

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNTEGRİN $\alpha 10$ 'UN PLGA NANO
PARTİKÜLLERİNE YÜKLENMİŞ siRNA İLE BASKILANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra Nur ÇEVİK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

Haziran - 2022

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNTEGRİN $\alpha 10$ 'UN PLGA NANO
PARTİKÜLLERİNE YÜKLENMİŞ siRNA İLE BASKILANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Büşra Nur ÇEVİK
(195309006)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

Haziran - 2022

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195309006 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Büşra Nur ÇEVİK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNTEGRİN $\alpha 10$ 'UN PLGA NANO PARTİKÜLLERİNE YÜKLENMİŞ siRNA İLE BASKILANMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Neslihan ABACI

İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN

İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah YÜCESAN

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : **1 Ağustos 2022**

Savunma Tarihi : **21 Haziran 2022**



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez çalışmam sürecinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmamın her aşamasında desteği ile yanında olan, her sorunumu büyük bir sabır ve özveri ile yanıtlayan çok değerli danışmanım Prof. Dr. Fahri AKBAŞ ve eş danışmanım Dr.Öğr.Üyesi Fatemeh BAHADORİ'ye,

Tez çalışmalarım sırasında fikirlerini, tecrübelerini benimle paylaşan, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen değerli Seda SÜSGÜN ve Nur Damla KORKMAZ'a;

Tez çalışmamın deney sürecinde fikirlerini, tecrübelerini benimle paylaşan, yardımını esirgemeyen değerli Rabia DURAN'a;

Çalışma süresince beni destekleyen, hep yanımda olan, bana inanan, beni cesaretlendiren ve maddi-manevi yardımlarını esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20210420 Numaralı proje ile desteklenmektedir.

Haziran 2022

Büşra Nur ÇEVİK

BEYAN

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

Büşra Nur ÇEVİK
İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|------|
| ÖNSÖZ..... | iv |
| BEYAN..... | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| KISALTMALAR | viii |
| SEMBOLLER | x |
| TABLO LİSTESİ..... | xi |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | xii |
| ÖZET | xiv |
| SUMMARY | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI | 4 |
| 2.1 KANSER..... | 4 |
| 2.1.1 Cerrahi yaklaşımlar | 5 |
| 2.1.2 Kemoterapi..... | 5 |
| 2.1.3 Radyoterapi | 6 |
| 2.1.4 İmmünoterapi | 6 |
| 2.1.5 Hipertermi | 7 |
| 2.1.6 Gen tedavisi..... | 8 |
| 2.1.7 Glioblastoma Kanseri..... | 9 |
| 2.2 GEN SUSTURMA STRATEJİLERİ..... | 10 |
| 2.2.1 Antisens Teknoloji | 10 |
| 2.2.1.1 RNAi mekanziması | 11 |
| 2.2.1.2 RNAi Temelli Gen Baskılama Bileşenleri..... | 12 |
| 2.2.1.3 RNAi Terapötiklerin Uygulama Alanları..... | 15 |
| 2.3 İNTEGRİNLER | 15 |
| 2.3.1 İntegrin $\alpha 10$ | 17 |
| 2.4 NANOTEKNOLOJİ | 17 |
| 2.4.1 Nanopartikül..... | 18 |
| 2.4.2 Lipozomlar | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.3 Dendrimerler | 22 |
| 2.4.4 Miseller | 22 |
| 2.4.5 Karbon nanotüpler..... | 23 |
| 2.4.6 Metalik nanopartiküller..... | 23 |
| 2.4.7 Polimerik nano taşıyıcılar | 24 |
| 2.4.7.1 Poli laktik ko glikolik asit (PLGA) nanopartikül..... | 25 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 27 |
| 3.1 GEREÇ..... | 27 |
| 3.1.1 Cihazlar | 27 |
| 3.1.2 Kimyasallar ve Kitler | 30 |
| 3.1.3 Tampon ve çözeltiler..... | 33 |
| 3.1.3.1 Büyütme medyumları..... | 33 |
| 3.1.3.2 Nanopartikül sentezinde kullanılan çözeltiler..... | 34 |
| 3.1.3.3. Western blot deneylerinde kullanılan çözeltiler..... | 34 |
| 3.2 YÖNTEM..... | 35 |
| 3.2.1 PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması..... | 35 |
| 3.2.2 siRNA'nın PLGA nanopartikülerine yüklenmesi..... | 36 |
| 3.2.3 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu | 36 |
| 3.2.4 siRNA-PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi (%EE) | 36 |
| 3.2.5 Hücre Hatları ve Hücre Kültürü..... | 37 |
| 3.2.6 MTT ile Hücre Canlılık Tayini | 38 |
| 3.2.7 Hücre Göçü Deneyi..... | 38 |
| 3.2.8 Western Blot..... | 38 |
| 3.2.9 qPCR | 40 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 41 |
| 4.1 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu | 41 |
| 4.1.1 Boş PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu | 41 |
| 4.1.2 siRNA-PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu..... | 43 |
| 4.2 siRNA-PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi (%EE) | 45 |
| 4.3 MTT Sonuçları..... | 46 |
| 4.4 Western blot | 48 |
| 4.5 Çizik Deneyi..... | 50 |
| 4.6 qPCR | 53 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 58 |
| KAYNAKLAR | 60 |

KISALTMALAR

| | |
|----------------------------|---|
| DNA | : Deoksiribonükleik Asit |
| FDA | : ABD Gıda ve İlaç İdaresi |
| PEG | : Poli(etilen glikol) |
| PLGA | : Poli (D,L-laktid-ko-glikolid) |
| RNA | : Ribonükleik Asit |
| siRNA | : küçük enterferans yapan RNA |
| miRNA | : mikro RNA |
| RISC | : RNA kaynaklı susturma kompleksi |
| mRNA | : mesajcı RNA |
| α | : alfa |
| β | : Beta |
| BBB | : Kan-beyin bariyeri |
| EGFR | : Epidermal büyüme faktör reseptörü |
| EPR | : Artmış geçirgenlik ve alıkonma |
| RNAi | : RNA interferans |
| SDS-PAGE | : Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi |
| PCR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| qPCR | : kantitatif Polimeraz zincir reaksiyonu |
| mM | : milimolar |
| nM | : nanomolar |
| g | : gram |
| ml | : mililitre |
| cm | : santimetre |
| mg | : miligram |
| M | : molar |
| μl | : mikrolitre |
| μg | : mikrogram |

| | |
|-----------------------|--|
| dk: | : dakika |
| pre-mRNA | : öncü mRNA |
| kaspaz-3 | : Sistein-aspartik asit proteaz-3 |
| bax | : Bcl-2 ile ilişkili X proteini |
| bcl-2 | : B hücreli lenfoma |
| pten | : Fosfataz ve tensin homologu |
| EDTA | : Etilendiamin tetraasetik asit |
| TBS | : Tris tamponlu tuz çözeltisi |
| Cq | Nicel döngü |
| HCl | : Hidrojen klorür |
| NaCl | : Sodyum klorür |
| H₂O | : Su |
| W/O/W | : su içinde yağ içinde su çift emülsiyon |
| DLS | : <i>Dynamic Light Scattering</i> |

SEMBOLLER

C° : derece

2^{ΔACT} : rölatif gen ekspresyonu

ΔACT : gen ekspresyonundaki kat değişimi

kDa : kilodalton



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Kullanılan cihazların listesi

Tablo 3.2: Kullanılan kit, kimyasal listesi.

Tablo 4.1: Hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyut dağılımları.

Tablo 4.2: % Enkapsülasyon verim sonucu.

Tablo 4.3: Madde uygulandıktan 96 saat sonraki hücre canlılık oranları. Kontrol grubuna yalnızca DEPC'li medyum uygulanmış.

Tablo 4.4: 72 saatlik inkübasyon sonrası.

Tablo 4.5: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış hücrelerin canlılık oranı.

Tablo 4.6: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarının çizik deneyinin 4X büyütmede floresan mikroskopu görüntüleri.

Tablo 4.7: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarının çizik deneyinin analizi.

Tablo 4.8: Cq değerleri.

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: RNAi mekanizması [1].

Şekil 2.2: İlaç dağıtımında kullanılan bazı nano partiküller [2].

Şekil 2.3: EPR etkisinin mekanizması [3].

Şekil 2.4: Aktif hedeflendirme [4].

Şekil 2.5: Polimerik nanopartiküller [5].

Şekil 2.6: PLGA polimerinin yapısı [6].

Şekil 2.7: PLGA'nın sentezi ve degradasyonu [7].

Şekil 4.1: PLGA nanopartikülünün şiddetçe dağılımı (Intensity).

Şekil 4.2: Boş PLGA nanopartikülünün hacimce dağılımı (Volume).

Şekil 4.3: Boş PLGA nanopartikülünün sayıca dağılımı (Number).

Şekil 4.4: PLGA nanopartikülünün şiddetçe dağılımı (Intensity).

Şekil 4.5: PLGA nanopartikülünün hacimce dağılımı (Volume).

Şekil 4.6: PLGA nanopartikülünün sayıca dağılımı (Number).

Şekil 4.7: siRNA standartlarının standart sapma grafiği.

Şekil 4.8: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarından ekstrakte edilen proteinler ile yapılan western blot görüntüsü.

Şekil 4.9: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarında 24, 48 ve 72.saatlerde Bax geninin ekspresyon seviyeleri.

Şekil 4.10: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış gruplarda 24, 48 ve 72.saatlerde Bcl-2 geninin ekspresyon seviyeleri.

Şekil 4.11: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış gruplarda 24, 48 ve 72.saatlerde kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyeleri.

Şekil 4.11: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış gruplarda 24, 48 ve 72.saatlerde Pten geninin ekspresyon seviyeleri



GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNTEGRİN $\alpha 10$ 'UN PLGA NANO PARTİKÜLLERİNE YÜKLENMİŞ siRNA İLE BASKILANMASI

ÖZET

Kanser, dünyada ölüm nedenlerinin başında gelen bir hastalıktır ve birçok çeşitleri bulunmaktadır. En tehlikeli kanser sınıfına dahil olabilecek bir kanser türü de glioblastoma kanseridir ve beyin çevresine yayılabilen en yaygın ve ölümcül bir tümördür. Histolojik olarak nekroz ve endotel proliferasyon ile tanımlanan glioblastoma, yetişkin bireylerde görülen en yaygın ve agresif birincil beyin tümörüdür. Tanı ve tedavisinde birçok zorluk yaşanmaktadır. Bu olumsuzlukları en aza indirmek amacıyla nano taşıyıcı sistemler ile ilacın kontrollü ve hedefli iletimi mümkün hale getirilmeye başlanmıştır. Ayrıca, kanser hücrelerinde fazla eksprese olan genlerin ve ürünlerinin bilinmesiyle bu genlerin terapötik hedef olduğu çalışmalar artmıştır ve bu doğrultuda tümör bölgelerinde fazla eksprese olan genlerin susturulmasına yönelik çalışmalar günümüzde odak noktası olmuştur. Ribonükleik asit (RNA)'yı seçici bir şekilde hedefleyebilen antisens oligonükleotidler ile antisens teknolojisi bu alanda önemli ajanlar sunmaktadır. Bu terapötik ajanlardan biri olan küçük enterferans yapan (si-RNA)'lar ile hedeflenmiş mesajcı RNA (mRNA)'nın parçalanması mümkün hale gelmiştir. Böylece kanser hücrelerinin gelişimine sebep olan protein susturularak kanser tedavisi gerçekleştirilebilir. İntegrinler, α ve β zincirinden oluşan heterodimerik hücre yüzeyi reseptörleridir ve hücre dışı matrisi hücre iskeletine bağlarlar. Ayrıca tümör hücreleri üzerindeki hücre dışı matris ve integrin reseptörleri arasındaki etkileşimlerin, hücre göçü ve proliferasyonu gibi tümör hücresi süreçlerinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Özellikle, integrin $\alpha 10$ proteinini ifade eden *ITGA10* geninin yüksek ifadesi, glioma hastalarında daha kötü bir genel hayatta kalma olasılığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda, biyoyumlu, biyobozunur ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından insanlar üzerinde kullanımına onay alınmış bir polimer olduğu için Poli (D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) nanopartikülleri ile glioblastoma hücrelerine terapötik madde olan integrin $\alpha 10$ 'u hedefleyen siRNA'nın taşınabilmesini ve sonuçta kanser hücresindeki değişimi incelemeyi amaçladık. Böylece, PLGA nanopartikülleri ile siRNA taşınmasının etkinliği, PLGA nanopartikül aracılı siRNA'nın glioblastoma hücrelerindeki integrin $\alpha 10$ 'u baskılama etkinliği ve integrin $\alpha 10$ 'un baskılanması ile kanser hücrelerindeki değişikliğin incelenerek

PLGA nanopartikülleri ile taşınan siRNA'nın glioblastoma hücrelerindeki integrin $\alpha 10$ 'u hedeflenmesiyle glioblastoma kanseri için olası bir terapötik yaklaşım öne sürülebilecektir.

Anahtar Kelimeler: gen tedavisi, PLGA, nano taşıyıcı, si-RNA, integrin, glioblastoma kanseri



SUPPRESSION OF INTEGRIN α 10 IN GLIOBLASTOMA CELLS BY siRNA LOADED WITH PLGA NANOPARTICLES

SUMMARY

Cancer is a disease that is one of the leading causes of death in the world and has many varieties. The type of cancer that may be included in the most dangerous class of cancer is glioblastoma cancer, and it is the most common and deadly tumor that can spread around the brain. Glioblastoma, histologically defined by necrosis and endothelial proliferation, is the most common and aggressive primary brain tumor seen in adult individuals. There are many difficulties in diagnosis and treatment. In order to minimize these negativities, controlled and targeted delivery of the drug has started to be made possible with nano carrier systems. In addition, studies in which these genes are therapeutic targets have increased with the knowledge of overexpressed genes and their products in cancer cells, and accordingly, studies aimed at silencing overexpressed genes in tumor sites have become a focus today. Antisense oligonucleotides, which can selectively target RNA, and antisense technology provide important agents in this field. With siRNA, one of these therapeutic agents, it has become possible to break down the targeted messenger RNA. In this way, cancer treatment can be performed by silencing the protein that causes the development of the cancer cell. Integrins are heterodimeric cell surface receptors consisting of α and β chains and bind the extracellular matrix to the cytoskeleton. It has also been reported that the interactions between the extracellular matrix and integrin receptors on tumor cells play an important role in tumor cell processes such as cell migration and proliferation. In particular, the high expression of the ITGA10 gene, which expresses the integrin α 10 protein, has been shown to be associated with a worse overall survival probability in glioma patients.

In our study, we aimed to examine the transport of siRNA targeting the therapeutic substance integrin α 10 to glioblastoma cells with poly lactic co glikolic asid (PLGA)

nanoparticles, as it is a biocompatible, biodegradable polymer approved for use on humans by the FDA, and ultimately the change in the cancer cell. Thus, the efficiency of siRNA transport with PLGA nanoparticles, the efficacy of PLGA nanoparticle-mediated siRNA to suppress integrin $\alpha 10$ in glioblastoma cells and the change in cancer cells by suppression of integrin $\alpha 10$ will be examined. In conclusion, it can be suggested that siRNA carried by PLGA nanoparticles could be a possible therapeutic approach for glioblastoma cancer by targeting integrin $\alpha 10$ in glioblastoma cells.

Keywords: gene therapy, PLGA, nano-carrier, si-RNA, integrin, glioblastoma cancer



1. GİRİŞ

Glioblastoma kanserinin ve diğer kanser çeşitlerinin kesin ve etkili bir tedavisi olmamakla birlikte günümüzde mevcut olan terapötik yaklaşımların da ciddi yan etkileri olabilmektedir. Kanser tedavisi için kullanılan kemoterapötik ilaçlar hedeflenen tümör bölgesi dışında sağlıklı hücreleri de etkileyebilmektedirler. Dolayısıyla, kanser hücrelerinin ölümüne sebep olacak ilaç dozundan daha fazlası hastaya uygulanarak etkin dozun hedeflenmiş bölgeye ulaşması sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu durumun da insan sağlığı, çevre ve ekonomi açısından önemli dezavantajları olmaktadır. Ayrıca kanser tedavisi için geliştirilen ilaçlar ile beklenen düzeyde sonuçlar alınamadığından gen düzeyinde tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir.

Histolojik olarak nekroz ve endotel proliferasyon ile tanımlanan glioblastoma, yetişkin bireylerde görülen en yaygın ve agresif birincil beyin tümörüdür [8]. Hücre tipleri ve boyutlarında, mitoz sayılarında ve damar oluşumu ve nekroz dağılımlarında büyük farklılıklar gözlemlenebildiğinden glioblastoma heterojen bir tümör olarak da tanımlanmaktadır [9]. Genel olarak bu kanserin tedavisi ameliyat, radyoterapi ve alkilleyici kemoterapi ile gerçekleştirilmeye çalışılmaktadır [8]. Ancak uygulanan tedaviler ile istenilen düzeyde sonuçların alınamadığı da bir gerçektir.

Genel olarak tümör bölgelerinde, bazı genlerin fazla ekspresyonunun olduğu ve bazı genlerin ise baskılandığı bilinmektedir. Dolayısıyla kanser gelişiminde veya kanser hücrelerinin sağ kalımında önemli olabilecek fazla eksprese olan genlerin ya da gen ürünlerinin susturulmasıyla tümörün küçülmesi hatta yok edilmesi sağlanabilir. Anti-tümör etkilerinin yanında toksik etkileri çok fazla olan ilaç uygulamalarının yerine yalnızca hedeflenmiş gen üzerinde etki gösterebilen siRNA'lar da kanser tedavisinde umut vadeden yeni terapötik ajanlardır. RNA interferans (RNAi) mekanizmasının bir bileşeni olan siRNA, rehber RNA olarak görev alır ve Deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu, histonların modifikasyonu ve mRNA yıkımını gerçekleştirir [10]. Birçok kanser çalışmasında fazla eksprese olan genin susturulması siRNA ile gerçekleştirilerek kanser tedavisi için önemli sonuçlar alınmıştır [11, 12]. Birçok

avantajının yanı sıra siRNA'lar dolaşımında yer alan nükleazlar tarafından parçalanabilmesi ve hedefe ulaşmasının engellenebilmesi, hücre içine yeterli miktarda alınamaması ve hedef dışı hücreler tarafından da alınması gibi dezavantajlara da sahiptir [13]. Dolayısıyla, terapötik bir ajan olarak siRNA kullanılmak istendiğinde nano taşıyıcı sistemler ile taşınması tercih edilmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar, hedeflenen tümör bölgeleri dışında sağlıklı hücrelere de etki edebilmektedir. Ayrıca, hedeflenmiş bölge dışında başka bölgelere de yayılım göstermeleri gerekli olan dozdan daha fazla miktarın canlıya uygulanmasını gerektirmektedir. Dolayısıyla ilaç etken maddesinin hedef dışı bölgelere gitmesinin engellenmesi ve yalnızca gerekli olan dozda ilacın uygulanabilmesi için nano taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. Bu taşıyıcı sistemler ile hedeflenen bölgeye istenilen ilacın gerekli dozu taşınabilmektedir. Kullanılacak nano taşıyıcının canlı için zararlı bir etkisinin olmaması için biyouyumlu ve biyobozunur özellikte olması önemlidir. Bu çalışmada kullanılacak nano taşıyıcı ise PLGA nanopartikülüdür. FDA tarafından onaylanmış ve biyolojik olarak parçalanabilen PLGA, kontrollü ve sürekli salım, düşük toksisite ve biyolojik uyumluluk gibi önemli özelliklere sahip olmasından dolayı ilaç verme sistemlerinde kullanılabilir [14]. Ayrıca nanopartiküllerin kafatası içi tümöre ve normal beyin dokusuna nüfuz etme yetenekleri de in vivo çalışmalarla gösterilmiştir [15]. Bu doğrultu da hedeflenen glioblastoma hücrelerinde etkili bir şekilde siRNA ile baskılanma gerçekleştirebilmek için siRNA'lar PLGA nanopartikülleri ile taşınacaktır.

Bu çalışmada PLGA nanopartikül aracılı siRNA'ların hedefi ise glioblastoma hücrelerindeki integrinlerdir ve integrinler hedeflenerek, integrinlerin susuturulmasının kanser tedavisi açısından etkileri araştırılacaktır. Transmembran alfa (α) ve beta (β) heterodimerleri olan integrinler, hücre dışı matris ligandlarına, hücre yüzeyi ligandlarına ve çözümlü ligandlara bağlanabilen bir hücre yapışma reseptörleridir [16]. Ligand bağlanma sürecinde, integrinlerin sinyalleri hücrenin iç kısmına iletebildiği ve ligand bağlama afinitesini düzenleyen hücre içi sinyalleri de alabildiği bilinmektedir [16]. Dolayısıyla, tümör hücreleri üzerindeki hücre dışı matris ve integrin reseptörleri arasındaki etkileşimlerin, hücre göçü ve proliferasyonu gibi tümör hücresi süreçlerinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [17]. Özellikle katı tümörlerin başlaması, ilerlemesi ve metastazı için çok önemli olan çeşitli hücresel

işlevleri de düzenlediği bilinmektedir [18]. Yapılan bir çalışmada da integrin $\alpha 10$ proteinini ifade eden *ITGA10* geninin yüksek ifadesi, glioma hastalarında daha kötü bir genel hayatta kalma olasılığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [17].

Sonuçta bu araştırmada, PLGA nanopartikülleri aracılı siRNA'nın glioblastoma hücrelerine taşınması incelenecektir. Ayrıca, hedeflendirilmiş siRNA'nın glioblastoma hücrelerinde integrin $\alpha 10$ 'u baskılama etkinliğiyle kanser hücrelerindeki değişikliklerin in vitro analizi yapılacaktır.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 KANSER

Kanser, günümüzde gelişen teknoloji ve artan bilgi birimine rağmen tedavisi en zor ve bazı durumlarda hala iyileştirici bir tedavisi olmayan bir hastalık. Kanser, apoptoza uğraması gereken hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması olarak tanımlanabilir ve kanserli kitlenin cerrahi operasyon ile çıkarılması, kansere özgü ilaç kullanımı, radyasyon tedavisi ve kanser hücrelerinin kendiliğinden kaybolması gibi süreçler olmadığı sürece kanserli hücreler büyümeye devam edeceği de bilinmektedir [19]. Kanserlin ölümcül olmasındaki en önemli nedenler arasında tümör hücrelerinin hayatta kalabilmeleri için geliştirebildikleri mekanizmalardır. Besinler, kemokinler, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, endotel hücreler ve normal epitel hücreleri tümörün mikroçevresini oluşturur ve bu bileşenler birbirleriyle etkileşerek tümörün büyümesine, hastalığın ilerlemesine ve hatta ilaçlara karşı direnç mekanizmasının oluşmasına sebep olmaktadır [20]. Tümör hücrelerinin çoğalma hızı, hücre dışı besinlere bağlı olmakla birlikte daha düşük veya değişen besin koşullarına kanser hücreleri daha iyi uyum sağlamaktadır [21]. Ayrıca kanserlin meydana geldiği dokuya hatta insana göre farklı özellikte olmaları tedavi yöntemi geliştirmeyi zorlaştırıyor ve tek bir tedavi yöntemine değil de bir çok farklı tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmasına sebep oluyor. Bunlara ek olarak, kanserli hücrenin metastaz yeteneği de hastalığın daha da ciddileşmesine sebep oluyor. Kanserlerin genetik temelli olabileceğinin yanı sıra kanserlin en büyük nedeninin çevresel koşullar olduğu da gözlemlenmektedir. Stres, tütün kullanımı, fiziksel hareketsizlik ve aşırı vücut ağırlığı gibi faktörler kanser riskini artırmaktadır [22]. Kanser tedavisinin ilk ve en önemli aşamasını tanı süreci içermektedir. En etkili tanı sürecini riskli, zaman alıcı ve pahalı olmasına rağmen histolojik biyopsi olduğu için kanserlin erken teşhisini destekleyecek ve kişiselleştirilmiş terapi için biyo-spesifikasyonlarına dayalı olarak popülasyonun sınıflandırabilecek teşhis yöntemlerine ihtiyaç vardır [23]. Tanı aşamasının ardından ise en önemli ve en zor ikinci aşama olan tedavi süreci olmaktadır. Bu zamana kadar kanser tedavisi için farklı tedavi yöntemleri uygulanmıştır. Hastalığın zorlu

mekanizmasından dolayı bazı yöntemler bir arada da kullanılabilmesine rağmen hala net bir tedavi yöntemi yoktur. Genel itibariyle kanser tedavisi için kullanılan yöntemler, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hipertermi, cerrahi yaklaşımlar ve gen tedavisidir. Her tedavi yönteminin avantajlarının yanında olumsuz etkileri ve başarısız sonuçları olduğu için bu yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.1.1 Cerrahi yaklaşımlar

Kanser tedavisi için kullanılan yöntemlerin en eskisi olan cerrahi yöntemde kanserli doku ve çevresindeki sağlıklı doku kenarıyla birlikte kesilerek daha etkili sonuç alınmaya çalışılır [24]. Cerrahi yöntemin kanser tedavisindeki etkinliğini komşu organların ve kan damarlarının lokal tutulumunun kapsamı gibi tümörü etkileyen faktörler ve yaş gibi hastayla ilgili faktörler etkileyebilir [25]. Kanser tedavi sürecinin sonucunu belirleyen en önemli etken iyi planlanmış ve yüksek kaliteli cerrahi müdahaledir ve parça almanın en önemli amacı da hastalığın maksimum bölgesel kontrolünü sağlamaktır [26]. Cerrahinin zamanla gelişimiyle birlikte farklı cerrahi yaklaşımlar meydana çıkmıştır. Kanser karmaşık yapısından dolayı da birden fazla yöntemin bir arada kullanımı daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu duruma örnek olarak adjuvan radyoterapi ile transanal endoskopik mikrocerrahinin birlikte kullanımının, daha iyi erişim, daha iyi parça alımı ve görünürlük sonuçlandığı verilebilir [27]. Kanser cerrahisinde alınan sonuçlara göre geliştirilen yeni cerrahi yöntemlere, tümör çevresindeki normal dokuya daha az zarar veren transoral cerrahi de örnek verilebilir [28].

2.1.2 Kemoterapi

Hastalıkların tedavisinde kimyasalların kullanımı olarak ifade edilen kemoterapi terimi, 20. yüzyılın başında kanseri tedavi etmek için kullanılmaya başlanmıştır [29]. Kemoterapi, bir çok kanser çeşiti için bir tedavi yöntemi olması ile birlikte 12 kanser çeşiti için de tedavi sonucunda hastaliksız hayatta kalmayı sağlamaktadır [30]. Tümör büyümesinin inhibisyonu, hücre ve çevresi içinde farklı düzeylerde olabildiği gerçeğine rağmen kemoterapinin amacı hücre çoğalmasını ve tümör çoğalmasını engellemektir [31]. DNA sentezinin inhibisyonu, RNA sentezi inhibisyonu ve pürin sentezinin inhibisyonu gibi kemoterapötik ajanların etki mekanizmaları geniş olmasına rağmen yan etkileride oldukça fazladır [32]. Benzer çözünürlük ve geçirgenlik, optimize edilmiş doz oranları, örtüşen toksisitelerin olmaması ve farklı

terapötik mekanizmalar gibi koşullar sağlanarak farklı kemoterapötik ilaçların birlikte uygulanması ile daha etkili sonuçlar alınması beklenilmektedir [33]. Kemoterapiyi, cerrahi tedaviden sonra uzak metastazların uzun süreli baskılanması amacıyla yapılan ameliyat sonrası kemoterapi ve primer tümörün hacmini ve bölgesel lenfadenopati seviyesini azaltmak için kullanılan ameliyat öncesi kemoterapi olmak üzere ikiye ayırabilmekteyiz [34]. Ayrıca kanser kemoterapötikleri de ajanın çoğunun dolaşımında ve tümör dokusu dahil olmak üzere çeşitli organ ve sistemlerin hücrelerine doğrudan etki etmesine sağlayan parental yol ve bağırsak mikrobiyotasının enzimatik sistemleri tarafından metabolize edilerek karaciğerde de metabolik dönüşümlere uğradığı oral yol olmak üzere iki şekilde uygulanabilir [35].

2.1.3 Radyoterapi

Kemoterapiye göre daha az yan etkiye sahip olan radyoterapi, daha iyi lokal tümör kontrolü ve hastalığın yayılmasının azalmasını sağlayarak kanser tedavisi için önemli bir tedavi seçeneği olmuştur [36]. Kanser büyümesini geciktirme ve radyasyona maruz kalmış tümörü ortadan kaldırma özelliklerinin yanı sıra tümör mikroçevresindeki bağışıklık aktive edici ve baskılayıcı sinyaller arasındaki dengeyi değiştirir ve immün aracılı sistemik tümör gerilemesine de neden olduğu gözlemlenmiştir [37]. Ön tedavi olarak kullanılan radyoterapi, ilerlemiş tümörleri olan hastalarda semptomları giderir, yaşam kalitesini artırır ve iyonlaştırıcı radyasyon, DNA hasarını uyararak tümör hücresi ölümüne sebep olabilir [38]. Kanser biyolojisinin kişiden kişiye değiştiği gerçeğinin öğrenilmesiyle birlikte kişileştirilmiş tedavinin önemi ortaya çıktı. Bu doğrultuda, radyoterapi ile fiziksel hedeflendirme yapılabilir ve cerrahi ve kemoterapi ile de birlikte kullanılabilir [39]. X ışınları, elektron ışınları, proton ışınları gibi ışınlar kullanılarak yapılan tümör radyoterapisi ile meme kanseri, akciğer kanseri, özofagus kanseri, rektum kanseri, rahim ağzı kanseri, prostat kanseri, melanom, yumuşak doku sarkomu ve lenfoma gibi kötü huylu tümörlerin tedavisi gerçekleştirilebilir [40].

2.1.4 İmmünoterapi

Tümör biyolojisi ile alakalı bilgi birikiminin artmasıyla birlikte kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden nasıl kaçtığı ile ilgili bilgi birikimi arttı ve dolayısıyla kanser tedavisi de bu yönde şekillendi [41]. Kanserlin bağışıklıktan kaçan hücreler ile başlayabildiği bilindiği için bu doğrultuda geliştirilen immünoterapi ile tümöre özgü immün yanıtı uyararak tümör hücrelerini seçici olarak hedeflemeyi amaçlanmaktadır

[42]. Dolayısıyla kanser immünoterapisinin amacı vücudun kendi bağışıklık sisteminin etkinliğini artırarak kanserle doğal mücadeleyi sağlamaktır [33]. İmmünöterapi, akciğer kanseri hariç birçok katı kanserde başarılı sonuçlar vermiştir ama T hücreleri ile antijen sunan hücreleri veya tümör hücrelerinin etkileşimlerini modüle ederek çalışan bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin kullanılması ile akciğer kanserinde de etkili olmuştur [43]. Antijen işleme ve sunumu, bağışıklık sisteminin anormal protein ekspresyonu karşısındaki tavrını belirlemesini sağlar ve anti tümör immün yanıtı uyaran antijenler de tümör mutasyonlu antijenler, tümörle ilişkili antijenler ve kanser-testis antijenleridir [44]. Bağışıklık mikroçevresini düzenleyerek bağışıklık sistemini güçlendiren immünoterapi, immün kontrol noktası inhibitörleri, hücrel immünoterapiyi, eksozom immünoterapisini içerir ve terapötik etkisi de immün mikroçevre ve tümör mutasyon yükünden etkilenir [45]. Kanser tedavisinde etkili bir yöntem olabilen immünoterapi, çoklu katı ve hematolojik maligniteler için değişen ve spesifik etki mekanizması ile ilgili olan benzersiz toksisite profillerine sahiptir [46].

2.1.5 Hipertermi

Hipertermi, etkinliği uygulanan sıcaklığa ve süreye bağlı olarak ateşin uyarılmasıyla bir hastalığın tedavi edilmesidir [47]. 41-42°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hücreler öldüğü için hipertermi yöntemiyle vücudun kanserden etkilenen bölgesinin sıcaklığı artırılarak gerçekleştirilir [48]. Hipertermi, kanser tedavisi için önemli yöntemler olan radyasyon, kemoterapi ve immünoterapi tedavilerinin etkinliğini arttırabilmekte [49]. Hipertermi mantığında sıcaklık 39-42°C'ye gelmesiyle kan akışı arttığı için tümörlerin oksijenlenme durumunu büyük ölçüde iyileştirerek radyasyon ve kemoterapinin sitotoksik etkilerine karşı daha duyarlı olmasını sağlar ve vücudun tümöre karşı bağışıklık tepkisini iyileştirir [50]. Hipertermi uygulaması lokal ve tüm vücut hipertermisi olarak ikiye ayrılabilir ve lokal hipertermi yüzeysel tümör bölgelerde etki gösterirken, tüm vücut hipertermisi, metastatik ve daha lokalize kanseri tedavi etmede daha etkili ama toksik etkisi de vardır [51]. Farklı yöntemler uygun koşullarda bir araya getirildiğinde sonuç daha etkili olabilmekte ve hipertermi uygulamasının diğer yöntemlerle birlikte uygulanışları çalışılmakta. Bu doğrultuda farklı bir bakış açısı olan nanopartikül bazlı hipertermi de tümör immünojenitesini ve tümör geçirgenliğini arttırma gibi olumlu sonuçları olmuştur [52].

2.1.6 Gen tedavisi

Bilimdeki gelişmelerle birlikte birçok hastalığın ortaya çıkmasında genler üzerindeki değişikliklerin sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda da tüm hücreleri, dokuları etkileyen değil yalnızca hastalığa sebep olan geni veya genleri etkileyebilecek tedavinin daha etkili olabileceği düşünülmüştür. Sağlıklı olan hücrelere de herhangi bir kimyasal müdahale olmayacağı için tedavi amaçlı uygulanacak sistemin yan etkileri o oranda çok daha az olacaktır. Gen tedavisi de en basit tanımıyla hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde DNA ya da RNA'ların kullanılmasıdır [53]. Tedavi amaçlı, hedef hücreye genetik materyalin verilmesi olarak tanımlanan gen tedavisi ile kanser çalışmalarının yanı sıra monogenik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere birçok hastalık için de çalışılmaktadır [54]. Genel anlamda, gen tedavisi ile mutasyona uğramış bir genin normal kopyası verilebilir, RNA'sını hedefleyen sorumlu genin ekspresyonu azaltılabilir, faydalı bir gen ilavesi edilebilir ve mutant genomu modifiye edilebilir [55]. Ayrıca, gen ifadesinin zamansal ve mekansal özgüllüğü olduğu için gen terapisinde de gen ifadesinin temel (constitutive) mi yoksa düzenlenmiş mi olduğuna göre zamansal özgüllük; gen ifadesinin belirli bir beyin bölgesi veya hücre tipi ile sınırlı olup olmadığına da uzaysal özgürlük belirler [56]. Kanserden dolayı ölüm oranı diğer tüm hastalıklardan dolayı ölüm oranlarından yapılan bir çok araştırmaya rağmen daha fazladır. Bunun en önemli nedeni kanserlerin tanı ve tedavisindeki yetersizliklerdir. Kanser tedavisinde kullanılan en önemli tedavi yöntemi kemoterapi olmasına rağmen kemoterapinin yan etkileri faydalarının önüne geçmektedir. Dolayısıyla, kanserli hücrelere uygulanacak maddenin en az yan etkiye sahip olması gerekmektedir. Kanser çalışmalarında genellikle, kanserli hücrelerde bir veya birkaç genin fazla eksprese edilmesi veya baskılanması şeklinde genetik kusurlar oluşmasıyla tümörlerin meydana geldiği ortaya çıkmaktadır. Bu doğrultuda gen tedavisi, kanser çalışmaları için önemli bir alan oluşturmaktadır. Tümör antijenlerinin ve büyüme faktörlerinin gen aktarımı, gen modifiyeli antijen sunan hücreler, in vivo gen düzenleme, intihar gen tedavisi ve doğal onkolitik virüsler ve bakteriler yanı sıra küçük interferans yapan RNA'lar ve mikro interferans yapan RNA'ların ortaya çıkmasıyla antisense oligonükleotidlerinde dahil olduğu farklı stratejiler ile kanser tedavi yöntemleri geliştirilmektedir [57].

2.1.7 Glioblastoma Kanseri

Gelişen teknoloji ve biyoloji bilimindeki bilgi birikime rağmen kanser tüm hastalıklar içinde ölüme en çok sebep olması ile hala birinci sıralardadır. Bu hastalık bulunduğu dokuya, yapısına ve hatta kişiye bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Glioblastoma da insidansı yaşla birlikte artmasına rağmen her yaşta insanda olabilen ve nöroglial kök veya progenitör hücreleri etkileyen genetik değişikliklerden kaynaklanan içsel bir beyin tümörüdür [58]. Glioblastomalar yalnızca glial hücrelerden değil nöral kök hücre benzeri özelliklere sahip çoklu hücre tiplerinden de kaynaklanabilmekte ve genellikle beyinde meydana gelmesine rağmen beyin sapı, beyincik ve omurilikte de görünebilirler [59]. Dolayısıyla, beyin çevresine yayılabilen en yaygın ve ölümcül bir tümör olan glioblastoma, transkripsiyon profilleri, genetik ve epigenetik tarafından tümörlerin tanımlanmasıyla en kapsamlı genomik olarak karakterize edilebilir kanser türüdür [60]. Bu hastalığın kötü prognoza sahip olmasının nedeni yüksek derecede tümör içi hücrel heterojenite, plastisitedir ve ayrıca orijinal tümörden evrimsel olarak farklı olacak şekilde glioblastoma hücrelerinin yüksek nüks etme özelliğidir [61]. Ayrıca glioblastomayı birincil ve ikincil olarak sınıflandırılmasına rağmen histolojik olarak ayırt edilemezler ama genetik ve epigenetik profilleri bakımından farklılık gösterirler [62]. Farklı genetik yollar yoluyla birincil ve ikincil olarak sınıflandırılan glioblastomada; epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) amplifikasyonu, PTEN mutasyonu ve kromozom 10'un tamamı kaybı ile birincil glioblastoma, TP53 mutasyonlarını ve 19q kaybı ile de sekonder glioblastoma tanımlanmaktadır [63].

Normal hücrelerin etkilenmesi, tümörün anjiyogenezi uyarabilmesi ve mevcut vaskülatüre uyum sağlayabilmesi, bağışıklık hücre fonksiyonlarını baskılayabilmesi, beyindeki yabancı elementleri tanınması ve bunlarla savaşması gereken mikrogliya ve makrofajları etkisiz hale getirebilmesi şeklinde bir çok mekanizmaya etki etmesi ile gerçekleşir [64]. Tümör hücrelerinin normal hücreleri etkilemesinde, tümörle ilişkili makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri ve perisitler dahil olmak üzere integrin reseptörlerini eksprese edebilme yeteneği etkilidir ve bu durumda integrin aracılı sinyal yollarının, glioblastomada tümöral hücre oluşumuna sebep olduğu gözlemlenmiştir [65]. Bu kanserin tedavisindeki en önemli zorluk da terapötik amaçlı gönderilen maddenin, besin taşınması, homeostaz ve vücut ile beyin arasındaki iletişimden sorumlu olan kan-beyin bariyerini (BBB) geçemiyor olmasıdır [66]. Tümörlü bölgenin tedavisi için bu bariyerin geçilmesi gerektiğinden fiziksel ve

kimyasal açıdan uygun özelliklere sahip olan nano-taşıyıcılar ile yapılan deneyler sonucunda kan-beyin bariyeri boyunca etkin bir taşıma yapabildikleri gözlemlenmiştir [66].

2.2 GEN SUSTURMA STRATEJİLERİ

Nükleik asitlere karşı savunma mekanizmaları olarak geliştirilen gen susturma, RNA sentezini önleyen transkripsiyonel gen susturma ve transkripsiyon sonrası gen susturma stratejilerini kullanır [67]. RNA müdahalesi ile doğrudan inhibisyonu veya çinko parmak nükleazları, transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar ile DNA düzeyinde genomik modifikasyon yoluyla gen ifadesinin modifikasyonu sağlanabilir [68]. Ayrıca gen susturma stratejisi, diziye özgü hedefleme hem mutant hem de vahşi tip alellerin susturulması şeklinde ya da tek başına mutant alelin susturulması şeklinde gerçekleştirilebilir [69]. Biyoloji bilimindeki bilgi birikimin artması ile yeni stratejiler veya bilinen mekanizmaların farklı versiyonların uyarlamaları şeklinde hastalıkların tedavileri için yeni gen susturma yöntemleri geliştirilmekte. Bunlara bir örnek olarak da RNA aracılı bir antiviral savunma mekanizmasından yararlanarak geliştirilen virüs kaynaklı gen susturma stratejisidir [70]. Bu yöntem de hem RNA hem de DNA bitki viral kaynakları ile bitkilerdeki hedef genleri spesifik olarak susturulmasıdır [71]. Dolayısıyla, varolan ve geliştirilmeye çalışılan gen susturma stratejileri ile hastalık etkenine gen düzeyinde müdahale edilir. Sonuçta da transkripsiyonel gen susturmada kromatin yeniden şekillenmesi yoluyla doğrudan gen transkripsiyonuna sebep olabilirken, transkripsiyon sonrası gen susturma stratejisinde ise mRNA üzerinde işlem gerçekleştirilir [72].

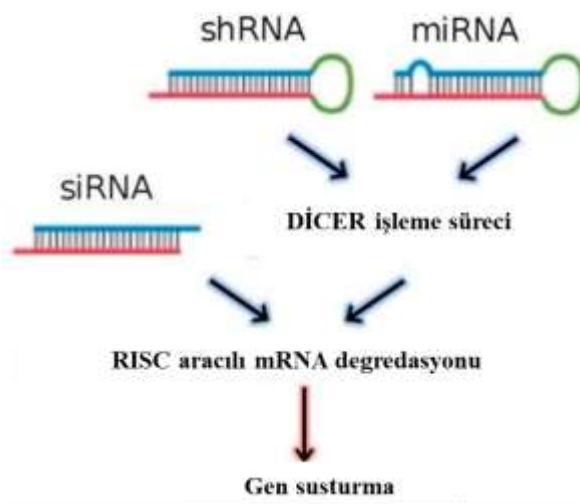
2.2.1 Antisens Teknoloji

Yaygın ve nadir görünen hastalıklar için önemli bir teknoloji olan antisens teknolojisi, Watson-Crick baz eşleştirmesi ile hedef RNA'lara bağlanabilecek kısa modifiye edilmiş oligonükleotitlere dayanır [73]. Oligonükleotit kimyası ve formülasyonlarındaki gelişmeler ile aynı zamanda çoğu monogenik hastalığın genetik temeli ve tam insan genom dizisinin bilinmesiyle bu teknoloji de gelişmektedir [74]. RNA'yı seçici bir şekilde hedefleyebilen antisens oligonükleotitler ile antisens teknolojisi ilaç keşif platformu olmuştur [75]. Ayrıca, tek sarmallı antisens oligonükleotitleri ve RNA interferansı ile gen susturma uygulamaları tedavisi oldukça zor olan nörolojik hastalıklar için de kullanılabilir [76]. mRNA işleme

sürecinin engellenmesi, Ribonükleaz H aktivasyonu, DNA ile üçlü sarmalın oluşumu, öncü mRNA (pre-mRNA) eklemesinin inhibisyonu/modülasyonu, pre-mRNA destabilizasyonu ve mikro RNA (miRNA)'ları hedefleme süreçleriyle antisens oligonükleotitler hedef hücreleri etkiler [77]. Dolayısıyla tek amaç gen ekspresyonunun spesifik inhibisyonudur ama hedef mRNA'nın bloke edilmesine veya bozulmasına dayalı çeşitli yöntemler vardır [78]. Antisens oligonükleotitler spesifik olarak tek bir proteini inhibe ettikleri için spesifik olmayan, hedef dışı etkilerin görülmesi oldukça sınırlıdır [79]. Antisens oligonükleotitlerin verimliliği oligomer uzunluğuna, nükleaz direncine ve bağlanma kinetiğine bağlı olduğu bilinmekte ve bu oligonükleotitlerin omurgasında ve şeker bileşenlerinde yapılan modifikasyonlar ile terapötik uygulamalar için daha uygun hale getirilebilmekteler [80].

2.2.1.1 RNAi mekanizması

Bitkilerin viral patojenlere karşı savunma mekanizması olan RNA susturma yolu Hamilton ve Baulcombe tarafından keşfedilmiş ve daha sonra da hayvanlarda bu mekanizmanın karşılığı olan RNAi mekanizması üzerine çalışmalar yapılmıştır [81]. Dolayısıyla RNAi, memeli hücrelerinde bulunan, RNA molekülleri tarafından hedef gen ekspresyonunun veya translasyonunun diziye özgü bir şekilde baskılandığı veya susturulduğu bir mekanizmadır [82]. Hedefin yok edilmesi veya baskılanması işleminde yer alan yaygın RNAi türleri kısa interfering RNA, kısa saç tokası RNA ve mikro RNA'dır ve bu süreç RNA ile hedef mRNA'sı arasındaki tamamlayıcılığa dayanmaktadır [83].



Şekil 2.1: RNAi mekanizması [1].

Çift sarmallı RNA tarafından uyarılması, etkisinin sistemik olması ve kalıtsal olması RNAi mekanizmasının önemli özellikleridir [84]. RNAi aracılı gen susturma mekanizması, çift zincirli RNA'nın küçük interferans RNA'lara parçalanması ve bu küçük RNA parçalarının aynı kökenli mRNA üzerinde etki eden ve onu bozan bir RNA kaynaklı susturma kompleksine katılması şeklinde iki aşamada gerçekleşir [85]. RNAi mekanizmasının ilk adımında uzun çift zincirli RNA, DİCER enzimi tarafından kısa çift zincirli miRNA ya da siRNA'lara ayrılır ve bu kısa çift zincirli RNA parçaları sitoplazmaya giderek mekanizma aktifleşir [86]. RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) çift zincirli RNA parçasının bir zinciri (yolcu zincir), komplekse dahil olan Argonaute proteini tarafından parçalanır ve RISC kompleksine dahil olan diğer zincir de hedef mRNA ile eşleşerek siRNA yada miRNA – RISC kompleksinin hedef mRNA'ya bağlanacağı ve mRNA'nın parçalayacağı için gen ekspresyonunun susturulmasına ya da baskılanmasına sebep olur [86]. RNAi mekanizmasının en önemli iki bileşeni siRNA ve miRNA'dır. Yapay olarak sentezlenip insan vücuduna transfekte edilen siRNA çift sarmallı RNA iken endojen olan miRNA ise tek sarmallı RNA'dır ve miRNA temelde hedefin 3'-translasyon geçirmemiş bölgesi üzerine etki edebilirken siRNA, mRNA'nın herhangi bir parçası üzerinde etki edebilir [87]. Ayrıca birden fazla genin ifadesini etkileyebilen miRNA, kusurlu baz çiftli bir saç tokası segmenti içeren, kodlamayan küçük RNA molekülleri iken belirli bir geni susturmak için kullanılan siRNA ise genellikle ekzojendir ve mükemmel tamamlayıcı çift sarmallı yapılar oluşturur [88].

2.2.1.2 RNAi Temelli Gen Baskılama Bileşenleri

RNAi mekanizmasında yer alan başlatıcı, gen susturma sürecinin efektörleri, yükselticileri ve ileticileri gibi farklı görevleri olan birçok bileşeni vardır ama temel olarak RNAi mekanizmasında DİCER, RISC, miRNA ve siRNA görev almaktadır [85].

DİCER

Ribonükleaz III ailesinin bir üyesi olan Dicer enzimi, çoğu küçük düzenleyici RNA'nın biyogenezinde, endojen ve eksojen substratların işlenmesinde ve hücrel süreçlerin düzenlenmesinde görev alır [89]. Dicer enzimi genellikle, iki katalitik alan, bir N-terminal DExH/D alanı, bir DUF283 alanı, bir PAZ alanı ve bir çift sarmallı RNA bağlama alanı içerir ve uzun çift sarmallı substratlardan siRNA, firkete(hairpin)

RNA substratlarından da miRNA üretimini sağlar [90]. Dicer enziminin RNA bağlayıcı alanı olan PAZ domaini, çift zincirli RNA substratları tanır ve Rnase III alanları tarafından tam olarak istenilen boyutta ürünler üretilir [91]. Ayrıca, enzimin N terminal helikaz alanı da pre-miRNA'ların firkete halka yapıları ile etkileşime girer çift zincirli RNA substratları arasında ayırım yapar [92]. siRNA ve miRNA üretildikten sonra gen susturma işleminin gerçekleşmesi için Dicer enzimi tarafından üretilen bu ürünler RISC'e yüklenir [93]. Çift zincirli RNA'dan siRNA üreten Dicer enzimi aynı zamanda oluşan siRNA'nın RISC proteiniyle birleşmesinde de rol oynar [94]. Dicer enzimi, ökaryotlar arasında benzer olmasına rağmen farklı metazoan model organizmalarında, substrat işleme ve seçicilik gibi özellikler açısından farklılıklar içermektedir [95].

RISC

RISC, taşıdığı rehber çift zincirli RNA parçası ile hedef mRNA'nın tam anlamıyla eşleştiği durumlarda, mRNA'nın fosfodiester omurgasını keserek 3'-hidroksil ve 5'-fosfat terminallerini bırakan iki değerlikli metal iyonuna bağımlı bir enzimdir [96]. siRNA ve miRNA aracılı gen düzenlemesinde önemli rolü olan RISC büyüme, gelişme ve metabolik bozukluklar gibi süreçleri de etkilemektedir [97]. RISC kompleksinin çekirdeğinde Argonaute ailesi proteinleri vardır ve küçük RNA'lar bu protein ile birleşerek RISC kompleksi oluştururlar [98]. Argonotlar, hemen hemen tüm ökaryotlarda bulunur ve Argonaute proteinleri, N-terminali, küçük RNA bağlamadan sorumlu olan PAZ alanı, katalitik faaliyetler sağlayan Orta ve PIWI alanlarına sahiptir [99]. Diziyeye özgü mRNA bölünmesi veya translasyonel baskı yoluyla ökaryotik gen ekspresyonunun değiştirilmesinde RISC kompleksi görev alır ve kompleksin çekirdeğinde yer alan Ago proteinleri de siRNA'ların rehber dizisinin seçimine, tamamlayıcı mRNA'ların hedeflenmesine ve bölünmesine yardım eder [100]. siRNA veya miRNA'ların iki zincirini içerirken RISC aktif değilken, tek zincirleri çıkmış hedef mRNA için rehber dizileri kalmış siRNA veya miRNA var iken RISC kompleksi aktiftir [101].

miRNA

MikroRNA (miRNA)'lar ilk Rosalind Lee tarafından *Caenorhabditis elegans*'ta tanımlanmış ve gen ekspresyonunu düzenleyen ve endojen kaynaklı protein kodlayan RNA'ların bir ailesidir [102]. Birçok hücresel süreci ve gelişim yolunu

etkileyen mikroRNA'ların Rnase III enzimi olan DROSHA ve DICER enzimleri tarafında sırasıyla çekirdekte ve sitoplazmada biyogenez süreçleri gerçekleştirilir [103]. Sonrasında, hedef genleri susturmak için 22 baz uzunluğunda olan miRNA/miRNA dupleksleri AGO proteini ile birleşerek RISC oluşur [104]. Genomdaki genlerin üçte birini düzenleyen 2000'den fazla miRNA insanda bulunmuş ve miRNA'lar hastalıklarla ilişkili oldukları için terapötik hedef olmuşlardır [105]. miRNA, translasyonel baskılama ve mRNA bozunması yoluyla gen susturulması şeklinde genleri düzenler ve gen susturma işlemi de argonaut proteini ve kılavuz iplikten oluşan miRISC tarafından gerçekleştirilir [106]. Ayrıca mikroRNA'ların farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücrel süreçleri düzenlediği bilinmektedir [107].

siRNA

Küçük interferans yapan RNA, mRNA veya plazmit DNA gibi genetik ilaçlar, hastalık etkeni olabilecek genleri susturarak, terapötik proteinleri eksprese ederek veya gen düzenleme metodları ile potansiyel gen terapileridir [108]. Bunlar arasından RNAi mekanizmasının bir bileşeni olan siRNA, hedef mRNA ile eşleşerek gen ekspresyonu susturabilme özelliğine sahiptir [109]. Bu özellik de siRNA'nın genetik temelli hastalıkların tedavisinde kullanılabilir bir terapötik araç olmasını sağlar. Özellikle bir ya da birkaç genin fazla eksprese olmasıyla ortaya çıkan kanser hastalığının tedavisinde etkili bir silah olarak kullanılabilir. siRNA'nın sentetik olarak üretilmesi de hedefe yönelik tedavi için önemli bir araç olmasını sağlamaktadır. Tümör bölgesinde fazla eksprese olan ya da eksprese olduğu için kanser oluşumunu tetikleyen gene özgü sentezlenen siRNA ile gen ekspresyonu susturulur ve tümör gelişimi baskılanabilir. Ayrıca, siRNA yalnızca tedavi aracı olarak değil bir gen ekspresyonunu baskılayarak o genin işlevini araştırmada kullanılabilir. siRNA tasarımının ilk aşaması, siRNA'nın rehber görevinde olmasından dolayı, hedef geni değerlendirerek başlar ve uzunluk, nükleotid içeriği ve özgüllüğün belirlenmesi ile de en işlevsel siRNA üretimi gerçekleştirilir [110]. Terapötik araç olarak siRNA'nın kullanımı oldukça etkili olabilir ancak hücre içine alınmasındaki yetersizliği ve hedef dışı yerleri etkilemesi gibi hücre dışında yaşanan zorluklarla beraber endozomal yıkım ile karşılaşması ve taşıyıcıdan salınması gibi hücre içinde yaşanan zorluklarla da karşı karşıyadır [13]. Dolayısıyla, siRNA terapötik araç olarak canlı vücuduna uygulanır ancak çıplak siRNA'ların büyük boyutu ve negatif yükü, plazma zarı boyunca difüzyonlarını

engeller, hücre içi birikimi önler ve ayrıca serum ve dokularda enzimler tarafından bozulmaya karşı oldukça hassas olduğu için yarılanma ömrü oldukça kısadır [111]. Dolayısıyla, siRNA, virüslerin neden olduğu kanserler, hepatitler, genlerin hatalı çalışması ve düzensiz ekspresyon nedeniyle metabolik ve genetik bozukluklar için terapötik bir araç olarak kullanılabilmesi için kimyasal modifikasyonlar ile termodinamik stabilitenin ve nükleaz aktivitesine direncin geliştirilmesi gerekmektedir [112]. Kimyasal modifikasyonlara örnek olarak riboz modifikasyonlar, fosfat omurga modifikasyonları ve eşlenik gruplarında değişiklik verilebilir [112]. Ayrıca, siRNA'lerden istenilen oranda verim alabilmek, stabilitesini korumak ve hedefe ulaşabilmesi için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır. siRNA'nın canlı vücuduna verilirken taşıma aracı olarak negatif yüklü nükleik asitlerle kompleksleşmeyi ve endositozu teşvik eden dış hücre zarlarına bağlanmayı kolaylaştırdığı için pozitif yüklü olan polimerik taşıyıcılar tercih edilmektedir [113].

2.2.1.3 RNAi Terapötiklerin Uygulama Alanları

Diziye özgü transkripsiyon sonrası genin susturulmasına neden olan RNAi mekanizması gen fonksiyonunu analiz etmek için hızlı ve uygun bir yöntem sağlamaktadır [114]. Dolayısıyla patolojiye sebep olan genlerin susturulmasına yönelik çalışmalar da kronik viral enfeksiyonlar için tedavi yöntemi olarak ilgi görmektedir [115]. Yapılan bir çalışmada RNAi teknolojisi ile nörotoksik bir proteinin üretimi engellenmiş ve nörotoksik proteinlerin neden olduğu dejeneratif nörolojik hastalıkların tedavisi için de terapötik bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür [116]. Otoimmün hepatit modelinde fareleri karaciğer yetmezliği ve fibrozisten korumak için hedef olan Fas geninin, siRNA ile hedeflenmesi sonucunda Fas ekspresyonunun susturularak karaciğer hasarının önlenmesi şeklinde terapötik bir vaatte bulunulmuştur [117]. RNAi mekanizması, kanser gen terapisi için yaygın olarak kullanılmakta ve örnek olarak da kronik miyeloid lösemi hastalığının tedavisi için BCL-2'nin, katı tümörlerde VEGF'in ve karaciğer tümöründe PLK1'in siRNA ile hedeflendirilmesi çalışmaları verilebilir [118].

2.3 İNTEGRİNLER

Transmembran α - β heterodimerleri olan integrinler, hücre dışı matris ligandlarını ve hücre yüzeyi ligandlarını tanıyan hücre yapışma reseptörlerinin bir süper ailesidir [16]. İntegrinlerin tüm α ve β alt birimleri, elipsoidal bir kafa oluşturan büyük küresel NH₂

terminal hücre dışı alanlarına, ince bir transmembran alanı ve $\beta 4$ integrini hariç hepsi 60 amino asitten daha az olan nispeten küçük bir sitoplazmik kuyruk içerirler [119]. Hücre dışı ligandların, integrinin hücre dışı alanlarıyla ve hücre içi sinyalleşme ve hücre iskeleti proteinlerinin de integrinin sitoplazmik kuyrukları tarafından bağlanması şeklinde ilerleyen süreç sayesinde integrinler, biyokimyasal sinyalleri ve mekanik kuvveti plazma zarı boyunca çift yönlü olarak iletir [120]. Büyük bir hücre dışı alana, bir transmembran alanına ve genellikle küçük bir sitoplazmik kuyruğa sahip olan 18 α alt birimi ve 8 β alt birimi ile integrinler farklı bağlanma özelliklerine, doku dağılımlarına ve biyolojik fonksiyonlarına sahip 24 farklı integrini bir araya getirirler [121]. İki transmembran alanı yakından etkileşime girerek bükülmüş bir formda olduğunda integrinler inaktif iken transmembran parçaları arasında daha az etkileşim ile düz bir konformasyonda olduğunda ise aktif formdadır [122]. Kümelenmiş ve aktif olan integrinler, kinazları ve sinyal adaptörünü dahil edip aktivasyonlarını sağlayarak, hücre göçü, hücre sağkalım ve hücre çoğalması gibi önemli yolların sinyallerini düzenler [123]. İntegrin heterodimerleri arasında önemli ölçüde fonksiyonel örtüşme gösterse de fareler üzerinde yapılan araştırmalara göre çok sayıda integrinin benzersiz işlevi destekledikleri belirtilmiştir [124]. İntegrin ligandları, büyüme faktörleri, sitokinler ve matris parçalayıcı gibi diğer proteinleri de bağladıkları için integrinleri sınıflandırmak zor iken fibronektin içindeki minimal hücre yapışma bölgesinin RGDS dizisine eşlenmesi ile ve hücre yapışmasını bloke eden antikorlardan yararlanarak integrinler başarılı bir şekilde sınıflandırılabilir [125]. İntegrinlerin matrisi yeniden şekillendirebildiği ve tümör hücrelerinin istilasını kolaylaştırdığı bilinmekte ve metastaz için gerekli olan sinyal yollarını da reseptör tirozin kinazlarla birleşerek aktifleştirdiği düşünülmektedir [126]. Tümör bölgelerinde fazla eksprese olan ya da baskılanan genler, proteinler öğrenildikçe bu doğrultuda çalışmalar da artmaktadır ve integrinler de kanserli hücrelerde fazla eksprese edildikleri için kanser çalışmalarında hedef olmuşlardır. Dolayısıyla kanser çalışmalarında integrinlerin hedef haline gelmesinde ki en önemli sebepler, katı tümörlerin başlaması, ilerlemesi ve metastazı için çok önemli olan çeşitli hücresel fonksiyonları düzenliyor olduklarının gözlemlenmiş olmasıdır. [18]. Sonuç olarak, integrinler hücre yapışması, gelişim, bağışıklık tepkileri ve hücre için çok önemli olan hücre içi yolları düzenlediği için canlı için önemlidir [127].

2.3.1 İntegrin $\alpha 10$

Beta1 integrin ailesinin bir üyesi olarak karakterize edilen integrin $\alpha 10$, tip II kolajene bağlanır ve kolajen bağlayıcı integrin alt birimleri $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 11$ ile ilişkilidir [128]. İntegrin $\alpha 10$, en çok kıkırdak içeren dokularda ve fibröz dokularda bol bulunan sınırlı bir doku ekspresyon paterni gösterdiği bilinmektedir [129]. Ayrıca integrin $\alpha 10$, kemik gelişiminden sorumlu olan osteoblastların zengin olduğu alanlarda da bulunurlar ve farelerde integrin $\alpha 10$ 'u silerek yapılan bir çalışma sonucunda uzun kemiklerin büyümesinin normalden daha geç olduğu gözlemlenmiş [130]. Metastaz ve hayatta kalma riski ile ilişkili olan integrin $\alpha 10$ 'u kodlayan ITGA10 geninin ekspresyonu primer tümörlere göre metastatik tümörlerde daha yüksek olduğu da belirtilmiştir [131]. Belirli tümörlerin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı düşünülen integrin $\alpha 10\beta 1$ 'in yüksek dereceli glioma tümör dokusunda ve hastadan türetilen glioblastom hücre hatlarında fazla eksprese edildiği ve glioblastom hücrelerinin canlılığı ve göçünde rol oynadığı gösterilmiştir [17]. Bir çalışmada, çeşitli hücre soylarına farklılaşma kapasitesine sahip olan mezenkimal kök hücrelerin, sahip oldukları integrin $\alpha 10$ seviyesi ile kondrojenik farklılaşma potansiyellerinin doğru orantılı olduğu belirtilmiştir [132].

2.4 NANOTEKNOLOJİ

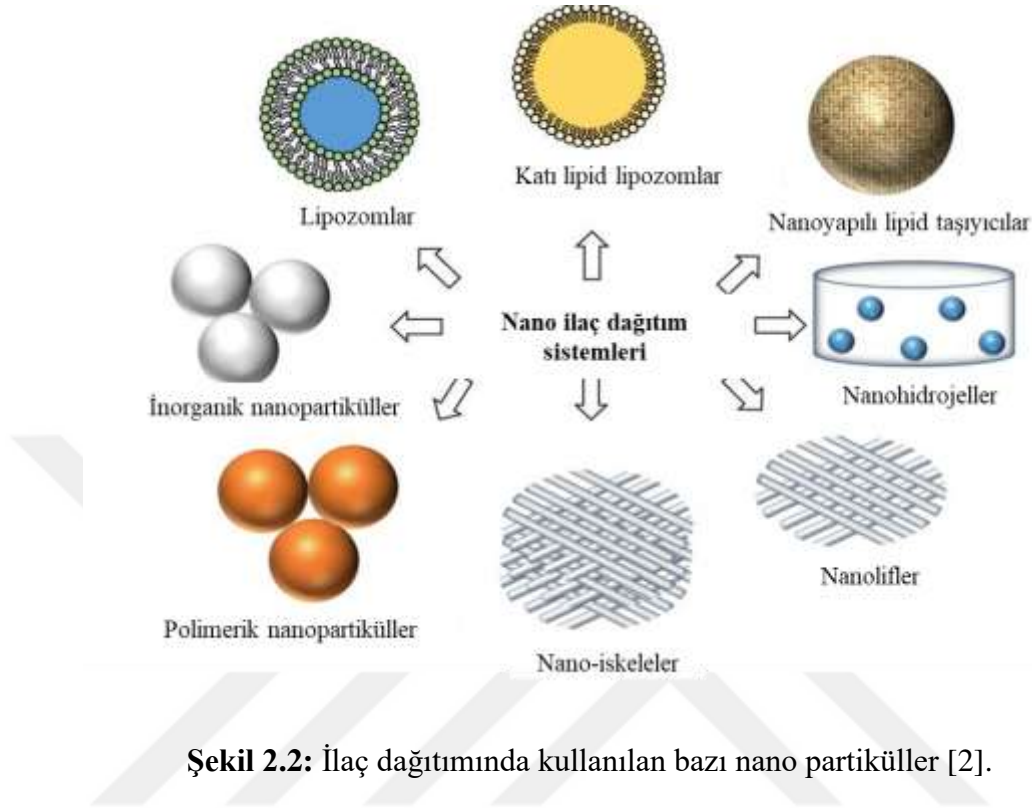
Nanoteknoloji, 1 ile 100 nm arasında değişen nanometre ölçeklerinde yapıların ve moleküllerin incelendiği nanobilimi kullanarak işlevsel hale getirmeye çalışır [133]. Nanoteknoloji, tarım, sulama/su filtrasyonu, gıda işleme ve paketlenme, hayvan yemi ve su ürünleri yetiştiriciliği gibi günlük yaşam için önemli olan birçok alanda kullanımı mevcuttur [134]. Ayrıca, evde hamilelik testlerinde altın nanoparçacıkların kullanımı gibi çeşitli tıbbi testler ve taramalarda nanoteknoloji kullanılmaktadır [135]. Nano ölçekli malzemelerin, yüksek yüzey-hacim oranı, gelişmiş reaktivite, iyi etkinlik sunma, spesifik molekülleri hedefleyebilen fonksiyonel gruplarla işlevselleştirilebilmeleri, fiziksel özelliklerinin kasıtlı olarak ayarlanması ve farklı malzemelerin kombinasyonu şeklinde hazırlanabilmeleri gibi özelliklere sahip olmalarından dolayı nanoteknoloji oldukça önemlidir [136]. Dolayısıyla nano teknoloji, maddeyi nanometre ölçeğinde karakterize eden, manipüle eden ve düzenleyen bir çalışma alanı olarak rafine nanomalzemeler, dağıtım sistemleri ve

hücre izleme sistemleri dahil birçok alanda kullanılır [137]. Nanoteknolojinin en önemli katkısı nanopartiküllerin sağlık alanında kullanımları olmuştur.

2.4.1 Nanopartikül

Nanoteknolojinin gelişimiyle birlikte nanopartiküllerin sağlık alanında özellikle de ilaçların taşınmasında kullanımı önemli bir alan oluşturmuştur. Nanopartiküller, ilaç etken maddelerinden büyük olduğu için ilaç etken maddelerinin taşınmasında oldukça önemli bir yere sahiptirler. Amaca yönelik olarak istenilen malzemede ve istenilen boyutta hazırlanabiliyor olması avantajlı bir kullanım sunmaktadır. Ayrıca malzemenin çeşidine göre üzerinde de değişiklikler yapılabilmesi özelleştirilme açısından da faydalıdır. Nanopartiküller, kullanım amacına, yarılanma ömrüne ve insan sağlığına etkisi gibi bir çok parametreye göre ilk aşamada organik, inorganik olarak daha sonra organik nanopartiküller de lipid bazlı, polimer bazlı gibi sınıflandırılabilir. Polimer nanopartiküller, lipozomlar ve miseller gibi lipid bazlı taşıyıcılar, dendrimerler, karbon nanotüpler ve altın nano partiküller gibi nano taşıyıcılar, hedefe yönelik ilaç dağıtımı, görüntüleme, radyasyon duyarlılaştırıcılar, apoptozun araştırılması ve sentinel lenf düğümü haritalaması gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır [138]. Nanopartiküller farklı maddelerden yapılabildikleri için farklı özelliklere sahip olmalarına rağmen hepsinin sahip olması gerek ortak özellikler vardır. Düşük toksisite, yüksek biyouyumluluk, yüksek güvenlik, biyobozunur, düşük immünojenisite, pozitif yüklü yüzey, yüksek gen transfeksiyon verimliliği, seri üretim ve düşük maliyet insan vücuduna gireceği ve en etkili bir şekilde hedefi hedefe taşıyabilmesi için nanopartikülün sahip olması gereken özelliklerdir [87]. Nanopartiküller bir çok farklı etken maddenin taşınmasında kullanılıyor. Tedavi amaçlı kullanılabilen polifenoller, proteinler ve peptitler gibi bazı biyoaktif maddelerin zayıf çözünürlükleri ve gastrointestinal sistemlerdeki az emilebilirliklerinden dolayı etkili sonuçlar alınamadığı için nanopartiküllerin şekillendirilebilir fizikokimyasal özellikleri ve geliştirilmiş geçirgenlik özellikleriyle ilaç etken maddesi hedeflenen bölgeye etkili bir şekilde taşınır [139]. Ayrıca nanopartiküller, ilacın terapötik etkinliğini artırma ve yan etkileri azaltma gibi özelliklere sahip olmakla birlikte immünolojik temizleme, renal temizleme, enzimatik ve mekanik bozulma, vasküler endotel, hücre dışı matris, hücre zarı, lizozom ve zar pompaları gibi hedefe ulaşmada zorluk çıkartacak engelleri de aşabilmesi için de optimize edilebilir [140]. Daha spesifik ilaç hedefleme ve dağıtımı, terapötik etkilerin

korunması, toksisitede azalma, güvenlik ve biyouyumluluk gibi konulardan dolayı nanopartiküller her geçen gün geliştirilmeye çalışılıyor [141].

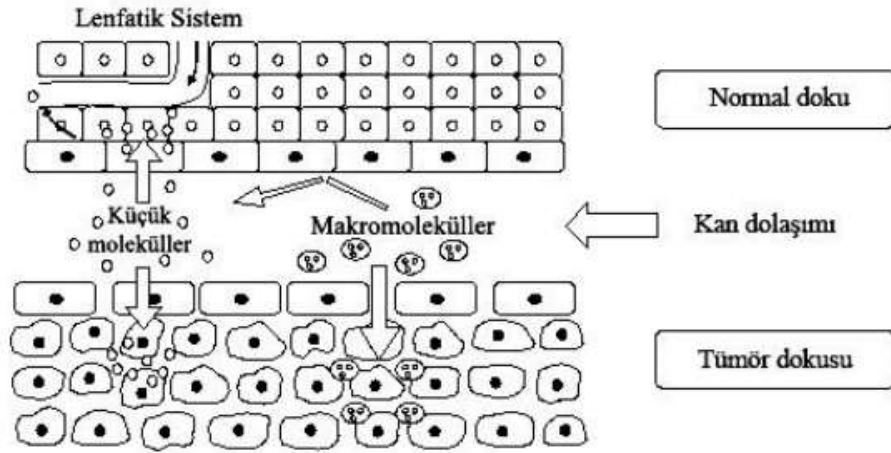


Şekil 2.2: İlaç dağıtımında kullanılan bazı nano partiküller [2].

Nanopartikül ile ilaçların taşınması özellikle kanser çalışmalarında araştırılıyor. Gelişen teknolojiye rağmen kanser tedavisinde bir çok yan etkisine ve sonuçlarının çok da parlak olmamasına rağmen kemoterapi en çok tercih edilen tedavi metodu. Kemoterapi ile uygulanan etken madde yalnızca hedef bölgeyi etkilemediği ve sağlıklı hücrelere de zarar verdiği için insanlara ciddi anlamda zarar veren yan etkileri mevcut. Dolayısıyla ilaç etken maddesinin yalnızca hedefi etkilemesi hem yan etkileri önemli bir miktarda azaltacak hem de direkt tümörlü bölgeye uygulanacak ilaç miktarı tam olarak olması gereken miktarda olacaktır.

Nanopartiküllerin boyutu ilaç etken maddelerinin büyüklüğünden çok daha büyüktür. Dolayısıyla ile bir nanotaşıyıcı içerisine birden fazla ilaç etken maddesi yüklenebilir ve yüklenen ilaç hedeflenmiş bölgeye pasif ve aktif hedefleme olmak üzere iki farklı şekilde taşınabilir. Tümör dokusunun morfolojik yapısı ile normal dokunun morfolojik yapısında farklılıklar olmaktadır. Tümör dokusunda hücreler arasında büyük boşluklar olduğu için nanopartikül içerisinde ilaç etken maddesi oraya daha kolay ulaşabilir. Ayrıca ilaç etken maddeleri çok daha küçük olduğu için sağlıklı dokular arasındaki

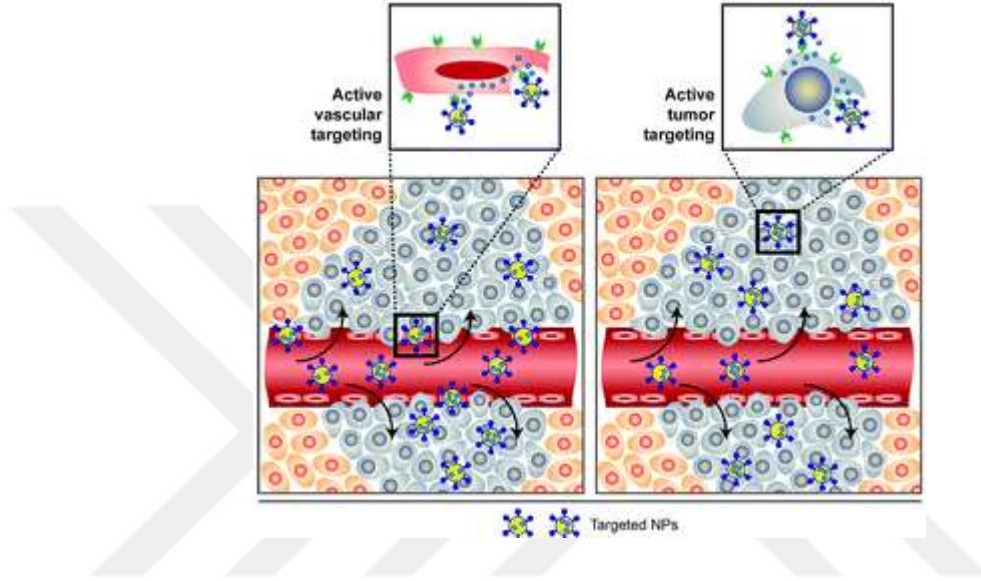
boşluklara da yayılarak sağlıklı hücreleri de etkileyebilir. Bu şekilde, çeşitli büyüklükteki moleküllerin tümör dokusunda, normal dokularda mümkün olmayan şekilde akümüle olmalarına artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi denir ve bu sürecin gerçekleşmesi için nanotaşıyıcının boyutu 10-100 nm arasında olması, renal eliminasyona uğramamak için nötr veya anyonik yükte olması gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir [3]. EPR etkisi tümör oluşumuyla bağlantılı olduğu için bu durumdan yararlanan çalışma alanı sınırlıdır ve bu strateji, interstisyel sıvı basıncı, hızlı büyüyen tümör hücrelerin lenf damarlarını sıkıştırması ve tümör dokusu heterojenliği gibi zorluklarla da karşı karşıya kalmaktadır [142]. Diğer taraftan pasif hedeflemede, taşıyıcı olarak katyonik lipozomlar kullanılırsa, tümör endotel hücrelerinde eksprese edilen negatif yüklü fosfolipid baş gruplar ile aralarında oluşacak elektrostatik çekimden de yararlanır [143]. Pasif hedeflemenin etkili olabilmesi için ilaç dağıtım sistemlerinin uzun süre dolaşımında olması gerekir ve bunun için de taşıyıcı yüzeyinin iyi çözülmüş ve esnek bir ana zincire sahip suda çözünür belirli polimerlerle modifiye edilmesidir [144].



Şekil 2.3: EPR etkisinin mekanizması [3].

Aktif hedefleme ise nanopartikül yüzeyine konjuge olan ligandlar ile hücre yüzeyindeki reseptörlerin etkileşimi sonucunda nanopartiküllerin endositoz ile hücre içine girmesine dayanır [145]. Kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada ilaç taşıyıcı sistem, hedef hücre üzerinde fazla eksprese olan reseptöre bağlanabilmesi için antikolar, peptitler, aptamerler, folik asit ve küçük moleküller gibi çeşitli ligandlar ile konjuge edilir [146]. Ayrıca katı tümör hücreleri, metastatik tümör hücreleri, ilaca dirençli tümör hücreleri ve kanser kök hücreleri tarafından spesifik olarak tanınma ve

içselleştirilebilme, uyarıcı yoluyla terapötikleri verimli bir şekilde serbest bırakabilme ve yüksek ilaç yüklem kapasitesi gibi özellikler ile aktif hedeflenmiş polimerik nanopartiküller ideal taşıyıcılardır [147]. Aktif hedefleme de tümörün hedeflenmesi dışında anjiyogenezin yeni damar sistemi de hedeflenebilmektedir [143]. Böylece, anti anjiyojenik ajan ile tümör damar sisteminin hedeflenerek tümörün beslenmesini engellenecektir ve endotelin hedeflenmesi anjiyojenik, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda tedavi yöntemi olmuştur [148].



Şekil 2.4: Aktif hedeflendirme [4].

2.4.2 Lipozomlar

Genellikle 100-500 nm çapında olan lipozomlar, polar fosfat baş grubu ve hidrofobik lipid kuyruklarına sahiptir ve sulu ortamlarda, hidrofobik kuyruklar kendi kendine birleşerek çekirdeğinde su olan lipofilik çift katmanlı bir zarla çevrili küresel yapı meydana gelir [149]. Nanopartiküllerin en önemli özelliği olan modifikasyonlara uğrayabilme lipozomlar için de geçerlidir. Terapötik bir taşıyıcı olarak işlevsellik kazanmak için moleküllerin dışarıya bağlanması veya moleküllerin ya sulu çekirdekte ya da lipid çift katmanlarına yani moleküllerin içeriye bağlanması sağlanabilir [150]. Lipozomlar, önemli fizikokimyasal, iyi biyouyumluluk ve biyobozunurluk, düşük toksisite, ilaç hedefli dağıtım ve kontrollü ilaç salınımı gibi özelliklere sahiptir [151]. Hazırlama yöntemine bağlı olarak çok katmanlı veziküller, küçük tek lamelli veziküller ve büyük tek lamelli veziküller olmak üzere sınıflandırılabilirler [152]. Lipozomların, aşı taşıyıcısı, tıbbi görüntüleme, kozmetik alanı ve ilaç taşıyıcısı gibi bir çok biyomedikal alanında kullanımları mevcuttur [153].

2.4.3 Dendrimerler

Bir merkezden yüzeye doğru anyonik, nötr ve katyonik dallarıyla karakterize edilen simetrik, küresel, mono-dağılmış ve homojen nanometrik moleküllerdir [154]. Çekirdek, tekrarlayan moleküler birimlerden oluşan iç katmanlar ve yüzeydeki terminal gruplar olmak üzere üç bileşenden oluşan dendrimerlerin terminal grupları ve boyutları amaca yönelik olarak sentez sırasında kontrol edilir [155]. Dendrimerler, hücre zarlarına kolayca nüfuz eder, onlarla kompleks oluşturan her şeyin hücresel alımını arttırdığı için iyi absorpsiyon ve biyoyararlanım özellikleri vardır ama modifikasyonlarla düzenlemesi gereken de sitotoksiteleri mevcuttur [156]. Ayrıca, dendrimer boyutuna, terminal ve çekirdek bölümlerine, konsantrasyona, sıcaklığa, pH gibi özelliklere bağlı olarak iyi bir taşıyıcı olması için çözünürlük, kontrollü salım, hedeflenen dağıtım ve biyoaktiflerin korunması özellikleri artırılabilir [157]. Dolayısıyla, boyutları, küresel şekilleri, kontrollü katman yapısı, çoklu yüzey işlevleri ile terapötikler ve diğer biyoaktif ajanların teslimi ve hedeflendirilebilir ilaç molekülü taşıma, gen transfeksiyonu, teşhis, görüntüleme araçları ve biyosensörler gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılır [158].

2.4.4 Miseller

Amfifilik blok kopolimerlerin, kritik misel konsantrasyonu üzerinde belirli çözücülerde kendi kendine bir araya gelmesiyle oluşturulan nanoparçacıklara miseller denir ve gıda, kozmetik ve tıp gibi farklı alanlarda da kullanımı mevcuttur [159]. Her blokta tekrar eden birimlerin kimyasal yapısı, blok kopolimer konsantrasyonu ve iyonlaşabilir gruplar içeren bloklar için sıcaklık ve iyonik güç gibi çevresel parametreler çözeltideki misellerin boyutunu ve morfolojisini etkiler [160]. Biyolojik olarak uyumlu ve biyo-parçalanabilir olan misellerin içine probler ve kontrast ajanlar dahil edilerek tümör teşhisi, görüntüleme rehberliğinde terapi ve teranositik için de kullanılabilir ve Poli(etilen glikol) (PEG) ile de biyoyumluluğu, stabilizeyi ve gizlilik etkisi artırılır [161]. Ayrıca, düzenli, ters ve tek molekül türleri bulunan miseller, ilaç dağıtımı için küçük boyut, daha az toksisite, ilacı çözündürme ve hedeflenebilirlik gibi özelliklerinden dolayı tercih edilebilmekte ama kırılabilir yapılarından dolayı uzun dolaşım ve sürekli salımlı olmaları zordur [162].

2.4.5 Karbon nanotüpler

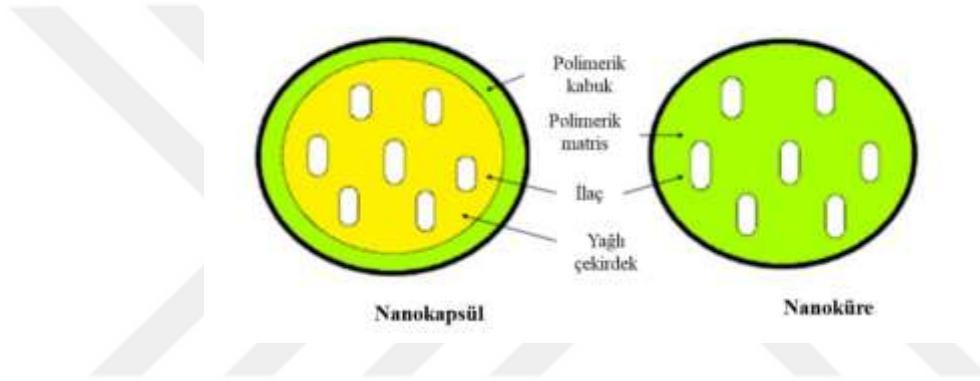
Silindire sarılmış grafit tabakasından oluşan karbon nanotüp, grafen silindirlerinin düzenlenmesindeki farklılık ile tek duvarlı karbon nanotüp ve çok duvarlı karbon nanotüp ile ikiye ayrılır [163]. Suda çözünür olan karbon nanotüpler, mononükleer fagosit sistem organlarına tutulmadığı ve renal atılım ile sistemik dolaşımdan temizlendiği bilinmektedir [164]. Yüksek kargo yüklemesi taşıma yetenekleri, içsel stabiliteleri ve dolaşımı uzatabilecek yapısal esneklik gibi özellikleri ile tek duvarlı karbon nanotüpler ilaç dağıtım sistemi olarak geliştirilebilmekte [165]. Ayrıca karbon nanotüpler, yüksek iletkenlik, elastikiyet, düşük ağırlık, güçlü, sert malzeme olması ve nano boyutlu çekirdekleri ve geniş yüzey alanları nedeniyle biyomoleküllerle konjuge olabilmek özellikleri de mevcuttur [166]. Karbon nanotüplerin yüzeyinde yapılan değişiklikler ile hidrofiliteleri ve hücre zarı ile etkileşimleri değişir ve sulu çözeltideki çözünürlüklerinin artmasıyla da sitoplazmaya geçişleri de kolaylaşır [167]. Sentez özelliklerine bağlı olarak karbon nanotüplerin toksik etkisinde de değişiklikler gözlemlenmektedir [168].

2.4.6 Metalik nanopartiküller

Toksik olmayan biyolojik materyallerin kullanımı, kullanılan malzemeye ve miktarına bağlı olarak nanopartikül özelliğinin değiştirilebilmesi ve nanopartikülü sentezlemek için gerekli olan bileşenlerin kolay bulunması ve çeşitli olması da doğal olarak sentezlenen metalik nanopartiküllerin avantajlarıdır [169]. Biyolojik sentez ile üretilen metalik nanopartiküllerin, malzeme bilimi, fizik, elektronik, sensör teknolojisi, hastalık teşhisi ve ilaç dağıtım sistemleri gibi çok çeşitli alanlarda kullanımı vardır [170]. Metalik nanopartiküller arasında yaygın olarak kullanılan gümüş, altın ve çinko gibi metallerin önemli düzeyde antibakteriyel aktiviteleri vardır [171]. Metalik nanopartiküllerin önemli bir bileşeni bitki özleridir ve bitki özleri kullanılarak sentezlenen metalik nanopartiküller, gelişmiş tümör spesifikliğı ve nispeten az toksik etkilere sahiptir [172]. Tümör hücrelerinin, sıcaklık ile apoptoza götürülebildiğı bilinmekte ve metal kombinasyonlarıyla manyetik nanopartiküller elde edilerek kanser hücrelerinin doğrudan öldürülmesine yol açan manyetik alan altında ısıtılabilirler [173].

2.4.7 Polimerik nano taşıyıcılar

Emülsifikasyon, nanoçökeltme, iyonik jelyasyon ve mikroakışkanlar gibi çeşitli teknikler ile monomerlerden veya önceden oluşturulmuş polimerlerden sentezlenen polimerik nanopartiküller, çok çeşitli yapı ve özellikleriyle biyolojik olarak parçalanabilir, biyouyumlu, depolama sırasında kararlı olmaları ve yüzeylerinde amaca yönelik değişiklik yapılabilme gibi özellikleriyle ilaç dağıtımı için tercih edilen materyallerdir [174]. Polimerleri doğal ve sentetik olarak sınıflandırdığımız zaman heparin, albümin, kitosan ve jelatin doğal polimerler grubunda; polietilen glikol, poli-L-glutamik asit, poli (laktik-ko-glikolik asit), poli (sebasik asit) ve poli (akrilik asit) sentetik polimerler grubundadırlar [5].

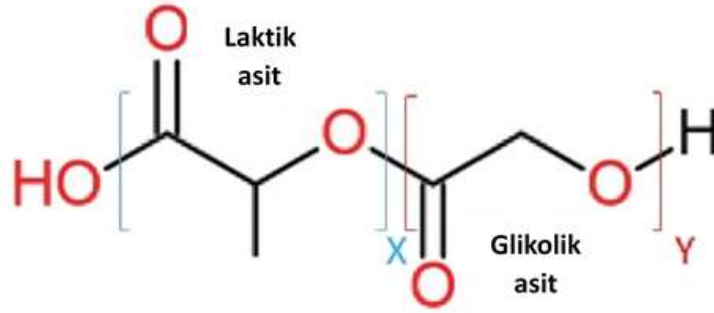


Şekil 2.5: Polimerik nanopartiküller [5].

Solvent buharlaşması, emülsifikasyon/çözücü difüzyonu, nano çökeltme ve emülsifikasyon/ters tuzlama gibi yöntemler ile yapılan polimer nanokapsüller polimerik bir kabuk ile çevrili, ilacın genellikle çözüldüğü yağlı bir çekirdekten oluşurken, nano çökeltme yöntemi ile yapılan pozitif nanoküreler ise ilacın içinde tutulabildiği veya yüzeylerine adsorbe edilebildiği sürekli bir polimerik ağ üzerine dayanmaktadır [175]. Polimerik nanopartiküller, uzun süre dolaşımında kalma, sürekli sistemik dağıtım ve hem pasif hem de aktif mekanizmalar yoluyla daha iyi hedefleme özellikleriyle klinik açısında avantajlıdır [176]. Ayrıca, biyobozunur olan polimerik parçalar, doku mühendisliği, ortopedik cihazlar, kardiyovasküler uygulamalar ve aşı uygulaması gibi çeşitli alanlarda da kullanılmaktadır [177].

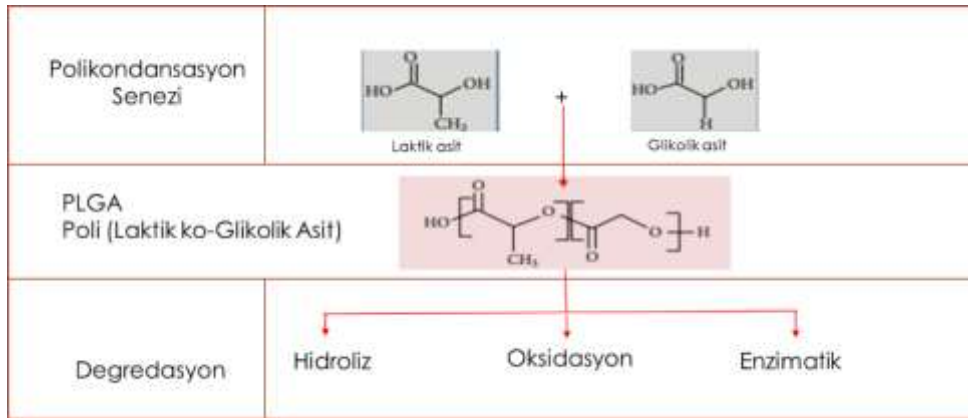
2.4.7.1 Poli laktik ko glikolik asit (PLGA) nanopartikül

PLGA, amaca yönelik olarak oranları optimize edilen poli (laktik asit) ve poli (glikolik asit)'in polimerleşmesiyle elde edilen sentetik termoplastik alifatik biyoyumlu polyesterdir [178].



Şekil 2.6: PLGA polimerinin yapısı [6].

FDA tarafından insanlar üzerinde kullanım izni olan PLGA, proteinler, peptitler, genler, aşilar, antijenler ve insan büyüme faktörleri gibi birçok ajanı taşıyabilir, biyoyumlu, biyolojik olarak bozunabilir ve toksik etkisi de oldukça düşüktür [179]. Ayrıca, hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçları kapsülleme yeteneğine sahip olduğu için PLGA çok tercih edilen nanotaşıyıcı bir sistemdir [180].



Şekil 2.7: PLGA'nın sentezi ve degradasyonu [7].

PLGA nanopartikülü taşıyıcı olarak vücutta kullanıldığı zaman taşıdığı ürünü hedefe ulaştırdıktan sonra hidrolize olabilir ve ortaya çıkacak ürünler de glikolik asit ve laktik asit olduğu için krebs döngüsüne katılarak metabolize edilirler [181]. Dolayısıyla bu özelliği ile de canlı için herhangi bir toksik etkisi olmaz. İstenilen boyutta ürün üretme ve ilaç veya aşı bileşenlerinin işlevlerini kaybetmeden güvenli

bir şekilde dahil etme yeteneği ile daha çok çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilmesine rağmen emülsifikasyon, solvent buharlaştırma ve organik faz ayırma gibi çeşitli teknikler ile PLGA partikülleri hazırlanabilir [182]. Bu özelliklerinden dolayı birçok çalışmada tercih edilmektedir. PLGA mikro ve nano partikülleri, diyabet, kanser, kalp rahatsızlığı, viral enfeksiyon, otoimmün hastalıklar ve kıkırdak hasarı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde önemli taşıyıcı sistem olabileceğini gösteren çalışmalar vardır [183]. Yapılan bir çalışmada da antikanser ajanların PLGA nanopartikülleri ile glioma dokusuna etkili bir şekilde taşındığı belirtilmiştir [184].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın deneysel aşamalarının nanopartikül üretim çalışmaları Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Farmasötik Biyoteknoloji laboratuvarı ve hücre kültürü çalışmaları da Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında 29.09.2021 – 16.06.2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.1 GEREÇ

3.1.1 Cihazlar

Tez aşaması boyunca kullanılan cihazların bilgileri aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazların listesi.

| Cihaz Adı | Cihaz Firması | Kullanım Amacı |
|-----------------------------------|---------------|--|
| Derin dondurucu (-20°C, -80°C) | Uğur, Haier | Hücre hatlarının ve çeşitli çözeltilerin uzun süre saklanması için kullanılmıştır. |
| Buzdolabı (+4°C) | Beko | Örnekler, tampon ve sok çözeltilerin saklanması için kullanılmıştır. |
| Buz makinesi | Scotsman | Soğuk koşullar gereken çalışmalarda buz elde edilmesinde kullanılmıştır. |
| Santrifüj | Hettich | Yüksek hızda ayrıştırma gerektiren tüm çalışmalarda kullanılmıştır. |

Tablo 3.1 (devam) : Kullanılan cihazların listesi.

| | | |
|--|--------------------------|--|
| Otoklav | Nüve | Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmıştır. |
| Distile su cihazı | Sartorius Stedim Biotech | Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. |
| Floresan mikroskop | Zeiss | Hücrelerin görüntülenmesinde kullanılmıştır. |
| Etüv | Nüve | Bazı cam tüplerin ve otoklav sonrası malzemelerin kurutulmasında kullanılmıştır. |
| Karbondioksitli etüv | Nüve EC 160 | Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. |
| Laminar flow kabin | Nüve MN090/120 | Deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. |
| Otomatik pipetler | Thermo, Eppendorf | Tüm moleküler çalışmalarda kullanılmıştır. |
| Mikropipet ucu (1, 200, 1000 µl) | Neptune | Tüm çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır. |
| Spektrofotometre – polistiren küvetler | ISOLAB | Nanopartikül ölçümünde kullanılmıştır. |
| PCR Cihazı | Bio-Rad | cDNA sentezi için kullanılmıştır. |

Tablo 3.1(devam) : Kullanılan cihazların listesi.

| | | |
|--|---------------------------------------|--|
| Soğutmalı Santrifüj Cihazı | Nüve NF1200 | RNA izolasyonu aşamalarında kullanılmıştır. |
| Isıtıcı Blok | Denville Scientific | Örneklerin hazırlanmasında kullanılmıştır. |
| Vorteks | Stuart | Küçük hacimdeki solüsyon ve mixleri homojen hale getirmede kullanılmıştır. |
| pH metre | Hanna Instruments | Çözeltilerin pH ayarlanmasında kullanılmıştır. |
| Çeker ocak | Vortice | Çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır. |
| Sıcak su banyosu | Nüve BM 30 | Çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır. |
| Ultrasonikaör | Bandelin Sonorex | Çözeltilerin homojenizasyonunda kullanılmıştır. |
| Şırınga (2.5-5 ml) | Biotech | Nanopartikül oluşumunda kullanılmıştır. |
| Multiskan™ GO Mikroplaka Spektrofotometre cihazı | Thermo Scientific | Protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanılmıştır. |
| 4'lü Dikey jel elektroforez tankı | Biorad Life Sciences Research, ABD | Jele yüklenen proteinlerin yürümesi için kullanılmıştır. |

Tablo 3.1 (devam) : Kullanılan cihazların listesi.

| | | |
|---|--|--|
| Güç kaynağı | Biorad Life Sciences Research, ABD | Elektroforez cihazının çalışması için kullanılmıştır. |
| Filtre kağıtları ve PVDF membran | Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, 68 Amerika | Protein bantlarının jelden transferi için kullanılmıştır. |
| Trans-blot turbo transfer sistemi | Biorad Life Sciences Research, Kaliforniya, Amerika | Jel üzerindeki proteinlerin PVDF membrana aktarılması için kullanılmıştır. |
| Çalkalayıcı/karıştırıcı | BioRocker™ 2D Rockers ; Denville Scientific Inc., ABD | Membranların yıkanması ve çözelti içinde bekletilmesi için kullanılmıştır. |
| Mikro santrifüj | Micrefuge ® 20R Centrifuge, Beckman coulter | Ependorflarda olan çözeltilerin santrifüjü için kullanılmıştır. |
| ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) | VARIOSKAN FLASH, Thermo scientific | siRNA miktarlarının ölçümünde kullanılmıştır. |
| Hassas tartı | Precisa | Kimyasal maddelerin miktarlarını ölçmede kullanılmıştır. |

3.1.2 Kimyasallar ve Kitler

Tez aşamasında deneysel süreçlerde kullanılan kimyasallar ve kitler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.2: Kullanılan kit, kimyasal listesi.

| Kimyasal adı, Kit | Marka | Kullanım Amacı |
|--|--|--|
| PBS (Fosfat tamponlu tuz) | Gibco-Invitogen, USA, Lot # 20031084R | Hücre kültüründe yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır. |
| Fetal Sığır Serum (FBS) | Gibco-Invitogen, USA, Lot # 10500 | Hücre kültüründe besleyici serum olarak kullanılmıştır. |
| Tween 80 | Sigma-Aldrich, p1754-1L, Lot:BCBZ9052 | Nanopartikül oluşumunda sürfaktan olarak kullanılmıştır. |
| Diethyl pyrocarbonate (DEPC) | Sigma #159220 | RNase-içermeyen su hazırlamakta kullanılmıştır. |
| Tris bazı | T1503-sigma, Lot #SLBN7135V | Bufferların hazırlanmasında kullanılmıştır. |
| Hidroklorik asit (HCl) | Sigma-Aldrich | Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır. |
| Sodyum hidroksit | Sigma-Aldrich | Tampon çözeltilerin pH ayarlamalarında kullanılmıştır. |
| PLGA;”Poly(lactic-co-glycolic acid)” (50:50), mol wt 30,000-60,000 | Sigma-Aldrich USA p2191-5G, Lot # MKCJ9489 | Nanopartikül hazırlanmasında kullanılmıştır. |
| DMSO (Dimethyl sufoxide) | Merck, Darmstadt, Almanya | Hücre kültüründe pasajlamada kullanılmıştır. |
| DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium) | Gibco Waltham, Massachusetts, ABD | Hücre kültüründe kullanılmıştır. |

Tablo 3.2 (devam): Kullanılan kit, kimyasal listesi.

| | | |
|--------------------------------------|---|--|
| Blastaq 2X qPCR MasterMix | Abm, | cDNA senetinde kullanılmıştır. |
| Human itga10 (esirna1) | Sigma-Aldrich, Lot #PYW | İntehrin α 10 proteinin baskılanması için kullanılmıştır. |
| ITGAX Rabbit pAb | ABclonal, Lot #3561170007 | Western deneylerinde protein tayini için kullanılmıştır. |
| BCA Protein Test Kiti | Thermo Fisher Scientific, ABD | Protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılmıştır. |
| 4X Laemmli tampon solüsyonu | Biorad Life Sciences Research, ABD | Örneklerin kuyuya düzgün yürümesi için kullanılır. |
| Prestained protein ladder | Thermo Scientific, Product# 26619, Lot #00146407 | Protein bantlarının |
| %5 Yağsız süt tozu | Sigma 70166 | Membrana aktarılan proteinlerin bloklanması için kullanılmıştır. |
| Luminol substrat | K-12045-C20; Advansta-WesternBright ECL HRP Substrate, San Francisco, ABD | Membran görüntülerinin alınması için kullanılmıştır. |
| BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye | Abm, Cat# MasterMix-S-XL | qPCR için kullanılmıştır. |
| 2-propanol | J.T.Baker | RNA izolasyonu için kullanılmıştır. |
| Chloroform One step RNA reagent | Biobasic, Lot: N116DROJ | Hücre pelletlerinden RNA izolasyonu yapmak için kullanılmıştır. |

Tablo 3.2 (devam): Kullanılan kit, kimyasal listesi.

| | | |
|----------------------------------|---|---|
| RNase içermeyen su | Germany, Lot No: 154038017 | RNA çalışmalarında kullanılmıştır. |
| cDNA kiti | Abm One Script RT cDNA synthesis kit, #6214 | cDNA sentezi için kullanılmıştır. |
| Aseton | İsolab, Lot no: LRO183307ALQ | PLGA'nın çözülmesi için kullanılmıştır. |
| RIPA lizis buffer (10X) | Lot : 2557620 | Hücre pelletlerinden protein ekstrakte etmek için kullanılmıştır. |
| Proteaz inhibitör kokteyl | Millipore, Lot:DAM1770354 | Protein ekstrakte ederken proteinlerin zarar görmemesi için kullanılmıştır. |
| Western Bright™ Sirius | Advansta, USA, Lot: 140728-63 | Proteinlerin görüntülenmesi için kullanılmıştır. |
| Western Bright™ Peroxide | Advansta, USA, Lot: 140815-05 | Proteinlerin görüntülenmesi için kullanılmıştır. |
| Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Reagent | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific | Nanopartikül içerisindeki RNA miktarını ölçmede kullanılmıştır. |

3.1.3 Tampon ve çözeltiler

3.1.3.1 Büyütme medyumları

%10 FBS besiyeri

%10 FBS (Fetal bovine serum), %89 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (4.5 g/L glukoz) %1 Penisilin/Streptomisin kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri kullanılmadığı süreçlerde buzdolabında (+4°C) bekletildi.

3.1.3.2 Nanopartikül sentezinde kullanılan çözeltiler

RNase-içermeyen su

2 litre distile su içerisine 2 ml Dietil pirokarbonat (DEPC) eklenerek çeker ocak altında 24 saat bekletilmiştir. Hazırlanan %2 (w/v) DEPC - H₂O tüm deneysel çalışmalarda sterilizasyon için kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

Tween 80 çözeltisi

19 ml DEPC su içerisine 1 ml tween 80 eklenip homojenizatörde karıştırılarak stok çözelti hazırlanmıştır.

Tris-EDTA (TE Tampon) stok çözeltisi

0,5 M 1 mL EDTA ve 1 M 5 mL Tris kullanılarak hazırlanır. Hazırlanan çözeltinin üzerine 496 mL DEPC (dietilpirokarbonat) su eklenerek hazırlanmıştır.

3.1.3.3. Western blot deneylerinde kullanılan çözeltiler

1.5 Molar (M) Tris Baz (pH:8.8)

45,35 g Tris baz 250 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımıyla çözdürülür. Çözdürme işleminden sonra pH değeri 1 milimolar(mM) HCl ile 8.8'e ayarlanır.

0.5 Molar (M) Tris Baz (pH:6.8)

15,175 g Tris baz 250 ml distile su içerisinde karıştırıcı yardımıyla çözdürülür. Çözdürme işleminden sonra pH değeri 1 milimolar(mM) HCl ile 6.8'e ayarlanır.

5X Yükleme tamponu

10 ml loading buffer hazırlandı; 5 ml %87 gliserol, 2.5 ml 1M Tris (pH:9) ve 1 ml SDS (%20) karıştırıldı ve son olarak spatula ucuyla bromophenol blue eklendi. Daha sonra kullanımı kolaylaştırmak için 1.5 ml'lik ependorflara aliquatlandı.

10X Yürütme tamponu (pH:8.8)

500 ml hazırlandı; 15.14 g Tris baz (final konsantrasyonu 0.25 M), 72.05 g glisin (final konsantrasyonu 1,92 M) 500 ml distile su içerisinde magnetik karıştırıcı ile çözüldü. Son olarak 5 g SDS de eklendi ve karıştırıldı.

10X Transfer Tamponu (pH:8.3)

500 ml hazırlandı; 15.14 g Tris baz (final konsantrasyonu 0.25 M), 72.05 g glisin (final konsantrasyonu 1,92 M) 500 ml distile su içerisinde magnetik karıştırıcı ile çözüldü.

1X Transfer tamponu

500 ml hazırlandı; 50 ml 10X transfer buffer, 100 ml %20 metanol ve 350 ml distile su eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında %0.05 SDS ekleyip biraz çalkalandı ve 4 °C kaldırıldı.

10X TBS (pH:7.4)

500 ml hazırlandı; 6.055 g tris baz ve 45 g NaCl tartılarak magnetik karıştırıcıda 500 ml distile su içinde çözüldü.Çözdürme işleminden sonra pH değeri 1 milimolar(mM) HCl ile 7.4'e ayarlanır.

1X TBS

Hazırlanan 10X TBS'den 1X hazırlandı. 100 ml 10X TBS ve 900 ml distile karıştırılır.

1X TBS-T (pH:7.4)

50 ml 10X TBS, 450 ml distile su ve 0.5 ml Tween20 karıştırıldı. Toplamada 500 ml hazırlandı.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bu çalışma için tasarlanan nano ilaç taşıyıcı sistemde, laboratuvarımızda en sık kullanılan yöntemde optimizasyon yapılarak rasyonel bir dizayn uygulanmıştır. Organik çözücülerin nükleotid yapılarını bozduğu bilinmektedir. Bunun için laboratuvarımızda kullanılan yöntem modifiye edilmiştir. Bu modifiye yöntem daha önce denenmiş ve yayına dönüştürülmüştür [185]. Bu yöntemde önce nano-taşıyıcı hazırlanmış daha sonra si-RNA bu hazırlanan nano-taşıyıcıya ajitasyon ile yüklenmiştir. PLGA polimerinden nanopartiküllerin üretimi için su içinde yağ içinde su çift emülsiyon (W/O/W) buharlaştırma tekniği kullanılmıştır [186]. 5 ml aseton içerisinde 50 mg PLGA eklenerek ultrasonik banyoda çözülmüştür (yağ fazı). Tween 80 1:20 oranında seyreltilerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok Tween 80 çözeltisinden 1 ml alınarak 19 ml DEPC (0.2 mg/ml) – H₂O'ya eklenmiştir (su fazı). Tween 80 ve DEPC – H₂O karışımı pipetaj yapılarak homojenize edilip ve içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcının üzerine alınmıştır. Hazırlanan PLGA – aseton karışımı karıştırıcının üzerinde bulunan Tween 80 – DEPC – H₂O'ya yaklaşık 20 cm uzaklıktan şiringayla damlatılmıştır. Manyetik karıştırıcının üzerinde gece boyunca bırakılarak aseton buharlaştırılmıştır.

3.2.2 siRNA'nın PLGA nanopartikülerine yüklenmesi

Hazırlanan nanopartikül süspansiyonundan 500 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorfa konulmuş ve 66 µl'si atılmıştır. -20'den alınarak buz üzerinde bekletilen siRNA'dan 66 µl alınarak ependorfa koyulmuştur. siRNA-PLGA nanopartikülü – Tween 80-DEPC-H₂O çözeltisi 10 dk boyunca 30-40 saniye şiddetli vorteks 20-30 saniye buz üzerinde bekletilmiştir. Bu şekilde siRNA'nın PLGA nanopartikülü tarafından enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Temelde W/O/W yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartiküller Zetasizer Nano ZSP cihazıyla *Dynamic Light Scattering* (DLS) metodu kullanılarak boyut ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Lazer ışık saçılımına dayanan ölçümlerde tek kullanımlık disposable küvetler kullanılmıştır. Hazırlanan PLGA nanopartiküllerinden 1 ml küvetlere konularak ölçüm alınmıştır. Yapılan DLS ölçümlerinde nanopartiküllerin boyutu, çapı, yoğunluğu ve PDI sonuçları elde edilmiştir. Nanopartiküllerin mono-dispersity indeksi ve boyutu sayı, hacim ve yoğunluk olarak analiz edilmiştir.

3.2.4 siRNA-PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi (%EE)

İlk olarak PLGA nanopartikülü yapılmıştır. 50 mg PLGA tartılarak 5 ml aseton eklenmiş ve ultrasonik banyoda PLGA'nın çözülmesi sağlanmıştır. 19 ml DEPC'li su ve 1ml Tween 80'den magnetik karıştırıcı üzerinde stok Tween 80 çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok Tween 80 çözeltisinden 1 ml alınarak 19 ml DEPC'li su üzerine eklenmiş ve magnetik karıştırıcının üzerine alınmıştır. 5 ml asetonu çözölen PLGA 2.5 ml'lik şırıngaya çekilerek hazırlanan DEPC'li Tween 80 çözeltisi üzerine damlatılmıştır. Magnetik karıştırıcı üzerinde gece boyu bırakılarak asetonun uçması sağlanmıştır. Aseton uçtuktan sonra PLGA çözeltisinden 3 ml alınmış ve 396 µl'si atılarak 396 µl siRNA eklenmiştir. 10 dakika boyunca buz-vorteks işlemi gerçekleştirilerek siRNA'nın PLGA nanopartiküllerine yükleme işlemi yapılmıştır.

Hazırlanan 3 ml siRNA-PLGA üzerine 3 ml Tris-EDTA (pH:7.4) ilave edilerek karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan hemen sonra 200 µl örnek alınarak 20,000 g 20 dk 4 C°'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant kısım alınarak Quant-iT Ribogreen ile 1:1 oranında karıştırılarak Elisa cihazı ile 500 nm'de ölçüm alınmıştır. Ölçüm sonucunda elde edilen siRNA konsantrasyonunu hesaplamak için standart sapma grafiği kullanılmıştır.

Konsantrasyon eğrisi, Quant-iT Ribogreen eklenerek elde edilen siRNA örneklerinin 1000 ile 0 ng/ml arasındaki farklı konsantrasyon eğrisi kullanılarak süpernatant kısmında bulunan siRNA miktarı ölçülmüştür. 0 ve 1000 ng/ml arasında siRNA örnekleri hazırlanmış ve örneklerden ve Quant-iT Ribogreen'den 1:1 oranında karıştırılmıştır. Elisa cihazı ile 500 nm'de ölçüm alınmış ve standart sapma grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen standart sapma grafiği ile siRNA konsantrasyonları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ile enkapsülasyon verimi(%EE) aşağıda gösterilen denklem kullanılarak da hesaplanmıştır.

$$\% EE = \frac{\text{PLGA içerisinde bulunan siRNA}}{\text{Toplam kullanılan siRNA}} \times 100$$

3.2.5 Hücre Hatları ve Hücre Kültürü

Bu çalışmada glioblastoma hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hattı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarımızda mevcuttur. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde steril ortamda gerçekleştirilmiştir. Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Streptomisin solüsyonu içeren katkılı DMEM (Sigma, Germany) besi yeri içeren steril T75 lik hücre kültür flasklarında 37°C de %5 CO2 ortamında 4-5 gün inkübe edilmiştir. Hücreler konfluent hale geldiğinde, flasklardaki besiyeri 10 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ile değiştirilmiş ve 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmış, oluşan hücre süspansiyonu 50 ml steril falkon tüplere aktarılmış, hücreler üzerine 10 mL taze besiyeri (DMEM yada MEM) eklenerek Tripsin ile nötralize edilmiş ve hücreler 1500xg de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelletine 2 ml taze besiyeri eklenmiş ve steril pastör pipetle süspansiyon haline getirilmiştir. Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan alınan 10 µL hücre 10 µL tripan mavisi solüsyonu ile karıştırılmış, Bu karışımın 10 µL'si Thoma lamına pipetlenerek hücreler mikroskop altında sayılmış ve hücre konsantrasyonu belirlenmiştir. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 ml lik Falkon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu (20-30 hücre/100µL) hazırlanmış. 100 µL hücre süspansiyonundan 96'lık hücre kültür plaklarına pipetlenmiş. Plaklardaki hücreler kontrol ve değişik konsantrasyonlardaki test maddelerinin eklenmesinden sonra 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.2.6 MTT ile Hücre Canlılık Tayini

Nano ilaç taşıyıcı sistemin sitotoksik etkisini göstermek için hücre canlılığını belirlemek için kolorimetrik bir analiz olan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılmıştır. Tüm hücre hatları, 2500-7500 arası değişen yoğunlukta 96 oyuklu plakalara ekilmiş ve hücrelerin adaptasyonunu sağlamak üzere, hücreler % 5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, siRNA yüklü PLGA tedavi grupları ile hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücrelere 10 µl MTT solüsyonu (5 mg / ml) uygulanmış ve 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kuyuya 100 µl DMSO ile muamele ederek karanlıkta 37 °C'de 15 dk inkübe edilmiş ve 570 nm'de "microplate" okuyucusunda (LUMIStarOmega, BMG Labtech, Almanya) ölçülmüştür. Muamele edilmeyen kontrol grubunun canlılığı% 100 olarak kabul edilecek ve tedavi edilen hücrelerin nispi hücre canlılığı (%)= $[100 \times (\text{Sample Abs}) / (\text{Control Abs})]$ bu formüle göre hesaplanmıştır. MTT gibi hücre canlılık testleri 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarında gerçekleştirileceğinden, her bir tedavi dozu 3 farklı kuyucuk kullanılarak test edilmiştir.

3.2.7 Hücre Göçü Deneyi

24 well plate 20 nM siRNA-PLGA uygulancak 3 kuyu ve 3 kuyu da kontrol grubu olacak şekilde kuyulara hücreler ekilmiştir. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak için % 5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki çözelti atılmadan 1000 veya 200 µl'lik pipet ucu ile kuyuların ortasından çizik atılmıştır. Sonrasında eski besiyeri atılarak taze besiyeri eklenmiş ve tedavi gruplarına da siRNA yüklü PLGA eklenmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde alınacak mikroskop görüntülerinin değerlendirilmesi için madde uygulandığı anda da birkaç kuyudan çiziklerin görüntüsü alınmıştır. Plate, 37 °C'de % 5 CO₂ inkübatörüne kaldırılmış ve 24, 48 ve 72. saatlerde 4X büyütmede görüntü alınmış ve sonrasında analiz edilmiştir.

3.2.8 Western Blot

siRNA'lar ile yapılacak integrin $\alpha 10$ 'un susturulmasının etkinliğini ölçebilmek amacıyla protein düzeyinde analiz yapılmıştır. Bunu için de western blot yapılmıştır. Örnek hazırlama, yürütme, transfer ve görüntüleme şeklinde 4 kısımdan oluşan bir süreçtir. İlk aşamada protein örnekleri hazırlanmıştır. Western Blot için önceden

toplanan ve -20 °C'de muhafaza edilen hücre pelletlerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Örneklere proteaz inhibitörleri karışımı ve 1X RIPA'dan oluşan karışım hazırlayıp örneklere uygulanmıştır. Örnekler homojenize edilmiş ve 30 dk buzda bekletilmiştir. Daha sonra 4 °C'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Toplanan süpernatantlar sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılmıştır. Örneklerin protein konsantrasyonları Multiskan™ GO Mikroplaka Spektrofotometre cihazı ve Pierce BCA Protein Test Kiti kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin eşit miktarda protein konsantrasyonları belirlendikten sonra her bir örnek için 20 µg protein örneği, 3.5 µL 4X laemmlı tampon solüsyonu, RIPA ve dH₂O ile 18,5 µl'ye tamamlanmış ve bu şekilde protein karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım 95°C' de 6 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında elektroforez zamanına kadar örnekler +4°C buz üzerinde inkübe edilmiştir. % 14 Bis-Tris Poliakrilamid protein jeli 4'lü dikey jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Protein işaretçisi olarak PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder kullanılmış ve jel içerisine yüklenmiştir. Elektroforez için gerekli tampon solüsyonu eklendikten sonra sonra güç kaynağı kullanılarak proteinlerin ağırlıklarına göre ayrıştırılması sağlanmıştır. Jeller elektroforez sonrasında tanktan alınmış ve kuyuların olduğu kısım kesilmiştir. Proteinleri jelden membrana aktarmak için öncesinde tampon solüsyonu hazırlanmıştır. PVDF membran metanolde Kullanılan filtre kağıtları ve PVDF membran transfer için hazırlanan tampon solüsyonu içerisinde ıslatılmıştır. Trans-blot turbo transfer sistemi kullanılarak jel üzerindeki proteinlerin PVDF membrana aktarılması sağlanmıştır. Membranlar, bloklama çözeltisi olan Tris tamponlu salin (TBS-T) (%0.1 Tween içeren tamponlanmış Tris salin) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilip TBS-T içerisinde 3 kez yıkama yapılmıştır. TBS-T ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu içinde seyreltilen ITGAX Rabbit ve GAPDH primer antikorlarına daldırılarak gece boyunca inkübe edilmiştir. TBS-T ile üç kere yıkandıktan sonra membranlar çalkalayıcı/karıştırıcı üzerinde TBS-T ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu içinde seyreltilmiş peroksidaz-bağlı anti-mouse ve anti-rabbit ikincil antikorlar ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üç defa daha TBS-T ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kemilüminesans algılama reaktifleri içerisinde karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Sonrasında protein görüntülemeleri Fusion FX7 (Vilber Lourmat) sistemine sahip CCD kamera altında luminol substrat ile yapılmıştır.

3.2.9 qPCR

24,48 ve 72. saatlerde kazıma yöntemi ile toplanan hücre pelletlerinden kit kullanmadan “One step RNA reagent” ile RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu işlem için one step RNA reagent ile birlikte kloroform, izopropil alkol, %75 etanol ve RNase-içermeyen su kullanılmıştır. İzolasyon aşamaları tamamlandıktan sonra ölçüm alınmış ve elde edilen RNA'nın temizliği ve konsantrasyonu kontrol edilmiştir. RNA izolasyonundan sonra *Abm one script RT cDNA synthesis* kiti ile cDNA sentezi yapılmıştır. 200 ng RNA'dan cDNA sentezleneceği için işleme RNA konsantrasyon sonuçlarına göre örneklerden kaç mikrolitre alınacağı hesaplanıp kit protokolüne uyulmuş ve son aşamada örnekler PCR cihazında 42 C°'de 30 dk ve 85 C°'de 5 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lardan Real time polimeraz zincir reaksiyon (PCR) cihazında kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (qPCR) gerçekleştirilmiştir. qPCR için çalışılan örneklerde apoptotik genlerin ekspresyon seviyeleri inceleneceği için bax (forward: ATC CAG GAT CGA GCA GGG CG; reverse: GGT TCT GAT CAG TTC CGG CA), bcl-2 (forward: GTT CCC TTT CCT TCC ATC C; reverse: TAG CCA GTC CAG AGG TGA G), cas-3 (forward: TGC CTG TAA CTT GAG AGT AGA TGG; reverse: CTT CAC TTT CTT ACT TGG CGA TGG) ve pten (forward: TCC CAG TCA GAG GCG CTA TG; reverse: CAC AAA CTG AGG ATT GCA AG) primerleri ve *housekeeping* olarak da β -actin (forward: GCG AGA AGA TGA CCC AGA T; reverse: GAG GCG TAC AGG GAT AGC) primerleri kullanılmıştır. *BrightGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye* kiti ile qPCR için örnekler hazırlanmış ve eş zamanlı PCR cihazında 95 C°'de 10 dk inkübe edip, 15 saniye 95 C°'de, 20 saniye 60 C°'de, 40 saniye 72 C°'de 40 döngü aşamasından sonra 5 saniye 65 C° ve 5 saniye 95 C°'de PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR'dan sonra Cq değerlerine göre $2^{\Delta\Delta CT}$ hesaplanmış ve kontrol grupları ile madde uygulanan gruplardaki hedef genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Yöntem kısmında bahsedildiği şekilde PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve siRNA yüklenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin siRNA yüklenmeden önceki ve sonraki aşamadaki karakterizasyonu Zetasizer Nano ZSP cihazıyla DLS metoduyla boyut ölçümleri yapılmıştır.

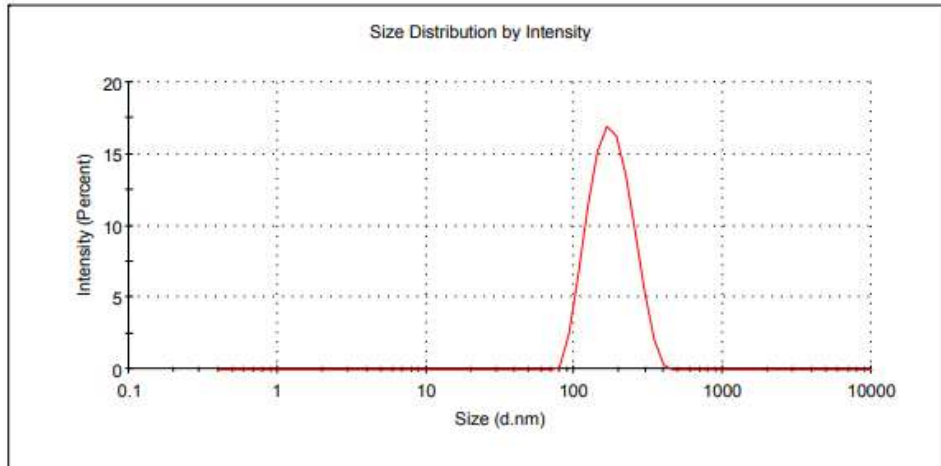
4.1.1 Boş PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Yöntem kısmında bahsedildiği şekilde PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Zetasizer Nano ZSP cihazıyla DLS Metoduyla nanopartiküllerin boyutu, çapı, yoğunluğu ve PDI sonuçları elde edilmiştir. Nanopartiküllerin boyutu sayı (number), hacim (volume) ve yoğunluk (intensity) olarak analiz edilmiştir.

Results

| | Size (d.n... | % Intensity: | St Dev (d.n... |
|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 166.0 | Peak 1: 182.2 | 100.0 | 58.48 |
| Pdl: 0.115 | Peak 2: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Intercept: 0.967 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

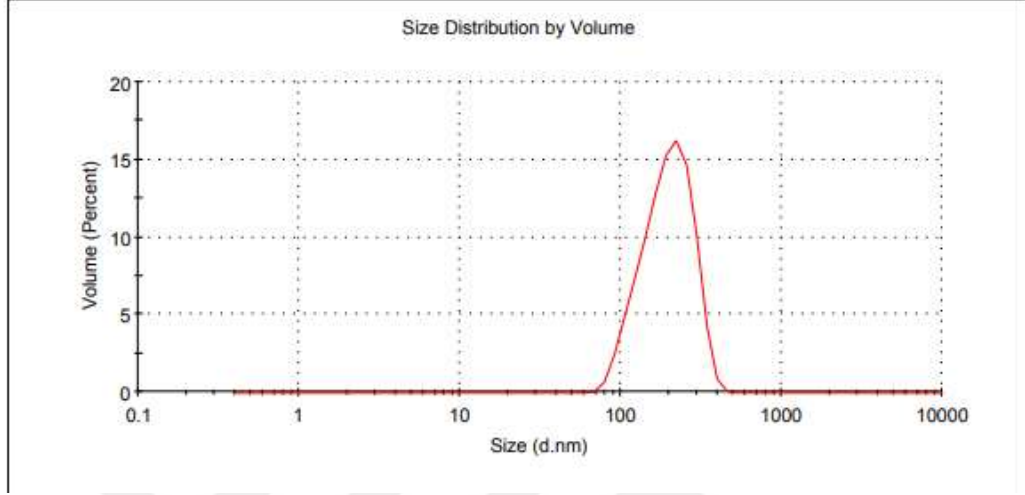
Result quality Refer to quality report



Şekil 4.1: Boş PLGA nanopartikülünün şiddetçe dağılımı (Intensity).

Results

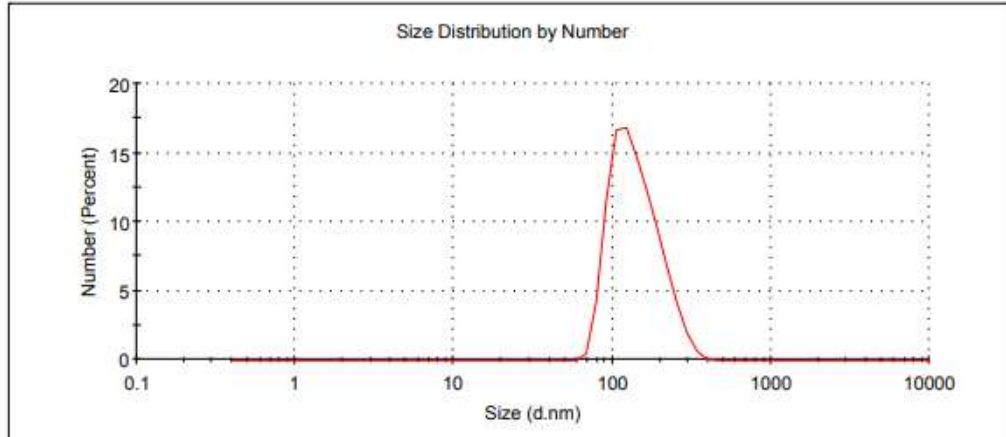
| | Size (d.nm): | % Volume: | St Dev (d.nm): |
|---|----------------------|-----------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 166.0 | Peak 1: 203.1 | 100.0 | 67.09 |
| Pdl: 0.115 | Peak 2: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Intercept: 0.967 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Result quality Refer to quality report | | | |



Şekil 4.2: Boş PLGA nanopartikülünün hacimce dağılımı (Volume).

Results

| | Size (d.n... | % Number: | St Dev (d... |
|---|----------------------|-----------|--------------|
| Z-Average (d.nm): 166.0 | Peak 1: 145.5 | 100.0 | 52.59 |
| Pdl: 0.115 | Peak 2: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Intercept: 0.967 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Result quality Refer to quality report | | | |



Şekil 4.3: Boş PLGA nanopartikülünün sayıca dağılımı (Number).

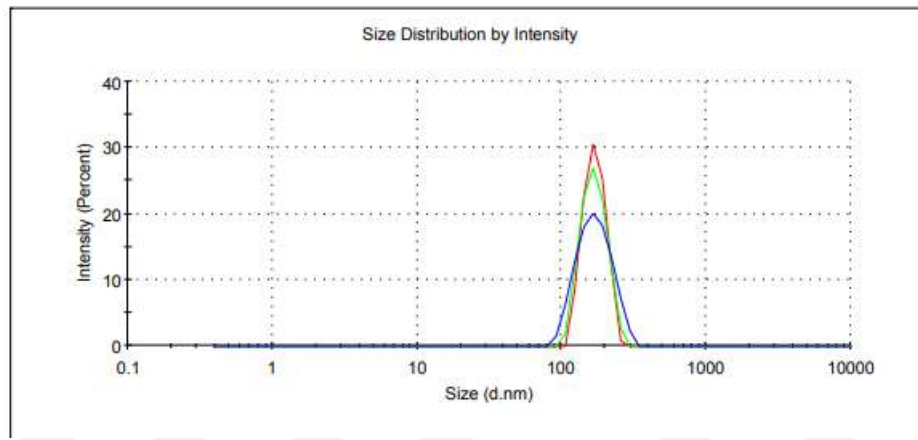
4.1.2 siRNA-PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyonu

PLGA nanopartikülleri hazırlandıktan sonra yöntem kısmında belirtildiği şekilde siRNA yüklenmiştir. siRNA yüklenen nanopartiküllerinin karakterizasyonları, sayı (number), hacim (volume) ve yoğunluk (intensity) olarak analiz edilmiştir.

Results

| | Size (d.n... | % Intensity: | St Dev (d.n... |
|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 161.2 | Peak 1: 171.8 | 100.0 | 45.78 |
| Pdl: 0.044 | Peak 2: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Intercept: 0.868 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

Result quality Good

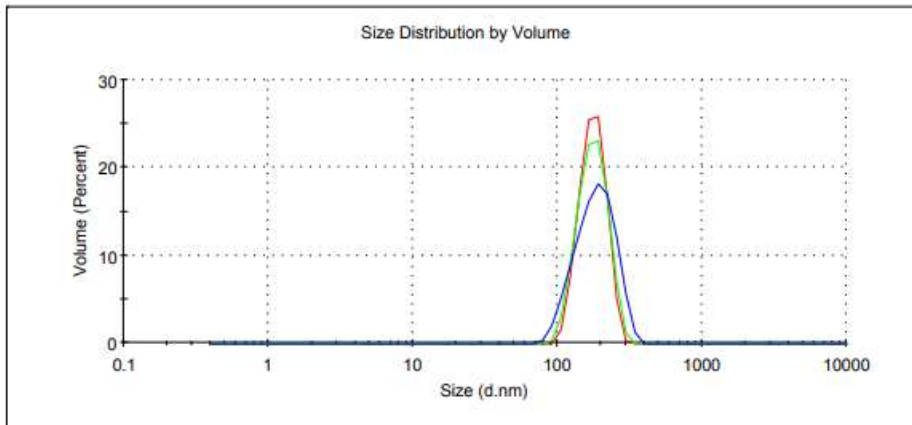


Şekil 4.4: PLGA nanopartikülünün şiddetçe dağılımı (Intensity).

Results

| | Size (d.nm): | % Volume: | St Dev (d.nm): |
|--------------------------------|----------------------|-----------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 161.2 | Peak 1: 187.8 | 100.0 | 55.15 |
| Pdl: 0.044 | Peak 2: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Intercept: 0.868 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |

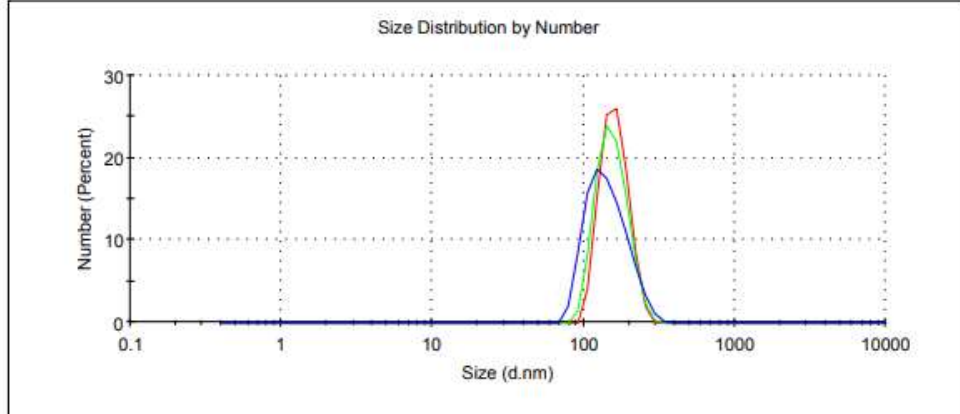
Result quality Good



Şekil 4.5: PLGA nanopartikülünün hacimce dağılımı (Volume).

Results

| | | | | |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Z-Average (d.nm): 161.2 | Peak 1: 146.9 | Size (d.nm): 146.9 | % Number: 100.0 | St Dev (d.nm): 45.83 |
| Pdl: 0.044 | Peak 2: 0.000 | Size (d.nm): 0.000 | % Number: 0.0 | St Dev (d.nm): 0.000 |
| Intercept: 0.868 | Peak 3: 0.000 | Size (d.nm): 0.000 | % Number: 0.0 | St Dev (d.nm): 0.000 |
| Result quality: Good | | | | |



Şekil 4.6: PLGA nanopartikülünün sayıca dağılımı (Number).

Tablo 4.1: Hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyut dağılımları.

| | Intensity | % | Volume | % | Number | % | PdI |
|-------------------|------------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|------------|
| PLGA | 182.2 | 100 | 203.1 | 100 | 145.5 | 100 | 0.115 |
| SiRNA-PLGA | 171.8 | 100 | 187.8 | 100 | 146,9 | 100 | 0.044 |

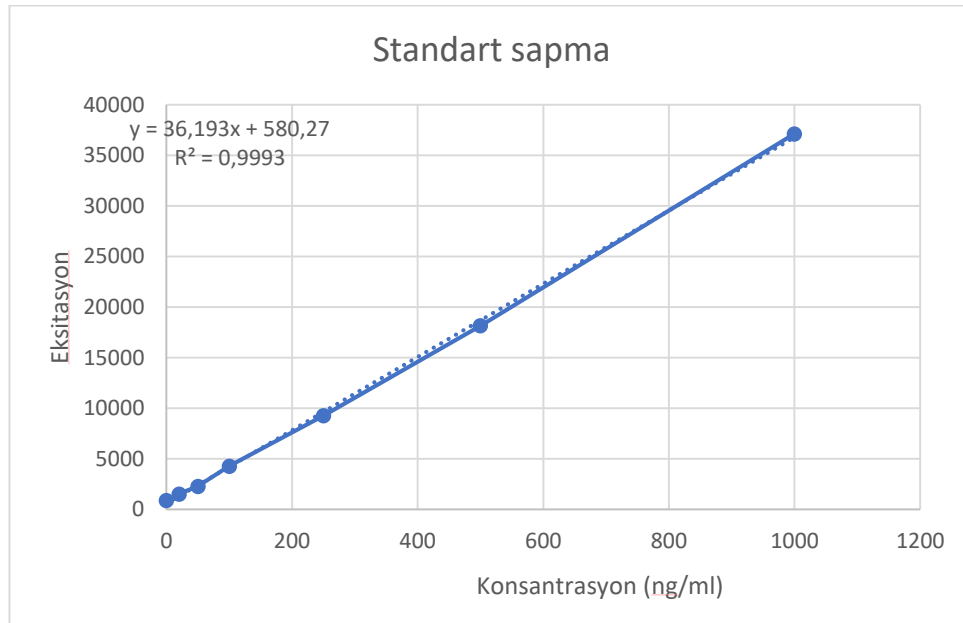
Daha önceki çalışmalar referans alınarak önce W/O/W buharlaştırma tekniği PLGA nanopartikülü üretilmiş ve sonrasında kısa vorteks-buz yöntemiyle siRNA yüklenmiştir. si-RNA yüklü PLGA nanopartikülü elde etmenin farklı yöntemleri olmasına rağmen önce boş PLGA üretip sonrasında PLGA yüklenmesi yöntemi laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkarak tercih edilmiştir. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir önceki tez çalışmasında bu yöntem ile daha küçük boyutlu ve en yüksek gen susturma etkinliğine sahip nanopartikül üretildiği gösterilmiştir [185].

Yapılan araştırmalar sonucunda, tümör hücrelerinde eksprese edilen integrinlerin, metastaz, hayatta kalma ve proliferasyona katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir [18]. Bu doğrultuda integrinlerin siRNA ile baskılanması terapötik bir yaklaşım olabileceği

düşünülmüştür. Ayrıca, siRNA'nın bozunmadan taşınması için de PLGA nanopartiküllerine siRNA yüklenmiştir. Kan-tümör bariyeri, 40-200 nm aralığında vasküler fenestrasyonlar sergilediği bilindiği için beyin tümörüne etkili bir taşıma yapılabilmesi için hazırlanan nanopartikül boyutlarının bu aralıkta olması gerekmektedir [187]. Hedeflenen bölge bir beyin tümör bölgesi olduğu için bu bilgiler ışığında etkili bir taşımanın olabilmesi için öncelikle hazırlanan nanopartiküllerinin karakterizasyonu yapılmıştır. İlk nanopartikül denemesinde boyutu 200 nm'i geçmiş olmasına rağmen daha sonra yapılmış ve siRNA yüklenmiş nanopartikül boyutları olması gereken aralık içinde oldukları gözlemlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin dar boyut dağılımına sahip olması yani polidispersite indeksi (PdI) değerinin 0.2'den küçük olması genelde istenmektedir [188]. Bizim çalışmalarımızda sonuçlar 0.2'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta, PdI değerinin sıfıra yakın olması daha yüksek kapsülleme verimliliğine ve ilaç yüklemesine sebep olmaktadır [189].

4.2 siRNA-PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi (%EE)

Su içinde yağ içinde su çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle oluşan PLGA miselleri içerisinde enkapsüle edilen siRNA, su ve tampon çözeltilerinin bulunduğu ortama salım gerçekleştirir. PLGA partikülleri içerisinde enkapsüle edilen siRNA gereç ve yöntem kısmında verilen enkapsülasyon verimi (%EE) formülü kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.7: siRNA standartlarının standart sapma grafiği.

İlk olarak standart siRNA örneklerinden standart sapma grafiği oluşturulmuştur. Standart sapma grafiğinden elde edilen formül ile başlangıçta salınan siRNA konsantrasyonu hesaplanmıştır. Başlangıç siRNA miktarından başlangıçta salınan siRNA konsantrasyonu çıkarılarak PLGA içerisinde kalan siRNA hesaplanmış ve elde edilen değerler enkapsülasyon verimliliği formülüne koyularak % enkapsülasyon verimliliği % 48,81 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2: % Enkapsülasyon verim sonucu.

| Başlangıç siRNA konsantrasyonu | Başlangıçta salınan siRNA miktarı (eksitasyon) | Başlangıçta salınan siRNA konsantrasyonu | PLGA içerisinde kalan siRNA | EE% |
|--------------------------------|--|--|-----------------------------|-------|
| 2640 ng/ml | 49495 | 1351,497 ng/ml | 1288,503 ng/ml | 48,81 |

Kapsülleme verimliliği, esas olarak polimerin moleküler ağırlığına, bileşimine ve ilaçla etkileşimine gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterildiği belirtilmiştir [190]. Ayrıca PLGA'nın hidrofobik doğası ve siRNA ile PLGA arasındaki elektrostatik etkileşimlerin olmaması nedeniyle, PLGA nanopariküllerine verimli bir şekilde kapsüllemenin zor olduğu da ifade edilmiştir [191]. Aynı zamanda enkapsülasyonu hesaplayabilmek için deney düzeninde güçlü santrifüj aşaması olduğu için nanopartikül içerisinde kalan siRNA miktarını önemli ölçüde düşürebileceğini de düşünmekteyiz. Dolayısıyla bizim elde ettiğimiz enkapsülasyon verimliliği oldukça iyidir.

4.3 MTT Sonuçları

İntegrin α 10 proteinini baskılaması amacıyla hürelere uyguladığımız siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerin hürelere sitotostik bir etkisinin olup olmadığını gözlemlemek için MTT deneyi yapılmış ve 570 nm'de ölçüm alınmıştır. Cihazın verdiği absorbans değerleri ile hücre canlılığı hesaplanmıştır.

Tablo 4.3: Madde uygulandıktan 96 saat sonraki hücre canlılık oranları. Kontrol grubuna yalnızca DEPC'li medyum uygulanmış.

| Uygulanan madde | Hücre Canlılığı (%) |
|-------------------|---------------------|
| 20 ng siRNA-PLGA | 85,46 |
| 4 ng siRNA-PLGA | 84,27 |
| 1 ng siRNA-PLGA | 86,40 |
| 0.5 ng siRNA-PLGA | 92,42 |

Tablo 4.4: 72 saatlik inkübasyon sonrası.

| Uygulanan madde | Absorbans değerleri |
|------------------|---------------------|
| 20 ng siRNA-PLGA | 0,893 |
| 20 ng siRNA | 0,771 |
| PLGA | 1,087 |

Tablo 4.5: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış hücrelerin canlılık oranı.

| Saat | Hücre Canlılığı (%) |
|---------|---------------------|
| 24.saat | 80,32 |
| 48.saat | 47,82 |
| 72.saat | 60,33 |

Yapılan deneylerden aldığımız sonuçlara göre uyguladığımız siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin hücreler üzerinde dikkate değer sitotoksik etkisi olmamıştır. Ayrıca yaptığımız bir çalışmadan alınan absorbans değerlerine göre hücrelere,

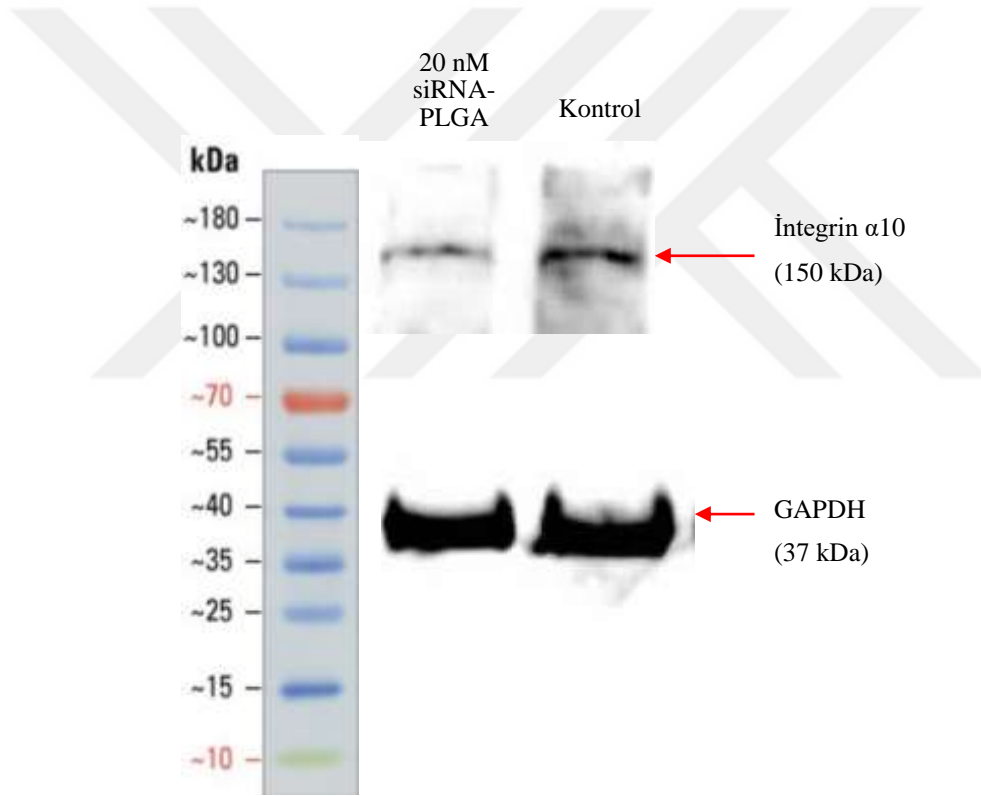
nanopartiküle yüklemeyen uygulanan siRNA, nanopartiküle yüklenen siRNA'ya göre canlılık oranını daha çok azaltabildiği yorumunu yapmak mümkündür. Diğer taraftan 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış hücrelerin canlılık oranı 24. saatte %80'lerde iken 48. saatte %47'lere düşmüş ve 72. saatte %60'lara çıkmıştır. Hücre kültürü şartları ve 48. saatte siRNA mekanizmasının etkinliği ile integrin α 10 baskılanmasının bir sonucu olarak da hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir yorumu yapılabilir.

Kendi sonuçlarımız ile benzer çalışmaların sonucunu karşılaştırarak daha doğru yorum yapmak mümkün olur. Literatür taramalarından biri olan PLGA nanopartikülleri ile U87 hücre hattının hedeflendiği bir çalışmada, 200 μ g PLGA/mL ve daha yüksek konsantrasyonlardaki PLGA'nın hücrelerin canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir [187]. Rat glioma hücre hattı üzerinde yapılan bir başka çalışmada da ise PEG ile modifiye edilmiş ve kitosan kaplı PLGA nanopartiküllerinin sitotoksik bir etki göstermedikleri gösterilmiştir [184]. Hepatoselüler karsinom hücre hatlarında yapılan çalışmada da boş PLGA nanopartiküllerinin ve scrambled siRNA yüklü olan PLGA nanopartiküllerinin sitotoksik etkisi karşılaştırılmış ve bizim çalışmalarımıza benzer şekilde önemli sitotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir [192]. Hepatoselüler karsinom taşıyan farelerde polietilen glikolle modifiye edilmiş PLGA nanopartikülü ile siRNA iletiminin hedefli bir şekilde iletebilmesi amacıyla yapılan farklı bir çalışmada da MTT deneylerinde PLGA'ya yüklenmiş ve serbest (0.2 μ M) siRNA'nın sitotoksik etkileri kontrol gruplarına göre karşılaştırıldığında dikkate alınabilecek sitotoksik bir etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir [193]. Literatürle doğru orantılı olarak, bizim çalışmalarımızda da FDA tarafından onaylı olan PLGA'nın hücre canlılığı üzerinde toksik bir etkisi olmadığı kültür ortamında gözlemlenmiştir. Ayrıca, siRNA yüklü PLGA'nın da dikkate değer ölçüde bir toksik etkisi olmadığını bizim çalışmalarımızda da gösterilmiştir.

4.4 Western blot

Yapılan çalışmalar ile PLGA nanopartikülüne integrin α 10 siRNA'sı yüklenerek glioblastoma hücre hattındaki integrin α 10'un baskılanması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda western blot deneyleri yapılarak protein düzeyinde integrin α 10'un baskılandığı incelenmiştir. Ayrıca, tüm hücrelerde eksprese olduğu bilinen GAPDH antikoru da bu çalışmada kıyaslama için kullanılmıştır. siRNA uygulanan hücreler ile herhangi bir müdahale yapılmayan hücrelerde bant kalınlıklarına göre bir kıyaslama

yapılarak hedef proteinin baskılandığı gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan GAPDH proteininin, siRNA-PLGA uygulanan ve kontrol gruplarında aynı kalınlıkta ve 37 kDa'da bant verdiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmanın deney aşamasında bir hata olup olmadığını kontrol etmek amacıyla GAPDH antikorunu kullanıldığı için sonuçta yapılan deneyin doğruluğu gösterilmiştir. Çalışmanın asıl amacı integrin $\alpha 10$ 'un baskılanabildiğini göstermektir. İntegrin $\alpha 10$ 'un 150 kDa'da bant vermesi bekleniyordu ve sonuçta her iki grupta 150 kDa'da bant vermiştir. siRNA-PLGA uygulanan grubun 150 kDa'da verdiği bant madde uygulanmayan kontrol grubunun verdiği banttan daha ince olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla siRNA ile integrin $\alpha 10$ 'un baskılandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarından ekstrakte edilen proteinler ile yapılan western blot görüntüsü.







Western blot deneyi ile PLGA nanopartikülünün etkili bir şekilde siRNA'yı glioblastoma hücrelerinin membranında bulunan integrin $\alpha 10$ proteinine iletebildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda siRNA'nın PLGA nanopartikülüne sorunsuz bir şekilde yüklenebildiğini ve bozunmadan hücreye aktarabildiği gösterilmiştir.

4.5 Çizik Deneyi

İntegrin $\alpha 10$ siRNA'sı PLGA'ya yüklenerek U87 hücre hattındaki integrin $\alpha 10$ proteini hedef alındı. PLGA'nın siRNA'yı hücre içine taşıyarak integrin $\alpha 10$ 'un baskılanmasıyla hücre göçünde görev alan bir protein baskılanmıştır. Baskılanmanın sonucunu gözlemleyebilmek amacıyla çizik deneyi yapılmıştır. 24 saat önce plate ekilen hücrelerin besiyeri atılmadan önce pipet ucu ike kuyulara çizik atılmış ve taze besiyeri ile siRNA-PLGA uygulaması yapılmıştır. Floresan mikroskobun 4X büyütmesi ile 24, 48 ve 72. saatlerde görüntü alınarak çizik atılarak oluşturulan mesafeler power point programında hesaplanmış ve madde uygulanan ve kontrol gruplarındaki değişiklikler karşılaştırılmıştır.



Tablo 4.6: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarının çizik deneyinin 4X büyütmede floresan mikroskopu görüntüleri.

| | 20 nM siRNA-PLGA | Kontrol |
|-----------------|---|--|
| 24. saat |  |  |
| 48. saat |  |  |
| 72. saat |  |  |

Tablo 4.7: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış ve kontrol gruplarının çizik deneyinin analizi.

| | 24.saat | 48.saat | 72.saat |
|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 20 nM siRNA-PLGA | 10.16 cm | 7.86 cm | 5.38 cm |
| 20 nM siRNA-PLGA | 7.53 cm | 5.36 cm | 4.20 cm |
| 20 nM siRNA-PLGA | 7.71 cm | 6.40 cm | 5.99 cm |
| Kontrol | 4.54 cm | 2.21 cm | 1.47 cm |
| Kontrol | 7.29 cm | 3.70 cm | 2.35 cm |
| Kontrol | 5.96 cm | 3.69 cm | 2.06 cm |
| Kontrol | 7.9 cm | 6.49 cm | 5.34 cm |

Sonuçları Excel ile t test analizini gerçekleştirdiğimizde 24. saatte $p < 0,065$, 48. saatte $p < 0,046$ ve 72. saatte $p < 0,042$ sonuçlarına varılmıştır. Dolayısıyla, 48. ve 72. saatlerde siRNA ile baskılanmanın hücre göçü üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bir tekrarımızda da 72. saatte çizikğin kapanması kontrole göre madde uyguladığımız gruplarda daha az olmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar ile literatür taraması karşılaştırılmıştır. Kanser patogeneğinde yer aldığı bilinen bir genin baskılandığı bir çalışmada, kanser hücresinin yatay yönde göç etme yeteneğini değerlendirmek için hücre dışı matrise benzeyen matrijel kullanılarak yara iyileştirme deneyleri yapılmış ve matrisi sindiren ve polikarbonat membrandan geçen hücre sayısı incelenmiştir [194]. Çalışmalarının sonuçları deney düzeneğinin etkisiyle de anlamlı olmuştur. Yaptıkları uygulamanın hücre göçü üzerindeki etkisini araştırmak için çizik deneyi yapan bir başka grup ise çizik attıktan sonra fetal sıgır serumu (FBS) içermeyen ortamda hücreleri kültüre etmiş ve sonrasında sonuçları değerlendirmişler ve anlamlı sonuçlar elde etmişler [195]. Benzer şekilde, kanser gelişimi, metastazı ve prognozu ile yakından ilişkili olan bir proteinin glioma hücre hatları üzerindeki migrasyona etkisini siRNA ile baskılama yapılarak, FBS oranlarının farklı olduğu ortamların mevcut olduğu *Transwell* tahlilleri yapılmış ve net sonuçlar elde edilmiştir [196]. Malign melanom hücre hattı ile yapılan çalışmada monoklonal antikor inhibitörleri ile integrin $\alpha 10$ inhibe edilip integrin $\alpha 10$ 'un migrasyona etkisi araştırılmış ve bunun için hem yara kapanma (çizik deneyi) hem de Boyden Chamber sistemindeki jelatin kaplı filtreler kullanılmış ve çizik deneyinde önemli bir fark olmamasına rağmen diğer

sistemde ise kemoatraktana yönelik hücre göçünün inhibe edildiği gözlemlenmiş [128]. Bizim çalışmamızda yalnızca çizik deneyi yapıldı ve herhangi bir kemoatraktana yönelme veya farklı oranlarda FBS'in olduğu bir deney düzeneği kurulmadı. Dolayısıyla yaptığımız çizik deneylerinde anlamlı sonuçlarımızda olmasına rağmen Wenke ve arkadaşlarının elde ettiği çizik deneyinin sonucuna benzer şekilde net sonuçlar alınamamıştır.

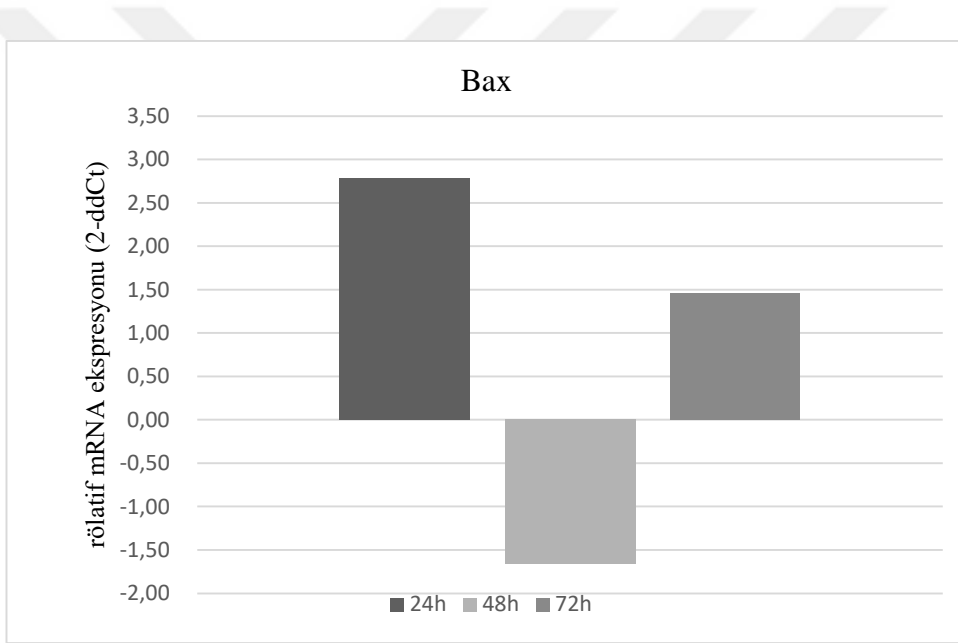
Bizim çalışmamıza benzer olarak glioblastoma hücre hatlarında siRNA aracılı integrin $\alpha10$ antikorundan oluşan antikor-ilaç konjugatı ile integrin $\alpha10$ baskılanmış ve baskılamanın hücre göçü üzerine etkisini araştırmak için jelatin kaplı *transwell* filtreler kullanılmış [17]. Deneylerinin sonucunda da hücre göçünün siRNA uygulaması ile azaldığını göstermişler [17]. Kültürde yaptığımız çizik deneylerinin tekrarlarından birinde hücre göçünün azaldığını gözlemlemiştik. Ancak kültür şartlarından dolayı diğer deney tekrarlarında benzer sonuçlar alamamıştık. Diğer taraftan integrin $\alpha10$ 'un metastatik özelliklerini incelemek için bizim çalışmamızda ki gibi inhibe etmek yerine hücrede fazla ekspresyonunu sağlayarak incelemek mümkündür. Bu doğrultuda, serumsuz besiyerinde süspanse edilip *transwell* insörtlerine ekilen integrin $\alpha10$ 'u fazla eksprese eden hücreler kontrol hücrelerine göre daha fazla göç ve istila sergiledikleri gösterilmiş [129]. Tüm bu literatür sonuçları ve bizim sonuçlarımız doğrultusunda integrin $\alpha10$ 'un baskılanması ya da aşırı ekspresyonu hücrelerin metastatik özelliklerini etkileyebileceğini düşünüyoruz.

4.6 qPCR

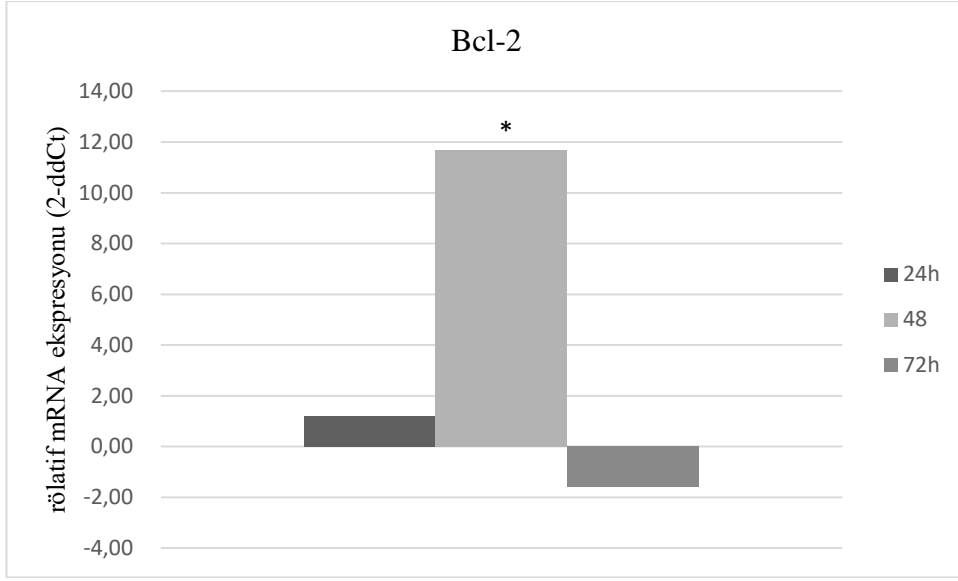
U87 hücre hattına uyguladığımız siRNA-PLGA'nın gen düzeyinde etkisini incelemek, apoptotik gen ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri gözlemek için qPCR yapılmıştır. Hücrelere 20 nM siRNA-PLGA uyguladıktan 24, 48 ve 72 saat sonra hücreler toplanmıştır. Toplamda 6 farklı örnek için RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Apoptotik genler olan bax, bcl-2, kaspaz-3, pten genleri ve *housekeeping* olarak B-aktin geni için forward ve reverse primerleri ile qPCR için örnekler hazırlanmış ve qPCR yapılmıştır. Cihazın verdiği Tablo 4-7'de gösterilen Cq değerleri ile $2^{\Delta\Delta CT}$ değerleri her örnek için hesaplandı ve ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

Tablo 4.8: Cq değerleri.

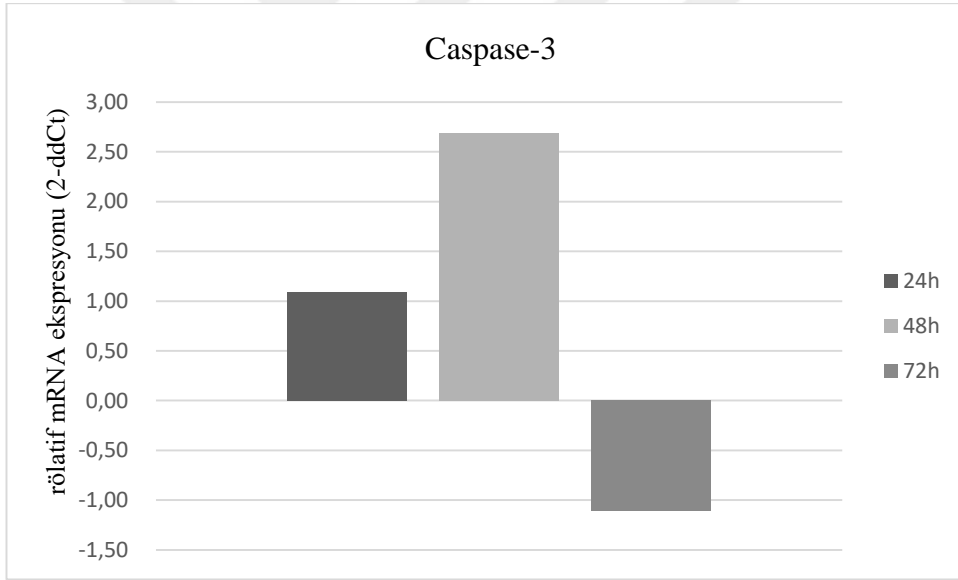
| | siRNA24 | siRNA48 | siRNA72 | | K24 | K48 | K72 |
|---------------------------------|---------|---------|---------|--|-------|-------|-------|
| β-Actin | 28,27 | 26,26 | 25,74 | | 26,63 | 24,69 | 27,08 |
| β-Actin | 28,17 | 26,30 | 25,20 | | 26,43 | 24,74 | 26,74 |
| Bax | 31,21 | 31,03 | 29,42 | | 31,38 | 28,20 | 31,28 |
| Bax | 31,95 | 30,60 | 29,08 | | 31,35 | 28,85 | 31,21 |
| Bcl-2 | 31,75 | 31,87 | 32,97 | | 30,01 | 34,03 | 32,72 |
| Bcl-2 | 31,37 | 32,17 | 31,53 | | 30,29 | 33,97 | 33,31 |
| Kaspaz-3 | 30,96 | 30,63 | 30,42 | | 29,30 | 30,54 | 31,50 |
| Kaspaz-3 | 31,07 | 30,37 | 30,03 | | 29,59 | 30,19 | 31,54 |
| Pten | 33,05 | 32,82 | 32,09 | | 32,07 | 33,86 | 33,48 |
| Pten | 32,83 | 33,28 | 32,29 | | 32,90 | 33,33 | 33,13 |



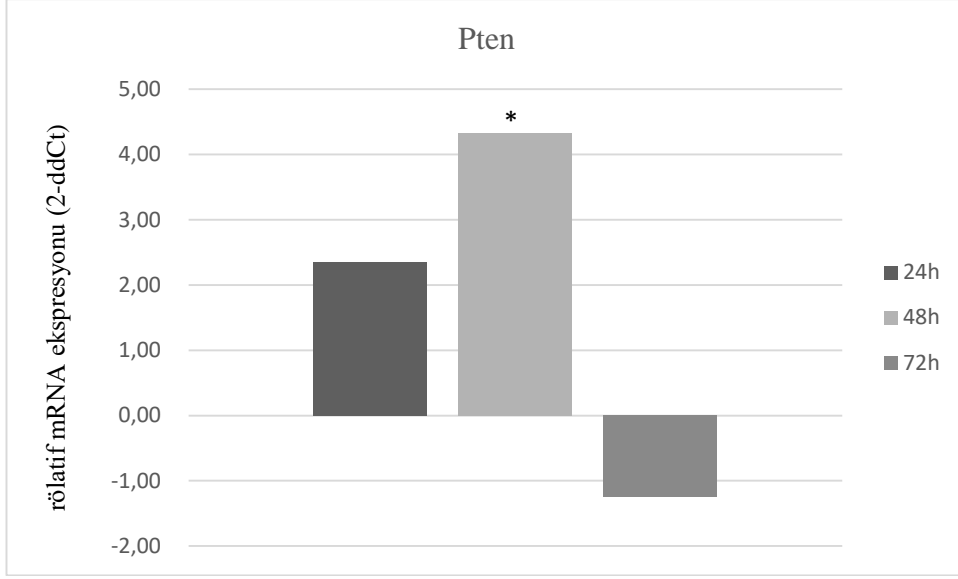
Şekil 4.9: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış grupta 24, 48 ve 72.saatlerde Bax geninin ekspresyon seviyeleri.



Şekil 4.10: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış gruplarda 24, 48 ve 72.saatlerde Bcl-2 geninin ekspresyon seviyeleri.



Şekil 4.11: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış gruplarda 24, 48 ve 72.saatlerde Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyeleri.



Şekil 4.12: 20 nM siRNA-PLGA uygulanmış gruplarda 24, 48 ve 72.saatlerde Pten geninin ekspresyon seviyeleri.

İntegrinlerin, sinyal iletimi, gen ekspresyonu, proliferasyon, apoptoz regülasyonu, istila ve metastaz ve anjiyogenezdeki rolleri gibi önemli yolakları etkileyen görevlerinin oldukları çalışmalarda gösterilmiştir [197]. Yapılan bir çalışmada integrinlerin apoptoz üzerindeki etkisi farklı durumlarda değerlendirilmiş ve sonuçta aynı integrin farklı hücre tiplerinde farklı yollara bağlanabildiği için bir durumda hayatta kalma sinyaline sebep olurken diğer taraftan apoptozu uyarabilmektedir [198]. Dolayısıyla çalışılan integrin ve hücre tipine bağlı olarak integrinin etki ettiği mekanizmalarda farklılıklar olabilmektedir. Diğer taraftan integrinler, hücre dışı matrikse hücreleri bağlar ve matristen sitoplazmik kinazların, büyüme faktörü reseptörlerinin ve iyon kanallarının aktivitelerini düzenleme gibi mekanik ve kimyasal sinyallere aracılık eder [199]. Bu durumda integrinlerin hücreleri farklı şekillerde etkilemesine sebep olabileceğini göstermektedir.

Biz de çalışmamızda temel olarak 4 gen üzerinden integrin $\alpha 10$ 'un apoptotik süreç ile ilişkisini incelemiştik. Primer olarak kullandığımız genlerden biri olan Bcl-2 proteini, apoptozu kontrol etmede ve çeşitli apoptotik uyarılara yanıt olarak hücre sağkalımını arttırmada rol oynadığı bilinmektedir [200]. Dolayısıyla Bcl-2, programlanmış hücre ölümünü engellemektedir [201]. Bcl-2 ile ilişkili X proteini (bax) ise mitokondriyal düzenlenmiş hücre ölümünün bir uygulayıcısıdır [202]. Kaspazlar, apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde önemli rollerinin oldukları bilinmekte ve bu aileye dahil olan kaspaz 3'de iyi bilinen bir uygulama proteazıdır [203]. Son olarak da PTEN,

insan sporadik kanserlerinde genellikle inaktive edilen ve her yerde eksprese edilebilen bir tümör baskılayıcısı olduğu bilinmektedir [204].

qPCR ile elde ettiğimiz Cq değerlerine göre yaptığımız analiz sonucunda integrin $\alpha 10$ 'u baskılayan siRNA-PLGA uygulamasının U87 hücre hattında 48. saatte bcl-2, ve pten genlerinin ekspresyonunu dikkate değer biçimde arttığı $\Delta\Delta CT$ değerlerinin 2'den yüksek olması ile tespit edilmiştir. Çalışmalarımız boyunca, 48. saatte siRNA-PLGA uygulamasının etkili olduğu gözlemlenmiştir ve bu deney sonucunda da uygulanan maddenin 48. saatte anlamlı sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, 24 ve 72. saatlerde $\Delta\Delta CT$ değerleri 2'den az olduğu için kontrol ve madde uygulanan grupların apoptotik gen ekspresyonlarında farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

PLGA nanopartikülünün üretilmesi, siRNA'nın nanopartiküle yüklenmesi, U87 hücre hattına uygulanması ve hücre kültürü düzeyinde meydana gelebilecek değişikliklerin araştırılması şeklinde 4 aşamadan oluşan bir proje gerçekleştirilmiştir. PLGA nanopartikülü literatürde de laboratuvarımızda da daha önce başarılı sonuçlar alınan w/o/w yöntemi ile üretilmiş, Zetasizer cihazıyla da karakterizasyon işlemi yapılmış ve enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. Sonrasında hücrelere uygulanmak istenen konsantrasyonda siRNA ile yüklendi ve hücre hattına taze besiyeri ile birlikte verilmiştir. Öncelikle MTT deneyleriyle hücrelere uyguladığımız siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerin sitotostik etkisi araştırılmıştır. FDA tarafından onaylı PLGA nanopartikülünün siRNA ile birlikte uygulanmasıyla da toksik etkinin çok az olduğu gözlemlenmiştir. İntegrin $\alpha 10$ siRNA'sının yüklü PLGA nanopartiküllerinin, siRNA'yı hücre içine taşıyabildiği ve geni baskılayıp baskılamadığını gözlemlemek için western blot deneyleri yapılmıştır. Western blot deneylerinde, kontrol gruplarına göre siRNA uygulanan hücre gruplarında integrin $\alpha 10$ 'un önemli ölçüde baskılandığı gözlemlenmiştir. İntegrin $\alpha 10$ 'un migrasyonda görevli olan bir protein olduğu bilindiğinden çalışmamızın hücre göçü üzerindeki etkisini incelemek için çizik deneyi yapıldı ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Sonuçlar kültür şartlarından dolayı değişkenlikler göstermesine rağmen 48. ve 72. saatte anlamlı sonuçlar aldığımız deney tekrarları olmuştur. İntegrin $\alpha 10$ 'un baskılanması apoptotik genlerin ekspresyonunda nasıl bir değişiklik yapar sorusuna cevap verebilmek için de qPCR yapılmış ve bax, bcl-2, kaspaz-3 ve pten genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Sonuçlarda bcl-2 ve pten ekspresyonunun 48. saatte dikkate değer biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Ancak 24 ve 72. saatlerde anlamlı sonuçlar alınmamıştır. Çalışmalarımızın sonuçları genel itibari ile beklediğimiz şekilde olmuştur. Deneylerimizde integrin ailesinden yalnızca bir proteini hedef aldığımız için ciddi farklılıkların gözlenmemesi tahmin edilen bir durumdur. Dolayısıyla, PLGA nanopartikülleri ile taşınan siRNA'nın glioblastoma hücrelerindeki integrin $\alpha 10$ 'u hedeflenmesi, glioblastoma kanseri için olası bir terapötik yaklaşım olabileceği için deneylerin geliştirilerek tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir. Devam edecek

deneyler ve sonrasında hayvanlar üzerinde yapılabilecek deneyler sonucunda hem kanser tedavisi için hem hedefe yönelik ilaç taşıma için önemli sonuçlar alınabilir.



KAYNAKLAR

- [1] **Mainini, F. and M.R. Eccles.** (2020). Lipid and Polymer-Based Nanoparticle siRNA Delivery Systems for Cancer Therapy. *Molecules*, 2020. **25**(11).
- [2] **Wang, W., et al.** (2019). Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *J Nanobiotechnology*, 17(1): p. 82.
- [3] **Özgün and S. ÇomoĞLu.** (2016). Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(3): p. 62-79.
- [4] **Farokhzad, O.C. and R. Langer.** (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1): p. 16-20.
- [5] **Ahlawat, J., G. Henriquez, and M. Narayan.** (2018). Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules*, 23(9).
- [6] **Allahyari, M. and E. Mohit.** (2016). Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Hum Vaccin Immunother*, 12(3): p. 806-28.
- [7] **Virlan, M.J.R., et al.** (2015). Current Uses of Poly(lactic-co-glycolic acid) in the Dental Field: A Comprehensive Review. *Journal of Chemistry*, 2015: p. 1-12.
- [8] **Wirsching, H.G., E. Galanis, and M. Weller.** (2016). Glioblastoma. *Handb Clin Neurol*, 134: p. 381-97.
- [9] **Eder, K. and B. Kalman.** (2014). Molecular heterogeneity of glioblastoma and its clinical relevance. *Pathol Oncol Res*, 20(4): p. 777-87.
- [10] **Aras, S., et al.** (2015). RNA interference in plants. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 72(3): p. 255-262.
- [11] **Tekedereli, I., et al.** (2013). Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2: p. e121.
- [12] **Zhang, C., et al.** (2014). si-RNA-Mediated Silencing of ADRBK1 Gene Attenuates Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Biother Radiopharm*, 29(8): p. 303-9.
- [13] **Elif Ünal, I.T., İrem Hazal Toroslu, Gülce Cansu Serin, Ayşe Yılmaz.** Post-Transkripsiyonel Gen Susturulması ve Kullanım Alanları. from <http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/464/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpzsnm15/15.P10.pdf>
- [14] **Sadat Tabatabaei Mirakabad, F., et al.** (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(2): p. 517-35.
- [15] **Maksimenko, O., et al.** (2019). Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm*, 572: p. 118733.
- [16] **Takada, Y., X. Ye, and S. Simon.** (2007). The integrins. *Genome Biol*, 8(5): p. 215.

- [17] **Munksgaard Thoren, M., et al.** (2019). Integrin alpha10, a Novel Therapeutic Target in Glioblastoma, Regulates Cell Migration, Proliferation, and Survival. *Cancers (Basel)*, 11(4).
- [18] **Desgrosellier, J.S. and D.A. Cheresh.** (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 10(1): p. 9-22.
- [19] **Roy, P.S. and B.J. Saikia.** (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, 53(3): p. 441-442.
- [20] **Aran, D., M. Sirota, and A.J. Butte.** (2015). Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. *Nat Commun*, 6: p. 8971.
- [21] **Reina-Campos, M., J. Moscat, and M. Diaz-Meco.** (2017). Metabolism shapes the tumor microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*, 48: p. 47-53.
- [22] **Torre, L.A., et al.** (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25(1): p. 16-27.
- [23] **Einoch Amor, R., et al.** (2019). Breath analysis of cancer in the present and the future. *Eur Respir Rev*, 28(152).
- [24] **Wyld, L., R.A. Audisio, and G.J. Poston.** (2015). The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(2): p. 115-24.
- [25] **Strobel, O., et al.** (2019.) Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(1): p. 11-26.
- [26] **Hoshi, H.** (2020). Management of Gastric Adenocarcinoma for General Surgeons. *Surg Clin North Am*, 100(3): p. 523-534.
- [27] **Valsdottir, E.B., et al.** (2014). Quality of life and fecal incontinence after transanal endoscopic microsurgery for benign and malignant rectal lesions. *Surg Endosc*, 28(1): p. 193-202.
- [28] **Tateya, I., et al.** (2016). Transoral surgery for laryngo-pharyngeal cancer - The paradigm shift of the head and cancer treatment. *Auris Nasus Larynx*, 43(1): p. 21-32.
- [29] **DeVita, V.T., Jr. and E. Chu.** (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21): p. 8643-53.
- [30] **Frei, E., 3rd.** (1985). Curative cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 45(12 Pt 1): p. 6523-37.
- [31] **Amjad, M.T., A. Chidharla, and A. Kasi.** (2021). Cancer Chemotherapy. in *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- [32] **Livshits, Z., R.B. Rao, and S.W. Smith.** (2014). An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am*, 32(1): p. 167-203.
- [33] **Qin, S.Y., et al.** (2018). Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy. *Biomaterials*, 171: p. 178-197.
- [34] **Larionova, I., et al.** (2019). Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, 8(7): p. 1596004.
- [35] **Shvets, Y.V., N.Y. Lukianova, and V.F. Chekhun.** (2020). Human microbiota and effectiveness of cancer chemotherapy. *Exp Oncol*, 42(2): p. 82-93.
- [36] **Jarosz-Biej, M., et al.** (2019). Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int J Mol Sci*, 20(13).
- [37] **Rodriguez-Ruiz, M.E., et al.** (2018). Immunological Mechanisms Responsible for Radiation-Induced Abscopal Effect. *Trends Immunol*, 39(8): p. 644-655.

- [38] **Herrera, F.G., J. Bourhis, and G. Coukos.** (2017). Radiotherapy combination opportunities leveraging immunity for the next oncology practice. *CA Cancer J Clin*, 67(1): p. 65-85.
- [39] **Allen, C., S. Her, and D.A. Jaffray.** (2017). Radiotherapy for Cancer: Present and Future. *Adv Drug Deliv Rev*, 109: p. 1-2.
- [40] **Gao, L., et al.** (2020). Autophagy and Tumour Radiotherapy. *Adv Exp Med Biol*, 1207: p. 375-387.
- [41] **Yang, Y.** (2015). Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest*, 125(9): p. 3335-7.
- [42] **Liu, C.Y., K.F. Chen, and P.J. Chen.** (2015). Treatment of Liver Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(9): p. a021535.
- [43] **Steven, A., S.A. Fisher, and B.W. Robinson.** (2016). Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*, 21(5): p. 821-33.
- [44] **van den Bulk, J., E.M. Verdegaal, and N.F. de Miranda.** (2018). Cancer immunotherapy: broadening the scope of targetable tumours. *Open Biol*, 8(6).
- [45] **Tan, S., D. Li, and X. Zhu.** (2020). Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother*, 124: p. 109821.
- [46] **Kennedy, L.B. and A.K.S. Salama.** (2020). A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA Cancer J Clin*, 70(2): p. 86-104.
- [47] **Habash, R.W.Y.** (2018). Therapeutic hyperthermia. *Handb Clin Neurol*, 157: p. 853-868.
- [48] **Wust, P., et al.** (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3(8): p. 487-97.
- [49] **Hurwitz, M.D.** (2019). Hyperthermia and immunotherapy: clinical opportunities. *Int J Hyperthermia*, 36(sup1): p. 4-9.
- [50] **Franckena, M. and J. van der Zee.** (2010). Use of combined radiation and hyperthermia for gynecological cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 22(1): p. 9-14.
- [51] **Stewart, J.R. and F.A. Gibbs, Jr.** (1984). Hyperthermia in the treatment of cancer. Perspectives on its promise and its problems. *Cancer*, 54(11 Suppl): p. 2823-30.
- [52] **Stephen, Z.R. and M. Zhang.** (2021). Recent Progress in the Synergistic Combination of Nanoparticle-Mediated Hyperthermia and Immunotherapy for Treatment of Cancer. *Adv Healthc Mater*, 10(2): p. e2001415.
- [53] **Kaufmann, K.B., et al.** (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*, 5(11): p. 1642-61.
- [54] **Santiago-Ortiz, J.L. and D.V. Schaffer.** (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *J Control Release*, 240: p. 287-301.
- [55] **Cappella, M., et al.** (2019.) Gene Therapy for ALS-A Perspective. *Int J Mol Sci*, 20(18).
- [56] **Sudhakar, V. and R.M. Richardson.** (2019). Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics*, 16(1): p. 166-175.
- [57] **Husain, S.R., et al.** (2015). Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer Gene Ther*, 22(12): p. 554-63.
- [58] **Le Rhun, E., et al.** (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev*, 80: p. 101896.
- [59] **Davis, M.E.** (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs*, 20(5 Suppl): p. S2-8.
- [60] **Lathia, J.D., et al.** (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*, 29(12): p. 1203-17.

- [61] **Gimple, R.C., et al.** (2019). Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev*, 33(11-12): p. 591-609.
- [62] **Bruinsmann, F.A., et al.** (2019). Nasal Drug Delivery of Anticancer Drugs for the Treatment of Glioblastoma: Preclinical and Clinical Trials. *Molecules*, 24(23).
- [63] **Ohgaki, H. and P. Kleihues.** (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19(4): p. 764-72.
- [64] **Broekman, M.L., et al.** (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol*, 14(8): p. 482-495.
- [65] **Paolillo, M., M. Serra, and S. Schinelli.** (2016). Integrins in glioblastoma: Still an attractive target? *Pharmacol Res*, 113(Pt A): p. 55-61.
- [66] **Shergalis, A., et al.** (2018). Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacol Rev*, 70(3): p. 412-445.
- [67] **Wassenegger, M.** (2002). Gene silencing. *Int Rev Cytol*, 219: p. 61-113.
- [68] **Badia, R., et al.** (2017). Antiviral treatment strategies based on gene silencing and genome editing. *Curr Opin Virol*, 24: p. 46-54.
- [69] **Scholefield, J. and M.J. Wood.** (2010). Therapeutic gene silencing strategies for polyglutamine disorders. *Trends Genet*, 26(1): p. 29-38.
- [70] **Lu, R., et al.** (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30(4): p. 296-303.
- [71] **Lange, M., et al.** (2013). Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods Mol Biol*, 975: p. 1-14.
- [72] **Mendez, C., C.L. Ahlenstiel, and A.D. Kelleher.** (2015). Post-transcriptional gene silencing, transcriptional gene silencing and human immunodeficiency virus. *World J Virol*, 4(3): p. 219-44.
- [73] **Crooke, S.T., et al.** (2021). Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat Rev Drug Discov*, 20(6): p. 427-453.
- [74] **Bennett, C.F.** (2019). Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu Rev Med*, 70: p. 307-321.
- [75] **Bennett, C.F., et al.** (2017). Pharmacology of Antisense Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57: p. 81-105.
- [76] **Choong, C.J., K. Baba, and H. Mochizuki.** (2016). Gene therapy for neurological disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 16(2): p. 143-59.
- [77] **Gheibi-Hayat, S.M. and K. Jamialahmadi.** (2020). Antisense Oligonucleotide (AS-ODN) Technology: Principle, Mechanism and Challenges. *Biotechnol Appl Biochem*.
- [78] **Lee, L.K. and C.M. Roth.** (2003). Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Curr Opin Biotechnol*, 14(5): p. 505-11.
- [79] **Holmlund, J.T.** (2003). Applying antisense technology: Affinitak and other antisense oligonucleotides in clinical development. *Ann N Y Acad Sci*, 1002: p. 244-51.
- [80] **Hegarty, J.P. and D.B. Stewart, Sr.** (2018). Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102(3): p. 1055-1065.
- [81] **Berkhout, B.** (2018). RNAi-mediated antiviral immunity in mammals. *Curr Opin Virol*, 32: p. 9-14.
- [82] **Chen, X., et al.** (2018). RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Rev*, 37(1): p. 107-124.

- [83] **Rayburn, E.R. and R. Zhang.** (2008). Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov Today*, 13(11-12): p. 513-21.
- [84] **Grishok, A.** (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett*, 579(26): p. 5932-9.
- [85] **Agrawal, N., et al.** (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(4): p. 657-85.
- [86] **Singh, A., P. Trivedi, and N.K. Jain.** (2018). Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46(2): p. 274-283.
- [87] **Xin, Y., et al.** (2017). Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. *Mol Cancer*, 16(1): p. 134.
- [88] **Nabzdyk, C.S., L. Pradhan-Nabzdyk, and F.W. LoGerfo.** (2017). RNAi therapy to the wall of arteries and veins: anatomical, physiologic, and pharmacological considerations. *J Transl Med*, 15(1): p. 164.
- [89] **Song, M.S. and J.J. Rossi.** (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem J*, 474(10): p. 1603-1618.
- [90] **Taylor, D.W., et al.** (2013). Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 20(6): p. 662-70.
- [91] **Lau, P.W., et al.** (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*, 19(4): p. 436-40.
- [92] **Kurzynska-Kokorniak, A., et al.** (2016). Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro. *Sci Rep*, 6: p. 23989.
- [93] **Tian, Y., et al.** (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Mol Cell*, 53(4): p. 606-16.
- [94] **Lee, Y.S., et al.** (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1): p. 69-81.
- [95] **Svobodova, E., J. Kubikova, and P. Svoboda.** (2016). Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflugers Arch*, 468(6): p. 1089-102.
- [96] **Sontheimer, E.J.** (2005). Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2): p. 127-38.
- [97] **Zhang, R., et al.** (2018). Comprehensive Evolutionary Analysis of the Major RNA-Induced Silencing Complex Members. *Sci Rep*, 8(1): p. 14189.
- [98] **Czech, B. and G.J. Hannon.** (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet*, 12(1): p. 19-31.
- [99] **Hutvagner, G. and M.J. Simard.** (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1): p. 22-32.
- [100] **Yuan, Y.R., et al.** (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*, 19(3): p. 405-19.
- [101] **Ameres, S.L., J. Martinez, and R. Schroeder.** (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130(1): p. 101-12.
- [102] **Devasthanam, A.S. and T.B. Tomasi.** (2014). Dicer in immune cell development and function. *Immunol Invest*, 43(2): p. 182-95.
- [103] **Michlewski, G. and J.F. Caceres.** (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*, 25(1): p. 1-16.
- [104] **Kobayashi, H. and Y. Tomari.** (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1859(1): p. 71-81.
- [105] **Hammond, S.M.** (2015). An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 87: p. 3-14.

- [106] **Balasubramanian, S., et al.** (2020). MicroRNAs and Xenobiotic Toxicity: An Overview. *Toxicol Rep*, 7: p. 583-595.
- [107] **Wilson, R.C., et al.** (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*, 57(3): p. 397-407.
- [108] **Cullis, P.R. and M.J. Hope.** (2017). Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol Ther*, 25(7): p. 1467-1475.
- [109] **Dong, Y., D.J. Siegwart, and D.G. Anderson.** (2019). Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 144: p. 133-147.
- [110] **Fakhr, E., F. Zare, and L. Teimoori-Toolabi.** (2016). Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. *Cancer Gene Ther*, 23(4): p. 73-82.
- [111] **Gavrilov, K. and W.M. Saltzman.** (2012). Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*, 85(2): p. 187-200.
- [112] **Selvam, C., et al.** (2017). Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends. *Chem Biol Drug Des*, 90(5): p. 665-678.
- [113] **Rao, D.D., et al.** (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(9): p. 746-59.
- [114] **Martineau, H.M. and I.T. Pyrah.** (2007). Review of the application of RNA interference technology in the pharmaceutical industry. *Toxicol Pathol*, 35(3): p. 327-36.
- [115] **Mowa, M.B., C. Crowther, and P. Arbuthnot.** (2010). Therapeutic potential of adenoviral vectors for delivery of expressed RNAi activators. *Expert Opin Drug Deliv*, 7(12): p. 1373-85.
- [116] **Kumar, L.D. and A.R. Clarke.** (2007). Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): from in vitro to in vivo applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(2-3): p. 87-100.
- [117] **Song, E., et al.** (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, 9(3): p. 347-51.
- [118] **Zhong, X., et al.** (2016). Noncoding RNA for Cancer Gene Therapy. *Recent Results Cancer Res*, 209: p. 51-60.
- [119] **Ganguly, K.K., et al.** (2013). Integrins and metastasis. *Cell Adh Migr*, 7(3): p. 251-61.
- [120] **Kadry, Y.A. and D.A. Calderwood.** (2020). Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862(5): p. 183206.
- [121] **Huang, R. and E.K. Rofstad.** (2018). Integrins as therapeutic targets in the organ-specific metastasis of human malignant melanoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1): p. 92.
- [122] **Nieuwenhuis, B., et al.** (2018). Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 93(3): p. 1339-1362.
- [123] **Ata, R. and C.N. Antonescu.** (2017). Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *Int J Mol Sci*, 18(1).
- [124] **Teoh, C.M., S.S. Tan, and T. Tran.** (2015). Integrins as Therapeutic Targets for Respiratory Diseases. *Curr Mol Med*, 15(8): p. 714-34.
- [125] **Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg.** (2010). Integrins. *Cell Tissue Res*, 339(1): p. 269-80.
- [126] **Guo, W. and F.G. Giancotti.** (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10): p. 816-26.
- [127] **Ginsberg, M.H.** (2014). Integrin activation. *BMB Rep*, 47(12): p. 655-9.

- [128] **Wenke, A.K., et al.** (2007). Expression of integrin alpha10 is induced in malignant melanoma. *Cell Oncol*, 29(5): p. 373-86.
- [129] **Okada, T., et al.** (2016). Integrin-alpha10 Dependency Identifies RAC and RICTOR as Therapeutic Targets in High-Grade Myxofibrosarcoma. *Cancer Discov*, 6(10): p. 1148-1165.
- [130] **Engel, B.E., et al.** (2013). Expression of integrin alpha 10 is transcriptionally activated by pRb in mouse osteoblasts and is downregulated in multiple solid tumors. *Cell Death Dis*, 4: p. e938.
- [131] **Okada, T. and S. Singer.** (2017). Integrin-alpha10 drives tumorigenesis in sarcoma. *Oncoscience*, 4(3-4): p. 31-32.
- [132] **Varas, L., et al.** (2007). Alpha10 integrin expression is up-regulated on fibroblast growth factor-2-treated mesenchymal stem cells with improved chondrogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev*, 16(6): p. 965-78.
- [133] **Bayda, S., et al.** (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1).
- [134] **He, X., H. Deng, and H.M. Hwang.** (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *J Food Drug Anal*, 27(1): p. 1-21.
- [135] **Zhang, Y., et al.** (2019). Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *J Hematol Oncol*, 12(1): p. 137.
- [136] **Guerra, F.D., et al.** (2018). Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules*, 23(7).
- [137] **Deng, C., et al.** (2019). Advances of nanotechnology in osteochondral regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 11(6): p. e1576.
- [138] **Zaimy, M.A., et al.** (2017). New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Ther*, 24(6): p. 233-243.
- [139] **Karthivashan, G., et al.** (2018). Therapeutic strategies and nano-drug delivery applications in management of ageing Alzheimer's disease. *Drug Deliv*, 25(1): p. 307-320.
- [140] **Wolfram, J., et al.** (2015). Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets*, 16(14): p. 1671-81.
- [141] **De Jong, W.H. and P.J. Borm.** (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3(2): p. 133-49.
- [142] **Kumari, P., B. Ghosh, and S. Biswas.** (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target*, 24(3): p. 179-91.
- [143] **Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas.** (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(15): p. 1615-26.
- [144] **Torchilin, V.** (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 63(3): p. 131-5.
- [145] **Muhamad, N., T. Plengsuriyakarn, and K. Na-Bangchang.** (2018). Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review. *Int J Nanomedicine*, 13: p. 3921-3935.
- [146] **Zhuang, Y., et al.** (2016). Aptamer-Functionalized and Backbone Redox-Responsive Hyperbranched Polymer for Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Biomacromolecules*, 17(6): p. 2050-62.
- [147] **Zhong, Y., et al.** (2014). Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules*, 15(6): p. 1955-69.

- [148] **Kumar, S. and C. Li.** (2001). Targeting of vasculature in cancer and other angiogenic diseases. *Trends Immunol*, 22(3): p. 129.
- [149] **Almeida, B., et al.** (2020). Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. *Molecules*, 25(23).
- [150] **Ross, C., et al.** (2018). Liposome delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine*, 13: p. 8507-8522.
- [151] **Vieira, D.B. and L.F. Gamarra.** (2016). Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine*, 11: p. 5381-5414.
- [152] **Spuch, C. and C. Navarro.** (2011). Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). *J Drug Deliv*, 2011: p. 469679.
- [153] **Li, M., et al.** (2019). Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem*, 164: p. 640-653.
- [154] **Chis, A.A., et al.** (2020). Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. *Molecules*, 25(17).
- [155] **Dias, A.P., et al.** (2020). Dendrimers in the context of nanomedicine. *Int J Pharm*, 573: p. 118814.
- [156] **Janaszewska, A., et al.** (2019). Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules*, 9(8).
- [157] **Yousefi, M., A. Narmani, and S.M. Jafari.** (2020). Dendrimers as efficient nanocarriers for the protection and delivery of bioactive phytochemicals. *Adv Colloid Interface Sci*, 278: p. 102125.
- [158] **Maysinger, D., Q. Zhang, and A. Kakkar.** (2020). Dendrimers as Modulators of Brain Cells. *Molecules*, 25(19).
- [159] **Keskin, D. and A. Tezcaner.** (2017). Micelles As Delivery System for Cancer Treatment. *Curr Pharm Des*, 23(35): p. 5230-5241.
- [160] **Hwang, D., J.D. Ramsey, and A.V. Kabanov.** (2020). Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Adv Drug Deliv Rev*, 156: p. 80-118.
- [161] **Yi, Y., et al.** (2018). Polyester micelles for drug delivery and cancer theranostics: Current achievements, progresses and future perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 83: p. 218-232.
- [162] **Trivedi, R. and U.B. Kompella.** (2010). Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles. *Nanomedicine (Lond)*, 5(3): p. 485-505.
- [163] **Raphey, V.R., et al.** (2019). Advanced biomedical applications of carbon nanotube. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 100: p. 616-630.
- [164] **Kunzmann, A., et al.** (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta*, 1810(3): p. 361-73.
- [165] **Zhang, X., et al. (2009).** Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes. *Biomaterials*, 30(30): p. 6041-7.
- [166] **Anaya-Plaza, E., et al.** (2021). Biomolecule-Directed Carbon Nanotube Self-Assembly. *Adv Healthc Mater*, 10(1): p. e2001162.
- [167] **Comparetti, E.J., V.A. Pedrosa, and R. Kaneno.** (2018). Carbon Nanotube as a Tool for Fighting Cancer. *Bioconjug Chem*, 29(3): p. 709-718.
- [168] **Yan, H., et al.** (2019). Toxicity of Carbon Nanotubes as Anti-Tumor Drug Carriers. *Int J Nanomedicine*, 14: p. 10179-10194.

- [169] **Alphandery, E.** (2020). Natural Metallic Nanoparticles for Application in Nano-Oncology. *Int J Mol Sci*, 21(12).
- [170] **Ramrakhiani, L. and S. Ghosh.** (2018). Metallic nanoparticle synthesised by biological route: safer candidate for diverse applications. *IET Nanobiotechnol*, 12(4): p. 392-404.
- [171] **Vimbela, G.V., et al.** (2017). Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*, 12: p. 3941-3965.
- [172] **Rao, P.V., et al.** (2016). Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: p. 3685671.
- [173] **Huynh, K.H., et al.** (2020). Synthesis, Properties, and Biological Applications of Metallic Alloy Nanoparticles. *Int J Mol Sci*, 21(14).
- [174] **Mitchell, M.J., et al.** (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 20(2): p. 101-124.
- [175] **Zielinska, A., et al.** (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16).
- [176] **Hu, C.M., et al.** (2011). Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(27): p. 10980-5.
- [177] **Gutjahr, A., et al.** (2016). Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines (Basel)*, 4(4).
- [178] **Rezvantalab, S., et al.** (2018). PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Front Pharmacol*, 9: p. 1260.
- [179] **Jo, A., et al.** (2020). Fabrication and characterization of PLGA nanoparticles encapsulating large CRISPR-Cas9 plasmid. *J Nanobiotechnology*, 18(1): p. 16.
- [180] **Wu, P., et al.** (2020). Enhanced antitumor efficacy in colon cancer using EGF functionalized PLGA nanoparticles loaded with 5-Fluorouracil and perfluorocarbon. *BMC Cancer*, 20(1): p. 354.
- [181] **Raposo, C.D., C.A. Conceicao, and M.T. Barros.** (2020). Nanoparticles Based on Novel Carbohydrate-Functionalized Polymers. *Molecules*, 25(7).
- [182] **Stromberg, Z.R., et al.** (2021). Formulation of stabilizer-free, nontoxic PLGA and elastin-PLGA nanoparticle delivery systems. *Int J Pharm*, 597: p. 120340.
- [183] **Ding, D. and Q. Zhu.** (2018). Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 92: p. 1041-1060.
- [184] **Caban-Toktas, S., et al.** (2020). Combination of Paclitaxel and R-flurbiprofen loaded PLGA nanoparticles suppresses glioblastoma growth on systemic administration. *Int J Pharm*, 578: p. 119076.
- [185] **Ceylan, S., F. Bahadori, and F. Akbas.** (2020). Engineering of siRNA loaded PLGA Nano-Particles for highly efficient silencing of GPR87 gene as a target for pancreatic cancer treatment. *Pharm Dev Technol*, 25(7): p. 855-864.
- [186] **Park, H., et al.** (2019). Effect of Stabilizers on Encapsulation Efficiency and Release Behavior of Exenatide-Loaded PLGA Microsphere Prepared by the W/O/W Solvent Evaporation Method. *Pharmaceutics*, 11(12).
- [187] **Ananta, J.S., R. Paulmurugan, and T.F. Massoud.** (2016). Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation. *Neurol Res*, 38(1): p. 51-9.
- [188] **Jamali, Z., et al.** (2018). Evaluation of targeted curcumin (CUR) loaded PLGA nanoparticles for in vitro photodynamic therapy on human glioblastoma cell line. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 23: p. 190-201.

- [189] **Todaro, B., A. Moscardini, and S. Luin.** (2022). Pioglitazone-Loaded PLGA Nanoparticles: Towards the Most Reliable Synthesis Method. *Int J Mol Sci*, 23(5).
- [190] **Jain, A.K. and S. Thareja.** (2019). In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47(1): p. 524-539.
- [191] **Cun, D., et al.** (2010). Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *Int J Pharm*, 390(1): p. 70-5.
- [192] **Pho-Iam, T., et al.** (2021). PLGA nanoparticles containing alpha-fetoprotein siRNA induce apoptosis and enhance the cytotoxic effects of doxorubicin in human liver cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 553: p. 191-197.
- [193] **Khan, A.A., et al.** (2019). Therapeutic potential of functionalized siRNA nanoparticles on regression of liver cancer in experimental mice. *Sci Rep*, 9(1): p. 15825.
- [194] **Zhang, C., et al.** (2019). lncRNA CCAT1 promotes bladder cancer cell proliferation, migration and invasion. *Int Braz J Urol*, 45(3): p. 549-559.
- [195] **Cao, Y., et al.** (2017). Long non-coding RNA CCAT1 promotes metastasis and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Exp Cell Res*, 359(1): p. 185-194.
- [196] **Diao, B., et al.** (2017). IQGAP1siRNA inhibits proliferation and metastasis of U251 and U373 glioma cell lines. *Mol Med Rep*, 15(4): p. 2074-2082.
- [197] **Varner, J.A. and D.A. Cheresh.** (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 8(5): p. 724-30.
- [198] **Frisch, S.M. and E. Ruoslahti.** (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, 9(5): p. 701-6.
- [199] **Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti.** (1999) Integrin signaling. *Science*, 285(5430): p. 1028-32.
- [200] **Bruckheimer, E.M., et al.** (1998). The Bcl-2 gene family and apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 62: p. 75-105.
- [201] **Korsmeyer, S.J.** (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res*, 59(7 Suppl): p. 1693s-1700s.
- [202] **Spitz, A.Z. and E. Gavathiotis.** (2022). Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends Pharmacol Sci*, 43(3): p. 206-220.
- [203] **Jeelani, R., et al.** (2020). Hypochlorous acid reversibly inhibits caspase-3: a potential regulator of apoptosis. *Free Radic Res*, 54(1): p. 43-56.
- [204] **Alvarez-Garcia, V., et al.** (2019). Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol*, 59: p. 66-79.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Büşra Nur ÇEVİK

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2019, Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yükseklisans** : 2022, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Tezli Yüksek Lisans Program

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR:

- **Büşra Nur ÇEVİK.** (2022). Glioblastoma Hücrelerinde İntegrin $\alpha 10$ ' nun PLGA Nano Partiküllerine Yüklenmiş siRNA İle Baskılanması. 2. *Uluslararası Ege Sağlık Alanları Sempozyumu*, 7-8 MART / ONLINE.