

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HELA KANSER HÜCRELERİNİ ETİKETLEMEK AMACI İLE LİPİD
BAZLI NANOPARTİKÜL İLE TRANSFEKSİYONU**

Fatma Ceren KIRMIZITAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş Danışman

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Ocak, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HELA KANSER HÜCRELERİNİ ETİKETLEMEK AMACI İLE LİPİD
BAZLI NANOPARTİKÜL İLE TRANSFEKSİYONU**

Fatma Ceren KIRMIZITAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 05.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK
Hacettepe Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU, Üye
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Hela Kanser Hücrelerini Etiketlemek Amacı İle Lipid Bazlı Nanopartikül İle Transfeksiyonu başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Fatma Ceren KIRMIZITAŞ

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2019-3615 numaralı projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

Bilim kadınlarına,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi süreci boyunca danışmanlığımı üstlenen, bilgi birikimi ve deneyimi ile ufkumu açan ve bana örnek olan, lisans hayatımdan beri bana inanıp beni destekleyen, düştüğümde kaldıran, sevgi dolu kalbi ve hoşgörüsü ile her daim yanımda olan ömrüm boyunca kendime örnek alacağım saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU'na,

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında, yardımını ve ilgisini esirgemeyen, aynı şehirde olmasak bile ihtiyacım olan her an bana destek olan ve hiçbir şekilde desteğini esirgemeyen, araştırma ruhu ve fikirleriyle bana yol gösteren saygıdeğer eş danışman hocam Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK'e,

En zor anlarımdan birisinde bana destek olarak elimden tutan ve tezime çok büyük katkıda bulunan, bilgi birikimi ve desteğini benden esirgemeyen kendi yolumda ilerlerken her daim örnek alacağım saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU'na,

İkinci evim olarak gördüğüm laboratuvarımızda çalıştığım her an boyunca yanımda olan, beraber güldüğüm, ağladığım gece gündüz omuz omuza çalıştığım ve en büyük sorunlarla beraber mücadele edip çözüme kavuşturduğum çok kıymetli çalışma arkadaşlarım Hanife Sevgi VARLI MA, Meryem YILDIRIM, Funda ALKAN ÇANDIR, Volkan YALMAN, Seda GENÇ, Nevra Pelin CESUR, Sinan ÜNAL ve Beyza DÖNMÜŞ'e,

Aynı laboratuvarda çalışmasak da her daim yanımda olan kahkahalarımızla ve ağlama seslerimizle -1'e ses olduğumuz, varlıkları ve desteklerini her zaman yanıbaşımnda hissettiğim bir dakika bile moralimin bozulmasına imkan vermeyen canım arkadaşlarım Fatma Şayan POYRAZ, Emrah BERTAN, Dilsu ÇOLPAN, Gülşah AKBAŞ, İrem METEOĞLU, Cansel KAYA, Kübra TRABZONLU, Sinem KURT, Şener ÇİNTESUN ve Bilal ÖZTÜRK'e,

Beraber büyüdüğüm, nerede ve ne zaman olursa olsun her zaman desteklerini kalbimde hissettiğim, mesafelerin bizi asla ayıramadığı ikinci ailem olan çok değerli arkadaşlarım, Edibe Ece ABACI, Elif DİK, Yağmur HASBİOĞLU, Elif Nur

YILMAZ, Serap YALÇINYİĞİT, Ali KÖSE, Şafak Metin KIRKAR, Ömer Faruk AYDİN'a ve adını buraya yazamasam da her daim aklımda ve kalbimde olan tüm dostlarıma, Kendimi bildim bileli desteğini arkamda hissettiğim, ne olursa olsun koşulsuz şartsız benimle olan, zor anlarımda güçlü ve sabırlı durabilmeyi bana öğreten, her zorluğu beraber aşabileceğimize inandığım kocaman kalpleri sevgiyle dolu olan başta çok sevgili kız kardeşlerim Selen KIRMIZITAŞ ve Nehir AY, annem Gül KIRMIZITAŞ ve babam Adnan KIRMIZITAŞ olmak üzere tüm aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 1649B021807219 başvuru numarası ile TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

"Don't let anyone speak for you, and don't rely on others to fight for you." Michelle Obama

Fatma Ceren KIRMIZITAŞ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	4
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 Kanser.....	5
2.1.1 Serviks Kanseri	8
2.2 Kanser Tedavisinde Geleneksel Tedavi Yöntemleri	10
2.2.1 Radyoterapi.....	10
2.2.2 Kemoterapi.....	11
2.2.3 Cerrahi Müdahale Yöntemi.....	11
2.2.4 Hormonal Tedaviler	11
2.3 İmmünoterapi.....	12
2.3.1 İmmünoterapi Sınıflandırılması.....	14
2.4 Gen Aktarımı ve Nanoteknoloji.....	21
2.4.1 Viral Vektörler.....	25
2.4.2 Viral Olmayan Vektörler.....	26
2.5 Nanopartikül Hazırlama ve Karakterizasyon Yöntemleri.....	35
2.5.1 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	35
2.5.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri	38
2.6 Nanopartiküllerin Tümör Hücrelerine Hedeflendirilmesi.....	40
2.7 <i>In Vitro</i> Ortamda Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri	48

2.7.1 Hücre Kültürü Çalışmaları	48
3 MATERYAL VE METOT	55
3.1 Materyal	55
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	55
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler	55
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Kitler	56
3.2 Metot	57
3.2.1 IL-6 Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması	57
3.2.2 Oktadesilamin Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	58
3.2.3 Oktadesilamin Nanopartikül-Folik Asit Konjugatının Hazırlanışı	60
3.2.4 Sentezlenen Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül- Folik Asit Konjugatının Karakterizasyonu	60
3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları	61
3.2.6 Sentezlenen Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül- Folik Asit Konjugatının Sitotoksitesi	64
3.2.7 Nanopartikül-pDNA Konjugatının Hücrelere Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	64
3.2.8 Transfekte Edilmiş HeLa Hücrelerinin Makrofaj Hücreleri Üzerine Etkisinin Ko-Kültür Yöntemi İle Belirlenmesi	66
3.2.9 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Hücre Siklusuna Etkisinin İncelenmesi	67
3.2.10 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Antioksidan Kapasite Çalışması	68
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	69
4.1 IL-6 Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması	69
4.2 Oktadesilamin Bazlı Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	71
4.3 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikül-Folik Asit Konjugatının Hazırlanışı	72

4.4 Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül-Folik Asit Konjugatının Karakterizasyonu.....	72
4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları	82
4.6 Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül- Folik Asit Konugatının Sitotoksitesisi	83
4.7 Nanopartikül-pDNA Konjugatının Hücrelere Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	85
4.8 Transfekte Edilmiş HeLa Hücreleri Ve Aktifleştirilmiş Makrofaj Hücrelerinin Ko-Kültür Modeli İle Sitokin Yanıtının Belirlenmesi.....	89
4.9 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Hücre Siklusuna Etkisinin İncelenmesi	94
4.10 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Antioksidan Kapasite Çalışması	97
KAYNAKÇA	100
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	110

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikada dönme hızı
λ	Dalga boyu
°C	Derece Santigrat
g	Gram
CO ₂	Karbondioksit
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mM	Milimolar
mL	Mililitre
mV	Milivolt
M	Molar
nm	Nanometre
pg	Pikogram

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomic Güç Mikroskopu
ATR	Attenuated Total Reflectance
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPR	Gelişmiş Geçirgenlik ve Alıkonma
EtOH	Etil alkol
FA	Folik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FR	Folat Reseptör
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GFP	Yeşil Florasan Protein
IC ₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
KLN	Katı Lipid Nanopartikül
LA	Luria Agar
LB	Luria Broth
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NHS	N-hydroxysuccinimide
NP	Nanopartikül
OCT	Oktadesilamin
OD	Optik Densite
ON	Oktadesilamin Nanopartikül
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCS	Foton Korelasyon Spektroskopisi
PDI	Polidispersite İndeksi
PD-L1	Hücre Ölümü Ligandı
PDL-1	Programlanmış Hücre Ölümü Protein 1
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TAS	Total Antioksidant Status
TOS	Total Oksidant Status
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kanser hücresinin altı temel özelliği [11]	7
Şekil 2.2 Serviksin patolojik değişimi [20]	10
Şekil 2.3 2017 yılı verilerine göre gen transferi çalışmalarının sayısı ile ilgili hastalıklar [46]	22
Şekil 2.4 Nanoteknolojinin sağlık bilimleri alanındaki uygulamaları [14]	27
Şekil 2.5 Nanopartiküllerin özellikleri [61]	29
Şekil 2.6 Sık kullanılan nanotaşıyıcı sistemler. (A: Lipozomlar, B: Katı lipid nanopartiküller, C: Nano küreler, D: Nanokapsüller, E: Dendrimerler, F: Polimerik miseller, G: Metal bazlı nanopartiküller, H: Manyetik nanopartiküller) [62]	30
Şekil 2.7 Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması [64]	31
Şekil 2.8 Katı lipid nanopartikül aracılı gen aktarımı. (A: KLN ve DNA kompleksinin oluşması, B: KLN-DNA kompleksinin endositozu) [67]	33
Şekil 2.9 Tümör hücrelerinin nanopartiküller ile hedeflenmesi [74]	41
Şekil 2.10 Aktif hedeflemede kullanılan ligandlar [76]	44
Şekil 2.11 Folat konjuge KLN'lerin FR aracılı endositozu [91]	47
Şekil 2.12 Primer, sekonder ve devamlı hücre hatları [93]	49
Şekil 3.1 Plazmid haritası [103]	58
Şekil 3.2 Oktadesilaminin kimyasal yapısı	58
Şekil 3.3 Nanopartikül sentez aşamaları	59
Şekil 3.4 Transfeksiyon çalışmalarında 6 kuyucuklu plaka düzeni	66
Şekil 3.5 Ko-kültür yönteminde hücrelerin ekimi (www.biorender.com ile çizilmiştir)	67
Şekil 4.1 Seçici besiyerinde gözlenen bakteri kolonileri	69
Şekil 4.2 ON-1'e ait SEM görüntüsü	76

Şekil 4.3 OFAN'ye ait SEM görüntüsü	76
Şekil 4.4 ON-1'e ait AFM görüntüsü.....	78
Şekil 4.5 OFAN'ye ait AFM görüntüsü.....	78
Şekil 4.6 Sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR spektrumları	80
Şekil 4.7 HeLa serviks kanser hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü	82
Şekil 4.8 THP-1 hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü	83
Şekil 4.9 Çeşitli konsantrasyonlarda ON-1 ve OFAN partiküllerinin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi	84
Şekil 4.10 Transfeksiyon sonrası 24. saat HeLa hücrelerinin 10x objektifte görüntüleri A) OFAN aracılı transfeksiyon faz kontrast görüntüsü B) OFAN aracılı transfeksiyon floresan görüntüsü C) ON-1 aracılı transfeksiyon faz kontrast görüntüsü D) ON-1 aracılı transfeksiyon floresan görüntüsü E) pDNA ile transfeksiyon faz kontrast görüntüsü F) pDNA ile Transfeksiyon floresan görüntüsü	87
Şekil 4.11 THP-1 monosit hücrelerinin 200 mM PMA ile etkileşimi sonrası saat bazında fenotipik değişimi A: 0. saat, B: 24. saat, C: 48.saat, D: 72. Saat, E: 96. Saat.....	91
Şekil 4.12 Ko-kültür çalışmasının ardından hücrelerin IL-6 sitokin salınımı	92
Şekil 4.13 OFAN ve ON-1 isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki Cyclin D1 aktivitesine etkisi.....	94
Şekil 4.14 OFAN ve ON-1 isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki p53/TP53 aktivitesine etkisi	96
Şekil 4.15 ON-1 VE OFAN isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki total antioksidan kapasitesi	98
Şekil 4.16 ON-1 VE OFAN isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki total oksidan kapasitesi	98

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 İmmünoterapi çalışmalarının sınıflandırılması.....	14
Tablo 2.2 Gen aktarım metotlarının avantaj ve dezavantajları [51], [52]	24
Tablo 2.3 HeLa hücrelerinin özellikleri.....	49
Tablo 2.4 THP-1 hücrelerinin özellikleri.....	50
Tablo 4.1 İzole edilen pDNA yoğunluk ve saflık değerleri.....	70
Tablo 4.2 Sentezlenen oktadesilamin nanopartikül isim ve formülasyonları	72
Tablo 4.3 Nanopartiküllerin Zetasizer analizi sonuçları	73
Tablo 4.4 Nanopartikül-pDNA Konjugatları ve pDNA'nın Parçacık Boyutu, PDI Ve Zeta Potansiyel Değerleri	86

HeLa Kanser Hücrelerini Etiketlemek Amacı İle Lipid Bazlı Nanopartikül İle Transfeksiyonu

Fatma Ceren KIRMIZITAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş-Danışman: Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Kanser, çağımızda dünyada ölümlerin ve hastanın yaşam kalitesi ve süresini düşüren en önemli hastalık olarak belirtilebilmektedir. Günümüzde geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması ve/veya yan etkilere sahip olması nedeni ile immünoterapi yöntemi geliştirilmiştir. Kanser immünoterapisi, kanser hücrelerinin yerini tespit etmek ve yok etmek için hastanın immün sisteminin güçlendirilmesine dayanan bir yöntemdir. Katı lipid nanopartiküller, 2000'li yılların başında geliştirilen, başlıca gen aktarım çalışmalarında kullanılan kendine has avantaj ve dezavantajları olan taşıyıcı sistemlerdir. Nanopartiküllerin hedef hücreye aktarımı en az yapısı ve özellikleri kadar önemli olduğundan, hedef hücrenin özelliklerine uygun çeşitli ligandlar kullanılarak konjugasyonu ile hedeflendirilme yapılmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında kanser immünoterapisinde kullanılmak üzere hedeflendirilmiş katı lipid nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması hedeflenmektedir. Ardından HeLa serviks kanseri hücre hattı üzerinde gen aktarım etkinliği, mutajenitesi ve oksidatif stresi belirlenmiştir.

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküller (ON), tekli emülsiyon (w/o) çözücü difüzyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarının ardından uygun seçilen partikül ile folik asit konjugatı (OFAN) elde edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri, ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmiştir. Nanopartiküllerin morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik güç mikroskobu (AFM) ile belirlenmiştir. Partiküllerin yapısını oluşturan fonksiyonel gruplar ve kimyasal bağlar Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmiştir. Oktadesilamin ve folik asit bağlı oktadesilamin nanopartiküllerin hücre canlılığı MTT analizi ile tayin edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller ile transfer edilecek pEGFP N1-IL-6 plazmidi çoğaltılmış ve saflaştırılmıştır. HeLa serviks kanseri hücrelerine oktadesilamin ve folik asit bağlı oktadesilamin nanopartiküller ile gen aktarımı yapılarak transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. Transfeksiyon etkinliği 24 saat boyunca inverted mikroskop kullanılarak GFP ışımalarının takip edilmesiyle belirlenmiştir. Gen aktarımı ile hücrelerde meydana gelen immün yanıtın değerlendirilebilmesi için transfekte edilmiş HeLa serviks kanseri hücreleri ile makrofajlara farklılaştırılmış THP-1 monosit hücreleri ko-kültür modeli oluşturulmuştur. 72 saatin ardından vasatlar toplanarak nanopartiküllerin antioksidan-oksidan kapasiteleri ve hücre döngüsüne olan etkileri ilgili ticari kitler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İmmünoterapi, serviks kanseri, katı lipid nanopartikül, gen aktarımı

Transfection Of HeLa Cell Line For Labelling Via Lipid-Based Nanoparticles

Fatma Ceren KIRMIZITAŞ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Cancer is the most critical disease that decreases the quality and duration of the patient's lifetime in every country in the world. Since these traditional treatments are inadequate and/or have side effects, immunotherapy is in demand as a new treatment method. Cancer immunotherapy is a method based on strengthening the patient's immune system to locate and destroy cancer cells.

In the last 20 years, scientists aimed to reduce the side effects of potential treatment methods with the integration of nanotechnology. Solid lipid nanoparticles that have its own advantages and disadvantages are the carrier systems used in gene transfer since the early 2000s. Since the targeting is the most critical issue, nanoparticles conjugated with ligands to target cells.

In the presented thesis, we aimed to synthesize and characterize targeted solid lipid nanoparticles to be used in cancer immunotherapy. Then, the gene transfer activity, mutagenicity, and oxidative stress on the HeLa cervical cancer cell line was determined. Octadecylamine-based solid lipid nanoparticles (ON) were synthesized by a single emulsion (w/o) solvent diffusion method. Zeta potential

values, particle size, and polydispersity index (PDI) of the nanoparticles using the dynamic light scattering (DLS) method. Morphological analysis of nanoparticles was determined by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). The functional groups and chemical the particles were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Cytotoxicity of ON and OFAN were determined by MTT analysis. The cargo plasmid to be transferred was amplified and purified. Transfection efficiency was determined by monitoring GFP imaging using a fluorescence microscope for 24 hours. Transfected HeLa cervical cancer cells and THP-1 monocyte cells differentiated into macrophages were developed to create co-culture model The antioxidant-oxidant capacities of nanoparticles and their effects on cell cycle were evaluated.

Keywords: Immunotherapy, cervical cancer, solid lipid nanoparticles, gene delivery

1.1 Literatür Özeti

Bulaşıcı olmayan hastalıklar, dünya genelinde ölümlerin en önemli nedeni olarak belirtilmektedir. Kansere ise, ölümlerle sonuçlanan bulaşıcı olmayan hastalıkların en geniş sınıfını oluşturmaktadır. Temelde kanser, zamanla gelişen ve vücut hücrelerinin kontrolsüz bölünmesini içeren bir hastalık grubudur. Kansere hemen hemen tüm vücut hücrelerinde gelişebilir ve her kanser türünün kendine has özellikleri vardır. Ancak hastalığı oluşturan temel süreçler tüm kanser türlerinde oldukça benzerdir. Serviks kanseri, dünya genelinde kadınlarda en sık tanı konulan ve ölümlerle sonuçlanan dördüncü kanser türüdür. Gelişmemiş ülkelerde, gelişmiş ülkelere nazaran bu hastalığa daha sık rastlanmaktadır [1]. Kansere hastalığının kişiye özgü olması nedeni ile tek ve stabil bir tedavi yöntemi yoktur. Tedavi yöntemi; hastanın durumuna, hastalığın seyrine ve derecesine bağlıdır. Bazı hastalar için tek bir tedavi yöntemi yeterli oluyorken bazı hastalar için kombine tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Kansere tedavisinde tercih edilen geleneksel yöntemler; radyoterapi, kemoterapi, cerrahi müdahale yöntemi ve hormonal tedaviler şeklinde belirtilmektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri hastanın durumuna bağlı olarak seçilerek uygulanır. Kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri en sık tercih edilen yöntemler olmakla beraber hastanın günlük hayatını oldukça fazla etkileyebilecek yan etkilere neden olmaktadır. Ayrıca cerrahi müdahale yöntemi ve hormonal tedaviler de her kanser türü için tercih edilememektedir. Son on yılda bahsi geçen bu tedavi yöntemleri oldukça gelişmelerine rağmen kansere tedavisi için hala yeterli olmamaktadırlar. İmmünoterapi, birden fazla hedef ve yönde kanser hücrelerine saldırmak için bağışıklık sistemini dinamik olarak modüle eden yenilikçi bir tedavi yöntemidir. Kansere immünoterapisi, konağın bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser hücrelerini belirlemeye ve elimine etmeye dayanan yeni bir stratejidir [2]. İmmünoterapi, prensip olarak iki ana gruba ayrılmaktadır: pasif ve aktif immünoterapi. Pasif immünoterapi, immün sisteme ait hücrelerin laboratuvar koşullarında modifiye edilmesi ile immün yanıt

oluşturulması esasına dayanır, hastanın immün sistemine bağlı değildir. Pasif immünoterapi monoklonal antikorlar ve adoptif hücresel terapi olarak spesifik ve spesifik olmayan şekilde yapılabilmektedir. Aktif immünoterapi, tümörlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınabilen, yabancı olarak tanımlanıp daha sonra yok edilebilen spesifik antijenlere sahip olduğu teorisine dayanmaktadır. Vücudun immün sisteme ait hücrelerinin antijene özgü bir antitümör yanıt oluşturmalarını teşvik etmek amacıyla hastanın immün sistemini uyarır. İmmün sistemin uyarılması; aşılama, immünomodülasyon veya spesifik antijen reseptörlerini hedeflemeleri ile gerçekleştirilmektedir. Aktif immünoterapi; immün kontrol noktası inhibitörleri, kanser aşılı ve onkolitik virüsler ile yapılmaktadır [3], [4].

Gen aktarımı genel anlamda, belli hastalıkları tedavi etmek amacı ile yabancı DNA'nın konakçı hücrelere aktarılması işlemidir. Gen aktarımı çalışmalarında iki ana etmenin önemi vardır. Bunlar; transfer edilecek genetik materyalin ve taşıyıcı vektörel sistemin özellikleridir. Bir taşıyıcı sistem; genetik materyali endositik yolda ilerlerken deşere olmadan biyolojik bariyeri geçerek hücrenin nükleusuna iletebilmelidir. İdeal bir vektörün sahip olması gereken bazı özellikler vardır. Bunlar; hedef hücreye kargo elementin deşere olmadan iletebilmesi, yüksek miktarda kargo elementin taşınabilmesi, uzun süren raf ömrü ve üretiminin kolay ve tekrarlanabilir olmasıdır. Gen aktarımı başlıca fiziksel, biyolojik ve kimyasal olmak üzere üç şekilde yapılabilmektedir. Nanoteknoloji, nano-boyutlarda malzemelerin ve sistemlerin geliştirildiği bir teknoloji alanıdır. Nanoteknolojinin temel bilimlerle kombinasyon halinde kullanılması ile kanser tedavisine yönelik birçok sistem geliştirilmiştir. Nanopartiküller geçen 30 yılda kanser tedavisinde sıkça kullanılan taşıyıcı sistemlerdir. Çalışmanın amacına yönelik yapıda ve boyutta sentezlenebilmeleri ve makropartiküllere kıyasla daha kolay endositoza uğramaları ile gen aktarımı temelli tedavilerde sıkça vektör olarak kullanılmaktadırlar. Negatif yüke sahip DNA molekülünün hedef hücrelere aktarılması için özellikle pozitif yüke sahip nanopartiküller tercih edilmektedir. En sık kullanılan katyonik partiküller, katı lipid nanopartiküllerdir. Katı lipid nanopartiküller, son 20 yıldır DNA ve RNA bazlı gen aktarımında kullanılmaktadır. Katı lipid nanopartiküller, çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Üretim yöntemlerinin ucuz ve kolay olması, raf ömrünün uzun olması, biyouyumlu

olmaları ve çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olmaları gibi önemli avantajları vardır. Bunun yanında zamanla partikül boyutunun büyümesi ve öngörülemeyen jelleşme gibi dezavantajlara sahiptir [5], [6].

Nanopartiküllerin sağlıklı dokulara zarar vermeden hedef bölgeye iletilmesi nanopartiküllerin sağlık alanındaki kullanılmasının önündeki en büyük engellerden birisidir. Nanopartikül bazlı aktarım sistemlerinde gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma (EPR) koşulları sağlanmadığında hedefleme yapılması gerekmektedir. Hedeflendirme; iletim yapılacak hedef hücrenin çeşidi ve durumuna göre çeşitli ligandlar ile nanopartiküllerin konjugasyonu ile yapılabilmektedir. Nanopartikül hedeflemesi, spesifik olarak hedef hücreye, dokuya veya organa yönelik uygulanan bir tekniktir. Hedefleme iki şekilde yapılmaktadır: pasif ve aktif hedefleme. Pasif hedeflemede tümör dokularının etrafındaki ortamın sağlıklı dokulara göre daha asidik pH'a sahip olması esasına dayanarak yapılan hedeflemedir. Aynı zamanda tümör dokularının EPR etkisi ile partiküllerin toplanmaları göz önüne alınmaktadır. Böylece pH ve boyut/yük duyarlı nanotaşıyıcı sistemler ile pasif hedefleme yapılabilmektedir. Fizyolojik koşullardaki pH'da bozulmadan kalabilen ve hedef bölgenin sahip olduğu pH'da taşıdıkları kargo elemanı salan ve 200 nm'den küçük boyutta pozitif yük taşıyan nanopartiküller pasif hedeflemede sıkça kullanılmaktadır. Aktif hedefleme, tümör hücrelerinin yüzeyindeki aşırı derecede eksprese olan yüzey reseptörlerinin hedef alınmasına dayanan bir tekniktir. Aktif hedefleme pasif hedeflemeye kıyasla daha zor kurgulanır ve ölçeklendirilir. Hedefleme genel olarak tümör hücrelerini antikorlar, peptitler, aptamerler veya bazı küçük moleküller ile yapılabilmektedir. Bir vitamin olan folik asit, folat reseptörü olarak bilinen bir tümör ilişkili antijene bağlanan hedefleme çalışmalarında en sık kullanılan ligandlardan biridir. Folat reseptörü serviks, yumurtalık, böbrek ve beyin gibi birçok tümör çeşidinde aşırı derecede eksprese olurken sağlıklı hücrelerde folat reseptörünün ekspresyonu çok azdır veya hiç olmamaktadır. Folik asitin molekül ağırlığının düşük olması, suda çözünebilmesi, pH ve ısı gibi dış etmenlere karşı dayanıklı olması, folat reseptöre karşı yüksek afinite sahip olması gibi nedenlerden dolayı oldukça sık kullanılan bir ligandır [7], [8].

1.2 Tezin Amacı

Sunulan tez çalışmasında viral olmayan vektörler aracılığı ile HeLa serviks kanser hücre hattına gen aktarımı yapılacak ve transfeksiyonun etkinliği değerlendirilecektir. Literatürde oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin gen aktarımı çalışmalarında başarı ile kullanıldığı bilgisi yer almaktadır ancak bu nanopartiküllerin folik asit ile konjugat oluşturarak tümör hücrelerinin hedeflenmesi amaçlanmaktadır. Aynı zamanda sentezlenen nanopartiküllerin hücre siklusuna etkisi, oksidan ve antioksidan kapasiteleri değerlendirilerek literatüre yeni bilgiler eklenmesi hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, daha önceden literatürde gen aktarımı çalışmalarında etkin olarak kullanılan oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin geliştirilerek tümör hücrelerinin hedeflenmesinde kullanılması hedeflenmektedir. Sunulan bu tez çalışması ile, geleneksel kanser tedavi yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen immünoterapi yöntemi için kullanılabilir bir model oluşturulacağı düşünülmektedir. Tez çalışmasında kullanılan katı lipid nanopartiküle folik asit takılarak konjugat oluşturulmuştur. Nanopartikül hedeflendirilmesi ile transfeksiyon etkinliğinin arttırılarak aktarılacak istenen genin daha yüksek seviyede ifade edilmesi ve immün yanıtın indüklenmesi amaçlanmaktadır. Elde edilen veriler ile literatürde kanser immünoterapisi alanında kullanılan katı lipid nanopartiküllerin antioksidan-oksidan aktivitelerinin araştırılması ve hücre siklusuna etkilerinin değerlendirilmesi yönündeki açıkların kapatılacağı düşünülmektedir. Sağlıklı hücreleri öldürmeden kanser hücrelerinin öldürülmesi ile yeni nesil hedefli ilaçların geliştirilebileceği düşünülmesi ile biyomalzeme ve ilaç alanlarında katkı sağlanacağı hedeflenmektedir.

2.1 Kanser

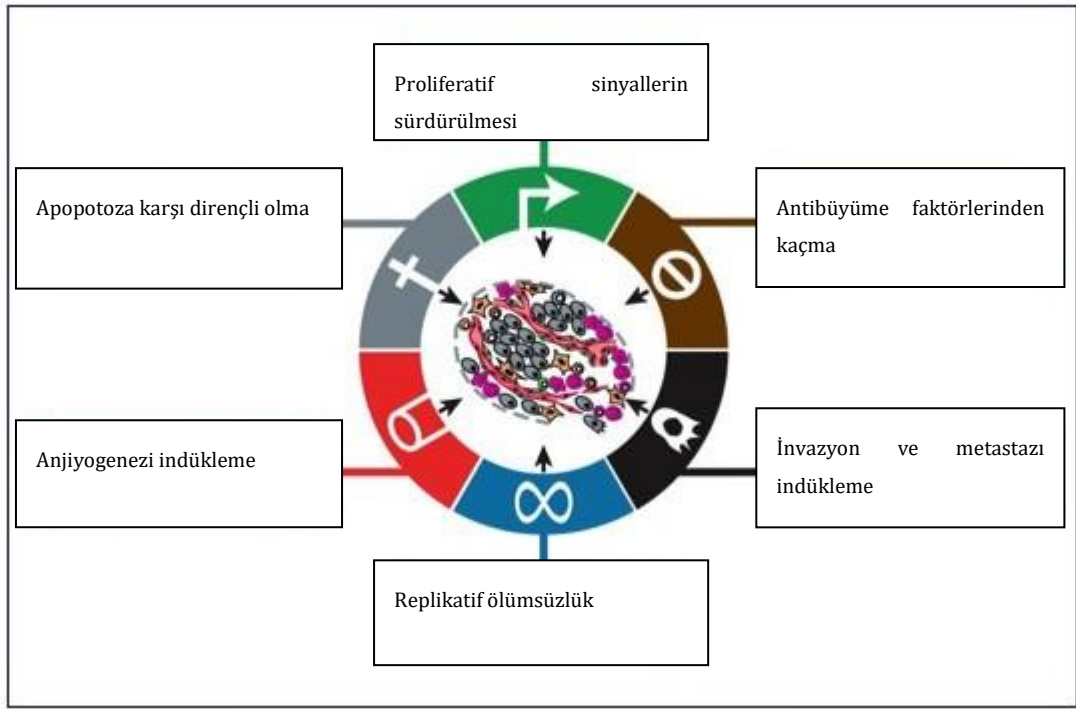
İnsanoğlunun yazılı ilk kaynaklarına dayanarak, kaydedilmiş tarihin başlangıcından bu yana, insanlar ve hayvanlarda kanser hastalığına dair izlere rastlanmıştır. Bu izlerden bazıları fosilleşmiş kemik tümörleri, eski Mısır'daki insan mumyaları ve eski el yazmaları olarak belirtilebilir. Örnek olarak, mumyalarda osteosarkom adı verilen kemik kanserini düşündüren büyüme görülmesi ve baş ve boyun kanserinde görülen kemik kafatası yıkımı örnek olarak gösterilebilir. Kanser tanımı, daha kanser terimi tanımlanmadan önce, Edwin Smith Papirüsü denilen ve eskiden Mısırdaki okutulan bir ders kitabının bir parçası olan yazıtlarda kullanılmıştır. Yangın tatbikatı adı verilen bir aletle çıkarılmış tümör vakası tarif edilmiş ve hastalık hakkında “Tedavi yok” denilmiştir. Kanser kelimesinin yaratıcısı, “Tıbbın Babası” olarak kabul edilen Yunan hekimi Hipokrat (M.Ö. 460-370) olarak kabul edilmektedir. Hipokrat, ülser ve ülser olmayan tümörleri tanımlamak için karsino ve karsinoma terimlerini kullanmıştır. Yunancada, yengeç anlamına gelen bu kelimelerin, kanserden yayılan parmak benzeri çıkıntıların ve o bölgedeki şişkinliğin bir yengeç şeklini çağrıştırdığı için kullanıldığı düşünülmektedir. Roma hekimi Celsus (M.Ö. 28-50), daha sonra Yunanca yengeç terimini, Latince sözcük olan kansere çevirmiştir. Başka bir Yunan doktor olan Galen (MS 130-200) tümörleri tanımlamak için oncos (Yunanca şişlik) kelimesini kullanmıştır. Her ne kadar Hipokrat ve Celsus'un yengeç analogisi hala kötü huylu tümörleri tanımlamak için kullanılsa da Galen'in terimi artık onkoloji uzmanı olan kanser uzmanlarının adının bir parçası olarak kullanılmaktadır [9] [10].

Kanser, anormal hücrelerin normal sınırlarının ötesinde büyümesiyle karakterize edilen ve daha sonra vücudun bitişik kısımlarını istila edebilen ve/veya diğer organlara yayılabilen geniş bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir. Kanseri hücreleri, dokulardan köken alırlar, büyüdükçe ve bölündükçe

normaliteden uzaklaşırlar. Kanser, çoklu aşamalı bir hastalıktır, sebepleri hastadan hastaya değişiklik göstermekle beraber tek bir nedeni yoktur ve vücudun hemen her bölümünü etkileyebilir. Kanser oluşmasına sebebiyet veren ajanlara karsinojen adı verilir ve kimyasal, biyolojik ve fiziksel olarak çeşitli türleri vardır. Kansere sebebiyet veren başlıca faktörler şu şekildedir: iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları, yaş, yetersiz fiziksel aktivite, sigara ve alkol tüketimi, beslenme ve diyet, kimyasal maddeler, mikroorganizmalar ve genetik faktörlerdir. Kanser, genetik faktörlerden daha çok çevresel faktörlere bağlıdır.

Hastalığın en önemli nedeni olarak genlerde meydana gelen mutasyonlar belirtilmektedir. Çoğu kanser, hücrelerin daha hızlı bölünmelerini sağlayan, hücrenin iç ve dış kontrollerden kaçabilmesini sağlayan ve programlanmış hücre ölümünü engelleyen bir dizi mutasyonun etkisi ile oluşur. Hücrelerin mutasyonlar etkisiyle bölünmeye devam etmesi üzerine, oluşan kitle benign olarak adlandırılır. Benign tümörler metastaz yeteneğine sahip değildir sadece bulundukları yerde büyüyebilirler. Malign tümörler ise köken aldıkları dokunun çevresindeki doku ve organlara yayılabilme yeteneğine sahiptirler.

2000 yılında Douglas Hanahan ve Robert A. Weinberg yaptıkları çalışma ile kanser hücrelerinin biyolojik olarak altı temel özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir (Şekil 2.1) [11]. Kanser hücrelerinin biyolojik özellikleri, 2011 yılında Douglas Hanahan ve Robert A. Weinberg tarafından yayınlanan yeni bir çalışma ile on tane olarak güncellenmiştir. Eklenen özellikler; genomik instabilite ve mutasyonlar, tümörü destekleyen inflamasyon, immün yıkımdan kaçınabilmek ve enerji metabolizmasının yeniden programlanabilmesi olarak belirtilmiştir [12].



Şekil 2.1 Kanser hücresinin altı temel özelliği[11]

Kanser, her hastanın vücudunda farklı doku ve organlarda ortaya çıkabilir bu nedenle ortaya çıkan belirtileri de farklılık gösterir. Her kanser türü kendine has belirtiler gösterir ve birçok kanser türü başlangıçta herhangi bir semptom göstermezken hastalığın seyriyle beraber semptomlar belirginleşir. Başlıca gözlemlenen belirtiler şunlardır; açıklanamayan ve hızlı kilo kaybı, ağrı, halsizlik, ateş, şişlik ve kanamadır. Bununla beraber unutulmamalıdır ki, erken teşhisle beraber gelen iyi bakımın hayat kalitesi ve süresi üzerine önemli bir etkisi vardır [9].

Günümüzde, bulaşıcı olmayan hastalıklar dünya genelinde ölümlerin en önde gelen sebebi olarak belirtilmektedir. Bu hastalıklardan kanser ise dünya genelinde ölümlerin en önemli nedeni ve çağımızda dünya üstündeki her bir ülkede yaşam süresini ve kalitesini düşüren en önemli rahatsızlık olarak öngörülmektedir [13].

Kanser, dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve 2018'de yaklaşık 9,6 milyon ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir. Yakın gelecekte, kansere yakalanan hasta sayısında artış görüleceği ve 2030 yılına kadar kansere bağlı

ölümlerin sayısının 13,1 milyona ulaşacağı düşünülmektedir [14]. Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarına göre, 172 ülkenin 91'inde 70 yaşından önceki ölümlerin ilk veya ikinci nedenidir ve 22'sinde üçüncü veya dördüncü sıradadır. Küresel olarak, kanser her 6 ölümden 1'inin nedeni olarak belirtilmektedir. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türleri iken; meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanseri kadınlarda en yaygın olan türlerdir [15]. İnsidans, belirli bir süre içerisinde meydana gelen yeni vakaların sayısı ve coğrafi bölgede, yıllık olarak mutlak vaka sayısı veya yılda 100.000 kişi başına oran olarak aktarılmaktadır. Kanser geliştirme riskini yaklaşık olarak belirlemek ve ülkeler ile dünya bölgeleri arasında karşılaştırma yapmak için kullanılmaktadır. Birincil önleme stratejileri, bu oranın azaltılmasını amaçlamaktadır, ancak artan oranlar, bu alandaki başarısızlığı yansıtmayabilir, ancak erken tespitin (testler veya programlar), subklinik kanser vakaları keşfedildiğinde insidans oranlarında geçici bir artışa yol açabileceği düşünülür. Benzer şekilde, mortalite belirli bir bölgede ve dönemde meydana gelen ölümlerin sayısıdır ve ölüm oranı yılda 100.000 kişi başına düşen ölümlerin sayısıdır. Ölüm, insidansın ve mortalitenin (ölmekte olan hastaların oranı) ürünüdür [13].

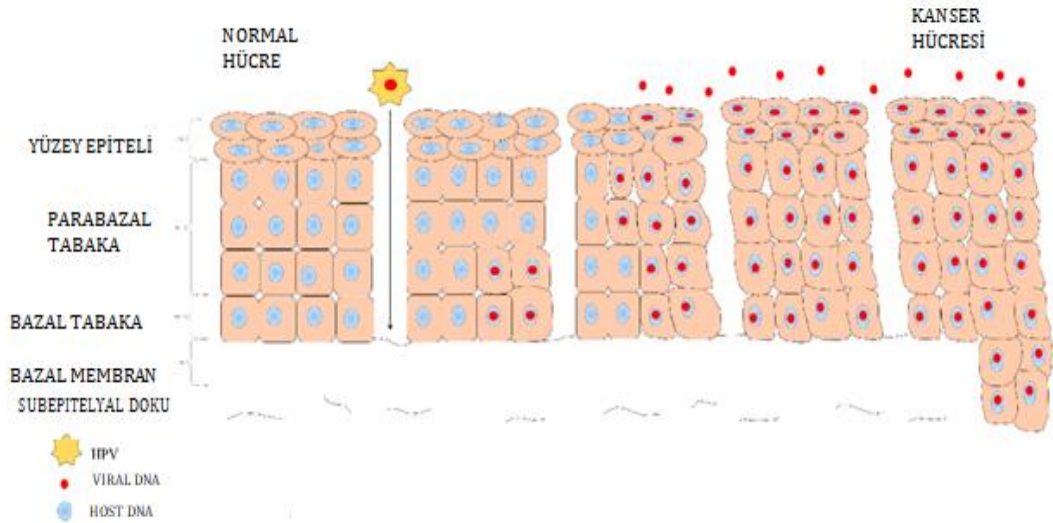
2.1.1 Serviks Kanseri

Dünya çapında serviks kanseri, 2018 yılında 570.000 vaka ve 311.000 ölümlerle birlikte kadınlarda en sık tanı konan dördüncü kanser ve aynı zamanda dördüncü önde gelen kanser ölüm nedenidir. Serviks kanseri, gelişmekte olan veya gelişmemiş ülkelerde meme kanserinin ardından insidans ve mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır. Serviks kanserine bağlı ölümlerin %80'i gelişmemiş ülkelerde olduğu bilinmektedir. Serviks kanseri, kadınlarda genelde orta yaşta (35-44 yaş) ortaya çıkan bir hastalıktır. Çok nadir olarak 20'li yaşlarda görülebilir. Aynı zamanda 65 yaş üstü kadınlarda yalnızca %15 oranında görülür [13].

Serviks kanseri ve buna bağlı ölüm oranının azaltılmasındaki gelişmelere ve yok edilme ihtimaline yönelik küresel iyimserliğe rağmen, serviks kanseri geçmişte kalmış bir hastalık değildir, her 2 dakikada 1 kadın serviks kanseri nedeniyle kaybedilmektedir. Serviks kanseri vakaları sürekli olarak artış göstermektedir. Aynı zamanda, kanser türleri arasında en öngörülebilir olanıdır. Erten tanı ile

beraber hastalığın ilerlemeden durdurulması ihtimali yüksektir. Her hastada görülen bulgular farklılık gösterebilir. En sık görülen bulgu, ağrısız kanama ile vajinal akıntıdır. Ayrıca, menstürel döngü haricinde görülen kanama, postkoital kanama, menstürel dönemdeki kanamanın normalden daha ağır ve uzun sürmesi, kilo kaybı, bel ve kasıkta ağrı vb. belirtiler de sıkça görülür [16].

Serviks kanserinin birçok nedeni vardır. Bunlar; birden fazla seksüel partner, erken yaşta cinsel ilişki, cinsel yolla bulaşan enfeksiyon öyküsü, genç yaşta gebelik, yüksek doğum sayısı, sigara ve tütün kullanımı, immün sistemde zayıflama, Human Papilloma Virüs (HPV) enfeksiyonu olarak belirtilebilir [17]. Ayrıca gelişmemiş ülkelerde yaşayan kadınların tedavi yöntemlerine ulaşamaması ve serviksin hijyeniyle de alakalıdır. Birçok araştırmacı günümüzde, serviks kanserinin kalıtsal olarak neredeyse hiç aktarılmadığını düşünmektedir [18]. Bütün nedenlerin yanında HPV, serviks kanserinde karsinogeneze ana etmendir. Bugüne kadar neredeyse 200 HPV çeşidi tespit edilmiştir fakat bunların hepsi serviksi kanseri ile sonuçlanmamaktadır. HPV 16/18 her üç servikal karsinomdan ikisinin nedeni olarak belirtilir. Dünya genelinde ise HPV 31, 33, 35, 45, 52 ve 58, en yaygın görülen kanser türleridir [19]. HPV enfeksiyonunun patogenezi, çeşitli hücre proteinleri inhibe edebilen ve hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ve apoptoz gibi biyolojik süreçleri etkileyebilen viral onkoproteinlerin aşırı ekspresyonunu içerir. Servikal karsinogenezi indükleyen viral ve konakçı hücre protein değişiklikleri, hastalığın doğası hakkında derinlemesine bilgi sağlar ve spesifik moleküler hedefe yönelik tedavinin gelişimine ilham verir [20]. HPV enfeksiyonu sonrası, servikste görülen patolojik değişimler Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Serviksin patolojik değişimi [20]

2.2 Kanser Tedavisinde Geleneksel Tedavi Yöntemleri

Kanser, kişiye özgü bir hastalıktır bu nedenle tedavi yöntemleri hastadan hastaya değişiklik göstermektedir. Literatürde radyoterapi, kemoterapi cerrahi müdahale ve hormon tedavisi geleneksel kanser tedavileri olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda immünoterapi de kanser tedavisinde yükselmekte olan ve sıkça başvurulmuş en önemli yöntem olmuştur [9].

2.2.1 Radyoterapi

Radyoterapi (RT) diğer bir ismi ile radyasyon terapisi, kanser hücrelerinin iyonize radyasyon ile öldürülmesine dayanan yöntemdir. Radyoterapi, vücudun tamamını veya yalnızca bir bölgesini hedef alarak yapılabilir. Tedavi süreci hastalığın seyri ve hastanın sağlık durumuna belirlenir. Geliştirilen bu farklı radyoterapi yöntemlerinde temel hedef, olabildiğince fazla kanser hücrelerini sağlıklı hücrelere zarar vermeden öldürmektir. Radyoterapi, genelde tümörün küçültülmesi amacı ile cerrahi müdahale öncesi hastalara uygulanır. Ancak radyoterapinin en büyük yan etkisi kanserli hücreleri öldürürken sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Bunun yanında kişinin günlük hayatını etkileyecek saç kaybı, kusma, iştah kaybı gibi yan etkileri de vardır. Günümüzde hala sık başvurulmuş bir tedavi yöntemi olmasına

rağmen doktorlar alternatif tedavi yöntemlerini de göz önünde bulundurmaktadır [21].

2.2.2 Kemoterapi

Kemoterapi (KT), kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntemdir. Kemoterapötik ajanlar kullanılarak kanser hücrelerinin yok edilmesine dayanan yöntemdir. Literatürde, lenfoma ve lösemi türlerinde olumlu sonuçları olan bir tedavi yöntemi olduğu kanıtlanmıştır [22]. Kemoterapi genelde diğer tedavi yöntemleri ile beraber uygulanır. Tedavinin amacı, tümörün boyutlarını küçültmek, hastada görülen semptomların etkilerini azaltmak, metastazı engellemek, vücuttaki toplam tümör hücresi sayısını azaltmak olarak belirtilebilir. İleri seviye kanser hastalarında kemoterapi acıyı azaltmak için, cerrahi müdahale görecektir hastalarda tümör boyutlarını küçültmek için cerrahi müdahale sonrası vücutta kalan kanser hücrelerini öldürmek için bu tedavi yöntemi tercih edilmektedir. Kemoterapi uygulamalarında kullanılan ilaçlar aktivasyona ve inhibisyona dayalı mekanizmaların uyarılmasına bağlı olarak tümör hücrelerinin ölüme yönlendirmesini sağlar. Ancak radyoterapide olduğu gibi kemoterapi de hastanın sağlıklı hücrelerinde hasara neden olabilir ve gündelik hayatını olumsuz yönde etkileyecek yan etkilere neden olabilir [21].

2.2.3 Cerrahi Müdahale Yöntemi

Cerrahi müdahale yöntemi hem tek başına hem de diğer tedavi yöntemleri ile beraber kullanılabilir. Tümörlü dokudan örnek alınması gereken durumlarda veya metastaz yapmayan tümör dokularında kitlenin tamamen uzaklaştırılması amacı ile yapılmaktadır. Komşu sağlıklı hücrelere hasar vermeden tümörü uzaklaştırmak için diğer yöntemler ile tümörün boyutlarının küçültülmesi gerekmektedir. Günümüzde sıklıkla kullanılan bu yöntemde hasarlı dokunun durumuna göre geliştirilen yöntemler mevcuttur [9].

2.2.4 Hormonal Tedaviler

Hormonlar vücudun kendisi tarafından üretilen proteinlerdir. İhtiyaç durumunda dışardan verilebilen kimyasal maddeler de hormonlar olarak isimlendirilir. Hormonlar, kanser tedavisinde özellikle prostat ve meme kanserlerinin

tedavisinde seks hormonlarının ilaç olarak kullanılması ile yaygındır. Hormonal tedavilerin kemoterapiden farkı, hormonların hücreye bağlanması ve onların büyümesini engellemeleridir. Hormonal tedavilerde kullanılan ilaçlar üç sınıfa ayrılır; hormon sentez inhibitörleri, hormon reseptör antagonistleri ve hormon takviyesi şeklindedir. Her bir ilaç farklı şekilde hücreyi etkiler ve hitap ettiği kanser türü farklıdır.

2.3 İmmünoterapi

Son yıllarda, kanser ve immün sistem hücreleri arasındaki ilişkisi konusundaki bilimiz önemli ölçüde artmıştır. Buna bağlı olarak, yaygın olarak tercih edilen kanser tedavilerinin yanında hastaya ve hastalığa spesifik olarak geliştirilen tedaviler daha ön plana çıkmaktadır. Cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve hedeflendirilmiş tedavilerin ardından gelen kanser tedavisinin “beşinci ayağı” olarak tabir edilmektedir [23]. Bu tedavi yöntemi, tek başına veya diğer kanser tedavileri ile çeşitli kombinasyonlar oluşturacak şekilde kullanılabilir. Literatürdeki bir dizi çalışmaya göre, radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler ile sinerjisi halihazırda merak uyandıran bir araştırma konusudur [24]. Kanser immünoterapisinin amacı, hastanın immün sistem hücrelerini güçlendirerek kanser hücrelerini belirlemek, bulmak ve yok etmektir. Geçen 20 yıl boyunca kanser immünoterapisi konusunda oldukça büyük adımlar atılmıştır [25]. Öyle ki, klinik çalışmaların ardından elde edilen olumlu sonuçlar ile immünoterapi, 2013 yılında Science dergisi tarafından “Breakthrough of the Year” ilan edilmiştir [26]. Bu açıklamanın ardından, immünoterapi daha da ön planda yer almaya başlamıştır. 2018 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülünü, immün sistemin kanser hücrelerini yok etmek konusunda kullanılmasını temel alan çalışmaları ile James Allison ve Tasuku Honjo isimli bilim insanları kazanmıştır [27].

Eski Mısır’dan 18. yüzyıla kadar süregelen tarih boyunca, birçok yüksek ateşli ataktan veya enfeksiyöz hastalıktan sonra tümör büyümesinin gerilemesi vakasının bildirildiği yaygın bir bilgidir. Ancak gelişen teknoloji ile beraber immün sistem ve kanser arasındaki ilişki ancak 18. yüzyılın ortalarında fark edilebilmiştir. 18. yüzyılın ortalarında, iki Alman doktor Busch ve Fehleisen, erizipel enfeksiyonu (*Streptococcus pyogenes* enfeksiyonu) sonrası hastalarda tümör regresyonu

vakalarını bağımsız olarak bildirmiştir. Literatürde, kötü huylu tümörlerin tedavisi için ilk sistematik immünoterapi çalışması, 1891 yılında bir cerrahi onkolog olan William B. Coley yapılmıştır. Coley, hastanın bağışıklık sistemini uyarmak için ısı ile inaktive edilmiş *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* organizmalarını hastaya enjekte etmiştir. Coley başlattığı bu proje ile beraber, cerrahi müdahale yapılamayan çoğu sarkoma hastası olan 1000'den fazla sayıdaki hastada tümörde gerileme olduğunu görmüştür [23], [28]. Bu proje ile Coley'in yaşam boyu sürececek olan ve birçok bilim insanına örnek oluşturacak kanser immünoterapisi çalışmaları başlamıştır. Coley'in 1891 yılındaki ilk anti-kanser çalışmasından sonra immünoterapi alanındaki önemli gelişmeler; 1973 yılında dentritik hücrelerin (DC) keşfi, 1989 yılında ilk kimerik antijen reseptörlerinin (CAR) gelişimi, 1991 yılında ilk tümör antijeninin klonlanması ve 1995 yılında ilk kontrol noktası molekülünün yani sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4'ün (CTLA-4) tanımlanması olarak belirtilebilir [29]. 21. yüzyılda gelişen teknoloji ve yöntemler ile yapılan klinik çalışmaların lisanslanması ile de immünoterapi çalışmaları önemini arttırmıştır.

İmmünoterapinin avantajları [2]:

- "İmmünoinflamatuar" tümörün tedavi etkisi iyidir ve uzun dönem sağkalım oranı önemli ölçüde iyileşmiştir.
- Hedeflenebilir bir yöntem olduğu için kesinliği ve özgüllüğü yüksektir.
- Uzun süre etkili olan bir yöntemdir.
- Tedavi birden fazla tümör tipini kontrol edebilir ve öldürebilir.
- Tedavi, immün yanıtı arttırmak ve tümör hücrelerini öldürmek için vücudun kendi immün sistemini kullanır.
- Vücudun immün fonksiyonunu geri kazandırabilir ve geliştirebilir. Böylece tümör hücrelerini bulur, yok eder ve tümörün nüksü ve metastazını önler.
- Tedavi sonrası vücutta kalan residual tümör hücrelerini ve mikroskobik lezyonları vücuttan uzaklaştırır.
- Geleneksel tedavi yöntemlerine göre yan etkileri daha azdır.

İmmünoterapinin dezavantajları [2]:

- Özellikle immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı, otoimmün hastalıklara ve hatta ölüme yol açan olumsuz sonuçlar doğurabilir.
- Bazı hastalarda kullanımdan sonra çeşitli spesifik olmayan toksik ve yan etkiler ortaya çıkabilir.
- İmmünoterapi tedavisi aynı anda birçok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle hastaların sağkalım oranı ve prognozu tahmin edilememektedir.
- Tedavi maliyetleri oldukça yüksektir.
- Tedavi her hasta için uygun olmayabilmektedir bu nedenle hassas bir seçicilik vardır. Tümör tipi "immün baskılama tipi" ve "immün dışlama tipi" olduğunda, immünoterapi tedavisinin etkisi zayıftır.

2.3.1 İmmünoterapi Sınıflandırılması

Kanser immünoterapisi çalışmaları genel olarak iki şekilde sınıflandırılır; pasif ve aktif immünoterapi. Sınıflandırma, hastanın bağışıklık sisteminin mevcut durumuna ve kullanılması planlanan terapötik ajanın etki mekanizmasına bağlı olarak yapılmaktadır. Pasif ve aktif kanser immünoterapisi çalışmalarının sınıflandırılması Tablo 2.1’de gösterilmiştir [30].

Tablo 2.1 İmmünoterapi çalışmalarının sınıflandırılması

İMMÜNOTERAPİ	AKTİF	PASİF
SPESİFİK OLMAYAN	SİTOKİNLER İMMÜN KONTROL NOKTASI İNHİBİTÖRLERİ	ADOPTİF HÜCRESEL TERAPİ
SPESİFİK	KANSER AŞILARI ONKOLİTİK VİRÜSLER	MONOKLONAL ANTİKORLAR

2.3.1.1 Pasif İmmünoterapi

Pasif immünoterapide asıl amaç laboratuvar koşullarında üretilebilen terapötikler kullanılarak mevcut anti-tümör yanıtı arttırmaktır. Tedavi, immün sistemi zayıf ya da işlevsiz olan hastalarda tercih edilir. Tümör hücrelerine saldırmak için hastanın immün sisteminden bağımsız olarak tasarlanır, yalnızca immün sisteme ait bileşenlerin laboratuvarında modifiye edilmesi ile yapılır. Pasif immünoterapi yönteminde monoklonal antikorlar ve adoptif hücre terapisi sıkça kullanılan moleküllerdir [29], [31].

a) Monoklonal antikorlar (mAb), belirli bir B hücresi tarafından üretilen ve yüksek antijen affinitesine sahip büyük yapay proteinlerdir. Antijen spesifik olmaları sayesinde tümör hücresinin yüzeyindeki epitoplara bağlanma kapasiteleri yüksektir. Geçtiğimiz 20 yıl boyunca monoklonal antikorlar, immünoterapi çalışmalarında klinik çalışmalarda en sık kullanılan ve US FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylanan tedavi yöntemidir [32]. *Ex vivo* koşullarda kanser hücrelerinde üretilen antijenlere spesifik antikorlar üretilir ve immün yanıtı arttırmak amacıyla hastaya transfer edilir. Literatürde, monoklonal antikorlar direkt olarak kanser hücrelerinin yüzeyinde yer alan antijene yönelmelerinden dolayı hedeflendirilmiş tedaviler olarak da isimlendirilir. Tedavide kullanılan antikorlar; çıplak, konjuge, radyoaktif işaretlenmiş, kimyasal olarak işaretlenmiş ve bispesifik monoklonal antikorlar olarak sınıflandırılabilir. Kanser immünoterapisinde en sık çıplak monoklonal antikorlar kullanılır. Herhangi bir radyoaktif işaretçi veya ilaç bulunmasına gerek kalmadan doğrudan antijene bağlanabilirler. Konjuge mAb, kemoterapötik ilaçları veya radyoaktif işaretlenmiş partiküllerin kanser hücrelerine transferi amacı ile kullanılır. Radyoaktif işaretlenmiş mAb, çıplak antikora radyoaktif işaretçilerin eklenmesi ile oluşturulur. Kimyasal işaretlenmiş mAb, kemoterapötik etkisi yüksek monoklonal antikorlardır. Bispesifik mAb ise yapısında iki çeşit antikor taşımalarından dolayı, aynı anda bu iki antikoru reseptörü olan farklı iki antijene bağlanabilirler. Radyoaktif veya kimyasal işaretlenmiş monoklonal antikorlar içerdikleri toksinler veya yaydıkları radyasyon ile hedef hücreyi yok etmeyi

hedeflerler[33]–[35]. Günümüzde çeşitli kanser türlerini hedef alan monoklonal antikorlar temelli birçok ilaç geliştirilmiştir. 1997 yılında monoklonal antikorların klinikte kullanılması ile FDA tarafından onay alan ilk ilaç rituximab (Rituxan, Genentech) olmuştur [32].

b) Adoptif hücre terapisi, immün sistemi uyarmak yerine *ex vivo* koşullarda doğal ya da genetik olarak değişikliğe uğratılmış T hücrelerinin hastalara transfer edilmesidir. 20.yüzyıldaki çalışmalar ile hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda, tümör hücrelerinde sağlıklı hücrelerde olmayan tümör ilişkili ya da tümöre spesifik antijenlerin taşındığı anlaşılmış ve böylece başarılı adoptif T hücresi transferinin önemi kavranmıştır. Transfer edilen hücrelerin konakçıdaki belirli bir antijene hedeflendirilmesi ile konakçıdaki immün yanıt oluşma aşaması atlanmış olur. Hedeflenen immün yanıt oluşturabilmek için, otolog hücreler mutlaka tümör antijenlerini tanıyacak şekilde, immün yanıt oluşturabilecek sayıda, tümör yükü bölgelerine ilerleyebilecek ve dolaşımdan dışarıya çıkabilecek şekilde tasarlanmalıdır. T hücrelerinin tümör hücrelerini yok etmesi amacı ile transferi iki şekilde gerçekleştirilir; var olan tümör hücrelerinden elde edilen tümör spesifik T hücrelerinin izolasyonu (TIL) ve tümör hücrelerinin spesifik olarak tanınması için genetik olarak modifiye edilmiş T hücrelerinin kullanılması yolu. Her iki yöntemde de, T hücre *ex vivo* olarak işlem görür ve ardından tekrar hastaya transfer edilir [36]. Tarihteki ilk başarılı hücresel terapi, otolog TIL aracılığı ile ilerlemiş melanom hastasına yapılmıştır. T hücrelerinin genetik olarak modifiye edilmesi ile spesifik T hücresi reseptörü (TCR) elde edilir. TCR teknolojisi ile T hücreleri ile tümör spesifik antijenler HLA tanınması ile eşleşirler. Bu doğal eşleşme ile beraber minimum düzeyde sitotoksik etki oluşur. Fakat aynı zamanda TCR’lerin yüzeyde az miktarda eksprese olması ve T hücrelerinin *in vivo* koşullarda ömrünün kısa olması gibi dezavantajları vardır. Günümüzde genetik olarak modifiye edilmiş diğer T hücresi kimerik antijen reseptörleridir (CAR). CAR-T teknolojisi ile yapılan ilk çalışmalar olumsuz sonuçlar verse de günümüzde yöntemin zorlukları aşılmaya başlanmıştır. CAR-T teknolojisi ile ilgili dünya çapında birçok çalışma yürütülmektedir ve yakın zamanda olumlu sonuçlar alınacağına inanılmaktadır [37], [38].

2.3.1.2 Aktif İmmünoterapi

Tümöre özgü immün yanıtların daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılması, kanser immünoterapisine daha da odaklanmış bir yaklaşımın araştırılmasına yol açmıştır. Aktif immünoterapi, immün sistemi uyararak kanser hücrelerinin yok edilmesini hedefler. Aktif immünoterapi aşılama, immünomodülasyon veya spesifik antijen reseptörlerini hedeflemeleri ile yapılmaktadır. Yöntem, immün kontrol noktası inhibitörleri, kanser aşıları ve onkolitik virüsler aracılığı ile gerçekleştirilir [29].

a) Kanser aşıları, aktif immünoterapi çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Amaç, kanser hücrelerinin yok edilmesi adına immün yanıt oluşturulması ve vücudun aşılar sayesinde belirli peptit veya antijenleri hedefleyen antikorları üretmesini sağlamaktır. Aşılar, tümör hücrelerinin tamamını, bir parçasını veya saflaştırılmış antijenlerini içerebilir. Kanser aşıları; peptit bazlı, immün hücresi ya da dentritik hücresi bazlı ya da tümör hücresi bazlı olabilir. Kanser aşıları, vücutta bulunan tümör hücrelerini hedef alır ve aynı zamanda kanserin nüksünü engeller. Kanser aşılarının uygulanmasında bazı kısıtlamalar vardır. Bunlar; değişken antijen ekspresyonu, güçlü bir immün yanıt oluşturmama, tümör mikroçevresinde immün yanıtın nötralize edilebilmesi ihtimali ve zamanla etkinliğin düşmesi olarak belirtilebilir [31], [32].

- **Peptit bazlı aşılar,** tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan HLA molekülleri ile etkileşime giren tümör antijenlerine karşı immün yanıt oluşturmak amacı ile tasarlanır. Antijene özgü tasarlanmaları sayesinde sağlıklı hücrelerdeki toksik etkileri azdır ancak tümör antijen peptitleri ve hastanın HLA tipi iyi karakterize edilmelidir. Peptit aşıları, antijene özgü immün yanıtın düzenlenmesinde güvenilir bir yöntem olarak düşünülmektedir[39].
- **İmmün ya da dentritik hücresi bazlı aşılar,** dentritik hücreleri (DC), tümör antijenlerinin T hücreleri tarafından yakalanmasını ve işlenmesini ve ardından immün yanıt oluşmasını sağlayan hücrelerdir. Erken dönem kanser aşılarında, tümör ilişkili antijenler veya otolog tümör hücreleri ile monosit hücrelerinden elde edilmiş dentritik hücreler kullanılmıştır. 2010 yılında FDA tarafından prostat kanserinin tedavisi için DC bazlı ilk kanser aşısı onay almıştır. Sipuleucel-T (Provenge, Dendreon Corp.) isimli ilaç, hastanın kendi

hücrelerinin kullanılması ile anti-tümör yanıtın oluşturulması hedeflenmiştir. Günümüzde dentritik hücresi bazlı aşılar, sitokinlerle zenginleştirilmiş ve immünojenisiteyi artıran *in vitro* kültürleme tekniklerini kullanır. Ayrıca rekombinant teknoloji, T hücrelerini ve NK hücrelerini aktive eden büyüme faktörlerini veya interlökinleri salgılayan ve bu kanser aşılarının anti-kanser bağışıklık yanıtında önemli bir iyileşme sağlayan genetik olarak tasarlanmış DC'leri üretme kabiliyetini sağlamıştır. Kanser aşıları arasında çok yaygın olarak kullanılan ve geliştirilen bu yöntem; prostat, kolorektal, böbrek, meme kanseri, melanom, lösemi ve lenfomada test edilmiştir [31].

- **Tümör hücresi bazlı kanser aşıları**, tümör hücresinin tamamını immün yanıt oluşturmak amacı ile kullanır. Tümör hücrelerinin yüzeyindeki antijenlere özgü değildir ve böylece bağlanabildikleri epitop yelpazesi daha geniştir ve hastanın kendi hücrelerinin kullanılması (otolog) ya da başka bir hastanın tümör hücrelerinin kullanılması (allojenik) ile hazırlanabilir. Tümör hücreleri elde edildikten sonra, tek başlarına veya granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör gibi bir adjuvan ile kombinasyon halinde uygulanır. Klinik olarak, M-Vax (AVAX Technologies) gibi tümör hücresi bazlı aşılar, birçok farklı kanser çeşidinin tedavisinde kullanılabilmektedir [32].

b) Onkolitik virüsler, genetik olarak değiştirilmiş veya doğal olarak kanser hücrelerine nüfuz ederek onları öldürebilen virüslere denir. Virüsler yalnızca kanser hücrelerine etki ederek sağlıklı hücrelere zarar vermezler. Böylece, minimal yan etki ile beraber anti-tümör yanıt oluşturulmuş olur. Talimogene laherparepvec (T-Vec), FDA tarafından onay almış ilk onkolitik virüs bazlı ilaçtır. Viral enfeksiyonlara karşı geliştirilen koruma mekanizmalarının kanser hücrelerinin çoğunda bozulduğu gözlenmiştir. Bu bozulmadan faydalanılarak virüsler kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha yoğun bir şekilde çoğalabilmektedir. Virüslerin sağlıklı hücrelerde de çoğalabilmesinden dolayı, yalnızca kanser hücrelerinde çoğalan onkolitik virüslerin geliştirilmesi ve tedavide kullanılması ihtiyacı doğmuştur. Son zamanlarda, kanser hücrelerine özgü replikasyon elde etme girişimleri yapılmış ve Reolysin adlı bir reovirüs varyantı (aktive edilmiş Ras sinyal yoluna sahip hücrelerde onkolitik davranış sergilemektedir) geliştirilmiştir. 1991 yılında genetiği değiştirilmiş bir tip 1 herpes

simplex virüsündeki bir mutasyon ile beyin kanserinin tedavisinde olumlu sonuç alınmıştır [40].

c) İmmün kontrol noktası inhibitörleri, günümüzde klinik uygulamalarda en sık kullanılan ve birçok kanser türü için umut vaat eden bir yöntemdir. T hücreleri, antijen sunan hücreler ve tümör hücreleri üzerinde eksprese edilen bir dizi inhibitör reseptör ve ligand, yakın zamanda tümör mikroçevresindeki immün baskılanmasının önemli öğeleridir. T hücresi aktivasyonunun düzenleyicileri olarak biyolojik rollerinden dolayı, bu reseptör/ligand çiftleri "immün kontrol noktaları" olarak adlandırılmıştır. Bu kontrol noktalarının bloke edilmesi başarılı bir tedavi kavramı olarak ortaya çıkmıştır. İmmün kontrol noktaları, immün yanıtın düzenlenmesinde görevli hücre zar proteinleridir. Tümör antijenleri bir yanıt oluşturduktan sonra immün enflamatuvar yanıtın sürekli olarak aktive edilmemesini sağlamak için, çoklu kontroller veya "kontrol noktaları" mevcut veya aktive edilmiştir. İmmün kontrol noktaları, var olan bir immün yanıtı durdurabilen sinyallerdir. Bu sinyallerin, tümör hücreleri tarafından fazla miktarda ekspresyonu, kanser mikroçevresinde tümör hücrelerine spesifik T-hücresi immünitesini etkiler. İmmün kontrol noktasının inhibisyonunu içeren tedavilerin amacı, negatif bağışıklık düzenini bozarak bağışıklık sistemini kullanmak ve güçlendirmektir. 2011 yılında, Ipilimumab isimli ilaç klinik kullanımda immün kontrol noktası ilaçları kullanılarak melanom hastalarında tedavi imkânları sağlanmıştır. 2019 mart ayı itibariyle kontrol noktaları bazlı 7 adet immünoterapi ilacı klinik uygulamalarda kullanılmaktadır [41]. İmmün kontrol noktalarına bağlanan monoklonal antikörler, sitotoksik T lenfosit ile ilişkili molekül-4 (CTLA-4), programlanmış hücre ölümü protein 1 (PDL-1) ve programlanmış hücre ölümü ligandı (PD-L1) ile bağlantı yaparlar [41].

- **PD-1/PD-L1**, PD-1 immüno globulin gen süper ailesine mensup hücre yüzey reseptörüdür. PD-1; doğal öldürücü T hücreleri dendritik hücreler, monositler ve B hücreleri üzerinde var olan ana immün kontrol noktası reseptörüdür. Hücrelerin yapışması ve çoğalmasında görev alır. Normal koşullarda, PD-1'in iki ligandı bulunur: PD-L1 ve PD-L2 ve bu ligandlar, %37 dizi homolojisini paylaşır. Kanser hücreleri, immün sistem hücreleri tarafından saldırıya uğradığında PD-L1 ve PD-L2 ekspresyon düzeyi artar ve T hücrelerinin inhibisyonuna ve immün kaçışına

neden olur. PD-1/PD-L1 yolağını hedefleyen immün kontrol noktası inhibitörü, melanom, renal hücreli karsinom, küçük hücreli akciğer kanseri ve mesane kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde belirgin klinik cevaplara neden olur. PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşimin antikorlarla bloke edilmesi, kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkisini arttırır [42]. Bu yolu bloke etmek bağışıklık sisteminde “frenleri serbest bırakır” ve PD-L ifade eden tümör hücrelerinin saldırısına izin verir. PD-1/PD-L1 bağlantısının inhibisyonunun önemi her geçen gün artmaktadır. PD-1/PD-L1 yolağını hedefleyen monoklonal antikorlar ile birçok kanser türünde etkili tedavi sunan 2014 yılında Nivolumab ve Pembrolizumab FDA tarafından onaylanmış ilk iki ilaçtır.

- **CTLA-4**, immün yardımcı uyarıcı protein CD28'in homoloğu olan bir transmembran glikoproteinidir ve CD28'in fonksiyonunu nötralize eder. Her iki molekül de antijen sunan hücreler sırasıyla B7-1 ve B7-2 olarak da isimlendirilen CD80 ve CD86'ya bağlanır. CTLA-4, CD28'e kıyasla CD80 ve CD86'ya daha yüksek afinite ile bağlanır. Böylece ligandları için CD28'i geride bırakır. Normal koşullarda, efektör T hücrelerinde ve Treg hücrelerinin yüzey bölgesinde az seviyede eksprese edilir ve CTLA-4 inhibisyonu bu hücreler ile hedeflenebilir. CTLA-4 inhibisyonu, sitotoksit T hücrelerinin aktivasyonunu arttırır. Böylece Treg hücrelerine bağlı immün blokaj inhibe edilir ve anti-tümör aktivasyonu gözlenir. Yapılan çalışmalar ile beraber, 2011 yılında CTLA-4 tedavisi için geliştirilen Ipilimumab FDA tarafından onay almış ilk ilaçtır. Hem CTLA-4 hem de PD-1, bağımsız olarak CD3/CD28'e bağlı sinyal sistemi üzerinde fren görevi görür, bu da kontrol noktası inhibitörü tedavisinin etkili olması için altta yatan bağışıklık tepkilerinin gerektiğini gösterir [43].

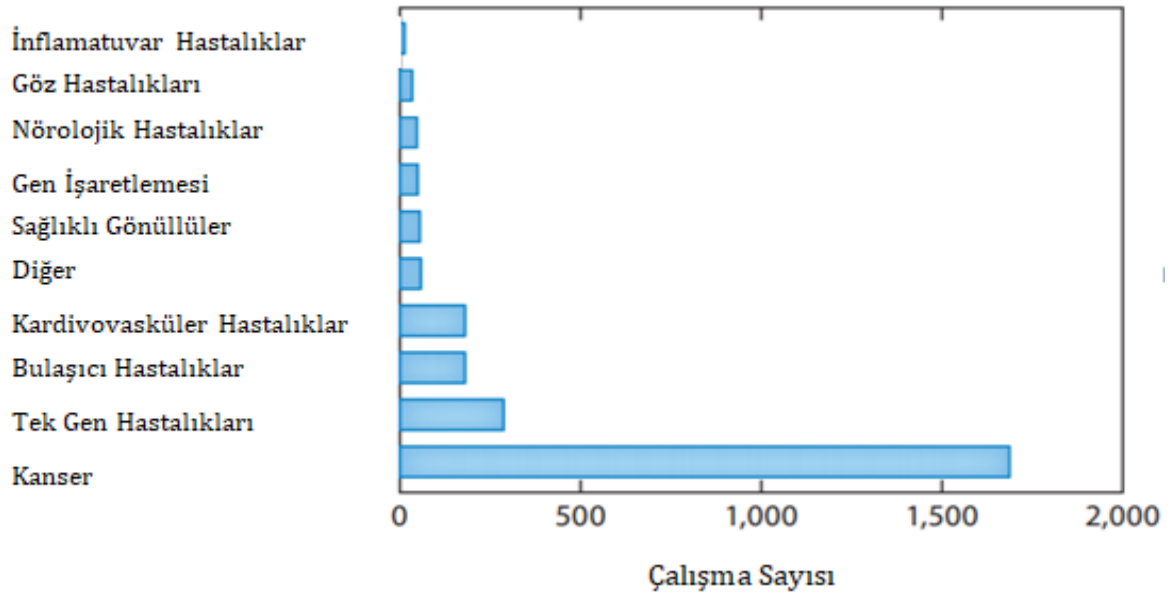
d) Sitokinler, çeşitli hücreler tarafından üretilen ve hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve yaşam sürelerinin düzenlenmesinde görev alan moleküler ağırlığı 30 kDa altında olan protein grubudur. Sitokinler, immün sistem hücrelerinin kısa mesafelerde parakrin ve otokrin tarzında iletişim kurmasına izin veren doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık sistemlerinin ana düzenleyicileridir. Bu moleküller diğer terapi ajanlarından farklı olarak direkt olarak immün hücrelerini uyarırlar. Sitokinler çoğunlukla bir uyarana yanıt olarak belirli bir süre boyunca salınır ve dolaşımdaki sınırlı yarı ömürleri nedeniyle etkilerinin kapsamı kısıtlıdır.

TNF- α (tümör nekroz faktörü), GM-CSF (granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör), IFN- α (interferon alfa) gibi sitokinler ve ayrıca IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 gibi bazı interlökinler aktif immünoterapide görev alan ajanlar olarak işlev görebilir. Sitokinlerin immün sistem üzerindeki etkisi birkaç farklı mekanizma ile açıklanabilir. Bunlar; hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve efektör CD4 + ve CD8 + T lenfositleri ve doğal katil hücrelerinin (NK) uyarılması, granülositler, monositler/makrofajlar ve T lenfositlerin oluşumuna neden olan hematopoietik sistemin öncül hücrelerinin proliferasyonunun ve farklılaşmasının uyarılması ve IFN- γ ve immünoglobulinlerin immün sistem hücreleri tarafından sentezinin uyarılmasıdır. Literatürde çok sayıda hayvan tümör modeli çalışması, sitokinlerin yüksek anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu göstermiş ve birçok farklı tümör tipinde denemeler yapılmıştır [44]. Özellikle; GM-CSF, IL-2, IFN- α -2b ve IL-12, metastatik melanomda, IFN- α ve GM-CSF miyeloid lösemide ve IFN- α -2b, IL-2 ve IL-12 böbrek kanseri üzerinde test edilmiştir. Sitokinlerin kanser immünoterapisinde kullanılması; tümör gerilemesini, metastaz oluşumunun önlenmesini, immünolojik belleğin gelişimini ve artan sağkalım ile birlikte hastalık nüks riskinin azaldığını göstermiştir. Ancak, TNF- α , GM-CSF ve IL-2 gibi sitokinlerin bazı klinik çalışmaları, ciddi yan etkiler nedeniyle kesinlikle sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte, sitokin (IL-2, GM-CSF, IFN- α) bazlı biyolojik terapi, geleneksel tedaviler ile kombine olacak şekilde kullanılması klinik olarak geliştirilmektedir [30]. 1986 yılında, IFN- α lösemi tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onay olan ilk sitokin olmuştur. Ardından IL-2, 1992 yılında metastatik böbrek kanseri için ve 1998 yılında ileri seviye melanom tedavisi için FDA tarafından onay almıştır [45].

2.4 Gen Aktarımı ve Nanoteknoloji

Gen aktarımı, özellikle bir hastalığın tedavi edilmesi amacı ile genetik materyalin transfer edilmesi olayıdır. Kavram olarak onlarca yıldır var olmasına rağmen, ilk klinik araştırma 1990'da nadir görülen bir immün yetmezlik bozukluğu hastalığının tedavisi için ABD'de yapılmıştır. Geçen 30 yıl boyunca, çeşitli monojenik hastalıklardan bulaşıcı hastalıklara, karmaşık nörodejenereatif bozukluklara ve kansere kadar geniş bir uygulama alanı vardır. 2017 yılı verilerine

göre, çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla yapılan gen transferi çalışmalarının belirli hastalıklara göre sayısı Şekil 2.3'te verilmiştir [46], [47].



Şekil 2.3 2017 yılı verilerine göre gen transferi çalışmalarının sayısı ile ilgili hastalıklar [46]

Gen aktarımı tekniklerinde, iki ana maddenin önemi vardır; genetik materyal ve taşıyıcı ajanın özellikleri. Çıplak deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) molekülleri, endositik yolaktaki lizozomlar ve membranlar dahil birçok biyolojik bariyeri geçerek bozunmadan bir hücreyi transfekte edememektedir. Bu nedenle enzimatik bozulmaya karşı, nükleik asitleri korumak için taşıyıcı bir sistemde taşınması gerekir [48]. Genetik materyali koruyan ve amaçlanan hücre tipinin hücresel veya nükleer iç kısmına transferini sağlayan taşıyıcı ajanlar vektör olarak adlandırılır. Taşıyıcı hedefe ulaştığında, hücreyi transfekte etmek amacı ile degrade olarak nükleik asitleri serbest bırakmalıdır. İdeal vektör; genetik materyali hücrelere aktarmak için etkili, toksik olmayan, immünojenik ve kanserojenik olmamalıdır.

Başarılı bir gen aktarımı için iyi bir vektörün sahip olması gereken bazı özellikler vardır. Bunlar[49]:

- Konak hücreye kolayca entegre olabilmesi,

- Transferi yapılacak kargonun bozunmadan hücrenin hedef bölgesine aktarılabilmesi,
- Üretiminin kolay, tekrarlanabilir ve çok miktarlarda yapılabilmesi,
- Saklama koşullarında uzun süre stabil kalabilmesi,
- Hedef hücreye aktarılan genin anlatım düzeyinin istenilen düzeyde olabilmesi,
- Taşıma kapasitesinin büyük olması,
- Biyobozunur ve biyouyumlu olması olarak belirlenebilir.

Gen aktarımı temelde, değişikliğe uğrayan hücre tipine göre germ hattı hücrelerine ve somatik hücrelere gen aktarımı olmak üzere ikiye ayrılır. Germ hattı hücrelerine gen aktarımında, sperm, yumurta, zigot ve erken dönem embriyolara aktarım yapılabilmektedir. Ancak bu hücrelerin hepsi, genetik olarak aktarılan hücreler olduğundan dolayı bu hücre aktarım yöntemi birçok ülkede etik açıdan doğru kabul edilmediği için yasal değildir. Somatik gen aktarımında ise aktarılan genetik materyal hedef hücreye entegre olsa da değişiklik bir sonraki nesle aktarılmaz. Günümüzde geliştirilen tüm gen nakli çalışmaları, somatik hücrelerine yapılmaktadır [47].

Ayrıca gen aktarımı sistemi, hedeflenen genlerin alıcı hücreye aktarıldığı ortama göre ikiye ayrılır. Bunlar: laboratuvarda yapılan gen aktarımı (*ex vivo*) veya direkt hastaya nakil (*in vivo*) olarak iki şekildedir. *Ex vivo* gen aktarımında, hedef hücreler hastadan temin edilir ve laboratuvar ortamında kültüre edilir. Nakil yapılacak hücreler seçilir, hücre kültüründe *in vitro* aktarım yapılır ve hastaya transfer edilir. Bu yöntemde hastanın kendi hücrelerini kullanmak, hücrelerin reddedilmemesi açısından avantaj sağlar. *In vivo* gen aktarımı ise, hedef hücreye *in vitro* koşullarda transfer yapılamaması durumunda tercih edilen yöntemdir. Transferdeki hedefleme en büyük problem olarak tespit edilmiştir. Bu yöntemde gen nakli yapılan hücreler *in vitro* ortamda değerlendirilmeden transfer edildiğinden, etkinlik transfer işleminin başarısına bağlıdır [50].

Gen aktarımı yöntemleri üç ana gruba ayrılır. Bunlar; fiziksel, kimyasal ve biyolojik gen aktarımıdır. Fiziksel gen aktarımında, aktarılmak istenen genetik materyal hedef hücreye fiziksel bir kuvvet kullanılarak transfer edilir. Kimyasal gen

aktarımında, kimyasal ajanlar kullanılarak hedef hücreye aktarım yapılır. Biyolojik gen aktarımı ise, genetik materyal *in vivo* veya *in vitro* koşullarda hücrelere özellikle virüsler kullanılarak transfer edilir. Kullanılan üç farklı yöntemin sisteme özgü avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2’de gösterilmiştir [51].

Tablo 2.2 Gen aktarım metotlarının avantaj ve dezavantajları [51], [52]

METOT	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
FİZİKSEL	Gen transferinde etkinlik yüksektir. Her hücre tipinde uygulanabilir. Bölünen ve bölünmeyen hücrelerde kullanılabilir. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> ortamda verim yüksektir.	Özel ekipmanlar gerektirir. Hücreleri fiziksel hasara uğrattığı, ölüme neden olabilir. Ürün miktarı düşüktür.
KİMYASAL	Ürün miktarı fazladır. <i>In vitro</i> ortamda etkinliği yüksektir ve sıkça kullanılır. Hızlıdır. Güvenli ve uygun maliyetli bir yöntemdir.	Bölünmeyen hücrelerde etkinliği düşüktür. <i>In vivo</i> sistemlerde transfeksiyon etkinliği düşüktür. Gen ekspresyonu süresi kısadır.
BİYOLOJİK	Taşıma kapasitesi fazladır. Bölünen ve bölünmeyen hücrelerde kullanılabilir. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> çalışmalarda verim yüksektir.	Gelecekte ortaya çıkabilecek biyogüvenlik problemleri vardır. Maliyeti yüksektir. Onkogeneze ve insersiyonel mutasyon riski vardır.

2.4.1 Viral Vektörler

Vektörler viral ve viral olmayan vektörler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Viral vektör sistemlerinde virüsler, hücreye tutunmak ve genetik materyali *in vivo* veya *ex vivo* ortamlarda aktarmak için geliştirilen “küçük” sistemler olarak düşünülebilir. Viral vektörler, biyolojik taşıma sistemleridir. Viral vektörlerin kendine has avantaj ve dezavantajları vardır. Viral olmayan sistemlere göre, daha yüksek etkinlikte ve daha dayanıklıdır. Ayrıca, beyin gibi bazı bölgelerde daha etkin şekilde gen aktarımında bulunurlar. Ancak, biyogüvenliğin sorun olması, belirli hücre tiplerine hedefleme yapılamaması, gen aktarımı işleminden sonraki 7-14 gün sonra etkinliğin düşmesi ve virüslerde DNA taşıma kapasitesi viral olmayan vektörlere kıyasla daha az olması gibi ciddi dezavantajları vardır [53]. Literatürde yer alan çalışmalara göre en sık kullanılan viral vektörler; adenovirüsler, adeno-ilişki virüsler, herpes simplex virüs ve lentivirüslerdir. Adenovirüsler; zarfsız çift zincirli DNA taşıyan virüsleridir ve 1953 yılında adenoidlerden izole edilmiştir. 7.5-30 kb aralığındaki gen bölgesini transfer edebilirler. Bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte edebilen vektörlerdir. Genoma entegre olmazlar ve dolayısıyla geçici ekspresyon yaparlar. Transdüksiyon etkinliği yüksektir ve ekspresyon birkaç gün içinde başlar ancak immün hücrelerini tetiklerler. Adeno-ilişki virüsler (AAV); zarfsız ve tek zincirli DNA taşıyan parlovirüs ailesine ait olan virüslerdir. Yaklaşık 5 kb'lık bir gen bölgesini transfer edebilir. Bölünebilen ve bölünemeyen hücreleri enfekte ederler. Genoma entegre olabildikleri için kalıcı ekspresyon vardır. Transdüksiyon etkinliği yüksektir ve ekspresyon birkaç hafta içinde başlar. Hücreler üzerindeki toksisite minimal düzeydedir. Üretim yöntemlerinin kompleks olması dezavantajıdır. Herpes Simplex virüs (HSV); kendi genomunda 150 kb'lık çift zincirli doğrusal DNA ve 80 gen bölgesi bulunduran bir virüstür. 30-50 kb aralığındaki gen bölgesini konakçıya transfer edebilir. Bölünebilen ve bölünemeyen hücreleri enfekte ederler. Genoma entegre olmazlar fakat konakçıyı uyku haline geçirdikleri için ekspresyon uzun süreli ve stabildir. Ekspresyon birkaç saat içinde başlar. Ancak, transdüksiyon etkinliği düşüktür, üretim yöntemleri komplekstir ve hücreler üstündeki toksik etkisi yüksektir. Lentivirüsler, yaklaşık 8 kb'lık yabancı gen bölgesini konak hücreye transfer edebilir. Bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte edebilen retrovirüs formlarıdır. Genome entegre

oldukları için kalıcı ekspresyon vardır. Genoma entegre olmaları ile beraber bazı hücreler bu virüslere karşı direnç geliştirebilir ve hücreler üstündeki toksik etkileri fazladır.

2.4.2 Viral Olmayan Vektörler

Viral olmayan vektörler, viral vektörlere alternatif olarak geliştirilmiş vektörlerdir. Viral olmayan vektörlerin avantajları; biyoyumlu ve biyogüvenli olmaları, düşük immünojenite ve toksisiteye sahip olmaları, kimyasal olarak amaca uygun dizayn edilebilme esnekliğine sahip olmaları, yüksek gen taşıma kapasitesidir. Viral olmayan gen aktarımı fiziksel ve kimyasal yollarla yapılabilir.

Fiziksel gen aktarımı başlıca; gen tabancası, elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve sonikasyon yöntemleri ile yapılır. Gen tabancası yöntemi, 1990'lı yıllardan beri özellikle bitkilere gen aktarımında kullanılan bir yöntemdir. Temelde, altın gibi ağır metal içeren partiküller aracılığı ile çıplak DNA'nın, hedef hücrenin yüzeyine doğrudan gönderilmesine dayanır [54]. Elektroporasyon, hücre duvarını yüksek yoğunluklu elektrik akımına maruz bırakarak geçici destabilizasyonuna neden olarak makromoleküllerin hücre içine alınması prensibi ile uygulanır. Bu yöntem literatürde ilk olarak 1991 yılında kayıt altına alınmıştır [55]. Mikroenjeksiyon, fiziksel olarak hedef hücreye gen transferinin en direkt yoludur. Yöntem, cam mikropipetler yardımı ile ilgili hücrenin sitoplazmasına ya da çekirdeğine aktarılacak kargonun gönderilmesi suretiyle yapılır. Sonikasyon ise ses dalgaları kullanılarak hücre duvarında geçici destabilizasyona sebep olarak kargonun hücre duvarını aşarak hedef hücreye aktarımı sağlanır [56].

Kimyasal yöntemler ile yapılan gen aktarımı, biyolojik gen aktarımına alternatif olarak geliştirilmiştir. Kimyasal metotlar ile üretilen taşıyıcılar aşağıda belirtilen şu özellikler esas alınarak sentezlenmelidir:

- Belirli hücrelere uygun tasarlanarak hedefleme yapmak için tasarlanabilmelidirler,
- DNA'yı sitozolik yolaktaki nükleazlardan korumak için yoğun paketlenme yapabilmelidirler.

- DNA'nın sürekli veya belli aralıklarla salınımını sağlamak için tasarlanabilirler.
- Hedef bölgeye göre, DNA'dan sitoplazmada veya çekirdekte ayrılabilmelidirler.

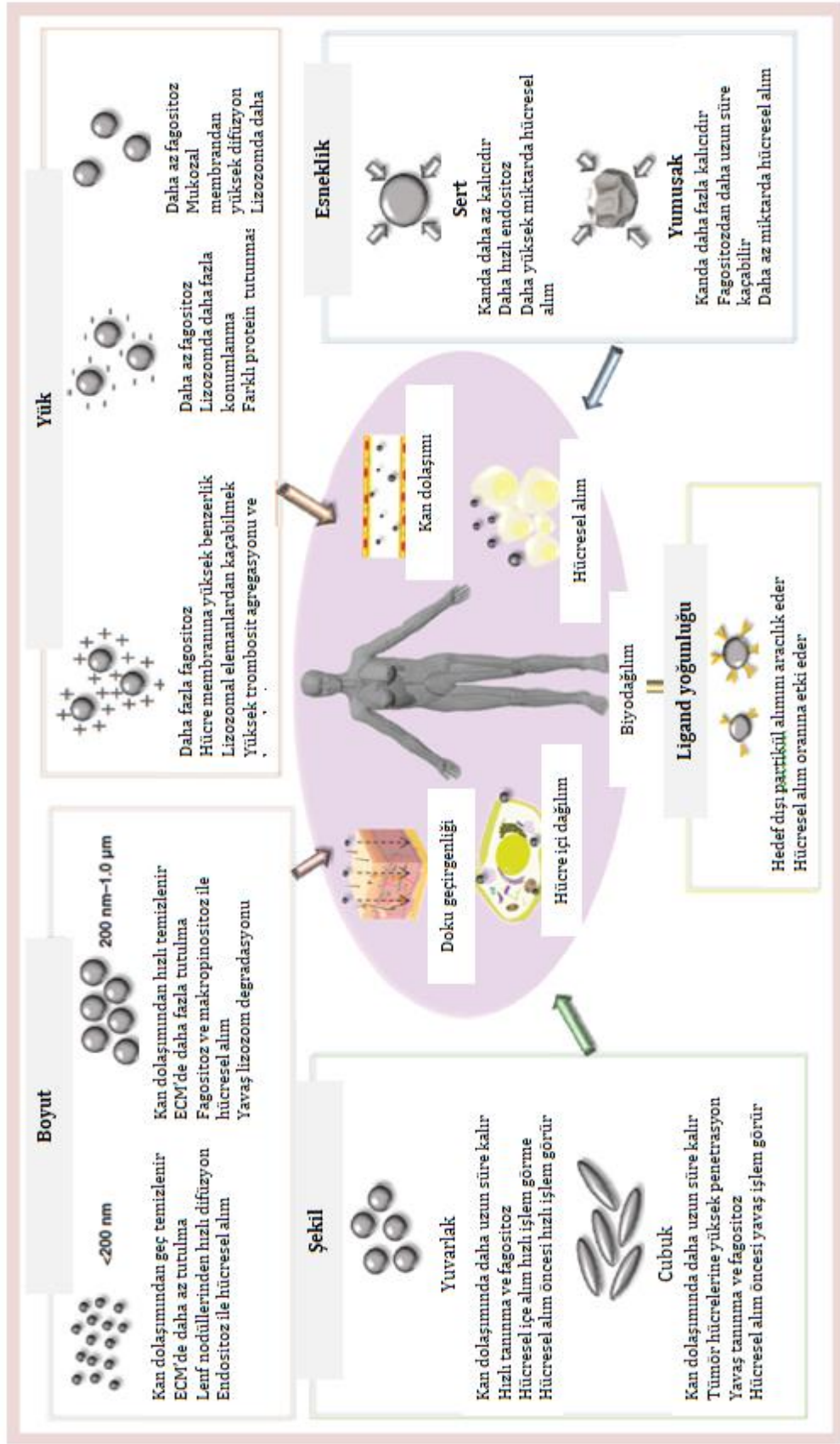
2.4.2.1 Nanopartiküler Sistemler

Nano, Yunanca “cüce” anlamına gelmektedir. Fiziksel olarak bir nanometre (nm), bir metrenin (m) milyarda biri 10^{-9} değerindedir. Örneğin, atomların büyüklüğü yaklaşık 0,1 nm ve insan saçının kalınlığı yaklaşık 100.000 nanometredir. Nanoteknoloji, ilk kez 1959 yılında Nobel Fizik Ödülü sahibi olan Richard P. Feynman tarafından ortaya atılmış bir kavramdır [57]. Nanoteknoloji, başta sağlık bilimleri, mühendislik, fizik, kimya ve biyoloji olmak üzere çeşitli bilimlerin kesiştiği mulidisipliner bir alan olarak ifade edilebilir. En basit tanım ile nanoteknoloji, nanoboyutlarda materyal ve cihazlar geliştiren bir teknoloji olarak anlatılabilir. Günümüzde, 21. yüzyılın endüstriyel devrimi olarak tanımlanan bu teknolojinin en önemli avantajı temel bilimler ile uygulamalı bilimlerin birlikte kullanılabilmesidir. Nanoteknolojinin sağlık bilimleri alanındaki bazı uygulamaları Şekil 2.4'te gösterilmiştir [14].



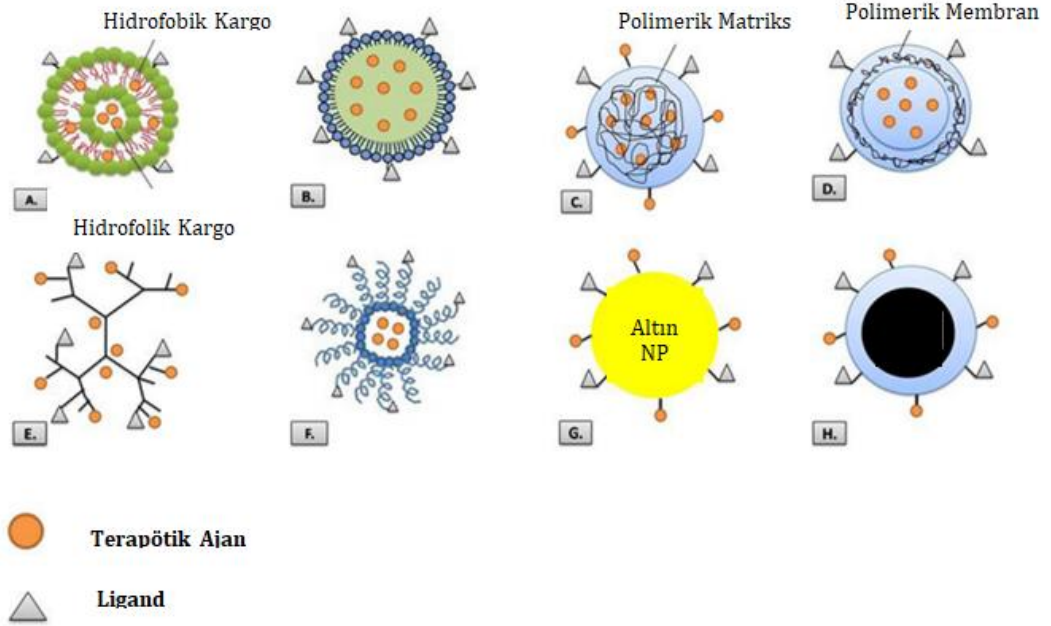
Şekil 2.4 Nanoteknolojinin sağlık bilimleri alanındaki uygulamaları [14]

Nanoteknoloji ile beraber özellikle kanser tedavisinde kullanılmak üzere birçok nanotaşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu sistemlerden en sık kullanılan ve en çok gelişim gösteren sistem nanopartiküllerdir. Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen parçacıklardan oluşan malzeme sınıfıdır. Yapılan çalışmalarda, boyutun parçacıkların fizikokimyasal yapısı üzerine etkisi olduğunu tespit ettikçe nanoboyuttaki partiküllerin de önemi artmıştır [58]. Nanopartiküllerin sahip olduğu özellikleri Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Geçtiğimiz otuz yılda özellikle otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve ayrıca kanser tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere yoğun bir şekilde çalışılmaktadır [59]. Bunların yanında makromoleküllere göre daha kolay endositoza uğradıkları için gen tedavisi çalışmalarında kullanılmak amacıyla sıkça vektör olarak tercih edilirler [60]. Literatürde, nanopartiküllerin DNA, ilaç, etken madde vs. transferinde oldukça sık kullanılmasıyla beraber farklı yapılarda birçok nanotaşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sistemler Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Nanopartiküllerin özellikleri [61]

Özellikle nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile beraber, negatif yüklü DNA ile bağ yapabilen pozitif yüklü taşıyıcılar ön plana çıkmaktadır. Bunlar; katyonik polimerler ve katyonik lipidler olarak sınıflandırılabilir.

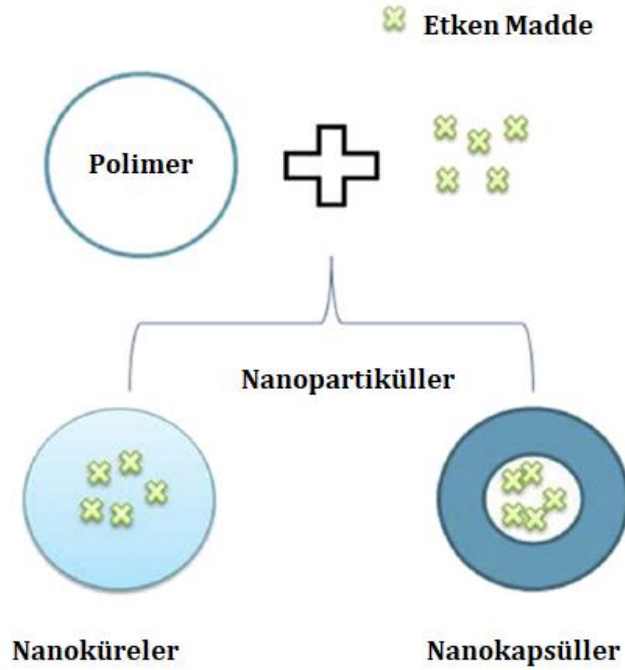


Şekil 2.6 Sık kullanılan nanotaşıyıcı sistemler. (A: Lipozomlar, B: Katı lipid nanopartiküller, C: Nano küreler, D: Nanokapsüller, E: Dendrimerler, F: Polimerik miseller, G: Metal bazlı nanopartiküller, H: Manyetik nanopartiküller)[62]

a. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller (PNP), 10-1000 nm aralığında bir boyuta sahip katı koloidal parçacıklardır ve biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu polimerlerden veya kopolimerlerden üretilir. İlaç taşıyıcı içinde taşıyıcının yüzeyine fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmış olarak taşınır. Bu nanotaşıyıcı sistemler sahip oldukları; küçük boyut, biyolojik olarak bozunabilirlik, suda çözünürlük, toksik olmama, uzun raf ömrü ve depolama sırasında stabilite gibi avantajlarından dolayı etken madde taşınımında sıkça kullanılırlar. Polimerik nanopartiküllerin temel işlevi, farmasötik ajanı belirli bir hedef bölgeye ileterek, daha yüksek bir ilaç konsantrasyonu elde etmek ve uçucu ilaçların stabilitesini ve ilacın etkinliğini ve verimliliğini arttırmaktır. Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması (Şekil 2.7), sentez yöntemine göre yapılmaktadır: nanokapsüller ve nanoküreler. Nanoküreler, ilacın bir matris sistemi içinde yayıldığı sistemlerdir.

Nanokapsüller ise, ilacı çevreleyen bir polimer zardan oluşan kapsüller şeklindedir. Nanopartiküler sistemlerde kullanılan polimerler hem doğal hem de sentetik olabilmektedir. Çalışmaya uygun olarak kullanılacak polimerin seçimi çok önemlidir. Polimer seçimi yaparken polimerin, biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu, toksisite düzeyi ayrıca yüklenecek etken maddenin özellikleri, dozu ve salım süresi önemlidir. Sık kullanılan sentetik polimerler; Poli(laktid-ko-glikolid asit) (PLGA), poli(glikolik asit) (PGA) ve Poli(laktik asit) (PLA) olarak belirtilebilir [63], [64]. Sık kullanılan doğal polimerler ise jelatin, aljinat, albümin ve kitosan şeklindedir. Taşıyıcı sistemlerde sentetik polimerler doğal polimerlere göre üretimi ve işlenmesi daha kolay olduğundan daha ön plandadır.



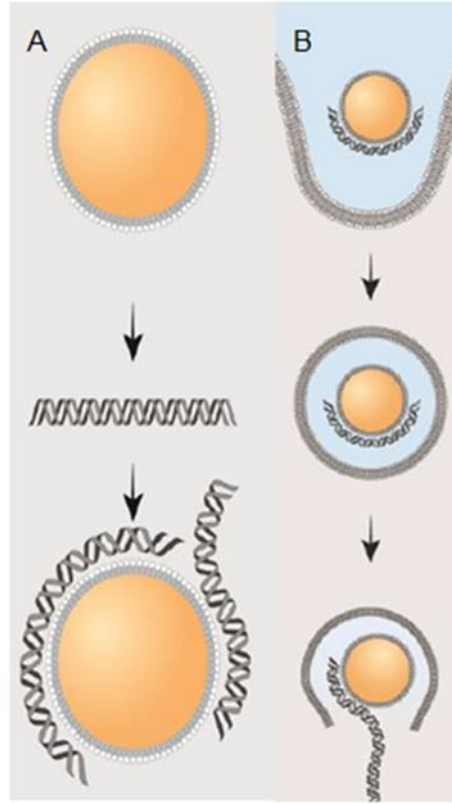
Şekil 2.7 Polimerik nanopartiküllerin sınıflandırılması [64]

b. Katı Lipid Nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller (KLN), 1991 yılından beri polimerik nanopartiküllere, lipozomlara ve emülsiyonlara alternatif olarak geliştirilen Müller ve arkadaşları tarafından geliştirilen taşıyıcı sistemlerdir [65]. KLN'ler suda veya sulu sürfektan madde çözeltisi içinde çözünmüş halde bulunan boyutları 50-1000 nm arasında değişen kolloidal partiküllerdir. KLN'ler, küçük boyutta olmaları, geniş yüzey alanı, ilaç yükleme kapasitesinin fazla olması gibi benzersiz özelliklerinden dolayı farmasötik çalışmalarda oldukça sık kullanılır. Ayrıca katı lipid nanopartiküller, literatürde var olan polimerik nanopartiküller, lipozomlar ve emülsiyonlar gibi taşıyıcı sistemlerin sahip olduğu dezavantajları aşabilmek için geliştirilmiş taşıyıcı sistemlerdir. Bu dezavantajlar; polimer degradasyonu ve sitotoksitesi, büyük çapta üretim yapılamaması, stabilitenin yetersizliği, ilaç kaçağı ve füzyonu, fosfolipid degradasyonu, yüksek maliyetli üretim ve sterilizasyon problemleridir [66].

KLN'Ler 2000 yılında beri gen transferinde sıkça kullanılmaktadır. Negatif yüklü DNA veya RNA'nın taşınması için tasarlanan sistemlerde, elektrostatik etkileşimlerden faydalanmak amacı ile pozitif yüklü taşıyıcılar tercih edilmektedir. KLN'ler yapısında, benzalkonyum klorür, setilpiridinyum klorür, setrimit, Tween 80 gibi pozitif yüklü sürfektanlar ile katyonik özellikte olmaktadır. KLN bazlı gen aktarımı çalışmalarında matriks ve sürfektan seçimi transfeksiyon etkinliğini de etkileyeceğinden dolayı hayati önem taşımaktadır. Katı lipid nanopartiküller ve transfer edilecek DNA'nın oluşturduğu kompleks Şekil 2.8 'de gösterilen şekilde olmaktadır. DNA, KLN'nin etrafındaki pozitif yük ile doğal olarak birleşmekte ve bu şekilde taşınmaktadır. KLN-DNA kompleksi hücre içine endositoz ile alınır fakat endozomal kaçış mekanizmaları tam olarak belirlenmiş değildir. Endositoza dair literatürde KLN reçetesinde bulunan Tween 80 gibi bazı sürfektanların zar geçirgenliğini arttırdığı dolayısıyla transfeksiyon etkinliğinde artışa neden olduklarını görülmüştür. DNA'nın tutulmasında ayrıca yapıdaki hidrofobik ve hidrofilik kısımların uzunluğu ve tipi önemli yer tutmaktadır. Şekil 2.8'de KLN-DNA kompleksinin hücre için endositoz ile alındıktan sonra lizozomal

destabilizasyon ile beraber DNA'nın sitozolde serbest bırakılması gösterilmektedir [67].



Şekil 2.8 Katı lipid nanopartikül aracılı gen aktarımı. (A: KLN ve DNA kompleksinin oluşması, B: KLN-DNA kompleksinin endositozu) [67]

Lipid bazlı nanopartiküller dört ana kısımdan oluşur: katyonik bir polar baş grubu, bir hidrofobik zincir, bir bağlayıcı ve bir omurga alanı. Katyonik baş grubu, DNA ve lipid nanopartiküllerin doğal olarak birleşmesinde önemli bir rol oynayan lipoplex adı verilen bir kompleks oluşturmak için DNA molekülü üzerindeki negatif yüklü fosfat gruplarını çeker. Bir lipid nanopartikülün hidrofobik kısmı bir steroid veya bir alkil zincirinden oluşur, uzunluğu ve tipi transfeksiyon etkinliğini etkiler. Bağlayıcı grup, polar baş grubunu hidrofobik bölümle birleştirir ve lipid nanopartiküllerin kimyasal stabilitesine, biyolojik olarak bozunabilirliğine ve transfeksiyon verimliliğine etki eder. Omurga alanı, kafa grubunu hidrofobik alandan ayıran bir yapı iskelesi görevi görür. Lipid nanopartiküllerin hedeflenmesini ve hücre içine alımını arttırmak için yeni yan zincirler eklenerek manipüle edilebilir [48].

Katı lipid nanopartiküllerin avantajları [66], [68];

- İlaç salınımının kontrollü ve/veya hedefli yapılabilmesi,
- Biyouyumluluğun yüksek olması,
- Buharla sterilizasyonun yapılabilmesi,
- Enkapsüle edilmiş içeriğin salınım kinetiğinin daha kolay kontrol edilebilmesi,
- Taşıyıcı bünyesinde tutulan biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımının arttırılabilmesi,
- Var olan taşıyıcı sistemlerin eksiklerini aşabilecek potansiyelde olabilmesi,
- Taşıyıcı bünyesinde tutulan kararsız bileşiklerin kimyasal korunmasının yapılabilmesi,
- Biyopolimerik nanopartiküllere göre çok daha kolay üretiminin yapılabilmesi,
- Sisteme özgü çözücü gerekmemesi,
- Kolay elde edilebilir hammaddeler ile çalışılabilmesi,
- Çok uzun raf ömrüne sahip olması (bir yıldan fazla),
- Uygulama alanı çok yönlüdür,
- Yüksek ölçeklerde ve uygun maliyetli üretim yapılabilmesi,
- Kargo elemanın transfer aşamasında stabil kalabilmesi,
- Fazla miktarda kargo elemanın taşınabilmesi,
- Suda çözünebilen moleküllerin aktarımı için idealdir.

Katı lipid nanopartiküllerin dezavantajları [66], [68];

- Partikül boyutunun büyümesi,
- Öngörülemeyen jelleşme eğilimi,
- Partikülün taşıdığı içeriği bazı durumlarda serbest bırakabilmesi,
- Polimerik geçişlerin beklenmedik dinamikleridir.

2.5 Nanopartikül Hazırlama ve Karakterizasyon Yöntemleri

2.5.1 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Katı lipid nanopartikül sentezinde kullanılan çeşitli birçok yöntem vardır. Kullanılan lipid, sürfektan ve eğer varsa kosürfektanın özelliklerine ve taşıyıcı ajanın amacına yönelik olarak metod seçilmelidir. Başlıca yöntemler; yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, mikroemülsiyon yöntemi, emülsiyon-çözücü evaporasyon yöntemi, çözücü difüzyon yöntemi, çözücü enjeksiyon yöntemi, çöktürme yöntemi, süperkritik akışkan yöntemi ve sprey kurutma yöntemidir.

2.5.1.1 Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi (HPH):

Katı lipid nanopartikül sentezinde güvenilir ve uygun bir yöntemdir. Yüksek sıcaklıklarda (sıcak HPH) veya oda sıcaklığının altında (soğuk HPH) gerçekleştirilir. Bu yöntemde, sıvı dar bir boşluktan yüksek basınçla itilir. Partikül boyutunun küçültülmesi yüksek kesme gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri nedeniyle sağlanmaktadır. Homojenizasyon tekniğinde iki genel yaklaşım vardır: sıcak ve soğuk homojenizasyon. Sıcak homojenizasyon tekniğinde KLN'lerin hazırlanmasında kullanılan lipidler, erime noktalarının 5-10°C üstünde ısıtılarak eritilir. Kargo erimiş lipidlerde çözülür ve ardından lipidin erime noktasının üzerindeki bir sıcaklıkta homojenizasyon işlemi için sıcak sulu bir sürfektan çözeltisi içinde dağıtılır. Hedeflenen partikül boyutu elde edilene kadar döngü tekrarlanabilir. Numunenin oda sıcaklığında soğutulması ile KLN'ler elde edilir. Soğuk homojenizasyon tekniğinde, taşınacak etken madde/ilâç eritilmiş lipid içinde çözdürülür, ardından sıvı azot veya kuru buz vasıtasıyla lipidin içine hapsedilir. Hızlı soğutma, lipid matrisinde ilacın katı bir çözeltisinin oluşumuna neden olur. Katı çözelti daha sonra mikropartikül boyutuna getirilir. Katı lipid mikropartiküller, emülsiyonlaştırıcılar içeren soğuk sulu bir faz içinde çözdürülür ve akabinde oda sıcaklığında homojenleştirilir. Soğuk homojenizasyon, homojenleştirme sırasında sıcaklığa bağlı ilâç degradasyonu ve sulu faza ilâç yayılımı sorunlarının üstesinden gelir. Bununla birlikte, ilacın erimiş lipid içinde çözdürülmesi ve homojenleştirme işlemi sırasında üretilen sıcaklık nedeniyle ilacın ısıya maruz kalması önlenememektedir [69].

2.5.1.2 Mikroemülsiyon Yöntemi:

Mikroemülsiyonlar, lipid faz, sürfektan, kosürfektan (yardımcı sürfektan madde) ve sudan oluşan berrak, termodinamik olarak kararlı, mikroheterojen dispersiyonlardır. Suyu mikroemülsiyonların eklenmesi, ince parçacıklar oluşturan lipid fazının çökmesine yol açar. Gasco araştırma grubu, KLN'lerin hazırlanması için bu tekniği kullanmıştır. Öncelikle, lipid (yağ asidi/glisericit) eritilir ve ilaç erimiş lipid içinde dağıtılır. Su, sürfektan ve kosürfektan madde, lipidin erime sıcaklığına eşit bir sıcaklığa kadar ısıtılır. Bu sulu sürfektan çözeltisi, şeffaf mikroemülsiyon elde etmek için hafifçe karıştırarak lipide ilave edilir. Bu mikroemülsiyon daha sonra 2-10°C'de manyetik karıştırıcıda suda çözündürülür. Soğuk sulu ortamda lipid damlacıklarının hızlı bir şekilde yeniden kristalleştirilmesi ile KLN'ler üretilir. KLN'lerin, karıştırma işlemi nedeniyle değil, çökme nedeniyle oluştuğuna dikkat edilmelidir. Elde edilen lipid nanopartiküller, su ile yıkanabilir ve liyofilize edilebilir [69].

2.5.1.3 Emülsiyon-Çözücü Evaporasyon Yöntemi

Lipid, sulu bir fazda emülsiyon haline getirilmiş, suyla karışmayan organik çözücü (kloroform veya sikloheksan) içerisinde çözündürülür. Çözücünün buharlaştırılması üzerine, lipidin sulu ortam içinde çökmesi nedeniyle nanopartikül dispersiyonu oluşur. Ortalama partikül boyutu organik fazdaki lipid konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük lipid yüzdesi (%5) ile daha küçük partiküller elde edilebilmektedir. Artan lipid içeriği ile, dispersiyon fazdaki viskozite artar ve buna bağlı olarak homojenizasyon verimliliği azalır. Bu tekniğin avantajı, transferi yapılacak içeriğin termal bozulmasının önlenmesidir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, kullanılan organik çözücülerin kalıntıları toksik olabilmesidir [68], [69].

2.5.1.4 Çözücü Difüzyon Yöntemi

KLN'lerin sentezinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. İlk adım, lipid içeren kısmen su ile çözünebilen bir çözücü ile su emülsiyonu içinde bir çözücü hazırlamaktır. Benzil alkol veya bütillaktat gibi toksisitesi az, suyla karışabilen çözücüler kullanılmaktadır. Lipid emülsiyonunun suya aktarılması ve sürekli karıştırılması ile lipid fazın damlacıkları, organik çözücünün difüzyonu ile beraber

lipid nanopartiküller olarak katılır. Çökelen partiküller su ile yıkanır ve santrifüj edilir. Ardından, süspansiyon ultrafiltrasyon ile saflaştırılması ile benzilalkolün neredeyse %99,8'i elimine edilir. Yüksek enkapsülasyon oranı, homojenizasyon işleminin atlanması, kolay ölçeklendirilebilme, kolay ve tekrarlanabilir sentez basamakları bu yöntemin avantajları arasındadır. Ancak, emülsifikasyon işlemi sırasında ilacın sızdırılabilmesi riski, süspansiyondan uzaklaştırılması gereken çok fazla suyun olması gibi dezavantajlara da sahiptir [66], [69].

2.5.1.5 Çözücü Enjeksiyon Yöntemi

KLN sentezi için temel ilke çözücü difüzyon metoduna benzemektedir. KLN'ler, suda çözünebilen bir çözücü içindeki bir katı lipid çözeltisinin suyla hızla enjekte edilmesiyle hazırlanır. Bu yöntemde normal olarak kullanılan çözücüler aseton, etanol, izopropanol ve metanoldur [70].

2.5.1.6 Çöktürme Yöntemi

KLN'ler çözücü evaporasyon tekniğine benzer bir yöntem olan ve çözücü gereksinimi ile karakterize edilen çöktürme yöntemi ile sentezlenir. Gliserit, organik bir çözücü (kloroform vb.) içerisinde çözündürülür ve çözelti sulu bir fazda emülsifiye edilir. Çözücünün buharlaştırılmasından sonra, lipid çöker ve nanopartiküller oluşturur. Organik çözücülerin kullanılması bariz bir dezavantajdır [70].

2.5.1.7 Süperkritik Akışkan Yöntemi

Bu yöntem KLN üretimi için nispeten yeni bir tekniktir ve çözücü olmadan üretim avantajına sahiptir. Bu teknolojiye toz ve nanopartikül hazırlanması için çeşitli varyasyonlar vardır. Gaz doymuş çözeltiler, lipid malzemenin eritilmesine yardımcı olurken, daha sonra lipid eriyik, gaz doymuş çözeltiler ile birlikte basınç altında süper kritik akışkan içinde çözülür. KLN, süperkritik karbondioksit çözeltileri (RESS) yönteminin hızlı genişlemesi ile hazırlanabilir. Karbondioksit (% 99.99) bu yöntem için bir çözücü olarak iyi bir seçimdir [66], [71].

2.5.1.8 Sprey Kurutma Yöntemi

Sulu bir KLN çözeltisini bir ilaç ürününe dönüştürmek için liyofilizasyona alternatif bir prosedürdür. Liyofilizasyondan daha ucuz bir yöntemdir. Bu yöntem, yüksek sıcaklık, kesme kuvvetleri ve parçacığın kısmi erimesi nedeniyle partikül birikmesine neden olur. Bu yöntemde, en az 70°C ve üzeri erime noktasına sahip lipidler kullanılabilir. Literatürde çok sık kullanılan bir üretim yöntemi değildir [66], [71].

2.5.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri

Sentezlenen KLN'lerin karakteristik özellikleri transfeksiyon etkinliği açısından oldukça önemlidir. Ortalama partikül çapı, boyut, polidispersite indeksi ve yükü, nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini ve *in vitro* dağılımını etkiler. Partikül boyutu ve zeta potansiyel dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenir. Nanopartiküllerin morfolojik özellikleri genellikle taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ile kimyasal yapısı fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve ile tayin edilmektedir.

2.5.2.1 Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Literatürde, partikül boyutunu belirlemenin en hızlı ve en popüler yöntemi foton-korelasyon spektroskopisi (PCS) veya dinamik ışık saçılımıdır (DLS). DLS, nano ve mikron altı boyutlarda kolloidal süspansiyonlardaki Brownian nanoparçacıklarının boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Tek renkli ışığın (lazer) Brownian hareketindeki küresel parçacıkların bir çözeltisine parlatılması, ışık hareketli parçacığa çarptığında Doppler kaymasına neden olarak gelen ışığın dalga boyunu değiştirir. Bu değişiklik parçacığın boyutu ile ilgilidir. Foton korelasyon spektroskopisi (PCS), DLS'ye dayalı olarak partikül büyüklüğü ve boyut dağılımının doğru tahmini için en sık kullanılan tekniği temsil eder [72].

2.5.2.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) direkt görselleştirmeye morfolojik inceleme yapılmaya imkân sağlar. SEM karakterizasyonu için, nanopartikül numunesi öncelikle liyofize edilerek kuru bir forma dönüştürülür. Ardından altın gibi bir iletken ile kaplanarak numune tutucu üzerine yerleştirilir. Numune odaklanmış

ince bir elektron demeti ile taranır. Örneğin yüzey özellikleri, numune yüzeyinden saçılan ikincil elektronlardan elde edilmektedir. SEM tarafından elde edilen ortalama boyut, dinamik ışık saçılmasıyla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılabilir. Ayrıca, bu teknikler zaman alıcı, maliyetlidir ve sıklıkla boyutlandırma dağılımı hakkında tamamlayıcı bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır [72].

2.5.2.3 Atomik Güç Mikroskobu (AFM)

Bu teknik aynı zamanda tarama kuvveti mikroskobu olarak da bilinmektedir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), partikül boyutu ölçümünde ultra yüksek çözünürlük sunar ve atom ölçeğinde bir prob ucu kullanılarak mikron altı seviyedeki numunelerin fiziksel olarak taranmasına olanak sağlar. Özelliklere bağlı olarak, numuneler genellikle temaslı veya temassız modda taranır. Temas modu sırasında, topografik harita, probun numune boyunca yüzeye dokundurulmasıyla ve prob temassız modda iletken yüzey üzerinde asılı kalmasıyla oluşturulur. AFM'nin başlıca avantajlarından biri, iletken olmayan numuneleri herhangi bir özel işlem görmeden görüntüleme yeteneğidir. Bu özellik hassas biyolojik ve polimerik nano ve mikroyapıların görüntülenmesini sağlar. Ayrıca AFM (herhangi bir matematiksel hesaplama olmadan), çeşitli biyolojik koşulların etkisini anlamada yardımcı olan boyut, boyut dağılımı ve gerçek resmin en doğru tanımını sağlar [72].

2.5.2.4 Yüzey Yükü

Partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli nanopartiküllerin temel özellikleridir. Yüzey yükü ve yük yoğunluğu, nanoparçacıkların biyolojik çevre ile etkileşimini ve ayrıca biyoaktif bileşiklerle elektrostatik etkileşimlerini belirler. Kolloidal materyalin stabilitesi genellikle nanopartiküllerin zeta potansiyeli ile analiz edilir. Zeta potansiyeli, yüzey yükünün dolaylı bir ölçüsüdür. Dış Helmholtz düzlemi ile kesme yüzeyi arasındaki potansiyel fark değerlendirilerek elde edilebilir. Taneciklerin stabilitesini sağlamak ve birikmesini önlemek için zeta potansiyel değerleri (pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyel değerleri) elde edilir. Zeta potansiyel değeri -10 mV ile +10 mV arasındaki partiküller genellikle nötral, +30 mV ve üstünde olanlar katyonik ve -30 mV'un altında olanlar ise anyonik olarak değerlendirilmektedir. Yüksek zeta potansiyele sahip

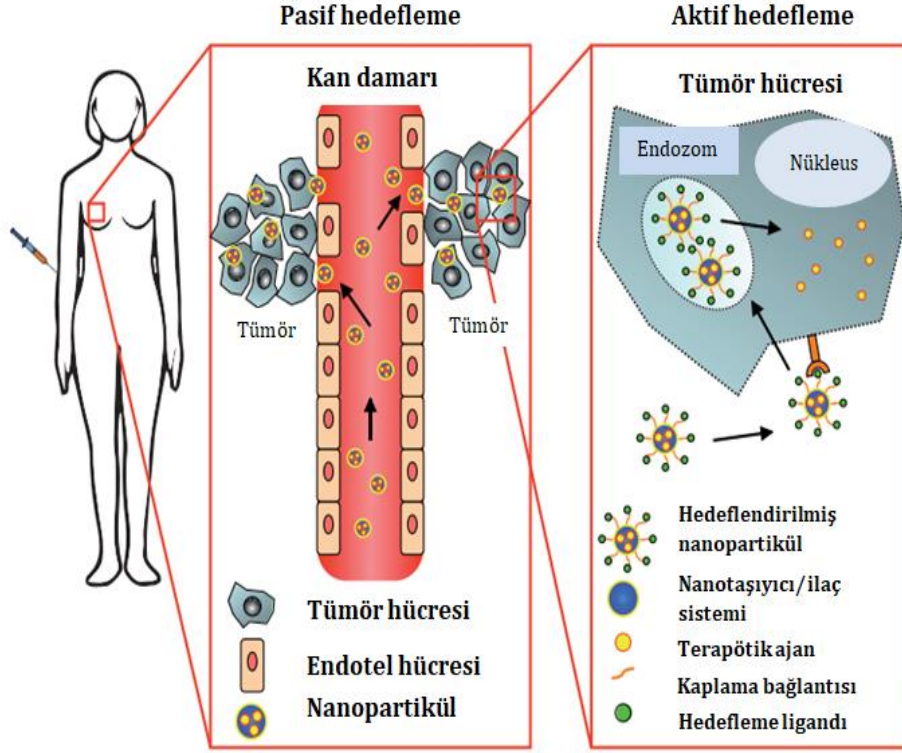
partiküller, verilen koşullar altında elektrostatik itme ile koloidal dispersiyonu stabilize edebilir.

2.5.2.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Karmaşık ve spesifik örneklerin karakterizasyonunda kullanılan Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR), adsorbantların nanopartikül yüzeyi üzerindeki varlığını belirlemek için kullanılmaktadır. IR spektrumu, nanopartikülün yapısındaki atomların arasındaki bağların moleküler vibrasyonuyla oluşan frekanslara denk gelen absorpsiyon piklerinden oluşur. Her madde kendine özgü bir spektruma sahiptir [73].

2.6 Nanopartiküllerin Tümör Hücrelerine Hedeflendirilmesi

Nanopartiküllerin hastalıklı dokulara seçici olarak iletilmesi, nanotıp alanındaki en büyük sorunlardan birisidir. İdeal nanopartikül bazlı terapötikler, aktif terapötik ajanların tümör hücreleri hariç hedef dışı etkileri en aza indiren veya ortadan kaldıran patolojik dokulara spesifik hedeflere sahip olmalıdır. Nanopartiküler aktarım sisteminde, gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma (EPR) uygun olmadığında veya verimsiz olduğunda patojenik bölgelere spesifik iletim için hedefleme yapmak gerekmektedir. Hedeflendirme, hedef hücrenin tipine ve durumuna seçici olarak bağlanmayı sağlayacak hedefleme ligandları ve nanopartiküllerin konjugasyonu ile yapılan bir tekniktir. Hedefleme, spesifik bölgelere, organlara, dokulara veya hücrelere yapılabilir. Pek çok araştırma, displastik ve patolojik dokular için benzersiz olan veya bunlar içinde yukarı doğru düzenlenmiş hücre yüzeyi bileşenlerine özgü ligandları, nanopartikül yüzeyine konjuge ederek hedefleme yapmayı amaçlamıştır. Bu hedef ligandlara örnek; küçük moleküller, polipeptit esaslı peptitler, protein domainleri, antikorlar ve aptamerler şeklindedir. Tümör hücrelerine hedefleme temelde iki şekilde yapılabilir: Pasif ve aktif hedefleme. Tümör hücrelerinin nanopartikül aracılı hedeflenmesi Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Tümör hücrelerinin nanopartiküller ile hedeflenmesi [74]

2.6.1 Pasif Hedefleme

Pasif hedefleme, tümör dokusundaki kan kılcal damarlarının spesifik özelliklerine dayanır. Kan kılcal damarlarının yoğunluğu ve yeni kan damarlarının oluşumu tümör dokularında sık görülür. Tümör dokusundaki kan damarları; tümör tipine, konumuna ve büyüme derecesine bağlı olarak $\sim 100\text{-}300\text{ nm}$ çapında endotel hücreler astarındaki defekt ve gevşek yapı ile karakterize edilir. Düşük perisit seviyelerine sahip olan bu endotelyumdaki aralıklar sızdırır bir yapıya sahiptir. Böylece yaklaşık 100 nm ve altı boyutuna sahip nanopartiküllerin kan damarlarından geçmesine ve tümör mikroçevresine ulaşmasına izin verir. Normal dokular genellikle endotelde yaklaşık $5\text{-}10\text{ nm}$ çapında çok daha küçük gözenekler içerir. Tümör dokusu, tümör endotelinin sızıntılı doğasına ek olarak, lenfatik drenajın düşük olduğu bir yapıdadır. Sonuç olarak, nanotaşıyıcılarının girişine müsaade ederek ve drenajı engelleyen bu yapı nanopartiküllerin tümör dokusunda birikmesine neden olur. Bu iki faktör, pasif hedeflemede kullanılan ve gelişmiş

geçirgenlik ve alıkonma (enhanced permeability and retention, EPR) etkisi olarak adlandırılan bir etkidir. EPR, nano ve mikro boyuttaki partiküllerin tümör dokularında toplanmalarına neden olmaktadır. Pasif hedeflemede, taşıyıcı sistemler tümör hücrelerine özgü özellikler gösteren tümör mikroçevresi ve partikülün sahip olduğu boyut/yük gibi özellikleri kullanarak yapılmaktadır. Tümör hücrelerinin, normal hücrelere kıyasla büyümeleri ve metabolik aktiviteleri oldukça hızlıdır. Tümör dokusunu oluşturan hücreler, tümör dokusunun damarlanması öncesinde hipoksik şartlardadır. Bu nedenle ihtiyacı olan enerjiyi karşılayabilmek için, normal hücrelere kıyasla çok daha fazla glukoz molekülü tüketmektedirler. Tüm bunlara bağlı olarak da tümörün etrafındaki bölgede asidik bir ortam oluşmaktadır. Nihayetinde, fizyolojik pH'da (7,4) stabil kalabilen ve hedeflendikleri bölgede pH değişimi ile taşıdıkları maddeyi salabilen nanotaşıyıcı sistemler geliştirilerek, bu taşıyıcıların uyarı-cevap etkisinden faydalanarak, taşıdıkları kargolarını bırakmaları sağlanabilmektedir. Bu sebeple pH duyarlı nanotaşıyıcılar kullanılabilir. Ayrıca partiküler sistemlerin sahip olduğu yük ve boyut pasif hedefleme için oldukça önemlidir. 200 nm'den küçük boyuta sahip ve katyonik özellik gösteren nanopartiküllerin tümörlü dokuda biriktiği ve burada katyonik olmayan taşıyıcılara göre daha fazla kalabildiği bilinmektedir [75]–[77]. Pasif hedeflemede nanopartiküller, polietilen glikol (PEG) gibi kan ile uyumlu hidrofilik polimerler ile kaplanır. Bunun nedeni, retiküloendotelial sistemlerin (RES) organları tarafından tutulup yok edilmesini engelleyerek partiküllerin dolaşımında daha uzun süre kalabilmesini sağlamaktır. Uzun süreli dolaşım, daha fazla nanopartiküllerin kan damarlarından ekstravaze olmasına ve tümör dokusunda birikmesine izin verir. Tümörlerin pasif hedeflenmesi hala bazı dezavantajlarla karşı karşıyadır. Bunlar:

1. EPR etkisi, kan damarlarının çokluğuna ve sızıntı derecesine bağlı olduğu için farklı kanser türlerinde oldukça heterojendir. Bazı kanser türleri insanlarda EPR etkisine dair herhangi bir kanıt göstermemiştir.
2. PEG polimerleri veya PEGilasyon ile kaplama taşıyıcının hücre içine alınmasında ve endozomal kaçışta önemli bir azalmaya neden olur. Bu, özellikle gen vektörleri durumunda düşük anti-tümör etkisinin birincil nedenidir, çünkü genler öncelikler kanser hücrelerine girebilmeli ardından sitozole ulaşmak için

endozomal bölmeden kaçabilmelidir. Gen aktarımında, PEGilasyon ve PEG ile kaplanmış katyonik lipidler incelenmektedir. Tümör mikroçevresinin spesifik özelliklerine yanıt olarak tümördeki PEG kaplamasının çıkarılması yoluyla hücre alımının iyileştirilmesi için bazı stratejiler kullanılabilir.

3. Dokular arasındaki yüksek basınç ve hücre dışı matrisin varlığı nedeniyle bazı tümörlerden transfer çok verimsizdir.

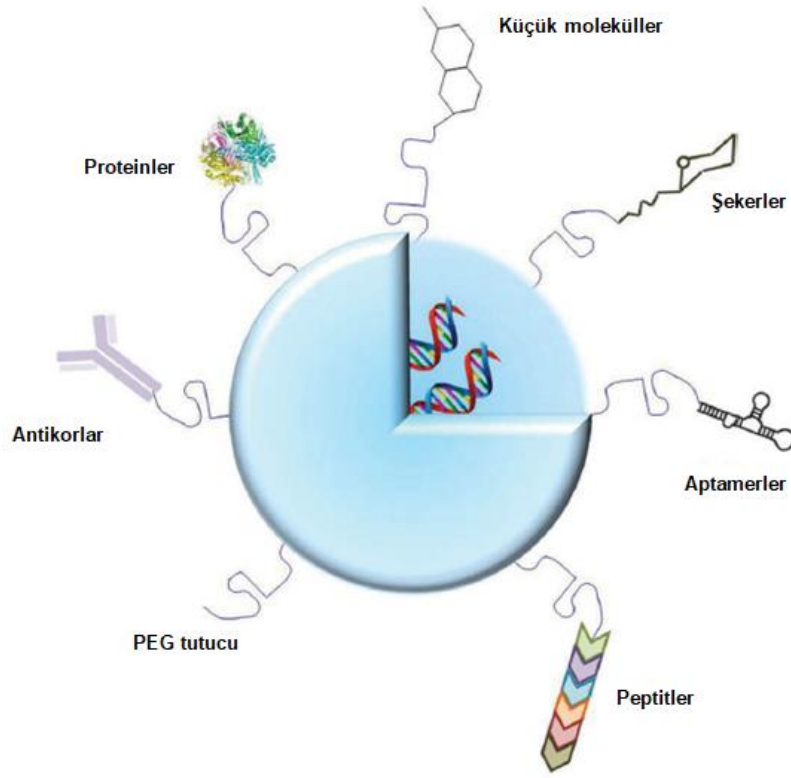
4. Özellikle tekrarlanan uygulamalarda PEGilasyon işlemine rağmen nanopartiküllerin bir kısmının RES tarafından kandan temizlenir. Bu, toksisiteye, yan etkilere ve immün yanıtı neden olur.

5. Bazı PEG formülasyonları, nanopartiküllerin hızlı bir şekilde yok edilmesine neden olan anti-PEG antikorlarının üretimi nedeniyle tekrarlanan uygulamalarda avantajlarını kaybederler.

Bu dezavantajlar, pasif hedeflemeye dayanan bazı FDA onaylı ilaçların, klinik çalışmalarda lipozomal olmayan ilaçlara kıyasla neden önemli anti-tümör etki göstermediğini açıklamaktadır. Bu ürünler esas olarak daha yüksek dozların uygulanmasına izin veren, hastalar üstündeki yan etkilerinin (kusma, bulantı ve daha az kemik iliği defekti) daha tolere edilebilir olması nedeniyle onaylanmıştır [76], [78]. Pasif hedefleme ile nanopartiküller hedef hücreye iletilebilmekte fakat hücre alımı olumlu yönde tetikleyecek herhangi bir etkileri bulunmamaktadır. Pasif hedeflemedeki eksiklik, taşıyıcı sistemleri aktif hedefleme yöntemlerine başvurmaya yönlendirmiştir.

2.6.2 Aktif Hedefleme

Aktif hedefleme, tümör hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen spesifik yüzey reseptörlerine bağlanan spesifik ligandların kullanımını içerir. Bu yöntem, reseptör aracılı endositoz özellikle sitozol veya çekirdeğin hücre içi etki alanlarına nükleik asit taşıyan nanopartiküller için uygun bir yöntemdir. Aktif hedefleme sistemleri pasif hedefleme sistemlerine kıyasla daha zor kurgulanır ve ölçeklendirilir. Nanopartiküller genellikle, tümör hücrelerini aktif olarak hedeflenmesi için antikorlar, peptitler veya aptamerler ve bazı küçük moleküller ile modifiye edilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Aktif hedeflemede kullanılan ligandlar [76]

2.6.2.1 Antikorlar

Monoklonal antikorlar, ani ve değişken mevcudiyetleri ve moleküler hedeflere yüksek afiniteleri ve özgüllükleri nedeniyle hedef ligandlar olarak yaygın kullanılan makromoleküllerdir. Bu hedefleme ligandları genellikle 150 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve yüksek bağlanma afinitesi gösterirler. Araştırmaya uygunlukları ve *in vivo* hedefleme ligandlarının tümör sadece EPR etkisine bağlı kalmadan, hedefleme ligandları olarak kabul edilen antikorlar nanotaşıyıcı hedeflemesinde sıkça kullanılmaktadır. Literatürde, 2014 yılına kadar kırkın üzerinde antikorlar ile aktif hedefleme yapılması amaçlanan çalışma bulunmaktadır. Ancak nanopartikülerin antikor ile hedeflenmesinde bazı majör problemler bulunmaktadır. Bunlar; antijen bağlanması (mAb'nin yüksek hedef özgüllüğü ve afinitesi olmalı, nanopartiküle bağlanan molekül özgüllüğü bozmamalıdır), konjugasyon (mAb-nanopartikül konjugatı yüksek verimli ve bölgeye özgü olmalı), kan dolaşımında bulunma süresi (mAb-nanopartikül konjugatı dolaşım sırasında kararlı olmalıdır). Ek olarak, sistemde immünojenite ve saflık diğer endişelerdir. Vücut, antikorları yabancı proteinler olarak

algılayabilir ve bunları temizleyerek hedeflenen nanopartiküllerin etkisini geçersiz kılabilir. Monoklonal antikorların nanotaşıyıcı hedeflemesinde sürekli kullanımı ile büyük ölçüde çapraz tür antikor immünojenisitesi meydana gelmektedir. Tüm bu kaygılar ile beraber antijen bağlanma fragmanı (Fab'), tek zincirli değişken fragmanlar (ScFv) ve peptitler gibi antikor fragmanlarının kullanımı kısmen immünojenisite sorununun üstesinden gelmeyi hedeflemektedir [78], [79].

2.6.2.2 Peptitler

Peptitler, düşük molekül ağırlığı (yaklaşık 1kDa), ideal doku penetrasyon kabiliyeti, immünojenisitenin olmaması, üretim kolaylığı gibi özellikleri ile antikorlardan ve antikor analoglarından daha avantajlı bir seçenektir. Çeşitli peptitler, tümör hücrelerinin yüzeyinde aşırı ekspere edilen tümöre spesifik epitoplara tanıyabilmesi ile aktif hedefleme sistemi olarak kullanılabilir. Literatürde, geçen son on yılda nanopartiküllerin peptit molekülleri kullanılarak hedeflendirilmeye dayanan birçok çalışma yer almaktadır. Antikorlar gibi peptitlerin de birçok farklı nanotaşıyıcı tipi (metalik, polimerik, dendrimetik ve miseller) ile konjugat yapabildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çok sayıda etkili *in vitro* peptit (protein kinaz CK2 ve glioma gibi) olmuştur. Bununla beraber, *in vivo* koşullarda çalışan peptitlerin proteolize, değişken toksik etkilere ve hücre sinyalleşmesi üzerinde farklı etkilere sahip oldukları, alerjik duyarlılaşmayı teşvik edebildikleri ve oral biyoyararlanmaya uygun olmadıkları için daha zorlayıcı görünmektedir. Ek olarak, peptit sentezinin maliyetleri bazı özel uygulamalar için engelleyici olabilir [78], [79].

2.6.2.3 Aptamerler

1990'lı yıllarda Szostak, Gold ve Joyce grupları tarafından geliştirilmelerinden bu yana, aptamerler ayrı bir ligand sınıfı olarak tanımlanmaktadır [80]. Aptamerler, birkaç nüleotitten oluşan kısa tek zincirli nükleik asit dizileridir. Küçük moleküllerden büyük proteinlere kadar birçok biyokimyasal hedefi bağlama potansiyeline sahip çeşitli yapılardır. Bu, aptamer dizilerinden türetilir; yaklaşık 12-20 nükleotit uzunluğundaki bir 5' ve 3' konsensüs bölgesi tamamen veya kısmen rastgele seçilmiş nükleotitlerin merkezi bölgesini çevreler. Rastgele bölge, tipik olarak 10^{13} ve 10^{15} benzersiz diziler sağlayan aptamer havuzunun çeşitliliğini

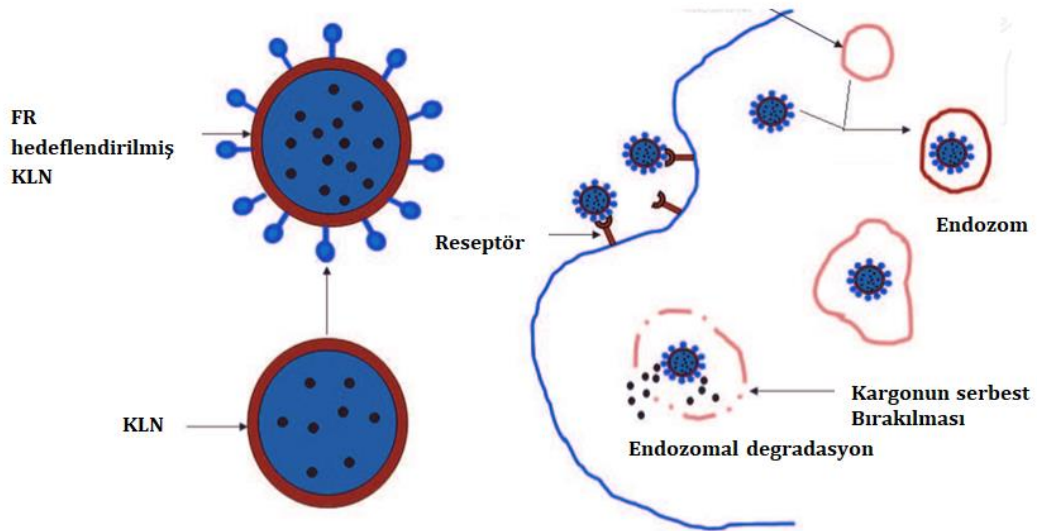
belirler. Küçük, yüksek derecede hassas olan, biyobozunur yapıda ve immünojenitesi düşük olan yapılardır. Aptamerler, kimyasal olarak antikora çok benzeyen fakat daha fazla avantaja sahip yapılardır. İlk olarak, aptamerler küçük yapıları için tümör hücrelerinden içeri daha kolay alınırlar. Çeşitli küçük moleküller ile konjugat aptamerler ise daha spesifik çalışmalar yapılmaktadır. İkincisi, aptamerler tipik olarak immünojenik değildir. Üçüncüsü, monoklonal antikora kıyasla daha yüksek özgüllük ve afiniteyle reseptörlere bağlanırlar. Son olarak ise aptamerler kolay ölçeklendirilebilir ve uygun maliyetli yapılardır. Tüm bu avantajları ile aptamerler nanopartikül hedeflemesi için çekici ligandlardır [81]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar ile beraber, çeşitli tümör hücrelerinin aktif olarak hedeflenmesi için aptamerler ile farklı türdeki nanopartikül sistemlerinin denemesi olumlu sonuçlar vermiştir [82]–[84] .

2.6.2.4 Küçük Moleküller

Küçük moleküller, farklı yapılara ve özelliklere sahip önemli bir hedefleme grubudur ve bu da onları nanopartiküllerin fonksiyon kazanması için oldukça uygun bir sınıf haline getirir. Küçük boyut ve düşük moleküler ağırlık ayrıca çoklu ligandların nanopartiküllere bağlanmasına izin verir. Tüm küçük molekül bazlı hedefleme ligandı arasında folik asit, tümör hücrelerinin hedeflenmesi için en yaygın kullanılan ligandır.

Folat reseptörü (FR) yumurtalık, böbrek, akciğer, beyin, endometriyal, kolorektal, serviks, meme ve prostat kanseri gibi birçok katı tümör hücresinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bununla beraber, sağlıklı hücrelerde folat reseptör tümörlü hücrelere göre çok azdır veya hiç yoktur. Nanotaşıyıcı sistemlerin folik asit ile oluşturulan konjugasyonu ile yüzeyinde aşırı miktarda folat reseptör bulunan kanser dokularının hedeflenmesi ve böylece kişiselleştirilmiş ve hedeflendirilmiş tedavi tekniklerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Folik asit; molekül ağırlığının düşük olması (441 g/mol), suda çözünebilir olması, pH, ısı ve çeşitli solventlere karşı dayanıklı olması, taşıyıcı ajanlar ile kolay konjugasyon yapabilmesi, toksik olmaması, folat reseptöre yüksek afiniteye sahip olması ve küçük boyutundan dolayı hücreden içeri kolay girebilmesi gibi birçok avantaja sahip bir ligandır. Folik asit çeşitli metabolik yollarda tek karbon transfer reaksiyonları için ökaryotik

hücreler tarafından gerekli olan suda çözünabilir temel bir vitamindir (vitamin B9). Hücre proliferasyonları için gerekli olan nükleotit bazlarının biyosentezinde rol oynar. Tümör hücrelerinin metabolik faaliyetleri sağlıklı hücrelere göre çok daha fazladır, bu nedenle daha fazla folik asit ve diğer vitaminlere gereksinim duyarlar. Tümör hücrelerinin vitamine olan ihtiyacının artması ile beraber yüzeyinde yer alan folat reseptörü miktarı da artmaktadır. Yüzeyde yer alan FR yoğunluğu ve tümör hücresinin ilerleme derecesi arasında pozitif bir korelasyon vardır. Literatürde yer alan *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların pek çoğunda folik asit ile kimyasal taşıyıcı konjugatlarının FR hedeflenmesi amacıyla hücrelere daha fazla ulaşımının daha fazla olduğu görülmüştür [85]–[89]. Nanotaşıyıcı sistemlerin folat reseptörüne hedeflendirilmesi ile reseptör aracılı endositoz Şekil 2.11’de gösterildiği gibi başlatılmış olur. İşlem folik asit konjuge nanotaşıyıcı sistemlerin hücre yüzeyi üzerindeki FR'lere bağlanmasıyla başlar. Plazma membranı içe doğru bükülür ve sonunda hücre içi ayrı bir kompartıman oluşturur. Endositik veziküllerin (endozomlar) pH değeri düşer, oluşan asidik ortam ile beraber FR’nin folat konjugatını serbest bırakması sağlanır. Ardından membrana bağlı FR’ler, hücre yüzeyine geri dönerler. Aynı zamanda, FR’lerden salınan konjugatlar endozomdan kaçarak sitoplazmada transfer edilecek elemanın salınması sağlanır [90].



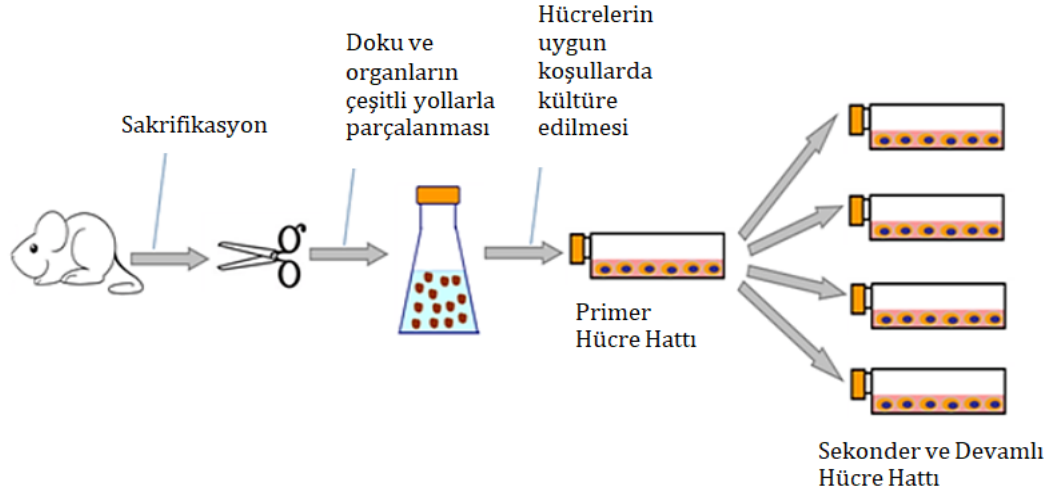
Şekil 2.11 Folat konjuge KLN'lerin FR aracılı endositozu [91]

2.7 *In Vitro* Ortamda Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

2.7.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, belirli koşullar altında belirli bir dokudan veya organdan izole edilen belirli hücrelerin uyarlanması ve çoğaltılmasına dayanan tekniktir. Kültür terimi, doğal koşulları taklit eden uygun koşullarda hayatta kalmak ve büyümek anlamına gelir. Hayvan hücrelerinin ve dokularının kültürü, hücrelerin, dokuların ve organların donörden izole edilmesini ve *in vitro* ortamda büyütülmesini içeren genel ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. *In vitro* kültürün birçok hücrenin işlevlerini incelemek için en doğru sonuç veren ve kıymetli metot olduğu kanıtlanmıştır. Belirli bir hücre grubu, hücresel aktivitelerini, farklılaşmalarını ve çoğalmalarını incelemek için büyük miktarlarda kültürlenebilir.

Hücre kültüründe çalışılan hücre hatları; primer, sekonder ve devamlı hücre hatları olmak üzere üç başlıkta tanımlanmaktadır. Hücre hatlarının Şekil 2.12’de şematik gösterimi bulunmaktadır. Primer hücre hatları, belirli bir dokudan veya organdan çeşitli yollarla (mekanik veya enzimatik) izole edilen ve kültüre alınan ilk hücrelerdir. Bu hücreler, heterojendir, kontaminasyon ihtimalleri yüksektir ve ancak 8-9 kere pasajlanabilirler. Büyüme hızları yavaştır ancak izole edildikleri doku veya organ hakkında en doğru bilgiyi verirler. Sekonder hücre hatları, primer hücre hatlarının 100 kereye kadar pasajlanabilen ancak daha sonra üreme yeteneklerini kaybeden hücre hatlarıdır. Bu hücre hattı fibroblastoid tipi hücrelerden oluşmaktadır. Devamlı hücre hatları ise, tümör hücreleri ya da manipüle edilmiş hücrelerin kültür edilmesi ile oluşturulan hücre hatlarıdır. Devamlı hücre hatları ölümsüz hücre hatları olarak da bilinmektedir. Diğer hücre hatlarına göre daha iyi karakterize edilmiş, kültür ortamında daha hızlı, sürekli ve güçlü büyüeyebilen ve kullanılacağı her seferde bir kaynaktan izolasyona ihtiyaç duyulmayan hücre hatlarıdır [92], [93].



Şekil 2.12 Primer, sekonder ve devamlı hücre hatları [93]

HeLa Hücre Hattı

HeLa hücreleri, 1950'lerde Henrietta Lacks adlı bir hastanın serviks dokusundan izole edilen ve laboratuvar koşullarında çalışılan edilen ilk insan hücre hattıdır. Oldukça agresif bir kanser hücre hattıdır, durmadan bölüne kapasitesine sahiptirler ve literatürde 70000'den fazla çalışmada kullanılmıştır [94]. HeLa kanser hücrelerinin özellikleri Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3 HeLa hücrelerinin özellikleri

HELA	(ATCC® CCL-2™)
Organizma	Homo sapiens, İnsan
Doku	Serviks
Hastalık	Adenokarsinom
Yaş	31
Cinsiyet	Kadın
Morfoloji	Epitelyal

THP-1 Hücre Hattı

THP-1 hücre hattı, 1980 yılında Tsuchiya ve ark. tarafından akut monositik lösemili bir hastanın kanından izole edilen bir insan monositik lösemi hücre hattıdır. THP-1 hücreleri morfoloji ve farklılaşma özelliklerinde birincil monositlere ve makrofajlara benzerler ve bu nedenle *in vitro* çalışmalarda sıkça tercih edilmektedirler. Bu hücreler büyük, yuvarlak tek hücreli bir morfoloji gösterir [95]. THP-1 hücrelerinin özellikleri Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4 THP-1 hücrelerinin özellikleri

THP-1	(ATCC® TIB-202™)
Organizma	Homo sapiens, İnsan
Doku	Periferik kan
Hastalık	Akut monositik lösemili
Yaş	1
Cinsiyet	Erkek
Morfoloji	Monosit

2.7.1.1 Sitotoksite Analizi

Sitotoksite, nanopartiküllerin *in vitro* çalışmalarında biyolojik değerlendirilme için kullanılan en önemli özelliklerinden birisidir. Test edilen materyalin çeşitli mekanizmalar ile sebep olduğu hücre ölümünü belirlemek için ucuz, güvenilir ve tekrarlanabilir testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Sitotoksite; kolorimetrik, boyama, luminometrik ve florometrik olarak test edilebilmektedir.

MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolium bromür) testi, 1980 yılında Mosmann tarafından geliştirilen sitotoksiteyi değerlendirmek için en yaygın kullanılan kolorimetrik testlerden biridir. Günümüzde, MTT kullanımı en

yaygın olan sitotoksisite testlerinden biridir. Birçok hücre hattında kullanılabilir ve ISO (10993.5) standartları içinde yer almaktadır.

Bu test, canlı hücrelerin mitokondrilerinde meydana gelen dehidrojenazlar ile suda çözünebilen sarı tetrazolium tuzunun suda çözünmeyen mor formazan kristallerine enzimatik dönüşümüne dayanarak hücre canlılığını tespit eder. Böylece belli dalga boyunda çözünmüş formazan kristallerinin konsantrasyonu ölçülerek metabolik olarak aktif hücre sayısına dair ölçüm yapılmış olur. Formazan molekülü, hücre zarı için geçirimsiz özelliktedir böylece sağlıklı hücrelerde birikme yapar. Bu testin diğer testlere göre belli başlı bazı avantajları vardır. Bunlar; yüksek tekrarlanabilirlik, kolaylık, güvenilirlik ve sitotoksisitenin yanı sıra hücre canlılığının da analiz edilebilmesidir. Ancak MTT testinin bazı dezavantajları da vardır. Örneğin; test edilen kimyasalın tetrazolyum tuzu ile reaksiyon verebilmesi, bazı hücrelerdeki mitokondriyal aktivitenin öldükten sonra da devam edebilmesi gibi durumlarda MTT testi yanılabilmektedir [96], [97].

2.7.1.2 Antioksidan- Oksidan Kapasite Analizi

Oksidanlar, hem vücudun içinde hem de dışında üretilen ve diğer hücrelerel molekülle ile reaksiyona girebilen reaktif moleküllelerdir. Bu moleküllelerin üretiminin sonucu olarak hücrede oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidan molekülleleri reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) olarak sınıflandırılabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrelerel oksidatif metabolizmanın doğal yan ürünleridir ve hücre sağkalımı, ölümü ve farklılaşması, hücre sinyali ve inflamasyonla ilişkili faktör üretiminin modülasyonunda önemli roller oynar. Vücutta oksidan moleküllelerinin etkilerini ortadan kaldırmak için bir antioksidan savunma mekanizması vardır. Oksidan molekülle bu savunma sistemini aştığında ise kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi olaylar meydana gelmeye başlar. Oksidan antioksidan seviyelerindeki dengesizlik ve antioksidan savunmanın aşılması durumunda oksidatif stres durumu meydana gelir.

Hücreler ile etkileşime giren özellikle nanopartiküller gibi birçok biyomalzeme vücuttaki oksidatif stresi indükleyebilmektedir. Nanopartiküllerin yüzey alanı ve yüzeyinde yer alan hidroksil gruplarının yoğunluğu ROS üretimini etkilemektedir.

Literatürde yer alan çalışmalarda, özellikle metal nanopartiküllerin hücrelerde oksidatif strese neden olduğu ayrıca hayvan deneylerinde de olumsuz sonuçlara sebep olduğu gösterilmiştir [96], [98], [99].

2.7.1.3 Hücre Siklusundaki Etkilenmenin İncelenmesi

Biyomalzemelerin biyolojik sistemler ile etkileşimleri sonucu sitotoksikite ve oksidatif strese sebep olma özelliklerinin yanısıra hücre döngüsüne etkilerinin incelenmesi de oldukça önemlidir. Ökaryotlarda hücre döngüsü iki ana dönemden oluşmaktadır: DNA replikasyonu ve mitoz için gerekli besinleri üretmek ve hücrenin büyümesini içeren interfaz aşaması ve hücrenin bölünerek iki yavru hücre oluşturduğu mitoz (M) aşaması. Bir hücrenin yaşamının neredeyse tamamı üç bölüme ayrılan interfazda harcanır: G1(Gap phase 1), S (Synthesis phase) ve G2 (Gap phase 2) fazları. G1 fazında hücre büyür ve hücre bölünmesi için gerekli olan enzimleri üretir. S fazında DNA kopyalanır. Son olarak, G2 fazında hücre büyümeye devam eder ve mitoz için gerekli işlemleri gerçekleştirir. Hem G1 hem de G2 fazlarında, hücrenin bölünmesinde önemli adımlar için hazırlanmasını sağlayan kontrol noktaları vardır. Mitoz (M) fazı, gerçek hücre bölünmesine karşılık gelir ve oldukça fazla miktarda enerji gerektirir. Mitozda birçok aşama olmasına rağmen (profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz), temelde hücrenin çekirdek ve sitoplazmik içeriğinin bölünmesinden oluşur. Hücre siklusunda, fazlar arasındaki kontrol noktalarında düzenleyici moleküller görev alır. Bu düzenleyici moleküller başta siklinler ve siklin-bağımlı kinaz kompleksi (Cdk) olarak isimlendirilmişlerdir ve bulundukları faza göre farklı konsantrasyonlarda olabilirler. İnsanlarda dört tip siklin vardır; G1siklinler (siklin D), G1/S siklinler (siklin E), S siklinler (siklin A) ve M siklinleri (siklin B). Adlandırmadan da anlaşılacağı gibi, her bir siklin hücre döngüsünde belirli bir faz, geçiş veya faz seti ile ilişkilidir ve o fazın veya periyodun olaylarını yönlendirmeye yardımcı olur. Örneğin, M siklin, nükleer zarf bozulması ve kromozom yoğunlaşması gibi M fazı olaylarını teşvik eder. Bir pro-mitotik hücre dışı sinyal alındıktan sonra, G1 siklin, G1 fazına özel Cdk kompleksleri (Cdk2, Cdk4 ve Cdk6) ile bağlanarak, hücreleri S fazına hazırlamak için aktif hale gelir ve S siklinleri ile DNA replikasyonu için gerekli enzimlerin ekspresyonunu teşvik eden transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu teşvik eder. G1 siklin-Cdk

kompleksleri ayrıca S fazı inhibitörleri olarak işlev gören moleküllerin ubiquitinasyon için hedeflenerek parçalanmasını da sağlar. Aktif S siklin, S fazına özel Cdk kompleksi (Cdk2) ile bağlanarak, DNA replikasyonun başlamasını ve hücre döngüsünün S fazına geçmesini sağlar. M siklinler ise Cdk1 ile bağlanarak hücredeki mitozu başlatır [100]–[102].

Hücre döngüsündeki düzensizliğin tümör oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Özellikle hücre döngüsünde inhibitör görevi yapan p53 ve retinablastom (Rb) gibi tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kayıpları hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına ve böylece tümör oluşuma neden olmaktadır. Normalde Rb hücreleri, hücrelerin G1 fazından S fazına geçişinden sorumlu proteinlerin transkripsiyonunu indükleyerek hücre proliferasyonunu negatif yönde regüle eder. Hücrenin G1 fazından S fazına geçişi geri dönüşümsüz bir olaydır ve eğer kontrol noktalarından geçilebilirse DNA replikasyonu başlar. G1 fazından S fazına geçiş siklin D, Rb ve evreye özgü Cdk'lar tarafından kontrol edilmektedir. Siklin D, aktive olduktan sonra Cdk4/Cdk6 ile kompleks oluşturur. Oluşan Cdk kompleksleri tarafından fosforile edilen Rb, inaktivasyona neden olur. Fosforilasyona uğrayan ve inaktif hale geçen Rb'nin hücre döngüsüne etkisi, aktifken S fazına geçişte görev alan genlerin transkripsiyonel aktivitesini sağlayan transkripsiyon uzama faktörü (E2F) ile sağlanmaktadır. E2F'nin serbest bırakılması ile beraber G1/S ve S fazına geçişin gerekli olan bazı spesifik siklin ve genlerin transkripsiyonunu sağlar. Rb ile ilişkili olan E2F, hücre döngüsünde DNA replikasyonu, onarımı ve apoptozis gibi önemli olaylarda görev yapmaktadır [101].

Rb'nin ardından tanımlanan bir diğer tümör baskılayıcı gen p53'tür. p53, DNA hasarı, hipoksi durumu, onkogenler ve oksidatif stres gibi birçok koşuldaki etkilenebilir. p53, aktif edilebilen kısa ömürlü (yaklaşık 20 dakika) bir transkripsiyon faktörüdür. p53, multifonksiyonel bir proteindir ve hücrelerin farklılaşması, yaşlanması ve apoptoz gibi birçok hücresel olayda görev almaktadır. p53, bazı DNA hasarı formlarına cevaben p21 genini aktive eder. p21 bazı siklin ve kompleks oluşturdukları siklin bağımlı kinazlara (Cdk4-6/SiklinD, Cdk2/SiklinE, Cdk2/SiklinA ve Cdk2/SiklinA) bağlanarak bunları inhibe eder. Ayrıca p21 geni, DNA replikasyonu için gereken komplekse (PHNA, Proliferating cell nuclear

antigen) bağlanıp DNA polimerazın bağlanmasını engeller ve DNA sentezini durdurur. p53 geni aynı zamanda G1/S ve G2/M evrelerindeki kontrolde de görev almaktadır. Literatürde, mitotik iğ iplikleri inhibitörleri ile yabancı tip p53 hücreye birlikte aktarıldığında hücre siklusunun G2 evresinde durmuşken p53 yokluğundaki ploid ile hücrelerin bölünmeye devam ettiği gözlenmiştir. Böylece, DNA replikasyonunu inhibe etme yeteneği ile hasarlı DNA'nın yeni hücrelere geçmesini engelleyer. Ayrıca, DNA sentezi esnasında oluşan hasarların mitoz bölünme başlamadan tamir edilmesi ve hasarlı DNA'nın yeni hücrelere aktarılmasının engellenmesi sağlanmıştır [102].

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi (Shimadzu)
- Ultrasonik su banyosu (Bandelin Sonorex)
- Sonikatör (Bandelin Sonoplus)
- Manyetik karıştırıcı (Variomag Mono)
- UV-Vis Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)
- Çalkalamalı inkübatör (Mikrotest MCI55)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra X-30 R)
- Mini santrifüj cihazı (Hermle. Z 206 A)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- ZetaSizer (Malvern ZEN 3600 Nano ZS)
- Liyafilizatör (Telstar Cryodos)
- FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 100)
- CO₂ inkübatör (Esco, CelCulture CO₂ INCUBATOR)
- Otoklav (Hirayama)
- Invert mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeiss, EVO® LS 10)
- Biyogüvenlik kabini (Mikrotest MLF120)
- Elisa reader (Biotek PowerWave XS2)
- Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers)
- Atomik güç mikroskobu (Shimadzu SPM 9600)

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre kültür flaskları (T25) (TPP 90026)
- Hücre kültür flaskları (T75) (TPP 90076)

- Thoma Lamı (ISOLAB 075.03.002)
- Pipet ucu 1000 µL (ISOLAB TB1000)
- Pipet ucu 200 µL (ISOLAB TB200)
- Pipet ucu 10 µL (ISOLAB TB010)
- 96 kuyucuklu plaka (TPP 92096)
- 24 kuyucuklu plaka (TPP 92024)
- 6 kuyucuklu plaka (TPP 92006)
- Hücre kryo (dondurma) tüpler (ISOLAB 09111102)
- 15 ml'lik steril falkon tüpler (CORNING 352095)
- 50 ml'lik steril falkon tüpler (CORNING 352070)
- Steril tek kullanımlık pipetler (2 ml) (TPP TP94002)
- Steril tek kullanımlık pipetler (5 ml) (TPP TP94005)
- Steril tek kullanımlık pipetler (10 ml) (TPP TP94010)
- Transwell insert aparatı (0.4 µm por çapı) (CORNING 3413)
- Steril petri kabı (ISOLAB 08102061)
- Steril Öze (ISOLAB 08201001)

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Kitler

- Kanamisin (Duchefa Biochemie K0216.0010)
- Luria Broth (LB) (Sigma Aldrich L3522)
- Luria Agar (LA) (Sigma Aldrich L3147)
- Oktadesilamin (Sigma Aldrich 305391-25G)
- Kloroform (Sigma Aldrich 102442)
- Tween 80 (Sigma Aldrich P1754)
- Folik Asit (Sigma Aldrich F7876)
- PBS tablet (Sigma Aldrich 524650)
- EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) (Thermo Fisher Scientific 22980)
- NHS (N-hydroxysuccinimide) (Thermo Fisher Scientific 24500)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) (Biological Industries 01-052-1A)
- F-12 (HAM) Nutrient Mixture (Biological Industries 01-095-1A)

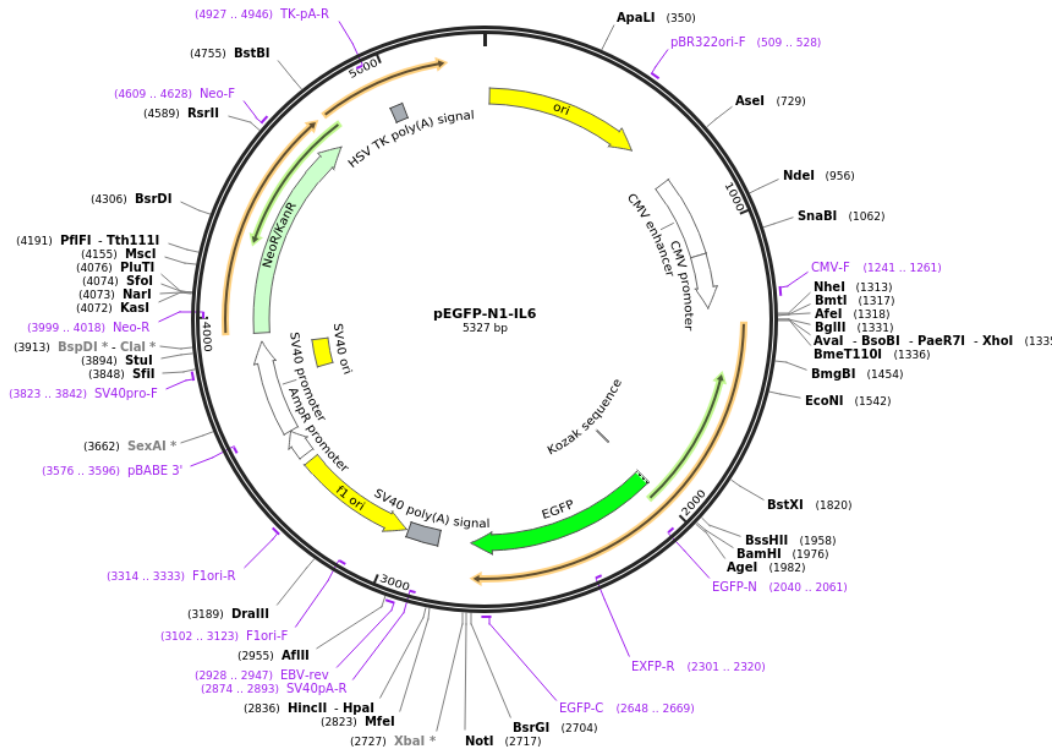
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries 03-031-1B)
- Fetal Bovine Serum (Biological Industries 04-007-1A)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries 03-052-1A)
- Tripan mavisi (Sigma T8154)
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT-Sigma M5655)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO-ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508001)
- Human IL-6 ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific EH2IL6)
- Total Antioxidant Status (TAS) Test Kit (Rel Assay Diagnostics)
- Total Oxidant Status (TOS) Test Kiti (Rel Assay Diagnostics)
- CD1 Human ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory E3586Hu)
- p53/TP53 ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory E1711Hu)
- QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (QIAGEN 12963)

3.2 Metot

3.2.1 IL-6 Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Tez çalışmasında, aktarılacak gen bölgesi olan IL-6 ve GFP (green fluorescence protein) eksprese eden plazmid (Addgene Plasmid 111933: pEGFP N1-IL-6) firmadan saplama kültürde dönüştürülmüş bir bakteri içinde temin edilmiştir. IL-6, enfeksiyonlara ve doku hasarına cevaben üretilen pleotropik bir sitokindir. Fibroblastlar, vasküler endotelial hücreler, mast hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve T ve B hücreleri dahil olmak üzere çoklu hücre tipleri bu sitokinin üretimi ile ilişkilidir. Gen aktarımı çalışmalarında kullanılacak olan plazmidin haritası Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bakteriyel kültür, steril bir kürdan yardımı ile alınmış ve 100 µg Kanamisin/mL LB Agar içeren petri kaplarına ekilmiştir. Ekimin ardından petriler 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen koloniler arasından bir tanesi seçilerek, 100 µg Kanamisin/mL LB Broth sıvı besiyerine aktarılmıştır. Sıvı besiyeri 37 °C’de 200 rpm’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün sıvı besiyerindeki bakterilerin yoğunluğu, UV visible cihazında 650 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Cihazda blank değeri olarak LB Broth kullanılmıştır. İzolasyon işlemleri, alkali lizis, adsorpsiyon, yıkama ve desorpsiyon aşamalarını içeren QIAGEN Inc® (Almanya) şirketinin kit

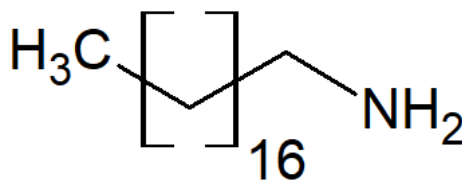
protokolüne uygun olarak kitin tampon çözeltileri ile yapılmıştır. İzolasyon ardından plazmid DNA'ların (pDNA) saflık analizi Nanodrop cihazı kullanılarak spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir. Ölçüm 260/280 nm absorbands değerlerinde yapılmıştır.



Şekil 3.1 Plazmid haritası [103]

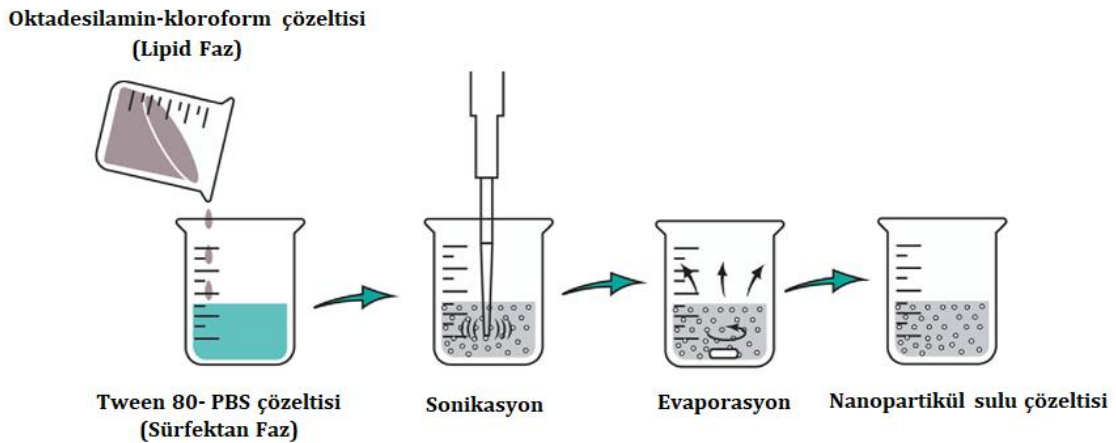
3.2.2 Oktadesilamin Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Tez çalışmasında kullanılacak olan nanotaşıyıcı sistemler oktadesilamin kullanılarak sentezlenecektir. Oktadesilamin, yapısında barındırdığı amin gruplarının protonlanması ile pozitif yük kazanabilen ve böylece DNA ile doğal olarak etkileşim kurabilen bir lipid molekülüdür. Oktadesilaminin kimyasal yapısı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Oktadesilaminin kimyasal yapısı

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküller tekli emülsiyon (w/o) çözücü difüzyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Nanopartikülün lipid fazını oktadesilamin solüsyonu, sürfektan fazını ise Tween 80 solüsyonu oluşturmaktadır. Sabit konsantrasyondaki lipid faz ve farklı konsantrasyonlardaki Tween 80 solüsyonu ile çalışmalar yapılmıştır. Her bir formülasyonda, belirtilen miktarda oktadesilamin tartılmış ve belirtilen hacimdeki kloroform içinde çözdürülmüştür. Oluşturulan çözelti, manyetik karıştırıcı üstünde Tween 80-PBS çözeltisine içinde 100 µL pipet kullanılarak damla damla damlatılmıştır. Karışım homojenizasyonu sağlamak adına buz banyosunda belirlenen süre ve güçte sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Sonikasyon işleminin ardından organik çözücünün uzaklaştırılması için nanopartikül çözeltisi 4 saat boyunca 1000 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karışım, 4 saatin ardından çöktürme ve yıkama işlemleri için santrifüj edilmiştir. Birinci çöktürme işlemi 30 dakika 6500 rpm ve +4 °C'de yapılmıştır. Bu adımın ardından süpernatant alınarak tekrar çöktürme işlemi yapılmıştır. İkinci çöktürme aşaması, 1 saat 11500 rpm ve +4°C'de yapılmıştır. Çöktürme işleminin ardından pelet 40 mL distile suda çözdürülerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi 30 dakika 11500 rpm ve +4°C'de yapılmıştır ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. En son yıkama işleminden sonra pelet 5 mL distile suda çözdürülerek, liyofilizatörde kurutulmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3 Nanopartikül sentez aşamaları

3.2.3 Oktadesilamin Nanopartikül-Folik Asit Konjugatının Hazırlanışı

Oktadesilamin nanopartiküller liyofilizatörde kurutulmuş ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir. 2 mL 0,02 gram Folik Asit-PBS çözeltisine 0,001 gram NHS eklenmiş ve 1 saat boyunca 1000 rpm ve +4 °C'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Ardından 0,001 gram EDC eklenmiş ve 1 saat boyunca 1000 rpm'de +4 °C'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon bittiğinde, 3 mL 2 mg nanopartikül çözeltisi eklenmiştir. Bir gece boyunca 1000 rpm'de +4°C'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Bir sonraki gün, 1 saat 11500 rpm +4 °C'de koşullarında çöktürme amacı ile santrifüj yapılmıştır. Ardından 30 dakika 11500 rpm +4 °C'de bir kez yıkama yapılmıştır. Pelet 5 mL distile suda çözündürülerek liyofilizatörde kurutulmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4 Sentezlenen Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül- Folik Asit Konjugatının Karakterizasyonu

Sentezlenen nanopartikül dispersiyonlarına ait parçacık boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer cihazı kullanılarak yapılmıştır. Morfoloji tayini, Atomik Güç Mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile örneklerin kimyasal bağ analizi yapılmıştır.

3.2.4.1 Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli değerleri, dinamik ışık saçılımı (DLS) metodu ile tayin edilmiştir. Kurutulmuş nanopartikül örnekleri, 1/10 oranında distile su ile dilüe edilerek (100 µL örnek/ 1 mL distile su) ölçüm yapılmıştır. Yapılan analizler 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında 0,89 cP viskozite ve 78,54 kırılma indeksi değerleri kullanılarak $\pm 0,1$ °C hassasiyeti ile 25 °C'de 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

3.2.4.2 Taramalı Elektron mikroskobu (SEM)

Sentezlenen oktadesilamin (ON) ve oktadesilamin-folik asit konjuge nanopartiküllerin (OFAN) morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile tayin edilmiştir. Her iki nanopartikül örneği de SEM cihazı için uygun

stablara damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından, iletken özellikte olmamalarından dolayı, örnekler görüntü alınmadan önce altın ile kaplanmıştır. Nanopartiküllerin boyutları, yüzey morfolojisi ve şekilleri yüksek vakum altında 30000x büyütmede ikincil elektron yöntemi ile taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.4.3 Atomik Güç Mikroskobu (AFM)

Sentezlenen oktaadesilamin ve oktaadesilamin-folik asit konjuge nanopartiküllerin morfolojik özellikleri atomik güç mikroskobu (AFM) ile belirlenmiştir. Analiz temassız modda, sinyal frekansı 1 Herz olacak şekilde yapılmıştır. 1 µm x 1 µm boyutunda bir alanda çekim yapılmıştır. Nanopartikül dispersiyonları, mika disklerin üzerine damlatılıp oda sıcaklığında kurutularak analiz edilmiştir.

3.2.4.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Morfolojik analizler zeta potansiyel analizinin ardından uygun bulunan nanopartiküller doğrudan ATR (Attenuated Total Reflectance) ataçmanı kullanılarak analiz edilmiştir. Optimize nanopartiküllerin yapısındaki fonksiyonel gruplar ve kimyasal bağları, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) cihazı ile 3 tekrar şeklinde tayin edilmiştir.

3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan tezde sentezlenen ve optimize edilen oktaadesilamin ve oktaadesilamin-folik asit konjuge nanopartiküllerin *in vitro* deneyleri HeLa insan serviks kanser hücre hattı (ATCC® CCL-2™) ve THP-1 insan lösemi monosit hücre hattı (ATCC® TIB-202™) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.6.1 Hücrelerin Canlandırılması

Önceden dondurulmuş hücre hatları -196 °C sıcaklığındaki sıvı azot tankında kriotüpler içerisinde muhafaza edilmektedir. Çalışılacak hücre hattı sıvı azot tankından alınarak hızlı bir şekilde çözündürülmüştür. Çözünen hücre 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün sonunda süpernatant atılarak pelet hücreye uygun tamamlanmış besiyerinde çözündürülmüştür. Pipetaj yapılarak hücre iyice çözündürüldükten sonra hücre kültür flasklarında 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin flaskın yüzeyine tutunmaları ve yoğunlukları

inverted mikroskop ile takip edilmiştir ve hücre yoğunluğu %80-90'a ulaşana dek iki günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Hücreler %80-90 konflent olduklarında ise pasajlama işlemi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan HeLa hücreleri adherent (yapışkan) ve THP-1 hücreleri ise süspanse kültürlerdir. Her iki hücredeki santrifüj koşulları aynıdır fakat HeLa hücreleri bulundukları yüzeye tutunarak çoğaldıkları için yatay, THP-1 hücreleri ise süspanse kültürde büyüdükleri için dikey pozisyonda inkübe edilmiştir.

3.2.6.2 Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması, bulundukları flasktan başka bir flaska zarar görmeden transfer edilmesi işlemidir. Hücreler, %80-90 konfluent olduğunda pasajlama işlemi yapılmıştır. HeLa hücreleri (yapışkan hücre) pasajlanmak için bulundukları yüzeyden tripsinizasyon ile ayrılmaları gerekmektedir. Flasktan besiyeri uzaklaştırılmış ve 1X Tripsin-EDTA eklenerek enzimin optimum çalışma koşullarını sağlayabilmek adına 37°C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücrelerin bulundukları yüzeyden ayrılıp ayrılmamaları mikroskop ile gözlenmiştir. Ayrılma gözlemlendiğinde hücrelere tripsin enzimini inaktive edebilmek için uygun ve tamamlanmış besiyeri eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Eklenen besiyerinin detripsinizasyon için kullanılan tripsinin en az iki katı kadar kullanılması gerektiği göz önünde bulundurulmuştur. Yıkama işleminden sonra hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak pelet uygun ve tamamlanmış besiyerinde nazikçe çözündürülmüştür. Pipetaj işleminin ardından yeni hücre kültür flasklarına aktarılmış ve uygun büyüme koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler inverted mikroskop ile takip edilmiş ve %80-90 konfluent olduklarında pasajlama işlemi tekrar edilmiştir. THP-1 hücreleri (süspanse hücre) tripsinizasyon işlemine gerek duymaksızın flasktan falkona direkt aktarılarak santrifüj edilmektedir. Santrifüjün ardından süpernatant atılarak pelet uygun ve tamamlanmış besiyerinde çözündürülerek yeni flasklara aktarılarak uygun büyüme koşullarında inkübe edilmiştir. Hücrelerin çoğalması inverted mikroskop ile her gün takip edilmiştir.

3.2.6.3 Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü

Sunulan tez çalışmasında yapılacak deneylerde hücrelerin ekilmesinden önce sayılması gerekmektedir. Hücre-besiyeri süspansiyonundaki canlı ve ölü hücreler tripan mavisi kullanılarak hesaplanmıştır. Tripan mavisi ile süspansiyondaki canlı hücreler ışık altında beyaz ve parlak görünürken, ölü hücreler mavi ve mat gözükmemektedir. Hücrelerin pasajlanması veya ekilmesi işlemlerinden önce hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Santrifüjün ardından pelet uygun ve tamamlanmış besiyerinde çözündürülmüştür. Pipetaj işleminin ardından 10 µL hücre süspansiyonu alınarak 10 µL tripan mavisi ile karıştırılmıştır. Hücre- tripan mavisi karışımından 10 µL alınarak Thoma lamına aktarılmıştır. Sayım lamdaki 16 eşit kareden oluşan sayma bölgesinin 4 tanesinin sayılıp ortalamasının alınması ile yapılmıştır. Sayımın ardından canlı hücre sayısı (3.1) eşitliği ile bulunmuştur.

$$\text{Canlı hücre sayısı} = \frac{\text{Thoma lamında sayılan hücre sayısının ortalaması} * \text{Dilüsyon faktörü} * \text{Toplam hacim} * 10^4}{16} \quad (3.1)$$

3.2.6.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler ihtiyaç halinde kullanıldıktan sonra, daha sonra da kullanılabilmek adına dondurulma işlemi (kriyopreservasyon) yapılmaktadır. Kriyopreservasyon ile dondurulmuş hücreler yeniden kullanılmak üzere eritildiklerinde canlılık ve fonksiyonel özelliklerinin yüksek oranda korunması amaçlanmıştır. Hücreler çok hızlı soğutulduklarında oluşan bu kristallerinin mekanik parçalanmaya sebep olması veya çok yavaş soğutulduklarında hücrenin dehidrasyonu nedeni ile hücre ölümleri olabilmektedir. Ani ısı değişimlerine karşı dondurma işlemi esnasında DMSO gibi kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. HeLa ve THP-1 hücreleri, hücre pasajlanması protokolünde belirtildiği üzere santrifüj edilmiş ardından 1 mL (%90 FBS, %10 DMSO) dondurma solüsyonunda çözündürülmüştür. Hücre-dondurma solüsyonu kriyotüplere aktarılarak -20 °C'de 30 dakika muhafaza edilmiştir. Kriyotüpler ardından -80°C'ye transfer edilerek saklanmıştır. Oda koşullarında hücreler üzerinde toksik etkiye sahip DMSO'nun etkisini en aza indirmek için hücreler kademeli olarak soğutulmuştur.

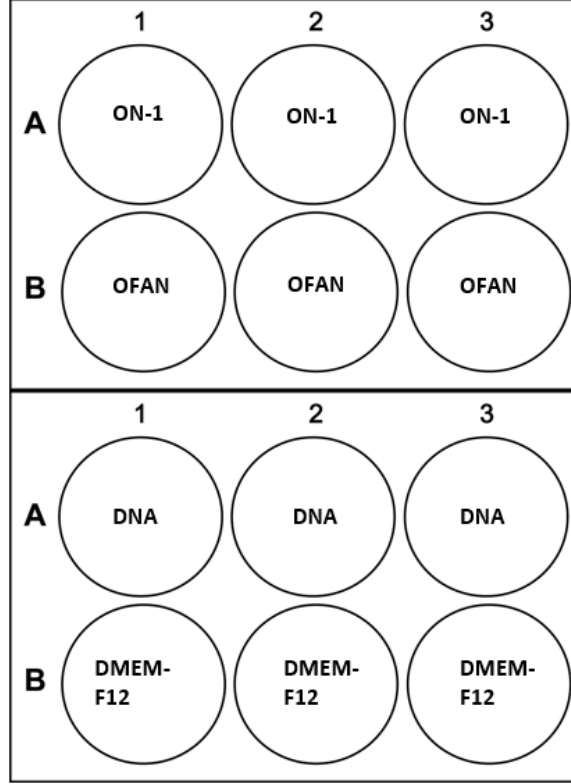
3.2.6 Sentezlenen Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül- Folik Asit Konjugatının Sitotoksitesitesi

Gen aktarım aracı olarak sentezlenen ve karakterizasyon işlemleri tanımlanan oktadesilamin nanopartikül ve oktadesilamin nanopartikül-folik asit konjugatının *in vitro* sitotoksitesitesi MTT analizi ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada sitotoksitesite, laboratuvar ortamında sentezlenen nanopartiküllerin hücreler üzerindeki toksisitesini belirlemek için yapılmaktadır. Bu analiz için HeLa hücreleri 96 kuyucuklu kültür plakasına 1×10^5 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Plaka, 37°C %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından, eşit sayıda kuyucuklara ayrı ayrı olarak farklı konsantrasyonlarda (15 µg/µL, 25 µg, 35 µg/µL, 45 µg/µL ve 55 µg/µL) oktadesilamin nanopartikül ve oktadesilamin nanopartikül-folik asit konjugatı eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak DMSO ve negatif kontrol olarak DMEM-F12 besiyeri kullanılmıştır. Analiz her bir konsantrasyon için 8 tekrar olarak yapılmıştır. 96 kuyucuklu kültür plakası 37°C %5 CO₂ koşullarında tekrar 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa steril PBS ile 1/10 oranında dilüe edilen 50 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenerek, 4 saat aynı kültür koşullarında inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyonun ardından MTT kuyucuklardan uzaklaştırılarak 100 µL DMSO eklenerek, mor formazan kristallerinin enzimatik olarak dönüşümü gözlenmiştir. 96 kuyucuklu kültür plakası ELISA okuyucuda 570 nm absorbans değerinde ölçülerek, hücrelerin canlılık değerleri belirlenmiştir. Değerlendirme yapılırken, negatif kontrolün 570 nm’de ölçülen absorbans değeri %100 hücre canlılığı olarak kabul edilerek, nanopartiküllerin sitotoksitesite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.7 Nanopartikül-pDNA Konjugatının Hücrelere Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyon işlemi yapılmadan bir gün önce, HeLa hücreleri 6 kuyucuklu kültür plakasına her bir kuyucuğa 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya 2 mL %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyeri ilave edilmiştir. Transfeksiyondan bir saat önce besiyeri, serum içermeyen DMEM-F12 besiyeri ile değiştirilmiştir. Bu esnada, oktadesilamin nanopartikül-pDNA konjugatı, oktadesilamin nanopartikül-

folik asit-pDNA konjugatı ve pDNA örneği hazırlanmış, etkileşim ve stabilizasyon için bir saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Konjugatlar, her bir kuyucuk için ayr ependorf tüpte hazırlanmıştır. Tüpe öncelikle belirlenen miktarda plazmid DNA eklenerek 100 µL serum içermeyen DMEM-F12 besiyerinde çözdürölmüştür. Ardından belirlenen miktarda nanopartiköl eklenerek tüpün ağzı kapatılmış ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve inkübasyonun ardından her bir kuyucuk için, belirlenen miktarda konjugat ile transfeksiyon yapılmıştır. Transfekte edilen HeLa hücreleri 4 saat boyunca 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından besiyeri, serum ilaveli DMEM-F12 ile değiştirilmiştir. Transfeksiyon etkinliğinin değerlendirilmesi GFP ışması ile yapılmıştır. Katı lipid nanopartiköl ile aktarılan plazmid DNA'da yer alan GFP kodlayan bölgenin eksprese olmasıyla beraber, uygun dalga boyunda florasana ışık altında ışıma gözlenebilmektedir. Transfekte olmuş hücrelerdeki ışımalar florasana ataçmanlı inverted mikroskopta 24 saat boyunca gözlenmiştir. Transfeksiyon etkinliği, hücrelerin faz kontrast ve florasana görüntülerinin karşılaştırılması ve görüntülerin sayılması ile belirlenmiştir. Hesaplamalar yapılırken sayım plakanın 3 farklı bölgesinden ve 3 tekrarlı olacak şekilde görüntü alınıp sayımı ile yapılmıştır. Plaka düzeni şekil 3.4'te gösterildiği gibidir.

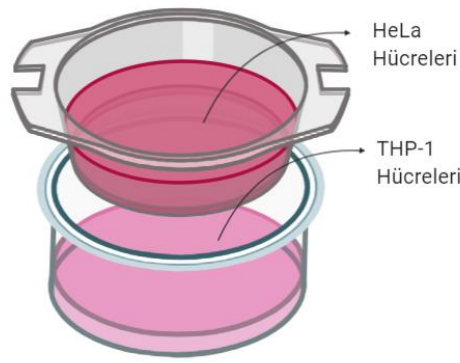


Şekil 3.4 Transfeksiyon çalışmalarında 6 kuyucuklu plaka düzeni

3.2.8 Transfekte Edilmiş HeLa Hücrelerinin Makrofaj Hücreleri Üzerine Etkisinin Ko-Kültür Yöntemi İle Belirlenmesi

Sentezlenen oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit nanopartikülleri ile transfeksiyon sonrası makrofaj hücreleri üzerine etkisi, ko-kültür yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlem için, monosit hücrelerinden makrofaj hücrelerine farklılaşma protokolü uygulanmıştır. THP-1 hücreleri 6 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Her bir kuyucuğa 1 mL %10 FBS içeren RPMI besiyeri eklenmiştir. 200 mM PMA-RPMI çözeltisi damla damla eklenmiştir. THP-1 hücrelerinin hücre kültürü flaskına yapışması, 96 saat boyunca inverted mikroskop ile takip edilip incelenmiş ve görüntülenmiştir. Transwell insert aparatı, THP-1 hücrelerinin farklılaşma süreci bittiğinde 6 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Aparatın alt kısmına THP-1 hücreleri üst kısmına ise her bir kuyucukta 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde HeLa hücreleri ekilmiştir (Şekil 3.5). Şekil 3.5 BioRender ile çizilmiştir. Hücreler 72 saat boyunca

beraber kültüre edilmiştir. 72 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklardan besiyerleri toplanmıştır. Elde edilen vasatlar, IL-6 seviyeleri daha sonra test edilmek üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir. HeLa hücreleri ile uyarılarak makrofajlara dönüştürülen THP-1 hücrelerinin ko-kültürü çalışmasının ardından IL-6 seviyeleri ticari olarak temin edilen Human IL-6 ELISA Kit prosedürüne uygun olarak tespit edilmiş, absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sitokin seviyeleri pg/mL cinsinden değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5 Ko-kültür yönteminde hücrelerin ekimi (www.biorender.com ile çizilmiştir)

3.2.9 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Hücre Siklusuna Etkisinin İncelenmesi

HeLa serviks kanseri hücre hattı kullanılarak stres modeli oluşturulmuştur. CD1 ve p53/TP53 kantitatif değerlerinin tayin edilmiştir. HeLa hücreleri 24 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucuğa 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon işlemi esnasında kullanılan nanopartikül miktarı, HeLa hücrelerinin üzerine eklenerek 72 saat boyunca uygun kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit konjugatı ile inkübe edilen hücreler santrifüjlendikten -80 °C'de 1 saat muhafaza edilmiştir. 1 saatin ardından 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ile analiz yapılmıştır. Kontrol grubu olarak herhangi bir nanopartikül ile işlem görmemiş HeLa hücreleri kullanılmıştır. Strese

maruz bırakılan HeLa hücreleri, Human Cyclin D1 ELISA Kit ve Human p53/Tumor Protein ELISA Kit prosedürlerine göre işlem görmüştür. Her bir örnek 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, firmanın önerdiği metot ile hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucundaki değerler ile sentezlenen oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin hücre siklusuna etkisi değerlendirilmiştir.

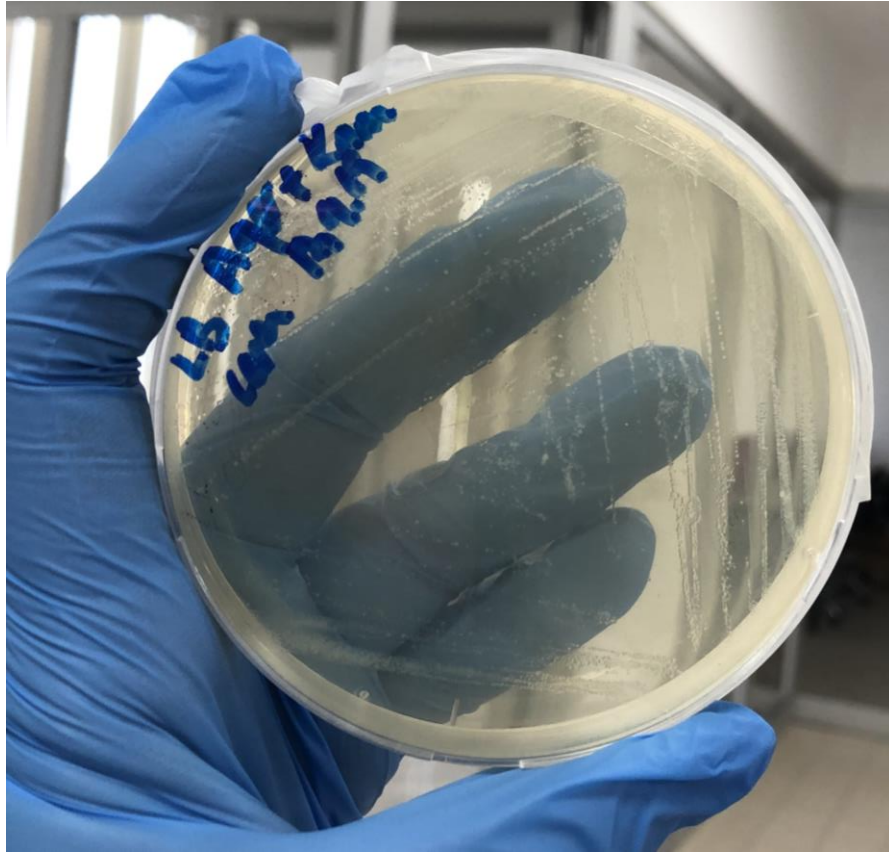
3.2.10 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Antioksidan Kapasite Çalışması

HeLa serviks kanseri hücre hücre hattı kullanılarak stres modeli oluşturulmuştur. Sentezlenen oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit nanopartiküllerin antioksidan- oksidan kapasiteleri belirlenmiştir. HeLa hücreleri 24 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon işlemi esnasında kullanılan nanopartikül miktarı, HeLa hücrelerinin üzerine eklenerek 24 saat boyunca uygun kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit konjugatı ile inkübe edilen hücreler santrifüjledikten sonra -80 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saatin ardından 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve süpernatant ile analiz yapılmıştır. Kontrol grubu olarak herhangi bir nanopartikül ile işlem görmemiş HeLa hücreleri kullanılmıştır. Strese maruz bırakılmış HeLa hücreleri TAS (Rel assay, Total Antioxidant Status Kit) kiti ve TOS (Relassay Total Oksidant Status Kit) kiti prosedürlerine uygun olarak işlem görmüştür. Her bir örnek 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, firmanın önerdiği metot ile hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucundaki değerler ile sentezlenen oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin antioksidan- oksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 IL-6 Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Sunulan tez çalışmasında, IL-6 ve GFP gen bölgelerini kodlayan ve kanamisine dirençli plazmid gen aktarımı çalışmalarında kullanılmak üzere tercih edilmiştir. Saplama kültürde temin edilen *Escherichia coli* DH5 α suşu, öncelikle steril bir kürdan kullanılarak kanamisin içeren LB Agar içeren petri kaplarına ekilmiştir. Ardından 37 °C'de statik kültürde bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Petri kaplarında yer alan seçici besiyerinde görülen bakteri kolonileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Seçici besiyerinde gözlenen bakteri kolonileri

Petride üreme gösteren kolonilerden bir tane seçilerek, erlenmayer şişedeki kanamisin içeren LB Broth sıvı besiyerine aktarılmıştır. Sıvı kültür 37 °C’de 200 rpm’de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün sıvı besiyerindeki bakterilerin yoğunluğu, 650 nm dalga boyunda UV visible cihazında ölçülmüştür. Cihazda blank değeri olarak LB Broth kullanılmıştır. Sıvı besiyerindeki bakterilerin yoğunluğu, 0,5 olarak ölçülmüştür. Bu değer bakterinin logaritmik büyüme fazında olduğunu ve izolasyon için yeterli miktarda bakteriye ulaşıldığını göstermektedir. Çalışmada kullanılacak plazmidi içeren bakterinin uzun süreli depolanması ve saklanması için bu aşamadan sonra dondurma işlemi yapılabilmektedir. Bakteri erlenmayer şişeden falkon tüpe aktararak oda sıcaklığında 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet dondurulmak üzere %20 gliserol (w/v) çözeltisinde çözündürülmüş ve 1 mL’lik ependorf tüplere alikotlanmıştır. Dondurulan bakteri kültürü depolanmak üzere -80 °C’ye aktarılmıştır. Plazmid DNA izolasyonu, QIAGEN Inc® (Almanya) firmasından temin elinden Plasmid Plus Maxi Kit ile firmanın önerdiği kit protokolü ve kitin tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pürifikasyon çalışması 3 set halinde yapılmıştır ve elde edilen plazmid DNA’ların yoğunluk ve saflık değerleri Nanodrop cihazı ile 260 nm ve 280 nm absorbans değerlerinde ölçülmüş ve hesaplanmıştır. İzole edilen pDNA örneklerinin yoğunluk ve saflık değerleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 İzole edilen pDNA yoğunluk ve saflık değerleri

	µg/µL	A260/A280
pDNA 1	1,91	1,82
pDNA 2	2,48	1,80
pDNA 3	2,46	1,86

Literatürde yer alan çalışmalara göre, analizlerde kullanılmadan önce “DNA kalitesi” mutlaka spektrofotometrik, jel elektroforezi veya florometrik analizler ile değerlendirilmelidir. Spektrofotometrik olarak, DNA izolasyonu işleminin ardından 260 nm ve 280 nm absorbans değerlerinde ölçümler yapılarak DNA yoğunluğu ve saflığı değerleri değerlerine ulaşılabilir. İzole edilen pDNA saflığı genellikle ~1,8-2,0 arasında ise DNA “saf” olarak tabir edilebilir. Eğer bu

oran kayda değer bir ölçüde düşükse ($\leq 1,6$), ölçüm yapılan absorbans değerlerinde veya yakınlarında güçlü şekilde emilen proteinlerin, fenolün veya diğer kontaminant maddelerin varlığını gösterebilir. Aksine absorbans okumaları esnasında DNA ve RNA arasında ayırım yapılamadığından bu değer kayda değer bir ölçüde yüksekse ($\geq 2,0$) numunedeki RNA'nın varlığının oranı arttırdığı ve kontaminasyona sebep olduğu söylenebilir [104], [105]. Bu verilere göre, transfer edilmek istenen plazmid DNA'nın izolasyonu işleminin ardından elde edilen 3 pDNA örneği de kullanıma uygun olarak elde edilmiştir.

4.2 Oktadesilamin Bazlı Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Çalışmada kullanılmak üzere oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküller tekli emülsiyon (w/o) çözücü difüzyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Üretilen nanopartiküllerin formülasyonu Tablo 4.2'de belirtilmiştir. Nanotaşıyıcı sistemler üç farklı formülasyonda üç tekrar şeklinde aynı laboratuvar koşullarında ve aynı malzemeler kullanılarak üretilmiştir. Sentez işleminin ardından örneklerin ilk olarak boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Gen aktarımı çalışmalarında kullanıma uygun bulunan bir formülasyon ile oktadesilamin nanopartikül-folik asit konjugatı oluşturulmuştur. Çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilen partiküller liyofilize edilip kurutularak, -20°C'de muhafazaya edilmiştir.

Tablo 4.2 Sentezlenen oktadesilamin nanopartikül isim ve formülasyonları

Nanopartikül İsmi Formülasyon	Lipid faz		Sümfektan Faz		Sonikasyon	
	Lipid molekül	Çözücü	Sümfektan molekül	Çözücü	Süresi	Gücü
ON-1	0,062 gram oktadesilamin	4 mL kloroform	3 gram Tween 80	50 mL PBS	50 sn	%30 amp.
ON-2	0,062 gram oktadesilamin	4 mL kloroform	1,5 gram Tween 80	50 mL PBS	50 sn	%30 amp.
ON-3	0,062 gram oktadesilamin	4 mL kloroform	1 gram Tween 80	50 mL PBS	50 sn	%30 amp.

4.3 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikül-Folik Asit Konjugatının Hazırlanışı

Sentezlenen üç farklı formülasyona ait partikül örnekleri boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Ardından çalışmaya en uygun olan formülasyon seçilerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilmiş nanopartiküller ile oluşturulan konjugat tekrar boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Seçilen oktadesilamin nanopartikül ve oktadesilamin nanopartikül-folik asit konjugatı ile morfolojik ve kimyasal analizler tamamlanmıştır.

4.4 Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül-Folik Asit Konjugatının Karakterizasyonu

Sentezlenen oktadesilamin nanopartikül ve oktadesilamin-folik asit konjuge nanopartiküller sentezlendikten morfolojik ve kimyasal analizleri yapılmıştır. Partiküllerin boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel analizleri

Zetasizer ile belirlenmiştir. Elde edilen partiküllerin morfolojik analizleri SEM ve AFM ile kimyasal özellikleri ise FT-IR ile tayin edilmiştir.

4.4.1 Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI) ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen nanotaşıyıcı sistemlerin boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel gibi gen aktarımında oldukça önemli olan özellikleri Zetasizer analizi ile belirlenmiştir. Üç farklı formülasyon denenmiş ve üç tekrarlı olacak şekilde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir. ON ismi verilen oktadesilamin nanopartikül örneklerinden seçilen ON-1 isimli nanopartikül çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilerek öncelikle folik asit ile konjugat oluşturmuş ardından karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 4.3 Nanopartiküllerin Zetasizer analizi sonuçları

Nanopartikül İsmi	Boyut (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
ON-1	129 ±5,02	0,3	+33 ±7,8
ON-2	976 ±10,30	0,3	+40,2 ±6,3
ON-3	1068 ±11,01	0,2	+31 ±15,3
OFAN	150 ± 6,40	0,4	+35 ±5,2

Çalışmada kullanılacak olan nanotaşıyıcı sistemlerin formülasyon çalışmasında lipid faz sabit tutulurken sürfektan fazın konsantrasyonu değiştirilmiştir. Konsantrasyonlar sırası ile %6, %3 ve %1,5 Tween 80 içeren çözeltiler olarak belirlenmiş ve partiküller sırasıyla ON-1, ON-2 ve ON-3 olarak isimlendirilmiştir. ON-1, en yüksek sürfektan konsantrasyonuna sahiptir ve parçacık boyutu 129±5.02 nm olarak belirlenmiştir. Ardından ON-2, ve ON-3 formülasyonlarında %3 ve %1,5 oranında sürfektan içermektedir ve sırasıyla parçacık boyutu 976±10,30 ve 1068±11,01 olarak belirlenmiştir. Literatürde yer alan Doktorovova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gen aktarımında kullanılmak üzere sentezlenen ve karakterizasyon çalışmaları yapılan pozitif yüklü katı lipid nanopartiküllerin yapılarındaki sürfektan molekülünün konsantrasyonu arttıkça parçacık boyutunun küçüldüğü görülmüştür [106]. Benzer olarak, 2017 yılında

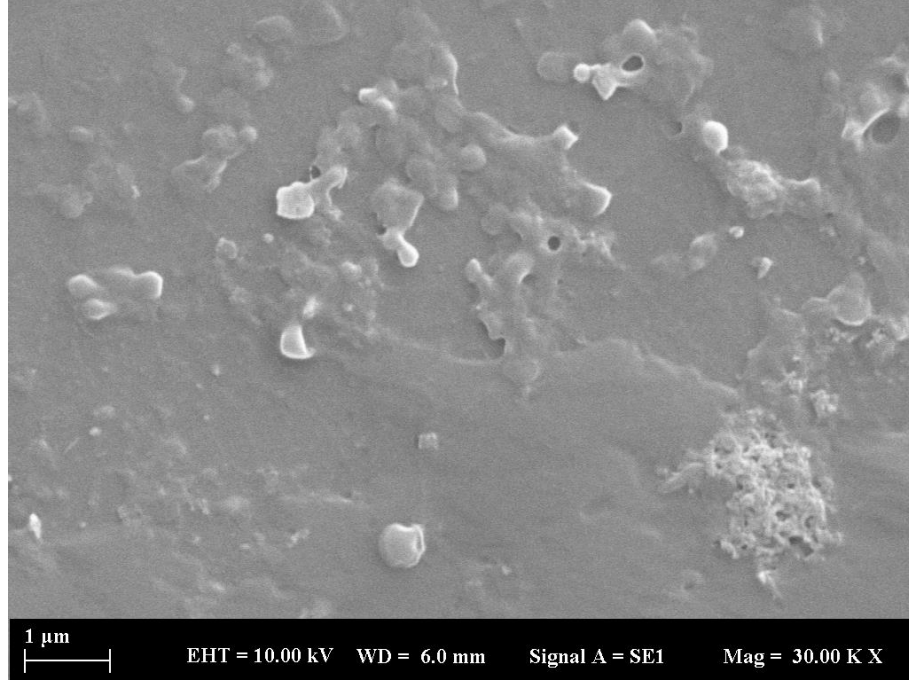
Botto ve arkadaşları, pozitif yüklü KLN sentezinde çeşitli sürfektanları farklı konsantrasyonlarda deneyerek sürfektan konsantrasyonu ve parçacık boyutu bağlamında bu tez çalışmasında verilen değerler ile paralel sonuçlar ortaya koymuştur [107]. Polidispersite indeksi terimi, bir boyut dağılımının homojen olmama durumu olarak tanımlanmaktadır. PDI terimi boyutsuzdur iki parametrelili bir ölçümün ardından elde edilen bir sayıdır. Literatüre göre lipid bazlı taşıyıcı sistemlerde, bir boyut dağılımının değeri 0,05 ve 0,7 değerleri arasında olmalıdır. 0,7'den büyük olan PDI değerleri numunenin çok geniş partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu ve DLS tekniği ile analiz edilmeye uygun olmadığını göstermektedir [108]. Özellikle gen aktarımı çalışmalarında bu değer 0,7'den küçük olmasına dikkat edilmektedir. Tablo 4.3'te görüldüğü üzere sentezlenen tüm nanopartiküllerin PDI değerleri 0,7'den küçük olarak bulunmuştur. Ayrıca nanopartiküllerin endositozunda ve DNA ile interaksiyonunda parçacık boyutu ve PDI ile zeta potansiyel de oldukça önemlidir. Tablo 4.3'te belirtilen zeta potansiyel değerleri incelendiğinde tüm örneklerin yüksek pozitif yük taşıdığı görülmektedir. Ölçülen zeta potansiyel değeri, DNA ve KLN arasındaki etkileşimin derecesi hakkında bilgi vermektedir. Çalışmanın amacına uygun olarak negatif yüklü DNA ile "doğal" olarak etkileşime girebilecek ve pDNA'nın kanser hücrelerine yüksek verimde aktarılabilmesini sağlayabilecek partiküller elde edilmiştir. Literatürde yer alan bilgiye göre, pDNA transferinde kullanılmak amacı ile sentezlenen KLN'lerin yüksek pozitif özellik göstermeleri gerektiği belirtilmektedir. Yüğü +30 mV ve üstünde olan KLN'lerin DNA ile daha sağlam bağlandığı ve aynı zamanda taşınan DNA konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir. pDNA ve KLN'nin yük oranı (+/-), hedef hücreye transfer ve transfeksiyon etkinliği açısından oldukça biyolojik etkinliği arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda bahsi geçen yük oranının arttırılması ile KLN-aracılı gen aktarımı işleminde stabilite ve etkinliğin de orantılı olarak arttığı görülmüştür [67]. Benzer şekilde, Tabatt ve arkadaşları, plazmid DNA transferinde kullanılmak üzere ürettiği KLN örneklerinin zeta potansiyelinin +37,8 ile +41,2 mV skalasında olduğu ve DNA'yı oldukça etkin transfekte ettiği gözlenmiştir [109].

Çalışmada kullanılmak üzere üç farklı formülasyonda ON sentezlenmiş, Zetasizer cihazı ile yapılan analizleri sonunda tez çalışmasının devamında kullanılmak üzere

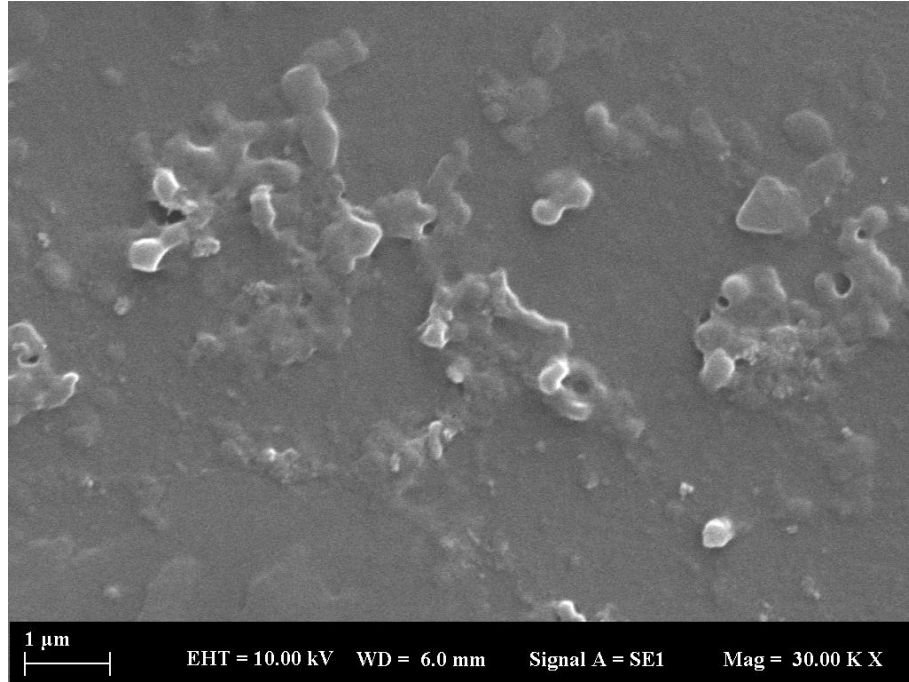
ON-1 isimli nanopartikül seçilmiş ve folik asit konjugatı oluşturulmuştur. OFAN olarak isimlendirilen nanopartikül örneğinin parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli Tablo 4.3'te verilmiştir. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, parçacık boyutu $150\pm6,40$, PDI 0,4 ve zeta potansiyeli $+35\pm5,2$ olarak bulunmuştur. ON-1 ve OFAN partikülleri karşılaştırıldığında parçacık boyutunun ve PDI değerinin arttığı ancak zeta potansiyelin çok fazla değişmediği görülmüştür. Literatürde, 2020 yılında Yassemi ve arkadaşlarının çalışmasında KLN'lerin parçacık boyutu folik asit ile konjugat oluşturmadan önce $227,8\pm6,93$ nm, PDI değeri 0,3 olarak; konjugat oluşturduktan sonra ise $258\pm12,74$ nm ve 0,2 olacak şekilde değiştiği gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada parçacık boyutu ve PDI değişirken zeta potansiyelin kayda değer bir ölçüde değişmediği gözlenmiştir [89]. Zeta potansiyel, sürfektan ve lipid molekülünün konsantrasyonu ve cinsinden etkilendiği bilinmektedir. Yapılan tez çalışmasından elde edilen veriler ile literatürde yer alan güncel çalışmalarda belirtilen veriler paralellik göstermektedir [88], [110]–[112].

4.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Sunulan tez çalışmasının devamında, karakterizasyon çalışmaları ON-1 ve OFAN isimli nanopartikül örnekleri ile devam etmiştir. SEM analizi için örnekler, yüksek vakum altında altın ile kaplandıktan sonra 30000x büyütmede incelenmiştir. ON-1 isimli nanopartiküle ait SEM görüntüsü Şekil 4.2'de, OFAN isimli nanopartiküle ait SEM görüntüsü ise Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.2 ON-1'e ait SEM görüntüsü



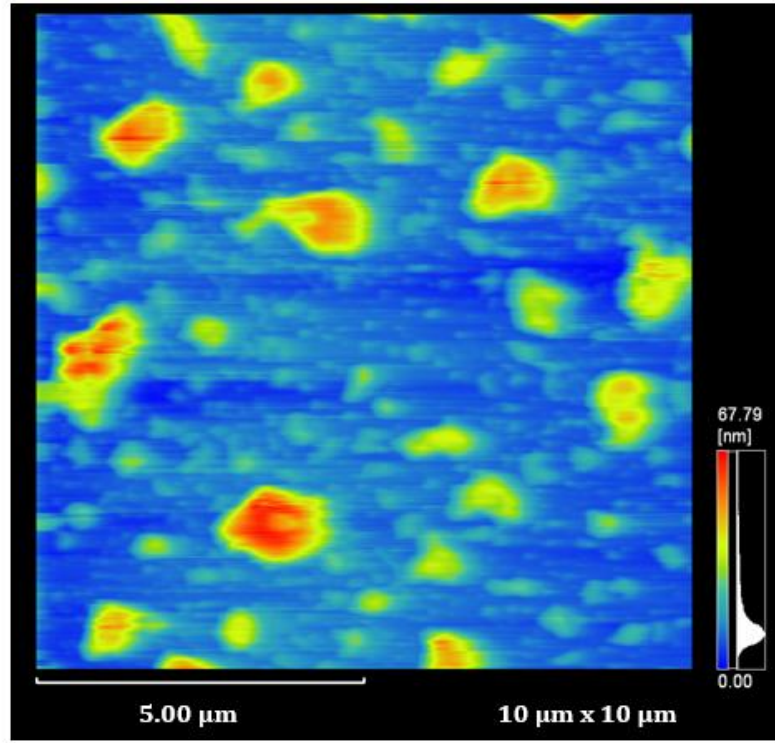
Şekil 4.3 OFAN'ye ait SEM görüntüsü

Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilen SEM görüntülerine göre, elde edilen nanopartiküller küresel şekilli, dar boyut dağılımına sahiptir. Ayrıca parçacık boyutlarının 100-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. ON-1 ve OFAN isimli nanopartiküllerin analizden önce kurutularak hem KLN matriksindeki hem de KLN çevresindeki su

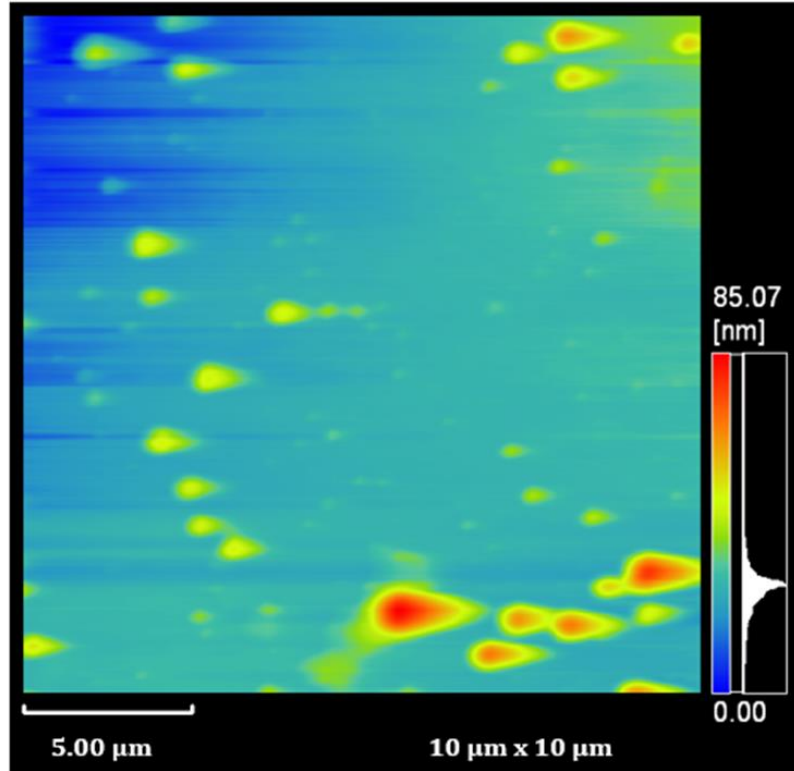
uzaklaştırılmıştır. Kurutma işleminden dolayı SEM analizinde elde edilen boyutlar Zetasizerda elde edilen boyutlardan daha küçük olarak bulunmuştur. Literatürde Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, folat konjuge KLN'lerin boyutları SEM görüntüleri DLS yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile farklılık göstermektedir. DLS yöntemi sonucu, 254.5 ± 5.8 nm olarak ölçülen boyut SEM analizinde ~ 140 nm olarak bulunmuştur. Ayrıca ilgili çalışmadaki SEM görüntüleri sunulan tez çalışmasında elde edilen partiküllerin SEM görüntüleri ile benzerlik göstermektedir [113]. Dolatabadi ve arkadaşları 2014 yılında Compritol bazlı KLN sentezlemiş ve partikül morfojisini SEM analizi ile belirlemiştir ve partiküllerin yuvarlak şekilli ve dar boyut dağılımına sahip olduğunu belirtmişlerdir [114]. 2016 yılında, Sabzichi ve arkadaşları MCF-7 hücrelerine Letrozol transferi amacı ile folat konjuge KLN sentezi ve karakterizasyonu yapmıştır. İlgili çalışmada, verilen SEM görüntüsü sunulan tez çalışmasındaki SEM görüntüsü ile benzerlik göstermiştir [115]. Yapılan tez çalışmasında ve literatürde yer alan çalışmalara istinaden sentezlenen, optimize edilen ve karakterizasyon işlemleri yapılan KLN'lerin folik asit ile konjugasyon işleminin ardından SEM görüntülerinde kayda değer bir değişiklik görülmediği söylenebilmektedir.

4.4.3 Atomik Güç Mikroskobu (AFM)

ON-1 ve OFAN isimli partiküllerin AFM cihazı ile karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Örnekler, $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ boyutunda bir alanda, temassız modda sinyal frekansı 1 Herz olacak şekilde analiz edilmiştir. Mika disklerin üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulan örneklerin AFM görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 ON-1'e ait AFM görüntüsü



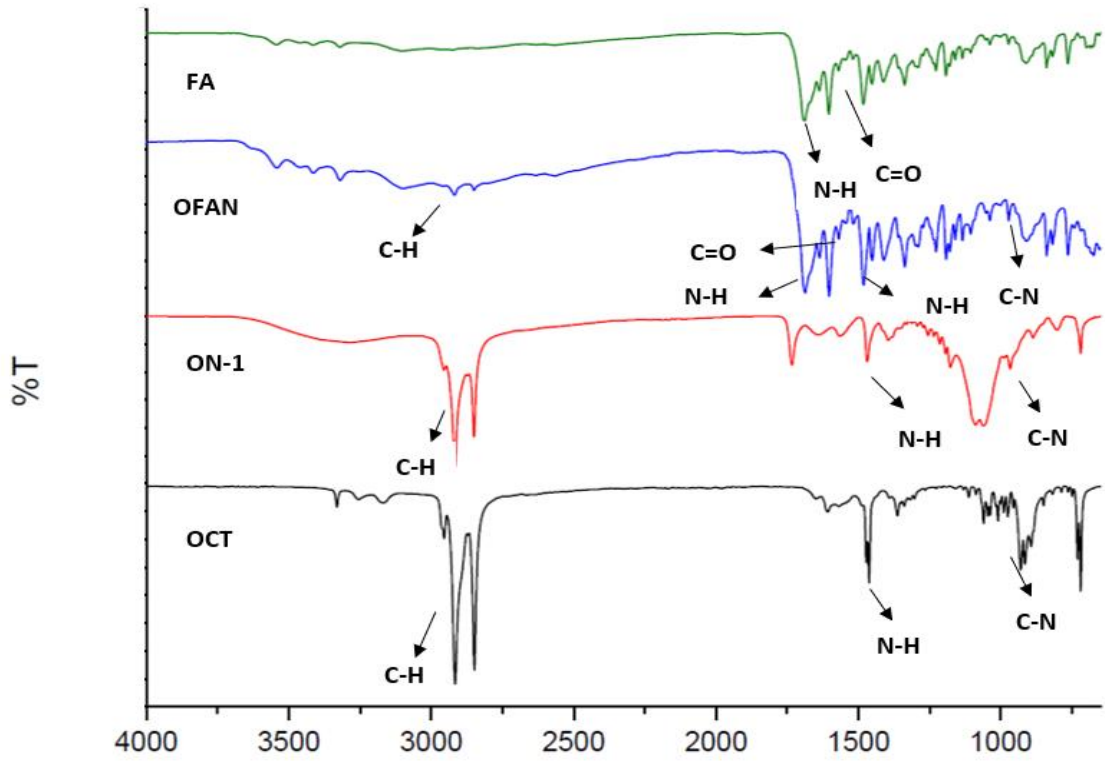
Şekil 4.5 OFAN'ye ait AFM görüntüsü

ON-1'e ait AFM görüntüsü Şekil 4.4'te, OFAN'ye ait AFM görüntüsü ise Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Her iki şekilde de nanopartiküllerin yuvarlak şekilli ve nano boyutta olduğu görülmüştür. Aynı zamanda nanotaşıyıcı sistemlerin lipid bazlı yapısından dolayı agregatlar oluştuğu gözlenmiştir. SEM analizinde olduğu gibi AFM analizinde de KLN'lerin folik asit ile konjugasyonundan sonra yüzey morfolojilerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Kumar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı sürfektan moleküller kullanılarak KLN'ler sentezlenmiş ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada verilen AFM görüntülerinde de DLS analizinden elde edilen parçacık boyutundan daha büyük boyutlu partiküller gözlenmiştir. Bu olayın nedeni lipid bazlı partiküllerin agregasyona olan eğilimi olarak belirtilmiştir [116]. 2010 yılında Vighi ve arkadaşları, Na1300 nöroblastoma hücre hattına pDNA transfer etmek amacı ile iki farklı katyonik lipid bazlı nanopartikül sentezlemiştir. Sentezlenen nanopartiküller DLS yöntemi ile analiz edildikten sonra uygun bulunanlar AFM ile analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre, DLS ve AFM analizleri sonucu partikül boyutları ve yoğunluğu paralellik göstermektedir [117].

Son yıllarda nanopartiküllerin sık kullanıldığı alanlardan birisi gen/ilaç aktarımı çalışmalarıdır. Literatürdeki bilgiye göre, 200 nm ve altında parçacık boyutuna sahip partiküllerin, kan dolaşımında daha fazla seyahat edebildiği ve penetrasyon kabiliyetinin daha fazla olduğu bilinmektedir [25]. Partikül boyutu küçük olan nanopartiküller, EPR adı verilen tümör mikroçevresindeki anormal derecede sızdıran ve fonksiyonunu kaybetmiş lenfatik drenaj nedeniyle katı tümörlerde birikme eğilimindedirler. Nanoboyutlardaki taşıyıcı sistemlerin dokuya girişi sağlanır, drenaj engellenir ve partiküllerin tümör dokusunda birikmesi sağlanır. Sunulan tez çalışmasında, DLS metoduna dayanan Zetasizer analizi, SEM ve AFM analizleri ile sentezlenen oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin ve oktadesilamin nanopartikül-folik asit konjugatının boyutlarının 200 nm altında olduğu ve morfolojisinin tasarlanan çalışma için uygun olduğu belirlenmiştir. Karakterizasyon işlemleri, partiküllerin kimyasal yapısının belirlenmesi için FT-IR ile devam etmiştir.

4.4.4 Fourier Transform Infrared (FT-IR)

Parçacık boyutu, polidispersite indeksi ve yük değerleri belirlenen ve uygun görülen partiküller morfolojik olarak da analiz edilmiş ve çalışmanın amacına uygun görülmüştür. ON-1 ve OFAN isimli nanopartiküllerin, yapısında barındırdığı fonksiyonel grupların ve kimyasal bağların varlığı FT-IR analizi ile belirlenmiştir. IR spektrumu ile sentezlenen nanopartiküllerin yapısındaki kimyasal bağlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. FT-IR analizi ile KLN'lerin yapısındaki kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların titreşimi ile elde edilen spektrum $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ skalasında belirlenmiştir.



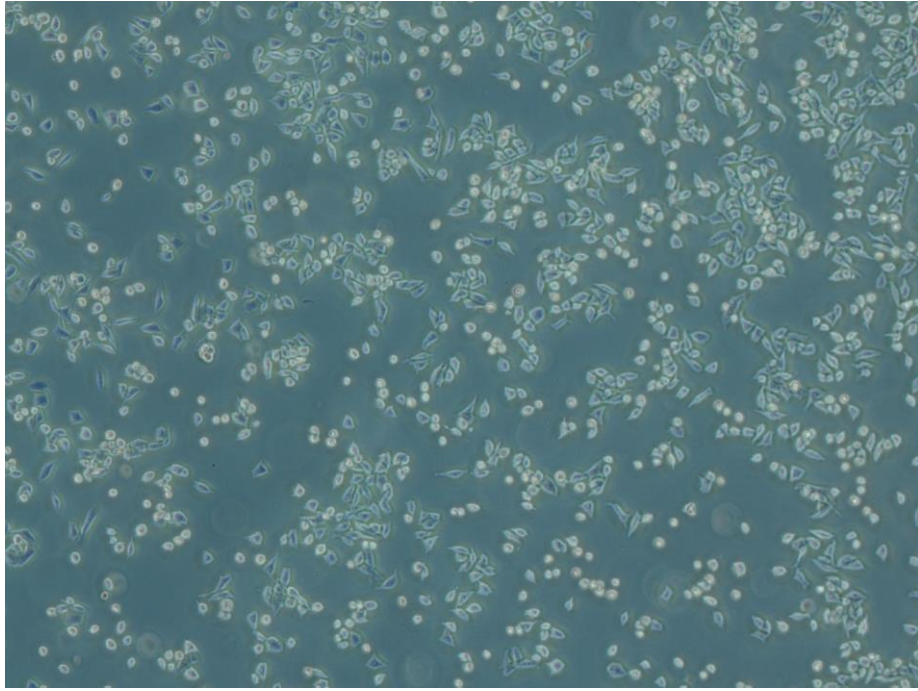
Şekil 4.6 Sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR spektrumları

Şekil 4.6'da folik asit, OFAN, ON-1 ve oktadesilaminin FT-IR analizi sonucu elde edilen spektrum gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi ON-1 ve OFAN, saf oktadesilamin ile neredeyse aynı karakteristik piklere sahiptir. Aynı zamanda OFAN, işlem görmemiş folik asite özgü karakteristik pikleri de spektrumunda barındırmaktadır. Şekil 4.6'da verilen IR spektrumuna göre, oktadesilaminin yapısında bulunan bağlar; 2920 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} ve 1110 cm^{-1} yakınlarında pik

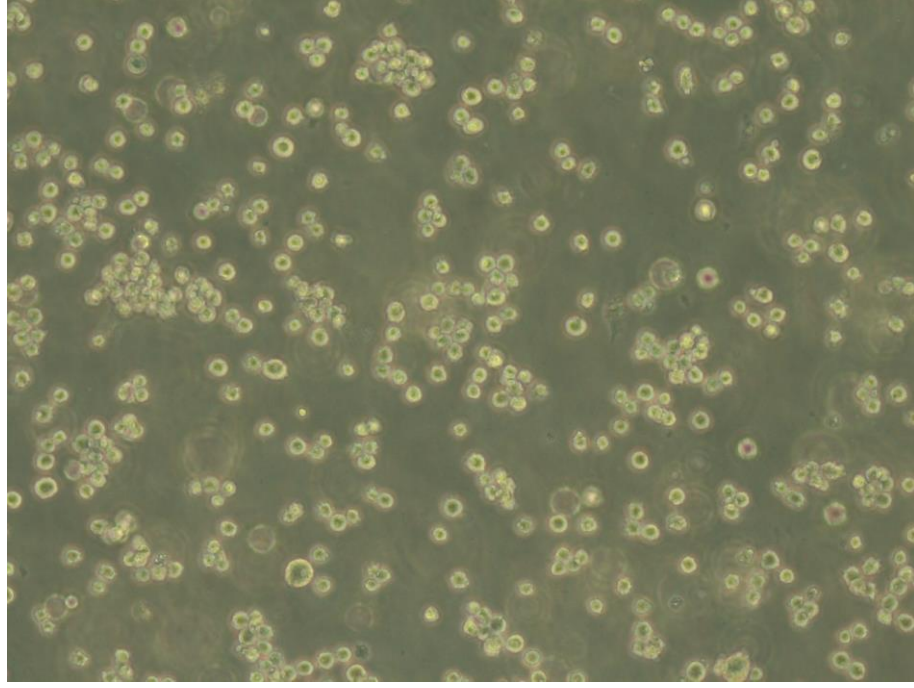
veren sırasıyla C-H, N-H ve C-N gerilmelerini temsil etmektedir. Bu gerilmeler oktadesilaminin yapısında bulunan karakteristik bantlardır ve saf oktadesilamin, OFAN ve ON-1 partiküllerine ait spektrumda görülebilmektedir. Verilen IR spektrumunda görüldüğü üzere, belirtilen üç bantın yoğunluğu üç farklı spektrumda farklılık göstermektedir. Saf oktadesilaminde görülen bu üç karakteristik bağ, ON-1'den ve OFAN'den daha keskin ve belirgindir. Bu yoğunluk farkı, partikül yüzeyine ve saf maddeye eklenen moleküllerin oluşturduğu yeni kimyasal bağlardan kaynaklanmaktadır. Bununla beraber saf folik asit ve OFAN'ye ait spektrumlarda da benzerlik görülmektedir. Folik asit, yapısında bulunan primer amin ($R-NH_2$) uç ve karboksil uç ($-COOH$) bulundurmaktadır. Oktadesilaminin yapısında bulunan terminal amin grubu ile bağ kurarak amide grubu oluşturur. Saf folik asitin yapısında bulunan 1712 cm^{-1} ve 1557 cm^{-1} gerilmeleri sırasıyla amin grubundaki N-H ve asitmerik gerilmelerden kaynaklanan $C=O$ kimyasal bağlarından kaynaklanmaktadır. IR spektrumunda, saf folik asit ve OFAN isimli nanopartikülün sahip olduğu bağların varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.6'da verilen IR spektrumun analizi sonucu, oktadesilamin bazlı nanopartikül örneklerinin saf oktadesilamin ile aynı kimyasal bağlara sahip olduğu ve elde edilen nanopartiküllerin folik asit ile başarılı bir konjugat oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Azandaryani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, polimer-lipid hibrit nanopartiküllerin folik asit ile konjugasyonu yapılmıştır. Belirtilen çalışmada sunulan folik asitin FT-IR spektrumu ve kimyasal yapısı hakkında elde edilen bilgiler Şekil 4.6'da verilen spektrumu doğrular niteliktedir [118]. Ayrıca 2012 yılında Varshosaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kronik myeloid lösemi hücre hattına (K562) ilaç transferi amacı ile lipid matriks olarak oktadesilamin kullanılarak KLN sentezlenmiş ve folik asit ile konjugasyon oluşturulmuştur. Bu çalışmada, verilen FT-IR grafiği; oktadesilamin, folik asit ve bu iki molekülün konjugasyonuna ait spektrumları, bu çalışmada elde edilen spektrumlarla benzerlik göstermektedir [119].

4.5 Hücre Kültürü alışmaları

Sunulan tez çalışmasında; sentezlenen, optimize edilen ve karakterize edilen ON-1 ve OFAN nanopartiküllerin *in vitro* deneyleri HeLa serviks kanser hücre hattı ve THP-1 insan lösemi monosit hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. HeLa hücre hattı %10 FBS içeren DMEM-F12 besiyerinde, THP-1 hücre hattı %10 FBS içeren RPMI besiyerinde 37°C %5 CO₂ koşullarında büyütülmüştür. şekil 4.7 ve şekil 4.8’de bu çalışmada kullanılan hücrelerin 10x faz kontrast hücre görüntüleri verilmiştir.



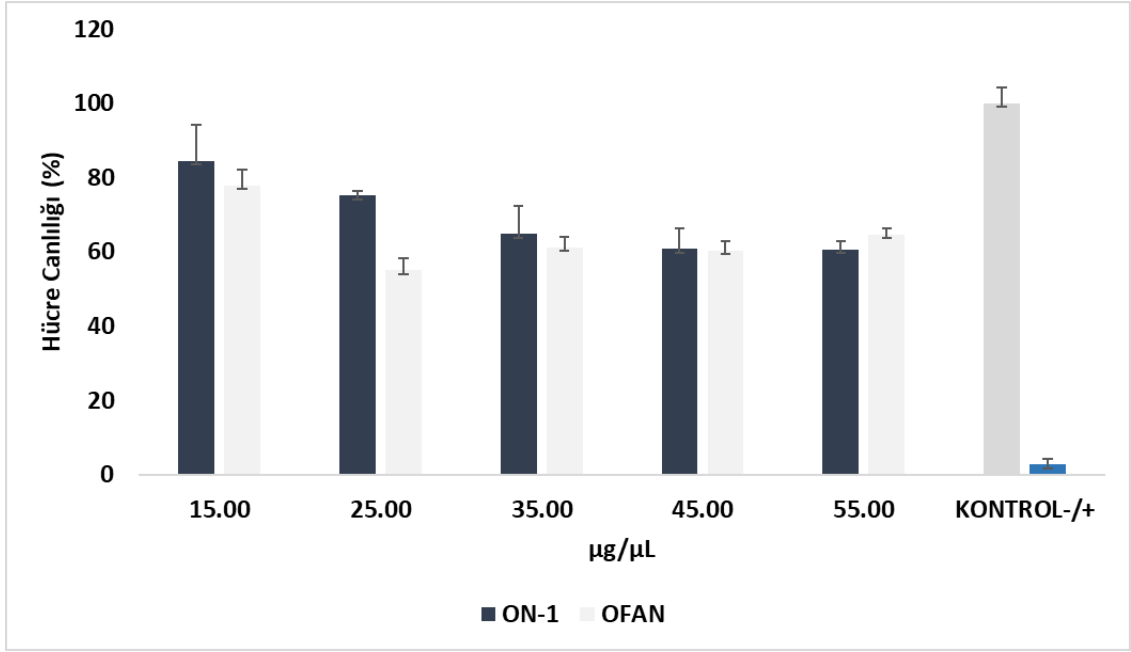
şekil 4.7 HeLa serviks kanser hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü



Şekil 4.8 THP-1 hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü

4.6 Oktadesilamin Nanopartikül ve Oktadesilamin Nanopartikül- Folik Asit Konugatının Sitotoksitesi

Karakterizasyon işlemleri sonucu, ON-1 ve OFAN nanopartikülleri çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksite analizleri HeLa hücre hattında MTT analizi ile belirlenmiştir. ON-1 ve OFAN isimli örnekler farklı konsantrasyonlarda (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 55 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) olacak şekilde ekilmiştir. Her bir konsantrasyon 8 tekrar olarak çalışılmıştır. Yapılan MTT analizinde, negatif kontrolü 570 nm'deki ölçülen absorbans değeri %100 hücre canlılığı olarak kabul edilerek hücre canlılığı oranları hesaplanmıştır. Analiz edilen farklı konsantrasyonların HeLa hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksite analizi sonuçları Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Çeşitli konsantrasyonlarda ON-1 ve OFAN partiküllerinin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

ON-1 için hücre canlılığı değerleri 15 µg/µL için %85 (± 5,2), 25 µg/µL için %75 (±1,3), 35 µg/µL için %65 (±4,3), 45 µg/µL için %61(±3,5) ve 55 µg/µL için %60 (±2,3) olarak belirlenmiştir. OFAN için hücre canlılığı değerleri 15 µg/µL için %78 (±3,3), 25 µg/µL için %55 (±2,8), 35 µg/µL için %61 (±2,5), 45 µg/µL için %60 (±1,7) ve 55 µg/µL için %65 (±1,5) olarak belirlenmiştir. Elde edilen hücre canlılığı değerlerine göre, sentezlenen nanopartiküllerin değerlendirilen konsantrasyonlarının hepsinde canlılık %55'in üzerindedir.

Nanopartiküler sistemler başta gen aktarımı amacı ile olmak üzere kanser immünoterapisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin *in vitro* ve *in vivo* denemelerinde en önemli faktörlerden birisi kabul edilebilir miktarda toksik etkiye sahip olmalarıdır. Nanomalzemelerin hızlı, güvenli ve başarılı bir şekilde günlük hayata entegrasyonunda herhangi bir potansiyel güvenlik ve çevresel sorunla karşı karşıya gelmemek adına, sitotoksikite değerlendirme çalışmaları önem arz etmektedir [96].

Literatürde Fabregas ve arkadaşları, 2014 yılında mikroemülsiyon yöntemi ile stearik asit, oktadesilamin ve Poloxamer 188 bazlı yeni bir katyonik KLN geliştirmiştir [120]. Sentezlenen pozitif yüklü KLN 2 farklı konsantrasyonda

HEK293T (embriyonik böbrek hücresi hattı) hücre hattına uygulanmış ve herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır. Ardından 2017 yılında Fabregas ve arkadaşları geliştirdikleri KLN'leri HeLa hücrelerine pDNA ve RNA transferinde kullanılmak üzere kullanmış ve pDNA:KLN konjugatının da hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır [121]. 2018 yılında Karagöz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, L929 fare fibroblast hücrelerine pEGFP-C1 plazmidini aktarmak üzere mikroemülsiyon yöntemi ile Precirol ATO-5 bazlı 3 farklı KLN sentezlenmiş ve hücreler üzerindeki sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Her bir KLN için 6 farklı konsantrasyon (3, 5, 7, 10, 15, 20 µL/kuyucuk) analiz edilmiş ve sentezlenen her iki KLN'nin uygulanan hiçbir dozunda hücre canlılığı %50'nin altına düşmemiş ve transfeksiyon çalışmaları için uygun bulunmuştur [122]. Ayrıca literatürde, akciğer endotel hücrelerinin hedeflenmesi ve gen susturulması amacıyla KLN kullanılmıştır. Toksisitenin tolere edilebilir derece olduğu ve tedavi sürecinde akut toksisiteye dair herhangi bir kanıt gözlenmemiştir [123].

4.7 Nanopartikül-pDNA Konjugatının Hücrelere Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Gen aktarımı temelli immünoterapi çalışmalarında, çalışmanın temelini hedef hücreye taşınacak gen bölgesi ve vektörel sistem oluşturmaktadır. Gen aktarımını çalışmalarında viral olmayan yöntemler viral yöntemlere göre daha kolay sentez yöntemlerine sahip, daha kolay karakterize edilebilen ve daha az toksik etkiye sahip sistemlerdir. Hedef hücreye gerçekleştirilen transfeksiyonun etkinliği, aktarılan genin hücrede eksprese olması ile değerlendirilebilmektedir.

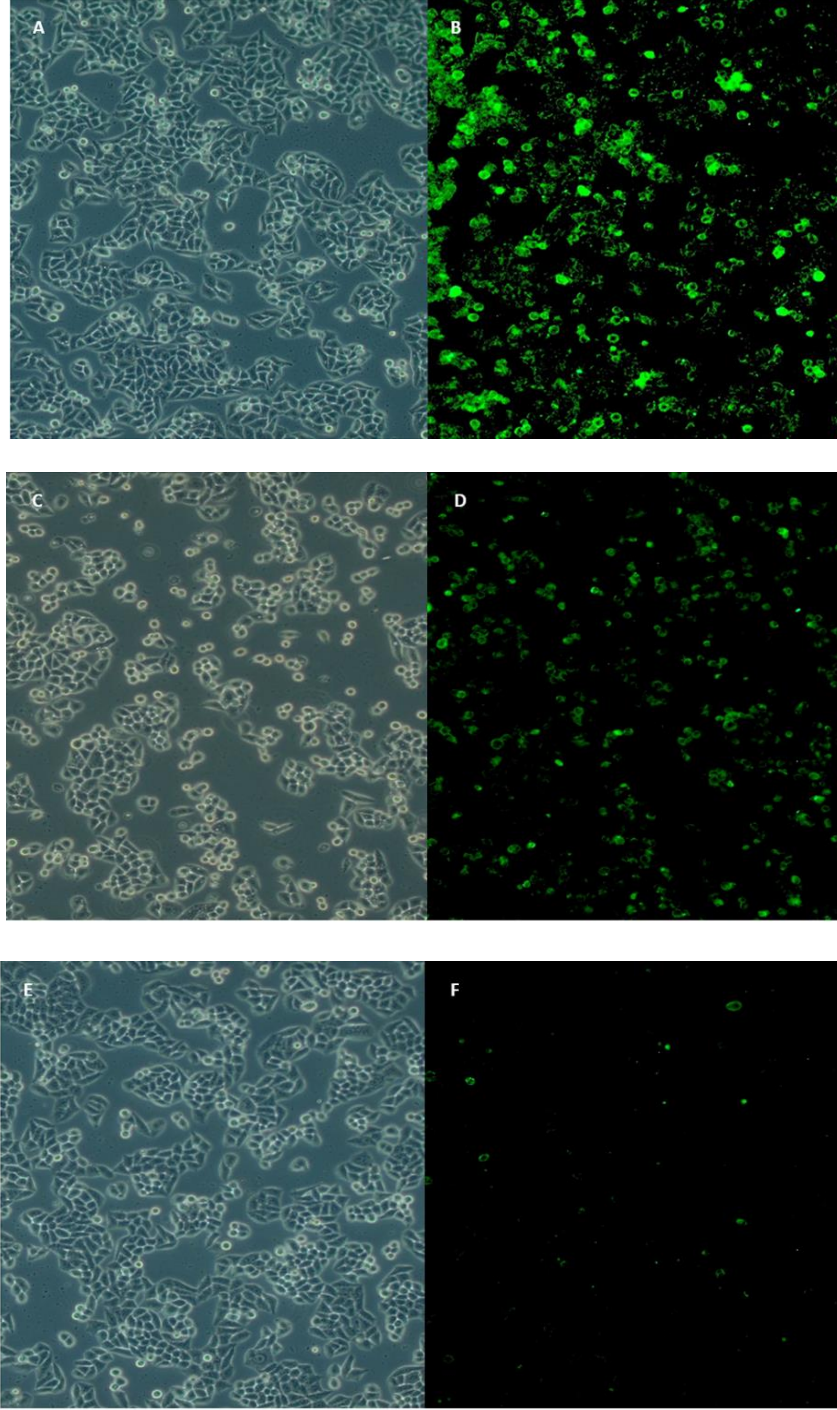
Bu çalışmada, HeLa hücrelerine ON-1 ve OFAN isimli taşıyıcı sistemler kullanılarak IL-6 ve GFP kodlayan gen bölgelerini içeren pEGFP N1-IL-6 plazmidi aktarılmıştır. Transfeksiyon 24 saat boyunca gözlenmiştir. Gen aktarımında kullanılmak üzere seçilen plazmidin IL-6 gen bölgesinin C terminal ucunda bir raportör gen olan GFP'yi eksprese eden gen bölgesi bulunmaktadır. Transfeksiyon etkinliği, hedef hücrelerde aktarılan plazmitteki GFP gen bölgesinin eksprese olması sonucu yayılan yeşil ışımının görüntülenmesi ile belirlenmiştir. Transfeksiyon işlemi için hazırlanan nanopartikül-pDNA konjugatlarının zetasizer analizi sonuçları Tablo 4.4'teki gibidir. Elde edilen verilere göre her iki partikülün de zeta potansiyel

değerlerinden DNA ile konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği söylenebilmektedir.

Tablo 4.4 Nanopartikül-pDNA Konjugatları ve pDNA'nın Parçacık Boyutu, PDI Ve Zeta Potansiyel Değerleri

Konjugat İsmi	pDNA	Boyut (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
ON-1 (35 µg)	1 µg	135 ±6,3	0,3	+21,8 ±4,1
OFAN (35 µg)	1 µg	155 ±6,8	0,3	+25 ± 7,6
pDNA	1 µg	1025 ±13,6	0,7	-11,0 ±6,7

Transfeksiyon etkinliğinin değerlendirilmesi, plazmitin hücrelere ON-1 ve OFAN isimli nanopartiküler kullanılarak ve çıplak DNA olarak transfer edilmesi ve kıyaslanması ile gerçekleştirilmiştir. Her bir transfeksiyon serisi 3 tekrar şeklinde çalışılmıştır. Transfeksiyon etkinliği, hücrelerin aynı objektifte çekilen faz kontrast ve floresan görüntülerinin sayılması ve kıyaslanması ile hesaplanmıştır. Plakanın her bir kuyucuğunun 3 farklı bölgesinden çekilen 3 farklı fotoğrafın sayılması ile transfeksiyon etkinliği belirlenmiştir. Şekil 4.10'da transfekte edilen HeLa hücrelerinin 24. saatteki 10x objektifte inverted mikroskop kullanılarak çekilen faz kontrast ve floresan görüntüleri gösterilmiştir. 24. saatte transfeksiyon etkinliği sırasıyla OFAN, ON-1 ve pDNA için %82 (±2,8), %71 (±1,5) ve %16 (±0,9) olarak belirlenmiştir. Çalışmanın amacına uygun olarak folik asit ile HeLa hücrelerinin yüzeyindeki folat reseptöre hedeflendirilmiş transfeksiyonun etkinliği en yüksektir.



Şekil 4.10 Transfeksiyon sonrası 24. saat HeLa hücrelerinin 10x objektifte görüntüleri A) OFAN aracılı transfeksiyon faz kontrast görüntüsü B) OFAN aracılı transfeksiyon florasan görüntüsü C) ON-1 aracılı transfeksiyon faz kontrast görüntüsü D) ON-1 aracılı transfeksiyon florasan görüntüsü E) pDNA ile transfeksiyon faz kontrast görüntüsü F) pDNA ile Transfeksiyon florasan görüntüsü

Hedef dokuya herhangi bir taşıyıcı araç olmadan DNA transferi işlemi en basit ve aynı zamanda en güvenilir fiziksel/mekanik yöntemdir. Çıplak DNA, nükeazlar aktivitesinden korunmak için herhangi bir protein, lipid veya başka bir moleküller ile ilişkisi olmayan DNA'yı ifade etmektedir. Ancak DNA'nın nükleazlar tarafından hızlı degradasyonu nedeni ile çıplak DNA hedef dokulara istenilen oranda iletilemez ve ifade seviyesi oldukça düşük olur. Bu nedenle, DNA'nın iyonik etkileşimler yolu ile DNA ile kompleks oluşturabilecek bir lipid, inorganik malzeme veya polimer ile aktarılması ile çözülebilmektedir. Literatürde nanopartiküler sistemler ve çıplak DNA'nın karşılaştırıldığı birçok çalışma vardır. 2017 yılında Rasoulianboroujeni ve arkadaşları gen aktarımı çalışmalarında lipofektamin ve katyonik lipozomlar ile DNA-nanopartikül kompleksleri oluşturmuş ve çıplak DNA ile HEK-293 hücrelerinde transfeksiyon etkinliğini değerlendirmiştir. Çalışmada lipofektamin ve katyonik lipozom aracılı transfeksiyonun çıplak DNA ile yapılan transfeksiyondan neredeyse 8 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Kayda değer bir artış görülen etkinliğin sebebinin partiküllerin net pozitif yükünden kaynaklandığı belirtilmiştir [124]. 2019 yılında Varlı ve arkadaşları, oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküler sistemler ile indüklenmiş pluripotent hücre elde etmek amacı ile somatik hücrelerin tekrar programlanması için Yamanaka faktörlerinin aktarılması çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışmada L929 fibroblast hücrelerine gen aktarımı yapılmış ve transfeksiyon etkinliği 72% (± 0.04) olarak hesaplanmıştır [125]. Literatürde katyonik katı lipid nanopartiküllerin gen aktarımı çalışmalarında kullanıldığı birçok çalışma vardır. Bunlardan birisi, 2010 yılında Vighi ve arkadaşlarının yaptığı Na1300 mürin nöroblastoma hücre hattına oktadesilamin bazlı 2 farklı nanopartikül ile transfeksiyon yapılmıştır. Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin gen aktarımı çalışma amacı ile *in vitro* değerlendirmesi sonucu, çıplak DNA'ya oranla KLN bazlı konjugatların etkinliği %12 olarak belirtilmiştir [117].

Nanopartiküllerin tıp alanında kullanılmasının önündeki en büyük engellerden birisi hedef dışı transferdir. Nanopartikül aracılı kanser immünoterapisinde hedef hücrenin çeşitli mol-leküller ile hedeflenmesi oldukça sık tercih edilen bir yöntemdir. Folat reseptör, tümör hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla aşırı eksprese olan bir reseptördür. Böbrek, serviks, meme ve yumurtalık kanseri

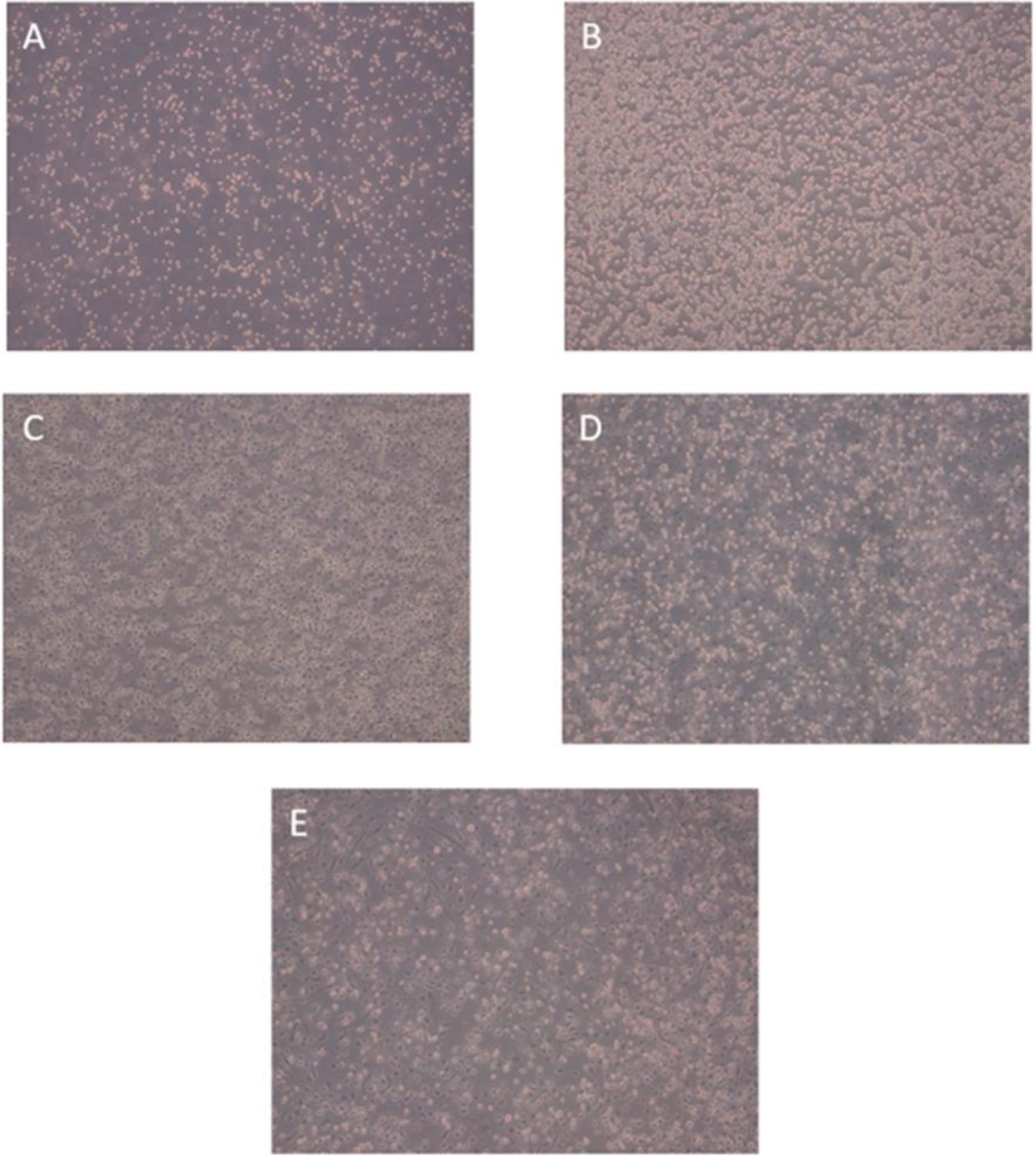
hücrelerinde sağlıklı hücelere kıyasla daha fazla eksprese olmaktadır. Serviks kanseri hücrelerini nanopartiküller ile hedeflemenin birçok yolu vardır. Bunların çoğu hücrelerin yüzeyinde aşırı eksprese olan reseptörlere, diğerleri ise kök hücrelerin kullanımına dayanan stratejilere dayanır. Literatürde katı lipid nanopartiküllerin folik asit aracılı hedeflemesine dayanan birçok çalışma vardır. 2019'da Yassemi ve arkadaşları, MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine kemoterapötik ilaç transferinde oktadesilamin bazlı KLN'lerin folik asit ile hedeflendirilmesi çalışması yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, FA konjuge KLN'lerin etkinliğinin daha yüksek olduğu ve aynı zamanda biyouyumlu ve toksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür [89]. Liu ve arkadaşları, gen aktarımı SKOV3 insan ovaryum kanseri hücre hattı (folat reseptör pozitif) ve A549 insan akciğer hücre hattı (folat reseptör negatif) olmak üzere 2 hücre hattına folat reseptörüne hedeflendirilmiş KLN'ler ile gen aktarımı yapılmıştır. GFP ışıması ile belirlenen transfeksiyon etkinliği ile SKOV3 hücre hattında kayda değer bir oranda artış görülmüştür. A549 hücre hattına yapılan gen aktarımında ise folat reseptör ekspresyonu görülmemesinden kaynaklı transfeksiyon etkinliğinde herhangi bir artış görülmemiştir [113]. Literatürde folat reseptörüne hedeflendirilmiş nanopartiküllerin kanser immünoterapisinde kullanıldığı birçok çalışma vardır [89], [126], [127]. Sunulan tez çalışmasında, transfeksiyon etkinliğini arttırmak için oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküller HeLa hücrelerinin yüzeyindeki folat reseptörlerine hedeflendirilecek şekilde tasarlanmıştır. Sonuç olarak folik asit konjuge KLN'lerin, KLN'ye ve çıplak DNA'ya göre daha etkin bir şekilde gen aktarımı yaptığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların güvenilirliği literatürdeki çalışmaları ile desteklenmiştir.

4.8 Transfekte Edilmiş HeLa Hücreleri ve Aktifleştirilmiş Makrofaj Hücrelerinin Ko-Kültür Modeli ile Sitokin Yanıtının Belirlenmesi

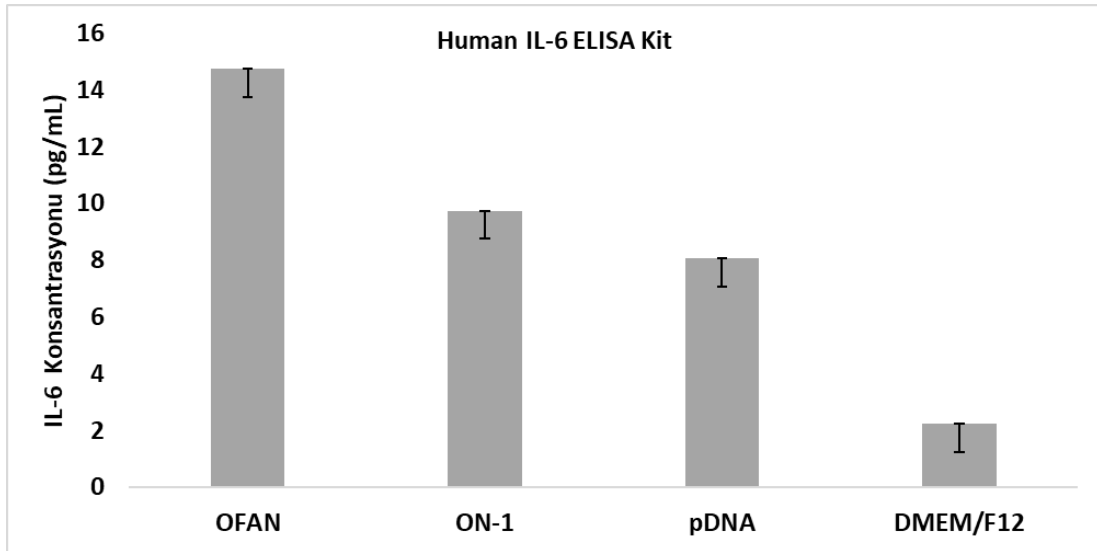
Bu çalışmada, oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit nanopartiküller ile HeLa hücrelerine IL-6 kodlayan gen aktarımı yapılmıştır. Transfeksiyon işleminden 96 saat önce, THP-1 hücreleri 6 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Her bir kuyucuğa 1 mL %10 FBS içeren

RPMI besiyeri ve 1 mL 200 mM PMA-RPMI çözeltisi damla damla eklenmiştir. THP-1 monosit hücrelerinin makrofajlara dönüşümü 96 saat boyunca gözlenmiş ve görüntülenmiştir. 96 saatin ardından THP-1 hücrelerinin PMA ile etkileşiminin ardından hücreler kültür plakalarının yüzeyine yapışmıştır. Hücresel farklılaşma ve fenotipik değişimlere ait görüntüler Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Hücre farklılaşması süreci sona erdiğinde, THP-1 hücrelerinin bulunduğu 6 kuyucuklu plakalara Transwell insert aparatı yerleştirilmiştir. Aparatın üst kısmına Şekil 3.4'te belirtilen plaka düzeninde HeLa hücreleri 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 72 saatlik inkübasyonun ardından HeLa serviks kanseri hücresi/THP-1 monosit hücresinden farklılaştırılan makrofajlardan oluşan ko-kültür modelinden süpernatantlar toplanarak ticari kit aracılığı ile sitokin yanıtı tayini yapılmıştır. 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak protein değerleri ölçülmüştür. Elde edilen preotin değerleri Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

1980 yılından beri, THP-1 hücreleri direkt primer hücrelerin kullanılmasının mümkün olmadığı biyolojik sistemlerde en sık tercih edilen hücre hattıdır. Uygun çalışma koşullarında THP-1 hücre hattı *in vitro* ortamda makrofajlar için en sık tercih edilen hücre hattıdır [128], [129]. 2020 yılında Yalman ve arkadaşları, kitosan katkılı stearik asit polimeri sentezlenmiş ve biyomalzeme olarak kullanımı değerlendirilmiştir. Çalışmada immünotoksisite deneyleri için 200 mM PMA ile farklılaştırılan THP-1 hücreleri kullanılmıştır [130]. 2019 yılında Biriken, *in vitro* araştırma sistemleri geliştirmek amacı ile THP-1 hücrelerinin PMA'ya farklı konsantrasyonlarda ve maruz kalma sürelerindeki farklılaşması değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmaların ardından 20 ng/mL konsantrasyonunda PMA ile 48 saat boyunca farklılaştırılan THP-1 hücrelerinde en yüksek hücre canlılığı ve en belirgin fenotipik hücresel değişim gözlemlendiği belirtilmiştir [131].



Şekil 4.11 THP-1 monosit hücrelerinin 200 mM PMA ile etkileşimi sonrası saat bazında fenotipik değişimi A: 0. saat, B: 24. saat, C: 48.saat, D: 72. Saat, E: 96. saat



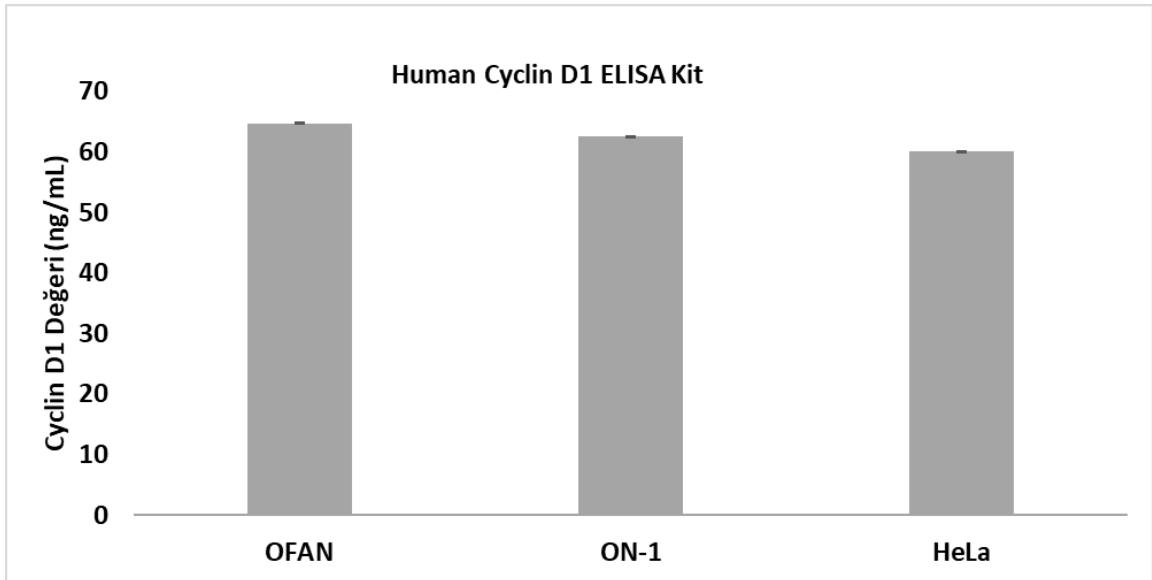
Şekil 4.12 Ko-kültür çalışmasının ardından hücrelerin IL-6 sitokin salınımı

Şekil 4.12’de verilen sonuçlara göre, OFAN ve ON-1 kullanılarak ve herhangi bir taşıyıcı sistem kullanılmadan çıplak DNA ile transfekte edilen hücrelerdeki IL-6 protein konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak transfekte edilmemiş, DMEM-F12 besiyerinde çoğaltılmış HeLa hücreleri kullanılmıştır. En yüksek IL-6 protein konsantrasyonu OFAN ile kullanılan ko-kültür modelinde gözlenmiştir. Aktifleşmiş makrofajlar, immün yanıtı düzenlemek ve sürdürmekle görevlidirler. Devamlı bir immün yanıt için makrofajlar, molekül ağırlığı düşük olan metabolitler (reaktif oksijen radikalleri, eikosanoidler), sitokinler (IL-6, IL-10, TNF- α), adezyon molekülleri (fibronektin, trombospondin), enzimler (lizozim, kollajenaz ve elastaz) gibi ürünlerin salınmasına başlarlar. IL-6, akut faz yanıtları ve inflamasyon gibi çeşitli hücre fonksiyonlarından sorumlu olan doğal immünitede görev alan pleiotropik bir sitokindir. Travma, enfeksiyon ve diğer stresler esnasında IL-6 lokal doku bölgelerinde sentezlenir, sistemik dolaşıma girer ve karaciğeri C-Reaktif Protein (CRP) gibi akut faz proteinleri üretmesi için uyarır. Literatürde yer alan çalışmalarda gen aktarımına dayalı ko-kültür modellerinde sitokin yanıtın değerlendirilmesine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yamagata ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada, 2 farklı gen aktarım aracı ile hücrelere gen aktarımı yapılmış ve molekül yapıları, aktiviteleri ve sitokin yanıtları değerlendirilmiştir. 2 tip poli(l-lizin) sentezlenmiş ve CHO hücrelerine lusiferaz eksprese eden plazmid DNA aktarımı yapmıştır. Gen

aktarımı işleminin ardından hücrelerdeki sitokin seviyeleri ölçülmüştür. Katyonik özellikte olan her iki taşıyıcı sistem için de pDNA transferinin ardından sitokin seviyelerinde kayda değer bir fark görülmemiştir [132]. Literatürde ayrıca 2017 yılında Akarsu ve arkadaşları, *Toxoplasma gondii* ile muamele edilen Caco-2 insan kolon kanseri hücreleri ile THP-1 hücre hatlarının ayrı ayrı ve beraber kültüre edilmelerinden sonra sitokin salınımında meydana gelen değişimleri gözlemlemişlerdir. *Toxoplasma gondii* inflamatuvar sitokinlerin uyarılmasını stimüle eden bir protozoon olarak güçlü hücresel yanıtı neden olmaktadır. Bunun çalışmanın sonucunda, beraber kültüre edilen hücrelerin ayrı ayrı kültüre edilmelerinden daha etkili sitokin yanıt oluşturduğu ve 24. Saatte sitokin üretiminin arttığı gösterilmiştir [133]. 2011 yılında Suchi ve arkadaşları, IL-6'nın özafagus kanserinin biyolojik aktiviteleri üzerindeki etkilerini kemosenesitivite açısından değerlendirmiştir. Bu çalışmada KYSE170 ve TE13 isimli iki özafagus karsinom hücre hattına ticari olarak temin edilen lipofektamin ile IL-6 gen bölgesi aktarılmış ve cisplatine karşı biyolojik aktivitesi kemosenesitivite açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda özafagus karsinom hücrelerinde üretilen IL-6 proteinlerinin cisplatine karşı direnç sağladığı ve gelecek çalışmalarda moleküler mekanizmasının değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir [134]. Literatürde ayrıca 2018 yılında Biriken ve arkadaşları, THP-1 hücrelerinin PMA ile uyarıldıktan sonra makrofajlara farklılaşmasının ardından sitokin yanıtlarında meydana gelen değişimleri incelemiştir ve THP-1 hücrelerinin makrofajlara farklılaştıktan sonra. Yapılan literatür taraması ile sunulan tez çalışması ile aynı perspektife sahip bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden birisi olan immün sistemden kaçışın engellemesini hedefleyen gen aktarımına dayalı bu tez çalışmasında, ko-kültür modeli oluşturularak sitokin yanıt değerlendirilmiştir. OFAN ile serviks kanseri hücre hattına hedeflendirilmiş nanopartiküller ile transfeksiyon işleminin ardından farklılaştırılmış makrofaj hücrelerindeki sitokin yanıtının diğer 3 ko-kültür modeline göre daha yüksek olduğu görülmüştür. OFAN ve diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bir farktır ($p<0.05$). Bu sonuç, katı lipid nanopartikül temelli hedeflendirmenin başarılı olduğunu ve farklılaştırılmış makrofaj hücrelerinin uyarıldığı ve sitokin salınımının başladığı şeklinde yorumlanabilmektedir.

4.9 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Hücre Siklusuna Etkisinin İncelenmesi

Sunulan tez çalışmasında, HeLa serviks kanseri hücre hattı kullanılarak nanopartiküllerin hücre siklusuna etkisi değerlendirilmiştir. CD1 ve p53/TP53 kantitatif değerlerinin tayini için HeLa hücreleri 24 kuyucuklu hücre plakaya ekilmiş ve 24 saat uygun kültür koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolunca, kuyucuklara 35 µg/µL oktadesilamin nanopartikül ve oktadesilamin-folik asit konjugatı eklenerek 72 saat aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Ardından hücre vasatı toplanarak 1 saat 80 °C'de muhafaza edilmiştir. 1 saatlik inkübasyonun ardından hücreler santirfüj edilerek süpernatantlar toplanmıştır. Kontrol grubu olarak herhangi bir nanopartikül ile işlem görmemiş HeLa hücreleri kullanılmıştır. Human Cyclin D1 ELISA Kit ve Human p53/Tumor Protein ELISA Kit prosedürlerine uygun olarak strese maruz kalan HeLa hücre hattının analizi yapılmıştır. Analiz, her bir nanopartikül için 3 tekrar şeklinde yapılmıştır ve analiz sonuçları firmanın önerdiği metot ile hesaplanmıştır. ON-1 ve OFAN isimli nanopartiküllerin HeLa hücrelerinde hücre siklusuna etkileri Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



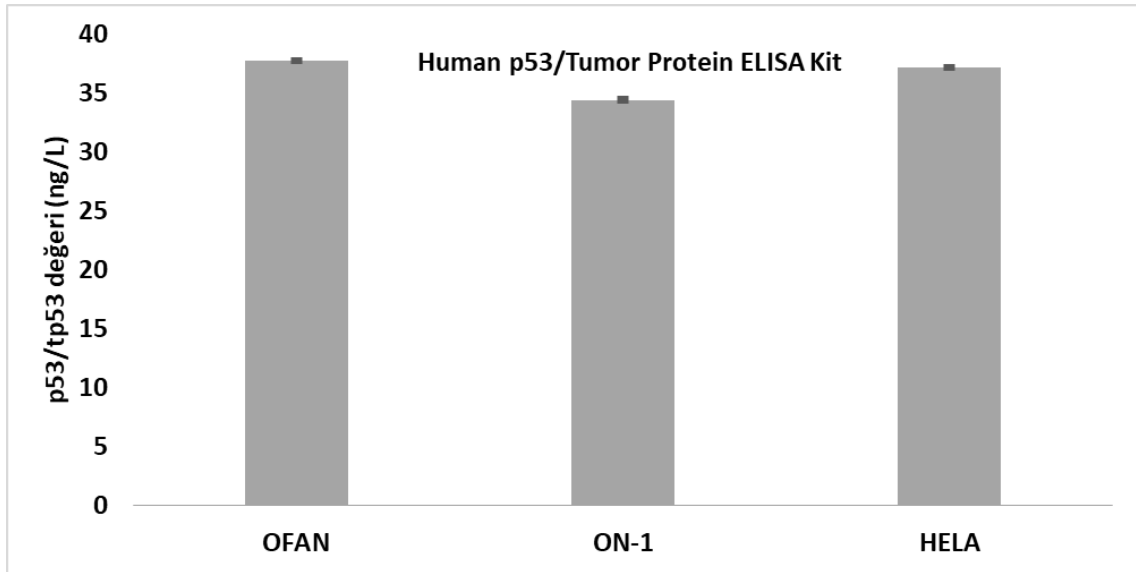
Şekil 4.13 OFAN ve ON-1 isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki Cyclin D1 aktivitesine etkisi

İnsanlarda bulunan dört tip siklinden biri olan D tipi siklin aynı zamanda G1 siklinleri olarak da bilinmektedir. Ökaryotik hücrelerde siklus, mitozdan sonra G1, S VE G2 fazlarından oluşan interfaz ve mitoz aşamalarından oluşmaktadır. G1 fazında, hücre çevresini kontrol ederek sinyal alır, hücre büyümesini indüklenir ve DNA replikasyonu hazırlığı yapılır, RNA sentezi başlatılır. Hücre siklusunda çeşitli kontrol noktaları vardır, bunlardan birisi ise siklin D1'in görev aldığı G1-S fazındadır. Biyomalzemelerin hedef hücrede meydana getirdiği mutasyonlardan dolayı hücre siklusunda hatalar meydana gelir. Siklusta fazlar arası geçiş ilgili hazırlık yapılmadan olursa genetik materyal doğru bir şekilde kopyalanamaz ve hücrede hasar meydana gelir [135]. p53 geni (tümör protein 53), anlatımı sonucunda p53 proteini üretilen, hücre siklusunda önemli bir düzenleyici olarak görev yapan bir tümör süpresör gendir. Eğer bir hücre hasara maruz kalmışsa veya DNA'sı hasar görmüş ise p53 proteini o hücrenin hücre siklusunu tamamlamasını engeller. Ökaryotik hücrelerde meydana gelen kanserlerin büyük çoğunluğunun nedeni p53 genindeki mutasyonlar sonucu işlevini kaybetmesidir [136]. Kanser immünoterapisinde kullanılmak üzere tasarlanan nanopartiküllerin hücre siklusuna etkisinin *in vitro* değerlendirilmesi çalışmanın bir sonraki adımları için oldukça önemlidir. Ancak literatürdeki çalışmalar hücrelere p53 geninin KLN aracılı transferi [137], [138] ve p53'ün çalışma mekanizmasına etki eden moleküllerin aktarılması [139], [140] üzerinedir. Direkt olarak sentezlenen nanopartikülün hücre siklusunda p53'e olan etkisi değerlendirilmemiştir. Bu bağlamda sunulan tez çalışması ile literatüre yeni bir perspektif kazandırılmak istenmiştir.

OFAN ve ON-1 nanopartikülleri ile kültüre edilen HeLa hücrelerinin siklin D1 değerinde kontrol grubuna göre artış görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir artış değildir ($p>0.05$). Yapılan analiz ile sentezlenen oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin HeLa hücrelerinde siklin D1 değerini arttırdığı tayin edilmiştir. 2018 yılında Wang ve arkadaşları, meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere kurkumin yüklü katı lipid bazlı nanopartiküller sentezlemiş ve antikanser etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, sentezlenen KLN'lerin kontrol grubuna göre siklin D1 değerini azaltarak hücre siklusunda inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemler de

kullanılan nanotaşıyıcı sistemlerin hücre siklusuna etkisi, ilacın taşınması ve hücre siklusunun yavaşlatılarak kanser hücrelerin yok edilmesi açısından önem arz etmektedir [141]. 2020 yılında Kumar ve arkadaşlarının çalışmasında, kitosan kaplı ferulik asit yüklü katı lipid nanopartikülleri ile kolon kanseri hücrelerine hedefleme yapmak için folik asit ile konjugatı oluşturmuştur. Oluşturulan konjugatın fizikokimyasal analizlerinin ardından HT-29 insan kolon kanseri hücre hattında antikanser etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, nanopartiküllerin HT-29 hücre hattı üstünde siklin D1 değerlerini istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde düşürdüğü bulunmuştur ($p>0.05$) [110].

Kemoterapi ve radyoterapi sonrası kanser hücrelerinin yaşaması onarım yollarındaki hasarlara bağlı olabilir. Hücre siklus kontrol noktalarında ve DNA onarım yollarındaki moleküler bileşenlerin daha iyi anlaşılması için ve çalışmalar klinik çalışmalarla da desteklenmelidir.



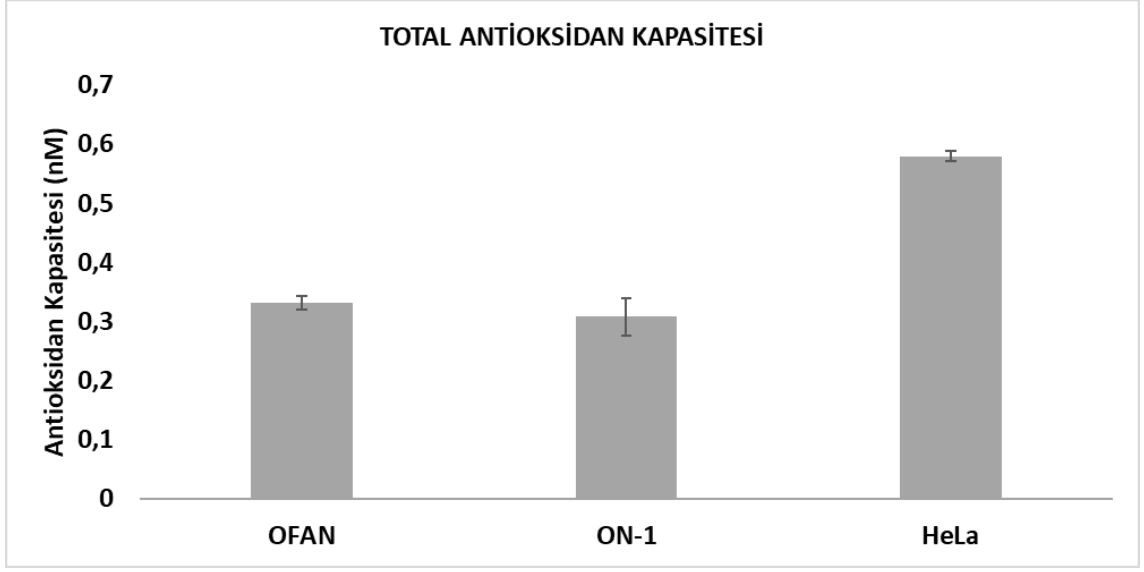
Şekil 4.14 OFAN ve ON-1 isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki p53/TP53 aktivitesine etkisi

Yapılan analiz sonucunda, OFAN nanopartikülü ile kültüre edilen HeLa hücrelerinin p53/TP53 değerinde kontrol grubuna göre artış görülmesine karşılık ON-1 nanopartikülü ile kültüre edilen HeLa hücrelerinde kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. Ancak bu azalma ve artma değerleri istatistiksel açıdan

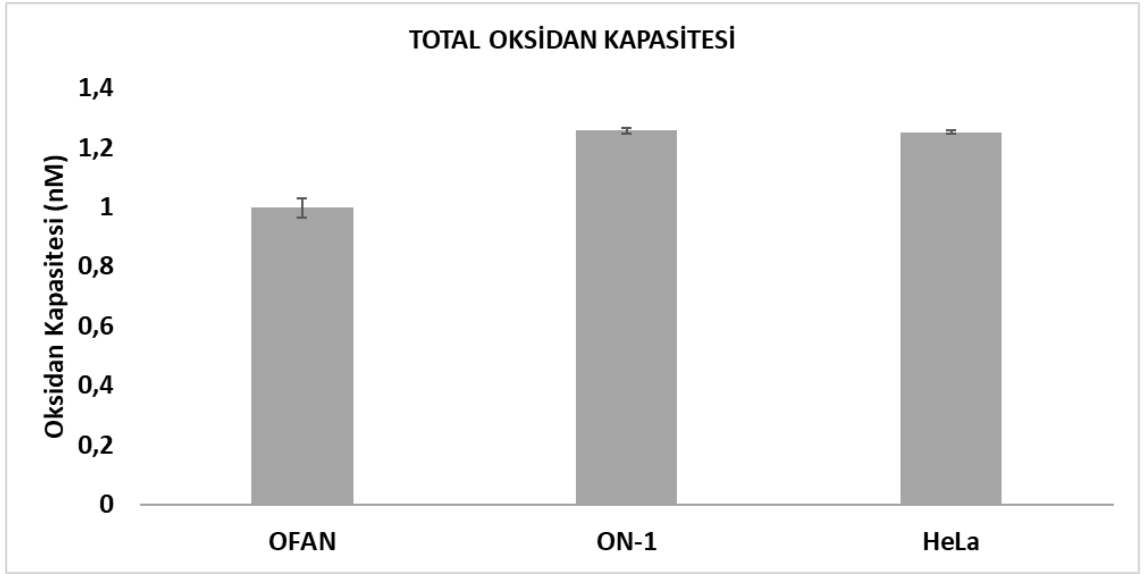
anlamli değildir ($p>0.05$). Literatürde, 2015 yılında Cunha tarafından yapılan tez çalışmasında, glioblastoma hücre hattına kemoterapi ile birlikte uygulanabilecek gen terapisi lipid bazlı taşıyıcı sistemler ile miRNA modülasyonuna dayanan bir tedavi yöntemi tasarlanmıştır. Bu yöntemde sentezlenen nanopartiküllerin p53 değerlerine bakılarak hedeflenmiş, nanopartiküllerin herhangi antikanser etkiye sahip olmadığını göstermiştir [142].

4.10 Sentezlenen Oktadesilamin ve Oktadesilamin-Folik Asit Nanopartiküllerin Antioksidan Kapasite Çalışması

Sunulan tez çalışmasında, HeLa serviks kanseri hücre hattı kullanılarak oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit nanopartiküllerin antioksidan- oksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Antioksidan- oksidan kapasitesinin kantitatif tayini için HeLa hücreleri 24 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucuğa 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyone edilmiştir. Transfeksiyon işlemi esnasında kullanılan nanopartikül miktarı, HeLa hücrelerinin üzerine eklenerek 24 saat boyunca uygun kültür koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Oktadesilamin ve oktadesilamin-folik asit konjugatı ile inkübe edilen hücreler santrifüjlendikten $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saatin ardından 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve süpernatant ile analiz yapılmıştır. Kontrol grubu olarak herhangi bir nanopartikül ile işlem görmemiş HeLa hücreleri kullanılmıştır. Analiz TAS (Rel assay, Total Antioxidant Status Kit) kiti ve TOS (Relassay Total Oksidant Status Kit) kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır ve sonuçlar firmanın önerdiği metot ile hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucundaki değerler ile sentezlenen oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin antioksidan- oksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir. ON-1 ve OFAN isimli nanopartiküllerin HeLa hücrelerinde antioksidan- oksidan kapasitesi Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15 ON-1 VE OFAN isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki total antioksidan kapasitesi



Şekil 4.16 ON-1 VE OFAN isimli nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerindeki total oksidan kapasitesi

Şekil 4.15'te sentezlenen OFAN ve ON-1 isimli nanopartiküllerin kontrol hücrelerine göre total antioksidan kapasiteleri gösterilmiştir. Bu veriye göre, her iki partikül de kontrol hücrelerine göre antioksidan kapasiteyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür ($p < 0.05$). Biyomalzemelerin hücre çalışmalarında

kullanılması planlanırken, hücrede meydana gelebilecek oksidan-anitoksidan dengesizliği de hesaba katılmalıdır. Bu dengesizlik ile beraber oksidatif stres kaynaklı hastalıklar görülebilmektedir. Folik asit konjuge OFAN, ON-1'den daha yüksek oranda antioksidan kapasiteye sahiptir. Biyolojik aktivitelerinin yanısıra folik asit aynı zamanda anioksidan özelliğe sahip bir moleküldür ve reaktifleri inhibe etmektedir. Literatürde, folik asitin anitoksidan aktivitesinin belirlenmesi ve folik asit-nanopartikül konjugasyonuna dayalı çalışmalar yer almaktadır. Josji ve arkadaşları, folik asitin serbest radikalleri inhibe ederek potansiyel bir anitoksidan olarak kullanılabileceğini kanıtlamışlardır [143]. AbouAitah ve arkadaşları silika nanopartikülleri folik asit ile konjugat oluşturarak sentezlemiş ve kanser hücrelerine HeLa serviks kanser hücre hattına ve HepG2 hepatosellüler karsinom hücre hattında ilaç taşınımını ve nanopartiküllerin antioksidan-oksidan kapasitelerini değerlendirmiştir. Sonuçlara göre, folik asit konjuge nanopartiküllerin antioksidan özelliğinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği kaydedilmiştir ($p<0.05$) [144]. Şekil 4.16'da OFAN ve ON-1'in total oksidan kapasitesi görülmektedir. OFAN, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir ($p<0.05$). ON-1 ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde artma göstermiştir ($p>0.05$).

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 kıyaslandığında sentezlenen nanopartiküllerin kontrol grubuna göre artış azalışların birbirini doğrular nitelikte olduğu görülebilmektedir. OFAN, ON-1 isimli nanopartiküle göre daha yüksek antioksidan özelliğine ancak daha düşük oksidan kapasitesine sahiptir. İlgili çalışmalar göz önüne alındığında sunulan tez çalışmasında OFAN isimli nanopartikülün antioksidan özelliğe sahip olduğu ve literatürdeki ilgili çalışmalar ile desteklendiği söylenebilmektedir. Literatürde oktadesilamin bazlı nanopartiküllerin hücreler üzerindeki antioksidan- oksidan kapasitesinin değerlendirilmesine dayalı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Elde edilen verilen, sonraki çalışmalar için öncü nitelikte olduğu ve bu sonuçlar ile sunulan tez çalışmasının literatüre katkıda bulunduğu söylenebilmektedir.

- [1] K. Szymańska, "Uterine cervix cancer: Diagnosis and treatment," in *Encyclopedia of Cancer*, 2018.
- [2] S. Tan, D. Li, and X. Zhu, "Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond," *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.109821.
- [3] B. D. Liebelt, G. Finocchiaro, and A. B. Heimberger, "Principles of immunotherapy," in *Handbook of clinical neurology*, vol. 134, Elsevier, 2016, pp. 163–181.
- [4] M. M. Escribese and D. Barber, "New insight into cancer immunotherapy," *Allergologia et Immunopathologia*. 2017, doi: 10.1016/j.aller.2017.09.013.
- [5] H. M. Abdelaziz, M. S. Freag, and A. O. Elzoghby, "Solid lipid nanoparticle-based drug delivery for lung cancer," in *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*, 2019.
- [6] J. Ezzati Nazhad Dolatabadi and Y. Omid, "Solid lipid-based nanocarriers as efficient targeted drug and gene delivery systems," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2016, doi: 10.1016/j.trac.2015.12.016.
- [7] Y. Lu, E. Segal, C. P. Leamon, and P. S. Low, "Folate receptor-targeted immunotherapy of cancer: Mechanism and therapeutic potential," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, doi: 10.1016/j.addr.2004.01.009.
- [8] X. Ren, L. He, X. Tian, P. Zhang, Z. Chen, and X. Mei, "pH and folic acid dual responsive polysaccharide nanospheres used for nuclear targeted cancer chemotherapy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.028.
- [9] O. Baykara, "Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar," *Balıkesir Sağlık Bilim. Derg.*, 2017, doi: 10.5505/bsbd.2016.93823.
- [10] A. C. Society, "No Title." [Online]. Available: www.cancer.org. [Accessed: 06-Mar-2020].
- [11] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [12] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [13] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [14] V. K. Chaturvedi, A. Singh, V. K. Singh, and M. P. Singh, "Cancer

- nanotechnology: A new revolution for cancer diagnosis and therapy," *Curr. Drug Metab.*, 2018, doi: 10.2174/1389200219666180918111528.
- [15] W. H. Organisation, "No Title." [Online]. Available: <https://www.who.int/cancer/en/>. [Accessed: 06-Mar-2020].
- [16] S. G. Mavi Aydoğdu and Ü. Özsoy, "Serviks kanseri ve HPV," *Androloji Bülteni*, 2018, doi: 10.24898/tandro.2018.62533.
- [17] P. A. Cohen, A. Jhingran, A. Oaknin, and L. Denny, "Cervical cancer," *The Lancet*. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32470-X.
- [18] T. Šarenac and M. Mikov, "Cervical cancer, different treatments and importance of bile acids as therapeutic agents in this disease," *Frontiers in Pharmacology*. 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00484.
- [19] C. Marth, F. Landoni, S. Mahner, M. McCormack, A. Gonzalez-Martin, and N. Colombo, "Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up," *Ann. Oncol.*, 2017, doi: 10.1093/annonc/mdx220.
- [20] S. D. Balasubramaniam, V. Balakrishnan, C. E. Oon, and G. Kaur, "Key molecular events in cervical cancer development," *Medicina (Lithuania)*. 2019, doi: 10.3390/medicina55070384.
- [21] O. Baykara, "Current therapies and latest developments in cancer treatment," in *Horizons in Cancer Research*, 2015.
- [22] M. Mian *et al.*, "Bortezomib, thalidomide and lenalidomide: Have they really changed the outcome of multiple myeloma?," *Anticancer Res.*, 2016.
- [23] S. J. Oiseth and M. S. Aziz, "Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead," *J. Cancer Metastasis Treat.*, 2017, doi: 10.20517/2394-4722.2017.41.
- [24] J. Nam, S. Son, K. S. Park, W. Zou, L. D. Shea, and J. J. Moon, "Cancer nanomedicine for combination cancer immunotherapy," *Nature Reviews Materials*. 2019, doi: 10.1038/s41578-019-0108-1.
- [25] P. Huang *et al.*, "Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy," *Acta Biomaterialia*. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.028.
- [26] M. Sambi, L. Bagheri, and M. R. Szewczuk, "Current challenges in cancer immunotherapy: Multimodal approaches to improve efficacy and patient response rates," *Journal of Oncology*. 2019, doi: 10.1155/2019/4508794.
- [27] M. J. Smyth and M. W. L. Teng, "2018 Nobel Prize in physiology or medicine," *Clinical and Translational Immunology*. 2018, doi: 10.1002/cti2.1041.
- [28] E. F. McCarthy, "The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas," *Iowa Orthop. J.*, 2006.
- [29] N. E. Papaioannou, O. V. Beniata, P. Vitsos, O. Tsitsilonis, and P. Samara, "Harnessing the immune system to improve cancer therapy," *Annals of Translational Medicine*. 2016, doi: 10.21037/atm.2016.04.01.
- [30] D. V. Yuzhakova, M. V. Shirmanova, T. F. Sergeeva, E. V. Zagaynova, and K. A.

- Lukyanov, "Immunotherapy of cancer (Review)," *Sovremennye Tehnologii v Medicine*. 2016, doi: 10.17691/stm2016.8.1.23.
- [31] R. Kokate, "A systematic overview of cancer immunotherapy: An Emerging Therapy," *Pharm. Pharmacol. Int. J.*, 2017, doi: 10.15406/ppij.2017.05.00112.
- [32] C. Lee Ventola, "Cancer immunotherapy, part 1: Current strategies and agents," *P T*, 2017.
- [33] A. A. Özlük, M. G. Oytun, and D. Günenç, "Kanser immünoterapisi," *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplant. Derg.*, 2017, doi: 10.5606/FNG.TRANSPLANTASYON.2017.004.
- [34] M. Barbaros, Burak; Dikmen, "Kanser İmmünoterapisi," *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enst. Derg.*, 2015.
- [35] I. Kimiz-Gebologlu, S. Gulce-Iz, and C. Biray-Avci, "Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy," *Molecular Biology Reports*. 2018, doi: 10.1007/s11033-018-4427-x.
- [36] Ö. Met, K. M. Jensen, C. A. Chamberlain, M. Donia, and I. M. Svane, "Principles of adoptive T cell therapy in cancer," *Seminars in Immunopathology*. 2019, doi: 10.1007/s00281-018-0703-z.
- [37] P. Ataca and O. Arslan, "Chimeric antigen receptor T Cell (Car T Cell) therapy in hematology," *Turkish J. Hematol.*, 2015, doi: 10.4274/tjh.2015.0049.
- [38] E. Wrona and P. Potemski, "A novel immunotherapy — The history of CAR T-cell therapy," *Oncology in Clinical Practice*. 2019, doi: 10.5603/OCP.2019.0016.
- [39] K. Kaur and G. L. Khatik, "Cancer immunotherapy: An effective tool in cancer control and treatment," *Curr. Cancer Ther. Rev.*, vol. 16, no. 1, pp. 62–69, 2020.
- [40] G. Marelli, A. Howells, N. R. Lemoine, and Y. Wang, "Oncolytic viral therapy and the immune system: A double-edged sword against cancer," *Frontiers in Immunology*. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00866.
- [41] S. Khan and D. E. Gerber, "Autoimmunity, checkpoint inhibitor therapy and immune-related adverse events: A review," *Seminars in Cancer Biology*. 2019, doi: 10.1016/j.semcan.2019.06.012.
- [42] K. KAHVECİ and M. Türkoğlu, "İmmün kontrol noktası inhibitörleri Ctla-4 ve Pd-1/Pd-l1'in immünoterapideki Yeri," *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, vol. 10, no. 2, pp. 210–218.
- [43] J. A. Seidel, A. Otsuka, and K. Kabashima, "Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations," *Frontiers in Oncology*. 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00086.
- [44] S. Lee and K. Margolin, "Cytokines in cancer immunotherapy," *Cancers*. 2011, doi: 10.3390/cancers3043856.
- [45] T. A. Waldmann, "Cytokines in cancer immunotherapy," *Cold Spring Harb.*

- Perspect. Biol.*, 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a028472.
- [46] X. M. Anguela and K. A. High, "Entering the modern era of gene therapy," *Annu. Rev. Med.*, 2019, doi: 10.1146/annurev-med-012017-043332.
 - [47] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, and M. R. Abedi, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update," *Journal of Gene Medicine*. 2018, doi: 10.1002/jgm.3015.
 - [48] E. Keles, Y. Song, D. Du, W. J. Dong, and Y. Lin, "Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications," *Biomaterials Science*. 2016, doi: 10.1039/c6bm00441e.
 - [49] C. S. Katragadda, P. K. Choudhury, and P. N. Murthy, "Nanoparticles as non-viral gene delivery vectors," *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, 2010.
 - [50] A. Günel Özcan, "Gen tedavisi ve biyogüvenlik," *Türk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, 2007.
 - [51] E. Cevher, A. Demir, and E. Sefik, "Gene delivery systems: Recent progress in viral and non-viral therapy," in *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 2012.
 - [52] M. Alsaggar, D. Liu, L. Huang, D. Liu, and E. Wagner, "Chapter One–Physical methods for gene transfer," *Advances in Genetics*. Academic Press Cambridge, p. 1, 2015.
 - [53] M. Carter and J. Shieh, "Gene delivery strategies," in *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 2015.
 - [54] M. Raska and J. Turanek, "DNA vaccines for the induction of immune responses in mucosal tissues," in *Mucosal Immunology: Fourth Edition*, 2015.
 - [55] P. T. Pratheesh and M. Vineetha, "Genetic engineering of microalgae for production of therapeutic proteins," in *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, 2015.
 - [56] D. M. Tran *et al.*, "Transcutaneous ultrasound-mediated nonviral gene delivery to the liver in a porcine model," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, 2019, doi: 10.1016/j.omtm.2019.07.005.
 - [57] R. Feynman, "There's plenty of room at the bottom," in *Feynman and Computation*, 2018.
 - [58] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
 - [59] H. Shen *et al.*, "Nanoparticle delivery systems for DNA/RNA and their potential applications in nanomedicine," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 19, no. 27, pp. 2507–2523, 2019.
 - [60] R. Awang Saman and M. Iqbal, "Nanotechnology-Based drug delivery Systems: Past, Present and Future," in *Nanotechnology: Applications in Energy, Drug and Food*, 2019.
 - [61] A. M. Grimaldi, M. Incoronato, M. Salvatore, and A. Soricelli, "Nanoparticle-

- based strategies for cancer immunotherapy and immunodiagnostics,” *Nanomedicine*. 2017, doi: 10.2217/nnm-2017-0208.
- [62] S. Sarkar *et al.*, “Advances and implications in nanotechnology for lung cancer management,” *Curr. Drug Metab.*, 2016, doi: 10.2174/1389200218666161114142646.
- [63] A. R. Giriya, “Medical applications of polymer/functionalized nanoparticle systems,” in *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles*, Elsevier, 2019, pp. 381–404.
- [64] H. K. S. Yadav, A. A. Almokdad, S. I. M. shaluf, and M. S. Debe, “Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers,” in *Nanocarriers for Drug Delivery*, 2019.
- [65] R. H. Müller, K. Mäder, and S. Gohla, “Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000, doi: 10.1016/S0939-6411(00)00087-4.
- [66] V. Mishra *et al.*, “Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems,” *Pharmaceutics*. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040191.
- [67] M. B. De Jesus and I. S. Zuhorn, “Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms,” *Journal of Controlled Release*. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.01.010.
- [68] U. S. Bagul, V. V. Pisal, N. V. Solanki, and A. Karnavat, “Current status of solid lipid nanoparticles: a review,” *Mod. Appl. bioequivalence Bioavailab.*, vol. 3, no. 4, pp. 1–2, 2018.
- [69] W. Mehnert and K. Mäder, “Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.021.
- [70] P. Ekambaram, A. H. Sathali, and K. Priyanka, “Solid lipid nanoparticles- A review,” *Int. J. Appl. Pharm.*, 2012.
- [71] M. K. SARANGI and S. Padhi, “Solid lipid nanoparticles—a review,” *Drugs*, vol. 5, p. 7, 2016.
- [72] S. Bhatia and S. Bhatia, “Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications,” in *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, 2016.
- [73] T. Büyüksırit and H. Kuleaşan, “Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı,” *GIDA*, vol. 39, no. 4, pp. 235–241, 2014.
- [74] R. van der Meel, “Targeted inhibition of tumor growth and angiogenesis.” University Utrecht, 2013.
- [75] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, and D. M. Shin, “Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer,” *Clinical Cancer Research*. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.

- [76] I. A. Khalil, Y. Sato, and H. Harashima, "Recent advances in the targeting of systemically administered non-viral gene delivery systems," *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019, doi: 10.1080/17425247.2019.1656196.
- [77] L. E. Van Vlerken, Z. Duan, M. V. Seiden, and M. M. Amiji, "Modulation of intracellular ceramide using polymeric nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer," *Cancer Res.*, 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1648.
- [78] N. Karra and S. Benita, "The ligand nanoparticle conjugation approach for targeted cancer therapy," *Curr. Drug Metab.*, 2011, doi: 10.2174/138920012798356899.
- [79] A. Friedman, S. Claypool, and R. Liu, "The smart targeting of nanoparticles," *Curr. Pharm. Des.*, 2013, doi: 10.2174/13816128113199990375.
- [80] D. S. Wilson and J. W. Szostak, "In vitro selection of functional nucleic acids," *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.611.
- [81] P. V Pawar, A. J. Domb, and N. Kumar, "Systemic targeting systems-EPR effect, ligand targeting systems," in *Focal Controlled Drug Delivery*, Springer, 2014, pp. 61–91.
- [82] X. He *et al.*, "Sequentially triggered nanoparticles with tumor penetration and intelligent drug release for pancreatic cancer therapy," *Adv. Sci.*, 2018, doi: 10.1002/advs.201701070.
- [83] Y. Duo *et al.*, "CX-5461-loaded nucleolus-targeting nanoplatform for cancer therapy through induction of pro-death autophagy," *Acta Biomater.*, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.035.
- [84] J. Yoo, C. Park, G. Yi, D. Lee, and H. Koo, "Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems," *Cancers (Basel)*, 2019, doi: 10.3390/cancers11050640.
- [85] Y. Hattori, M. Sakaguchi, and Y. Maitani, "Folate-linked lipid-based nanoparticles deliver a NF κ B decoy into activated murine macrophage-like RAW264.7 cells," *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, doi: 10.1248/bpb.29.1516.
- [86] J. Sudimack and R. J. Lee, "Targeted drug delivery via the folate receptor," *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2000, doi: 10.1016/S0169-409X(99)00062-9.
- [87] T. Yoshizawa, Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga, and Y. Maitani, "Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.026.
- [88] Z. Xu *et al.*, "Folic acid conjugated mPEG-PEI600 as an efficient non-viral vector for targeted nucleic acid delivery," *Int. J. Pharm.*, 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.01.009.
- [89] A. Yassemi, S. Kashanian, and H. Zhaleh, "Folic acid receptor-targeted solid lipid nanoparticles to enhance cytotoxicity of letrozole through induction of caspase-3 dependent-apoptosis for breast cancer treatment," *Pharm. Dev. Technol.*, 2020, doi: 10.1080/10837450.2019.1703739.

- [90] J. H. Park, S. Lee, J. H. Kim, K. Park, K. Kim, and I. C. Kwon, "Polymeric nanomedicine for cancer therapy," *Progress in Polymer Science (Oxford)*. 2008, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.09.003.
- [91] B. Chandra Mohanta, S. Chandra Dinda, N. Narayan Palei, and J. Deb, "Solid Lipid Based Nano-particulate Formulations in Drug Targeting," in *Role of Novel Drug Delivery Vehicles in Nanobiomedicine [Working Title]*, 2019.
- [92] O. O. Oyeleye, S. T. Ogundeji, S. I. Ola, and O. G. Omitogun, "Basics of animal cell culture: Foundation for modern science," *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, doi: 10.5897/bmbr2016.0261.
- [93] A. Helmrich and D. Barnes, "Animal cell culture equipment and techniques," *Methods Cell Biol.*, 1998, doi: 10.1016/s0091-679x(08)61568-x.
- [94] P. Nambisan, "Relevance of intellectual property rights in biotechnology," in *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology*, 2017.
- [95] W. Chanput, V. Peters, and H. Wichers, "THP-1 and U937 cells," in *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, 2015.
- [96] Y. Mo, A. Gu, D. J. Tollerud, and Q. Zhang, "Nanoparticle toxicity and environmental impact," in *Oxidative Stress and Biomaterials*, 2016.
- [97] J. Van Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos, "Cell sensitivity assays: The MTT assay," *Methods Mol. Biol.*, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-80-5_20.
- [98] M. Yu, Y. Mo, R. Wan, S. Chien, X. Zhang, and Q. Zhang, "Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells with exposure to metal nanoparticles," *Toxicol. Lett.*, 2010, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.02.010.
- [99] X. Yang *et al.*, "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity," *Toxicol. Lett.*, 2015, doi: 10.1016/j.toxlet.2015.02.004.
- [100] M. Mahmoudi, K. Azadmanesh, M. A. Shokrgozar, W. S. Journeay, and S. Laurent, "Effect of nanoparticles on the cell life cycle," *Chemical Reviews*. 2011, doi: 10.1021/cr1003166.
- [101] C. Giacinti and A. Giordano, "RB and cell cycle progression," *Oncogene*. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209615.
- [102] Ş. Akgün, H. Küçüksayan, and H. Akça, "Tümör baskılayıcı genler."
- [103] D. R. J. Verboogen, N. H. Revelo, M. Ter Beest, and G. Van Den Bogaart, "Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes," *J. Mol. Cell Biol.*, 2018, doi: 10.1093/jmcb/mjy038.
- [104] G. Lucena-Aguilar, A. M. Sánchez-López, C. Barberán-Aceituno, J. A. Carrillo-Ávila, J. A. López-Guerrero, and R. Aguilar-Quesada, "DNA source selection for downstream applications based on dna quality indicators analysis," in *Biopreservation and Biobanking*, 2016, doi: 10.1089/bio.2015.0064.
- [105] R. Hassan *et al.*, "Guidelines for nucleic acid detection and analysis in

- hematological disorders," *Malaysian Journal of Pathology*. 2015.
- [106] S. Doktorovova *et al.*, "Cationic solid lipid nanoparticles (cSLN): structure, stability and DNA binding capacity correlation studies," *Int. J. Pharm.*, vol. 420, no. 2, pp. 341–349, 2011.
- [107] C. Botto, N. Mauro, E. Amore, E. Martorana, G. Giammona, and M. L. Bondì, "Surfactant effect on the physicochemical characteristics of cationic solid lipid nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.052.
- [108] M. Danaei *et al.*, "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems," *Pharmaceutics*. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [109] K. Tabatt *et al.*, "Transfection with different colloidal systems: Comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes," *J. Control. Release*, 2004, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.02.029.
- [110] C. Senthil Kumar, R. Thangam, S. A. Mary, P. R. Kannan, G. Arun, and B. Madhan, "Targeted delivery and apoptosis induction of trans-resveratrol-ferulic acid loaded chitosan coated folic acid conjugate solid lipid nanoparticles in colon cancer cells," *Carbohydr. Polym.*, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115682.
- [111] K. Rajpoot and S. K. Jain, "Colorectal cancer-targeted delivery of oxaliplatin via folic acid-grafted solid lipid nanoparticles: preparation, optimization, and in vitro evaluation," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1366338.
- [112] A. C. C. Vieira *et al.*, "Mannosylated solid lipid nanoparticles for the selective delivery of rifampicin to macrophages," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1434186.
- [113] Z. Liu *et al.*, "Folate receptor mediated intracellular gene delivery using the charge changing solid lipid nanoparticles Folate receptor mediated intracellular gene delivery Z. Liu *et al.*," *Drug Deliv.*, 2009, doi: 10.1080/10717540903047387.
- [114] J. E. N. Dolatabadi, H. Hamishehkar, M. Eskandani, and H. Valizadeh, "Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.055.
- [115] M. Sabzichi, J. Mohammadian, A. Y. Khosroushahi, R. Bazzaz, and H. Hamishehkar, "Folate-targeted nanostructured lipid carriers (NLCs) enhance (Letrozol) efficacy in MCF-7 breast cancer cells," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2016, doi: 10.22034/APJCP.2016.17.12.6085.
- [116] R. Kumar, A. Singh, N. Garg, and P. F. Siril, "Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs," *Ultrason. Sonochem.*, 2018, doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.08.018.
- [117] E. Vighi, B. Ruozi, M. Montanari, R. Battini, and E. Leo, "pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid

- nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.01.030.
- [118] A. Hemati Azandaryani, S. Kashanian, and K. Derakhshandeh, "Folate conjugated hybrid nanocarrier for targeted letrozole delivery in breast cancer treatment," *Pharm. Res.*, 2017, doi: 10.1007/s11095-017-2260-x.
- [119] J. Varshosaz, F. Hassanzadeh, H. Sadeghi, and M. Shakery, "Folate targeted solid lipid nanoparticles of simvastatin for enhanced cytotoxic effects of doxorubicin in chronic myeloid leukemia," *Curr. Nanosci.*, 2012, doi: 10.2174/157341312800167542.
- [120] A. Fàbregas *et al.*, "A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid," *Int. J. Pharm.*, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.022.
- [121] A. Fàbregas *et al.*, "Improved formulation of cationic solid lipid nanoparticles displays cellular uptake and biological activity of nucleic acids," *Int. J. Pharm.*, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.026.
- [122] U. Karagöz, M. Kotmakçı, H. Akbaba, V. B. Çetintaş, and G. Kantarcı, "Preparation and characterization of non-viral gene delivery systems with pEGFP-C1 plasmid DNA," *Brazilian J. Pharm. Sci.*, 2018, doi: 10.1590/s2175-97902018000100265.
- [123] O. F. Khan *et al.*, "Endothelial siRNA delivery in nonhuman primates using ionizable low-molecular weight polymeric nanoparticles," *Sci. Adv.*, 2018, doi: 10.1126/sciadv.aar8409.
- [124] M. Rasoulianboroujeni *et al.*, "Development of a DNA-liposome complex for gene delivery applications," *Mater. Sci. Eng. C*, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.012.
- [125] H. S. Varli, F. Alkan, M. Demirbilek, and N. Türkoğlu, "A virus-free vector for the transfection of somatic cells to obtain iPSC," *J. Nanoparticle Res.*, 2019, doi: 10.1007/s11051-019-4668-1.
- [126] W. Wang, F. Zhou, L. Ge, X. Liu, and F. Kong, "A promising targeted gene delivery system: Folate-modified dexamethasone-conjugated solid lipid nanoparticles," *Pharm. Biol.*, 2014, doi: 10.3109/13880209.2013.876655.
- [127] L. Bayón-Cordero, I. Alkorta, and L. Arana, "Application of solid lipid nanoparticles to improve the efficiency of anticancer drugs," *Nanomaterials*, 2019, doi: 10.3390/nano9030474.
- [128] W. Zhao, Z. Sun, S. Wang, Z. Li, and L. Zheng, "Wnt1 participates in inflammation induced by lipopolysaccharide through upregulating scavenger receptor A and NF- κ B," *Inflammation*, 2015, doi: 10.1007/s10753-015-0147-8.
- [129] M. E. Lund, J. To, B. A. O'Brien, and S. Donnelly, "The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus," *J. Immunol. Methods*, 2016, doi: 10.1016/j.jim.2016.01.012.

- [130] V. Yalman *et al.*, "A study on bone tissue engineering: Injectable chitosan-g-stearic acid putty," *Technol. Heal. Care*, 2020, doi: 10.3233/THC-191775.
- [131] D. Biriken, "İnsan THP-1 leukemia hücrelerinin Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) ile hücre sel farklılaşması."
- [132] M. Yamagata, T. Kawano, K. Shiba, T. Mori, Y. Katayama, and T. Niidome, "Structural advantage of dendritic poly(l-lysine) for gene delivery into cells," *Bioorganic Med. Chem.*, 2007, doi: 10.1016/j.bmc.2006.09.033.
- [133] G. Aral Akarsu, D. Biriken, and Z. C. Karahan, "Caco-2 insan kolon epidermal adenokarsinom ve THP-1 insan lösemi monosit hücre dizilerinin f eşitli koşullarda *Toxoplasma gondii*'ye karşı sitokin yanıtlarının ve insan beta-defensin-3 ekspresyon değışikliklerinin araştırılması," *Mikrobiyol. Bul.*, 2017, doi: 10.5578/mb.53941.
- [134] K. Suchi *et al.*, "Overexpression of interleukin-6 suppresses cisplatin-induced cytotoxicity in esophageal squamous cell carcinoma cells," *Anticancer Res.*, 2011.
- [135] H. Cabadak, "Hücre siklusu ve kanser," 2008.
- [136] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris, "p53 mutations in human cancers," *Science (80-.)*, 1991, doi: 10.1126/science.1905840.
- [137] J. Valente, "Affinity purification and delivery of a p53-encoding plasmid DNA for gene mediated cancer therapy," 2018.
- [138] S. H. Choi *et al.*, "Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 3, pp. 545–554, 2008.
- [139] B. Debelec-Butuner, M. Kotmakci, E. Oner, G. Ozduman, and A. G. Kantarci, "Nutlin3a-Loaded nanoparticles show enhanced apoptotic activity on prostate cancer cells," *Mol. Biotechnol.*, 2019, doi: 10.1007/s12033-019-00178-2.
- [140] D. Belletti *et al.*, "Nutlin-3 loaded nanocarriers: Preparation, characterization and in vitro antineoplastic effect against primary effusion lymphoma," *Int. J. Pharm.*, 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.029.
- [141] W. Wang *et al.*, "Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles enhanced anticancer efficiency in breast cancer," *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23071578.
- [142] Pedro Miguel Pacheco de Jesus da Cunha, "On the development of a novel targeted miRNA-based therapy towards glioblastoma," UNIVERCIDADE DE COIMBRA, 2015.
- [143] R. Joshi, S. Adhikari, B. S. Patro, S. Chattopadhyay, and T. Mukherjee, "Free radical scavenging behavior of folic acid: Evidence for possible antioxidant activity," *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, doi: 10.1016/S0891-5849(01)00543-3.
- [144] K. AbouAitah *et al.*, "Folic acid-conjugated mesoporous silica particles as nanocarriers of natural prodrugs for cancer targeting and antioxidant action," *Oncotarget*, 2018, doi: 10.18632/oncotarget.25470.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: cerenktas@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Kırmızıtaş FC, Laçın NT, Demirbilek M. “pEGFP-N1-IL6 Plazmidinin Katı Lipid Nanopartikül İle Transfeksiyon Veriminin Değerlendirilmesi”, MAS International European Conference On Mathematics engineering-Natural & Medical Sciences-Xii, İzmir, Türkiye, 18-19 Temmuz 2020, ss 11-12.

Projeler

1. BAP, Proje No: FYL-2019-3615, Türkoğlu LN, Kırmızıtaş FC., HeLa Kanser Hücrelerini Etiketlemek Amacı İle Lipid Bazlı Nanopartikül ile Transfeksiyonu. 2019-Süresi: 12 ay