.11 (a) Çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın, (b) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (c) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin L929 hücreleriyle 24 saatlik sitotoksosite sonuçları	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.12 (a) Çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın, (b) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (c) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin L929 hücreleriyle 48 saatlik sitotoksosite sonuçları	64
Şekil 3.13 (a) Çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın, (b) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (c) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin L929 hücreleriyle 72 saatlik sitotoksosite sonuçları	64
Şekil 3.14 Kontrol grubu A549 hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	66
Şekil 3.15 100 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	67
Şekil 3.16 280 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	67
Şekil 3.17 400 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	68
Şekil 3.18 600 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	68
Şekil 3.19 PS-PLina-PLL-100 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	69
Şekil 3.20 PS-PLina-PLL-280 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	69
Şekil 3.21 PS-PLina-PLL-400 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	70
Şekil 3.22 PS-PLina-PEG-PLL-100 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	70
Şekil 3.23 PS-PLina-PEG-PLL-400 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	71
Şekil 3.24 PS-PLina-PEG-PLL-600 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi	71

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No

Sayfa

Şekil 3.25 (a) Hiçbir ajan ile muamele edilmemiş A549 kontrol hücreleri, (b) Sadece siRNA ile etkileştirilmiş hücreler, (c) PS-PLina-PLL-siRNA; d) PS-PLina-PEG-PLL-siRNA ile etkileştirilen hücreler. Oklar nekrotik ve apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Ölçek 100 µm aralığını göstermektedir..... 72



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Doğal ve sentetik bazı biyobozunur polimerler.....	22
Çizelge 2.1 A549 hücrelerinin hücre kültür ortamı.....	43
Çizelge 3.1 PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin boy-boy dağılımı üzerine bazı parametrelerin etkileri.....	53
Çizelge 3.2 Boş nanopartiküllerin +4 °C’de sulu ortamda depolanmasının nanopartiküllerin ortalama çapına, dağılım indeksine ve zeta potansiyel yüküne olan etkisi	54
Çizelge 3.3 Nanopartiküllerin PLL ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen zeta potansiyel değerleri.....	55
Çizelge 3.4 PS-PLina-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen zeta potansiyel değerleri	56
Çizelge 3.5 PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen zeta potansiyel değerleri	56
Çizelge 3.6 PS-PLina-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileşimi sonucu elde edilen % bağlanma verimlilikleri	56
Çizelge 3.7 PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileşimi sonucu elde edilen % bağlanma verimlilikleri.....	57



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

mm	: Milimetre
α	: Alfa
%	: Yüzde
Nm	: Nanometre
kHz	: Kilohertz
gr	: Gram
°	: Derece
C	: Santigrat
mL	: Mililitre
dk	: Dakika
g	: Graft
μ g	: Mikrogram
μ m	: Mikrometre
μ l	: Mikrolitre
nM	: Nanomolar
cm ³	: Santimetreküp
cm	: Santimetre
ppm	: Milyonda Bir
mV	: Megavolt

KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
AGO2	: Argonat-2

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

A549	: İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMEM F-12	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dsRNA	: Çift Zincirli RNA
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EPR	: Artırılmış Geçiş ve Alıkonma
ER-α	: Östrojen Reseptör Alfa
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCl	: Hidroklorik Asit
HCV	: Hepatit C Virüsü
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HIFU	: Yüksek Yoğunluklu Odaklanmış Ultrason
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPK	: Hepatosellüler Karsinom
HPV	: İnsan Papiloma Virüsü
L929	: Fare Fibroblast
miRNA	: Mikro RNA
MMF	: Matriks Metalloproteinazlar
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol)-2,5-Dipeniltetra-Zolyum Bromür
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NP	: Nanopartikül
PARP	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
PCL	: Poli ϵ -Kapolakton

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

PDGF	: Platenet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDI	: Poli Dispersite Index
PEA	: Poli Ester Amit
PEG	: Poli Etilen Glikol
PGA	: Poli Glikolik Asit
PLA	: Poli Laktik Asit
PLina	: Poli Linoleik Asit
PLL	: Poli L Lizin
PNP	: Polimerik Nanopartikül
PS	: Poli Stiren
PTEN	: Fosfat ve Tensin Homolog
PVA	: Poli Vinil Alkol
RISC	: RNA İndüklü Susturma Kompleksi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNAi	: RNA İnterferans
RNAz	: Ribonükleaz
ROP	: Halka Açılma Polimrizasyonu
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	: Küçük Müdahaleci RNA
ssRNA	: Tek Zincirli RNA
Tg	: Camsı Geçiş Sıcaklığı
TGA	: Termogravimetric Analiz
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
YGF	: Dönüşen Büyüme Faktörü



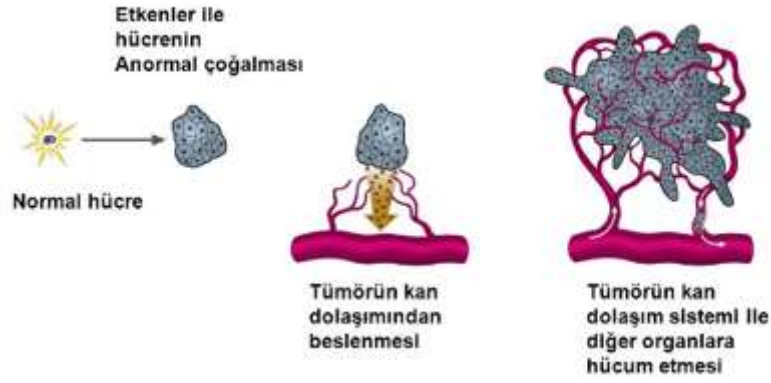
BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 KANSER NEDİR?

Dünyadaki en tahrip edici hastalıklardan olan kanser aynı zamanda önde gelen ölüm sebeplerinden biridir [1]. Genel anlamda kanser, gen ifadelerinde meydana gelen pek çok değişiklik sebebiyle hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki denge halinin bozulup hücrelerin anormal bir şekilde büyümesidir [2]. Kanser terimi, programlı hücre ölüm sisteminin bozulmasını, sınırsız hücre çoğalmasını, hücre fizyolojisindeki değişimleri içeren bir süreçler dizisi olarak tanımlanabilir. Bu olay genellikle diğer dokulara yayılan kötü huylu bir tümör oluşumuna yol açmaktadır. Çok aşamalı kanser oluşumu, kanser gelişimi için yaygın olarak kabul edilmiş bir hipotez olup başlama, ilerleme ve yayılma olarak üç aşamaya ayrılmıştır [3].

Kanser çoğunlukla somatik hücrelerde çeşitli etkenlerle oluşan anormal mutasyonların, normal olan komşu dokuları istila ederek başlangıç noktasından farklı bölgelerde ikincil tümörleri ürettiği bir hastalıktır (Şekil 1.1). İnsanlarda vücudun hemen hemen her dokusunda gelişebilen kanserin yüzden fazla türünden bahsedilebilir. Her kanser türünün kendine has özellikleri olmasına rağmen tüm tümörler, konak dokudaki hücre-hücre dışı matriks arasındaki karmaşık etkileşimin yanısıra genetik ve epigenetik olayları içeren ortak bir ilerleme şemasına göre gelişmektedir [4].



Şekil 1.1 Kanser oluşumunun gösterimi [5].

Kanser, insanoğlunun varoluşundan beri yüzyıllardır her geçen yıl artarak hayatı tehdit etmektedir [6]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayımlanan kanser raporuna göre 2012 yılında karşılaşılan yaklaşık 14 milyon kanser vakasının 8 milyonu ölümlle sonuçlanmıştır [7].

1.2 KANSERİN YAPISI VE BİYOLOJİSİ

Normal şartlarda hücreler bir taraftan kontrollü olarak ihtiyaca göre bölünerek büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalırken diğer taraftan da apoptoz adı verilen programlı hücre ölümü ile yok olmaktadır. Bu döngünün normal seyrinde ilerlemesinde onkogen ve tümör baskılayıcı genler görev üstlenmektedir. Büyüme faktörleri, DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Mutasyona uğrayarak başkalaşan bu genler hücrelerin kontrolsüz büyümesine yol açarak kanser hastalığını ortaya çıkarmaktadır [8].

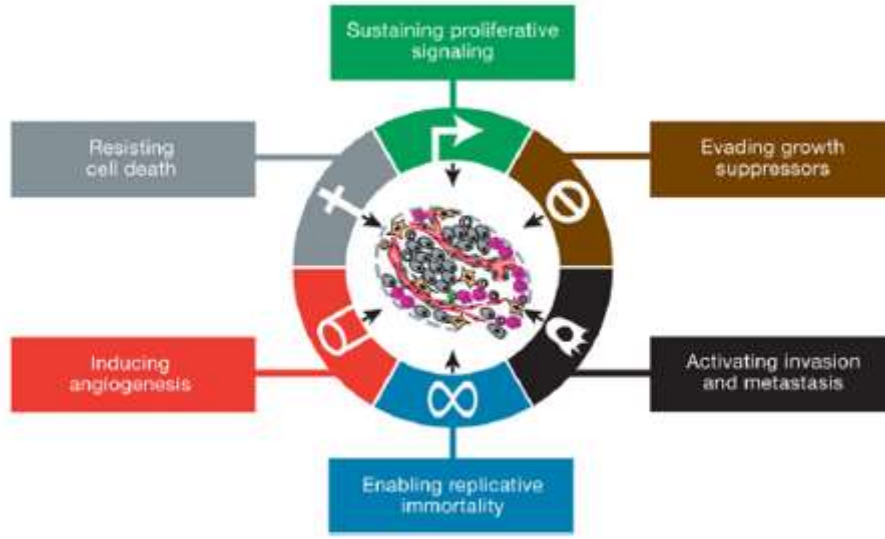
Normal ve kanser hücre biyolojisi arasındaki farklılıklar anatomi, biyokimya ve moleküler biyoloji seviyesindedir. Tümör biyolojisinin karakteristik anatomik özellikleri, kan damarlarının sızıntı özelliğini ve zayıf lenfatik drenajı içermektedir. Kanser damar sisteminde kan endotel hücrelerinin morfolojisi ve şekli, komşu hücreler arasındaki fenestraya bağlı olarak değişiklik gösterir. Böylece kontakt inhibisyon kaybı gerçekleşmektedir. Çoğu katı tümör, belirli bir büyüme seviyesine ulaştıktan sonra artan vasküler geçirgenlikle tümör dokusuna yeterli miktarda besin ve oksijen sağlayarak çevresindeki dokulardan daha hızlı bir şekilde büyümektedir. Tümör kan damarları genellikle kıvrımlı ve geniştir. Bu damarlar, normal dokularla karşılaştırıldığında aşırı döngü ve anriovenöz şant özelliğine sahip dallanma modelleri göstermektedir. Tüm bu özellikler, normal dokulardaki damarlanmaya kıyasla tümörlerde kan damarlarının geçirgenliğini artırarak genellikle normal dokulardaki

damar sistemine giremeyecek olan moleküllerin ve diğer maddelerin tümör dokularına iletimine ve birikimine olanak sağlamaktadır [9].

Tümörler iyi (benign) veya kötü huylu (malign) olarak ikiye ayrılmaktadır. Malign yumuşak doku tümörleri kontrolsüz bir şekilde büyür, komşu dokuları istila ederek tüm vücuda yayılabilir. İyi huylu tümörler ise vücudun diğer kısımlarına yayılmaz fakat buldukları yerde sürekli büyüyerek zamanla çevresindeki organlar için engel teşkil edebilirler [10].

Kanser hücrelerinin kazandığı nitelikler şunlardır (Şekil 1.2):

- **Proliferasyon Sinyalini Sürdürme:** Normal dokular, büyütücü sinyallerin üretimini ve salımını dikkatlice kontrol ederek normal dokunun devamlılığını sağlar. Kanser hücreleri ise bu sinyalleri düzenleyerek kendi kaderlerini kendileri belirler.
- **Büyüme Karşıtı Sinyallerden Kaçma:** Normal hücreler büyüme faktörlerinin miktarına bağlı olarak belirli bir yoğunluğa ulaştınca çoğalmayı durdurur. Kanser hücreleri, hücre çoğalmasını olumsuz etkileyen sinyallerden kaçarak kontrolsüz olarak çoğalabilmektedir.
- **İnvazyon ve Metastas:** Lokal istila ile başlayan süreç malign hücrelerin hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayarak kanser hücresinin normal dokuları etkisi altına alması ile devam edebilir.
- **Sınırsız Replikasyonu Sağlama:** Kanser hücreleri, kromozomların uç kısmında bulunan telomerlerin kısalmasını engellemek için telomeraz enzimi aktivitesini artırarak kontrolsüz olarak çoğalmaktadır.
- **Hücre Ölümüne Karşı Direnç:** Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Birçok kanser türünde p53 gibi apoptoz ile ilişkili genlerde değişiklik görülmektedir.
- **Anjiyogenez:** Normal hücreler gibi kanser hücreleri de metabolik atıkların ve karbondioksitin boşaltılmasını sağlaması yanında oksijen ve besin maddelerine de gereksinim duymaktadır. Anjiyogenez ile elde edilen tümörle ilişkili neovasküler yapı bu gereksinimleri karşılamaktadır. Böylece kanser hücreleri dolaşıma katılmış ve yayılımları hızlanmış olmaktadır [11].



Şekil 1.2 Kanserin özellikleri [11].

Anjiyogenez mevcut damarlardan yeni kan damarlarının geliştiği katı neoplazmaların hayatta kalabilmesi için vazgeçilmez olan karmaşık bir süreçtir. Anjiyogenez yeni damar oluşumu ve tümör gelişimi için lüzumludur. Yalnızca tümör büyümesi için değil metastaz için de elzemdir. Folkman ve arkadaşları katı tümörlerin kendi kan kaynaklarını uyarmadan 2-3 mm çaptan daha fazla büyümediğini göstermişlerdir. Tümör anjiyogenezi, moleküllerin tümör hücreleri tarafından salınması ile başlar. Bu hücreler, normal olan konak hücrelere sinyal göndererek yeni kan damarlarının büyümesini destekleyen protein yapımı için belirli genleri aktive etmektedir [12].

Anjiyogenezin pozitif düzenleyicileri olan moleküller şunlardır:

- Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)
- Platenet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)
- Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)
- Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)
- Dönüşen Büyüme Faktörü (TGF)
- Matriks Metalloproteinazlar (MMP)
- Anjiopietinler [12].

1.3 KANSER ÇEŞİTLERİ

Akciğer Kanseri: Akciğer kanseri, akciğer hücrelerinin kontrol dışı çoğalarak akciğerde bir kitle oluşturması durumudur. Akciğer kanseri, dünyada kanserle ilişkili ölüm oranının en yüksek olduğu kanser türüdür. Akciğer kanserinin üç temel türü arasında, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır [13].

1972 yılında D.J Giard tarafından 58 yaşında bir erkek hastadan izole edilen A549 akciğer kanser hücreleri, akciğer kanser çeşitleri arasında adenokarsinomlar içerisinde değerlendirilen alveol epiteli karsinomudur. Bu hücreler normal dokularda alveol içerisini saran, yassı şekilli, gazların ve elektrolitlerin geçişini sağlayan hücrelerdir [14].

Karaciğer Kanseri: Dünya çapında en sık görülen karaciğer kanserinin temel formu, hepatosellüler karsinomdur. Hepatosellüler karsinom (HPK) kapsamlı epidemiyolojisi nedeniyle komplike bir hastalıktır. Bunun sebebi, tümörlerin yalnızca birçok tümörde ortak olan mutajenik çevresel hasarları değil aynı zamanda hepatit virüslerinden kaynaklanan viral hasarları da içermesidir. Hepatit B ve C enfeksiyonları HPK gelişimi için önemli risk faktörleridir [13].

Prostat Kanseri: Prostat kanseri erkeklerde en sık rastlanan malign kanserdir. Prostat kanserinde sıklıkla görülen genetik lezyon PI3K yolağını antagonize eden fosfat ve tensin homolog (PTEN) tümör baskılayıcı genin kaybedilmesidir. Myc, hücre bölünmesi, transkripsiyon, protein sentezi ve replikasyon gibi çeşitli biyolojik proseslerle ilişkili transkripsiyon faktörüdür. Primer ve metastatik prostat kanserlerinde Myc'in aşırı ekspresyonu gözlenmektedir [13].

Meme Kanseri: Meme kanseri en sık tanısı konan kanser türlerindedir ve dünyada kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen sebebidir. Göğüs kanseri, tümörlerin üç reseptör molekülün ekspresyonuyla sınıflandırılması neticesinde bölümlere ayrılabilir. Bu reseptörler östrojen, progesteron ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'dir. Östrojen reseptör alfa (ER- α) iki tür östrojen reseptöründen biridir. ER- α memedeki epitel hücrelerinin hücre döngüsünde çok önemli bir rol oynamaktadır. Meme kanseri vakalarının yaklaşık %70'inde östrojen reseptörlerinin aşırı ekspresyonu gözlenmiştir [13].

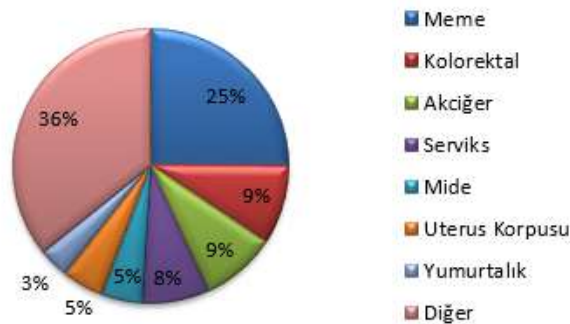
Mide Kanseri: Mide kanseri dünyada en sık karşılaşılan kanser türlerindedir. Özellikle erkeklerde kadınlardan oldukça fazla olarak görülmesi dikkat çekmektedir. Helikobakter pilori

bakterisinin yanı sıra diyet, fazla tuz alımı, sigara ve reflü gastrik adenokarsinoma gelişiminde önemli bir faktördür [15].

Yumurtalık Kanseri: Yumurtalık kanseri kadınlarda en sık rastlanan ve jinekolojik kanserlerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Tedaviye rağmen yumurtalık kanseri hastalarının büyük bir çoğunluğunda kemoterapiye dirençli rekürren tümörler gelişmektedir. Sık görülen bir genetik lezyon tümör susturucu BRCA1'in, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri ile alt edilmesidir. Tümör susturucu PTEN ekspresyonunun genetik veya epigenetik olarak kaybı da sıklıkla görülebilmektedir [13].

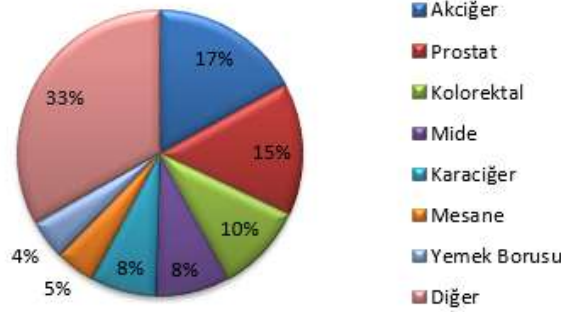
Serviks Kanseri: Serviks kanseri dünya çapında kadınlarda sıkça rastlanan malign hastalıklar arasındadır. Her yıl yaklaşık yarım milyon vaka ile karşılaşılır ve bu sayının yaklaşık yarısı terminal dönemdedir [16]. Serviks kanseri, yayılma potansiyeli olan kanser gelişimine yol açabilen insan papilloma virüsü (HPV) içeren enfeksiyon ile ilişkilidir. HPV'nin en kanserojen genotiplerinin HPV16 ve HPV18 olduğu düşünülmektedir. Çalışmalar yaş ve etnik köken, erken başlayan cinsel yaşam, gebelik ve doğum sayısı (ikiden fazla), vajinit, doğum kontrol hapı kullanımı, sigara kullanımı vs. faktörlerin de serviks kanseri riskini artırabileceğini göstermektedir [17]. Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı bir araştırmaya göre serviks kanseri dünyada ölüm oranının en yüksek olduğu kanser türleri arasında dördüncü sıradadır [7].

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayımlanan bir araştırmaya göre dünyada kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olan meme kanseri %25'lik bir orana sahipken bunu %9 ile kolorektal kanseri takip etmektedir (Şekil 1.3) [7].



Şekil 1.3 Kadınlarda en sık görülen kanser türleri.

Aynı çalışmada dünyada erkeklerde en sık rastlanan kanser türü akciğer kanseri %17'lik bir orana sahip iken bunu %15 ile prostat kanseri takip etmektedir (Şekil 1.4) [7].



Şekil 1.4 Erkeklerde en sık görülen kanser türleri.

1.4 KANSERE NEDEN OLAN ETKENLER

Kanser oluşumu, çeşitli iç ve dış kaynaklı etkenlere maruz kalınması sonucunda oluşan geniş çaplı DNA hasarının bir sonucudur [18]. Kanser oluşumlarının büyük bir kısmı çevresel-davranışsal etkenler ve yaşam tarzı ile ilişkilidir [7].

Kansere neden olan etkenlerden birkaçı şunlardır (Şekil 1.5):

Sigara: Sigara içmek akciğer, üst solunum yolları, yemek borusu, mesane, pankreas, böbrek, mide, karaciğer, bağırsak gibi kanserlere neden olur. Sigara içiminin kötü huylu tümör oluşumu ile sonuçlanıp sonuçlanmayacağı sigaranın içeriği ve alışkanlığın süresi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Çok erken dönemde kazanılan alışkanlıklar, kansere yakalanma riskini büyük ölçüde artırmaktadır. Riskler kanser türüne göre değişmektedir. Mesela sigara içenlerin akciğer kanserine yakalanma olasılıkları mesane kanserine yakalanma olasılıklarından yaklaşık dört kat daha fazladır.

Beslenme: Yetişkinlerde görülen obezite önemli bir endometriyum kanseri nedenidir ve nispeten menopoz sonrası meme kanserine de yol açabilir. Obezitenin kolon, böbrek ve safra kesesi riskini de artırdığı görülmüştür. Yetersiz sebze ve meyve tüketimi de birçok kanser türüne sebep teşkil edebilmektedir. Sebze ve meyvelerin koruyucu etkileri vücudumuzdaki maddelerin kanserojen etkilerini bloke etmektedir. Örneğin gıdalardaki antioksidanların serbest radikalleri nötralize ettiği düşünülmektedir. Sağlıklı gıdalardaki maddelerin, östrojen

gibi steroidlerin göğüs ve başka yerlerdeki kontrolsüz hücre çoğalmasını tetikleyen sinyalleri engellediği öne sürülmüştür.

Radyasyon: Radyasyonun çeşitli formları; güneş, elektrik hatları, ev aletleri, cep telefonları, radyoaktif radon gazı gibi etkenler kansere neden olan etkenler arasında yer almaktadır. Ayrıca güneşin yaydığı ultraviyole ışınlarının da cilt kanserini tetiklediği görülmüştür.

Kimyasal Maddeler: Asbest, benzen, formaldehit gibi birçok kimyasal madde kanserojendir. Kimyasal maddeler ile etkileşim sonucu hücreler normal işleyişten sapmaktadır [19].

Genetik Faktörler: Bazı tümörlerin gelişim sebebi, genetik yatkınlık olarak açıklanabilir. Genetik faktörlerle oluşan kanserler diğer türler içinde küçük bir orana sahiptir. Bu tür kanserlerde bireylere üst kuşaktan aktarılan genlerdeki bozukluklar, ortaya çıkan diğer genetik değişimlerle birlikte kanseri oluşturmaktadır. Aile ağacında kanser belli bir kuşaktan sonra gözleniyorsa bu kuşakta kendiliğinden olan bir mutasyonun çoğalma hücrelerini (germ; sperm ve yumurta) etkilemesi ve bu hatalı genin bir sonraki kuşağa aktarılması da göz önüne bulundurulmalıdır [20].

Virüsler: Kansere neden olan virüslere onkovirüs denilmektedir. İnsanlarda bazı virüsler kanserle ilişkilidir. Örneğin hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsünün (HCV) karaciğer kanseriyle, HPV'nin serviks kanseriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.5 Kanser riskini artıran faktörler [21].

Elde edilen veriler ışığında kanser, çevresel bir faktöre bağlanamıyorsa veya kalıtsal oluşum söz konusu değilse kanserin farklı birçok nedene bağlı olarak kendiliğinden ve nadir olarak gelişen bir formda olduğu düşünülebilir [20].

1.5 KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN GELENEKSEL YÖNTEMLER

Günümüzde kanser hastalarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan yöntemler cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi olarak sıralanabilir.

1.5.1 Cerrahi

Cerrahi, kanser hastalarında en çok kullanılan terapidir. Bu işlem, kanserden etkilenen kısmın tanı ve tedavi amacıyla çıkarılmasını içermektedir. Cerrahi yöntem ile kanseri önlemek, tedavi etmek veya teşhis etmek adına kanserli dokunun veya tümörün çıkarılması hedeflenmektedir. Şayet kanser aşırı ilerlemişse geçici cerrahi yöntem uygulanabilir ki bu şekilde kanser tedavi edilemese bile şikâyetler hafifletilebilmektedir [22].

Her hasta anestezi ve cerrahi işlemi kaldırabilecek vücut direncine sahip değildir. Cerrahi tedavide, ameliyat sonrası yaşanabilecek komplikasyonlar, yaşam kalitesini etkileyebilecek bir organın tümüyle alınması, cerrahi işlemden sonra dahi vücutta kanserli hücrelerin kalmış olması gibi bazı olumsuzluklar yaşanabilmektedir.

1.5.2 Kemoterapi

Kemoterapi, kanserli hücre tedavisinde en çok kullanılan ve ilaç alımını içeren tedavilerden biridir [22]. Bu yöntemle kanserli hücreler toksik etki yaratan ilaçlarla, kanserli hücrelerin bölünmesini sağlayan besin maddelerinin alımını keserek veya hücrelerin bölünmesinden sorumlu mekanizmayı durdurarak öldürülmektedir [23].

Kemoterapi, kemik iliği, sindirim sistemi, kıl kökü hücreleri gibi sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Konvansiyonel kemoterapinin en büyük dezavantajı sadece kanserli hücreler için seçici bir tedavi yapılamamasıdır. Bunun sonucunda beyaz kan hücresi üretiminin azalması, sindirim kanalı iltihabı, saç dökülmesi, organ işlev bozukluğu ve anemi gibi yan etkilerle sıkça karşılaşılmaktadır. Kemoterapik ajanlar hücreye penetre olamaz ve tümörün çekirdeğine

ulaşıp kanserli hücreleri öldüremezler. Makrofajlar tarafından yakalanan kemoterapik ajanlar dolaşımında kısa süreli var oldukları için kanserli hücrelerle tamamen etkileşime girememektedir. Karşılaşılan diğer bir olumsuz durum da ilaçların zayıf çözünürlüğüdür ki buda onların biyolojik membranlara nüfuz etmesine engel teşkil etmektedir [24].

Diğer bir problem kanserli hücre yüzeyinde aşırı üretilen, tümör içindeki ilaç birikimini önleyen ve antikanser ilaçlara karşı direnci geliştiren, ilaca karşı dirençli bir P-glikoprotein ile ilişkilidir. Böylece, uygulanan ilaç tedavisi başarısız olmaya devam etmekte ve istenilen sonuca ulaşamamaktadır [24].

1.5.3 Radyoterapi

Radyoterapi, kanserli vücut bölümüne gönderilen yüksek enerjili ışın demetini içermektedir. Bu yöntemde kanser tedavisi için gama ışınları, X ışınları ve yüklü parçacıklar uygulanmaktadır. İç ve dış radyasyon tedavisi olarak iki tiptir. Radyoterapi kanserli hücrelerin DNA'sını tahrip ederek çoğalmayı durdurmaya çalışmaktadır. Bunun sebebi kanser hücreleri radyasyona karşı aşırı duyarlıdır ve büyük oranda tahrip olabilmektedir. Tek başına ya da cerrahi operasyon ve kemoterapi ile birlikte uygulanabilmektedir [22].

Radyoterapide sağlıklı hücreler yanabilmektedir ve kanserli hücrelerin de yanması muntazam değildir. Sonuçta yanan kısım ölü ve işlevsiz olabilmektedir [23].

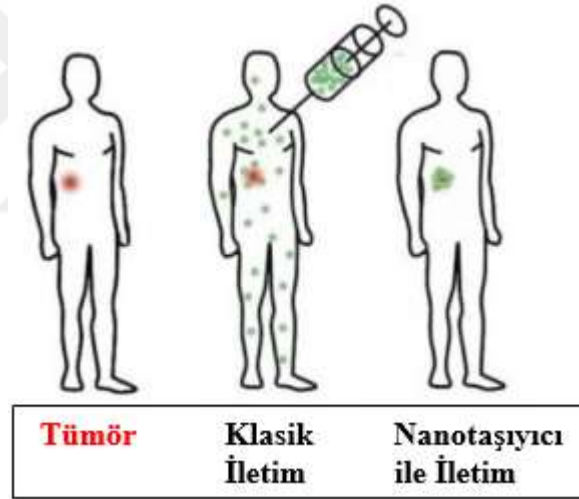
1.5.4 İmmünoterapi

Vücudun tümör büyümesini kontrol etmek için kullandığı bazı sinyalleri taklit eden biyolojik ajanların kullanımı immünoterapi olarak adlandırılmaktadır. Bu ajanlar laboratuvarında üretilen interferonlar, interlökinler, sitokinler, endojen inhibitörleri ve antijenleri içermektedir [25]. Kanser immünoterapisinin ortaya çıkışı, bazen yaşanan şiddetli bir bakteri enfeksiyonu sonrası kanserin gerileyebileceğini gözlemleyen Dr. William Coley ile yirminciyüzyılın başına kadar uzanmaktadır [26]. İmmünoterapi, kanserle mücadele etmek adın vücudun doğal savunmasını artırmak için tasarlanmış bir çeşit kanser tedavisidir. İmmünoterapi, kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak veya yavaşlatmak, kanserin vücudun diğer bölümlerine yayılmasını engellemek ve kanserli hücreleri yok etme görevinde bağışıklık sistemine yardımcı olmak amacıyla kullanılabilir [27].

Sık görülen yan etkiler dermatolojik problemler, mide-bağırsak sorunları, endokrinopati olarak sıralanabilir [28]. Ayrıca uzun süreli bir tedavi gereksinimi ve maliyet açısından pahalı olması tedavinin dezavantajlarındandır.

1.6 KONTROLLÜ İLAÇ SALIM SİSTEMİ VE ÖZELLİKLERİ

Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi kanser tedavisinde dünya çapında sıklıkla kullanılan dört temel yöntemdir. Bununla birlikte yüksek toksisite, düşük biyoyararlanım, suda çözünürlüğün az olması, düşük terapötik indeksler, dolaşımdaki tutarsızlık, nonspesifik biyolojik dağılım ve ilaçların kanser hücrelerinin yanında normal hücrelere de etki etmesi geleneksel kanser tedavi yöntemlerinin temel eksiklikleridir. Bu nedenle yüksek ölüm ve hastalık oranını azaltmak amacıyla yeni, zararsız ve etkili tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır [29] (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 İlacın geleneksel yöntem ve kontrollü sisteme göre iletimi [30].

Kontrollü salım sistemi, vücut tarafından yok edilen ilacı belirli bir zaman periyodunda sürekli ve kontrollü bir şekilde salarak genellikle sıfırıncı dereceden ilaç iletiminin gerçekleştiği salım sistemidir. En ideal lokal veya sistematik kontrollü salım sistemi, ilaç iletiminin önceden belirlenmiş hızda ve belirli bir sürede gerçekleşmesi ile meydana gelen bir sistemdir [31].

Kontrollü ilaç salım sistemleri son altmış yıl içinde ilerleme kaydetmiştir. Bu ilerleme ilk olarak 1952 yılında sürekli salım formülasyonu ile başlamıştır. Birinci nesil ilaç salımı (1950-1980) oral ve transdermal sürekli salım sistemlerini geliştirmeye ve kontrollü ilaç salım

mekanizmalarını kurmaya odaklanmış, ikinci nesil ise (1980-2010) kendi kendini düzenleyen ilaç salım sistemlerini, uzun vadeli çeşitli formülasyonları ve nanoteknoloji temeline dayanan dağıtım sistemlerini geliştirmeye çalışmıştır. İkinci neslin son dönemi çoğunlukla nanopartikül formülasyonlarının incelenmesi üzerine odaklanmıştır [32].

Kontrollü salım sistemleri lokal ilaç dağıtımında etkin bir araçtır. Lokal ilaç salımında temel hedef, bir ilaç ajanının vücudun fiziksel bir bölgesinde terapötik seviyenin oluşmasını sağlamasıdır. Diğer bir hedef de ajanların hedef olmayan dokulara iletimini engelleyerek sistemik toksisiteyi azaltmaktır [33].

Etkili bir ilaç salım sistemi için dört temel unsur vardır. Bunlar; ilacın uygun bir ilaç taşıyıcısına düzgün bir şekilde yüklenmiş olması, parçalanmaktan korunmak için vücut salgılarından kaçarak dolaşımında uzun süre kalabilmesi, hedeflenen bölgeye ulaşım ilacın işlevini yerine getireceği belirli bir süre içinde belirli bir yerde salınması olarak sıralanabilir. Vücutta hedeflenmesi istenen farklı bölgeler için izlenecek rotaya bağlı olarak farklı ilaç taşıyıcı sistemler kullanılabilir [34].

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajları şunlardır:

- Uygulanacak doz sıklığının ve dozaj miktarının azaltılması
- Tedaviyle ilgili hasta uyumunun iyileştirilmesi
- Kan plazmasında ilaç konsantrasyonunun sürekli korunması
- Yüksek doz nedeniyle oluşan toksisitenin azaltılması
- İlacın plazma düzeyinde konsantrasyon dalgalanmalarının azaltılması [35].

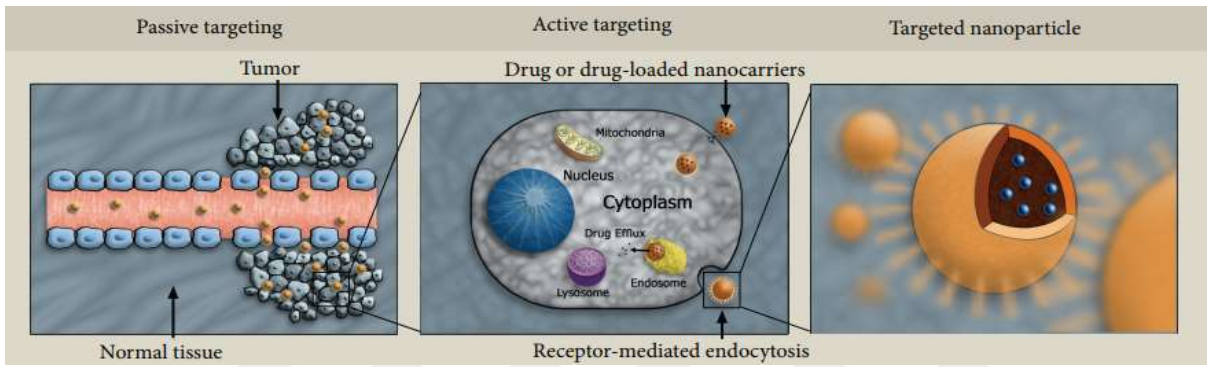
Yarılanma ömrü kısa olan ilaçların daha fazla dolaşımında kalmasını sağlamak, geleneksel tedavi yöntemlerine nazaran ilacın yan etkilerini azaltmak veya tamamen ortadan kaldırmak, en önemlisi de hedefe yönelik tedavi olması nedeniyle sağlıklı dokuların zarar görmesini engellemek bu yöntemin belli başlı avantajları arasındadır.

1.7 İLAÇ HEDEFLEME YÖNTEMLERİ

Hedefli tedaviler tümörün büyüme ve gelişmesinde rol alan belirli biyolojik transdüksiyon yollarını veya kanser proteinlerini engellemeyi amaçlamaktadır. Normal dokularda da

bulunan bu proteinler kanserli hücrelerde çok daha fazla sayıda veya mutasyona uğramış şekilde bulunmaktadır. Bu yenilikçi tedavilerin hedefi malign hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüüp gelişmesine yardımcı olan sinyalleri engellemek, apoptozun indüksiyonu ile kanser hücrelerinin ölümünü sağlamak, bağışıklık sistemini uyarmaktır. Ayrıca, sağlıklı hücrelerin ölümünü en aza indirmek yahut istenmeyen yan etkileri ortadan kaldırmak için kemoterapi ajanlarını spesifik kanser hücrelerine hedefli olarak iletmektir [36].

İlaç hedefleme stratejileri pasif hedefleme ve aktif hedefleme olmak üzere iki kategoriye ayrılmıştır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 İlaç hedefleme yöntemleri [24].

1.7.1 Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme sızıntılı vasküler tümör etrafındaki alanlarda ilaç birikimine dayanmaktadır. Yaygın olarak artırılmış geçirgen ve alıkonma (EPR) etkisi olarak adlandırılmaktadır [37].

Tümörlerin birçoğunda besin ve oksijen ihtiyacı nedeni ile damarsal geçirgenlik yükselmektedir. Normal damarlarda 2 nm'den büyük moleküller sıkı bağlantılar nedeni ile endotel hücreler arasından geçemezken, tümör bölgesindeki mutasyondan dolayı 10-500 nm arası boyutlu moleküller dokuya geçip birikebilmektedir. Bozulmuş lenfatik boşaltım nedeni ile de moleküllerin sistem dışına çıkmaları zorlaşmaktadır [38].

Retikuloendotelial sistemden kaçmak için boyut ve yüzey özellikleri ayarlanmış taşıyıcı sistemler kan dolaşımında daha uzun süre kalma ve hedeflenen tümör dokularına ulaşma şansını artırmaktadır [39].

1.7.2 Aktif Hedefleme

Aktif hedefleme ile ligand-reseptör, antijen-antikör gibi moleküler tanıma formlarından yararlanılarak belirli bir bölgeye partikül veya ilaç gönderilmektedir [40]. Kontrolsüzce büyüyen tümörün artan besin ihtiyacı, hastalıklı doku ve hücrelerin farklı yüzey reseptörlerini artırmaktadır. Katı tümörler kanserli ve sağlıklı hücrelerin heterojen bir karışımından oluşmakta ve bunlar arasında ayırım yapabilecek nanotaşıyıcıların geliştirilmesi önem teşkil etmektedir. Bu nedenle aktif hedeflemenin temeli ilaç taşıyıcıların çevresinin, sağlıklı hücre ve damarlarda daha az iken kanser hücrelerinde veya damar bölgesinde daha fazla bulunan reseptörleri seçebilecek hedefleyici ligandlarla kaplanmasına dayanmaktadır [41].

Ligand-Reseptör Aracılı Hedefleme: İlaç taşıyıcı, ligand ve hücre reseptörü arasındaki belirli bir etkileşim sayesinde hedef dokunun hücresel bölmesine nüfuz etmektedir. Bu yöntemde, hücre yüzeyindeki reseptöre yönelik bir liganda ihtiyaç duyulmaktadır. Ligand-reseptör etkileşimi, ilaç taşıyıcının internalizasyonuna ve ilacın hücre içine salımına sebep olmaktadır. Katı tümörlere aktif hedeflendirme, hedef hücre ve reseptörlerine erişebilmek adına taşıyıcının dokular arası boşluğa ekstrasvazyonudur [42].

Bununla birlikte bir ligand ve reseptör arasındaki etkileşim, aralarındaki uzaklık 0,5 mm'den daha az olduğunda mümkündür. Aktif reseptör hedeflemenin aslında ligand-reseptör etkileşimi anlamına geldiğini ancak bu olayın kan dolaşımı ve ekstrasvazyondan sonra oluştuğu sonucuna varılabilir [34].

Moleküler hedefler, kanserli hücre yüzeylerinde aşırı üretilen reseptörler ve tümör dokusunu besleyen damarlarda aşırı üretilen reseptörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Nanopartiküllerin aktif hedeflemede kullanımı için ilk strateji, tümör hücrelerinde aşırı üretilen yüzey reseptörleri tarafından spesifik olarak tanınabilen antikör, protein, peptit, aptamer, sakkarit veya folik asit vb. küçük molekülü ligandlarla nanopartikül yüzeyinin kaplanmasıdır. Böylece hedeflenmiş nanopartiküller komşu sağlıklı hücreleri etkilemeksizin reseptör aracılı endositoz yolu ile tümör hücreleri tarafından emilmektedir. Bu yöntem, kanser tedavisinin etkinliğini artırmak ve geleneksel tedavi yöntemlerinin yan etkilerini azaltmak adına EPR etkili pasif hedeflemeyi tamamlayıcı niteliktedir. İkinci strateji ise tümörü besleyen kan damarlarının hedeflenmesidir. Nanopartiküllerin tümör damarlarına doğrudan

hedeflenmesiyle, tümörün gelişmesi için gereken besin ve oksijen ihtiyacını engelleyerek tahrip olmasını sağlamaktadır [41].

Manyetik Hedefleme: Manyetik hedefleme yaklaşımı, dışarıdan lokalize bir manyetik alan uygulanarak manyetik ilaç taşıyıcısına bağlanmış veya enkapsüle edilmiş terapötik ajanın intravenöz enjeksiyon ile tümör dokusuna yönlendirilmesini kapsamaktadır. Manyetik ilaç taşıyıcıları genellikle manyetit, demir, nikel, kobalt gibi maddeler içermektedir [43].

Yönlendirilen manyetik taşıyıcının hedef tümör sitesinde birikmesinin ardından ilaç manyetik taşıyıcıdan salınmakta ve tümör hücreleri tarafından etkili bir biçimde alınmaktadır. Taşıyıcının ilaç birikim etkinliği, manyetik alan şiddeti, kan akış hızı ve taşıyıcının yüzey karakterizasyonu gibi çeşitli parametrelere bağlıdır [44].

Ultrasonik Hedefleme: Ultrasonik dalgalar 20 kHz veya daha yüksek frekanslı ses dalgalarından oluşmaktadır. Ultrason, ısı yoluyla tümör tedavisi için uygulanan tümör ablasyonunda etkili ve güvenli olduğu kanıtlanmış bir medikal prosedürdür. Doku, yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrasonun (HIFU) termal, kimyasal ve mekanik etkileri sayesinde minimal yan etkilerle ablasyona tabi tutulmaktadır [45]. Yöntemde ultrasona duyarlı biyobozunur veya biyobozunur olmayan polimerler kullanılabilir. Yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason, primer katı tümör ve metastatik hastalığı tedavi etmek için invaziv olmayan ve ekstrakorporeal yöntem olarak tanımlanmaktadır. Doku sıcaklığını hızlıca sitotoksik bir düzeye yükseltmek için gereken enerji bu yolla sağlanabilmektedir [46].

Ultrason hem tanı hem de tedavi amaçlı kullanılabilir. İlaç salımı frekans, şiddet gibi birtakım parametrelere bağlıdır [47].

1.8 KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Tedavi edilecek bölgeye ilaç iletilmesinde birtakım sınırlamalarla karşılaşıldığı için bu konu araştırmacıların ilgisini çekmektedir. İlaç iletimi basitçe, biyoaktif bir ajanın belirli bir hızda belirli bir bölgeye salınması süreci olarak tanımlanabilir. İlaçların çoğu düşük çözünürlük, yüksek toksisite, agregasyon, degradasyon, kısa yarılanma ömrü gibi sınırlayıcı niteliklere sahiptir. Günümüzde ilaç iletim sistemleri, ilaçların sorunlarının azaltılması için çeşitli disiplinlerden araştırmacılar tarafından hızla geliştirilmektedir [48].

İlaç iletim sistemi, aktif ilacın çözüldüğü, dağıtıldığı, kapsüllendiği veya aktif maddenin üzerine adsorbe edildiği/bağlandığı bir ilaç taşıyıcıdan oluşmaktadır. İlaç taşıyıcı malzemeler ilaç iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. Nanoparçacıklar, mikroküreler, mikrokapsüller, emülsiyonlar gibi bu taşıyıcılar farklı kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılabilir [49].

1.8.1 Mikroküreler

İlacın polimerik bir matriste homojen olarak çözüldüğü veya dağıtıldığı sistemlerdir [50]. Mikroküreler, parçacık boyutları 0,1-200 µm aralığında olan biyolojik olarak parçalanabilen veya parçalanamayan malzemelerden elde edilen küçük küresel parçacıklardır. İlaç emilimi ve mide-bağırsak sisteminde rahatsızlık uyandıran ilaçlara karşı yan etkiler, mikrokürelerin küçük parçacık boyutundan ötürü iyileştirilmiştir [51]. Mikroküreler, proteinler, polisakkaritler, polyesterler ve lipidler gibi polimerik malzemelerden çeşitli tekniklerle üretilmektedir [52]. Sabit ve uzun süreli terapötik etkileri, dozaj sıklığının azaltılıp hasta uyumluluğunun iyileştirilmesi, küresel şekil ve küçük boyutu nedeniyle vücuda daha kolay enjekte edilebilmesi, biyoyararlanımı artırıp yan etkileri azaltabilmesi, bozunum ve ilaç salımı bakımından kontrol edilebilir olması gibi avantajları bulunmaktadır [53].

1.8.2 Mikrokapsüller

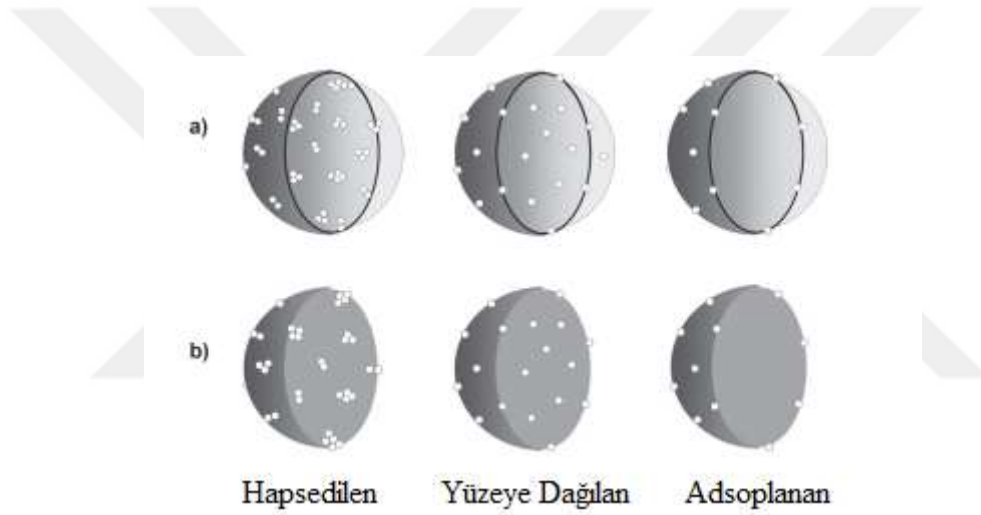
Mikrokapsüller, ilaç ihtiva eden çekirdeğin tamamen bir polimer kabukla çevrelendiği bir sistemdir. Çekirdek katı, sıvı veya gaz olabilmektedir. Mikrokapsülleme, katı, sıvı veya gazın polimerik bir matris veya kabuk içinde tutulması işlemidir. Kötü koku ve tatları gizlemek, ilaçları çevre etkisinden korumak, partikül boyutunu azaltıp az çözünen ilaçların çözünürlüğünü artırmak, sürekli, hedefli ve kontrollü ilaç salımı gerçekleştirmek, kolay sıvı taşınımını sağlamak, buharlaşmayı önlemek, zehirli maddeleri güvenli bir şekilde taşımak mikrokapsülleme işleminin amaçlarındandır [50].

1.8.3 Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm aralığında olan sentetik veya yarı sentetik polimerlerden oluşan kolloidal yapılardır. İlaç çözünebilme, partikül içinde hapsedilebilme, enkapsüle edilebilme veya nanopartiküle bağlanabilmektedir. Geleneksel matris veya ilaç iletim sisteminin yanı sıra kolloidal ilaç iletim sistemi popülerlik

kazanmıştır. Kolloidal ilaç iletim sistemi başlıca lipozom ve polimerik nanopartiküllerden oluşmaktadır. Polimer esaslı nanoparçacıklar ilaç, protein ve DNA'yı hedef hücre veya organlara etkili bir şekilde taşımaktadır. Nanometre seviyesindeki boyut, hücre membranlarından geçme ve kan akışındaki stabilite adına olumlu bir etki oluşturmaktadır. Bu sistemlerle öncelikle hedefli ilaç iletiminde, kontrollü ilaç salımını ve suda az çözünen ilaçların çözünme oranını/biyoyararlanımını artırmak amaçlanmaktadır [54].

Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemine bağlı olarak nanokapsüller veya nanoküreler elde edilebilmektedir. Nanokapsüller, ilacın polimer zarı ile çevrili bir boşlukta hapsedildiği sistemlerdir. Nanoküreler ise ilacın fiziksel ve eşit olarak dağıldığı matris sistemlerdir [55] (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 Enkapsülasyon mekanizması modeli: hapsedilen, yüzeğe dağılan ve adsoplanan ilaç (a) nanokapsüller (b) nanoküreler [56].

Nanopartiküller, geniş yüzey alanı ve sınırlı kuantum mekanik etkileri ile farklı manyetik, termal, optik ve elektriksel özellikler göstermektedir. Normal organlara zarar vermeden tümör dokusuna hedeflenebildikleri için genellikle ilaç taşıyıcısı olarak geliştirilip kullanılmaktadır. İdeal nanopartikül taşıyıcıların, biyobozunur, kararlı, immünojenik olmayan, kolay üretilebilir, ucuz maliyetli ve yüklerini yalnızca hedef bölgeye serbest bırakabilme özelliğine sahip olmaları istenmektedir [57].

İlaçların polimerik nanokapsülasyonu, ilacın etkinliğini, özgünlüğünü, dayanıklılığını ve tedavi ediciliğini artırmaktadır. Nanoparçacıkların hedefleme yetenekleri, partikül boyutu, yüzey yükü, yüzey modifikasyonu ve hidrofobiklik gibi birtakım özelliklerden

etkilenmektedir. Bunların arasından nanoparçacık boyut-boyut dağılımı, nanoparçacıkların hücre zarı ile olan etkileşimleri ve fizyolojik ilaç bariyerlerine karşı nüfuz yeteneklerini belirlemek açısından önem teşkil etmektedir. Katyonik yüzey yükü, nanoparçacıkların hücrelerle etkileşimi ve dolayısıyla internalizasyon oranını artırmaktadır. Hidrofobik yüzeyli nanopartiküller hızlı opsonize edilir ve mononükleer fagositik sistemin sabit makrofajları tarafından temizlenmektedir. Kan dolaşımında kalış süresini ve kalıcılığı artırmak adına yüzeyin hidrofilik polimerle kaplanması, parçacık yüzeyinde plazma proteinlerini uzaklaştıracak etki yaratabilmektedir. Salım mekanizması, kullanılan polimerin molekül ağırlığı ile modüle edilebilmektedir. Polimer ağırlığı arttıkça ilaçların salımı daha yavaş olabilmektedir [58].

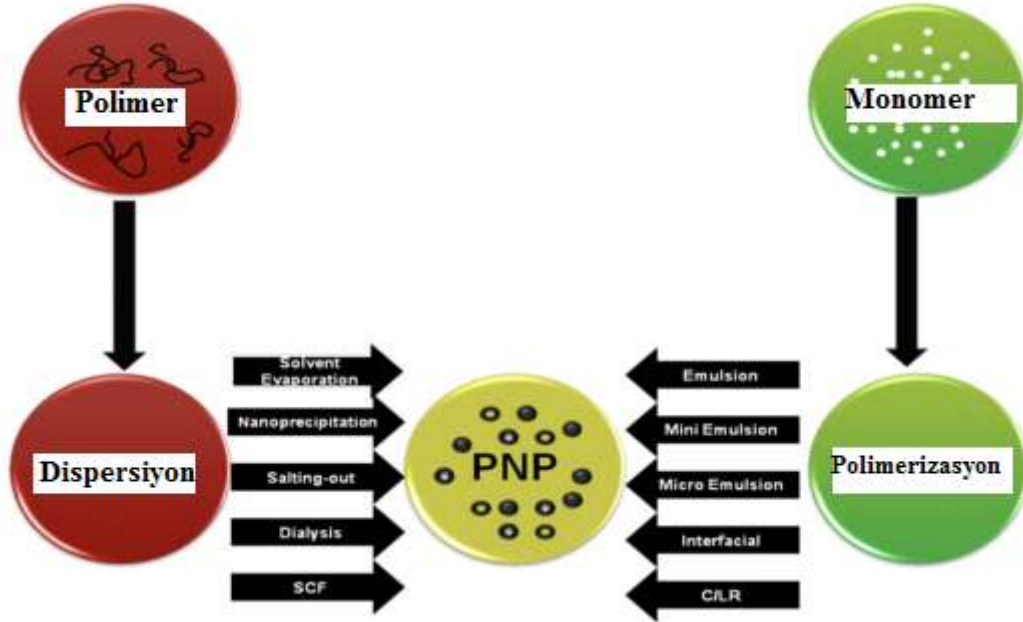
Nanoparçacık, polimerik zar ve matris boyunca çekirdekten kontrollü difüzyon veya erozyon yoluyla ilacı salabilecek bir polimer ile kaplanır. Bu membran kaplaması ilaç salımında bariyer görevi görmektedir. Bu nedenle polimerik membrandaki ilacın çözünürlüğü ve yayılabilirliği ilaç salımında önemli bir faktör haline gelmektedir. Genel olarak ilaç salım hızı, ilacın çözünürlüğüne, yüzeye bağlanmış veya adsorbe edilmiş ilacın desorpsiyonuna, nanoparçacık matrisi boyunca ilaç difüzyonuna, nanopartikül matrisin aşınma veya bozunmasına ve bu erozyon/difüzyon sürecinin kombinasyonuna bağlıdır [59].

Polimerik ilaç taşıyıcılar ilacı üç temel fizikokimyasal mekanizma ile hedef doku bölgesine iletmektedir. Birincisi, polimerik nanoparçacıkların hidrasyon yoluyla şişip ardından difüzyon yoluyla salım yapması, ikincisi, polimerin hedeflenen bölgede kopması, bölünmesi veya bozunması ile sonuçlanan bir enzimatik reaksiyon sonucu ilacın hapsedildiği çekirdekten salınmasıdır. Üçüncüsü ise ilacın, polimerden ayrılması ve şişmiş nanopartiküllerden salımıdır. Polimerik nanopartiküller, polimer seçimi ve ilaç salımını düzenleme kabiliyetleri sayesinde kanser terapisi, aşı verilmesi, kontraseptifler ve hedefli antibiyotik iletimi için ideal bir adaydır [55].

1.8.3.1 Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Hazırlama yönteminin seçimi, kullanılan polimerin yapısına ve etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri olarak önceki dönemlerde monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanan yöntemler kullanılmıştır. Günümüzde ise, tam olarak karakterize edilmiş, önceden sentezlenmiş polimer

veya doğal makromoleküllerin dispersiyonuna dayalı yöntemler daha fazla kullanılmaktadır (Şekil 1.9) [60].



Şekil 1.9 Birkaç nanopartikül hazırlama yönteminin şematik gösterimi [61].

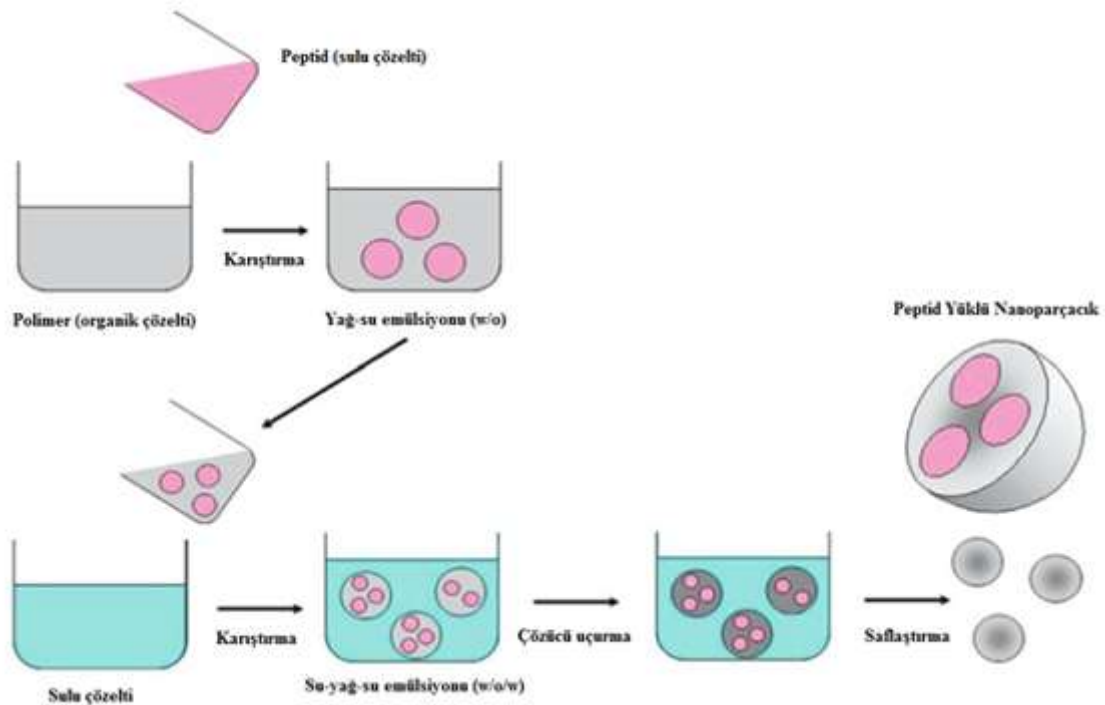
Yüzeyleyarak Polimerizasyon: Monomerin arayüzeyde polimerleşmesiyle nanopartiküllerin oluşması esasına dayanmaktadır. Su/yağ emülsiyonu hazırlandıktan sonra bu emülsiyona polimeri oluşturacak monomer çözeltisi ilave edilir. İç faz olarak metanol, dış faz olarak yüzey etkin madde ve organik çözücü içeren emülsiyon, yüksek hızda karıştırılarak monomerin organik çözücüdeki çözeltisi eklenip polimerizasyon gerçekleştirilmektedir. Oluşan nanopartiküller santrifüj edilip ayrıldıktan sonra yıkanarak liyofilize edilmektedir [62].

Nanoçökeltme: Suyla karışabilen bir organik faz içinde çözünen polimerik malzemenin, poli (vinil alkol) (PVA) gibi sürfaktan madde içeren su fazına manyetik karıştırma altında eklenmesi ile nanokürelerin kendiliğinden çökmesi esasına dayanmaktadır. Nanoçökeltme yöntemi; polimer, polimer çözücüsü, polimerin çözünmediği bir çözücü olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır [63].

Çözücü Buharlaştırma Yöntemi: Uygun bir çözücüde çözünen polimerin kurutulması esasına dayanan bu yöntem, polimerik nanopartikül üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Suyla karışmayan diklorometan, kloroform gibi bir çözücü içinde polimer çözünmekte ve sürfaktan içeren sulu fazda emülsüfiye edilmektedir. İç fazdaki damlacıkların

agrega olmasını engellemek amacıyla sürfaktan kullanılmaktadır. Emülsifikasyon süreci mekanik karıştırma, sonikasyon ya da yüksek basınçlı homojenizasyonla gerçekleştirilebilmektedir. Ardından oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda ya da düşük basınç altında çözücü buharlaştırılmaktadır. Sertleşen nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanarak distile su ile birkaç kez yıkanıp katkı maddelerinin uzaklaşması sağlanmaktadır. Son olarak örnek liyofilize edilmektedir [63].

Nanopartiküllere yüklenen moleküllerin hidrofilik olması durumunda çoğunlukla ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi (su/yağ/su) kullanılmaktadır (Şekil 1.10). Bu yöntemde, etkin maddenin sulu çözeltisinin polimer içeren organik faz içerisinde dağıtılması ile su/yağ emülsiyonu elde edilmektedir. Bu emülsiyonun dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilmesiyle su/yağ/su ikili emülsiyonu, etkin madde çözeltisini içeren polimer çözeltisi damlacıklarını oluşturmaktadır. Buharlaştırma işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra etkin maddenin çözeltisini içeren nanopartikül süspansiyonu meydana gelmektedir. Süspansiyonun santrifüjlenmesi ile elde edilen nanopartiküller suyla yıkanıp kurutulduktan sonra liyofilize edilmektedir [60].



Şekil 1.10 Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi [60].

Emülsiyon Çözücü Difüzyon Yöntemi: Çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye edilmesiyle oluşmuş bu yöntemde polimer enkapsülasyonu için, benzil alkol gibi kısmen suda çözünen bir çözücüde çözünerek ortam termodinamik dengeye ulaşıncaya dek su ile doyurulmaktadır. Suyla doyurulmuş çözücü-polimer fazı, yağ/polimer oranına göre nanopartikül oluşturan ve dış faza çözücü difüzyonuna yol açan stabilizör içeren sulu çözelti ile emülsifiye edilmektedir. Ardından kaynama noktalarına göre buharlaştırma veya filtrasyon yoluyla çözücü uzaklaştırılmaktadır [64].

1.9 KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİNDE KULLANILAN POLİMERLER

Uygulanan anti kanser ilaçların birçoğu polimerlere kıyasla düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir ve hidrofobik özelliktedir. Bu tür küçük moleküler anti kanser ilaçları kan dolaşım sisteminden hızlı bir şekilde tasfiye edilmelerinin yanı sıra toksik yan etkilere de sahiptirler [65].

Polimer adı verilen tekrarlayan uzun zincirli yapılar, ilaç taşıyıcısı olarak ve lipit veziküllerdeki avantajlarından ötürü son yıllarda çok fazla ilgili görmektedir. Ancak bu amaçla kullanılabilmesi için polimerin biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olması gerekliliği nedeniyle her polimer ilaç taşıyıcısı olarak kullanılamamaktadır. Biyoyumluluk terimi ile herhangi bir bağışıklık tepkisi vermeden uzun süre vücutta barınabilen madde kastedilmektedir ki bu özellik vücuda yapılan bir implant veya ilaç taşıyıcıları için temel bir unsurdur. İmplant ve enkapsüle edilen ilacı vücuda iletmek amacıyla kullanılan polimerler arasındaki önemli bir fark biyobozunurluklarıdır. Bu terim, organizmadaki bozunma/parçalanma anlamına gelmektedir. İlaç verildikten sonra polimerin hücrelerde kalması ve birikmesi istenmeyen bir durumdur. Bunun yerine hidroliz ile temizlenmesi ve toksik olmaması istenir. Bozunma süresi ne çok uzun ne de çok kısa olmalıdır [66].

Bilim insanları tarafından yirminci yüzyılın son yarısında biyomedikal uygulamalar için biyoyumlu, uygun mekanik özellikler sergileyecek yeni polimerik malzemeler düzenleyen veya var olanları değiştiren birtakım çalışmalar yapılmış ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin uzun süreli ilaç iletim sistemlerinde etkili oldukları kanıtlanmıştır [67].

Kontrollü salım sistemlerinde kullanılmak üzere biyoyumlu ve biyobozunur polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu, biyoyararlanımı artırmak, vücuttaki ilaç faaliyetini sürdürmek,

belli bir bölgeye lokalize etmek ve hedeflemek gibi potansiyel uygulamaları nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir [68]. Biyobozunur polimerler doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki grupta incelenebilir (Çizelge 1.1) [69].

Doğal polimerler, diğer bir deyişle biyopolimerler, doğrudan yeşil bitkiler, hayvanlar, yosunlar, bakteriler ve mantarlar gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir [70]. Doğal polimerler, polisakkaritler, polipeptitler ve polinükleotitleri içeren üç temel sınıfa ayrılmaktadır. Polisakkarit ve polipeptitlerin büyük bir çoğunluğu başarılı bir şekilde anti kanser ilaçlarla kombine edilebilmektedir [71].

Sentetik polimer, genellikle organik çözücülerde çözünme özelliğine sahip, polietilen glikol veya polihidroksipropil metakrilamid gibi insan yapımı polimerlerdir [71]. Polimerler insan tarafından sentezlendiği zaman istenen biyolojik uygulamaya uygun malzemeyi üretmek ve polimer yapısının bazı yönlerini kontrol etmenin yanı sıra kimyasal kompozisyon, üç boyutlu yapı, malzeme özellikleri ve ilaç ile etkileşime girecek fonksiyonel grupların oryantasyonu da ayarlanabilmektedir. Biyobozunur sentetik polimerler olduğu gibi biyobozunur olmayan sentetik polimerler de mevcuttur. Biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler, polimer ana zincirlerinde ester, ortoester, amid, üre ve üretan içermektedir. Biyobozunur olmayan polimerlerin biyobozunurluklarını bu tür kısımlar ekleyerek artırmak mümkündür [72].

Çizelge 1.1 Doğal ve sentetik bazı biyobozunur polimerler.

DOĞAL POLİMERLER		SENTETİK POLİMERLER
Protein Esaslı	Polisakkaritler	PLA poli (laktik asit)
Kollajen	Kitosan	PGA poli (glikolik asit)
Albümin	Dekstran	PCL poli (ε-kaprolakton)
Jelatin	Nişasta	PEA poli (esteramit)
	Selüloz	Poli ortoester
	Aljinat	Polianhidrid

Kollajen, insan vücudunda cilt ve diğer kas-iskelet dokularının ana bileşeni olarak en bol bulunan proteindir. Yaklaşık üç yüz nanometre uzunluğunda ve üç yüz bin molekül ağırlığında çubuk tipli bir polimerdir. Kollajenler, karşılık gelen aminoasitleri elde etmek için vücutta kollajenaz ve metaloproteinaz gibi enzimler yoluyla enzimatik degradasyona uğramaktadır. Enzimatik olarak parçalanabilmesi yanında eşsiz fizikokimyasal, mekanik ve biyolojik özelliklere sahip olmasından dolayı kollajenler biyomedikal uygulamalara yönelik araştırmalar için oldukça caziptir [73].

Albümin, insan kan plazmasında toplam plazma kütlelerinin neredeyse yüzde ellisini oluşturan bir proteindir. Çözünürlüğü ve polimer zinciri boyunca fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle albümin, membran, mikroküre, nanofiber ve nanoküre gibi çeşitli şekil ve formlara kolaylıkla işlenebilmektedir. Ayrıca üstün kan uyumluluğu nedeniyle, intravenöz ilaç ve gen iletimi için taşıyıcı bir araç olarak albümin için geniş çapta araştırmalar yapılmaktadır [73].

Kitosan, tamamen asetillenmiş bir polimer olan ve eklem bacaklıların dış iskeletini oluşturan kitinin deasetilasyonu yoluyla üretilen bir polimerdir [73]. Kitosan, biyolojik uyumluluğu, biyobozunurluğu ve toksik olmayan yapısı ile değerli bir biyomateryaldir. Katyonik karakter ve potansiyel fonksiyonel grupları kitosanın birçok medikal ve farmasötik uygulama için cazip bir polimer olmasını sağlamaktadır [69].

Dekstran, sakkarozun *leuconostoc mesenteroides* adlı bir bakteri tarafından fermentasyonu sonucu oluşan bir polimerdir. Suda çözünürlük, biyoyuymuluk ve biyobozunurluk özellikleri sebebiyle dekstran, proteinlerin, aşı ve ilaçların sürekli iletimi için kullanılan polisakkarit polimer olarak kabul görmüştür [69].

Poli (laktik asit) (PLA), laktik asit monomerlerinin veya siklik laktid dimerlerinin polimerizasyonu ile sentetik olarak üretilen termoplastik biyobozunur bir polimerdir [69]. PLA ve kopolimerleri geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. PLA, biyoyumlu, hidroliz ve enzimatik aktivite ile biyolojik olarak parçalanabilen, düşük immünojeniteli, çoklu uygulamalara uyabilecek şekilde tasarlanabilen geniş bir mekanik ve fiziksel özellikler dizisine sahiptir [74]. PLA'nın kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanımı oldukça yaygındır.

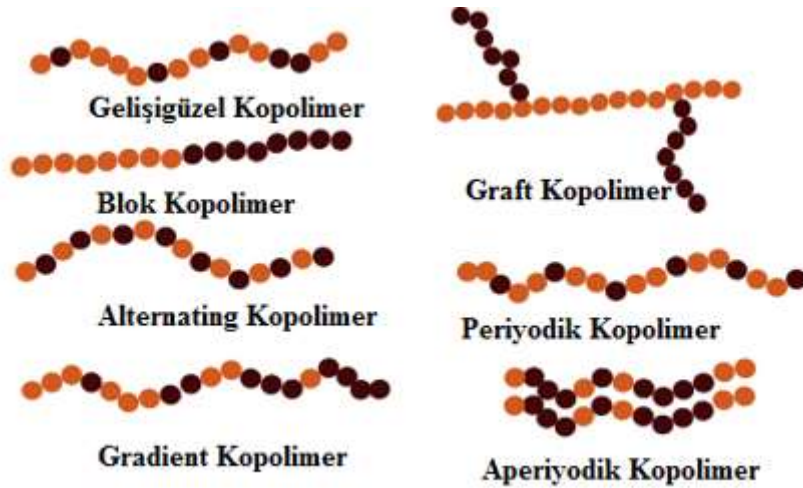
Poli (glikolik asit) (PGA), biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere araştırılan ilk biyobozunur sentetik polimerlerden biri olarak düşünülebilir. Poliglikolik, yüksek kristalinitesi

sayesinde mükemmel mekanik özelliklere sahiptir [73]. PGA genellikle glikolik asit siklik diesterinin halka açılma polimerizasyonu ile elde edilen sert, dayanıklı ve kristalimsi bir polimerdir. PLA gibi poliesterlerin aksine, PGA birçok polimer çözücünde çözünmemektedir. PGA'nın düşük çözünürlüğü ve yüksek erime sıcaklığı nedeniyle ilaç uygulamalarındaki kullanımı sınırlıdır [69]. Bu nedenle, poliglaktit doğasında olan bazı dezavantajlarını iyileştirmek için poliglaktit birimleri içeren çeşitli kopolimerler geliştirilmektedir [73].

Poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), yarı kristalin bir polimerdir ve nispeten ucuz bir birim olan ϵ -kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonu yoluyla elde edilebilmektedir. PCL, birçok organik çözücünde çözünebildiği için kolay işlenebilir bir polimerdir. Yavaş bozunması, birçok ilaca yüksek geçirgenliği, toksisite yaratmaması nedeniyle uzun süre zarfında etki edecek şekilde ilaç salım aracı olarak kullanılmaktadır [73].

1.9.1 Kopolimerler

Kopolimerler, iki veya daha fazla monomer türünden sentezlenen polimerlerdir. Komonomerlerin farklı sıralanışına bağlı olarak kopolimerler, gelişigüzel veya istatistiksel kopolimerler, blok veya halkalı kopolimerler, graft kopolimerler, alternatıng kopolimerler, periyodik kopolimerler ve son yıllarda ortaya çıkan gradient kopolimerler olarak kategorize edilmektedir (Şekil 1.11) [75].



Şekil 1.11 Kopolimer Türleri [75].

İki ayrı maddenin karışımından elde edilen ürünler bazen bu yapıyı oluşturan ürünlerden daha iyi özellikler taşıyabilmektedir. Bir polimer zinciri boyunca farklı monomer birimlerinin varlığı polimerin bazı özelliklerini geliştirebilmekte veya polimere yeni özellikler

kazandırabilmektedir. Ana polimer zinciri üzerinde farklı birimlerin yer alması kopolimerizasyon tepkimeleriyle sağlanmaktadır [76].

Daha iyi özellikler gösteren ileri polimerik malzemeler oldukça ilgi görmektedir. Yapısında farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri barındıran blok ve graft kopolimerler en çok rağbet gören malzemeler arasındadır [77].

Blok ve graft kopolimerleri oluşturan değişik bloklar türlerine göre kopolimere, amfifilik, elastomer ve/veya biyobozunur özellikler kazandırır. Polimerlerin kimyasal modifikasyonu son yıllarda ilgi çeken araştırma konuları arasında yer almaktadır [78].

Blok kopolimerlerde, farklı birimler bloklar halinde zincir içerisinde yer almaktadır. Graft kopolimerlerde ise diğer monomer biriminin zinciri ana polimer üzerinde değil yan zincir olarak kopolimer yapısında yer almaktadır [76].

Serbest radikal, anyonik, katyonik, koordinasyon, grup transfer, katılma, basamaklı, metatez ve makro başlatıcılar gibi çeşitli polimerizasyon metotları blok ve graft kopolimerleri sentezlemek için kullanılmaktadır. Birçok kitap ve makale bu yöntemlerle sentezlenen blok ve graft kopolimerler üzerine yapılan araştırmaları konu edinmiştir [79].

Katyonik polimerizasyon pozitif yüklü aktif merkezler üzerinden yürüyen iyonik bir polimerizasyondur. Kuvvetli protonik asitler ve lewis asitleri gibi başlatıcılar ile başlatılırlar ve stiren, N-vinil karbazol, bütadien, izobütülen gibi elektron verici gruplar taşıyan monomerler bu yöntemde polimerleşirler [80].

Anyonik polimerizasyonda büyümeyi sağlayan aktif uçlar anyonik karakterde olup polimerleşme süreci genellikle karbanyonlar üzerinden ilerlemektedir. Akrilamit, metakrilat, vinil klorür gibi elektron çekici gruplar barındıran monomerler anyonik yolla polimerleşmektedir [80].

Halkalı bileşiklerin polimerizasyonunda kullanılan bir teknik olan halka açılma polimerizasyonu (ROP) biyobozunur ve yenilenebilir türetilmiş malzeme sentezinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Doymamış halkalı eterler, halkalı esterler (laktonlar), halkalı amitler (laktamlar) ve halkalı aminler (iminler) halka açılma polimerizasyonu

polimerleşebilmektedir. Poli(bütlen oksit), poli(etilen oksit), poli(etilen imin), poli(kaprolakton) halka açılma polimerizasyonu ile üretilen bazı ticari polimerlerdir. Halka açılma polimerizasyonunda monomer molekülleri katılma polimerizasyonuna benzer şekilde, birer birer zincirlere katılırlar. Yine katılma polimerizasyonuna benzer şekilde polimerizasyon ortamında yalnız aktif zincirler ve monomer molekülleri arasında tepkime gözlenir ve monomerden büyük iki molekül tepkimeye giremez [80].

Serbest radikal polimerizasyonu zincir polimerleşmesinin radikalleri üzerinden yürümektedir. Serbest radikal, çiftleşmemiş elektronlara sahip reaksiyona yatkın, ara üründür. Isı veya ışık yardımıyla parçalanarak radikal üreten başlatıcılar kullanılarak gerçekleştirilen serbest radikal polimerizasyonda başlama, çoğalma, sonlanma ve transfer reaksiyonları adımları bulunmaktadır. Bu yolla genellikle doymamış monomerler polimerleştirilir. Serbest radikal polimerizasyonları, bir serbest radikali bulunan aktif merkez uca monomerin eklenmesiyle büyür. Her yeni monomerin polimer molekülüne ilavesiyle aktif merkez yeni oluşan zincir ucuna transfer olur [80].

Hidrofobik ve hidrofilik blokları içeren amfifilik graft kopolimerler, malzeme ara yüzey materyallerinin yapısal kontrollerini sağlayan fonksiyonel polimerler sınıfını oluşturmaktadır [81].

Çözücü veya yüzey ortamlarında hidrofilik ve hidrofobik bloklar birbirine yapışarak misel, mikroemülsiyon ve adsorblanmış polimer tabakaları oluşturmaktadır. Özellikle hidrofilik kısım olarak polietilen glikol içeren amfifilik kopolimerler, büyük öneme sahiptir [82].

Şanal vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada PCL-g-PEG amfifilik graft kopolimeri hazırlanmıştır. Amfifilik kopolimerin hidrofilik özelliğinin, kopolimerdeki PEG oranı ile orantılı olarak arttığı ve ayrıca temas açısının da azaldığı gözlenmiştir [81].

1.10 PS-g-PLina VE PS-g-PLina-g-PEG GRAFT KOPOLİMERLERİ

Polistirenler, amorf, yüksek molekül ağırlıklı doğrusal polimerlerdir. Özel katkılarla modifiye edilmedikleri sürece, karbon ve hidrojenle oluşan ve yapısında benzen halkası içeren stiren monomerinin kovalent bağlı birimlerinden oluşmaktadır [83].

Linoleik asit, çoklu doymamış bir yağ asididir. Çoklu doymamış yağın ootoksidayonu medikal uygulamalarda biyolojik esaslı malzemelerin üretimi için kullanılan çok yönlü bir araçtır. Ootoksidayona uğramış polimerler, vinil monomerlerinin serbest radikal polimerizasyonunu başlatan peroksit kısımları içermektedir. Polimer yapısındaki yağ asidi zincirlerinin varlığı polimerin, esneklik, adezyon, su ve kimyasala dayanım gibi bazı fiziksel özelliklerini geliştirmektedir. Bu sayede sahip oldukları eşsiz biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri, bunların biyomedikal alanda kullanımları açısından önemli bir rol oynamaktadır. Hidrofobik yapıya sahip olan yağ asitleri, vücudun doğal bileşeni oldukları için biyobozunur özellikli polimerlerdir. Dolayısıyla ilaç taşıyıcı olarak kullanıldıklarında, ilacı oldukça uzun süreli hapsedme konusunda etkilidirler [84].

Çoklu doymamış yağın ootoksidayonu, yağ bazlı bir polimerin sentezlenmesinde kullanılan en yaygın yollardan biridir. Oksijen ve güneş ışığı altında ağırlıklı olarak hidroperoksidasyon, peroksidasyon, epoksidasyon, perepoksidasyon reaksiyonları ile uygulanır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden bu yöntem kullanılarak makroperoksi başlatıcıları elde edilmektedir [85].

Makroperoksit başlatıcılar, makromoleküler yapılar arasında birkaç peroksit grubu içermektedir. Sahip oldukları peroksit grupları sayesinde blok veya graft kopolimer elde etmek amacıyla vinil monomerlerinin serbest radikal polimerizasyonunu başlatmak için kullanılmaktadır [86].

PEG, nötr, toksik olmayan, suda çözünebilir, biyoyumlu ve sıra dışı biyolojik özelliklere sahip polieterdir. PEG'in biyomedikal uygulamalarda kullanım alanı oldukça geniştir [87].

İnce vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada linoleik asit, PLina makro peroksit başlatıcı elde etmek için oda sıcaklığında güneş altında ootoksidayona tabi tutulmuştur. Serbest karboksilik asit grubu içeren PS-g-PLina graft kopolimerlerini hazırlamak için stirenin serbest radikal polimerizasyonu PLina makro peroksit başlatıcı yoluyla başlatılmıştır. Ardından primer amin terminali olan PEG, karboksilik asit grubuyla tepkimeye girerek PS-g-PLina-g-PEG rod-coil tadpole amfifilik graft kopolimeri üretilmiştir [86].

PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartikülleri toksik olmamaları, biyobozunur olmaları, vücuttan kolay atılabilmeleri, kararlılıkları ve fonksiyonel gruplar içermeleri nedeniyle yeni nesil ilaç ve gen taşıyıcı sistemler olarak oldukça cazip malzemelerdir. PS-PLina ve amfifilik

PS-PLina-PEG tadpolegraft kopolimer sentezinde yer alan polimerik linoleik asit makro peroksit, tadpole şekilli graft kopolimerleri elde etmede vinil polimerizasyonu için çok yönlü olan bir serbest radikal başlatıcıdır. Karboksilik asit fonksiyonlu PLina makro başlatıcı, medikal ve endüstriyel uygulamalarda yeni polimer materyallerin sentezi için organik kimyada pek çok modifikasyon reaksiyonlarında kullanımaçısındananeşsiz özelliklere sahiptir. Elde edilen kopolimerdeki poli(linoleik asit) segmenti biyobozunur özelliğe sahip olmasından dolayı kopolimere biyobozunur özellik kazandırmaktadır.

1.11 PEG'İN TAŞIYICI SİSTEMLERDEKİ ÖNEMİ

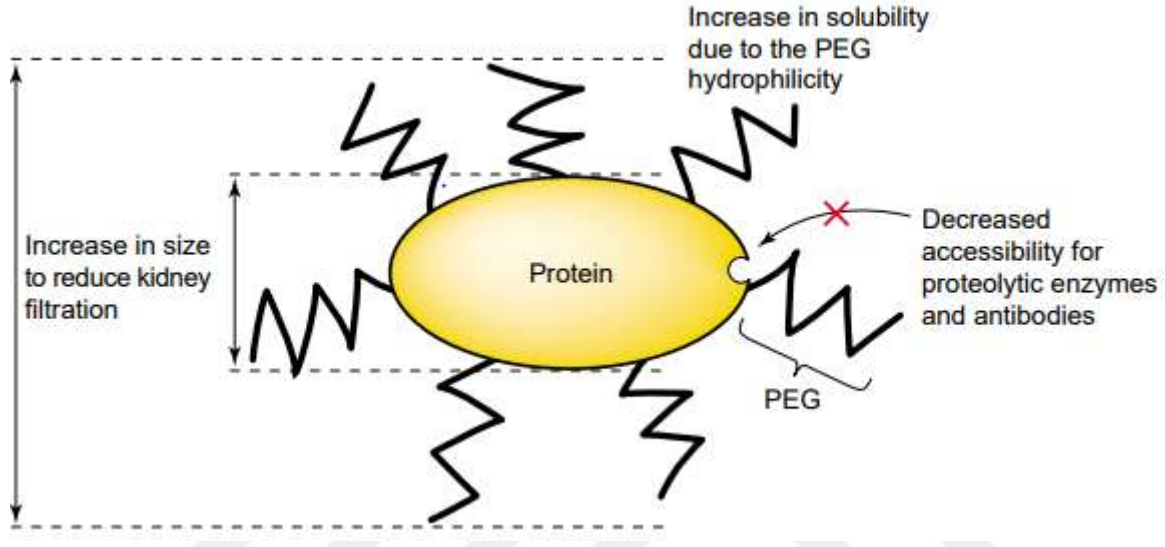
Poli(etilen glikol) polimeri ilaç iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. İlaç taşıyıcısı olarak yaygın kullanım alanına sahip olan nanopartiküller eşsiz koruyucu kaplama malzemesidir ve aynı koruma proteinlere ve ilaçlara da sağlanır. PEG monomer birimi $O(CH_2)_2$ dir. PEG'in her bir monomerinin hem polar bir oksijen atomu hem de polar olmayan bir $(CH_2)_2$ grubu vardır. PEG çeşitli polar ve nonpolar çözücülerde çözünebilme özelliğine sahip olduğu için hidrofobik ilaç moleküllerinin suda çözünürlüğünü ve çözünme özelliklerini iyileştirmek adına taşıyıcı olarak kullanılabilir [88].

PEG, bir başka moleküle bağlandığında kendi özelliklerini koruyarak yeni oluşan moleküle eşsiz özelliklerini aktarmaktadır. Taşıyıcı sistem PEG ile oluşturularak yüzeye protein yapışması engellenerek taşıyıcının mononükleer fagositik sistem tarafından tanınması önlenmektedir. Sonuç olarak, PEG ihtiva eden taşıyıcı sistemler sistemik sirkülasyonda uzun zaman kalarak ilacı salabilmektedir [62].

Mononükleer fagositik sistem, karaciğer, dalak ve böbrek gibi organları sarmaktadır. MPS, nanopartiküllerin farmakokinetik davranışını belirleyen önemli bir faktördür. Karaciğer; hücresel fragmanları, bakteriyi, agregatları ve aynı zamanda nanopartikülleri imha etmek ve kanı filtrelemek için kendi monosit/makrofaj bölgesini kullanarak bir süzgeç gibi fonksiyon göstermektedir. Ek olarak renal atılım mekanizmaları, bu salım sistemlerinin elimine edilmesine yardımcı olmaktadır. Nanopartikülün böbrek ve karaciğer tarafından atılımından kaçınarak tümör hücrelerine girmesinde bazı metodlar geliştirilmiştir. Böbrek filtrasyonundan kaçınmak için nanopartikül boyut ve yükü modifiye edilebilmektedir. Anyonik yüke sahip 8 nm'den daha büyük olan nanopartiküller daha az filtre edilmektedir. Karaciğer atılımını azaltmak için opsonizasyonun azaltılması oldukça önemlidir. Nanopartiküllerin PEG'lenmesi

yoluyla yapılabilen bu işlem ilk geçiş ekstraksiyonunu azaltmakta, enzimatik sindirime karşı fizikokimyasal stabiliteyi iyileştirmekte ve serum yarı ömrünü artırmaktadır [89,90,91,92].

Pegilasyon, PEG ile yapılan modifikasyon işlemine verilen addır. Pegilasyon ile ilacın immünojenik özellikleri azalmakta, dolaşımda kalış süresi artmakta ve dağılım hacmi küçülerek ilacın yarı ömrü uzamaktadır (Şekil 1.12) [62].



Şekil 1.12 Pegilasyon işleminin başlıca avantajları [93].

1.12 KANSER TEDAVİSİNDE TAŞIYICI SİSTEMLERDE KULLANILAN ETKEN MADDELER

Geçmiş on sekizinci yüzyıla dayanan kanser tedavisinde cerrahi işlem, erken evre kanser tedavisi için birincil tedavi yöntemidir ve çoğu hasta, hastalığın sık sık nüksetmesinden muzdariptir. 1895 yılında radyasyon tedavisi keşfedilmiş, daha sonraki yıllarda ise kemoterapi tedavisinde çarpıcı bir ilerleme kaydedilmiştir [94].

Paklitaksel, doksorubisin, florourasil (5-FU) gibi ilaçlar kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardan bazılarıdır.

Paklitaksel, hücre bölünmesi için gerekli dinamiği bozan, mikrotübül stabilize edici bir ajandır. Sulu çözeltilerde az çözünmesine karşın alkol gibi birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Mevcut formülasyon, polietoksillenmiş hint yağı (Chremophor EL) ve

etanol karışımından oluşmaktadır ki bu karışım hipersensitivite, nefrotoksisite, nörotoksisite gibi ciddi yan etkilere sahiptir [95].

Etkili ve yaygın şekilde kullanılan anti kanser ilaçlardan biri olan doksorubisin ise kanser hücrelerinde nükleik asitlerin sentezini inhibe ederek çalışmaktadır. Doksorubisin, kardiyotoksisite ve miyelosupresyon gibi istenmeyen bazı yan etkilere sahiptir. Bu yan etkiler ilacın teröpatik indeksinin daralmasına neden olmaktadır [95].

Geleneksel tedavi yöntemleri sahip oldukları yan etkiler ve gösterdikleri başarısız sonuçlar sebebiyle tam olarak etkili olamamaktadır. Son yıllarda kanser tedavisinde yeni nesil bir yöntem olarak spesifik tümör hedeflemeye yönelik yeni metotlar geliştirilmektedir. Hedefli tedavi sürecinde kullanılan ajanlar yalnızca hastalıklı bölgeye gönderilebilmekte ve böylece sağlıklı hücrelerin zarar görmesi engellenebilmektedir [95].

Tüm kanser türleri kalıtsal olmasa da kanser genetik bir hastalıktır. Hücrel aktiviteyi kontrol etmekte sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser hastalığına yol açmaktadır.

Temel olarak gen tedavisi, genetik ve enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde terapötik etkiye sahip genetik materyalin, hedeflendirilmiş spesifik hücre veya dokuya minimum toksisite ile transfer edilmesi şeklinde tanımlanabilir. Gen transfer stratejileriyle, bir genin işlevi engellenebilir, eski haline geri getirilip iyileştirilmesi sağlanabilir veya gene yeni bir fonksiyon kazandırılabilir [96].

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ilk gen terapisi deneyi, 1990 yılında immün yetmezlik bozukluğu bulunan hastaya uygulanmıştır [97].

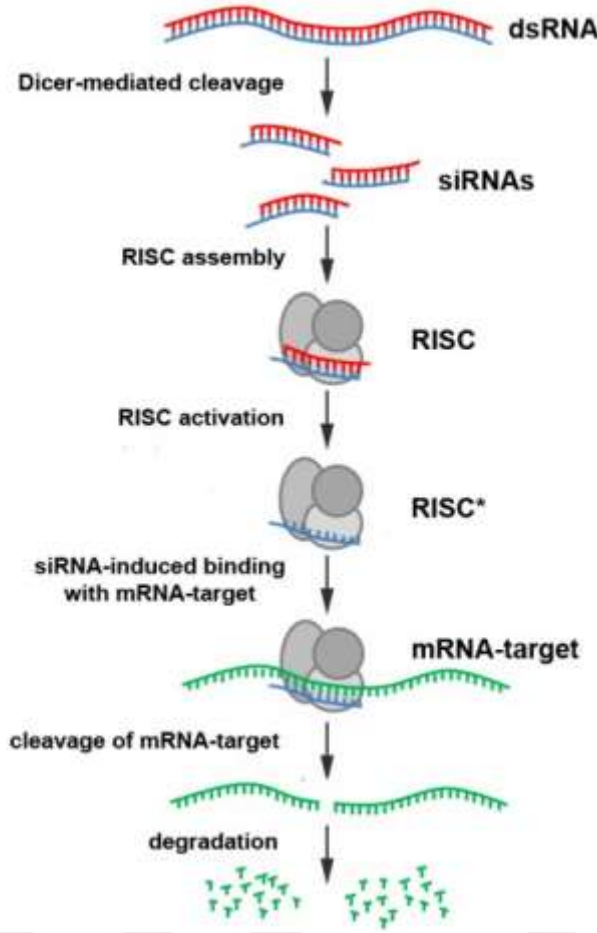
Nükleik asitler kullanılarak spesifik genin işlevinin engellenmesine, baskılanmasına yönelik gelişen tedavi şekillerine ilgi günden güne artmaktadır [97]. Ancak çıplak nükleik asit sekanslarının, dolaşımdaki enzimler nedeniyle kısa sürede bozularak vücutta kalış sürelerinin kısa olması potansiyel terapötik etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır [98].

Kanser tanı ve tedavisinde kullanılması adına yapılan çalışmaların yanı sıra, İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV)/Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (AIDS), influenza, insan

papillomavirus infeksiyonu gibi viral hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklarda yapılan hayvan deneylerinde ve insan uygulamalarında umut vaadeden gelişmeler gözlenmiştir [99].

RNA interferans (RNAi) bitkilerde, bazı omurgasızlarda ve memelilerde bulunan, hedef mesajcı RNA'ya (mRNA) komplementer, çift zincirli RNA'ların (dsRNA) hücreye verildiğinde bunların sitoplazmada mRNA'ya bağlanıp degradasyonunda dolayısıyla translasyona engel olmasında rol oynadığı gen susturma mekanizmasıdır [100]. Bu mekanizma sayesinde iki tip ve bağımsız çift zincirli küçük ribonükleik asit (RNA) molekülü işlenmekte ve hedeflerine yönelik etki göstermektedir. Birincisi endojen veya ekzojen kaynaklı olabilen, genellikle 21-23 baz uzunluğunda ve mRNA'nın parçalanmasını sağlayan küçük interfere edici RNA'lardır (siRNA). İkincisi ise endojen kaynaklı olup, genellikle 22 baz uzunluğunda olan ve translasyon aşamasını baskılayan mikro RNA'lardır (miRNA) [101].

Bu mekanizmanın ilk basamağında, ekzojen veya endojen kaynaklı dsRNA'lar, ribonükleaz-III tipi protein ailesinden olan Dicer enziminin aktivitesiyle 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA'yı oluşturur. RNAi mekanizmasının anahtar molekülü olan, çift zincirli, protein kodlamayan bu siRNA'lar, hedef mRNA moleküllerini arayıp bağlayan RNA-indüklü susturma kompleksi (RISC) tarafından antisens, tek zincirli RNA (ssRNA) yapısına dönüştürülür [102]. RISC, antisens dizisine sahip siRNA zincirini, kendisine komplementer olan mRNA'yı Watson-Crick baz eşleşmesine göre bulması ve hibridleşmesi için rehber olarak kullanır [96]. RISC'in merkezi ve birincil yürütücüsü Argonat proteindir. Argonat proteinleri RISC'in katalitik aktivitesinden sorumludur. İnsanda 4 Argonat proteini vardır (AGO 1-4). siRNA ile gen susturulmasında Argonat-2 (AGO2) kullanılır [103]. Bu enzim kompleksi hedef mRNA'nın 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester bağı endonükleaz aktivitesiyle keser [96]. Böylece zararlı, istenmeyen proteinlerin üretimi RNAi mekanizmasıyla engellenmiş olur (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 RNAi mekanizmasının şematik gösterimi [104].

Kemoterapötik anti kanser ilaçlarla karşılaştırıldığında siRNA'nın pekçok avantajı vardır. Özel mekanizmaya sahip olan siRNA kanser tedavisinde kullanım açısından önemli avantajlara sahiptir. İlk olarak, yüksek derecede güvenilir özelliklere sahip olup gen ifadesinin translasyondan sonraki basamağını etkileyerek DNA ile etkileşime girmeyip, gen tedavisinin hayvan üzerindeki risklerinden ve mutasyondan kaçınmaktadır. siRNA'nın ikinci avantajı yüksek etkinliğe sahip olmasıdır. Tek bir kanser hücresi içerisinde siRNA, sadece birkaç kopya ile gen ifadesini büyük oranda baskılayabilmektedir. Diğer küçük ilaç molekülleri veya antibadi temelli ilaçlarla karşılaştırıldığında, siRNA'nın en büyük avantajı sınırsız hedefleme seçimine sahip olması ve komplementer baz eşleştirme prensibi yoluyla spesifitesinin tayin edilmesidir. Bu strateji aynı zamanda moleküler biyolojinin ve tüm gen diziliminin gelişimi açısından oldukça fayda sağlamaktadır. siRNA'nın temel stratejisi, uygun şekilde tasarlanmış siRNA ile ileri evredeki spesifik kanser hücresindeki genin susturulması yoluyla kanseri tedavi etmesidir [105].

siRNA'nın terapötik ilaç olarak geliştirilebilmesi ve klinikte hastalıkların tedavisinde başarılı sonuçlar gösterebilmesi için bazı problemlerin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. siRNA'nın terapötik kullanımını kısıtlayan önemli bir engel bu molekülün plazma ve hücrel sitoplazmada nükleazlar tarafından hızlı bir şekilde degradasyona uğrama ihtimali ve dolayısıyla yarı ömrünün kısa olmasıdır. Ek olarak siRNA, yapısı gereği negatif yüke sahip olduğundan dolayı etkin şekilde hücre içine penetre olamaz. Bu nedenle siRNA salımı için etkili ve uygun bir taşıyıcı sisteminin kullanımına ihtiyaç vardır [106]. Bu durum, terapötik siRNA'ları nükleazlara karşı koruyan, bu ajanların hücre içine alınmalarını kolaylaştıran, dolayısıyla da etkinliklerini artıran, güvenli, non viral sistemlerden olan nanopartiküllere olan ihtiyacı artırmıştır. Hücre membranından kolayca geçebilen nanopartiküllerin kullanılmasıyla ve modifiye edilmesiyle etken maddenin hücrel yüzeylere etkin bir şekilde taşınması, olası toksisitenin minimuma inmesi, vücudun herhangi bir bölgesine zarar vermeden sadece tümörlü dokuya hedeflendirilmesi mümkündür [107].

Plazmatik nükleazdan dolayı siRNA direkt olarak sistemik dolaşıma enjekte edilememektedir. Etkili bir sistemik yönlendirmeye ve damar içi enjeksiyonla siRNA'nın in vivo ortamda hedef hücrelerine etkili bir şekilde salımı için plazma nükleazlarına karşı siRNA'nın korunmasına gereksinim vardır. Çıplak siRNA 30 dakika içerisinde plazma enzimleri tarafından tamamıyla degrade olmaktadır. Nanopartikül içerisine enkapsülasyon siRNA'yı plazmatik enzim degradasyonundan korumaktadır [89,91]. Sonuç olarak siRNA'nın nanopartikülle enkapsüle edilmesi, siRNA'yı plazmatik nükleazdan ve immün cevaptan korumakta ve böylelikle nanopartikül, endositoz yoluyla hücre içerisine girerek siRNA'nın başarılı bir şekilde salımını gerçekleştirmektedir. Sistemik siRNA'nın vücut içerisinde yönlendirilmesi ve fizyolojik bariyeri geçebilmesi için salım sistemleri şu şekilde tasarlanmalıdır:

- Serum kararlılığı sağlamalı
- İmmün sistemden kaçma özelliğine sahip olmalı
- Serum proteinleri ve kanser olmayan hücrelerle etkileşim azaltılmalı
- Renal atılıma dirençli olmalı
- Kanser dokusuna ulaşmak için vasküler geçirgenliği artmalı
- RNAi'nin girmesi için endosom kaçışına ve hücre girişine izin vermeli
- Düşük toksisiteye sahip olmalı



BÖLÜM 2

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1 KULLANILAN KİMYASALLAR VE EKİPMANLAR

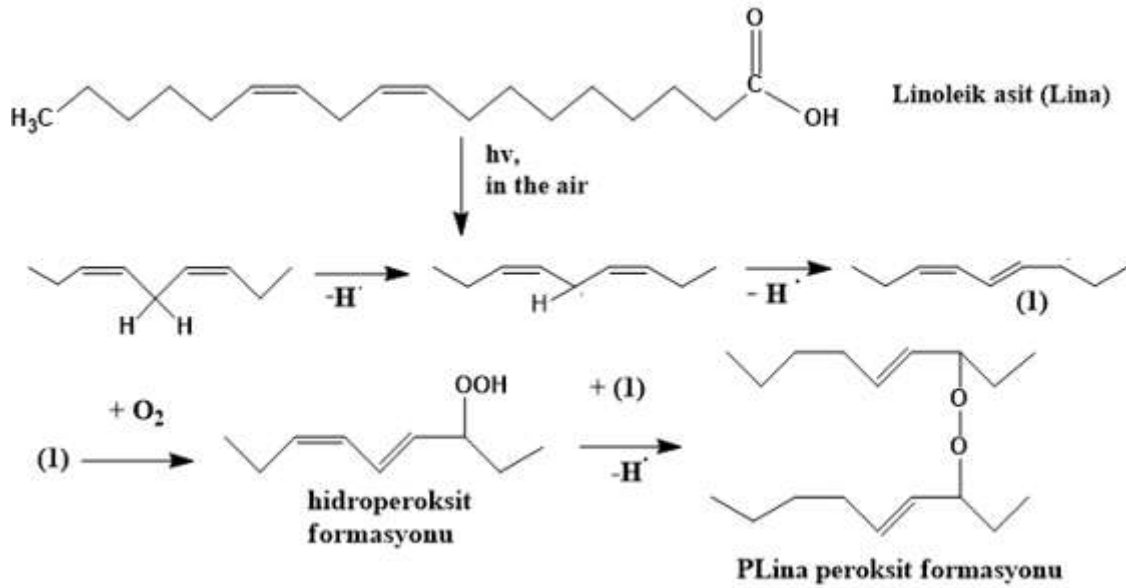
Oktadeka-9, 12-dionik asit (linoleik asit) Fluka (Code 62,240)'dan %75 saflıkla temin edilmiştir. Stiren ve diğer çözücüler Aldrich'den satın alınarak kullanımdan önce saflaştırılmıştır. Polietilen glikol-bis-(2-aminopropil eter) (molekül ağırlığı 2000 g/mol) (PEG-NH₂) Huntsman Co. (Basel, Switzerland) firmasından temin edilmiştir. Diklorometan Merck (Germany)'den satın alınmıştır. Kloroform (≥99% GC grade), kalay oktanoat (SnOct₂), sodyum dodesil sülfat (SDS), Poly-L-lysine (PLL) solution (P4707, mol wt 70,000-150,000) ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Poli vinil alkol (PVA, Mw 72,000, Fluka, USA) sürfaktan olarak kullanılmıştır. siRNA (Sens dizisi: 5'CCGUGGAUCUGAAUUACAATT-3'; antisens dizisi: 5'UUGUAAUUCAGAUCCACGGAA-3') ve taşıyıcı olarak kullanılan katyonik ve nötral lipid karışımından oluşan HiperFect Transfeksiyon Reaktif Qiagen (Almanya) firmasından alınmıştır. Hücre kültürü çalışmaları için insan akciğer kanser hücre hattı (A549), hücre kültürü ortamı ve PRMI-1649 (Roswell Park Memorial Institute-1640) American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) firmasından temin edilmiştir. Propidyum iyodür (PI) Roche (Deutschland, Germany), Tripsin-etilen-diamin tetra asetik asit (tripsin-EDTA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F-12), fetal kalf serum (FCS) ve dimetil sülfoksit (DMSO) Biological Industries (Beit Haemek, Israel) firmasından satın alınmıştır. 3-(4,5-Dimetiltiazol)-2,5-dipeniltetra-zolyum bromür (MTT) ve Ribonükleaz A (RNase A) Serva (USD) firmasından temin edilmiştir. Fosfat tampon tuzu (PBS) Thermo Scientific, USA firmasından satın alınmıştır.

Deneysel çalışmalarda liyofilizatör (Christ, Germany), nanodrop (Thermo Scientific Nano Drop 1000 Spectrophotometer), santrifüj (Centrifuge 5810R), homojenizatör (IKA T 125 Digital Ultra turrax), UV-spektrofotometre (Mini UV 1240, Shimadzu, Japan), mekanik

karıştırıcı (Heidolph RZR 2021) ve ultrasonik banyo (Alex) kullanılmıştır. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini gözlemlemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Quanta FEG 450 model SEM) kullanılmış olup nanopartiküllerin karakterizasyonu Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer SpectrumOne, Nicolet 520, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Annexin V-PI analizi Akış Sitometri (BD FACSCanto) cihazında yapılmıştır. Nanopartiküllerin boy-boy dağılımı ve yüzey yükleri zeta potansiyel (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, England) cihazı ile tayin edilmiştir.

2.2 LİNOLEİK ASİTİN OTOOKSİDASYONU

Poli linoleik asit (PLina), linoleik asidin otooksidasyonu yoluyla üretilmiştir. Belli bir miktar linoleik asit petri kabına dökülerek oda sıcaklığında güneşe maruz bırakılmıştır. 4 haftalık otooksidasyon sonrasında açık sarı viskoz sıvı PLina elde edilmiştir. Ardından örnek, kloroform ekstraksiyonu yoluyla izole edilmiştir. Otookside linoleik asitin çözünebilir kısmı, stirenin polimerizasyonunda makroperoksidik başlatıcı olarak etki etmesi için kullanılmıştır (Şekil 2.1).

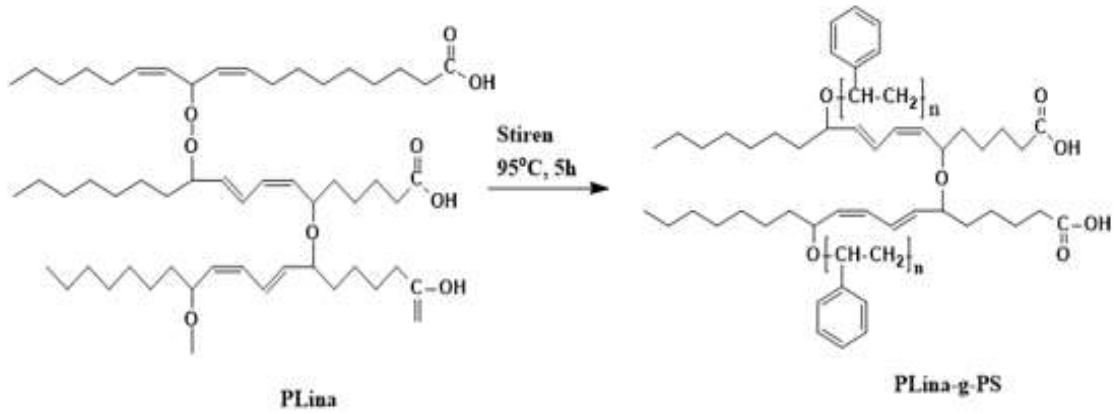


Şekil 2.1 Linoleik asitin otooksidasyonuna ait kimyasal reaksiyon basamağı.

2.3 PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG GRAFT KOPOLİMERLERİNİN SENTEZİ VE FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

2.3.1 PS-g-PLina Graft Kopolimerlerinin Hazırlanışı

8 gr Stiren ve 3 gr PLina, 10 mL saf toluende çözülerek argon atmosferi altında (3 dakika kadar balon içerisine argon gazı verildi) 95 °C'de 5 saat yağ banyosu içerisinde karıştırılmıştır. Ham polimer 20 mL saf kloroform içerisinde çözülmüş ve 200 mL metanolde karıştırılarak çöktürülmüştür. Elde edilen kopolimer filtre edilmiştir. Filtre kağıdındaki polimer hafifçe kazınıp saat camı veya ufak petri kabına konularak oda sıcaklığında 24 saat kuruması için bekletilmiş ve ardından vakum altında 40 °C'de 24 saat kurutulmuştur (Şekil 2.2).

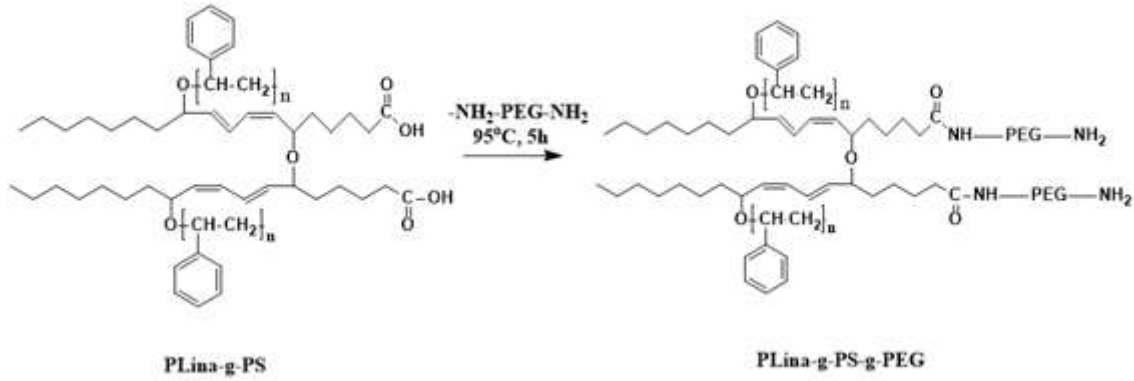


Şekil 2.2 PS-g-PLina graft kopolimerinin sentezlenmesine ait kimyasal reaksiyon basamağı.

2.3.2 PS-g-PLina-g-PEG Graft Kopolimerinin Hazırlanışı

0.5 gr PS-g-PLina ve 0.25 gr Jeffamine ED-2003'e (amin uçlu PEG) 10 mL saf toluen ilave edilerek 95 °C'de 5 saat argon atmosferi altında yağ banyosu içerisinde karıştırılmıştır. Çözücü kısmen rotary evaporatörde buharlaştırılmıştır. Polimer, metanolde çöktürülmüş ve filtre edilmiştir. Filtre kağıdındaki polimer küçük petri kabına aktarılmış ve 24 saat oda sıcaklığında ve ertesi gün vakum altında 40 °C'de 24 saat kurutulmuştur. İleri saflaştırma işlemi yapılarak ortamda reaksiyona girmemiş PEG'leri uzaklaştırmak amacıyla kurutulmuş polimer küçük kapaklı cam tüpün içerisine konulmuştur. Üzerine 15 mL kadar saf kloroform ilave edilmiş ve ağzı kapatılarak karıştırılıp çözünmesi sağlanmıştır. Çözündükten sonra polimer çözeltisi adi süzgeç kağıdında süzdürülmüş ve alttaki polimer çözeltisi 0.5-0.6 gr

ağırlığındaki petri kabına düzgün bir şekilde dökülmüştür. 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün üstünü kaplayacak kadar saf su konularak 30 dk beklenmiştir. Daha sonra polimer filmi düzgün bir şekilde sıyrılarak alınmış ve su dolu beher içerisine koyularak 24 saat bekletilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerinin sentezlenmesine ait kimyasal reaksiyon basamağı.

Hazırlanan graft kopolimerlerinin fizikokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla FTIR, HNMR ve TGA analizleri yapılmıştır.

2.4 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANIŞI VE KARAKTERİZASYONU

PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerleri kullanılarak çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu amaçla 10 mg graft kopolimerleri 10 mL diklorometanda çözüldükten sonra homojenizatör varlığında ve buz banyosu eşliğinde 0,5 mg/mL PVA içeren sulu dağılma ortamına damla damla enjekte edilerek oluşturulan sulu süspansiyona aynı miktardaki bir diğer PVA çözeltisi ilave edilmiştir. Ortamdan organik çözücü uzaklaştırmak amacıyla sulu çözelti ultrasonik banyo ve mekanik karıştırıcı (2000 rpm) varlığında 2 saat kadar karıştırılmıştır. Sonrasında ortamda reaksiyona girmeden kalan PVA, polimer ve organik çözücü uzaklaştırmak amacıyla süspansiyon haldeki çözelti 12.000 rpm hızda 30 dk süre ile suyla yıkanarak çöktürülmüştür. Altaki çökelek -80°C 'de dondurularak ileride yapılacak olan deneysel çalışmalar için liyofilize edilmiştir.

Elde edilen nanopartiküllerin boy-boy dağılımlarını gerçekleştirmek amacıyla, kullanılan polimer miktarı, sürfektan miktarı ve karıştırma hızı gibi parametreler değiştirilerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve sistem in vitro uygulamalar için optimize edilmiştir.

Hazırlanan PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin karakterizasyonu FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisini gözlemek amacıyla SEM analizi yapılmıştır.

2.5 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN STABİLİTE TESTİ

Liyofilize edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal stabilitelerini tayin etmek amacıyla farklı sıcaklıklarda sulu ortamdaki davranışları gözlemlenmiştir. 25 °C oda koşullarında nanopartiküllerin agregasyon hızı arttığından dolayı stabilite deneyleri bir ay boyunca sulu ortamda +4 °C'de değerlendirilmiştir. Bu amaçla belli miktarda alikotlara ayrılarak ependorf tüplere alınan nanopartiküller 30 gün boyunca sulu ortamda +4 °C'de bekletilerek partikül boyutu, poli dispersite (PDI) ve zeta potansiyel değerlerine bakılmıştır.

2.6 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN PLL İLE MODİFİYE EDİLMESİ

Negatif yapıdaki siRNA moleküllerinin nanopartiküllerin yüzeyine elektrostatik olarak bağlanması için partikül yüzey yükünün pozitif olması gerekmektedir. Negatif yüklü PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartikülleri pozitif yüklü hale getirmek amacıyla poli-L-lizin ile modifiye edilmiştir. Lizin, polar bazik bir aminoasit olup fizyolojik pH (7.4) da yan zincirinde proton alıcı moleküller taşımaktadır.

Liyofilize edilmiş 40 µg/mL derişimindeki PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküller distile suda dispers edilerek hazırlanmış ve partiküllerin iyice dağılması için yaklaşık bir saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Optimum PLL miktarını belirlemek için 250 µl, 500 µl ve 1000 µl PLL çözeltisi, karışmakta olan nanopartikül solüsyonlarına ilave edilmiştir. PLL'nin nanopartiküllere yüksek verimde bağlanmasını sağlamak amacıyla elde edilen çözelti 24 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya bırakılmıştır. Ortamda bağlanmadan kalan PLL'leri uzaklaştırmak amacıyla karışım 12000 rpm'de 15 dakika

santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Dibe çöken nanopartiküller suda dispers edilerek yüzey yükleri Zeta-Sizer cihazı ile ölçülmüştür.

2.7 PLL İLE MODİFİYE EDİLMİŞ PS-PLina Ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNE siRNA BAĞLANMASI Ve BAĞLANMA VERİMİNİN HESAPLANMASI

Hedef gen olarak seçilen c-myc geninin susturulması için ticari olarak tasarlanmış ve etkinliği kanıtlanmış olan siRNA'lar kullanılmıştır. RNAi Handbook'ta (Flexitube siRNA, Qiagen) yer alan bilgilere göre, 100 nM siRNA; $1.25 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ siRNA konsantrasyonuna karşılık gelmektedir. Buna göre, PLL ile modifiye edilmiş nanopartiküllere en yüksek verimde bağlanan optimum siRNA konsantrasyonunu belirlemek için 3 farklı derişimde siRNA kullanılmıştır. 100 nM'dan daha düşük konsantrasyonlardaki siRNA'lar ile yapılan yükleme verimi oldukça düşük çıktığı için konsantrasyonlar artırılarak deneye devam edilmiştir.

Nanopartiküllere siRNA bağlanması çalışmalarında, partiküller 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda olacak şekilde deiyonize su ile seyreltilmiştir. Eklenen PLL miktarının siRNA bağlanma verimine etkisini araştırmak amacıyla her bir nanopartikül 250 μl , 500 μl ve 1000 μl PLL ile etkileştirildikten sonra elde edilen nanopartiküller siRNA ile muamele edilmiştir. PS-PLina-PLL nanopartiküller için konsantrasyonları 100 nM, 280 nM ve 400 nM olacak şekilde sırasıyla 3 μl , 7 μl ve 10 μl hacmindeki siRNA'lar nanopartikül çözeltisine ilave edilmiştir. PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküller için ise konsantrasyonları 100 nM, 400 nM ve 600 nM olacak şekilde sırasıyla 3 μl , 10 μl ve 15 μl hacmindeki siRNA'lar nanopartikül çözeltisine ilave edilmiştir. Elde edilen çözeltiler kompleksleşme reaksiyonu için yaklaşık 1 saat oda sıcaklığındaki rotorda sabit hızda (15 rpm) karıştırılmaya bırakılmıştır. Hazırlanan 2 farklı nanopartikül ve 3 farklı siRNA formülasyonları (farklı derişimlerde) 12000 rpm'de santrifüjle çöktürülerek süpernatantlar ayrılmıştır. Dibe çöken siRNA ile konjuge edilen partiküllerin yüzey yükleri Zeta-Sizer cihazında ölçülmüştür. Süpernatant kısmında partiküllere bağlanmayan siRNA'ların miktarı 260 nm'de Nanodrop cihazıyla ölçülmüştür. siRNA içermeyen nanopartiküllerden elde edilen süpernatant kör olarak kullanılmıştır. Bu yolla, başlangıç derişimi bilinen siRNA'ların ne kadar oranda nanopartiküllere bağlandığı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Nanopartiküle bağlanan siRNA miktarı=Yüklenen toplam siRNA miktarı-Süpernatantta kalan siRNA miktarı

% siRNA bağlanma verimi=(Nanopartiküle bağlanan siRNA miktarı/Toplam yüklenen siRNA miktarı)*100

2.8 NANOPARTİKÜLLERİN siRNA SALIM PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Hedef siRNA'nın nanopartiküllere başarılı bir şekilde yüklenmesinden sonra partiküllerin fizyolojik pH 7.4'teki davranışları ve salım profilleri incelenmiştir. Bu amaçla PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartikülleri (40 µg/mL) 500 µL PLL ile modifiye edilerek pozitif yükle yüklendikten sonra farklı konsantrasyonlardaki siRNA'lar (100 nM, 280 nM, 400 nM) PS-PLina-PLL NP'ler ve (100 nM, 400 nM, 600 nM) PS-PLina-PEG-PLL NP'ler ile etkileştirilmiştir. siRNA bağlı nanopartiküller pH'sı 7.4 olan fosfat tampon çözeltisinde (PBS) seyreltilerek küçük ependorf tüplerine alınıp 8 gün boyunca 37 °C'de 60 rpm'de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Farklı zaman aralıklarında (0, 2, 4, 24, 48, 72, 90, 144, 168, 216, 240 ve 264. saat) örneklerden 100 µl alınarak 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Alınan 100 µl örnek çözeltisi yerine aynı miktarda PBS eklenmiştir. Santrifüj edildikten sonra süpernatanta salınan siRNA'ların derişimi Nanodrop cihazı ile 260 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiş ve elde edilen değerler kullanılarak zamana karşı kümülatif siRNA salım grafiği oluşturulmuştur.

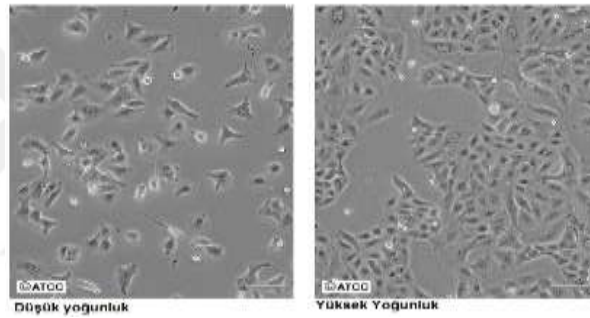
2.9 HÜCRELERİN HAZIRLANMASI VE siRNA İLE KONJUGE EDİLEN PARTİKÜLLERİN HÜCRELERE TRANSFEKSİYONU

Bu çalışmada akciğer adenokarsinom hücreleri olan A549 hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 2.4). siRNA-PS-PLina-PLL ve siRNA-PS-PLina-PEG-PLL partikül örneklerinin hücre etkileşimini belirlemek için aşağıdaki incelemeler yapılmıştır.

Hücre kültürü, canlı bir doku veya organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda ve kontrol edilebilir koşullar altında büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine verilen isimdir. Hücre kültürü terimi ile genellikle ökaryotik hayvan hücreleri anlaşılrsa da bitki, fungi, virüs ve bakterilerin de kültürü yapılabilmektedir. Hücrelerin in vitro ortamda yaşayabilmeleri, büyümeleri ve çoğalmaları için uygun besiyerlerine ihtiyaçları vardır. İyi bir besiyeri

esansiyel ve non-esansiyel amino asitleri, vitaminleri, tuzları, şekerleri, serum, penisilin ve streptomisin gibi antibiyotikleri Na, K, Ca, Mg, Cl, P, NaHCO₃, CO₂ gibi iyonları, Fe, Zn, Se gibi iz elementleri ve kolin, inositol gibi lipidleri ihtiva etmelidir. Kültür ortamını etkileyen diğer faktörler ise sıcaklık, pH, nem, gaz fazı bileşenleri, ozmolarite ve ışıktır.

Hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların günümüzde önemli bir yeri vardır. Sağlıklı ya da patolojik durumlarda bir hücre ya da dokuda bulunan bir maddenin ya da üretilmiş bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak *in vitro* sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca hücre/doku kültürü, gen tedavisi, çeşitli enzimlerin ve hormonların üretimi, DNA ve RNA replikasyonu araştırması, kök hücre araştırmaları, doku mühendisliği ve genetik manipulasyon ve immortalizasyon gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.



Şekil 2.4 A549 hücrelerinin görüntüsü.

2.9.1 Hücrelerin Hazırlanması

-80 °C’de muhafaza edilen kriyotüplerdeki A549 hücreleri derin dondurucudan alınarak çözülmüştür. %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Çözünen A549 hücreleri falkon tüp içerisine konulup üzerine 3 mL hazırlanan besiyerinden ilave edilerek 2500 rpm’de 2 dakika santifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve pellet 4’er mL besiyeri ile süspanse edilip 25 cm³’lük flaslara aktarılmıştır. Flaskların kapağı hafif gevşetilerek 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre konulmuştur. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenmiştir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak yüzey kaplaması tamamlandığında kültürler, tripsin enzimiyle muamele edilerek 1/4 pasaj yapılmış ve hücreler yeni flaslara aktarılmıştır. Çizelge 2.1’de A549 hücrelerinin hücre kültür ortamı gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 A549 hücrelerinin hücre kültür ortamı.

Hücre Türü	Akciğer Kanseri Hücre Hattı (A549)
Kültür Kabı	25 cm ³ 'lik polistren flask, yüzeyi hücre tutunmasına uygun
Kültür Vasatı	%10 Fetal sığır serumu içeren DMEM-F12
Rutin sub-kültür	¼
Kültür Özelliği	Monolayer
Toplam Hacim	5 mL
Ph	7,2-7,5
Sıcaklık	37±0,5 °C
İnkübasyon Ortamı	% 5'lik CO ₂ etüvü

2.9.2 siRNA ile Konjuge Edilen Partiküllerin Hücelere Transfeksiyonu

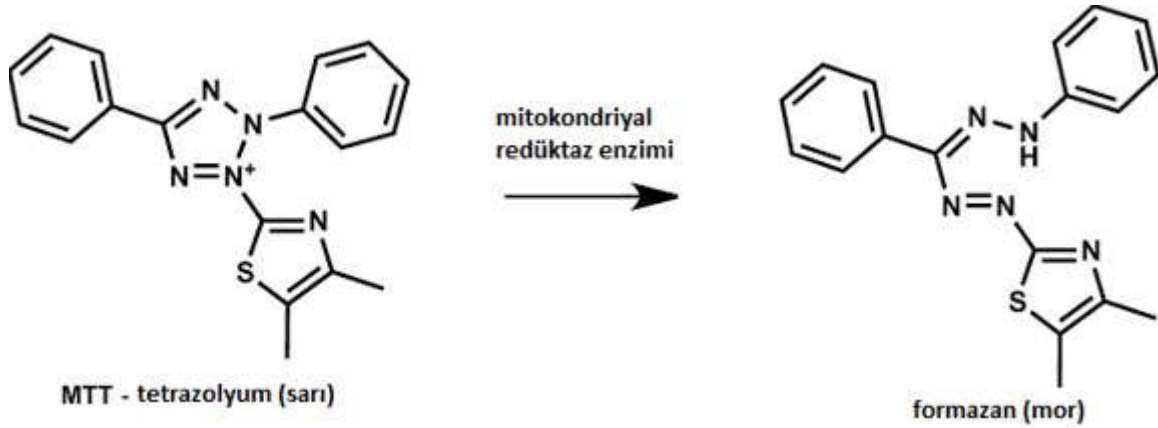
A549 kanser hücreleri flasklarda çoğaltılıp %70-80 oranında yüzeyi kaplandıktan sonra hücre vasatı atılmış ve 3 mL PBS ile hücreler yıkanmıştır. Daha sonra hücelere 1 mL tripsin-EDTA eklenerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin mikroskopik olarak flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilmiştir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak incelendikten sonra, flaska 3 mL taze besiyeri eklenip hücreler falkon tüpe aktarılarak 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve tüpün dibinde kalan hücre pelletleri üzerine 1 mL taze besiyeri eklenip süspanse edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için hücreler tripan mavisi ile boyanıp thoma lamında sayılmıştır. Bu sayımda mavi boyanmış hücreler ölü, parlak ve boyanmamış hücreler canlı hücreleri göstermektedir.

2.9.3 Sitotoksisite Testi (MTT)

MTT testi, hücre canlılığının tespiti için kullanılan testlerden biridir. Antiproliferatif ajanların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksisite oranları bu test ile saptanabilmektedir.

Genel olarak, mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin tetrazolyum boyasını indükleme kapasitelerini ölçmeye dayalı kolorometrik bir yöntemdir. Canlı hücreler tarafından sarı renkli tetrazolyum mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmektedir [108].

Oluşan formazan ürününü çözmek için genellikle DMSO, asitlenmiş etanol çözeltisi ya da seyreltilmiş hidroklorik asit (HCl) içeren SDS çözeltisi eklenir. Bu mor renkli çözeltinin absorbans değeri 500-600 nm aralığındaki bir dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak hesaplanır. MTT, hücrelerin aktivitelerini, proliferasyon ve canlılıklarını ölçmede etkin, hassas, güvenilir, kantitatif bir sitotoksite yöntemidir.



Şekil 2.5 MTT yapısında tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesinin şematik gösterimi [108].

2.10 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sitotoksite testi için, önce sabit siRNA ve nanopartikül konsantrasyonlarının farklı inkübasyon sürelerinde kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Daha sonra inkübasyon süresi sabit tutulup farklı $w(\text{siRNA}) / w(\text{NP})$ oranlarının hücrelere olan etkisi ortaya konulmuştur. PS-PLina ve PS-PLina-PEG (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nanopartikülleri 500 μl PLL ile modifiye edilerek sırasıyla 100 nM, 280 nM, 400 nM c-myc siRNA'lar ve 100 nM, 400 nM, 600 nM c-myc siRNA'lar ile etkileştirilerek A549 hücreleri üzerinde 24 (Şekil 3.9), 48 (Şekil 3.10) ve 72 saatlik (Şekil 3.11) periyotlarla sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu plaklara 5×10^4 hücre/mL derişiminde ekilmiştir. Hücreler, 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra yukarıda yer alan tüm deney grupları ile etkileştirilmiştir.

- Sadece c-myc siRNA ile muamele edilecek hücre grupları için siRNA'lar son hacim 100 µL besiyerinin içinde derişimleri 100 nM, 280 nM, 400 nM, 600 nM olacak şekilde 20 µM stok siRNA'dan RNAz içermeyen su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Sadece boş nanopartiküllerin toksik etkilerini incelemek üzere PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin PLL ile modifiye edildiği ve edilmediği formülasyonlar hazırlanmış ve besiyeri ile seyreltilerek konsantrasyonu 40 µg/mL olacak şekilde hücrelere 100 µL olarak pipetlenmiştir.
- siRNA-NP formülasyonlarının hazırlık aşamasında, tüm nanopartiküller öncelikle farklı miktarlardaki siRNA'lar ile etkileştirildi. Daha sonra oda sıcaklığında 1 saat kompleksleşmesi için çözeltiler 15 rpm'de karıştırılmaya bırakılmıştır. Bu gruplar kuyucuklarda yer alan hücrelerle muamele edilmeden önce besiyeri ile seyreltilmiş ve 100 µL olarak pipetlenmiştir.
- Tüm nanopartiküller hücrelere verilmeden önce UV altında 20 dakika bekletilmiştir.

96'lık plaklar bu andan itibaren 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda plaktaki vasat atılarak kuyucuklara 100 µL taze vasat ve 13 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL, PBS ile seyreltilmiştir) pipetlenmiştir. Plaklar 4 saat karanlıkta etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT çözeltisi dikkatlice alınmış ve kuyucuklara 100 µL DMSO pipetlenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

Yapılan MTT testinde, 96 kuyucuklu plakların ilk sütunundaki dört kuyucuk kontrol çalışması olarak kullanılmış ve hücreler besiyerleri haricinde herhangi bir aktif ajan ile muamele edilmemiştir. Diğer tüm gruplar dört tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol plağından alınan absorbansların ortalaması %100 kabul edilmiş olup test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile kıyaslanmıştır.

2.11 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN L929 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

siRNA ile konjuge edilen nanopartiküllerin kanser hücresi olmayan, fare fibroblast hücreleri L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analiziyle incelenmiştir. Önce sabit siRNA ve nanopartikül konsantrasyonunun farklı inkübasyon sürelerinde kanser hücreleri üzerindeki

toksik etkileri incelenmiştir. Daha sonra inkübasyon süresi sabit tutulup, farklı w(siRNA) / w(NP) oranlarının hücelere etkisi ortaya konmuştur. PS-PLina ve PS-PLina-PEG (40 µg/mL) nanopartikülleri 500 µl PLL ile modifiye edilerek sırasıyla 100-280-400 nM c-myc siRNA'lar ve 100-400-600 nM c-myc siRNA'lar ile etkileştirilerek L929 hücreleri üzerindeki 24 (Şekil 3.12), 48 (Şekil 3.13) ve 72 saatlik (Şekil 3.14) sitotoksik etkileri incelenmiştir.

2.12 APOPTOTİK-NEKROTİK ANALİZLER

2.12.1 Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) ile Annexin V-PI Analizi

c-myc genini susturmak üzere hazırlanan siRNA-PS-PLina-PLL ve siRNA-PS-PLina-PEG-PLL formülasyonlarının ve nanopartikülsüz (naked) siRNA'nın A549 hücreleri üzerindeki ölüm yollarının apoptotik ve/veya nekrotik mi olduğunu araştırmak için Annexin-V-PI analizi yapılmıştır. Bunun için Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (ThermoFisher Scientific, ABD) prosedürü takip edilerek sonuçlar Akış Sitometri (BD FACSCanto) cihazında incelenmiştir.

- A549 hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL nanopartikülleri ile hedef siRNA'lar etkileştirilmiş ve hazırlanan tüm deney grupları ile hücreler transfekte edilmiştir (Nanopartikül-siRNA formülasyonunun ve naked siRNA'ların hazırlama prosedürü ve tüm deney gruplarının hücelere transfeksiyonu MTT analizinde detaylı olarak anlatılmıştır).
- Hücreler ve deney grupları muamele edildikten sonra etüvde 48 saat boyunca etkileşimleri için inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra, her bir kuyucukta bulunan deney grubu tripsin aktivasyonu ile kaldırılmış, 750 µl PBS kuyucuklara eklenerek tüm hücreleri alacak şekilde yıkama yapılarak her bir deney grubundaki hücreler buzun üzerindeki akış sitometri tüplerine alınmıştır.
- Tüm tüpler 300 g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır.
- Dipte çöken hücelere 100 µl 1X annexin-bağlanma tamponu eklenmiştir.
- Buzun üzerine tüpler yerleştirilmiş ve her bir tüpe 5 µl Alexa Fluor® annexin V boyasından ve 1 µl PI (100 µg/mL) boyasından ilave edilmiştir.

- Tüplerdeki hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve ardından hücrelerin üzerine 400 µl 1X annexin-bağlanma tamponu ilave edilerek yavaşça pipetaj yapılmıştır.
- Buzun üzerine tüpler konarak Akış sitometri cihazına gidilmiş ve analize kadar tüpler buzda bekletilmiştir.

2.12.2 Floresan Mikroskop Analizi

c-myc genini inhibe etmek üzere hazırlanan siRNA-PS-PLina-PLL ve siRNA-PS-PLina-PEG-PLL formülasyonlarının ve nanopartikülsüz (naked) siRNA'nın A549 hücreleri üzerindeki etkilerini mikroskopik olarak araştırmak için Floresan mikroskop analizi yapılmıştır. Bunun için Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (ThermoFisher Scientific, ABD) prosedürü takip edilerek sonuçlar Floresans mikroskopu cihazında incelenmiştir.

- A549 hücreleri, 24 kuyucuklu plaklara 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL nanopartikülleri ile hedef siRNA'lar etkileştirilmiş ve hazırlanan tüm deney grupları ile hücreler transfekte edilmiştir (Nanopartikül-siRNA formülasyonunun ve naked siRNA'ların hazırlama prosedürü ve tüm deney gruplarının hücrelere transfeksiyonu MTT analizinde detaylı olarak anlatılmıştır).
- Hücreler deney grupları muamele edildikten sonra etüvde 48 saat boyunca etkileşimleri için inkübasyona bırakılmıştır.
- 48 saat sonra, her bir kuyucuktaki hücre vasatı atılmış ve tüm kuyucuklar 500 µl PBS ile yıkanmıştır.
- Daha sonra tüm kuyucuklara 500 µl 1X annexin-bağlanma tamponu eklenmiştir ve hücreler yıkandıktan sonra bu çözelti atılmıştır.
- Ardından hücrelerin üzerine 100 µl 1X annexin-bağlanma tamponundan, 5 µL Alexa Fluor® annexin V boyasından ve 1 µl PI (100 µg/mL) boyasından ilave edilmiştir.
- Plaka karanlıkta 15 dk inkübe edildikten sonra mikroskopik analiz yapılmıştır.

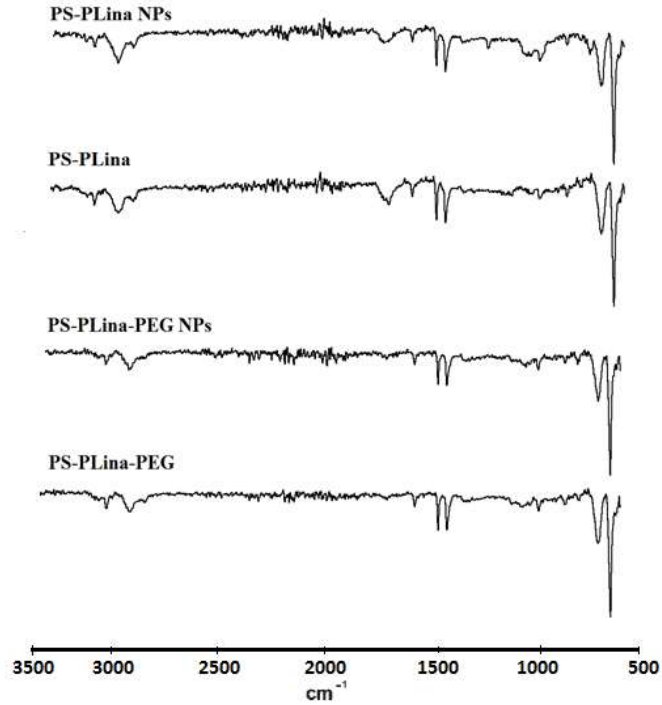


BÖLÜM 3

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

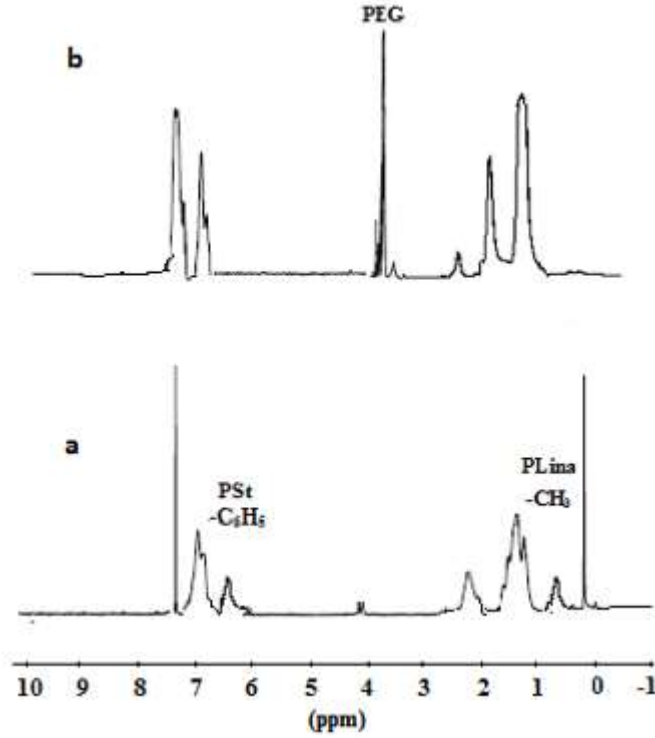
3.1 PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG GRAFT KOPOLİMERLERİ ve PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Şekil 3.1’de sentezlenen PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerlerinin ve hazırlanan PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin FTIR analizi sonuçları görülmektedir. PS-g-PLina, 1705 cm^{-1} ’de karakteristik karbonil grubuna ait pik gözlenmiştir. PS-g-PLina-g-PEG’deki amid grubu 1610 cm^{-1} ’de ve NH grubu da 3029 cm^{-1} ’de pik verirken 1000 cm^{-1} ’de PEG’e ait karakteristik pik görülmüştür.



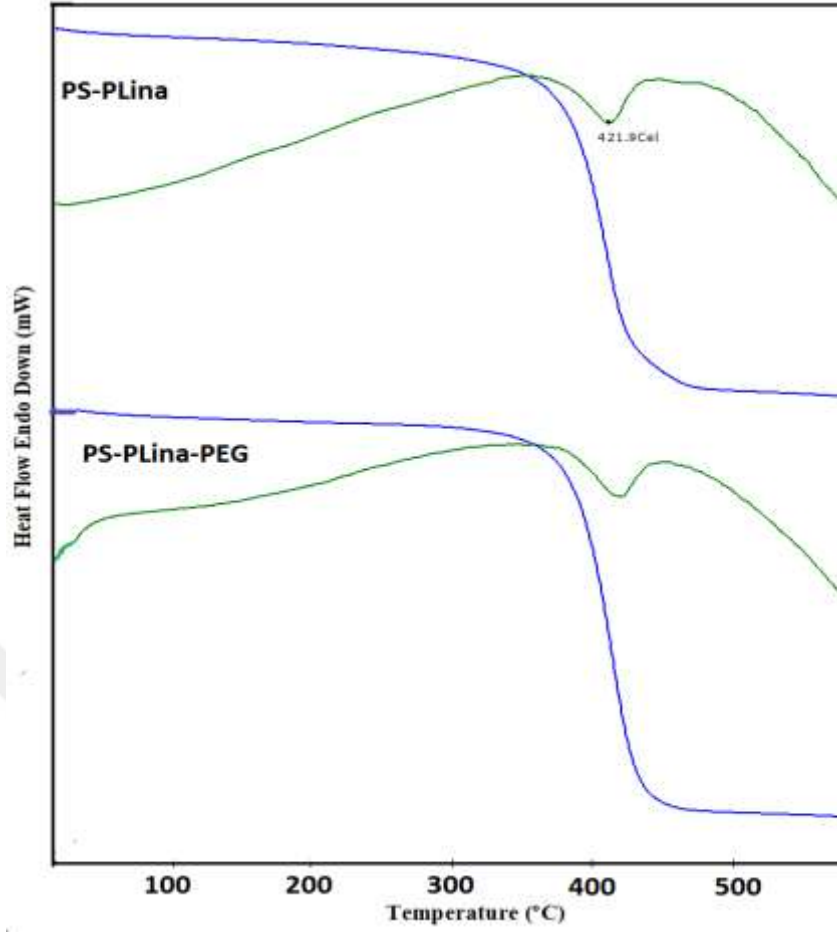
Şekil 3.1 PS-g-PLina, PS-PLina NP’leri, PS-g-PLina-g-PEG ve PS-PLina-PEG NP’lerine ait FTIR spektrumları.

Şekil 3.2’de PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimer örneklerinin ¹H NMR spektrumları görülmektedir. Şekil 3.2 (a)’ya bakıldığında PS-g-PLina kopolimerine ait karakteristik pikler sırasıyla yağ asidi makroperoksitlerdeki –CH₃ grubu için 0.8 ppm; PLina’ya ait –CH-O- grubu için 4.1 ppm ve polistirendeki fenil protonları için 6-7.2 ppm’de pikler gözlenmiştir. Şekil 3.2 (b)’de ise PS-g-PLina-g-PEG kopolimerine ait karakteristik pikler sırasıyla 6.7-7.4 ppm arasında polistirenin fenil grubu; 3.8 ppm’de PEG ve 3.6 ppm’de PLina’ya ait –CH-O- grubu şeklinde görülmüştür.



Şekil 3.2 (a) PS-g-PLina ve (b) PS-g-PLina-g-PEG’e ait ¹H NMR spektrumları

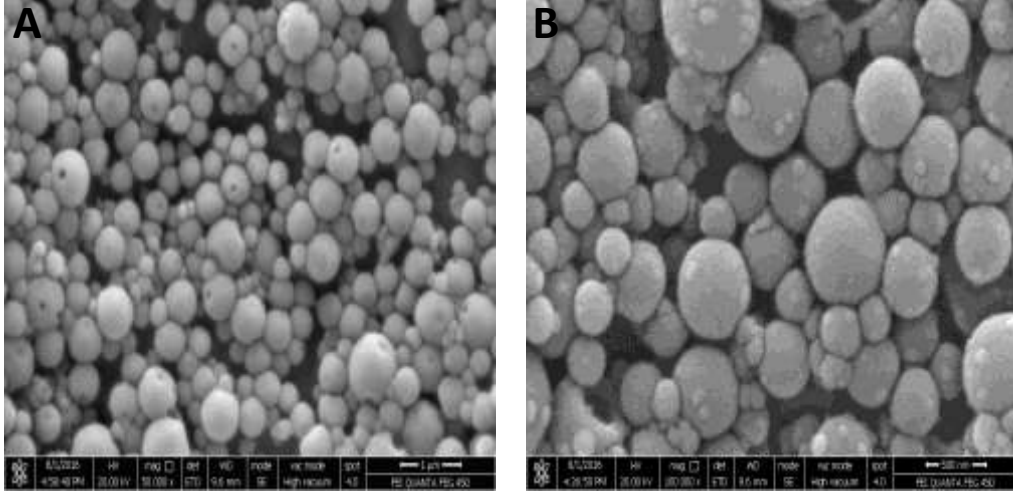
Elde edilen graft kopolimerlerinin TGA analizleri yapılmıştır. Kuru örnek TGA analizi için 10 °C/min hızda 20 °C’den 600 °C’ye kadar ısıtılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.3 sırasıyla PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerlerinin termogravimetrik analizini göstermektedir. PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerlerinin termal bozunması polistirene benzer olup yaklaşık 421,9 °C’dir.



Şekil 3.3 PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerlerinin TGA eğrisi.

3.2 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN YÜZEY MORFOLOJİSİ

Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi SEM analizi ile değerlendirilmiştir. SEM görüntülerine bakıldığında nanopartiküllerin oldukça düzgün yüzeye sahip küresel formda olduğu ve genelde homojen şekilde dağıldığı ve agregasyonun olmadığı görülmektedir. Ayrıca DLS ölçümlerinden elde edilen sonuçlara göre karşılaştırıldığında ortalama çaplarının daha küçük olduğu saptanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 (a) PS-PLina nanopartiküllerin ve (b) PS-PLina-PEG nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

3.2.1 Partiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler

Elde edilen nanopartiküllerin boy-boy dağılımlarını gerçekleştirmek amacıyla polimer miktarı, sürfaktan miktarı ve karıştırma hızı değiştirilmiş ve Çizelge 1'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre sürfaktan miktarının artmasıyla nanopartiküller arasında itme kuvveti artmış, dinamik arayüzey gerilimi önemli bir şekilde azalmıştır ve böylelikle nanopartiküllerin boyutları azalarak daha kararlı hale gelmiştir.

Partiküllerin hazırlanma aşamasında polimer miktarının artması polimerin daha fazla çökmesine neden olmuştur ve dolayısıyla nanopartikül boyutu artmıştır.

Homojenizatör hızı arttıkça süspansiyon ortamına iletilen enerji miktarı artmıştır ve bu etki nanopartiküllerin boyutunu küçültmüştür.

Çizelge 3.1 PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin boy-boy dağılımı üzerine bazı parametrelerin etkileri.

Örnekler	Polimer konsantrasyonu (mg/mL DCM)	PVA konsantrasyonu (mg/mL)	Homojenizatör hızı (% büyüklük)	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
PS-PLina NP	5	0.5	90	411±5	0.313±0.042	-20.3±0.10
	3	0.5	90	339±7	0.216±0.021	-27.2±0.31
	1	0.5	90	150±10	0.080±0.009	-32.8±0.25
	1	0.5	90	150±10	0.080±0.009	-32.8±0.25
	1	0.25	90	235±16	0.158±0.018	-30.5±0.02
	1	0.125	90	328±18	0.378±0.024	-19.8±0.30
	1	0.5	90	150±10	0.080±0.009	-32.8±0.25
	1	0.5	70	342±17	0.285±0.043	-18.0±0.33
	1	0.5	50	512±28	0.398±0.075	-12.6±0.42
PS-PLina-PEG NP	5	0.5	90	568±14	0.495±0.093	-9.2±0.78
	3	0.5	90	499±11	0.307±0.078	-10.1±0.22
	1	0.5	90	184±6	0.113±0.017	-14.6±0.19
	1	0.5	90	184±6	0.113±0.017	-14.6±0.19
	1	2	90	265±13	0.277±0.021	-13.3±0.27
	1	1	90	380±11	0.348±0.008	-11.0±0.16
	1	0.5	90	184±6	0.113±0.017	-14.6±0.19
	1	0.5	70	402±13	0.318±0.060	-12.1±0.23
	1	0.5	50	665±17	0.523±0.077	-6.5±0.11

Nanopartiküllerin boy-boy dağılımına göre yapılan karakterizasyon çalışması sonrasında nanopartiküller optimize edilerek boyutları 150±10nm olarak saptanmıştır. Graft kopolimerlerin sahip olduğu karboksil grubu nedeniyle yüzey yükünün negatif olduğu bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının PDI değerlerine bakıldığında sulu ortamda hemen hemen homojen bir dağılıma sahip oldukları gözlenmiştir.

3.3 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN STABİLİTE TESTİ

Bir aylık süre zarfında partiküllerin boyutlarında, polidispersitelerinde ve yüzey yük dağılımlarında önemli bir değişimin olmadığı ve partiküllerin +4 °C’de saklanması suretiyle belirlenen süre zarfında stabilitelerini koruduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Boş nanopartiküllerin +4 °C’de sulu ortamda depolanmasının nanopartiküllerin ortalama çapına, dağılım indeksine ve zeta potansiyel yüküne olan etkisi.

+4 °C			
PS-PLina NP’leri	Size (nm)	PDI	ZP (mV)
1.Gün	150±10	0.080±0.009	-32.8±0.25
30.Gün	156±2	0.090±0.005	-30.1±0.12
PS-PLina-PEG NP’leri			
1.Gün	184±6	0.113±0.017	-14.6±0.19
30.Gün	189±1	0.118±0.004	-13.1±0.33
PS-PLina-PLL-siRNA NP’leri			
1.Gün	168±3	0.120±0.012	-37.2±0.11
30.Gün	171±4	0.132±0.006	-34.7±0.20
PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP’leri			
1.Gün	200±4	0.104±0.035	-20±0.04
30.Gün	204±7	0.098±0.049	-14.1±0.17

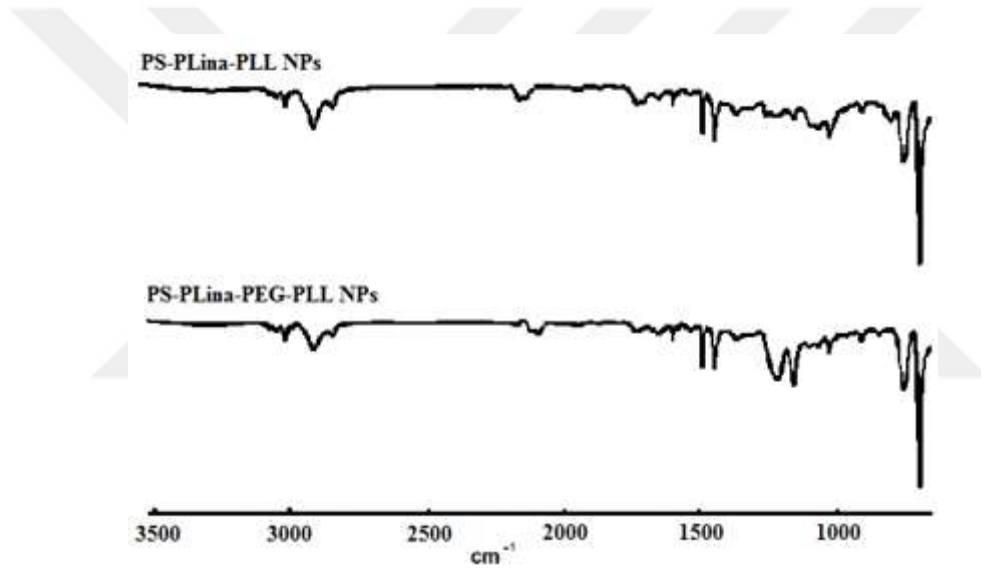
3.4 PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN PLL İLE MODİFİYE EDİLMESİ

Çizelge 3.3’ten de görüldüğü üzere, eklenen PLL miktarı arttıkça nanopartiküllerin yüzey yükleri pozitif olarak lineer bir şekilde artmıştır. Ancak fazla miktarda PLL ilave edilmesi hücre etkileşimlerinde toksisiteye neden olduğundan ve nanopartikül boyutunu artırdığından dolayı uygun bağlanma verimi için gerekli olan optimum miktarın tespit edilmesi önemlidir.

Çizelge 3.3 Nanopartiküllerin PLL ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen zeta potansiyel değerleri.

Örnekler	0 µl PLL	250 µl PLL	500 µl PLL	1000 µl PLL
PS-PLina NP'leri	-32.8±0.25	+4.14 mV±0.08	+14.9 mV±0.06	+17.13 mV±0.08
PS-PLina-PEG NP'leri	-14.6±0.19	+9.14 mV±0.1	+15.8 mV±0.05	+20.77 mV±0.12

Elde edilen PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin FTIR spektrumları Şekil 3.5'te görülmektedir. FTIR spektrumuna bakıldığında PLL'in yaklaşık 2070 cm⁻¹ civarında karakteristik CON-H gerilme absorpsiyonu ve 2860 cm⁻¹ civarında simetrik CH₂ gerilme bandı verdiği gözlenmiştir.



Şekil 3.5 PS-PLina-PLL NP'lerin ve PS-PLina-PEG-PLL NP'lerinin FTIR spektrumları.

3.5 PLL İLE MODİFİYE EDİLMİŞ PS-PLina ve PS-PLina-PEG NANOPARTİKÜLLERİNE siRNA BAĞLANMASI VE BAĞLANMA VERİMİNİN HESAPLANMASI

Nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlardaki siRNA ile etkileşimlerinden sonra elde edilen zeta potansiyel değerleri Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 PS-PLina-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen zeta potansiyel değerleri.

Örnekler	0 nM SiRNA	100 nM SiRNA	280 nM SiRNA	400 nM SiRNA
PS-PLina-PLL (250 µl)	+4.14 mV±0.08	-9.67 mV±0.03	-10.43mV±0.83	-10.77 mV±0.34
PS-PLina-PLL (500 µl)	+14.9 mV±0.06	-11.13 mV±0.17	-12.27mV±0.97	-11.2 mV±0.56
PS-PLina-PLL (1000 µl)	+17.13mV±0.08	-9.81 mV±0.29	-10.6 mV±0.19	-11.6 mV±0.01

Çizelge 3.5 PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen zeta potansiyel değerleri.

Örnekler	0 nM SiRNA	100 nM SiRNA	400 nM SiRNA	600 nM SiRNA
PS-PLina-PEG-PLL (250 µl)	+9.14 mV±0.1	-6.70mV±0.94	-8.65mV±0.92	-10.12mV±0.29
PS-PLina-PEG-PLL (500 µl)	+15.8 mV±0.05	-14.3 mV±1.74	-13.67mV±1.97	-13.37mV±1.56
PS-PLina-PEG-PLL (1000 µl)	+20.77mV±0.12	-11.07 mV±0.53	-14.43 mV±1.2	-14.83mV±0.61

Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5’deki sonuçlara göre tüm PLL yüklü nanopartiküllerin sahip oldukları pozitif yük, siRNA yüklenme çalışmalarından sonra negatife kaymıştır. Kazanılan negatif yüzey yükü, siRNA’nın nanopartiküllere bağlandığını göstermekte olup PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL NP’lerin yüzey yükleri arasında çok büyük farkın olmadığını göstermektedir.

Farklı miktardaki PLL ile bağlanmış PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin siRNA yükleme veriminin incelendiği prosedürde elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.6 PS-PLina-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileşimi sonucu elde edilen % bağlanma verimlilikleri.

Örnekler	100 nM SiRNA	280 nM SiRNA	400 nM SiRNA
PS-PLina-PLL (250 µl)	%28.5±1.12	%25.68±0.98	%4.14±0.12
PS-PLina-PLL (500 µl)	%63.4±0.94	%43.4±1.05	%61.56±1.02
PS-PLina-PLL (1000 µl)	%46.84±0.85	%36.55±0.24	%35.39±0.35

Çizelge 3.7 PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki siRNA ile etkileşimi sonucu elde edilen % bağlanma verimlilikleri.

Örnekler	100 nM SiRNA	400 nM SiRNA	600 nM SiRNA
PS-PLina-PEG-PLL (250 µl)	%6.25±0.06	%34.2±0.79	%21±0.32
PS-PLina-PEG-PLL (500 µl)	%42.25±1.76	%27±0.94	%21.9±0.43
PS-PLina-PEG-PLL (1000 µl)	%39.10±1.4	%20.31±0.66	%28.65±0.73

siRNA bağlanma verimi sonuçlarına bakıldığında siRNA konsantrasyonu ve % bağlanma verimi arasında her partikül için korelasyon görülmemekle birlikte PS-PLina-PEG graft kopolimerindeki PEG miktarındaki artışın kopolimerin organik çözücündeki çözünürlüğünü düşürmesinden dolayı PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerindeki PEG miktarı oldukça azaltılmıştır. Bu nedenle PS-PLina NP'ler ile karşılaştırıldığında PS-PLina-PEG NP'lere siRNA bağlanma verimliliğinde önemli bir artışın olmadığı gözlenmiştir.

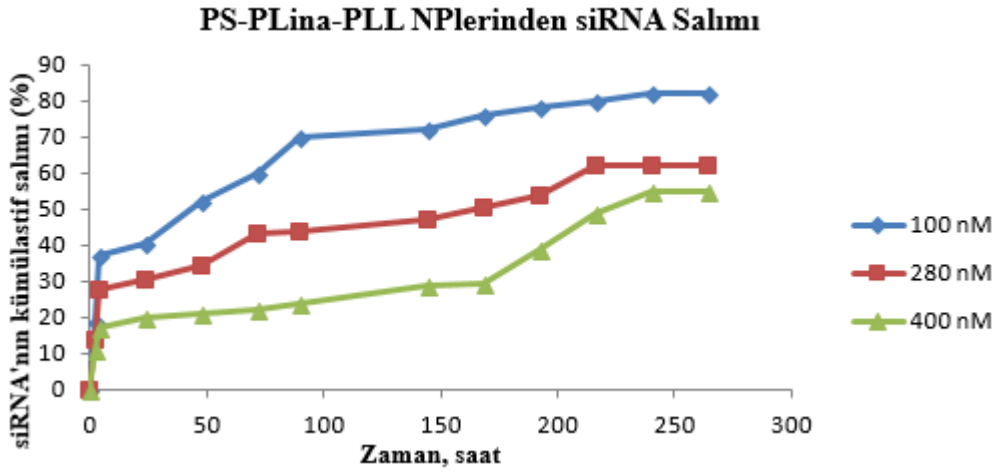
Nispeten daha yüksek % bağlanma verimi, 500 µl PLL ile modifiye edilen nanopartiküllerin farklı miktardaki siRNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilmiştir.

3.6 NANOPARTİKÜLLERİN siRNA SALIM PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

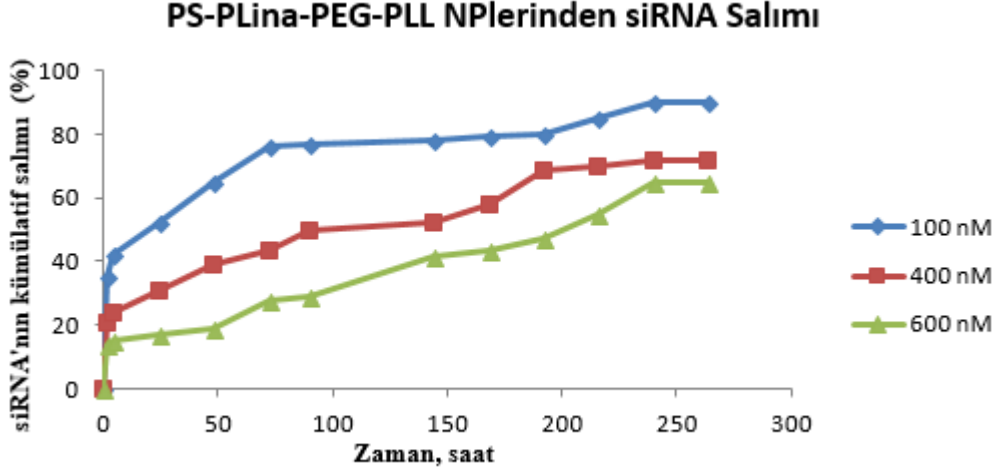
Şekil 3.6'da PS-PLina-PLL NP'lerinin salım sonucuna baktığımızda başlangıçta 4.saatte 100 nM konsantrasyonda %37, 280 nM'da %27,6 ve 400 nM'da %17 ilk ani patlama etkisi görülmüştür. Salımın son aşamasında siRNA'nın kümülatif miktarı yavaşlamaya başlamış ve 240. saatin sonunda 100 nM konsantrasyonda %82, 216.saat için 280 nM'de %62 ve 240.saat için 400 nM konsantrasyonda %55 siRNA salınarak platoya ulaşmıştır.

Şekil 3.7'deki PS-PLina-PEG-PLL NP'lerinin salım profiline baktığımızda başlangıçta 4.saatte 100 nM konsantrasyonda %42, 400 nM'da %24 ve 600 nM'da %15'lik ilk ani patlama etkisi görülmüştür. 100 nM konsantrasyonda 240. saatin sonunda siRNA'nın %90'ı, 400 nM'da %72'si ve 600 nM'de %65 siRNA salınarak platoya ulaşmıştır. Yaklaşık 10. günün sonunda sürdürülmüş ve kontrollü bir salım profili gözlenmiştir. Her iki nanopartikül formülasyonuna bakıldığında 100 nM konsantrasyonda ilk salım patlama etkisinin yüzde miktarının daha fazla olduğu, partiküle bağlı az miktardaki siRNA konsantrasyonunun daha kolay ve daha hızlı bir şekilde salındığı ve siRNA konsantrasyonu arttıkça bu etkinin giderek azaldığı gözlenmiştir. Bunun nedeni yüzeye bağlı düşük konsantrasyondaki siRNA'nın

miktarının az olması nedeniyle fizyolojik ortama geçişi daha kolay ve hızlı olmuştur. Ayrıca PS-PLIna-PLL NP'ler ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 240.saatin sonunda siRNA'nın partiküllerden yüzde salım miktarının PS-PLIna-PEG-PLL NP'lerde biraz daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi PS-PLIna-PEG-PLL NP'lerin ihtiva etmiş olduğu PEG'in hidrofilik karakterde olması ve fizyolojik ortamla teması sonucunda yüzeyindeki degradasyon hızının, daha hidrofobik karakterde olan PS-PLIna-PLL NP'lere göre daha fazla olması dolayısıyla PS-PLIna-PEG-PLL NP'lerden daha fazla miktarda siRNA salımı söz konusu olmuştur ancak aralarında önemli bir fark görülmemiştir. Cong ve arkadaşları siRNA salımı için PEG ile PLGA blok kopolimerden yola çıkarak asitte bozunabilen amid bağı içeren (Dlink_m) siRNA enkapsüle PEG-Dlink_m-PLGA NP'leri, PLGA/Cy5-siRNA NP'leri ve PLA/Cy5-siRNA NP'lerini hazırlamışlardır. siRNA salım profillerine bakıldığında PEG'in taşıyıcı sisteme kattığı hidrofilik karakter neticesinde yüzeyin fizyolojik ortamda daha fazla aşınmasından dolayı PEG-Dlink_m-PLGA NP'lerden siRNA salım yüzdesinin PLGA/Cy5-siRNA NP'lerinden biraz daha yüksek olduğu buna karşılık PLA/Cy5-siRNA NP'lerindeki salım yüzdesinin her ikisinden oldukça fazla düşük olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi PLGA'nın PLA'ya göre daha hidrofilik karakterde olması neticesinde PLGA'nın salım yüzdesi PLA'ya göre daha fazla olarak gözlenmiştir [109].



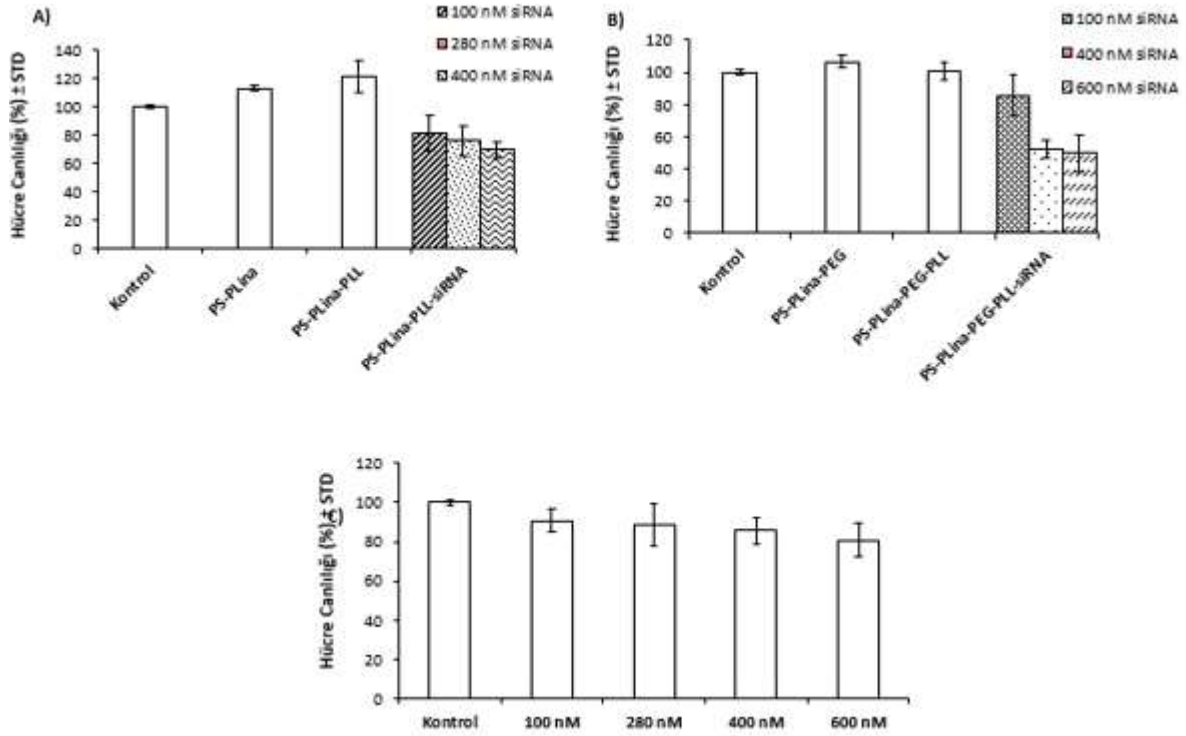
Şekil 3.6 PS-PLIna-PLL nanopartiküllerinden siRNA salımı.



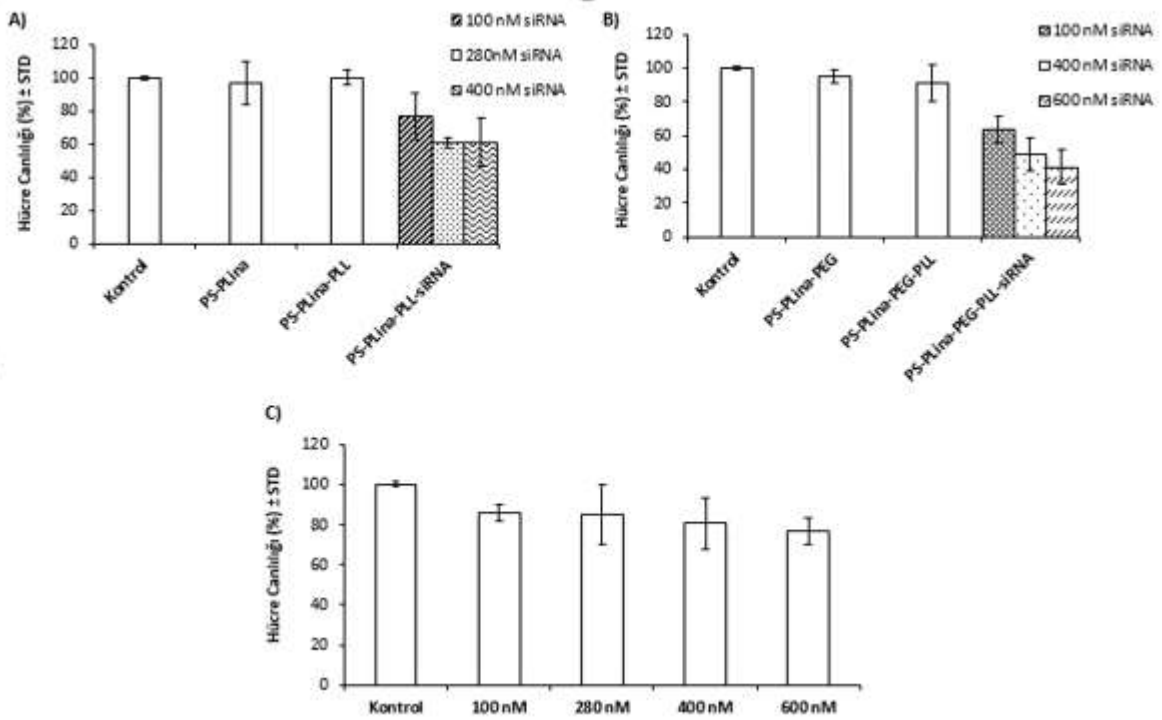
Şekil 3.7 PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinden siRNA salımı.

3.7 siRNA YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN A549 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

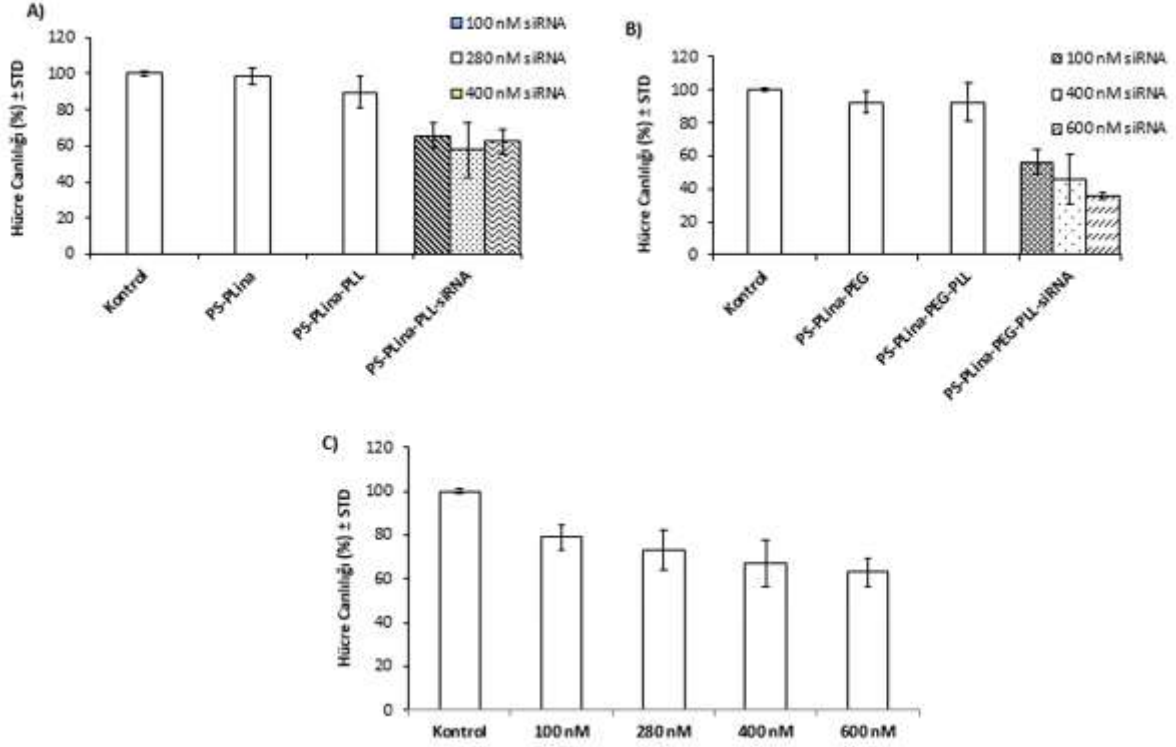
Sitotoksosite testi için, önce sabit siRNA ve nanopartikül konsantrasyonlarının farklı inkübasyon sürelerinde kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Daha sonra inkübasyon süresi sabit tutulup farklı $w(\text{siRNA}) / w(\text{NP})$ oranlarının hücrelere olan etkisi ortaya konulmuştur. PS-PLina ve PS-PLina-PEG (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nanopartikülleri 500 μl PLL ile modifiye edilerek sırasıyla 100 nM, 280 nM, 400 nM c-myc siRNA'lar ve 100 nM, 400 nM, 600 nM c-myc siRNA'lar ile etkileştirilerek A549 hücreleri üzerinde 24 (Şekil 3.8), 48 (Şekil 3.9) ve 72 saatlik (Şekil 3.10) periyotlarla sitotoksik etkileri incelenmiştir.



Şekil 3.8 (a) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (b) PS-PLina-PEG NP'lerin, PS-PLina-PEG-PLL NP'lerin ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin, (c) Kontrol grubu için boş NP'lerin ve çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın A549 hücreleriyle 24 saatlik etkileşimleri neticesinde in vitro sitotoksosite sonuçları.



Şekil 3.9 (a) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (b) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin, (c) Kontrol grubu için boş NP'lerin ve çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın A549 hücreleriyle 48 saatlik etkileşimleri neticesinde in vitro sitotoksosite sonuçları.

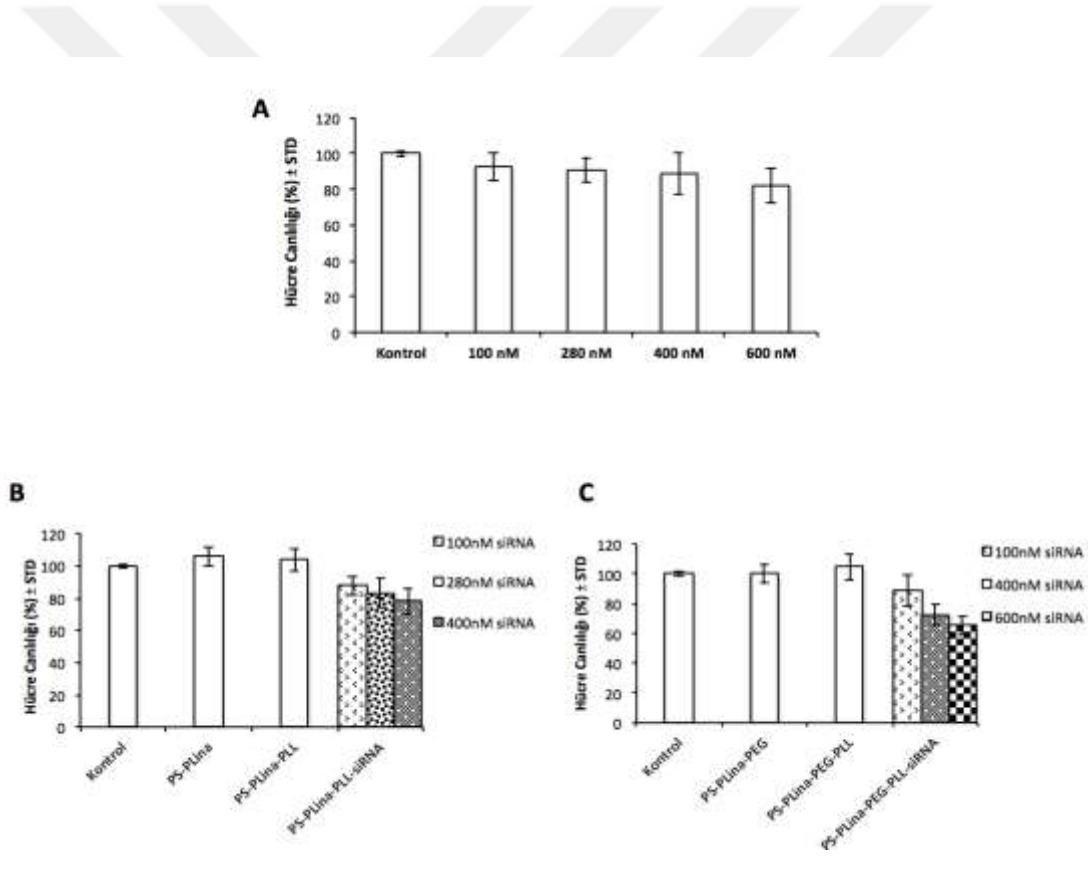


Şekil 3.10 (a) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (b) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin, (c) Kontrol grubu için boş NP'lerin ve çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın A549 hücreleriyle 72 saatlik etkileşimleri neticesinde in vitro sitotoksitesite sonuçları.

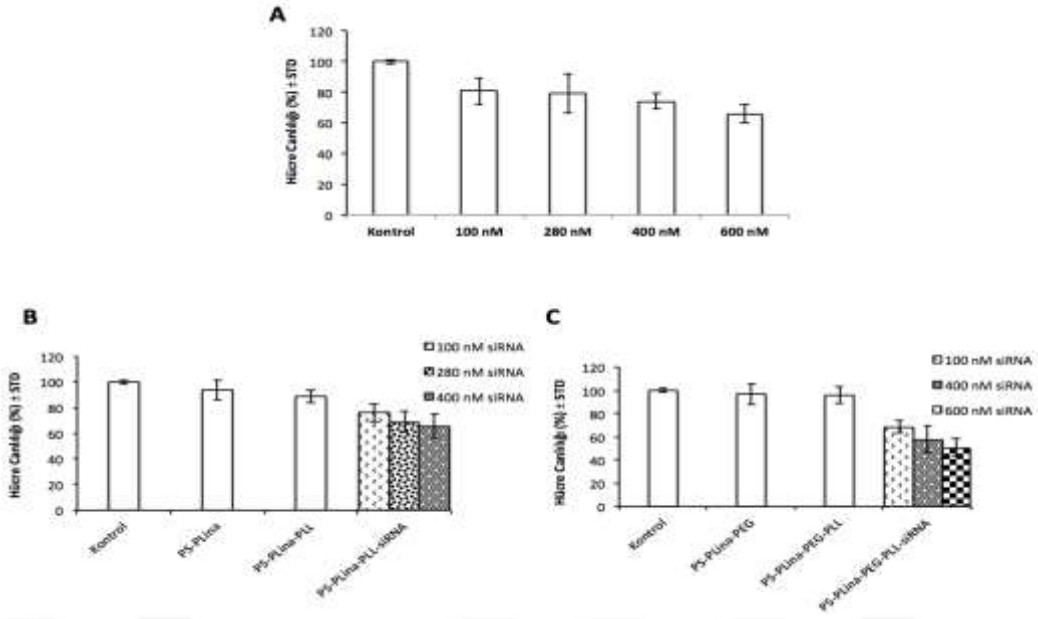
Bu sonuçlara göre PLL ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin hücreler üzerine 24, 48 ve 72 saatlik süreyle kayda değer bir sitotoksitesitesi yoktur. Farklı konsantrasyonlardaki c-myc siRNA'nın PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL yapısındaki taşıyıcılar olmadan hücrelere direkt olarak verilmesinin toksik etkisinin, nanopartiküllerle birlikte hücrelere verilmesinden daha az olduğu gözlenmiştir. siRNA ile konjuge edilmiş nanopartiküllerin A549 insan akciğer kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri inkübasyon süresi arttıkça artmıştır. 280 nM c-myc siRNA ile konjuge edilmiş PS-PLina-PLL nanopartiküllerinin 72 saat sonundaki toksik etkisi %57,83 iken 600 nM c-myc siRNA ile yüklenmiş PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin 72 saatlik toksik etkisi % 35,43 olarak ortaya konmuştur.

3.8 siRNA İLE KONJUGE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN L929 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

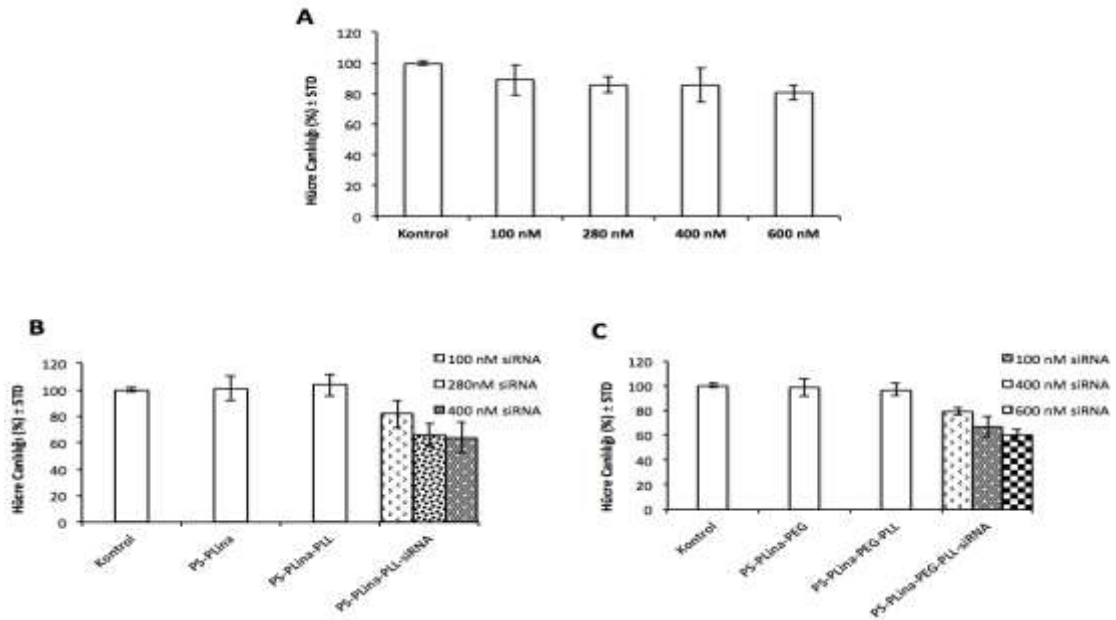
siRNA ile konjuge edilen nanopartiküllerin kanser hücresi olmayan, fare fibroblast hücreleri (L929) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analiziyle incelenmiştir. Önce sabit siRNA ve nanopartikül konsantrasyonunun farklı inkübasyon sürelerinde kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Daha sonra inkübasyon süresi sabit tutulup, farklı w(siRNA) / w(NP) oranlarının hücrelere etkisi ortaya konmuştur. PS-PLina ve PS-PLina-PEG (40 µg/mL) nanopartikülleri 500 µl PLL ile modifiye edilerek sırasıyla 100-280-400 nM c-myc siRNA'lar ve 100-400-600 nM c-myc siRNA'lar ile etkileştirilerek L929 hücreleri üzerindeki 24 (Şekil 3.11), 48 (Şekil 3.12) ve 72 saatlik (Şekil 3.13) sitotoksik etkileri incelenmiştir.



Şekil 3.11 (a) Çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın, (b) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (c) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin L929 hücreleriyle 24 saatlik sitotoksikite sonuçları.



Şekil 3.12 (a) Çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın, (b) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (c) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin L929 hücreleriyle 48 saatlik sitotoksisite sonuçları.



Şekil 3.13 (a) Çeşitli konsantrasyonlarda serbest siRNA'nın, (b) PS-PLina NP'leri, PS-PLina-PLL ve 100 nM, 280 nM ve 400 nM konsantrasyonlarında siRNA bağlanan PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerin, (c) PS-PLina-PEG NP'leri, PS-PLina-PEG-PLL NP'leri ve 100 nM, 400 nM ve 600 nM konsantrasyonlarda siRNA bağlanan PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'lerin L929 hücreleriyle 72 saatlik sitotoksisite sonuçları.

Elde edilen göre PLL ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin A549 akciğer kanseri hücrelerinde olduğu gibi kanser olmayan hücreler üzerinde de (24, 48 ve 72 saatlik süreyle) önemli derecede bir sitotoksitesi yoktur. c-myc geni akciğer kanseri hücrelerinde daha fazla ekprese olduğu için bu genin hedeflenmesi, inhibe olması ve spesifik hücre ölümü L929 hücrelerine nazaran A549 hücrelerinde daha fazla gözlenmiştir. Aynı şekilde siRNA ile konjuge edilen nanopartiküllerin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkileri inkübasyon süresi arttıkça artmıştır.

3.9 APOPTOTİK-NEKROTİK ANALİZLER

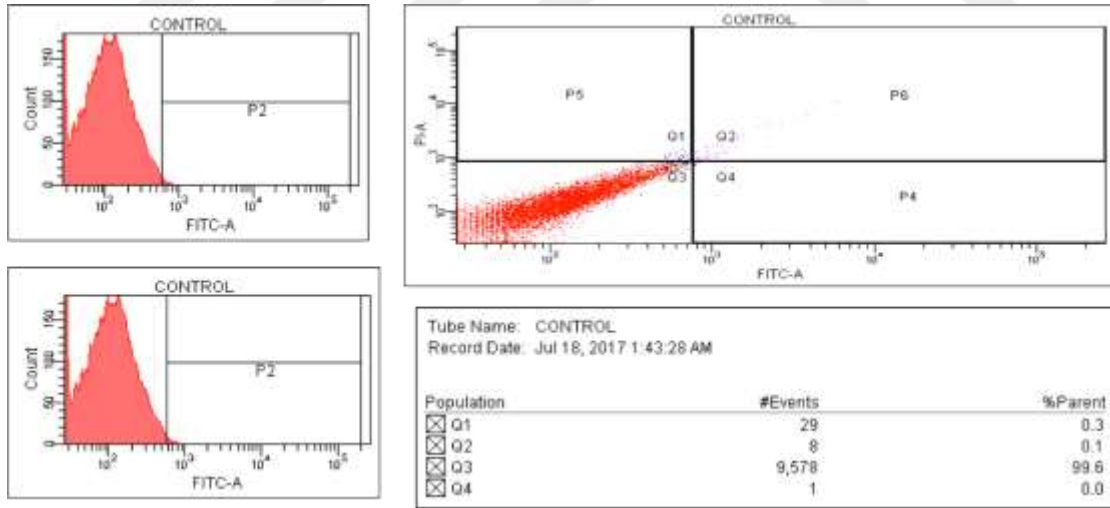
3.9.1 Akış Sitometrisi (Flow Cytometry) ile Annexin V-PI Analizi

Yapılan Akış Sitometrisi analizi sonuçlarında görülen Q3 bölgesi canlı hücre yoğunluğunu, Q4 bölgesi ise apoptotik hücrelerin yoğunluğunu göstermektedir. Q1 ve Q2 bölgeleri ise sırasıyla erken ve geç nekroza girmiş hücrelerin yoğunluğudur. Elde edilen sonuçlara göre, yapılan analizde hiç bir reaktifle muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri %99,6 canlılıktadır. Hücreler farklı konsantrasyonlardaki siRNA'lar ve bunların PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL ile konjuge edilmiş formlarıyla etkileştirilmiştir.

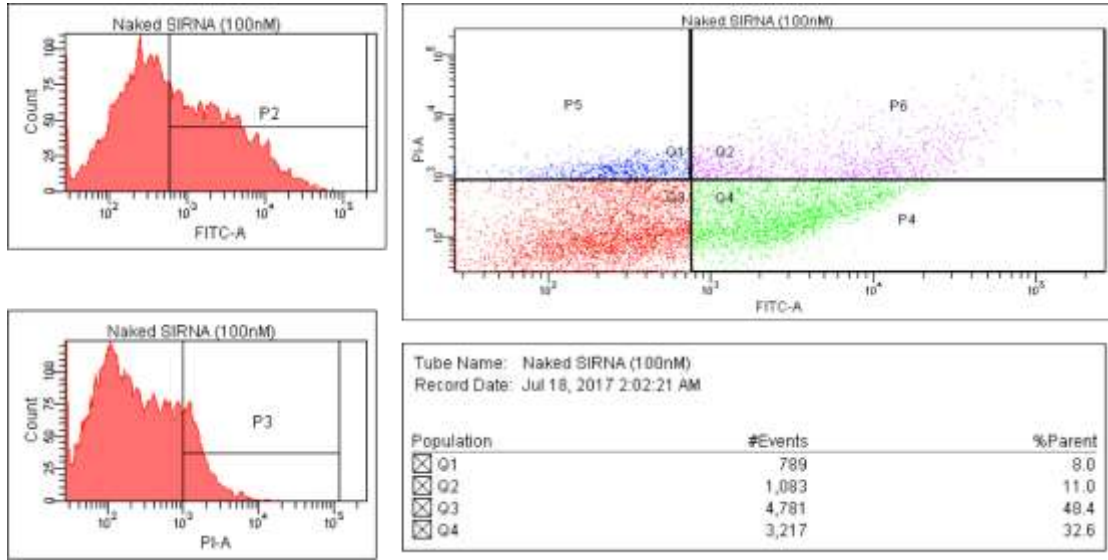
siRNA tek başına fizyolojik koşullar altında kararsızdır. siRNA normalde kan dolaşımına katıldığında serum içerisindeki nükleazlar tarafından kolaylıkla sindirilmekte, hızlı renal temizlenme/hepatik ayrılmaya maruz kalmakta ve geniş partikül boyutu ve aşırı negatif yükünden dolayı hücresel membranı çok zor geçebilmektedir. Çıplak siRNA pek çok insan hücrelerindeki hedef hücreleri doğru bir şekilde tanımlayamamaktadır ve dolayısıyla in vitro ortamda bakıldığında siRNA'nın tek başına etkinliği düşük bulunmuştur [110].

siRNA ile konjuge olmuş NP'lerin hücreler ile inkübasyonu sonucu c-myc geni A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmek için yönlenmiştir. siRNA-NP'ler, canlı hücrelerin ölümüne sebep olmaksızın endositoz yoluyla hedef hücrelerin direkt olarak sitoplazmasına hareket ederek hücre membranını geçebilmiş ve c-myc geninin ifadesini baskılamıştır. Bu gözlemler açıkça göstermektedir ki PS-PLina-PLL-siRNA NP'leri ve PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'ler, hücre kültür hattında doza bağımlı bir şekilde siRNA'nın kanser hücreleri içerisinde birikmesini sağlayarak c-myc geninin ekprese olmasını engellemiştir.

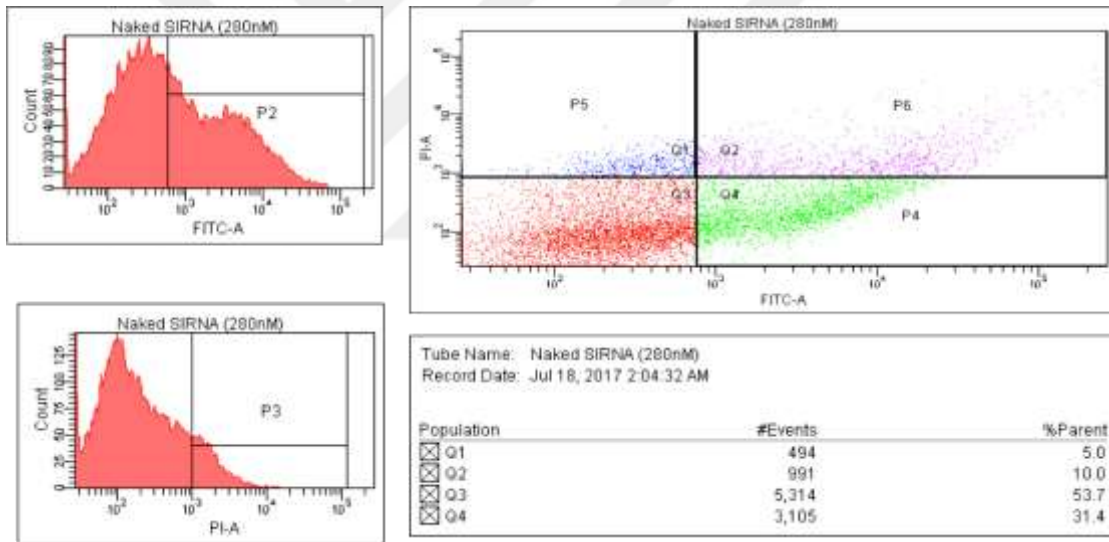
Sonuç olarak, nanopartikül olmadan hücelere verilen siRNA'ların da belli bir seviyede apoptoza neden olduğu gözlenirken bu apoptotik oranın nanopartikül kullanılarak siRNA'ların hücrelerle etkileşiminde arttığı ortaya konmuştur. Aynı şekilde, nekroza girmiş hücre sayısı da her iki nanopartikül-siRNA formülasyonlarında artış göstermekle birlikte PS-PLIna-PEG-PLL-siRNA NP formülasyonundaki PEG miktarı çok az olduğu için PEG'li ve PEG'siz partikül formları arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Aldrian ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada amfipatik RICK peptit-siRNA NP'leri ve PEG graft RICK peptit-siRNA NP'leri (PEG oranı \leq %20) taşıyıcı sistemleri hazırlanarak in vitro ve in vivo salım özellikleri incelenmiştir. Flow akış sitometri analizi yoluyla NP'lerin U87 insan glioblastoma hücreleri tarafından hücre içerisine alımı araştırılmıştır ve yapılan analiz sonucunda PEG'li ve PEG'li olmayan nanopartikül formülasyonlarında hücre internalizasyon düzeyleri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Aynı hücre üzerindeki öldürücü etkinliğine bakıldığında aynı şekilde PEG'li ve PEG'siz formülasyonlar arasında önemli bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde nanopartiküle PEG'in graft edilmesinin nanopartikül oluşumunu değiştirmediği, sadece zeta potansiyel değerinde hafif bir azalmanın olduğu gözlenmiştir [111].



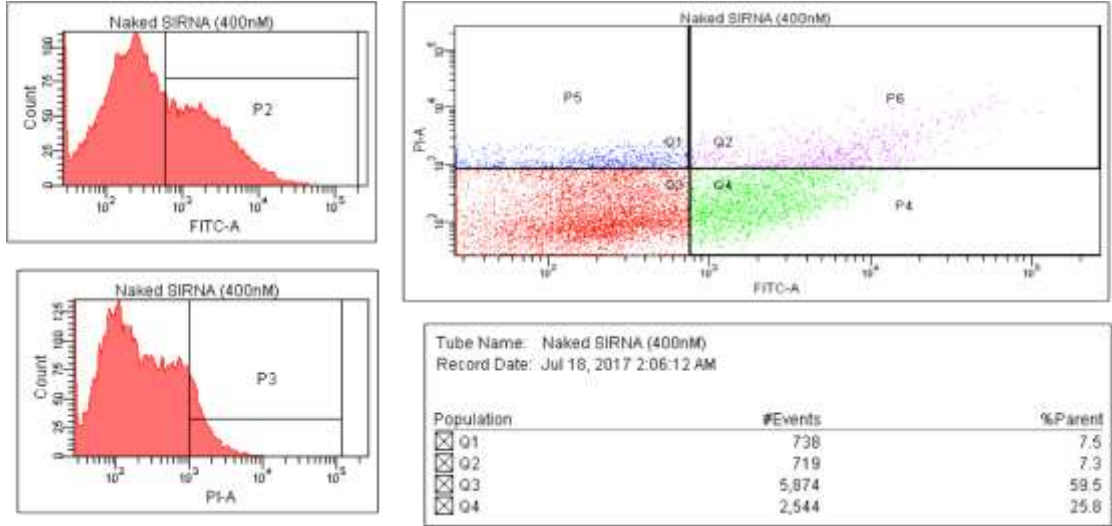
Şekil 3.14 Kontrol grubu A549 hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



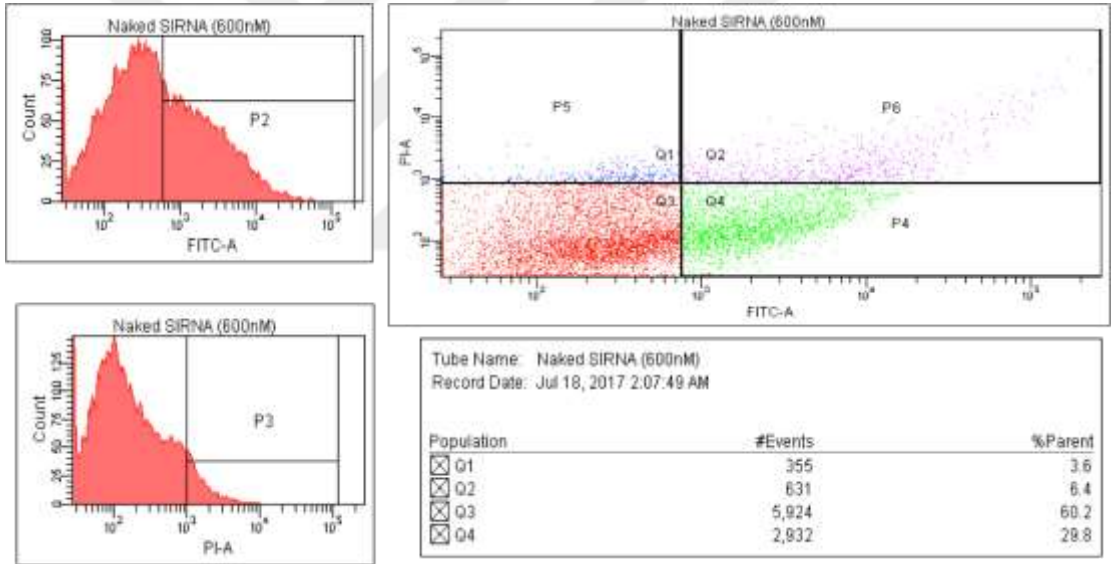
Şekil 3.15 100 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



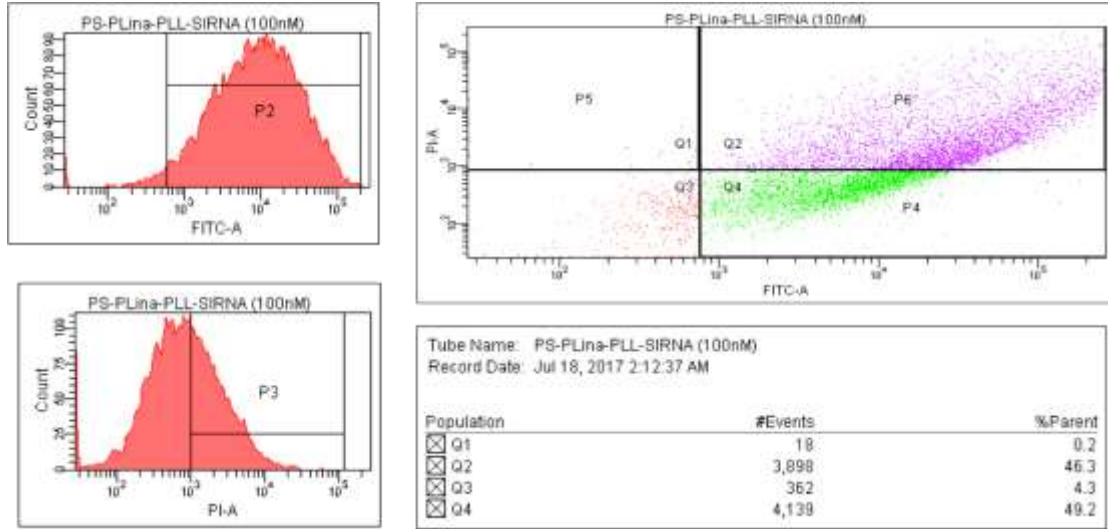
Şekil 3.16 280 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



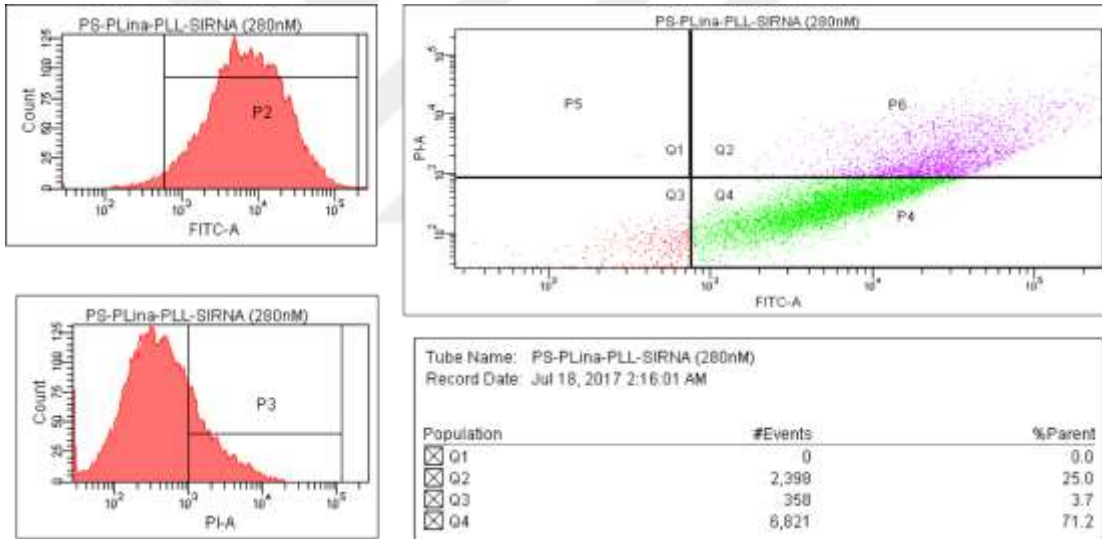
Şekil 3.17 400 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



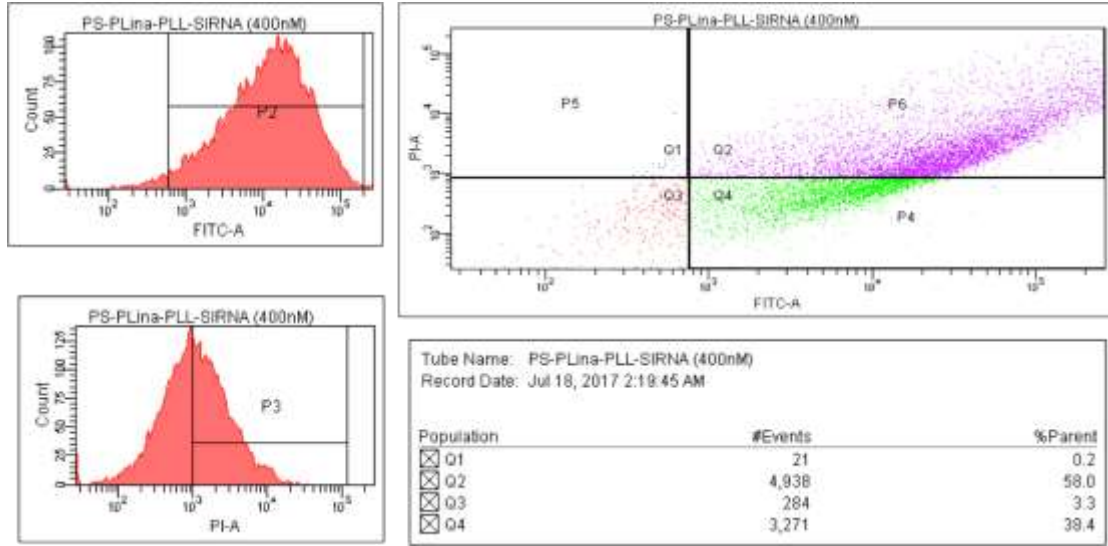
Şekil 3.18 600 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



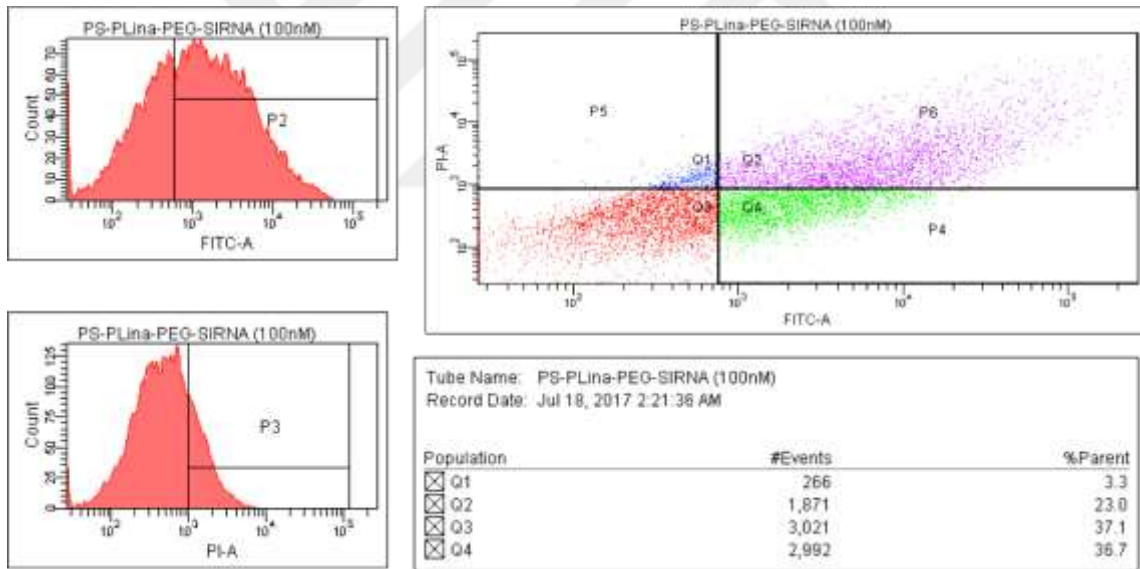
Şekil 3.19 PS-PLina-PLL-100 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



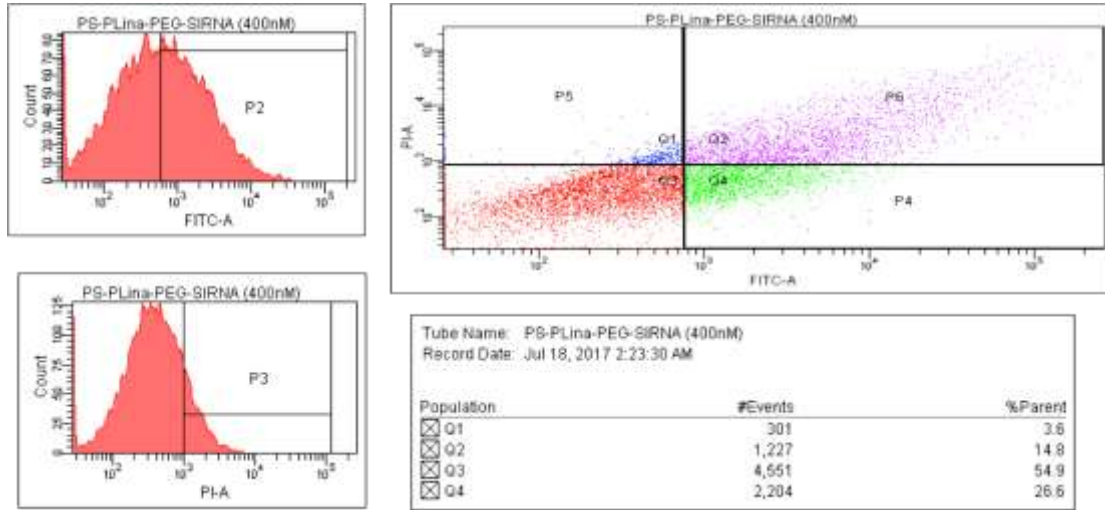
Şekil 3.20 PS-PLina-PLL-280 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



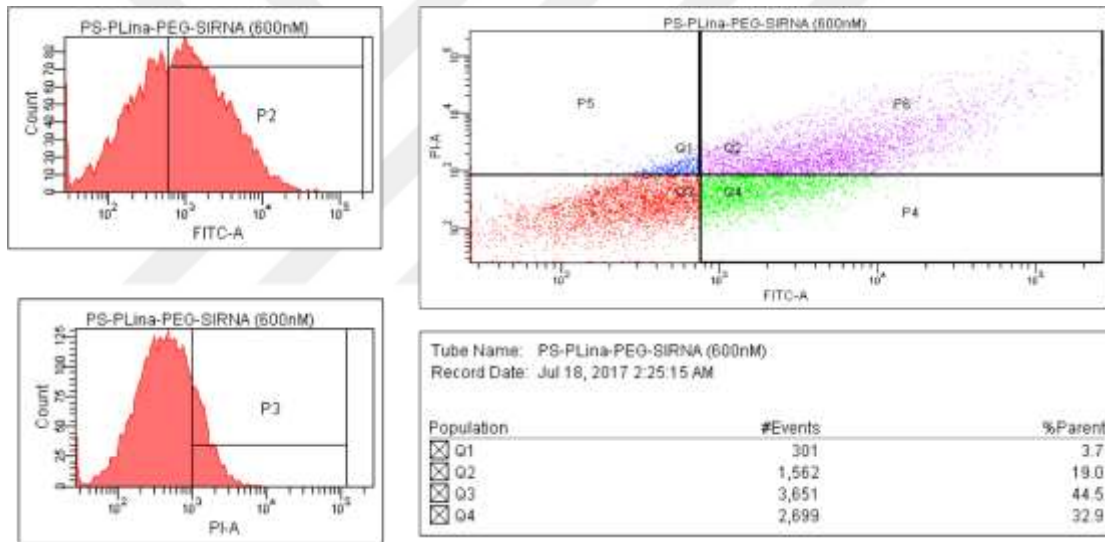
Şekil 3.21 PS-PLina-PLL-400 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



Şekil 3.22 PS-PLina-PEG-PLL-100 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.



Şekil 3.23 PS-PLina-PEG-PLL-400 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.

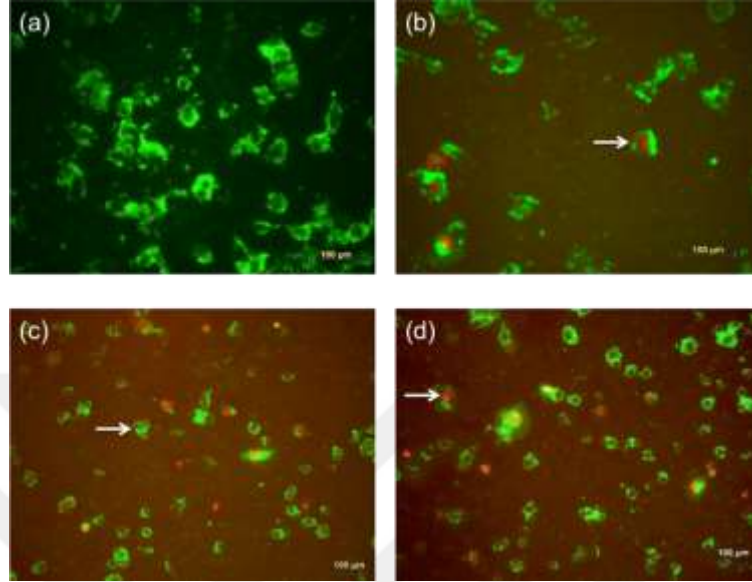


Şekil 3.24 PS-PLina-PEG-PLL-600 nM siRNA ile muamele edilen hücrelerin Akış Sitometrisi ile Annexin V ve PI analizi.

3.9.2 Floresan Mikroskopji Analizi

Annexin V boyası apoptotik ve canlı hücreleri yeşile boyamaktadır. PI floresan boyası normalde canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere girememekte ve bu hücreler PI ile boyanmamaktadır. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içerisine girmekte ve çekirdeği kırmızıya boyamaktadır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, hiç bir ajanla muamele edilmemiş hücrelerin canlı oldukları görülürken (a), siRNA (b), PS-PLina-PLL-siRNA (c) ve PS-PLina-PEG-PLL-siRNA (d) gruplarında ise geç apoptoz

hücreleri ve nekrotik hücreler görülmektedir (Şekil 3.25). siRNA'lar nanopartiküllere yüklenerek verildiğinde apoptotik ve nekrotik hücrelerde artma gözlenmiştir. Sonuçlar akış sitometrisi analizini doğrular niteliktedir.



Şekil 3.25 (a) Hiçbir ajan ile muamele edilmemiş A549 kontrol hücreleri, (b) sadece siRNA ile etkileştirilmiş hücreler, (c) PS-PLina-PLL-siRNA; d) PS-PLina-PEG-PLL-siRNA ile etkileştirilen hücreler. Oklar nekrotik ve apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Ölçek 100 μm aralığını göstermektedir.

3.10 BULGULAR VE DEĞERLENDİRME

Sunulan tez kapsamında ulaşılan bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Yapılan tez çalışmasında PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG graft kopolimerleri, stirenin serbest radikal polimerizasyonu yoluyla sentezlenmiştir.
- Sentezlenen PS-g-PLina ve PS-g-PLina-g-PEG kopolimerlerinden PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartikülleri çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır.
- PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin boy-boy dağılımına etki eden parametreleri değerlendirmek üzere polimer/çözücü oranı, sürfaktan miktarı ve homojenizatör hızı değiştirilerek nanopartiküller hazırlanmıştır. Değerlendirme sonuçlarına göre elde edilen bulgular şöyledir:

- ✓ Polimer/çözücü oranındaki artış süspansiyon ortamında polimerin dağılmasını zorlaştırıp polimerin daha fazla çökmesine sebep olduğu için nanopartikül boyutunu artırmaktadır.
 - ✓ Sürfaktan miktarındaki artış nanopartiküller arasındaki itme kuvvetini artırarak dinamik ara yüzey gerilimini azaltmıştır. Böylece küçük boyutlara sahip oldukça kararlı nanopartiküller elde edilmiştir.
 - ✓ Karıştırma hızı arttıkça süspansiyon ortamına iletilen enerji miktarı artmış ve bu durum nanopartiküllerin boyutunun küçülmesine sebep olmuştur.
- Nanopartiküllerin boy-boy dağılımı üzerine etki eden parametrelerin değerlendirilerek karakterize edilmesi sonucunda nanopartiküller optimize edilmiş ve boyutları PS-PLina nanopartikülleri için 150 ± 10 nm ve PS-PLina-PEG nanopartikülleri için 184 ± 6 nm olarak bulunmuştur.
 - Yapılan çalışmada nanopartiküllere siRNA bağlanması hedeflenmiştir. Negatif yüzey yüküne sahip siRNA moleküllerini nanopartiküllerin yüzeyine elektrostatik olarak bağlamak için partiküllerin yüzeyi pozitif yüklü PLL ile modifiye edilmiştir. Eklenen PLL miktarı ile birlikte nanopartiküllerin yüzey yükleri lineer bir şekilde pozitif olarak artmıştır. Eklenen PLL miktarının siRNA bağlanma verimine etkisini araştırmak adına nanopartiküller farklı derişimlerdeki (250, 500 ve 1000 μ l) PLL ile etkileştirilmiştir.
 - Elde edilen nanopartiküller farklı konsantrasyonlardaki (PS-PLina nanopartikülleri için 100, 280, 400 nM, PS-PLina-PEG nanopartikülleri için 100, 400 ve 600 nM) siRNA ile muamele edilmiştir. Partiküllerin zeta potansiyel ölçümleri yapılarak sahip oldukları pozitif yükün siRNA bağlama çalışmalarından sonra negatife kaydığı görülmüştür. Bu durum siRNA'nın nanopartiküllere bağlandığını göstermektedir.
 - Farklı miktardaki PLL ile bağlanmış PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlardaki siRNA ile bağlanma verimleri incelenmiştir. Nispeten daha yüksek bağlanma verimi 500 μ l PLL ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlardaki siRNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilmiştir.

- Nanopartiküllerin siRNA salım profilleri, nanopartiküller 500 µl PLL ile modifiye edilip farklı konsantrasyonlarda siRNA bağlanarak 0, 2, 4, 24, 48, 72, 90, 144, 168, 216, 240 ve 264. saatlerde alınan örneklerle incelenmiştir.
- PS-PLina-PLL-siRNA ve PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'leri başlangıçta 4.saatte 100 nM siRNA konsantrasyonunda belirli yüzdelerde ilk salım patlama etkisi göstermiş olup salımın son aşamasında kümülatif salım miktarı yavaşlamaya başlamış ve belirli bir süre sonunda platoya ulaşmıştır. PS-PLina-PEG-PLL-siRNA NP'ler hidrofilik karakterde PEG'in fizyolojik ortamda daha hızlı degradasyonundan dolayı PS-PLina-PLL-siRNA NP'lerle kıyaslandığında, farklı siRNA konsantrasyonlarında salım hızı PEG'li formülasyonda biraz daha fazla gözlenmiş olup aralarında çok fark görülmemiştir.
- Sabit siRNA ve farklı konsantrasyonlardaki siRNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) A549 akciğer kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Daha sonra inkübasyon süresi sabit tutulup $w(\text{siRNA}) / w(\text{NP})$ oranlarının hücrelere olan etkisi ortaya konulmuştur. Boş nanopatiküllerin toksik etkilerini incelemek üzere PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin PLL ile modifiye edildiği ve edilmediği formülasyonlar hazırlanmıştır.
- Bu sonuçlara göre PLL ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin hücreler üzerine 24,48 ve 72 saatlik süreyle kayda değer bir sitotoksitesi bulunmamaktadır.
- Farklı konsantrasyonlardaki siRNA'nın yapısında PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL nanopartikülleri olmadan hücrelere direkt verilmesinin toksik etkisinin nanopartiküller ile birlikte verilmesinden daha az olduğu gözlenmiştir. siRNA ile konjuge edilmiş nanopartiküllerin A549 insan akciğer kanser hücreleri üzerindeki toksik etkileri inkübasyon süresi arttıkça artmıştır. Ancak sitotoksite ve flow akış sitometri sonuçları arasında herhangi bir korelasyon görülmemiştir.
- 280 nM c-myc siRNA ile konjuge edilmiş PS-PLina-PLL nanopartiküllerinin 72 saatlik toksik etkisi %57,83'tür.

- 600 nM c-myc siRNA ile konjuge edilen PS-PLina-PEG-PLL nanopartiküllerinin 72 saatlik toksik etkisi %35,43'tür.
- Sabit siRNA ve farklı konsantrasyonlardaki siRNA ile etkileştirilmiş nanopartiküllerin farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) L929 hücreleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Daha sonra inkübasyon süresi sabit tutulup $w(\text{siRNA}) / w(\text{NP})$ oranlarının hücrelere olan etkisi ortaya konulmuştur. Boş nanopartiküllerin toksik etkilerini incelemek üzere PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerin PLL ile modifiye edildiği ve edilmediği formülasyonlar hazırlanmıştır.
- Bu sonuçlara göre PLL ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin hücreler üzerine 24, 48 ve 72 saatlik süreyle kayda değer bir sitotoksitesisi bulunmamaktadır. c-myc geni akciğer kanseri hücrelerinde daha fazla ekprese olduğu için bu genin hedeflenmesi, inhibe olması ve spesifik hücre ölümü L929 hücrelerine nazaran A549 hücrelerinde daha fazla gözlenmiştir. siRNA bağlı nanopartiküllerin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkileri inkübasyon süresi arttıkça artmıştır.
- Yapılan akış sitometrisi analiz sonuçlarına göre hiçbir reaktifte muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri %99,6 canlılıktadır. Hücreler farklı konsantrasyonlardaki siRNA'lar ve bunların PS-PLina-PLL ve PS-PLina-PEG-PLL ile konjuge edilmiş formlarıyla etkileştirilmiştir. Sonuçlarda, nanopartikül olmadan hücrelere verilen siRNA'ların da belli bir seviyede apoptoza neden olduğu gözlenirken bu apoptotik oranın nanopartikül kullanılarak siRNA'ların hücrelerle etkileşiminde arttığı ortaya konmuştur. Aynı şekilde, nekroza girmiş hücre sayısı da her iki nanopartikül-siRNA formülasyonlarında artış göstermiştir.
- Floreson mikroskopi analizi sonuçlarına göre hiçbir ajanla muamele edilmemiş hücrelerin canlı oldukları görülürken, siRNA, PS-PLina-PLL-siRNA ve PS-PLina-PEG-PLL-siRNA gruplarında ise geç apoptoz hücreleri ve nekrotik hücreler görülmüştür. siRNA'lar nanopartiküllere bağlanarak verildiğinde apoptotik ve nekrotik hücrelerde artma gözlenmiştir. Sonuçlar akış sitometrisi analizini doğrular niteliktedir.

- ✓ PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartikülleri siRNA taşıyıcısı olarak ilk kez üretilmiş ve bu yapıların antikanser etkinliği ilk kez gösterilmiştir.
- ✓ PS-PLina-PEG nanopartiküllerin A549 insan akciğer kanser hücreleri üzerinde oldukça etkili olduğu ancak PS-PLina NP'ler ile karşılaştırıldığında, PEG miktarındaki artışın, polimerin çapraz bağlanmasıyla organik çözücüdeki çözünürlüğünü azaltması nedeniyle sentezlenen PS-PLina graft kopolimerine bağlanan düşük PEG oranı ($\leq 20\%$) nedeniyle in vitro ortamda hücre içerisine alım ve kanser hücreleri üzerindeki etkisi açısından aralarında çok büyük bir fark olmadığı gözlenmiştir.
- ✓ Elde edilen sonuçlar, PS-PLina ve PS-PLina-PEG nanopartiküllerinin kolay sentezlenen, maliyeti düşük ve biyoyumlu nanoyapılar olduğunu, siRNA taşıyıcı sistemi olarak üstün özelliklere sahip olduğunu ve akciğer kanseri tedavisinde umut vaat edici terapötik potansiyelin olduğunu göstermektedir.
- ✓ Söz konusu sistemlerin, sahip oldukları özellikleriyle farklı biyomedikal alanlarında da kullanım potansiyeli mevcuttur.

KAYNAKLAR

- [1] **Kang L, Gao Z, Huang W, Jin M and Wang Q** (2015) Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5 (3): 169-175.
- [2] **Ruddon R W** (2007) *Cancer Biology*. 4th edition, ISBN-13: 978-0-19-517543-1, Oxford University Press, New York, 530 pp/s.
- [3] **George V C, Dellaire G and Rupasinghe H P V** (2017) Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genomestability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45: 1-14.
- [4] **Nejad A M, Bidkhorji G, Ashtiani S H, Najafi A, Bozorgmehr J H and Wang E** (2014) Cancer systems biology and modeling: Microscopic scale and multiscale approaches. *Seminars in Cancer Biology*, 30: 60-69.
- [5] **URL-1**<<http://slideplayer.biz.tr/slide/2920052>>, Ziyaret tarihi: 20.01.2017.
- [6] **Kızıltan D** (2016) Kanser Belirteçlerinin Tayininde Kullanılmak Üzere Titanyum Bazlı Elektrokimyasal Nanobiyosensörlerin Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, 74 s.
- [7] **Steward B W, Wild C P** (2014) *World Cancer Report 2014*. 1st edition, ISBN 978-92-832-0443-5, WHO Press, Switzerland, 632 pp/s.
- [8] **Taşdemir D** (2008) Akciğer Kanseri Hastalarda Gözlenen Kromozomal Düzensizlikler ile Hücre Ölüm Reseptörü-4 Genindeki Polimorfizmlerin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 127 s.
- [9] **Akhtar M J, Ahamed M, Alhadlaq H A, Alrokayan S A and Kumar S** (2014) Targeted anticancer therapy: Over expressed receptors and nanotechnology. *Clinica Chimica Acta*, 436: 78-92.
- [10] **Banerjee R, Bandopadhyay D and Abilash V G** (2013) Epidemiology, Pathology, Types and Diagnosis of Soft Tissue Sarcoma: A Research Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6: 18-25.
- [11] **Hanahan D and Weinberg R A** (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.
- [12] **Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P and Sharma V** (2015) Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9 (6): 1-5.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [13] **Lee S J, Kim M J, Kwon I C and Roberts T** (2016) Delivery Strategies and Potential Targets for siRNA in Major Cancer Types. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 104: 2-15.
- [14] **Şahin E** (2015) Resveratrol İle Muamele Edilmiş Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre Sitokinlerinin A549 Kanser Hücrelerine Etkilerinin Araştırılması. *Doktora Tezi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, 91 s.
- [15] **Reid G and Walsh S V** (2011) Pathology of epithelial tumours of the stomach. *Surgery (Oxford)*, 29 (11): 547-549.
- [16] **Chen Z, Zhang Z, Xie B and Zhang H** (2016) Development and evaluation of topotecan loaded solid lipid nanoparticles: A study in cervical cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 165: 182-188.
- [17] **Bronowicka-Klys D E, Lianeri M and Jagodziński P** (2016) The role and impact of estrogens and xenoestrogen on the development of cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84: 1945-1953.
- [18] **George V C, Dellaire G and Rupasinghe H P V** (2017) Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45: 1-14.
- [19] **Trichopoulos D, Li F P and Hunter D J** (1996) What Causes Cancer? *Scientific American*, 275 (3): 80.
- [20] **Güran Ş** (2005) Kanserden Korunma. *Gülhane Tıp Dergisi*, 47: 324-326.
- [21] **URL-2** <http://www.aicr.org/cancer-research-update/2015/11_25/cru_does_everything_cause_cancer.html?referrer=https://www.google.com.tr/>, Ziyaret Tarihi: 16.02.2017.
- [22] **Goyal R and Kumar S** (2014) Nanotechnology: A novel approach towards cancer treatment. *Journal of Innovative Biology*, 1 (2): 84-96.
- [23] **Bhavan N, Nagar A** (2008) Nanotechnology and Cancer Treatment. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 22 (2): 45-50.
- [24] **Sutradhar K B and Amin L M** (2014) Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *ISRN Nanotechnology*, 2014: 1-12.
- [25] **Sudhakar A** (2009) History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 1 (2): 1-4.
- [26] **Haanen J** (2014) Immunotherapy of Cancer: Towards a New Era. *EMC Oncology*, 2: 76-82.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [27] **Shukla J, Sharma R, Shukla A K and Shukla P** (2015) Immunotherapy: A Review Article. *Human Journals*, 4 (2): 223-240.
- [28] **DeSouza K and Savva C** (2016) Management of Immunotherapy Related Adverse Effect. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 6 (1): 1-8.
- [29] **Masood F** (2016) Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*, 60: 569-578.
- [30] **URL-3** <http://www.nanomachineslab.org/wp-content/uploads/2012/07/drug_delivery_1-300x279.jpg>, Ziyaret tarihi: 06.03.2017.
- [31] **Ummadi S, Shravani B, Rao N G R, Reddy S and Nayak B S** (2013) Overview on Controlled Release Dosage Form. *International Journal of Pharma Sciences*, 3 (4): 258-269.
- [32] **Park K** (2014) Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, 190: 3-8.
- [33] **Weiser J R and Saltzman W M** (2014) Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. *Journal of Controlled Release*, 190: 664-673.
- [34] **Mishra N, Pant P, Porwal A, Jaiswal J, Samad M A and Tiwari S** (2016) Targeted Drug Delivery-A review. *American Journal of Pharmtech Research*, 6 (1): 1-24.
- [35] **Rao A, Rao V N, Devi A S, Anil K, Naik V and Rajesh A** (2015) Oral controlled release drug delivery system. *International Journal of Pharma And Chemical Research*, 1 (1): 6-15.
- [36] **Pérez-Herrero E and Fernández-Medarde A** (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93: 52-79.
- [37] **Bae Y H and Park K** (2011) Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release*, 153 (3): 198-205.
- [38] **URL-4** <http://www.biomedya.com/show_file.php?attachid=32>, Ziyaret tarihi: 12.03.2017.
- [39] **Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z and Shin D M** (2008) Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14 (5): 1310-1316.
- [40] **Steichen S D, Caldorera-Moore M and Peppas N A** (2013) A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48 (3): 416-427.
- [41] **Martínez-Carmona M, Colilla M and Vallet-Regi M** (2015) Smart Mesoporous Nanomaterials for Antitumor Therapy. *Nanomaterials*, 5 (4): 1906-1937.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [42] **Jackman A L** (Ed.) and **Leamon C P** (Ed.) (2011) *Targeted Drug Strategies for Cancer Inflammation*. 1st edition, ISBN: 978-1-4419-8416-6, Springer, New York, 249 pp/s.
- [43] **Vasir J K** and **Labhassetwar V** (2005) Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4 (4): 363-374.
- [44] **Park J H, Saravanakumar G, Kim K and Kwon I C** (2010) Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (1): 28-41.
- [45] **Zardad A, Choonara Y E, Toit L C, Kumar P, Mabrouk M, Kondiah P D and Pillay V** (2016) A Review of Thermo-and Ultrasound-Responsive Polymeric Systems for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Polymers*, 8 (10): 359-380.
- [46] **Zhou Y F** (2011) High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World Journal of Clinical Oncology*, 2 (1): 8-27.
- [47] **Boissenot T, Bordat A, Fattal E and Tsapis N** (2016) Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *Journal of Controlled Release*, 241: 144-163.
- [48] **Parveen S, Misra R and Saoo S K** (2012) Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomed Journal*, 8 (2): 147-166.
- [49] **Zhao Z, Li Y and Xie M B** (2015) Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International Journal of Molecular Science*, 16: 4880-4903.
- [50] **Balagai P** (2011) Microparticulate drug delivery system: a review. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, 1 (1): 9-37.
- [51] **Sharma N and Gupta P** (2015) Microspheres as Drug Carriers for Controlled Drug Delivery: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (11): 4579-4587.
- [52] **Kushwaha S K S, Rastogl A, Rai A K and Singh S** (2012) Novel Drug Delivery System for Anticancer Drug: A Review. *International Journal of PharmTech Research*, 4 (2): 542-553.
- [53] **Prasad B S G, Gupta V R M, Devanna N and Jayasurya K** (2014) Microspheres as Drug Delivery System – A Review. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5 (3): 1961-1972.
- [54] **Kumbhani J, Tank C, Upadhyay J, Darshit R, Nirali T and Hetal S** (2016) Nanoparticle: A Promising carrier for Novel Drug Delivery. *International Journal of Pharma Research & Review*, 5 (2): 27-40.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [55] **Nagavarma B V N, Hemant K S Y, Ayaz A, Vasudha L S and Shivakumar H G** (2012) Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles- A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3): 16-23.
- [56] **Guterres S, Alves M P and Pohlmann A R** (2007) Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, 2: 147-157.
- [57] **Yu X, Trase I, Ren M, Duval K, Guo X and Chen Z** (2016) Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2016: 1-15.
- [58] **Kumari A, Yadav S K and Yadav S C** (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (1): 1-18.
- [59] **Mudshinge S R, Deore A B, Patil S and Bhalgat C M** (2011) Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19 (3): 129-141.
- [60] **Derman S, Akdeste Z M ve Kızılbey K** (2013) Polimerik Nanopartiküller. *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31: 109-122.
- [61] **Rao J P and Geckeler K E** (2011) Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36 (7): 887-913.
- [62] **Gürsoy A Z** (Ed.) (2002) *Kontrollü Salım Teknikleri*, Birinci basım, ISBN: 975-97725-0-7, Elma Bilgisayar Basım, İstanbul, 208 s.
- [63] **Kaya M** (2016) Juglon Yüklü Nanopartiküllerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, 83 s.
- [64] **Müderrişoğlu A E ve Çomoğlu T** (2010) İlaç Taşıyıcı Polimerik Partiküler Sistem Formülasyonlarına Genel Bakış. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39 (4): 343-368.
- [65] **Akram M, Wang L, Yu H, Amer W A, Khalid H, Abbasi N M, Chen Y, Abdin Z, Saleem M and Tong R** (2014) Polyphosphazenes as anti-cancer drug carriers: From synthesis to application. *Progress in Polymer Science*, 39 (12): 1987-2009.
- [66] **Nordström P** (2011) Formation of polymeric nanoparticles encapsulating and releasing a new hydrophobic cancer drug. *Master of Science Thesis*, Chalmers University of Technology, Department of Chemical and Biological Engineering, Sweden, 57 pp/s.
- [67] **Shah N, Mewada R K and Shah T** (2011) Application of biodegradable Polymers in Controlled drug Delivery. *International Conference on Current Trends in Technology*, 8-10 Aralık 2011, Ahmedabad, Hindistan, 1-6.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [68] Kılıçay E, Çakmaklı B, Hazer B, Denkbaş E B ve Açıkgöz B (2010) Acetylsalicylic Acid Loading and Release Studies of the PMMA-g-Polymeric Oils/Oily Acids Micro and Nanospheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 119: 1610-1618.
- [69] Joshi J R and Patel R P (2012) Role of Biodegradable Polymers in Drug Delivery. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4 (4): 74-81.
- [70] Bhatia S (2016) *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*. 1st edition, ISBN: 978-3-319-41128-6, Springer International Publishing, Switzerland, 323 pp/s.
- [71] Dragojevic S, Ryu J S and Raucher D (2015) Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules*, 20 (12): 21750-21769.
- [72] Coelho J F, Ferreira P C, Alves P, Cordeiro R, Fonseca A C, Góis J R and Gil M H (2010) Drug delivery systems: Advanced Technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, 1: 164-209.
- [73] Nair L S and Laurencin C T (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymers Science*, 32: 762-798.
- [74] Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T and Brem H (2016) Polylacticacid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107: 163-175.
- [75] Huang J and Turner S R (2017) Recent advances in alternating copolymers: The synthesis, modification, and applications of precision polymers. *Polymer*, 116: 572-586.
- [76] Saçak M (1998) *Polimer Kimyasına Giriş*. 1. baskı, A.Ü.F.F Döner Sermaye İşletmesi Yayınları, Ankara, 164 s.
- [77] Müftüoğlu A E ve Yağcı Y (2005) Fotopolimerizasyon yöntemiyle çaprazbağlı ve aşırı kopolimerler hazırlanması. *İtüdergisi/c*, 3 (1): 73-78.
- [78] Allı A (2008) Yeni Bazı Graft Kopolimerlerin Sentezi ve Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi. *Doktora Tezi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Zonguldak, 157 s.
- [79] Arslan H (2012) Block and Graft Copolymerization by Controlled/Living Radical Polymerization Methods. *Polymerization De Souza Gomez A (Ed.)*, 1st edition, ISBN: 97-953-51-0745-3, InTech, e-book, 279-320.
- [80] Arı Y (2016) Yeni Graft Kopolimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Diyetlerde Arayüz Tabaka Olarak Kullanımının Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Düzce, 116 s.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [81] Şanal T, Koçak İ and Hazer B (2017) Synthesis of comb-type amphiphilic graft copolymers derived from chlorinated poly(ϵ -caprolactone) via click reaction. *Polymer Bulletin*, 74 (4): 977-995.
- [82] Çavuş G ve Hazer B (2010) Polietilen Glikol Bloklarının Molekül Ağırlığının Polipropilen Graft Kopolimerlerinin Mekanik Ve Hidrofilik Özellikleri Üzerine Etkisi. 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak, Türkiye.
- [83] Gurman J L, Baiber L and Levin B J (1987) Polystyrenes: A Review of the Literature on the Products of Thermal Decomposition and Toxicity. *Fire and Materials*, 11 (3): 109-130.
- [84] Çakmaklı B, Hazer B, Erdoğan T and Mutlu A G (2013) DNA adsorption and dynamic mechanical analysis of polymeric oil/oil acid copolymers. *Journal of Polymer Research*, 20 (3): 1-11.
- [85] Allı A, Allı S, Becer C R and Hazer B (2014) One-Pot Synthesis of Poly(linoleic acid)-g-Poly(styrene)-g-Poly(ϵ -caprolactone) Graft Copolymers. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91: 849-858.
- [86] İnce Ö, Akyol E, Sulu E, Şanal T and Hazer B (2016) Synthesis and characterization of novel rod-coil (tadpole) poly(linoleic acid) based graft copolymers. *Journal of Polymer Research*, 23 (1): 1-10.
- [87] Kılıçay E, Hazer B, Çoban B and Scholz C (2010) Synthesis and Characterization of the Poly(ethyleneglycol) Grafted Unsaturated Microbial Polyesters. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 38 (1): 9-17.
- [87] Bunker A (2012) Poly(ethyleneglycol) in drug delivery, why does it work, and can we do better? All atom molecular Dynamics simulation provides some answers. *Physics Procedia*, 34: 24-33.
- [88] Resnier P, Montier T, Mathieu V, Benoit J P and Passirani C (2013) A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials*, 34 (27): 6429-6443.
- [89] Whitehead K A, Langer R and Anderson D G (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8 (2): 129-138.
- [90] Felice B, Prabhakaran M P, Rodriguez A P and Ramakrishna S (2014) Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C*, 41: 178-195.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [91] Longmire M, Choyke P L and Kobayashi H (2008) Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine (Lond.)*, 3 (5): 703-717.
- [92] Veronese F M and Pasut G (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10 (21): 1451-1458.
- [93] Amer M H (2014) Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and Cellular Therapies*, 2 (27): 1-19.
- [94] Peppas L B and Blanchette J O (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (11): 1649-1659.
- [95] Kara G (2014) siRNA Tedavisinde Biyokimyasal Değerlendirmeler. *Yüksek Lisans Tezi*. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 103 s.
- [96] Caplen N J (2004) Gene Therapy Progress and Prospects. Downregulating gene expression: the impact of RNA interference. *Gene Therapy*, 11: 1241-1248.
- [97] Mendes R, Fernandes A R and Baptista P V (2017) Gold Nanoparticle Approach to the Selective Delivery of Gene Silencing in Cancer—The Case for Combined Delivery? *Genes*, 8 (3): 1-16.
- [98] Karagüzel A, Kalay E ve Celep F (2007) RNA İNTERFERANS (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33 (1): 41-44.
- [99] Gündoğdu R ve Çelik V (2009) RNA İNTERFERANS (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1-2): 34-47.
- [101] Bender O, Çelebi E ve Atalay A (2016) RNA interferans ve güncel klinik uygulamaları. *Tıbbi Biyoloji*, 36 (1): 53-60.
- [102] Doi N, Zenno S, Ueda R, Ohki-Hamazaki H, Ui-Tei K and Saigo K (2003) Short-Interfering-RNA-Mediated Gene Silencing in Mammalian Cells Requires Dicer and eIF2C Translation Initiation Factors. *Current Biology*, 13 (1): 41-46.
- [103] Ünal E, Tahmaz I, Toroslu İ H, Serin G C ve Yılmaz A (2013) Post-Transkripsiyonel Gen Susturulması ve Kullanım Alanları. *XV. Öğrenci Sempozyumu*, 15 Mayıs 2013, Ankara, Türkiye.
- [104] Petrova N S, Zenkova M A and Chernolovskaya (2013) *Structure-Functions Relations in Small Interfering RNAs*. Andrade A (Ed.), 1st edition, ISBN: 978-953-51-0924-2, InTech, Chapter 8.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [105] **Xu C and Wang J** (2015) Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10 (1): 1-12.
- [106] **Patil Y and Panyam J** (2009) Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics*, 367 (1-2): 195-203.
- [107] **Huang C, Li M, Chen C and Yao Q** (2008) Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12 (5): 637-645.
- [108] **Mosmann T** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2): 55-63.
- [109] **Xu C F, Zhang H B, Sun C Y, Liu Y, Shen S, Yang X Z, Zhu Y H and Wang J** (2016) Tumor acidity-sensitive linkage-bridged block copolymer for therapeutic siRNA delivery. *Biomaterials*, 88: 48-59.
- [110] **Zhi D, Zhao Y, Cui S, Chen H and Zhang S** (2016) Conjugates of small targeting molecules to non-viral vectors for the mediation of siRNA. *Acta Biomaterialia*, 36: 21-41.
- [111] **Aldrian G, Vaissière A, Konate K, Seisel Q, Vivès E, Fernandez F, Viguier V, Genevois C, Coillaud F, Démèné H, Aggad D, Covinhas A, Barrère-Lemaire S, Deshayes S and Boisguerin P** (2017) PEGylation rate influences peptide-based nanoparticles mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 256: 79-91.



ÖZGEÇMİŞ

Merve Nur ANILMIŞ, 1991 yılında Zonguldak'ta doğmuştur. İlköğretimi İnağzı İlköğretim Okulunda, ortaöğretimi Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesinde tamamlayıp Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde lisans eğitimini almıştır. 2015 yılından beri Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimini sürdürmektedir. Şubat 2016'dan beri Eren Enerji Elektrik Üretim AŞ'de çalışmaktadır.

ADRES BİLGİLERİ:

Adres: Çamlık Mahallesi Şehit Er Benan Şentürk Caddesi No: 25 Kilimli/ZONGULDAK

Tel : (+90) 541 730 08 84

E-posta: mervenuranilmis@hotmail.com