

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

MEME KANSERİ GEN TEDAVİSİ TIBBİ ÜRÜNLERİ İÇİN
NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Büşra CESUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

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

MEME KANSERİ GEN TEDAVİSİ TIBBİ ÜRÜNLERİ İÇİN
NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Büşra CESUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr.Öğr.Üyesi Devrim DEMİR DORA

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 4131 BAP proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25/06/2019

İmza

Tez Danışmanı : Dr.Öğr.Üyesi Devrim DEMİR DORA
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Coşkun USTA
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr.Öğr.Üyesi şükriye YEŐİLOT
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

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

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Büşra CESUR

İmza

Dr.Öğr.Üyesi Devrim DEMİR DORA

İmza

TEŐEKKÜR

Bu çalıőmamda bilgi ve deneyimleriyle her zaman bana yardımcı olan ve fikirleriyle hiç durmaksızın beni aydınlatan çok değerli biricik hocam Sayın Dr.Öğr.Üyesi Devrim DEMİR DORA'ya,

Çalıőmalarımıza verdiği destek için Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. Coőkun USTA'ya,

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı' nda görev alan tüm değerli hocalarıma ve kıymetli arkadaşlarıma,

Gen ve Hücre Tedavisi Uygulama ve Araőtıma Merkezi'nde çalıőmalarımı gerçekleőtirmeme imkan sağlayan sayın Prof. Dr. Salih ŐANLIOęLU'na ve bana yardımcı olan değerli arkadaşlarıma,

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü alıőanlarına,

Hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim her zaman yanımda olan ve başarılarımda en büyük paya sahip olan annem, babam ve özellikle çizimler konusunda yardımını esirgemeyen kardeőtıme,

Yüksek lisans sürecinde 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a

Sonsuz teőekkürler.

ÖZET

Amaç: Bu tez çalışmasında, meme kanserinde alternatif yeni bir tedavi yaklaşımı olan gen tedavisinin, etkili ve güvenli bir şekilde yapılabilmesi için ihtiyaç duyulan, ideal özelliklere sahip viral olmayan gen taşıyıcı sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Tez çalışması kapsamında meme kanseri hücresi içerisine gen aktarılabilecek nano boyutta veziküler sistemler hazırlanmış ve gen aktarım etkinliği, toksisitesi, stabilitesi ve hemolitik aktivitesi incelenerek; gen ilaç olma potansiyeli değerlendirilmiştir. Meme kanseri hücre hattı olarak ER (+), PR (+) ve HER2 (-) olan MCF-7 insan meme kanseri hücresi kullanılmıştır.

Bulgular: Hazırlanan niozomlar ile MCF-7 meme kanseri hücresine transfeksiyon sağlanmıştır. Dallanmış PEI pDNA ile 1:1 (h:h) oranında kompleksleştirilerek polipleksler hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan niozomlar ile kompleksleştirilerek niopolipleksler hazırlanmıştır. Niozomlar 51. 89 nm partikül boyutu ve +28. 3 mv zeta potansiyel değerlerine sahip bulunmuştur. Niopoliplekslerin toksisitesi değerlendirildiğinde; sağlıklı meme hücresi MCF-12A üzerine toksik etkisi gözlenmezken; MCF-7 meme kanseri hücresi üzerine toksik etkisi gözlenmiştir. Niopolipleksler MCF-7 meme kanseri hücresi için etkin nükleik asit taşıyıcı sistem olarak tasarlanmıştır. Niozomların 3 ay boyunca oda sıcaklığında (25 °C) stabilitesi değerlendirildiğinde boyutu, yükü ve morfolojik özellikleri değişmemiştir. Hemolitik aktivite gösterdiği için intravenöz uygulama yolu dışındaki uygulama yolları tercih edilmelidir.

Sonuç: Nanoboyutta hazırlanan niopolipleksler, nükleik asitlerin stabil ve etkin bir şekilde MCF-7 meme kanseri hücrelerine aktarılabilmesi için uygun taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmıştır. Preklinik ve klinik çalışmaları tamamlandıktan sonra gen tedavisi tıbbi ürünleri için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilme potansiyeli vardır.

Anahtar Kelimeler: kanser, meme kanseri, gen tedavisi, gen tedavisi tıbbi ürünü, niozom

ABSTRACT

Purpose: This study was performed to develop non-viral gene delivery systems with ideal properties for efficient and safe use in gene therapy as an alternative treatment in breast cancer.

Methods: Nano sized vesicular systems which can deliver genes into breast cancer cells were prepared and their potential as a gene drug was assessed by investigating efficiency of gene delivery, toxicity, stability and hemolytic activity. ER (+), PR (+) and HER2 (-) MCF-7 human breast cancer cells were used as breast cancer cell lines.

Results: Transfection of MCF-7 breast cells was achieved by the prepared niosomes. Polyplexes were prepared by complexing branched PEI with pDNA at a ratio of 1:1 (v:v). Polyplexes were later complexed with niosomes to form niopolyplexes. Niosomes had a particle size of 51.89 nm and a zeta potential value of +28.3 mV. Niopolyplexes were non-toxic to normal breast cell line MCF-12A, but were toxic to MCF-7 breast cancer cells. Niopolyplexes were designed as an efficient nucleic acid delivery system for MCF-7 breast cancer cells. Niosomes were stable at room temperature (25 °C) for 3 months with no changes in size, charge and morphological properties. Because of their hemolytic activity they should be delivered by other administration routes than intravenous delivery.

Conclusion: Nanosized niopolyplexes are designed as suitable delivery systems for stable and efficient delivery of nucleic acids into MCF-7 breast cancer cells. They have the potential to be used as a delivery system for gene therapy medicinal products after preclinical and clinical studies.

Key words: cancer, breast cancer, gene therapy, gene therapy medicinal products, niosome

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Kanseri	2
2.2. Gen Tedavisi	4
2.2.1. Gen Tedavisinin Tarihsel Süreci	4
2.2.2. Gen Tedavisi Yaklaşımları	5
2.2.3. Meme Kanserinde Gen Tedavisi Yaklaşımları	6
2.3. Gen Tedavisi Tıbbi Ürünleri	8
2.4. Gen Taşıyıcı Sistemler	8
2.4.1. Viral Vektörler	8
2.4.2. Viral Olmayan Vektörler	10
	iii

2.4.3. Nanotaşıyıcı Sistemler	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	19
3.1.1. Kullanılan Biyolojik Materyaller	19
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	19
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	21
3.2. Genetik Materyalin Elde Edilmesi	21
3.2.1. Bakteri Hücrelerinin Katı Besiyerine Ekimi	22
3.2.2. LV-RFP pDNA İzolasyonu	22
3.3. Genetik Materyallerin Karakterizasyonu	24
3.3.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	24
3.3.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi	24
3.4. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması	25
3.4.1. Ön Formülasyon Çalışması	25
3.4.2. Niozomların Hazırlanması	26
3.4.3. Polipleks ve Niopolipleks Komplekslerinin Hazırlanması	27
3.5. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	27
3.6. Taşıyıcı Sistemlerin Oda Sıcaklığındaki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	27
3.7. Taşıyıcı Sistemlerin Serumdaki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	27
3.8. Transfeksiyon Çalışmaları	28

3.8.1. Hücrelerin Pasajlanması	28
3.8.2. Hücrelerin Dondurulması	28
3.8.3. Hücrelerin Sayımı	29
3.9. Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi	29
3.10. Taşıyıcı Sistemlerin Hemolitik Aktivitesinin Değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR	31
4.1. Genetik Materyalin Eldesi ve Karakterizasyonu	31
4.1.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
4.1.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi	31
4.2.1. Niopleks ve Polipleks Kompleks Oluşumlarının Değerlendirilmesi	35
4.3. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	36
4.4. Taşıyıcı Sistemlerin Oda Sıcaklığındaki (25 °C) Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	36
4.5. Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	37
4.6. Nanotaşıyıcı Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	38
4.6.1. pDNA ile Hazırlanan Nioplekslerin Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	40
4.7. Nanotaşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi	40
4.8. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi	42
4.9. İstatistiksel Analiz	42
5. TARTIŞMA	43

KAYNAKLAR

49

ÖZGEÇMİŞ

59



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Non iyonik sürfaktanların HLB değerleri	15
Tablo 3.1.	Analizlerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	19
Tablo 3.2.	Alkali Lizis yönteminde kullanılan özeltiler	23
Tablo 3.3.	Ön formülasyon çalışmasında hazırlanan formülasyonlar	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	Viral olmayan vektörlerin hücre içine alım mekanizması	10
Şekil 2. 2.	Dallanmış polietileniminin kimyasal yapısı	13
Şekil 2. 3.	Nanotaşıyıcı sistemler	14
Şekil 2. 4.	Span20 kimyasal yapısı	15
Şekil 2. 5.	Span 60 kimyasal yapısı	15
Şekil 2. 6.	Span 80 kimyasal yapısı	16
Şekil 2. 7.	Tween 80 kimyasal yapısı	16
Şekil 2. 8.	Niozom yapısı	16
Şekil 4.1.	LV-RFP pDNA'nın agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	31
Şekil 4.2.	Organik çözücüsü metanol (A) ve kloroform (B) olan formülasyonların evaporatöre koyulmadan önceki fotoğrafları	32
Şekil 4.3.	Çözücüsü metanol (C) ve kloroform (D) olan ince lipit filmi fotoğrafları	32
Şekil 4.4.	Hidarete edilen formülasyonlara ait fotoğraf	33
Şekil 4.5.	Ön formülasyon çalışmasına hazırlanan niozomların mikroskop görüntüsü (40X)	34
Şekil 4.6.	pDNA niopleks oluşumunun agaroz jel elektroforez fotoğrafı	35
Şekil 4.7.	Nanotaşıyıcı sistemlerin boyut ve yük değerleri	36
Şekil 4.8.	3 ay oda sıcaklığında saklanan niozom formülasyonlarının fotoğrafı	37

Şekil 4.9.	Poliplekslerin 4sa (üstteki) ve 30 dk (alttaki) boyunca serum içerisindeki stabilitelerini gösteren agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	38
Şekil 4.10.	Çıplak LV-p DNA ile transfekte edilen MCF-7 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları (10X)	39
Şekil 4.11.	Niozom ve LV-p DNA'sı ile hazırlanmış niopolipleksler transfekte edilen MCF-7 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları (10X)	39
Şekil 4.12.	Niozom ve LV-p DNA'sı ile hazırlanmış niopolipleksler transfekte edilen MCF-12A hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları (10X)	39
Şekil 4.13.	MCF-7 meme kanseri hücrelerinde transfeksiyon verimliliği	40
Şekil 4.14.	Poliplekslerin MCF-7 hücre canlılığına etkisi	41
Şekil 4.15.	Poliplekslerin MCF-12A hücre canlılığına etkisi	41
Şekil 4.16.	Hemolitik aktivite sonuçları	42

SİMGELER ve KISALTMALAR

- ASO** : Antisens Oligonükleotit
- BPEI** : Dallanmış Polietilenimin
- DNA** : Deoksiribonükleik Asit
- dsRNA** : Çift İplik RNA
- EGF** : Epidermal Büyüme Faktörü
- EMA** : Avrupa İlaç Ajansı
- ER** : Östrojen Reseptör
- ERBB** : Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
- FBS** : Fetal Sığır Serum
- FDA** : Amerika Gıda ve İlaç Kurumu
- HER-2** : İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör- 2
- IFN** : İnterferon
- IFN- γ** : İnterferon gama
- IL-6** : İnterlökin-6
- IL-12** : İnterlökin -12
- LB** : Luria broth
- mRNA** : Mesajcı RNA

- miRNA** : MikroRNA
- MTT** : Metil tiazol-difenil-tetrazolium bromid
- NA** : Nükleik Asitler
- Na-TPP** : Sodyum tripolifosfat
- NF-kb** : Nüklear Faktör- kabba b
- PBS** : Fosfat Tampon Çözeltilisi
- PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- PEI** : Polietilenimin
- PR** : Progesteron Reseptör
- RES** : Retikuloendotelyal Sistem
- RNA** : Ribonükleik Asit
- RNAi** : RNA interferans
- shRNA** : Kısa hairpin RNA
- siRNA** : Küçük interferans RNA

1. GİRİŞ

Tıp alanındaki araştırmaların ilerlemesiyle, insanlarda meydana gelen hastalıkların hücre, doku ve genlerle tedavi edilmesine dair çalışmaların sayısı gittikçe artmaya başlamıştır. Kanserin genetik temelli bir hastalık olduğunun ortaya konması ile hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan moleküler etkenler aydınlatılarak, hastalığa karşı yeni tedavi stratejileri de geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yeni tedavi stratejilerden bir tanesi de günümüzde popüler hale gelen gen tedavisidir. Gen tedavisi; hastalığın gelişmesinden sorumlu kusurlu genleri düzeltmek için, nükleik asitlerin (DNA veya RNA) hastaya transfer edilmesidir. Gen tedavisi tıbbi rnleri Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından belirlenen sınıflandırmaya göre, somatik hücre tedavileri ve doku mühendisliği ürünleri ile ileri tedavi tıbbi ürünleri kapsamında değerlendirilmektedir. Gen tedavisi amacıyla kullanılan ilaçlar, terapötik, profilaktik veya diagnostik bir etkiye yol açan genleri içerir. Dokularda meydana gelen hasarları onarmak, vücudun işlevselliğini korumak için eksiklerini yerine koymak ve istenmeyen genlerin ekspresyonlarını engellemek amacıyla uygulanan ileri teknolojik ürünlerdir. Gen tedavisinde terapötik özelliği olan genlerin, güvenilir, stabil ve etkin bir taşıyıcı ile hedef hücreye transfer edilmesi amaçlanmaktadır. Genlerin hedef hücreye aktarılmasında viral veya viral olmayan vektörler kullanılmakta; viral vektörlere olan üstünlüklerinden dolayı viral olmayan vektörler tercih edilmektedir.

Bu tez çalışmasında, meme kanseri hücresine gen aktarımını sağlayabilecek viral olmayan bir taşıyıcı sistem olan farklı özelliklerdeki niozomlar, model bir gen taşıyıcı sistem olarak hazırlanmış ve karakterize edilerek ilaç olabilme potansiyeli değerlendirilmiştir. Literatürde niozomların meme kanseri hücresine gen aktarımında kullanıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda meme kanserine neden olan genlerin ekspresyonlarını engellemek amacıyla gen susturma özelliğine sahip pDNA, siRNA, miRNA veya shRNA'yı etkili, güvenli ve stabil bir şekilde hücre içine taşıyabilen, düşük toksisiteye sahip, nano boyutta, veziküler yapıda niozomlar hazırlanmış olup; ileride preklinik ve klinik çalışmalarla desteklendiği takdirde meme kanseri tedavisinde gen ilaç olmaya aday bir gen tedavisi tıbbi ürünü geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kansere bağılı morbiditenin ve mortalitenin her geçen gün daha da arttığı görülmektedir (Fonseca de Jesus ve ark., 2019). Günümüzde yapılan çalışmalarda dünya çapında kanserin hem insidans hem de ölüm oranlarında artış eğilimi gösterdiği bulunmuştur. Her yıl meme kanseri tüm dünyada 500.000'den fazla kadının ölümüne neden olmaktadır. Meme kanseri olan kadınların çoğunluğu hastalığın ileri bir safhasında teşhis edilirken beş yıllık sağkalım oranlarına bakıldığında % 10-40 arasında değiştiği görülmektedir. Erken teşhis ve temel tedavinin olduğu durumlarda, meme kanseri için beş yıllık sağkalım oranı % 80'ini bulmaktadır.

Yaygın olarak teşhis edilen kanser türü meme kanseridir. Kadınlarda ilk sırada ve en sık görülen kanser türüdür. Meme kanseri, histolojik özelliklere ve reseptör ekspresyonuna göre sınıflandırılan heterojen bir hastalıktır (Burke ve ark., 2019). Kanserin gelişim süreci büyüme sinyalleri, tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin mutasyonları, anjiyogenez, sınırsız replikasyon, apoptozdan kaçış, doku invazyonu ve metastazla ilgilidir (Wirth ve Yla-Herttua, 2014). Meme kanseri, tümörün reseptör durumuna ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2 (HER2), östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) gibi çeşitli hedeflenebilir reseptörlere bağılı olarak tedavi edilmektedir. Meme tümörlerinin büyük bir kısmında standart tedavilere dirençli metastaz ve ilaç direnci gelişmekte olup, hastalığın daha agresif alt tiplerinden biri olan üçlü negatif meme kanseri için halen iyi hedeflenmiş bir tedavi mevcut değildir (Gu ve ark., 2016). Meme kanserinin progresyonunu kontrol altına almak ve tedavisini sağlamak için, cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hedeflenmiş terapi olmak üzere birden fazla yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi, meme kanserinin operasyonu için uygundur. Radyoterapi ya da sistemik tedavi yöntemlerinin seçimi, hastalığın seyri ve şiddetine bağılıdır (Xie ve Zeng, 2017). Tanı cihazlarının ve gelişmiş adjuvan sistemik tedavilerin uygulanması ile erken evre meme kanseri tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da ne yazık ki, metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde iyileşme oranı oldukça düşüktür. Bu yüzden, ileri safhadaki meme kanserinin tedavisinde alternatif ya da tamamlayıcı tedavilere ihtiyaç duyulmaya başlamıştır. Meme

kanserinin ve ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmalara dair artan veriler sonucunda terapötik genler ve gen taşıyıcılardaki gelişmeler ile meme kanseri için pek çok yeni formülasyon geliştirilmeye çalışılsa da onaylanmış gen tedavi ürünü henüz bulunmamaktadır. Kusurlu genleri düzeltme ve gen tedavisi yoluyla gen ekspresyonunu modüle etme olasılığı meme kanseri için umut verici bir tedavi stratejisi olarak ortaya çıkmıştır. Yenilikçi tedavi stratejileri ve gen tedavisinin meme kanseri için klinik denemelerde uygulanmasını vurgulamaktadırlar. Gen tedavisi, meme kanseri araştırmalarını etkileme potansiyeline sahiptir. Özellikle geleneksel tedavilerle, RNAi bazlı terapötiklerin klinik uygulamasını arttırmak için daha fazla çaba gösterilmesi gerekmektedir. Genom düzenleme ve kök hücre tabanlı sistemler dahil olmak üzere yenilikçi stratejiler, gen terapisinin klinik uygulamaya dönüştürülmesine katkıda bulunabilir. İmmün temelli yaklaşımlar, seçilen meme kanseri hastaları için çekici bir terapötik fırsat olarak ortaya çıkmıştır (Bottai ve ark., 2017). Yapılan araştırmalarda bizim çalışmamızda olduğu gibi çoğunlukla ER (-), PR (-) ve HER2 (-) olan üçlü negatif meme kanseri hücresi olarak; 4T1 fare meme kanseri hücresi ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre dizisi ile; ER (+), PR (+) ve HER2 (-) olan MCF-7 insan meme kanseri hücresi kullanılmıştır. 4T1 meme kanseri hücre hattı ilk olarak BALB/c cins farelerden meme bezi dokusundan üretilmiştir (Aslakson ve Miller, 1992). Klinik öncesi araştırmalarda, meme kanseri metastazını incelemek için 4T1 hücreleri kullanılmaktadır. Hücrelerin canlı dokularda oldukça agresif oldukları bilinmektedir. 4T1 tümörü, insan meme kanseri için uygun bir deneysel hayvan modeli yapan birçok özelliğe sahiptir (Pulaski ve Ostrand-Rosenberg, 2001). MDA-MB-231 hücresi; epitelyal meme kanseri hücre hattıdır; metastatik meme adenokarsinomalı 51 yaşındaki Asyalı bir kadının meme dokusundan elde edilmiştir (Cailleau ve ark., 1978). Tıpta en sık kullanılan meme kanseri hücre hatlarından biridir. MDA-MB 231 hücresi PR, ER ve HER2 reseptörü bulundurmadığından oldukça agresif ve invaziv üçlü negatif meme kanseri hücresidir (Maharjan ve ark., 2018). Üçlü negatif meme kanserinin moleküler temelini anlamak bu nedenle çok önemlidir. MCF-7 hücre dizisi insan meme adenokarsinoma hücre dizisidir. MCF-7 hücre dizisi PR(+) ve ER(+) HER2(-) özelliktedir. Nanoteknolojinin gelişimi, tıpta taşıyıcı sistemler başta olmak üzere kanser teşhisi ve tedavisinde büyük gelişmelerin oluşmasını sağlamıştır.

2.2. Gen Tedavisi

Gen tedavisinin tanımını yapmadan önce temel kavramı açıklamak gerekirse gen, DNA molekülünde canlının kalıtsal özelliklerinden herhangi birini taşıyan, anlamlı bir işlevi olan (protein kodlayan) bir birim, bir parçası iken genom bir organizmanın sahip olduğu genetik şifrelerin tamamıdır. Gen tedavisi; hastaya DNA, RNA, mRNA, siRNA, antisens oligonükleotid gibi genetik bir materyalin aktarımı sağlanarak hastanın tedavi edilmesidir. DNA parçasının hücre içine girmesi işlemine transfeksiyon denir. Hücre içindeki gene transgen adı verilir (Pahle ve Walther, 2016). Gen tedavisi, mutasyona uğramış bir geni sağlam kopyası ile değiştirmek, mutasyonlu bir genin ekspresyonunu inhibe etmek, istenmeyen bir geni susturmak, eksik bir geni yerine koymak ya da hastalıkla savaşmaya yardımcı olacak terapötik geni hedef hücrelerin nükleuslarına ya da dokularına aktarmak için kullanılan bir yöntemdir. Gen tedavisi, kanser başta olmak üzere, özellikle genetik ve tedaviye dirençli hastalıkların tedavisi için umut verici bir yaklaşımdır. Geleneksel tedavi şekillerine göre yan etki riski oluşturmadan yüksek bir terapötik doz ile lokal olarak uygulanabilmesi sayesinde üstünlük taşımaktadır. Ayrıca, gen tedavilerinin çoğu tek sefer uygulanabilir ve uzun vadede maliyet açısından etkili olabilen tedavi yöntemleri olarak da göze çarpmaktadır.

2.2.1. Gen Tedavisinin Tarihsel Süreci

1944'te DNA'nın keşfiyle ilk gelişmeler başlamış; James Watson ve Francis Crick tarafından DNA molekülünün yapısının aydınlatılması ile çalışmalar daha da hız kazanmıştır. DNA dizilimlerini spesifik olarak tanıyan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin 1968 yılında bulunmasıyla yapılan çalışmalar daha da anlam kazanmaya başlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisiyle 1977 yılında bakterilerde insan büyüme hormonu üretilmesi başarılmıştır. Daha sonra insan insülin geninin klonlanmasıyla araştırmalar iyice ivme kazanmaya başlamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesinin ardından kistik fibrozis için ilk genetik marker belirlenmiştir. 1990 yılında yeni bir çağ açılması niteliğindeki uluslararası insan genom projesinin başlatılmasıyla ilk insan gen tedavisi gerçekleştirilmiştir (Wirth ve ark., 2013).

2.2.2. Gen Tedavisi Yaklaşımları

Gen tedavileri hücre türüne göre, eşey hücelere ve somatik hücelere yapılan tedaviler olarak sınıflandırılırken uygulama şekli bakımından da *ex vivo* ve *in vivo* olmak üzere sınıflandırılmaktadır:

Eşey Hücre Tedavisi

Bu tedavide, hücrelerin çekirdekleri çıkarıldıktan sonra donörün yumurtalığına verilir. Genetik bozukluk ve kalıtsal hastalıkların tedavisinde etkili bir tedavi yaklaşımı olduğu düşünülse de yapılan değişiklikler soylar boyunca aktarılabilecek şekilde kalıcı olduğu için pek çok ülkede etik açıdan bu tedavi yöntemi insan üzerinde uygulanmamaktadır. Fakat mitokondriyel hastalıklarda kabul edilebilir bulunmaktadır.

Somatik Hücre Tedavisi

Bu tedavide terapötik genler, hastanın somatik hücrelerine aktarıldığı için eşey hücre gen tedavisinde olduğu gibi gelecek kuşaklar boyunca bir aktarım söz konusu değildir. Günümüzde yapılan somatik hücre gen tedavisinde; işlevini kaybetmiş olan genlerin yerine fonksiyonel genlerin verilmesi, mutant genin fonksiyonel kopyasıyla değiştirilmesi, gen ekspresyonunun inhibisyonu veya spesifik hücrelerin öldürülmesi yani intihar gen tedavisi şeklinde yaklaşımlar uygulanmaktadır (Smith ve Blomberg, 2017).

***Ex Vivo* Gen Tedavisi**

Hastadan alınan hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılır. Sonra bir vektörle sağlıklı genler bu hücelere transfer edilir. Gen aktarımı olan hücreler laboratuvarda *in vivo* olarak çoğaltılır. Hastaya geri verilir. İmmünolojik bir etkinin görülmemesi yöntemin avantajlarından biri olarak görülmektedir.

***In Vivo* Gen Tedavisi**

Bu gen tedavisinde, terapötik gen bir vektör aracılığıyla doğrudan hastanın hücrelerine ya da dokularına aktarım yapılır. Burada en önemli olan tasarlanan vektörün yalnızca hedeflenen hücreler tarafından alınması veya bu hücrelerde gen ekspresyonu yapılmasını sağlayacak özelliklere sahip olmasıdır (Shan ve ark., 2014).

2.2.3. Meme Kanserinde Gen Tedavisi Yaklaşımları

Kanserde gen tedavisinin amacı, sağlıklı hücrelere müdahale etmeden kanser hücrelerini yok etmektir. Bu amaçla onkogen aktivitesinin baskılanması, apoptozun indüklenmesi, immünoterapi, anti-anjiyogenik tedavi, antisens oligonükleotit ve RNA interferans (RNAi) kaynaklı yaklaşımlar ve intihar gen tedavisi gibi farklı klinik yaklaşımlar mevcuttur (Vaseghi ve ark., 2017).

Onkogen Aktivitesinin Baskılanması

Transfeksiyon deneyleri ile onkogen ya da onkogenlerin tümör oluşumundan sorumlu olabileceği kanıtlanmıştır. Meme kanserinin temel nedenlerinden biri de onkogenlerin aşırı ekspresyonuna bağlı tümör oluşumunun gerçekleşmesidir. Burdan da anlaşıldığı gibi onkogen aktivitesinin baskılanması, tümör büyümesinin baskılanmasına neden olmaktadır. Meme kanserinde pek çok onkogen teşhis edilmiştir. Meme kanserinde yoğun olarak protoonkogen c-erbB-2 (veya HER2/neu) çalışılmaktadır. Aşırı gen ekspresyonu nedeniyle kanser patogenezinde rol oynamaktadır. Bu onkogen, meme kanseri için önemli bir belirteç olup; plazma membranına yerleşmiş EGFR'ne benzer bir membran reseptörüdür. C-erbB-2 proteinin aşırı ekspresyonu meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (Kurebayashi, 2001)). İnsan meme kanserinde HER-2 onkogeninin ekspresyonu adenovirüs 5 E1A geniyle inhibe edilmiştir. Adenovirüs tip 5 E1A geni eksprese edilen transkripsiyonel faktörü kodlayan ilk viral kökenli gen ürünüdür. Katyonik lipozom (DCC-E1A) ile gen tedavisine yönelik bir faz I çalışması bulunmaktadır (Xie ve Zeng, 2017).

Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına engel olan proteinleri kodlarlar. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar ve ekspresyonların baskılanması veya genlerin susturulması gibi durumlar kansere neden olmaktadır. Meme kanserinde p53, p16, p27, p21, miR34a, let-7a miRNA, Rb, miR-145, BRCA-1, BRCA-2, Rb, mda7 ve dekorin gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları veya eksiklikleri görülmüştür. Bunlar arasında p53 geni meme kanseri tedavisinde çalışmalarda sıklıkla ele alınan tümör baskılayıcı genidir.

Tümör Kaynaklı Anjiyogenezin İnhibe Edilmesi

Tümör hücrelerinin büyümesine neden olan anjiyogenez sırasında çeşitli büyüme faktörleri, prostaglandinler ortama salınarak bu uyarıyı başlatabilir. Bu nedenle kanser gibi anjiyogenez ile seyreden pek çok hastalıkta anjiyogenez inhibitörlerinin kullanımına ilişkin yaklaşımlar mevcuttur. Kanserde anjiyogenez inhibitörlerinin kullanımı ile tümör büyümesi baskılanmaktadır. Önemli anjiyogenez inhibitörlerinden olan endostatin ve anjiyostatin, bu anti-anjiyogenik genleri kodlayan plazmidler ile kompleks hale getirilmiş lipozomların meme kanser hücrelerini baskıladığı bulunmuştur (Saka ve Bozkir, 2012).

İntihar Gen Tedavisi

İntihar gen tedavisi, ön ilaçları metabolize eden genlerin tümör hücrelerine verilmesiyle yapılmaktadır. Bu tedavi yönteminde, ön ilaç aktifleşerek toksik ilaç kanserli hücrelerin ölümünü sağlamış olmaktadır. Kanser hücrelerini hedeflemek için bu hücreler üzerinde bulunan çeşitli reseptörler hedef alınır. Bu gen tedavisinde yaygın olarak herpes simpleks virüslerindeki timidin kinaz (HSV-tk) enzimini kodlayan genler kullanılır (Zarogoulidis ve ark., 2013).

İmmünoterapi

Bu tedavideki amaç, bağışıklık sistemini aktif hale getirilmesiyle tümör hücrelerinin yok edilmesidir. Tümöre spesifik antijen genlerinin aşı olarak kanser hücrelerine aktarılması, interlökin IL-2, IL-4, IL-12, IL-18, ve INF- α gibi sitokinlerle bu hücrelerin savunma hücrelerine duyarlı hale getirilmesi ve monoklonal veya poliklonal antikolarla tedavi yaklaşımları bulunmaktadır.

Antisens Oligonükleotit ve RNA İnterferon (RNAi) Teknolojileri

Moleküler temelli gen tedavi yaklaşımlarından biri olan antisens teknolojisi, gen susturma yöntemi olarak kanser ve genetik temelli hastalık tedavilerine yönelik ilaç geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Meme kanserine neden olan genlerin ekspresyonunu spesifik olarak inhibe edebilen kısa tek zincirli DNA (ssDNA) moleküllerin kullanımını kapsayan bir teknolojidir (Brenner ve ark., 2013). Meme kanserinde Bcl-2, metilentetrahirofolat redüktaz (MTHFR), c-myc, c-erbB-2, p21, protein Kinaz c-alfa (PKC- α) gibi onkogenlerin antisens moleküllerle inhibisyonu başarılı bir şekilde

yapılmıştır. RNA interferans, transkripsiyon sonrası sentezlenen mRNA dizisine homolog 21–23 nükleotitlik kısa RNA (siRNA) dizisi kullanılarak hatalı genin susturulmasıdır. Meme kanserinin tedavisinde c-myc geninin RNAi ile susturulması sonucunda MCF–7 meme kanseri hücrelerinin yok edildiği görülmüştür (Stoff-Khalili ve ark., 2006).

2.3. Gen Tedavisi Tıbbi Ürünleri

Doku ve gen mühendisliği yöntemleri kullanılarak işlenen ve üretilen beşeri tıbbi ürünlerdir. Vücut dokularında meydana gelen hasarları onarmak, vücudun normal işlevini yerine getirmek için eksikleri yerine koymak, bozulan dokunun bütünlüğünü sağlamak amacıyla hastalara uygulanabilen ileri teknoloji ürünleridir. Gen tedavi tıbbi ürünleri, somatik hücre tedavi tıbbi ürünleri, doku mühendisliği tıbbi ürünleri ve kombine ileri tedavi tıbbi ürünleri ileri teknoloji ürünleri sınıfına girer. Gen tedavisi tıbbi ürünleri, sonradan in vivo olarak ekspresyonu yapılacak profilaktik, diyagnostik ya da terapötik amaçlı genin, insan veya hayvan hücrelerine in vivo ya da ex vivo olarak transfer edilmesiyle bir dizi üretim işlemi sonucunda elde edilen ürünlerdir. Çıplak nükleik asit, kompleks nükleik asit, viral olmayan vektörler, viral vektörler ve genetik olarak değişikliğe uğratılmış hücreler gen tedavisi tıbbi ürünlerine dahildir.

2.4. Gen Taşıyıcı Sistemler

Bir gen tedavisinin başarılı olabilmesi için DNA moleküllerinin hedef hücrelere stabil bir şekilde taşınması gerekmektedir. Karşılaşılan en önemli sorun DNA'nın hücrelere girme yeteneğinin kısıtlı oluşu ve DNA'nın serum nükleaz enzimleri tarafından degradasyona uğramasıdır. DNA transfeksiyonu için bir taşıyıcı vektöre ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar viral vektörler ve viral olmayan vektörler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.4.1. Viral Vektörler

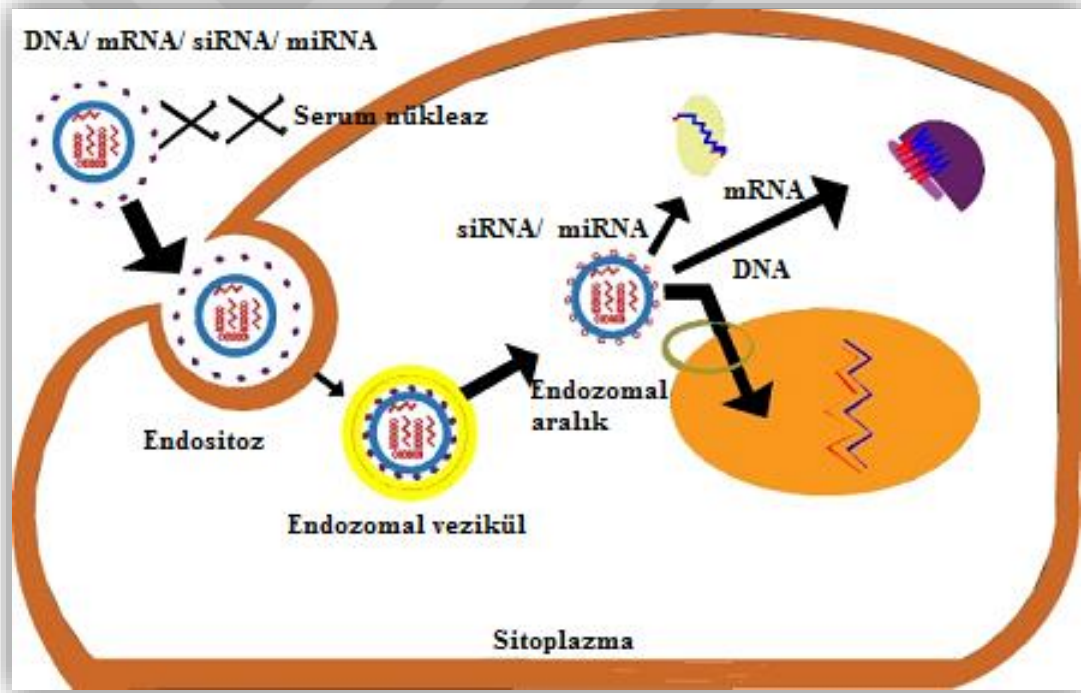
Retrovirüs, adenovirüs, adeno assosiyasyon virüsü, herpes simpleks ve lentiviral vektörler birçok hastalığın tedavisinde sıklıkla kullanılan viral gen taşıyıcı sistemlere örnektir. Retroviral vektörler, yüksek entegrasyon kapasiteleri ve taşıdıkları genetik materyalin hedef genomu entegre olma etkinliğinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedir. RNA taşıyan retrovirüsün hedefe aktarımıyla virüsün yapısında bulunan ters transkriptaz

enzimi aktifleşir. RNA genetik materyali, DNA'ya çevrilerek genoma dahil olmuş olur. Retroviral gen aktarımında karşılaşılan sorun, sadece sınırlı büyüklükteki genetik materyalin aktarılabilmesidir. Terapötik geni taşıyan retrovirüslerin hazırlanması için son teknolojiyle donanımlı laboratuvarlara ihtiyaç duyulması bunun yanında da yüksek maliyetinin olması yöntemin olumsuz yönlerindedir.

Adenoviral vektörler, her türlü hücreyi enfekte edebilen, yapımı ve çoğaltması kolay olan, 10-12 kb'lık genleri aktarabilen vektörlerdir. Retrovirüsler kadar defektif ve nonimmünojenik değillerdir. Aynı zamanlı immünoşüpresif kullanılarak etkinlik artırılabilir. Adeno assosiye virüsler, tek iplikli DNA virüsleri olup, etkinlik gösterebilmek için adenovirüslere ihtiyaç duyarlar (Nunes ve Raper, 1996). Biyogüvenlik açısından avantajlı gibi görünse de uzun süreli ekspresyon sağlamaması büyük dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Blau ve Springer, 1995). Vektörde, sadece virüsün uçlardaki ters dönmüş tekrarlarının kalması yüksek düzeyde güvenlik sağlamaktadır. Diğer bir yandan kısa DNA dizileri taşıması bu vektörün kısıtlayıcı yönlerindedir (Gardlik ve ark., 2005). Herpes simpleks virüs vektörleri, çift zincirli DNA (dsDNA) virüsleridir. Çok sayıda gen içerdiği için kompleks bir virüştür (Young ve ark., 2006). Lentiviral vektör, retrovirüslerden köken almaktadır. Bu vektörler, bölünmeyen hücrelere etki etmekte ve yüksek düzeyde gen ekspresyonu sağlayabilmektedir. Uygulama açısından bakıldığında göz, viral vektörlerin enjekte edilebildiği ve seçilen vektörün tipine göre uzun süreli lokal etkinin olabildiği gen tedavisi için oldukça uygun bir organ olarak görünmektedir. İn vivo gen transferinde adenovirüsler, adeno assosiye virüsler ve lentivirüslerin bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmelerinden dolayı, retrovirüslerde olduğu gibi seçicilik yoktur. Yani hastalıklı dokulardaki hücrelerle normal hücreleri de enfekte edebilirler. Viral vektörlerin dezavantajı virüslerin rastgele genoma entegre olmasından ötürü, genin yanlış bir yere yerleşme olasılığının olmasıdır. Bu sebeple kanser ya da başka hastalıklara neden olabilirler. Ancak günümüzde bu sorunları çözmek için pek çok araştırma yapılmaktadır (Aslanidi ve ark., 2013).

2.4.2. Viral Olmayan Vektörler

Bu vektörlerin üretimi viral vektörelere göre daha kolaydır ve maliyetleri ucuzdur. Ayrıca hapsetme kapasiteleri ve biyogüvenlikleri yüksektir. Bu nedenle son zamanlarda viral vektörlere alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Hücre içine alım mekanizması Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Viral olmayan vektörler fiziksel, kimyasal ve taşıyıcı sistem olarak üçe ayrılırlar. Bu vektörlerin düşük gen transfer etkinliği ve kısa süreli ekspresyon oluşturabilme sorunları vardır. DNA’nın negatif yükünü maskeleyerek DNA’yı hücre içi nükleaz degradasyonundan korumaya çalışırlar. Viral olmayan vektörler virüslerden daha çok tercih edilir. Çünkü immünojenik değildirler, üretimi kolaydır ve endüstriyel üretim amacıyla büyük ölçekte üretilebilirler (David ve Doherty, 2017).



(Jin ve ark., 2014)

Şekil 2. 1. Viral olmayan vektörlerin hücre içine alım mekanizması

Fiziksel Gen Aktarım Yöntemleri

Viral olmayan fiziksel yöntemin en basit hali çıplak DNA’nın aktarımıdır. Çıplak DNA kullanımı düşük toksisite, ucuz maliyet ve advers reaksiyonların olmaması gibi avantajlı

özelliklere sahip olmasına rağmen, düşük transfeksiyon etkinliği nedeniyle tercih edilmemektedir (Wirth ve Yla-Herttuala, 2014). Bu yüzden gen tedavisi için yüksek etkinlikte terapötik geni hedef bölgeye taşıyabilmek, DNA'nın stabilitesi ve hücre membranı ile penetrasyonu artırmak için viral olmayan taşıyıcı sistemlerle DNA'nın kompleks oluşturması gerekmektedir. Gen taşınmasında DNA'nın aktarımı için en yaygın olarak kullanılan fiziksel yöntemler gen tabancası, elektroporasyon (elektrik alan), sonikasyon (ultrason) ve hidrodinamik (yüksek basınçlı) taşımadır. Bu yöntemler, plazma membranı boyunca hedef bölgeye DNA aktarımını kolaylaştırmaktadır (Riley ve Vermerris, 2017).

Gen tabancası ile gen aktarımı, yüksek basınçlı helyum akımıyla hızlandırılmış plazmit DNA kaplı metal parçacıkların bir dokuya bombardımanı ile yapılmaktadır. DNA'nın doğrudan sitoplazmaya hatta nükleusa aktarımı yapılmış olur (Manjila ve ark., 2013).

Elektroporasyon, hücre membranının geçici olarak stabilitesini bozarak kısa süreli yüksek voltaj uygulanmasıyla yapılan bir yöntemdir. Aktarım yapılacak hücre ve plazmit DNA'nın uygulanan 2000-4000V'luk elektrik akımı ile hücre membranında oluşan porlardan DNA'nın hücreye geçişini sağlamaktadır. Daha sonra porların kapanmasıyla DNA'nın hücre içerisine aktarımı gerçekleşmiş olur (Al-Dosari ve Gao, 2009).

Sonikasyon, ultrason kullanılarak kavitasyon ile hücre permeabilitesini arttırarak hücre membranında oluşan geçici porlardan DNA'nın sitoplazmaya pasif difüzyonla taşınmasıyla gerçekleşmektedir.

Kimyasal Gen Aktarım Yöntemleri

Viral olmayan kimyasal gen taşıyıcı vektörler genellikle katyonik yapıda lipid ve polimerler olup DNA ile elektrostatik etkileşimle kompleks oluşumunu sağlayan vektörlerdir. Katyonik özellikleri sayesinde DNA'nın negatif yükünü baskılayarak negatif yüklü hücre membranlarından geçişini sağlamakta, DNA'yı nükleaz degradasyonundan korumaktadır (Panyam ve Labhasetwar, 2003). Ayrıca bu vektörler, doku ya da hücrelere hedeflendirilebilir ve boyutları ayarlanabilecek şekilde tasarlanabilir. Gen aktarımında önemli olan, vektör/DNA kompleksinin

biyoyumluluğu, hücreye toksisitesi ve uygulama yoludur (Luo ve Saltzman, 2000; W. Wang, Li, ve ark., 2013). Lipit ve polimerlerden oluşan viral olmayan gen taşıyıcı sistemler genellikle 10–1000 nm boyut aralığındaki polimerik ve metalik nanopartiküller, lipozomlar, niozomlar, polimerik miseller, nanojeller, nanokapsüller, dendrimerler, karbon nanotüpler, nanokristaller ve katı lipit nanopartikülleri gibi pek çok sistemi kapsamaktadır. Bu sistemler, ilaçların yanı sıra proteinler, peptidler, aptamerler, DNA ve küçük interferans RNA (siRNA) gibi terapötik moleküllerin taşınması için kullanılmaktadır.

Lipit tabanlı gen taşıyıcı sistemler

Katyonik lipitler gen taşınması sırasında sıklıkla kullanılmaktadır. Amfifilik yapıdaki katyonik lipitler, pozitif yüklü hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruktan oluşurlar. Pozitif yüklü grupları sayesinde, fizyolojik pH'da DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla kompleks oluştururlar. Bu lipitler tek başına DNA taşıyıcısı olarak kullanıldığı gibi lipozom, niozom, nanopartikül ve nanoemülsiyonların yapısına katılarak da gen aktarımını sağlarlar. Gen aktarımında katyonik lipitlerin dışında kullanılan dioleyilfosfatidiletanolamin (DOPE) veya kolesterol gibi yardımcı lipidler lipozomların, niozomların faz geçişine neden olarak transfeksiyon etkinliklerini arttırmaktadır. Lipidler hücre membranına benzer yapılar olduğundan immünojenite riskleri çok düşüktür (Zhao ve Huang, 2014).

Polimer tabanlı gen taşıyıcı sistemler

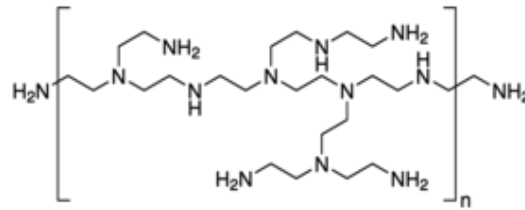
Doğal veya sentetik yapıdaki katyonik polimerler yapılarındaki amin gruplarıyla DNA'da bulunan negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşim sayesinde polipleks adı verilen stabil kompleksleri oluştururlar. Bu sayede katyonik polimer/DNA kompleksleri negatif yüklü membranlar ile etkileşim sağlamakta, sıkı paketlenme nedeniyle meydana gelen küçük boyut (<200 nm) hücresel bariyerlerden geçişi kolaylaştırmaktadır. Üstelik endositoz ile hücresel alımı ve transfeksiyon etkinliğini de arttırmaktadır.

Gen tedavisi için kullanılan pek çok katyonik polimer bulunmaktadır. Bunlar polietilenimin (PEI) başta olmak üzere poli (L-lizin)(PLL), poliamidoamin (PAMAM) ve polipropilamin dendrimerler, poli (L-histidin)-graft-poli(L-lizin), kitosan, katyonik

dekstran, katyonik peptitler ve jelatin diye devam etmektedir (Thomas ve Klivanov, 2003). Katyonik polimerler, DNA'nın sıkı paketlenmesiyle oldukça küçük boyutta elde edilmesi, stabilite, hedeflenebilirlik, çok miktarlarda kolay üretim, nükleaz degradasyonundan korunma, düşük immün cevap ve toksisite gibi özelliklerine bakıldığında lipit tabanlı sistemlere göre daha fazla avantaja sahiptir. Bunların yanında, düşük boyutları ve ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri, kanda kalış süreleri ve yüksek hücresel alımları son zamanlarda katyonik polimerleri daha çekici hale getirmiştir (Taniyama ve ark., 2002). Katyonik polimerler arasında yer alan polietilenimin (PEI) yüksek yük yoğunluğu nedeniyle nükleik asit taşınması için viral olmayan gen taşıyıcı sistem olarak sıklıkla kullanılan katyonik polimerlerden biridir (Fernandes ve ark., 2013). Tez çalışmamız kapsamında taşıyıcı sistemler hazırlanırken, poli (2-etil-2- oksazolin) polimerinin kısmi hidrolizi ile sentezlenen PEI katyonik polimerinin bir çeşidi olan dallanmış polietilen imin (BPEI) kullanılmıştır.

Polietilenimin (PEI)

PEI ilk kez 1995 yılında, üstün transfeksiyon yeteneği nedeniyle gen taşıma çalışmalarında altın standart olarak kabul edilmiştir. PEI, dallanmış ve lineer (düz) olmak üzere iki farklı yapıda bulunabilir. Yapısındaki yüksek aminin neden olduğu yüksek katyonik yük, plazmit DNA ve oligonükleotidler ile kompleks oluşumunu sağlamaktadır (Shah ve ark., 2015).

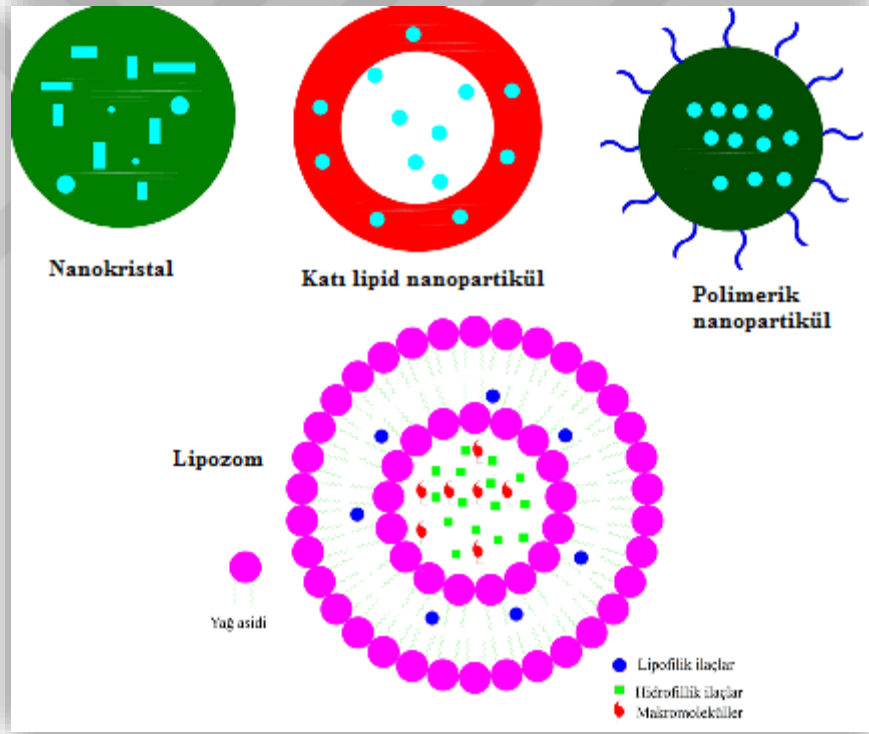


Şekil 2. 2. Dallanmış polietileniminin kimyasal yapısı

2.4.3. Nanotaşıyıcı Sistemler

Son zamanlarda meme kanseri ve pek çok kanser türünün tedavisi için nano ölçekteki (10-100 nm) terapötik sistemlerin kullanımı oldukça popüler hale gelmeye başlamıştır. Bu sistemler, polimerik miseller, polimer-ilaç konjugatları, dendrimerler, lipozomlar, niozomlar ve inorganik partiküllerden oluşmaktadır (Cesur ve Demir Dora, 2019).

Geleneksel moleküler tedavi modellerine göre nanoterapötik sistemler kanser tedavisinde yüksek yükleme kapasitesi, uzun süreli kan dolaşımı, sağlıklı dokularda azaltılmış toksisite ve arttırılmış anti-tümör etkinlik gibi önemli avantajlara sahiptir. Klinik çalışmalarda daha önce bahsedildiği üzere, lipopleks ve polipleksler gibi farklı nano taşıyıcılar sayesinde ve biyoteknolojideki son ilerlemelerle, dokuların hedeflenmesi ve akıllı fonksiyonlara sahip taşıyıcılar ön plana çıkmaya başlamıştır. Bu amfifilik nano yapıdaki niozomlar, miseller, proteinler, antikanser ilaçları, siRNA, DNA gibi çeşitli terapötik ajanları kanser hücrelerine aktarabilme yeteneğine sahiptir (Torchilin, 2006).



(L. Zhang ve ark., 2013)

Şekil 2. 3. Nanotaşıyıcı sistemler

Niozomlar (Non-İyonik Sürfaktan Vezikülleri)

Lipozom bulunduktan yaklaşık 10 yıl sonra yağ asitleri ve non-iyonik sürfaktanlarla veziküler yapılar oluşturabilir fikri ortaya atılmıştır. Bu yeni oluşan veziküller lipozomlara benzer yapılardır (Ge ve ark., 2019). Non-iyonik sürfaktan veziküller ilaç taşıyıcısı olarak lipozomlara alternatif olarak geliştirilmiştir. Lipozomların birçok

avantajları olmasına rağmen yapılarındaki fosfolipitler nedeniyle kimyasal stabiliteleri düşüktür. Yapılarındaki lipitlerin taşıdığı ester bağları kolayca hidroliz olabilir. Lipozomların bu gibi sorunları araştırmacıları daha iyi bir sistem geliştirmeye yöneltmiştir (Phadungcharoen ve ark., 2018).

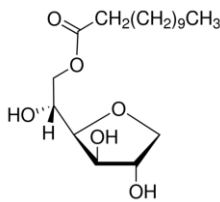
Niozom Oluşumu

Non-iyonik sürfaktanlar genelde doymuş sürfaktanlardır. Sürfaktanların ‘Hidrofil Lipofil Denge’ (HLB) değerleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Hidrofilik baş grup bir eter bağı ile alkil kısmına bağlanır. Veziküler sistem, kolesterol ve tek alkil zinciri olan non-iyonik sürfaktanlarla oluşabilir. Bu sistem hidrate edilince ozmotik olarak aktif ve stabil bir vezikül elde edilmiş olur (Handjani-Vila ve ark., 1979).

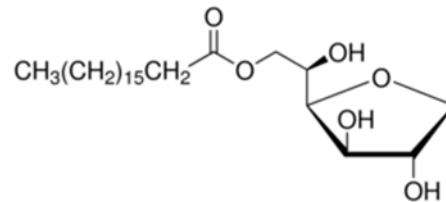
Tablo 2.1. Non iyonik sürfaktanların HLB değerleri

(Thakare ve ark., 2017)

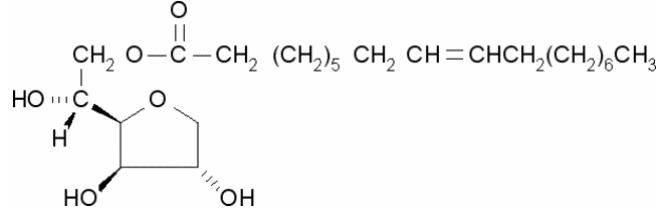
Non İyonik Sürfaktanlar	HLB Değerleri
Span 20 (Sorbitan monolaurat)	8,60
Span 40 (Sorbitan monopalmitat)	6,70
Span 60 (Sorbitan monostearat)	4,70
Span 80 (Sorbitan monooleat)	4,30
Tween 20 (Polioksietilen 20/ sorbitan monolaurat)	16,7
Tween 80 (Polioksietilen Sorbitan Monooleat/ Polisorbat 80)	15,0
Brij 72 (Polioksietilen 2 stearyl eter)	4,90



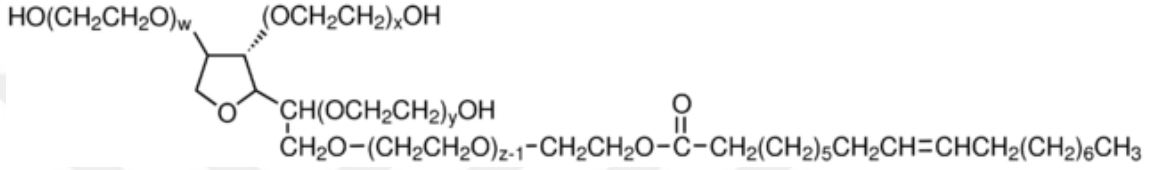
Şekil 2. 4. Span 20 kimyasal yapısı



Şekil 2. 5. Span 60 kimyasal yapısı



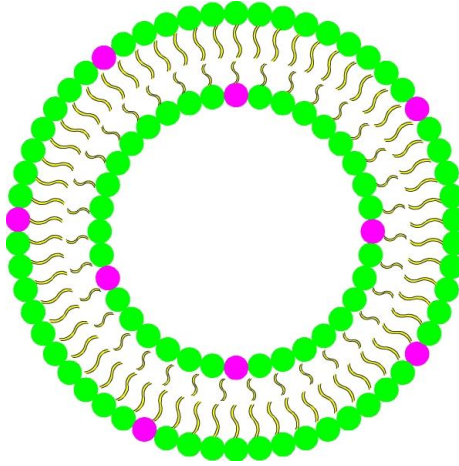
Şekil 2. 6. Span 80 kimyasal yapısı



Şekil 2. 7. Tween 80 kimyasal yapısı

Niozomların Yapısı

Non iyonik sürfaktanların hidrate edilerek oluşturduğu kapalı çift tabakalı yapılardır. Niozomlar, genellikle kolesterol ile polioksietilen alkil eterler ve polioksietilen alkil esterler gibi tek zincirli yüzey aktif moleküllerinden oluşan iyonik olmayan yüzey aktif maddelerdir (Geusens ve ark., 2011).



(Ge ve ark., 2019)

Şekil 2. 8. Niozom yapısı

Niozomların Avantajları

Niozomlar, etkin maddenin etkisini uzatabilir, hedeflendirme yapılabilir, doz serbest ilaca göre daha azdır, toksik özellikleri yok denecek kadar azdır, lipozomlardan daha dayanıklıdır. Çözünürlüğü düşük maddelerin çözünürlüğünü artırmada da kullanılabilir. Bu veziküller daha dayanıklı olup daha ucuza üretilirler üretilir (Phadungcharoen ve ark., 2018).

Niozomların Stabilitesi

Eter bağı ve alkil zincirleri daha yüksek kimyasal stabiliteyi sağlamaktadır. Ayrıca eterik sürfaktanlar, esterik sürfaktanlara göre daha stabil yapılardır. Fakat esterik sürfaktanlara göre daha çok toksiktirler. Kolesterol ve yük artırıcı maddelerin de eklenmesi niozomların stabilitesini artırır (Azeem ve ark., 2009).

Niozom Hazırlama Yöntemleri

Niozom hazırlama yöntemlerinde prensip sürfaktan/lipit karışımının belli bir ısıda hidrate edildikten sonra kullanım alanına göre ayarlanarak veziküllerin boyutlarının küçültülmesidir.

Film hidrasyon yöntemi

Sürfaktan lipit karışımı bir organik solvan ile çözülür. Yuvarlak tabanlı balon jodedeki karışımın organik solvanı rotavaporda vakum uygulanarak uçurulur. İnce filmi 50-60 °C'de sulu faz ile hidrate edilir. Elle çalkalama yöntemi de denmektedir (Yeo ve ark., 2019). Bu çalışmamızda taşıyıcı sistemler bu yöntem ile hazırlanmıştır.

Eter enjeksiyon yöntemi

Sürfaktan kolesterol karışımı dietil eterde çözüldükten sonra 60°C'de sulu faza iğne ile enjekte edilir. Eter buharlaştırılır. Bu yöntemin dezavantajı çözücünün tam olarak ortamdaki uzaklaştırılmamasıdır (Pham ve ark., 2006).

Ters faz buharlaştırma yöntemi

Sürfaktan kolesterol karışımı kloroformda çözülür. Yüklenecek etkin madde sulu fazda çözünür. İki faz 4-5°C'de sonike edilir. Sonra kloroform düşük basınçta uzaklaştırılır.

Ardından jel meydana gelir. Bu jel hidrate edilerek veziküller oluşturulur (L. Wang ve Pileni, 2016).

Proniozomlardan niozomların hazırlanması

Bu yöntemde suda çözünebilen bir taşıyıcı sürfaktan ile kaplanmaktadır. Proniozom adı verilen kuru sürfaktan filmi elde edilir. Faz geçiş sıcaklığının üzerinde sulu faz ile hidrate edilmesi sonucunda niozomlar elde edilmiş olur (Ahmad ve ark., 2017).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Biyolojik Materyaller

pDNA vektörleri

pDNA vektörü olarak LV-RFP (Addgene #plazmit 26001) kullanıldı.

LV-RFP pDNA'sı, ampisiline karşı direnç geni taşıyan ve aynı zamanda 7539 bp uzunluğunda olan bir plazmittir.

MCF-7 hücre hattı

MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisi (ATCC® HTB-22) kullanıldı.

MCF-12A hücre hattı

MCF-12A normal insan meme hücre dizisi ((ATCC® CRL-10782™) kullanıldı.

Kullanılan bakteri

pDNA'nın çoğaltılması için konakçı bakteri hücresi olarak *Escherichia coli* DH5α (*E. coli*) suşu kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi ve kullanım nedeni Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Kullanılan cihazlar	Kullanım sebebi
AutoclaveSystec VE55	Kullanılan çözeltilerin sterilizasyonu
BiofugeStratosHeraeus	pDNA izolasyonu
Bio-RAD PowerPac Basic	Agaroz jel elektroforezi

Çalkalamalı İnkübatör SHEL LAB SI Series	Bakteri kültürü
Floresan Microscope	Hücre görüntüleme
Heidolph İnkübatör 1000	Bakteri kültürü
Heidolph MR3001 Manyetik Karıştırıcı	Çözelti hazırlama
Heidolph Unimax 1010	Bakteri kültürü
KODAK Image Station 2000min	Agaroz jel elektroforezi
Mettler Toledo Hassas Terazi	Çözelti hazırlama
Olympus CKX41 Mikroskop	Hücre görüntüleme
Olympus IX2-UCB	Hücre görüntüleme
Thermo Multiskan Spectrum	pDNA izolasyonu
ThermoScientific Heracell 240 CO ₂ İnkübatör	Hücre kültürü
ThermoScientific Orion Star A111 pH metre	Çözelti hazırlama
Heidolph Rotary Evaporator	Taşıyıcı sistem hazırlama

Bandelin Sonorex	Taşıyıcı sistem hazırlama
Bandelin Sonopuls Hd 2070	Taşıyıcı sistem hazırlama
The Malvern Zetasizer Nano	Boyut ve yük ölçümü

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Sorbitan monooleat (Span 80; HLB 4.3) (*Sigma Aldrich 1338-43-8 Mw 428.60 g/mol*), Polisorbat 80 (Tween 80; HLB 15) (*Sigma Aldrich 9005-65-6 Mw 1310 g/mol*), Polietilen glikol oktadesil eter (Brij72; HLB 4,90) (*Sigma Aldrich 9005-00-9 Mw 358.60 g/mol*), Sorbitan monostearat (Span 60; HLB 4,70) (*Sigma Aldrich 1338-41-6 Mw 430.62 g/mol*), Sorbitan monolaurat (Span 20; HLB 8,60) (*Sigma Aldrich 1338-39-2 Mw 346.47g/mol*), Sorbitan monopalmitat (Span 40; HLB 6,70) (*Sigma Aldrich 26266-57-9 Mw 402.57 g/mol*), Polietilen glikol sorbitan monolaurat (Tween 20; HLB 16,7) (*Sigma Aldrich 9005-64-5 Mw 1228 g/mol*), Kolesterol (3 β -Hidroksi-5-kolesten) (*Sigma Aldrich \geq 99% Mw 386.65 g/mol*), Hekzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) (*Sigma Aldrich 57-09-0 Mw 364.45 g/mol*), Oktadesilamin (Sterilamin) (*Sigma Aldrich 124-30-1 Mw 269.51 g/mol*), kloroform, metanol, etanol, distile su, dallanmış polietilenimin (BPEI) (*Sigma Aldrich 408727 average Mw~25.000 by LS*): Stok çözeltisi 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

3.2. Genetik Materyalin Elde Edilmesi

Escherichia coli bakterisi hücreleri içindeki LV-RFP plazmit DNA izolasyonu alkali lizis yöntemi ile yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler

Luria-Bertani Agar (Sigma Aldrich L2897): 35 g LB agar tartıldıktan sonra 1 L dH₂O'da çözüldü. 121°C'de 15 dakika otaklavlandı. Bu işlemten sonra oda sıcaklığında bekleyen LB agar'a 100 μ g/ml ampisilin eklendi.

Luria-Bertani Broth (Sigma Aldrich L3022): 20 g LB tartıldıktan sonra 1 L dH₂O'da çözüldü. 121°C'de 15 dakika otaklavlandı. Bu işlemten sonra oda sıcaklığında bekleyen LB broth'a 100µg/ml ampisilin eklendi.

Tris (Vivantis biochemical Mw:121.4 g/mol): 10mM Tris-Cl için 30.285g tartıldıktan sonra 250 ml dH₂O'da çözüldü. pH HCl çözeltisi ile 8'e ayarlandı.

EDTA (Sigma aldrich Mw:372.2 g/mol): 0.5 M EDTA hazırlamak için 9.306 g EDTA tartıldıktan 50 ml dH₂O'da çözüldü. pH NaOH çözeltisi ile 8'e ayarlandı.

3.2.1. Bakteri Hücrelerinin Katı Besiyerine Ekimi

Tek koloni düşürme tekniği ile farklı kolonilerin birbirinden ayrılması sağlandı. 100 µg/ml ampisilin eklenmiş LB agar besiyeri hazırlandı.

1. pDNA içeren *E. coli* stoğundan alınan bakteri örneği, petri yüzeyinin yaklaşık 1/3'üne steril öze ucu ile üç aşamalı olacak şekilde çizik oluşturularak ekim yapıldı.
2. Bakterilerin çoğalması için petriler gece boyu 37°C'de inkübatöre bırakıldı.
3. Üremiş olan kolonilerden tek koloni seçilerek, daha önce hazırlanmış olan LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve mini kültür kuruldu.
4. Bakteri kültürü 37°C'de 200 rpm'de yaklaşık 8 saat çalkalanarak inkübasyona bırakıldı.
5. Daha sonra sıvı LB ile mini kültürden maksî kültür kuruldu.
6. Bakteri kültürü 37°C'de 200 rpm'de çalkalanarak 12 saat inkübe edildi ve sonrasında plazmit DNA izolasyonuna geçildi.

3.2.2. LV-RFP pDNA İzolasyonu

LV-RFP pDNA izolasyonu için alkali lizis yöntemi kullanıldı (Sambrook ve ark., 1989). Bunun için gerekli çözeltiler Tablo 3.2'de verildiği gibidir.

Tablo 3.2. Alkali Lizis yönteminde kullanılan çözeltiler

Çözelti I	Çözelti II	Çözelti III
Glukoz 50mM, Tris-Cl (pH:8.0) 25mM EDTA (pH:8.0) 10mM	Sodyum hidroksit 0.2 N SDS %1	Potasyum asetat (5M) Glasiyel asetik asit Distile su

Alkali lizis yöntemi şu şekilde yapıldı;

1. Bakteri kültürü 12.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürme işlemi gerçekleştirildi.
2. Süpernatant atıldıktan sonra kalan pellet üzerine soğutulmuş Çözelti I eklendi, ardından vortekslenip buz üzerinde 30 dakika bekletildi.
3. Taze hazırlanmış Çözelti II eklendikten sonra tüpler 5 kez hassas bir şekilde elle çalkalandı.
4. 3-4 dakika buz üzerinde bekletildi.
5. Buz üzerinde soğutulmuş Çözelti III eklendikten sonra vortekslenerek 3-5 dakika buz üzerinde bekletildi.
6. 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. %100 etil alkol eklendikten sonra 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlenerek DNA'nın çökmesi sağlandı.
8. Çökmüş pellete 1 ml %70'lik etil alkol eklendi ve 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
9. Üst faz atıldıktan sonra pellet kurumaya bırakıldı.

10. DNA 1X TE tamponda çözüldü.

3.3. Genetik Materyallerin Karakterizasyonu

İzole edilen pDNA'lar; plazmid DNA'nın elektroforetik hareketinin değerlendirilmesi, saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi yöntemleri ile karakterize edildi.

3.3.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen pDNA'nın saflığı ve konsantrasyonu 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılarak belirlendi. pDNA 1XTE tamponunda çözüldü. Daha sonra pDNA çözeltisi belirli bir oranda dilüe edildi ve 260-280 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo Electron Corporation Multiskan Spectrum) absorbans ölçümü yapıldı.

Plazmit DNA saflığı $A_{280/260}$ oranına göre değerlendirildi. OD280 değeri çözeltildeki protein miktarını gösterirken OD260 değeri ise DNA miktarını gösterir. Bu oranın 1.8-2.0 arasında çıkması pDNA'nın saf olduğu anlamına gelir (Chiang ve ark., 2005).

pDNA konsantrasyonu aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

pDNA konsantrasyonu= $A_{260} \times 50 \times$ Dilüsyon faktörü

3.3.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi

İzole edilen pDNA'ların büyüklükleri %1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Tampon çözeltisi olarak 1XTBE kullanıldı. TBE çözeltisi aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlandı.

TBE çözeltisi (Tris- Borik Asit- EDTA): 0.5 M EDTA hazırlamak için 186.1 g disodyum EDTA 1L dH₂O'da çözüldü, pH 8'e NaOH kullanılarak ayarlandı ve 0,45 µm filtreden geçirildi. 1 L TBE çözeltisi hazırlamak için 54 g Tris baz ve 27.5 g borik asit tartıldı ve 20 ml 0.5 M EDTA eklenerek 1L'ye tamamlandıktan sonra pH 8.3 ayarlandı.

LV-RFP pDNA'sı % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezinde 90 voltta elektrik akımında 45 dakika yürütüldü (BIOrad) ve ardından görüntüleme (KODAK Image Station 2000min) yapıldı.

3.4. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

3.4.1. Ön Formülasyon Çalışması

Ön formülasyon çalışmalarımızda in vitro transfeksiyonla pDNA'yı hücre içine aktarmak için non iyonik sürfaktan olarak Span 40, Span 80, Tween80 ve Brij 72 kullanılırken lipit olarak kolesterol, katyonik ajan olarak da CTAB, sterilamin, BPEI (sentetik) polimeri kullanıldı. Taşıyıcı sistemin amacı pDNA'yı serumda bulunan nükleazlara karşı koruyarak pDNA'nın stabil kalmasını sağlamaktır.

F1 formülasyonumuz sürfaktan olarak Tween 80 kullanılırken lipit olarak kolesterol ve katyonik ajan olarak sterilamin kullanılarak hazırlandı. Vezikül boyutunu küçültmek için en son basamakta ultra prob kullanıldı. Aynı formülasyonu CTAB'li hazırladığımızda ise F2 kodu verildi. Sürfaktan olarak Span 80 kullanıldığında ise F3 kodu verildi. Ardından katyonik ajan kullanılmadan en son basamakta sonikasyon yapılarak hazırlanan formülasyonlarımız için sürfaktan olarak Span 80 kullanıldığında F4, evaporatör kullanılmadan kendiliğinden oluşan niozomlara F5 ve sürfaktan olarak Tween 80 kullanıldığında ise F6 kodları verildi. Sürfaktan olarak Span 80'ni kullandığımız formülasyonda katyonik ajanı değiştirip BPEI yaptığımızda F7 kodu verildi. Sürfaktanı Span 40 seçtiğimizde kolesterolle molar oranı 1:1 olacak şekilde hazırlanan formülasyonlara F8 kodu verilirken Span 80 ve Tween 80'ni kombine halde kullandığımız formülasyona F9 kodu verildi. Sürfaktanımız Span 60 iken F10 kodu verilirken Brij 72 kullandığımızda F11 kodu verildi. Bu iki formülasyon içinde CTAB kullanıldı.

Tablo 3.3. Ön formülasyon çalışmasında hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon	Non iyonik sürfaktan	Lipit	Katyonik ajan	Hazırlama yöntemi
F1	Tween 80	Kolesterol	Stearilamin	İnce film hidrasyon
F2	Tween 80	Kolesterol	CTAB	İnce film hidrasyon
F3	Span 80	Kolesterol	Stearilamin	İnce film hidrasyon
F4	Span 80	Kolesterol	-	İnce film hidrasyon

F5	Span 80	Kolesterol	Stearilamin	Proniozom
F6	Tween 80	Kolesterol	Stearilamin	Proniozom
F7	Span 80	Kolesterol	BPEI	İnce film hidrasyon
F8	Span 40	Kolesterol	BPEI	İnce film hidrasyon
F9	Span 80 ve Tween 80	Kolesterol	BPEI	İnce film hidrasyon
F10	Span 60	Kolesterol	CTAB	İnce film hidrasyon
F11	Brij 72	Kolesterol	CTAB	İnce film hidrasyon

3.4.2. Niozomların Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sırasında niozomlar ince film hidrasyon ve proniozom yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır.

İnce film hidrasyon yönteminde hesaplanan miktarda lipit ve sürfaktanlar hassas terazide tartıldıktan sonra kloroform içinde çözünmesi sağlanarak berrak çözelti elde edildi. Bu çözelti 60°C'de 120 rpm'de evaporatörde uçurularak ve balonun çeperinde ince bir film tabakası oluşturuldu. Hidrasyon basamağında katyonik ajan eklendi. Oluşan veziküller sistemin 15 dakika ultrasonik banyoda ardından 30 dakika prob tipi ultrasonik homojenleştiricide sonikasyonu yapılarak vezikül boyutları küçültüldü.

Niozomlar proniozom tekniğiyle hazırlanırken; hesaplanan miktarda lipit ve sürfaktanlar hassas terazide tartıldıktan sonra kloroform içinde çözünmesi sağlanarak berrak çözelti elde edildi. Üzerine deiyonize su eklenerek 1 saat hidrate edildi. Oluşan veziküller sistemin 15 dakika ultrasonik banyoda ardından 30 dakika prob tipi ultrasonik homojenleştiricide sonikasyonu yapıldı.

Hazırlanan tüm formülasyonlar morfolojik özellikleri, zeta potansiyelleri, partikül boyutları, DNA ile kondenzasyon yetenekleri, stabilite ve transfeksiyon etkinlikleri göz önünde bulundurularak en ideal formülasyon F9 olarak seçildi.

3.4.3. Polipeks ve Niopolipeks Komplekslerinin Hazırlanması

1µg/µl LV-RFP plazmit DNA ile 1:1 (h/h) oranında sentetik; yüksek molekül ağırlıklı dallanmış BPEI polimeri 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak polipeks kompleksleri hazırlandı. Ardından polipeksler niozomlar ile inkübasyona bırakılarak kompleksleştirildi ve niopolipeksler hazırlanmış oldu. Kompleks oluşturabilme yeteneği % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

3.5. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Niozom kullanılarak hazırlanan pDNA taşıyıcı sistemler, morfolojik özellikleri, boyut, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksleri belirlenerek karakterize edildi. Boyut ve zeta potansiyel ölçümleri için Malvern Zetasizer ZEN3600 kullanıldı. Hazırlanmış olduğumuz taşıyıcı sistem 1:1000 oranında seyreltilerek yükü (zeta potansiyel) ve boyutu ölçüldü.

3.6. Taşıyıcı Sistemlerin Oda Sıcaklığındaki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan niozom formülasyonları 3 ay oda sıcaklığında (25 °Cderece) bekletilerek fiziksel stabiliteleri değerlendirildi.

3.7. Taşıyıcı Sistemlerin Serumdaki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan pDNA taşıyıcı sistemin pDNA'yı serumdaki nükleazlara karşı koruyup korumadığını incelemek için hazırlanan formülasyonlar %10 FBS serum içeren DMEM içinde 30 dk ve 4 saat olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda % 1'lik (a/h) sodyumdodesilsülfat (SDS, Sigma L4390) ile deney sonlandırıldı. Serum içerisindeki stabilite % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezinde incelendi.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D5648; 4,5 g/l glukoz ve L-glutamin): Bir şişe besiyeri ve 3,7 g sodyum bikarbonat 800 ml distile suda çözüldü. pH 7.4 ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlandı ve 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Daha sonra, 10 ml penisilin-streptomisin çözeltisi (Biological Industries), amfoterisin ve sodyum piruvat eklendi. Serumlu DMEM için %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serum, Biochrom AG) eklendi.

3.8. Transfeksiyon Çalışmaları

Gen tedavisi tıbbi ürünü olarak kullanılması amacıyla geliştirilen nanotaşıyıcı sistemin gen aktarım etkinliği transfeksiyon çalışmasıyla incelendi. Transfeksiyon çalışması aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D5648; 4,5 g/l glukoz ve L-glutamin): Bölüm 3.6 'daki gibi hazırlandı.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): Sırasıyla 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g NaH₂PO₄ ve 0,24 g KH₂PO₄ tartıldı sonrasında 800 ml dH₂O'da çözüldü. Çözeltinin pH'sı NaOH ile 7.4'e ayarlandıktan sonra distile suyla 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 0,22 µm filtreden geçirildi.

Tripsin-EDTA Çözeltisi: 1X Tripsin-EDTA çözeltisi (Biochrom AG, L2133) kullanıldı.

3.8.1. Hücrelerin Pasajlanması

Besiyeri, PBS ve tripsin-EDTA 37°C'ye ısıtıldı. Hücreler mikroskopta incelendi. Hücrelerin, petri yüzeyinin yaklaşık %80'ini kapladığı görüldüğü zaman pasajlandı. Yüzeye pipet değdirilmeden ortam pipetle çekildi. Daha sonra 5 ml PBS ile yıkandı ardından yeni bir pipetle 2 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 3-5 dakika bekletildi. Serbest hücreler 8-10 ml serumlu besiyeriyle süspande edilerek santrifüj tüpüne alındı. 125g de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet 10 ml taze serumlu besiyeriyle pipetaj yapılarak petrilere dağıtıldı. MCF-7 hücrelerinin yoğunluğuna göre pasaj yapıldı.

3.8.2. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler, ihtiyaç duyulandan daha fazla sayıda çoğaldığında veya yapılan çalışmaya ara verileceği durumlarda dondurularak saklandı. Hücrelerin yeniden çözüldüğünde canlılıklarının iyi olması için hücrelerin dondurulması işlemine dikkat edilmek gerekir. Besiyeri ve serum su banyosunda 37⁰ C'ye ısıtıldı. Hücrelerin pasajlanması bölümünde belirtildiği gibi pellet elde edildi. Hücre pelleti %5 DMSO ve % 95 FBS karışımıyla süspanse edildi ve Cryo.s™ adı verilen tüplere kondu (1 petriden yaklaşık 3 adet). Bu

tüpler dondurma kabına kondu ve -80 °C'de bir gece bekletildikten sonra ertesi gün sıvı azot tankına aktarıldı.

3.8.3. Hücrelerin Sayımı

Hücrelerle çalışırken hücrelerin canlılığını belirlemek çok önemlidir. Bu amaçla negatif yüklü bir boya olan 'Trypan Blue' kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin içine boya giremez. Canlı olmayan hücreler boyayı absorbe ettikleri için mikroskop altında mavi görünürler. Dikkat edilmesi gereken nokta, hücreler trypan blue'da uzun süre kalırsa canlı hücrelerin de maviye boyanacağıdır. Sayımı yapılacak hücreler tripsinle kaldırılarak besiyerinde süspanse edildi. Bu süspansiyondan 100 µl alındı. 1 ml'lik ependorf içinde 100 µl Trypan Blue boyasıyla karıştırılarak pipetaj yapıldı.

Hücre sayısını veren formül = $H_s \times D_o \times S_s$ (Hs: Hücre sayısı, Do: Dilüsyon oranı, Ss: Sabit sayı, 10.000) Thoma lamında 0,1 mm³ hacimde sayım yapılır.

MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 7.000/ kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra 70-80% doluluğa ulaşmış olan MCF-7 hücreleri 1X PBS ile yıkandı. Sonra %10 FBS içeren 100 µl DMEM ile karıştırılan formülasyonlar MCF-7 hücreleri üzerine eklendi. 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda besiyeri tazelendi. 24., 48. ve 72. saatlerdeki ışımalara floresan mikroskopunda (Olympus CKX41 Mikroskop) bakılarak transfeksiyon etkinliği incelendi.

Kullanılan çözeltiler

DMEM besiyeri: Bölüm 3.6 'daki gibi hazırlandı.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): Bölüm 3.8 'deki gibi hazırlandı.

3.9. Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Taşıyıcı sistemlerin sitotoksitesisi 3-(4,5-dimetiltiyazol -2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit testi (MTT) ile incelendi.

MTT (5 mg/ml) Çözeltisi

MTT (AppliChem, A2231) 5 mg tartıldı ve 10 ml 1X PBS içinde çözüldü. 0,22 µm filtreden geçirildikten sonra +4°C'de karanlıkta muhafaza edildi. MTT testi için, 96

kuyucuklu kültür kaplarında olan hücrelere, 20 µl MTT çözeltisi eklendi. Daha sonra 37°C’de 4 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl DMSO eklendi. 5 dakika inkübe edildi sonrasında spektrofotometrede 570-640 nm'de absorbands değeri okundu.

3.10. Taşıyıcı Sistemlerin Hemolitik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Hemoliz çalışması Wang ve arkadaşlarının çalışmasında belirtildiği şekilde yapılmıştır. Eritrositler üç kez yıkandıktan sonra EDTA’lı tüpte % 0,9’luk sodyum klorürde süspansedilerek (pH 7.4) kan solüsyonu içinde örnek 1 saat süreyle 37 °C’de inkübe edildi. Sürenin sonunda örnekler 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı 540 nm’de spektrofotometrede okundu. Negatif kontrol olarak sodyum klorür, pozitif kontrol olarak da saf su kullanıldı (J. Wang, He, ve ark., 2013; Chen ve ark., 2017).

Hemoliz oranı aşağıda verilen denkleme göre hesaplandı:

$$R = \frac{(A-C1)}{(C2-C1)} \times 100 (\%)$$

R: Hemoliz oranı

A: Örneğin absorbandsı

C1: Negatif kontrolün absorbandsı

C2: Pozitif kontrolün absorbandsı

4. BULGULAR

4.1. Genetik Materyalin Eldesi ve Karakterizasyonu

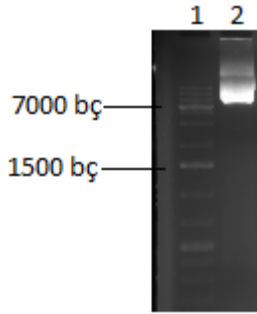
Çalışmamızda LV-RFP (Addgene #plazmit 26001) kullanıldı. *Escherichia coli* bakteri hücresi içinde bulunan LV-RFP plazmit DNA'sının izolasyonu Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. pDNA'lar, plazmit DNA'nın saflığının, konsantrasyonunun ve elektroforetik hareketinin belirlenmesi ile karakterize edildi.

4.1.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen pDNA'ların saflık ve konsantrasyonları Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Konsantrasyonları 1.78-2 µg/µl, saflıkları 1.8-2.0 aralığında bulundu.

4.1.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi

İzole edilen LV-RFP pDNA'larının elektroforetik hareketi Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı şekilde belirlendi.



Şekil 4.1. LV-RFP pDNA'nın agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

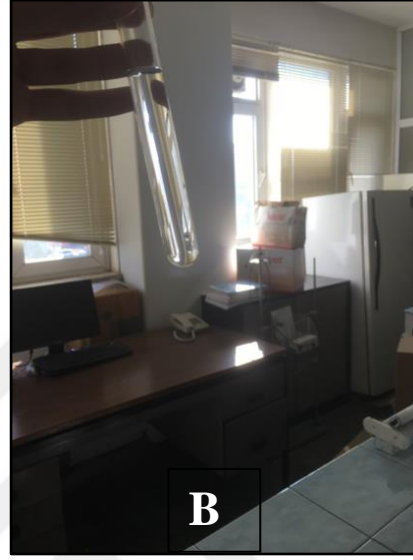
Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder, Thermo)

Örnek 2: LV-RFP pDNA (7539 bç)

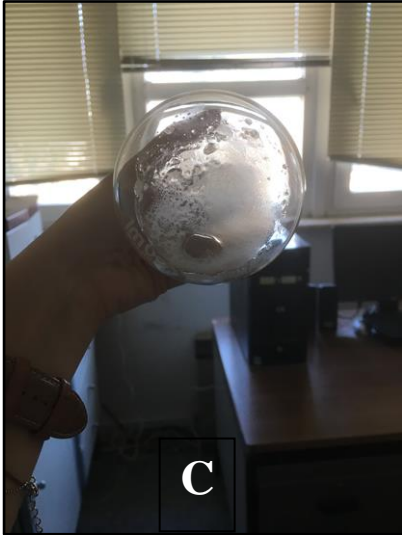
4.2. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

pDNA'nın serumdaki nükleazlara karşı stabil kalmasını sağlayarak meme kanseri hücrelerine başarılı bir şekilde aktarması için Bölüm 3.4.1 ve 3.4.2'de anlatıldığı şekilde nanotaşıyıcı sistemler hazırlandı. Organik faz olarak metanol ve kloroform kullanılan formülasyonların evaporatöre koyulmadan önceki fotoğrafı Şekil 4.2' de görülmektedir. Organik faz uçurulduktan sonra çözücüsü metanol ve kloroform olan formülasyonlara

ait lipid film fotoğrafı Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Hidrate edilen formülasyonlara ait fotoğraf Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Organik çözücüsü metanol (A) ve kloroform (B) olan formülasyonların evaporatöre koyulmadan önceki fotoğrafları

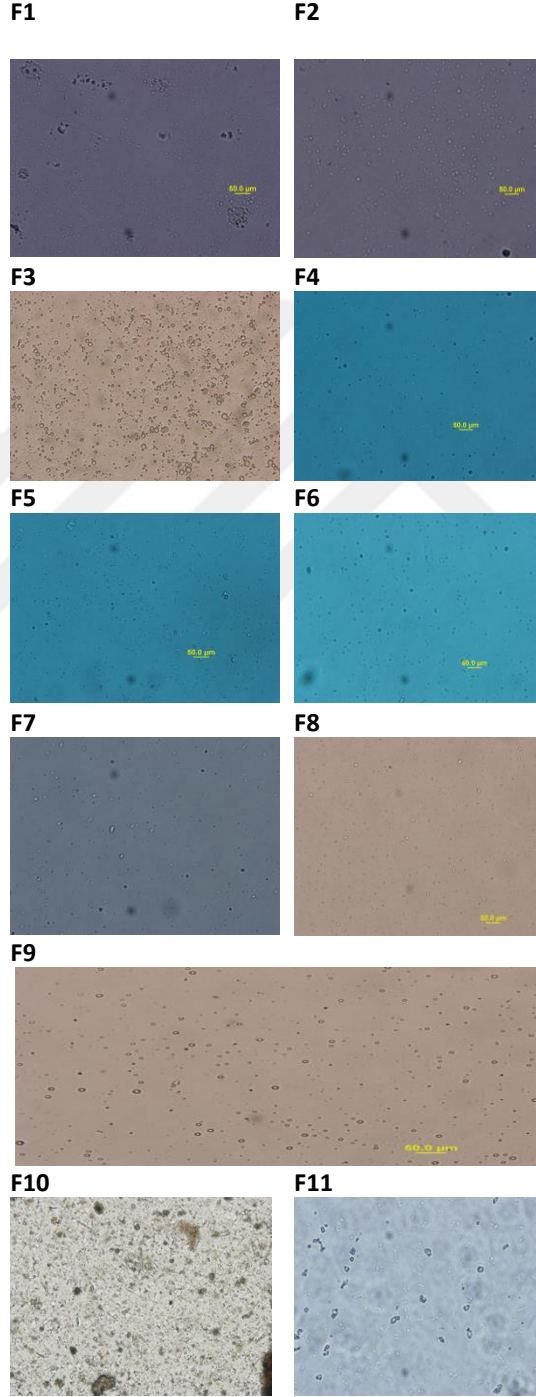


Şekil 4.3. Çözücüsü metanol (C) ve kloroform (D) olan ince lipid filmi fotoğrafı



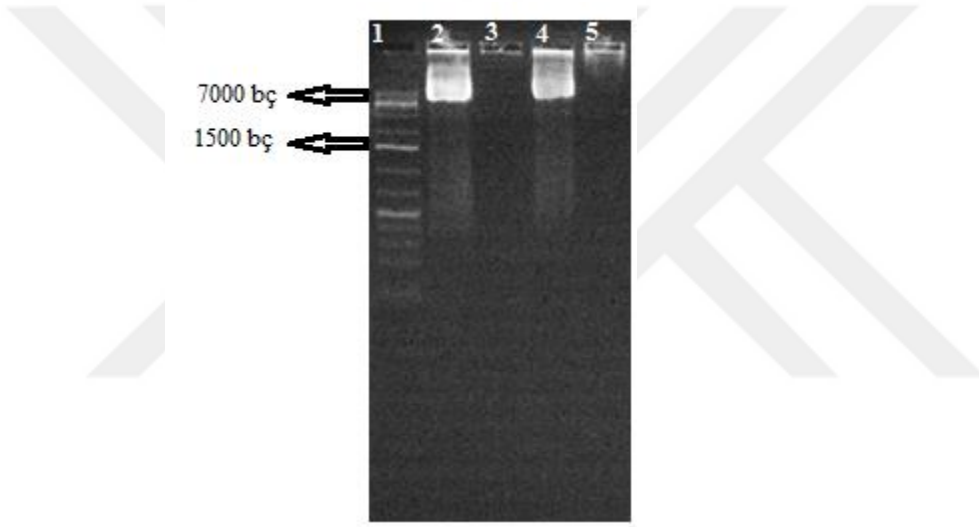
Şekil 4.4. Hidrate edilen formülasyonlara ait fotoğraf

Şekil 4.5. Ön formülasyon çalışmasında hazırlanan niozomların mikroskop görüntüsü (40X)



4.2.1. Niopleks ve Polipleks Kompleks Oluşumlarının Değerlendirilmesi

İlk olarak dallanmış polietilenimin ile LV-RFP plazmit DNA'sı ile kompleksleştirilerek polipleks hazırlandı. Ardından bu poliplekslerle niozomlar bir araya getirilerek niopleksler hazırlandı. Bu nanotaşınımı sistem ile pDNA'nın kompleks oluşturup oluşturmadığı agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Nioplekslerin pDNA'nın elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşturduğu gösterildi. Çıplak plazmit DNA ile karşılaştırıldığında komplekslerin kuyucukta kaldığı ve jel üzerinde hareket etmediği görüldü.



Şekil 4.6. pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA)

Örnek 3: LV-RFP pDNA :BPEI 1:1 (h:h)

Örnek 4: LV-RFP pDNA: Niozom 1:1 (h:h)

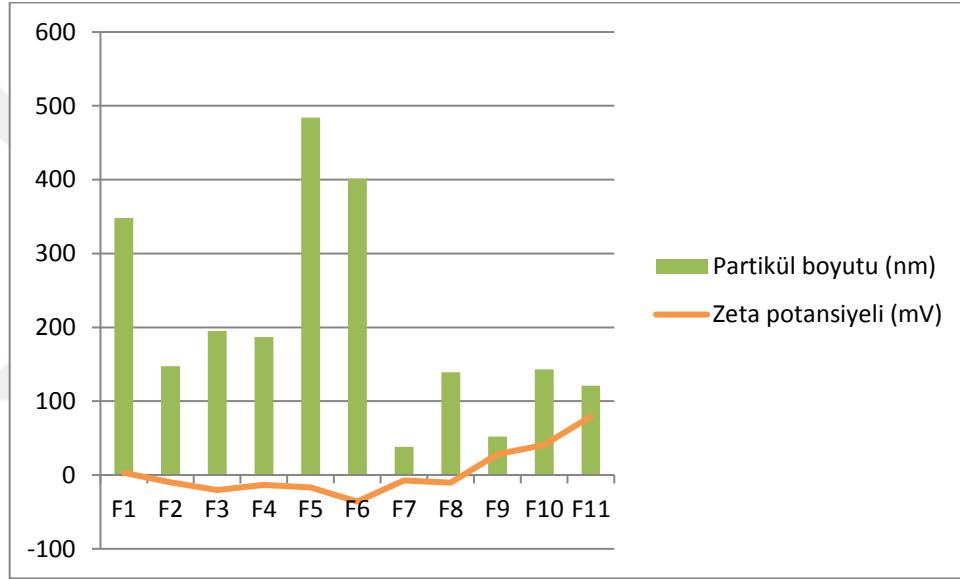
Örnek 5: LV-RFP pDNA:BPEI:Niozom 1:1 (h:h)

4.3. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Taşıyıcı sistemin karakterizasyonu için partikül boyutu, yükü ve polidispersite indeksi ölçüldü.

Nanotaşıyıcı Sistemin Boyut, Yük ve Polidispersite İndeksinin Ölçümü

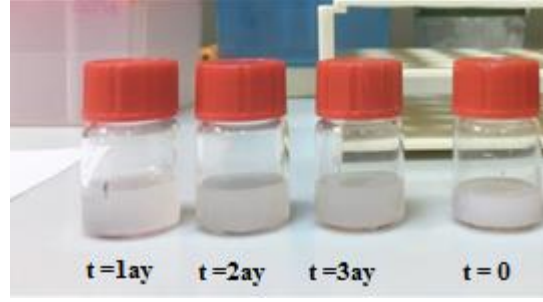
Partikül boyutu, yükü ve polidispersite indeksi değerleri Bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde ölçülen nanotaşıyıcı sistemin partikül boyutları, yükü ve polidispersite indeksi Şekil 4.7' de gösterildiği şekildedir.



Şekil 4.7. Nanotaşıyıcı sistemlerin boyut ve yük değerleri

4.4. Taşıyıcı Sistemlerin Oda Sıcaklığındaki (25 °C) Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

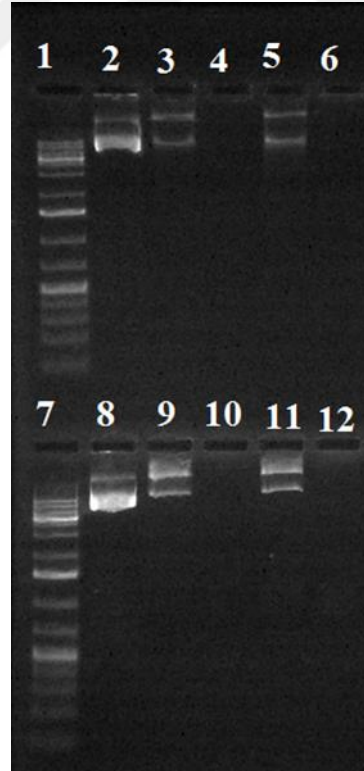
Hazırlanan niozom formülasyonlarından F9 niozom formülasyonunun 3 ay boyunca oda sıcaklığında fiziksel stabilitesini koruduğu diğerlerinin korumadığı gözlenmiştir. F9 niozom formülasyonunun 3 ay boyunca oda sıcaklığındaki fiziksel stabilitesini gösteren fotoğraf Şekil 4.8' de görülmektedir.



Şekil 4.8. 3 ay oda sıcaklığında saklanan niozom formülasyonlarının fotoğrafı

4.5. Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabiliteilerinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyon çalışmalarından sonra uygun bulunan niopolipekslerin serum stabilitesi değerlendirildi. Serum stabilite değerlendirmesi Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde yapıldı. Serum (FBS) ile 30 dk ve 4sa sonundaki inkübasyon sonucunda hazırlanmış olan nanotaşıyıcı sistemin stabil olduğu tespit edildi. Polipekslerin serum içerisindeki stabiliteileri Şekil 4.9' da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Poliplekslerin 4sa (üstteki) ve 30 dk (alttaki) boyunca serum içerisindeki stabilitelerini gösteren agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA) (serumsuz)

Örnek 3: plazmit DNA (LV-RFP pDNA)%10 FBS içeren DMEM içinde (4 sa sonra)

Örnek 4: LV-RFP pDNA :BPEI 1:1 (h:h) (4 sa sonra)

Örnek 5: LV-RFP pDNA: Niozom 1:1 (h:h) (4 sa sonra)

Örnek 6: LV-RFP pDNA:BPEI:Niozom 1:1 (h:h) (4 sa sonra)

Örnek 7: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 8: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA) (serumsuz)

Örnek 9: plazmit DNA (LV-RFP pDNA)%10 FBS içeren DMEM içinde (30 dk sonra)

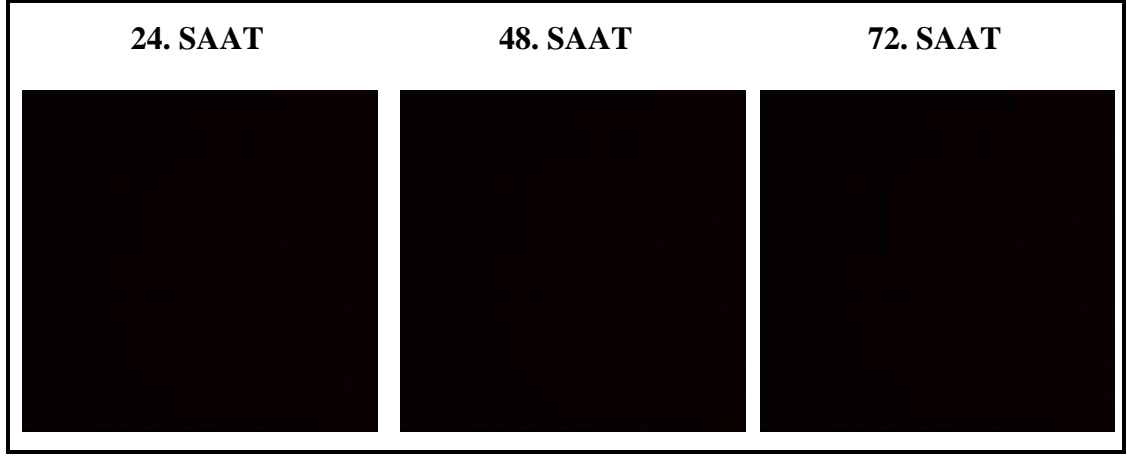
Örnek 10: LV-RFP pDNA :BPEI 1:1 (h:h) (30 dk sonra)

Örnek 11: LV-RFP pDNA:Niozom 1:1 (h:h) (30 dk sonra)

Örnek 12: LV-RFP pDNA:BPEI:Niozom 1:1 (h:h) (30 dk sonra)

4.6. Nanotaşıyıcı Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

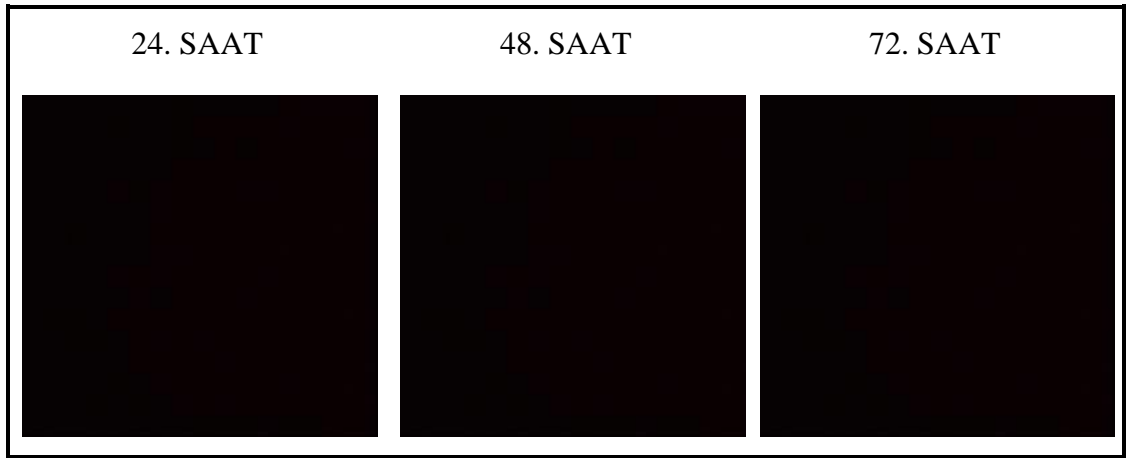
Niozom ile hazırlanan nanotaşıyıcı sistemin pDNA kompleksinin MCF-7 hücrelerine transfeksiyonu başarıyla gerçekleştirildi. LV-RFP plazmit DNA'sı ile hazırlanan nioplekslerin hücre içerisine başarılı bir şekilde aktarılıp aktarılmadığı ve gen ekspresyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği, floresan mikroskop altında 24. ve 48. saatlerde kırmızı floresan proteinin ekspresyonuna bakılarak değerlendirildi. Kontrol grubu olarak LV-RFP plazmit DNA'sı, polimerik taşıyıcılar ile kompleksleştirilmeden, çıplak olarak transfekte edildi. Çıplak plazmit DNA kontrol grubunda 24. ve 48. saatlerde transfeksiyon gerçekleşmediği; niopleksler ile transfeksiyonun gerçekleştiği ve kırmızı floresan proteinin ekspresyonunun 48. saatte arttığı gözlemlendi. Kontrol grubunun floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.10 da gösterilmiştir. Transfeksiyon çalışmalarının floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Çıplak LV-RFP pDNA ile transfekte edilen MCF-7 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları (10X)



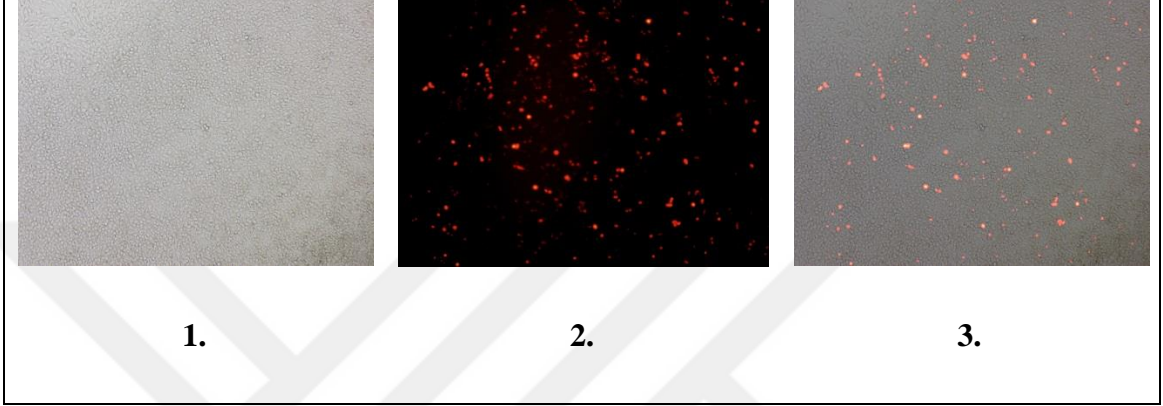
Şekil 4.11. Niozom ve LV-RFP pDNA'sı ile hazırlanmış niopolileksler ile transfekte edilen MCF-7 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları (10X)



Şekil 4.12. Niozom ve LV-RFP pDNA'sı ile hazırlanmış niopolileksler ile transfekte edilen MCF-12A hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları (10X)

4.6.1. pDNA ile Hazırlanan Nioplekslerin Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Niozomlarla pDNA'sı kullanılarak hazırlanan nioplekslerin transfeksiyon etkinliği değerlendirildi. Şekil 4.13 'te gösterildi.

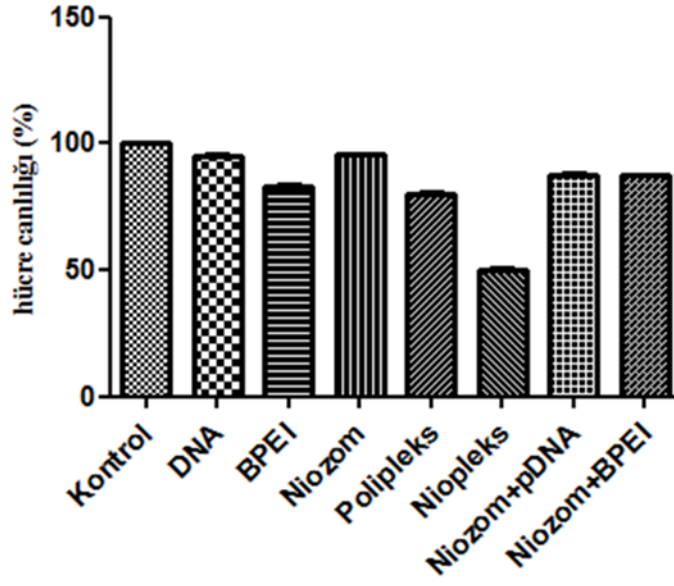


Şekil 4.13. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde transfeksiyon verimliliği

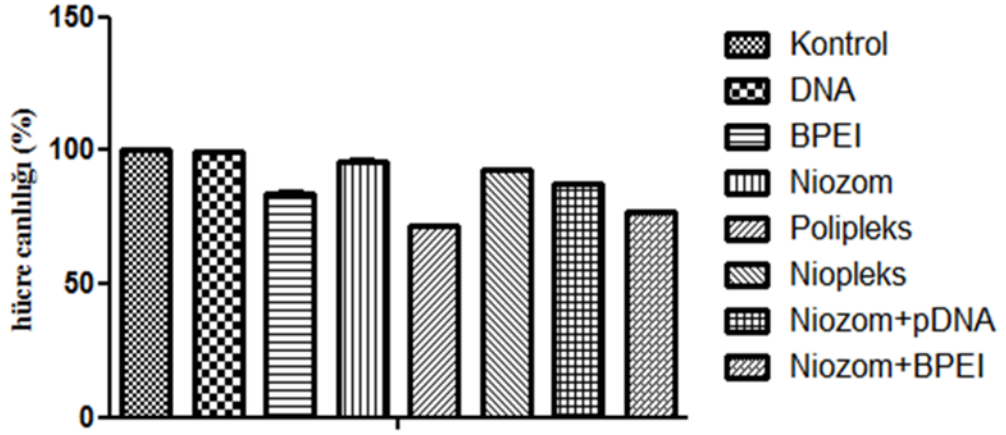
- 1: Normal mikroskop ışığı altındaki görüntü
- 2: Floresan mikroskop ışığı altındaki görüntü
- 3: Şelil 1 ve 2'nin karşılaştırılmış halinin görüntüsü

4.7. Nanotaşıyıcı Sisteminin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyonu gerçekleştirmiş olan nanotaşıyıcı sistemin sitotoksitesinin değerlendirilmesi, hücre proliferasyonuna (sitotoksite) etki edip etmediğini göstermek için MTT deneyi yapıldı. Yapılan MTT deneyi sonucunda göre geliştirmiş olduğumuz nanaotaşıyıcı sistemin MCF-7 meme kanseri hücrelerine toksik olduğu gözlemlendi. Komplekslerin MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.14' te gösterildi. Şekil 4.15'te sağlıklı insan meme hücresi olan MCF-12A hücre proliferasyonuna etkisi gösterildi.



Şekil 4.14. Polipekslerin MCF-7 hücre canlılığına etkisi ($p < 0.001$, $n = 6$)



Şekil 4.15. Polipekslerin MCF-12A hücre canlılığına etkisi ($p < 0.001$, $n = 6$)

4.8. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.10' da anlatıldığı şekilde yapılan hemoliz deneyine ait fotoğraf Şekil 4.16' da verilmiştir. Yine aynı bölümde belirtilen hesaplamalara göre hazırlanmış olduğumuz nioplekslerin hemoliz değeri %5'ün üzerinde olduğu için intravenöz yolla uygulanmasının mümkün olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.16. Hemolitik aktivite sonuçları

(1: DNA, 2: BPEI, 3: Niozom, 4: Polipleks, 5: DNA+niozom, 6: BEPI+Niozom, 7: Niopleks 8: Negatif kontrol, 9: Pozitif kontrol)

4.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi için t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Kanserde tedavi yaklaşımlarına bakıldığında kemoterapi, radyoterapi, cerrahi işlem ve immünoterapi ile karşılaşılmaktadır. Kemoterapi artık pek çok kanser türünde tek tedavi seçeneği olmaktan çıkmıştır. Kanser tedavisinde, kemoterapi oluşturduğu yan etkiler nedeniyle kombinasyon tedavisi uygulanması zorunlu hale gelmiştir. Kombinasyon onkoterapisi, benzer bir terapötik veya farklı terapötik kategorilere ait kemoterapi ve gen ya da antikanser ajanların bir kombinasyonunu içerebilir. Bunların yanında tıp alanındaki gelişmelerle kanser tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olan gen tedavisi kavramı ortaya çıkmaya başlamıştır. Gen tedavisinde kansere yönelik tedavi yaklaşımı işlevi bozuk, eksik veya fazla olan genlerin fonksiyonlarının düzeltilmesini içermektedir (Tani, 2016). Başarılı ve etkin bir gen tedavisinin yapılabilmesi için genlerin hücre içerisine taşıyıcı sistemler yardımıyla aktarılması gerekmektedir. Günümüzde viral olmayan gen taşıyıcı sistemler güvenli nükleik asit taşıyan sistemler olarak kullanım alanı bulmaktadır. Lipitler ve katyonik polimerler gen taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. BPEI kaynaklı polimerik taşıyıcı sistemler üçlü negatif hücre hattı olan 4T1 fare meme kanseri hücreleri için gen taşıyıcı sistem olarak geliştirilmiştir (Öner, 2018). Gen tedavisinin başarısı, taşımaya amaçladığımız gen ürününün hedef dokuya ya da hücreye en etkili ve güvenli bir şekilde aktarımı için uygun bir taşıyıcının geliştirilmesine bağlıdır. Genler viral veya viral olmayan taşıyıcı sistemler ile hücre içerisine aktarılabilir. Onkoloji tedavilerinde farmakokinetik, fizikokimyasal ve biyodağılım gibi karşılaşılan ana sorunları çözmek için misel, dendrimer, lipozom, nanopartikül gibi değişik nanoformülasyon stratejileri geliştirilmiştir (Jain ve ark., 2015; Z. Yang ve ark., 2015; Olusanya ve ark., 2018; Rawal ve Patel, 2019).

Gen tedavisi günümüzde, kanser tedavisinde güçlü bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Gen tedavisiyle kanserdeki çoklu ilaç direnci ve aynı anda ilgili genlerin ekspresyonunu spesifik susturmak ve kemoterapötik aktiviteyi artırarak tedavi sağlanabilir. Ayrıca antikanser ilaçların terapötik etkinliği, kombine tedaviler tarafından indüklenerek sinerjik etkiler ile önemli ölçüde geliştirilebilir. Bunun için de özel olarak tasarlanmış nanotaşıyıcılar gerekmektedir. Veziküler sistemlere bakıldığında gen taşıyıcı

sistem olarak kanserde lipozomlar kullanılırken retinal uygulamalarda niozomlarla ilgili çalışmalar dikkatimizi çekmektedir (Ojeda ve ark., 2016; Pinnapireddy ve ark., 2017).

Tez çalışmamızda, kemoterapiden farklı bir tedavi yaklaşımıyla, insan meme kanseri hücre hattına gen aktarımı yapabilecek ve geliştirildiği takdirde gen tedavisi tıbbi ürünü olarak kullanılacak nano taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla katyonik polimerler ve non iyonik sürfaktanlar ile niozomlar hazırlanarak MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına gen aktarım etkinlikleri değerlendirildi.

Niozom hazırlama yöntemlerinde temel kural sürfaktan/lipit karışımının yüksek ısıda hidrate edilmesidir. Sonrasında ise veziküllerin boyutlarının kolloidal dispersiyon elde etmek amacıyla küçültülmesidir. Hazırlama yöntemlerinin içinde en çok tercih edilen bizim de çalışmamızda kullanmış olduğumuz ince film hidrasyon tekniğidir (Yeo ve ark., 2018; Yeo ve ark., 2019). Taşıyıcı sistemlerin boyutu, yapısı, yükü ve polidispersite indeksi değerleri belirlenerek karakterizasyonları yapıldı. Yük ve boyutunun ölçülmesi taşıyıcı sistemin karakterizasyonu açısından önemli parametrelerdir. Bu parametreler taşıyıcı sistemin hücre yüzeyiyle etkileşiminde büyük önem taşımaktadır. Kullanılan cihazın çalışma prensibi, dinamik ışık saçılımı kullanılarak seyreltik çözeltilerdeki parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ölçülmesine dayanır. Işığın şiddeti parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Boyut azaldıkça saçılma açısı logaritmik olarak artar. Taşınan genetik materyalin hücre içine girmesini boyutun küçük olması kolaylaştırır. Zeta potansiyel parçacık ile çözelti arasında oluşur. Parçacıklar itme ve çekme kuvveti oluşturur. Bu kuvvet, parçacığın zeta potansiyel değerine bağlıdır. Zeta potansiyel ölçümü Doppler prensibi esasına dayanır. Zeta potansiyel değeri, içinde bulunduğu çözeltinin pH değeri ile değişir. Genetik materyalin hücre içine alınması boyutun büyük olması ve negatif yüklü olması gibi özellikleri nedeniyle çok sınırlıdır (Y. Yang ve ark., 2016; Taschauer ve ark., 2016). Hazırladığımız niozomların boyutu ortalama 51.84 nm ve yükü +28.3 mV bulundu. Niozomların katyonik olması DNA ile kondenzasyonunu ve fiziksel stabilitesini sağlamaktadır. Vezikül yapıdaki taşıyıcı sistemlerin boyutuna bakıldığında nano boyutta sistemler hazırlandığı gözlemlendi.

Karakterizasyonu yapılan taşıyıcı sistemlerin, 3 ay boyunca fiziksel stabilitesi değerlendirilerek F9 formülasyonu faz ayrımı olmayan en stabil niozom formülasyonu olarak seçildi. Daha sonra serum stabilitesi, sitotoksitesi, hemolitik aktivitesi ve transfeksiyon etkinliği değerlendirildi. Niozomların sağlıklı hücelere zarar verip vermediğinin kontrol edilmesi için sağlık insan meme hücresi olan MCF-12A hücre hattı kullanıldı. Taşıyıcı sistemlerin başarısının ve etkinliğinin değerlendirilmesi için üzerinde kırmızı floresan protein geni bulunan LV- RFP plazmit DNA kullanılmasıyla yapıldı. Çalışmalar sırasında kullanılacak pDNA gerekli miktarda çoğaltıldı ve ardından kullanım için uygunluğunu değerlendirmek için saflık tayini yapıldı. DNA'nın saflığını gösteren A260/280 oranı 1.8-2 arasındadır. İzole ettiğimiz pDNA'ların saflığı bu aralıkta bulundu. Restriksiyon enzimi kesimi yapılarak pDNA doğrulandı. Ardından örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. pDNA bantlarının molekül ağırlıklarına uygun yerde gözlendi (Chiang ve ark., 2005) Film hidrasyon yöntemiyle hazırlanan niopolilekslerin katyonikliğini sağlamak için BPEI kullanıldı (Priyam ve ark., 2018).

Polimer/pDNA kompleksleri hazırlanırken amin/fosfat (N/P) oranı veya ağırlık:ağırlık (a:a) oranı kullanılır. Bu tez çalışmasında niozom: pDNA niopleks kompleksleri ağırlık:ağırlık oranı kullanılarak hazırlandı. Hücre membranı negatif yüke sahip olduğu için hazırlanan niozom taşıyıcı sistemin yüzey yükünün pozitif olması sayesinde aktarılan genetik materyalin hücre içine girmesini kolaylaştırır (Mokhtarzadeh ve ark., 2015)

Niozomların kondenzasyon yeteneği agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Katyonik bir polimer olan polietilenimin ile hazırlanan taşıyıcı sistemler, negatif yüklü pDNA ile elektrostatik olarak etkileşmiştir. (Xin ve ark., 2017).

pDNA çıplak şekilde hücreye aktarıldığında nükleazlar tarafından parçalandığı için stabilitesini koruyamamaktadır. Hazırladığımız veziküler taşıyıcı sistemler, genetik materyali nükleazlara karşı koruyarak stabil kalmalarını sağlamaktadır.

Taşıyıcı sistemlerin fiziksel stabiliteleri ve serum içindeki stabiliteleri değerlendirildi (Y. Zhang ve ark., 2018). F9 niozomlarının oda sıcaklığında 3 ay boyunca saklandığında fiziksel satbilitesini koruduğu gözlendi. Serum içerisindeki stabilitesi

değerlendirildiğinde 30 dakika ve 4 saat inkübasyon sonrasında niopolilekslerin stabil olduğu gözlemlendi.

Transfeksiyon çalışmalarını değerlendirmek için, gen aktarımını floresan mikroskop ile gözlemleyebileceğimiz, LV-RFP pDNA kullanıldı. Transfeksiyon etkinliği değerlendirildiğinde F9 niozom formülasyonu ile MCF-7 meme kanseri hücrelerine başarılı şekilde transfeksiyonun gerçekleştiği, sağlıklı meme hücresi olan MCF-12A 'ya transfeksiyonun gerçekleşmediği gözlemlendi. Hücrelerin farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları transfeksiyon sonuçlarını etkilemiştir (Audouy ve ark., 2002). Niozom olarak hazırlanan taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğini; çözündüğü ortamın kimyasal durumu, pH, sıcaklık ve viskozite gibi parametreler etkilemektedir (Puras ve ark., 2015). Tween 80 hücre içi nüfuz etme kabiliyetini artırır. Ayrıca bu yüzey aktif madde agregatların oluşumunu önler. Hidrofil lipofil denge (HLB) elde edilmesi için yüzey aktif maddeler olarak polisorbitat ve sorbitan monooleat kullanılmıştır. Bu sayede, daha stabil yapı elde edilmiş olur (Severino ve ark., 2015).

Hücre proliferasyon hızı özellikle kanser gibi hastalıklarda, tümör biyolojisinin temel parametreleri hakkında fikir yürütülmesi için büyük önem taşır. Bu çalışmada hazırlanan niopleks formülasyonlarının in vitro sitotoksitesilerinin değerlendirilmesi için MTT testi yapıldı. Bu test, hücre canlılığını ve proliferasyonunu değerlendirmek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde esas olan, canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmektir. Canlı hücreler MTT'yi renkli formazan kristallerine dönüştürür. Ortaya çıkan formazon kristallerinin miktarı, 570-630 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Çoğalan hücreler proliferasyon gösteren hücrelerden daha çok aktivite gösterirler. Dolayısıyla bu yöntem hücre canlılığını ve sitotoksiteyi ölçmenin yanında bir de hücre proliferasyon oranını hakkında da bilgi verir. Suda çözünen MTT, tuz çözeltileri ile hazırlandığında sarımsı bir çözelti halini alır. Tetrazolyum halkasının parçalanmasıyla mor renkli formazana oluşur. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileriyle gerçekleşir. Oluşan formazan çözücüde çözünür. Ortaya çıkan kolorimetrik reaksiyon spektrofotometrik olarak okunur ve miktar tayini yapılır. PEI transfeksiyonu sırasındaki membran depolarizasyonu yoluyla bozulmuş mitokondriyal fonksiyona neden olabileceği ve yüksek sitotoksiteye neden olabileceği bildirmiştir. Bu toksisitenin

hazırlamış olduğumuz niozomlarla iyileştirildiği gözlemlendi (Grandinetti ve ark., 2011). Sağlıklı meme hücrelerine F9 niozom formülasyonu toksik bulunmamıştır.

Hazırlamış olduğumuz niopolilekslerin intravenöz uygulama ile uygulanıp uygulanmayacağını değerlendirmek için yapmış olduğumuz hemolitik aktivite deney sonuçlarına göre F9 niozom formülasyonumuzun hemoliz yaptığı bulunmuştur. Bu nedenle başka bir uygulama yolu ile verilebileceği düşünülmüştür (Shehata ve ark., 2016). Niozom hazırlarken kullanmış olduğumuz Span 80 ve Tween 80 non iyonik sürfaktanlardan yola çıkarak hazırlamış olduğumuz taşıyıcı sistem oral uygulamalar için uygun olabilir. (Paul ve ark., 2013; Khani ve ark., 2016; Garcia ve ark., 2017; Golmohammadzadeh ve ark., 2017; Koo ve ark., 2019). İlaç ve gen taşıyıcı sistem olarak kullanılan niozomlar çoğunlukla oküler ve transdermal olarak uygulanmaktadır (Manosroi ve ark., 2010; Manosroi ve ark., 2011; Puras ve ark., 2014; Puras ve ark., 2015; Qin ve ark., 2018).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Meme kanseri henüz hedefe yönelik tedavi seçeneği bulunmadığından günümüzde kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Son yıllarda kanserde gen tedavisi yaklaşımları ortaya çıkmaya başlamıştır. Genlerin etkin bir şekilde hücreye aktarılabilmesi için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Veziküler yapıdaki gen taşıyıcı sistemler nükleik asitlerin başarılı bir şekilde hücre içine taşınmasında kullanılan viral olmayan taşıyıcılardır. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin viral gen taşıyıcı sistemlere göre üstünlükleri bulunmasının yanı sıra en büyük sorunları başarılı ve etkin taşıyıcı sistemin optimum bir şekilde hazırlanmasıdır. Bu tez çalışmasında, meme kanserinde gen tedavisi tıbbi ürünü olarak kullanılabilecek yeni bir nanotaşıyıcı sistem geliştirilmiştir.

Belirlenen hedefler doğrultusunda niozom yapısında nano boyutta gen taşıyıcı sistemler hazırlanarak, bu taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonlarının yapılmasının ardından hücreye gen aktarım etkinlikleri ve sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Niozom gen taşıyıcı sistemlerle MCF-7 kanser hücresine transfeksiyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilirken niozomların sağlıklı meme hücrelerine gen aktarımı yapmadığı gözlemlendi. Geliştirmiş olduğumuz niozom formülasyonunun kanser hücrelerine sitotoksik etkisi bulunurken sağlıklı hücrelere toksisitesi gözlenmemiştir. Hemolitik aktivitesi görüldüğü için başka uygulama yollarının değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Geliştirmiş olduğumuz nano taşıyıcı sistem in-vivo, pre-klinik çalışmalar ve klinik çalışmalar ile desteklendiği takdirde meme kanseri gen tedavisi tıbbi ürünü olarak kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

Ahmad, M. Z., Mohammed, A. A., & Mokhtar Ibrahim, M. Technology overview and drug delivery application of proniosome. *Pharmaceutical development and technology*. 2017; 22 (3): 302-311.

Al-Dosari, M. S., & Gao, X. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*. 2009; 11 (4): 671-681.

Aslakson, C. J., & Miller, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer research*. 1992; 52 (6): 1399-1405.

Aslanidi, G. V., Rivers, A. E., Ortiz, L., Song, L., Ling, C., Govindasamy, L., . . . Srivastava, A. Optimization of the capsid of recombinant adeno-associated virus 2 (aav2) vectors: The final threshold? *PloS one*. 2013; 8 (3): e59142.

Audouy, S. A., de Leij, L. F., Hoekstra, D., & Molema, G. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharmaceutical research*. 2002; 19 (11): 1599-1605.

Azeem, A., Anwer, M. K., & Talegaonkar, S. Niosomes in sustained and targeted drug delivery: Some recent advances. *Journal of drug targeting*. 2009; 17 (9): 671-689.

Blau, H. M., & Springer, M. L. Gene therapy--a novel form of drug delivery. *The New England journal of medicine*. 1995; 333 (18): 1204-1207.

Bottai, G., Truffi, M., Corsi, F., & Santarpia, L. Progress in nonviral gene therapy for breast cancer and what comes next? *Expert opinion on biological therapy*. 2017; 17 (5): 595-611.

Brenner, M. K., Gottschalk, S., Leen, A. M., & Vera, J. F. Is cancer gene therapy an empty suit? *The Lancet. Oncology*. 2013; 14 (11): e447-e456.

Burke, E. E., Kodumudi, K., Ramamoorthi, G., & Czerniecki, B. J. Vaccine therapies for breast cancer. *Surgical oncology clinics of North America*. 2019; 28 (3): 353-367.

Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In vitro*. 1978; 14 (11): 911-915.

Cesur B., Demir Dora D., Biyolojik olmayan kompleks ilaçlar. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2019; 76(2): 221-228.

Chen, C., Yu, Y., Wang, X., Shi, P., Wang, Y., & Wang, P. Manipulation of pH-sensitive interactions between podophyllotoxin-chitosan for enhanced controlled drug release. *International journal of biological macromolecules*. 2017; 95: 451-461.

Chiang, C. L., Sung, C. S., Wu, T. F., Chen, C. Y., & Hsu, C. Y. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2005; 822 (1-2): 54-60.

David, R. M., & Doherty, A. T. Viral vectors: The road to reducing genotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2017; 155 (2): 315-325.

Englert, C., Tauhardt, L., Hartlieb, M., Kempe, K., Gottschaldt, M., & Schubert, U. S. Linear poly(ethylene imine)-based hydrogels for effective binding and release of DNA. *Biomacromolecules*. 2014; 15 (4): 1124-1131.

Fernandes, J. C., Qiu, X., Winnik, F. M., Benderdour, M., Zhang, X., Dai, K., & Shi, Q. Linear polyethylenimine produced by partial acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) for DNA and sirna delivery in vitro. *International journal of nanomedicine*. 2013; 8: 4091-4102.

Fonseca de Jesus, V. H., Guedes Camandaroba, M. P., Spina Donadio, M. D., Cabral, A., Pimentel Muniz, T., de Moura Leite, L., . . . Coimbra, F. J. F. Clinico-pathological features and survival of patients with malignant exocrine pancreatic neoplasms: The ac camargo cancer center experience. *Journal of surgical oncology*. 2019; 119 (1): 71-78.

Garcia, M. T. J., de Paula Freitas, C., Graciano, T. B., Coutinho, T. S., Cressoni, C. B., de Lima Pereira, S. A., & Shimano, M. M. Chitosan-based mucoadhesive gel for oral mucosal toluidine blue o delivery: The influence of a non-ionic surfactant. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. 2017; 20: 48-54.

Gardlik, R., Palffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J., & Celec, P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2005; 11 (4): RA110-121.

Ge, X., Wei, M., He, S., & Yuan, W. E. Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. *Pharmaceutics*. 2019; 11 (2).

Geusens, B., Strobbe, T., Bracke, S., Dynoodt, P., Sanders, N., Van Gele, M., & Lambert, J. Lipid-mediated gene delivery to the skin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2011; 43 (4): 199-211.

Golmohammadzadeh, S., Farhadian, N., Biriace, A., Dehghani, F., & Khameneh, B. Preparation, characterization and in vitro evaluation of microemulsion of raloxifene hydrochloride. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017; 43 (10): 1619-1625.

Grandinetti, G., Ingle, N. P., & Reineke, T. M. Interaction of poly(ethylenimine)-DNA polyplexes with mitochondria: Implications for a mechanism of cytotoxicity. *Molecular pharmaceutics*. 2011; 8 (5): 1709-1719.

Gu, G., Dustin, D., & Fuqua, S. A. Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment. *Current opinion in pharmacology*. 2016; 31: 97-103.

Handjani-Vila, R. M., Ribier, A., Rondot, B., & Vanlerberghie, G. Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products. *International journal of cosmetic science*. 1979; 1 (5): 303-314.

Jain, V., Jain, S., & Mahajan, S. C. Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment. *Current drug delivery*. 2015; 12 (2): 177-191.

- Khani, S., Keyhanfar, F., & Amani, A. Design and evaluation of oral nanoemulsion drug delivery system of mebudipine. *Drug delivery*. 2016; 23 (6): 2035-2043.
- Koo, J. S., Lee, S. Y., Azad, M. O. K., Kim, M., Hwang, S. J., Nam, S., . . . Cho, H. J. Development of iron(ii) sulfate nanoparticles produced by hot-melt extrusion and their therapeutic potentials for colon cancer. *International journal of pharmaceutics*. 2019; 558: 388-395.
- Kurebayashi, J. Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer*. 2001; 8 (1): 45-51.
- Luo, D., & Saltzman, W. M. Synthetic DNA delivery systems. *Nature biotechnology*. 2000; 18 (1): 33-37.
- Maharjan, S., Park, B. K., Lee, S. I., Lim, Y., Lee, K., & Kwon, H. J. Gomisin g inhibits the growth of triple-negative breast cancer cells by suppressing akt phosphorylation and decreasing cyclin d1. *Biomolecules & therapeutics*. 2018; 26 (3): 322-327.
- Manjila, S. B., Baby, J. N., Bijin, E. N., Constantine, I., Pramod, K., & Valsalakumari, J. Novel gene delivery systems. *International journal of pharmaceutical investigation*. 2013; 3 (1): 1-7.
- Manosroi, J., Khositsuntiwong, N., Manosroi, W., Gotz, F., Werner, R. G., & Manosroi, A. Enhancement of transdermal absorption, gene expression and stability of tyrosinase plasmid (pmel34)-loaded elastic cationic niosomes: Potential application in vitiligo treatment. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010; 99 (8): 3533-3541.
- Manosroi, J., Lohcharoenkal, W., Gotz, F., Werner, R. G., Manosroi, W., & Manosroi, A. Transdermal absorption enhancement of n-terminal tat-gfp fusion protein (tg) loaded in novel low-toxic elastic anionic niosomes. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011; 100 (4): 1525-1534.
- Mokhtarzadeh, A., Parhiz, H., Hashemi, M., Ayatollahi, S., Abnous, K., & Ramezani, M. Targeted gene delivery to mcf-7 cells using peptide-conjugated polyethylenimine. *AAPS PharmSciTech*. 2015; 16 (5): 1025-1032.

Nunes, F. A., & Raper, S. E. Liver-directed gene therapy. *The Medical clinics of North America*. 1996; 80 (5): 1201-1213.

Ojeda, E., Puras, G., Agirre, M., Zarate, J., Grijalvo, S., Eritja, R., . . . Pedraz, J. L. The role of helper lipids in the intracellular disposition and transfection efficiency of niosome formulations for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *International journal of pharmaceutics*. 2016; 503 (1-2): 115-126.

Olusanya, T. O. B., Haj Ahmad, R. R., Ibegbu, D. M., Smith, J. R., & Elkordy, A. A. Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules*. 2018; 23 (4).

Öner F, Meme Kanseri Gen Tedavisinde Nanopartiküler Nükleik Asit Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi. Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2018, Antalya, (Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA)

Pahle, J., & Walther, W. Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. *Expert opinion on biological therapy*. 2016; 16 (4): 443-461.

Panyam, J., & Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*. 2003; 55 (3): 329-347.

Paul, S., Kumar, A., Yedurkar, P., & Sawant, K. Design and development of multiple emulsion for enhancement of oral bioavailability of acyclovir. *Drug development and industrial pharmacy*. 2013; 39 (11): 1809-1817.

Phadungcharoen, N., Plianwong, S., Srivichai, C., Chanthananon, N., Kaosal, W., Pannil, O., . . . Rojanarata, T. Green, fast and cheap paper-based method for estimating equivalence ratio of cationic carriers to DNA in gene delivery formulations. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2018; 115: 204-211.

Pham, H. L., Shaw, P. N., & Davies, N. M. Preparation of immuno-stimulating complexes (iscoms) by ether injection. *International journal of pharmaceutics*. 2006; 310 (1-2): 196-202.

Pinnapireddy, S. R., Duse, L., Strehlow, B., Schafer, J., & Bakowsky, U. Composite liposome-pei/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2017; 158: 93-101.

Priyam, A., Nagar, P., Sharma, A. K., & Kumar, P. Mussel-inspired polydopamine-polyethylenimine conjugated nanoparticles as efficient gene delivery vectors for mammalian cells. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 2018; 161: 403-412.

Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4t1 breast tumor model. *Current protocols in immunology*. 2001; Chapter 20: Unit 20 22.

Puras, G., Martinez-Navarrete, G., Mashal, M., Zarate, J., Agirre, M., Ojeda, E., . . . Pedraz, J. L. Protamine/DNA/niosome ternary nonviral vectors for gene delivery to the retina: The role of protamine. *Molecular pharmaceutics*. 2015; 12 (10): 3658-3671.

Puras, G., Mashal, M., Zarate, J., Agirre, M., Ojeda, E., Grijalvo, S., . . . Pedraz, J. L. A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014; 174: 27-36.

Qin, Y., Tian, Y., Liu, Y., Li, D., Zhang, H., Yang, Y., . . . Gan, L. Hyaluronic acid-modified cationic niosomes for ocular gene delivery: Improving transfection efficiency in retinal pigment epithelium. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2018; 70 (9): 1139-1151.

Rawal, S., & Patel, M. M. Threatening cancer with nanoparticle aided combination oncotherapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2019; 301: 76-109.

Riley, M. K., & Vermerris, W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery-a review. *Nanomaterials (Basel)*. 2017; 7 (5).

Saka, O. M., & Bozkir, A. Formulation and in vitro characterization of pegylated chitosan and polyethylene imine polymers with thrombospondin-i gene bearing pdna. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2012; 100 (4): 984-992.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*: Cold spring harbor laboratory press; 1989, p:

Samson, A. A. S., Park, S., Kim, S. Y., Min, D. H., Jeon, N. L., & Song, J. M. Liposomal co-delivery-based quantitative evaluation of chemosensitivity enhancement in breast cancer stem cells by knockdown of grp78/clu. *Journal of liposome research*. 2019; 29 (1): 44-52.

Severino, P., Szymanski, M., Favaro, M., Azzoni, A. R., Chaud, M. V., Santana, M. H., . . . Souto, E. B. Development and characterization of a cationic lipid nanocarrier as non-viral vector for gene therapy. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2015; 66: 78-82.

Shah, R., Kronekova, Z., Zahoranova, A., Roller, L., Saha, N., Saha, P., & Kronek, J. In vitro study of partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazolines) as materials for biomedical applications. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 2015; 26 (4): 157.

Shan, Q., Wang, Y., Li, J., & Gao, C. Genome editing in rice and wheat using the crispr/cas system. *Nature protocols*. 2014; 9 (10): 2395-2410.

Shehata, T., Kimura, T., Higaki, K., & Ogawara, K. I. In-vivo disposition characteristics of peg niosome and its interaction with serum proteins. *International journal of pharmaceutics*. 2016; 512 (1): 322-328.

Smith, E., & Blomberg, P. [gene therapy - from idea to reality]. *Lakartidningen*. 2017; 114.

Stoff-Khalili, M. A., Dall, P., & Curiel, D. T. Gene therapy for carcinoma of the breast. *Cancer gene therapy*. 2006; 13 (7): 633-647.

Tani, K. Current status of ex vivo gene therapy for hematological disorders: A review of clinical trials in japan around the world. *International journal of hematology*. 2016; 104 (1): 42-72.

Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., . . . Morishita, R. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: Enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene therapy*. 2002; 9 (6): 372-380.

Taschauer, A., Geyer, A., Gehrig, S., Maier, J., Sami, H., & Ogris, M. Up-scaled synthesis and characterization of nonviral gene delivery particles for transient in vitro and in vivo transgene expression. *Human gene therapy methods*. 2016; 27 (3): 87-97.

Thakare, M., Israel, B., Garner, S., Ahmed, H., Elder, D., & Capomacchia, A. Nonionic surfactant structure on the drug release, formulation and physical properties of ethylcellulose microspheres. *Pharmaceutical development and technology*. 2017; 22 (3): 418-425.

Thomas, M., & Klivanov, A. M. Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. *Applied microbiology and biotechnology*. 2003; 62 (1): 27-34.

Torchilin, V. P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*. 2006; 58 (14): 1532-1555.

Vaseghi, G., Rafiee, L., & Javanmard, S. H. Non-viral delivery systems for breast cancer gene therapy. *Current gene therapy*. 2017; 17 (2): 147-153.

Wang, J., He, Y., Maitz, M. F., Collins, B., Xiong, K., Guo, L., . . . Huang, N. A surface-eroding poly(1,3-trimethylene carbonate) coating for fully biodegradable magnesium-based stent applications: Toward better biofunction, biodegradation and biocompatibility. *Acta biomaterialia*. 2013; 9 (10): 8678-8689.

Wang, L., & Pileni, M. P. Encapsulation of zwitterionic au nanocrystals into liposomes by reverse phase evaporation method: Influence of the surface charge. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 2016; 32 (47): 12370-12377.

Wang, W., Li, W., Ma, N., & Steinhoff, G. Non-viral gene delivery methods. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2013; 14 (1): 46-60.

- Wirth, T., Parker, N., & Yla-Herttuala, S. History of gene therapy. *Gene*. 2013; 525 (2): 162-169.
- Wirth, T., & Yla-Herttuala, S. Gene therapy used in cancer treatment. *Biomedicines*. 2014; 2 (2): 149-162.
- Xie, Z., & Zeng, X. DNA/rna-based formulations for treatment of breast cancer. *Expert opinion on drug delivery*. 2017; 14 (12): 1379-1393.
- Xin, Y., Huang, M., Guo, W. W., Huang, Q., Zhang, L. Z., & Jiang, G. Nano-based delivery of rna in cancer therapy. *Molecular cancer*. 2017; 16 (1): 134.
- Yang, Y., Zhao, H., Jia, Y., Guo, Q., Qu, Y., Su, J., . . . Qian, Z. A novel gene delivery composite system based on biodegradable folate-poly (ester amine) polymer and thermosensitive hydrogel for sustained gene release. *Scientific reports*. 2016; 6: 21402.
- Yang, Z., Gao, D., Cao, Z., Zhang, C., Cheng, D., Liu, J., & Shuai, X. Drug and gene co-delivery systems for cancer treatment. *Biomaterials science*. 2015; 3 (7): 1035-1049.
- Yeo, L. K., Chaw, C. S., & Elkordy, A. A. The effects of hydration parameters and co-surfactants on methylene blue-loaded niosomes prepared by the thin film hydration method. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019; 12 (2).
- Yeo, L. K., Olusanya, T. O. B., Chaw, C. S., & Elkordy, A. A. Brief effect of a small hydrophobic drug (cinnarizine) on the physicochemical characterisation of niosomes produced by thin-film hydration and microfluidic methods. *Pharmaceutics*. 2018; 10 (4).
- Young, L. S., Searle, P. F., Onion, D., & Mautner, V. Viral gene therapy strategies: From basic science to clinical application. *The Journal of pathology*. 2006; 208 (2): 299-318.
- Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Sakkas, A., Yarmus, L., Huang, H., Li, Q., . . . Malecki, M. Suicide gene therapy for cancer - current strategies. *Journal of genetic syndromes & gene therapy*. 2013; 4.

Zhang, L., Wang, S., Zhang, M., & Sun, J. Nanocarriers for oral drug delivery. *Journal of drug targeting*. 2013; 21 (6): 515-527.

Zhang, Y., Liu, L., Lin, L., Chen, J., Tian, H., Chen, X., & Maruyama, A. In situ dual-crosslinked nanoparticles for tumor targeting gene delivery. *Acta biomaterialia*. 2018; 65: 349-362.

Zhao, Y., & Huang, L. Lipid nanoparticles for gene delivery. *Advances in genetics*. 2014; 88: 13-36.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Büşra	Uyruğu	T.C.
Soyadı	CESUR	Tel no	05432106411
Doğum tarihi	01.01.1993	e-posta	bcesur@akdeniz.edu.tr busracesur07@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2007-2011
Lisans	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2011-2016
Lisans	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi	2014-2019
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	2016-devam ediyor

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Mesul Müdür Eczacı	Alliance Healthcare Ecza Deposu, ANTALYA	2018 (3ay)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2018-devam ediyor

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil (2017)	66,25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen Kurum	Süre (yıl-yıl)
TYL-2019-4131	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi	2019-2020

Burslar-Ödüller: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) kapsamında 2210 C - Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu

2nd International Health Science And Life Congress (IHSLC 2019) 24-27 Nisan 2019, Burdur, Genç Araştırmacı Kategorisinde Birincilik Ödülü

Yayınlar ve Bildiriler: İVEK BİO - Uluslararası İVEK BİO Kongresi / 26-28 Kasım 2018 / İstanbul, ‘‘Effect of Niosome Preparation Techniques on Physicochemical Properties of Niosome/pDNA Complexes (Nioplexes)’’(poster sunumu)

İVEK BİO - Uluslararası İVEK BİO Kongresi / 26-28 Kasım 2018 / İstanbul, ‘‘Formulation and Evaluation of Nano-Niosomes as Gene Delivery Systems’’(sözlü sunum)

‘‘Biyolojik Olmayan Kompleks İlaçlar’’ Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, cilt 76, sayı 2, 130-139 (derleme) Turk Hij Den Biyol Derg, 2019; 76(2): 221 - 228

2nd International Health Science And Life Congress (IHSLC 2019) /24-27 Nisan 2019/ Burdur, ‘‘Preparation And Cytotoxicity Evaluation Of Nanovesicular Gene Delivery Systems’’(sözlü sunum)

International Multidisciplinary Symposium On Drug Research & Development (DRD 2019) / 1-3 Temmuz 2019/ Malatya ‘‘Polymersomes: Nanocarriers For Gene Delivery To Human Embryonic Kidney Cells’’(sözlü sunum)