

**VENETOKLAKS ve siRNA YÜKLÜ ALBÜMİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bilgen ÇALIŞKAN**

**ESKİŞEHİR 2019**

**VENETOKLAKS ve siRNA YÜKLÜ ALBÜMİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Bilgen ÇALIŞKAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU**

**Eskişehir  
Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Kasım 2019**

*Bu tez çalışması BAP komisyonunca kabul edilen 1802S029 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bilgen ÇALIŞKAN'ın "Venetoklaks ve siRNA Yüklü Albümin Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 18/11/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

: Doc. Dr. Gülşay Bulutköroğlu

Üye

: Doc. Dr. Ferrim Yenilmez

Üye.

: Dr. Öğr. Üyesi Arzu M. Saka

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN  
Müdür



## ÖZET

### VENETOKLAKS VE siRNA YÜKLÜ ALBÜMİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Bilgen ÇALIŞKAN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kasım 2019

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Dünya çapında bir sağlık sorunu olan kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize tümör oluşumunun sonucudur. *Bcl-2* geni tarafından kodlanan Bcl-2 proteini, çeşitli apoptotik uyarılara yanıt olarak apoptozun kontrolü ve hücre sağ kalımının arttırılmasında belirgin bir rol oynamaktadır. Venetoklaks (ABT199), *Bcl-2* genini baskılayan ve kronik lenfositik lösemi (KLL) hastaların tedavisinde kullanılan FDA onaylı ilk ilaçtır. Aynı zamanda *Bcl-2* genini baskılayan siRNA'lar üzerinde yapılan çalışmalar artmaktadır. *Bcl-2* geninin siRNA ile spesifik olarak hedeflenip aşağı yönlü regülasyonu sağlandığı zaman, *Bcl-2*'yi aşırı ifade eden kanser hücrelerinde büyüme inhibe edilmekte ve kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığı artmaktadır. Antikanser ilaç ve siRNA ikilisinin birlikte kullanılması, seçici hedefleme yaparak ve ilaç direncini azaltarak terapötik etkinliği sinerjik olarak arttırabilir. Bu çalışmada amaç, *Bcl-2* genini baskılamak için klinikte kullanılan Venetoklaks etkin maddesi ile yine *Bcl-2* genini baskılayan siRNA'nın ayrı ayrı ve birlikte (siRNA/ABT) albümin nanopartiküllerine yüklenerek, bu oluşturulan formüllerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve *Bcl-2* genini aşırı ifade eden meme kanseri hücresi üzerindeki etkinliklerinin *in vitro* araştırılmasıdır. Bunun sonucunda Venetoklaks'ın meme kanseri tedavisinde etkinliğinin değerlendirilmesi ve tedavide taşıyıcı sistem kullanılarak toksik etkilerin minimuma indirilmesi amaçlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Venetoklaks, siRNA, Albümin Nanopartikülleri, Bcl-2, Antisens Teknolojisi

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND EVALUATION OF VENETOCLAX AND siRNA LOADED ALBUMIN BASED CARRIER SYSTEMS

Bilgen ÇALIŞKAN

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, November 2019

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Cancer, a worldwide health problem is the result of a tumor formation characterized by uncontrolled cell proliferation. Bcl-2 protein encoded by the *Bcl-2* gene plays a significant role in controlling apoptosis and increasing cell survival in response to various apoptotic stimuli. Venetoclax (ABT199) is the first FDA approved drug to suppress the *Bcl-2* gene and used in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Also the studies on siRNAs that suppress the *Bcl-2* gene have increased. In cancer cells overexpressing *Bcl-2*, growth is inhibited and the sensitivity of cancer cells to chemotherapy is increased by the *Bcl-2* gene is specifically targeted by siRNA and down-regulated. The combined use of the anticancer drug and siRNA can synergistically increase therapeutic efficacy by selective targeting and reducing drug resistance. The purpose of this study was to determine the physicochemical properties of these formulas and to overexpress the *Bcl-2* gene separately and together (siRNA/ABT) into the albumin nanoparticles, which were used in the clinic to suppress the *Bcl-2* gene *in vitro*. As a result it is aimed to evaluate the efficacy of Venetoclax in breast cancer and to minimize the toxic effects by using a carrier system.

**Keywords:** Venetoclax, siRNA, Albumin Nanoparticles, Bcl-2, Antisense Technology

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalıştığımız süre boyunca desteğini esirgemeyen, yürüttüğüm bu tez sürecinde beni her daim motive eden çok değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Sitotoksisite ve hücre kültürü çalışma yöntemlerini kendisinden öğrendiğim, tecrübelerinden çokça yararlandığım, bu çalışmada emeği büyük olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL'e, yüksek lisans eğitimime değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Alper ÖZTÜRK'e ve Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı tüm bölüm hocalarıma,

Birlikte çalıştığım ve bana her konuda destek olan, başta Rasim MASİMOV ile Serdar ALAGÖZ'e ve laboratuvarı birlikte kullandığım tüm arkadaşlarıma,

Çin Eczacılık Üniversitesi'nde geçirdiğim süre boyunca akademik ve manevi desteği ile değerli proje ve yayınlarda yer almamı sağlayan, bilimle uğraşma motivasyonumu ateşleyen hayat boyu minnettar kalacağım Doç. Dr. Qiu ZHENG'e,

Dil bariyerine rağmen kendilerinden çok şey öğrendiğim Çinli dostlarıma, bana teknik ve manevi desteğini her şekilde ulaştıran meslektaşım, arkadaşım Ayşegül ÖZLÜ'ye, hayata pozitif bakış açısıyla beni her durumda güldürmeyi becerebilen bu süreçte acı, tatlı birçok anı paylaştığım M. Sohail KHAN' a,

Hayatım boyunca verdiğim her kararın arkasında olan, beni cesaretlendiren, sevgisini, desteğini her zaman hissettiğim, bildikleri her şeyi aktarmaya çalışıp beni hayata hazırlayan sevgili anne ve babama, fikirleriyle başka açılardan bakmamı sağlayan, varlığıyla bana güç veren biricik kardeşime,

2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar kapsamında projeme Burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Bilgen ÇALIŞKAN

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜRLER.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Gen Tedavisi.....	3
2.1.1. Tümör hücrelerini hedefleme.....	5
2.1.2. Tümör mikro ortamını hedefleme.....	5
2.2. Gen Aktarılmasında Mekanizmalar ve Hedefler.....	6
2.3. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler.....	7
2.3.1. Nanopartiküller.....	8
2.3.1.1. Polimerik nanopartiküller (PNP'ler) .....	9
2.3.1.2. Polimerik miseller.....	9
2.3.1.3. Lipit tabanlı nanopartiküller.....	9
2.3.1.4. Protein nanopartikülleri.....	10
2.3.1.5. İnorganik nanopartiküller.....	10
2.3.2. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler.....	11
2.3.2.1. Albümin.....	12
2.3.2.2. Kitosan.....	16
2.4. Antisens Teknolojisi ve Oligonükleotitler (ASO) .....	17
2.5. RNAi Mekanizması ve Komponentleri.....	19



2.5.1. Dicer enzimi.....	20
2.5.2. siRNA (Small Interfering RNA, Küçük Engelleyici RNA) .....	21
2.5.3. RISC (RNA İndükleyici Baskılama Kompleksi) .....	21
2.6. Kanser tedavisinde siRNA-Albümin Kompleksinin Potansiyel Etkisi.....	22
2.7. Gen Susturulmasında <i>Bcl-2</i> Geni.....	23
2.7.1. <i>Bcl-2</i> proteinleri.....	23
2.7.2. <i>Bcl-2</i> homoloji bölgeleri.....	24
2.7.3. <i>Bcl-2</i> protein ailesi, yapısı ve etkileşimleri.....	25
2.7.4. Antiapoptotik ve proapoptotik <i>Bcl-2</i> proteinleri arasındaki etkileşim.....	26
2.8. Başlıca Apoptozis Yolakları.....	27
2.8.1. Apoptotik yolda <i>Bcl-2</i> proteinlerinin rolleri.....	28
2.8.2. <i>Bcl-2</i> 'nin aşırı ifade edilmesi.....	28
2.9. <i>Bcl-2</i> Hedefli Tedavi Yaklaşımları.....	29
2.9.1. Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri.....	29
2.9.2. BH3-mimetikleri.....	30
2.9.2.1. <i>Venetoklaks (ABT-199)</i> .....	30
2.9.2.2. <i>Venetoklaks etki mekanizması</i> .....	30
2.9.2.3. <i>Venetoklaks'a direnç mekanizmaları</i> .....	31
3. GEREÇLER.....	32
3.1. Kullanılan Maddeler.....	32
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	32
4. YÖNTEM.....	34
4.1. Formülasyon Çalışmaları.....	34
4.1.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması.....	34
4.2. Ön Çalışmalar.....	34
4.3. F6 Formülasyonunun Karakterizasyon Çalışmaları.....	37
4.3.1. Partikül boyutu ve dağılımı.....	37
4.3.2. Zeta potansiyeli.....	38

4.3.3. F6 formülasyonunun genetik materyal bağlama kapasitesi.....	39
4.3.3.1. <i>Jel retardasyon çalışmaları</i> .....	39
4.3.3.1.1. <i>Kullanılan tamponlar</i> .....	40
4.3.3.1.2. <i>Jelin hazırlanması</i> .....	40
4.3.3.2. <i>Formülasyonlara DNA yüklenmesi</i> .....	40
4.3.3.3. <i>Formülasyonlara siRNA yüklenmesi</i> .....	41
4.4. Venetoklaks (ABT199) Miktar Tayini için Ultra Basınçlı/Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	41
4.4.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması.....	41
4.4.1.1. <i>Doğrusallık</i> .....	42
4.4.1.2. <i>Kesinlik</i> .....	42
4.4.1.3. <i>Doğruluk</i> .....	43
4.4.2. Formülasyonda yüklenen etkin madde (ABT199) miktar tayini.....	43
4.4.3. <i>In vitro</i> salım çalışması.....	44
4.5. Hücre Kültürü.....	45
4.5.1. Sitotoksosite çalışması.....	45
4.5.1.1. <i>Sitotoksik etkileri değerlendirilecek formülasyonların hazırlanması</i> .....	47
4.5.1.1.1. <i>ABT199 çözeltisi hazırlanması</i> .....	47
4.5.1.1.2. <i>siRNA çözeltisi hazırlanması</i> .....	47
4.5.1.1.3. <i>F5 ve F6 Formülasyonlarının seyreltilmesi</i> .....	47
4.5.1.1.4. <i>F5-siRNA ve F6-siRNA kombinasyonunun hazırlanması</i> .....	48
4.5.1.1.5. <i>ABT199 çözeltisi ile siRNA yüklenmesi</i> .....	48
4.5.2. Transfeksiyon.....	48
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	50
5.1. Formülasyon Çalışmaları.....	50
5.2. Albümin Nanopartiküllerine Genetik Materyal Yüklenmesi.....	55
5.3. Formülasyonda yüklenen etkin madde (ABT199) Miktar Tayini .....	60
5.4. <i>In vitro</i> Salım Çalışması.....	62
5.5. Hücre kültürü Çalışmaları.....	66

<b>5.5.1. Sitotoksisite.....</b>	<b>66</b>
<b>5.5.2. Transfeksiyon.....</b>	<b>70</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>75</b>

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Doğal ve sentetik polimerlerden bazıları ve özellikleri.....	12
<b>Tablo 4.1.</b> Formülasyonların içerikleri ve kodları ile partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerinin kıyaslanması.....	37
<b>Tablo 4.2.</b> Hücrelere uygulanan 100 µL besiyeri içerisinde bulunan ABT199, siRNA ve formülasyon miktarları .....	47
<b>Tablo 5.1.</b> Jele yüklenen 1µg DNA ile inkübe edilmiş F5 ve F6 formülasyon miktarları.....	56
<b>Tablo 5.2.</b> 1 µg DNA için F5 ve F6 formülasyonlarının DNA bağlama için minimize edilmiş miktarları.....	57
<b>Tablo 5.3.</b> 7,5 µL F6 Formülasyonuna yüklenebilen maksimum DNA miktarı.....	58
<b>Tablo 5.4.</b> Jele yüklenen siRNA ve Formülasyon miktarları.....	59
<b>Tablo 5.5.</b> UPLC kalibrasyon eğrisi eldesi için ABT199'a ait konsantrasyonlara bağlı Alan / Alıkonma Zamanı değerleri .....	61
<b>Tablo 5.6.</b> ABT199'un zamana bağlı salınan kümülatif madde miktarları.....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kanser gen tedavisinde promoter-operasyon hedefli ifade ilkesi.....	4
Şekil 2.2. Gen transfeksiyon sürecinin şeması.....	7
Şekil 2.3. Antisens oligonükleotitlerin (ASO'lar) etki mekanizması.....	19
Şekil 2.4. RNA interferans mekanizması.....	20
Şekil 2.5. siRNA-albümin kompleksinin kanser hücresi ve sağlıklı hücre üzerine olan etkisi.....	23
Şekil 2.6. Bcl-2 ailesinin yapısı ve Bcl-2 protein ailesi ve bağlanma bölgeleri.....	24
Şekil 2.7. BH3 bölgesinin ve antiapoptotik proteinlerin hidrofobik bölgelerinin etkileşimleri.....	26
Şekil 2.8. Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenen mitokondriyal yolak aracılı apoptoz....	27
Şekil 5.1. DNA yüklenen F5 ve F6 formülasyonlarının jel görüntüleri.....	56
Şekil 5.2. 1 µg DNA için gerekli en düşük F5 ve F6 miktarlarının belirlenmesi.....	57
Şekil 5.3. Formülasyon miktarı sabit tutularak yüklenebilen maksimum DNA konsantrasyonun jel görüntüleri.....	58
Şekil 5.4. Formülasyonların siRNA bağlama yetilerinin jeldeki görüntüleri.....	59
Şekil 5.5. ABT199'nin UPLC kalibrasyon eğrisi [n=6, ort±SH].....	61
Şekil 5.6. Salım mekanizmaları.....	62
Şekil 5.7. Matrisler içinde meydana gelen ve etkin madde salımını sağlayan fizikokimyasal süreçler.....	63
Şekil 5.8. Albümin nanopartiküllerinden pH 5,5'deki 72 saatlik salım profili.....	64
Şekil 5.9. Albümin nanopartiküllerinden pH 7,4'deki 72 saatlik salım profili.....	64
Şekil 5.10. 24, 48 ve 72 saat sonunda NIH-3T3 hücrelerinde belirlenen sitotoksite.....	67
Şekil 5.11. 24, 48 ve 72 saat sonunda MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenen sitotoksite.....	68
Şekil 5.12. NIH-3T3 hücrelerine uygulanmış F5 formülasyonu ve FITC-konjugeli kontrol siRNA transfeksiyon görüntüsü.....	71
Şekil 5.13. MDA-MB 231 hücrelerine uygulanmış F5 formülasyonu ve FITC-konjugeli kontrol siRNA transfeksiyon görüntüsü.....	71

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
ABL	: Abelson Lösemi Proteini
ABT199	: Venetoklaks
Albf	: Albümin Çözeltilisi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ASO	: Antisens Oligonükleotid
bFGF	: Bazal Fibroblast Büyüme Faktörü
BSA	: Bovin serum albümin
°C	: Santigrat Derece
CDK	: Cyclin-Dependent Kinase (Sikline Bağımlı Kinaz)
CS	: Chitosan(Kitosan)
cSLN	: Cationic Solid Lipid Nano particles (Katyonik Katı Lipit Nanopartikülleri)
dak	: Dakika
DKM	: Diklorometan
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EE	: Yükleme Verimliliği
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
EPR	: Gelişmiş Geçirgenlik ve Tutma Etkisi
Etbr	: Etidyum Bromid
FBS	: Fetal Bovin Serum
FcRn	: Yenidoğan Fc Reseptörü
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi)
FITC	: Floressein İzotiyosiyanat
G	: Gram
GFP	: Green Floresan Protein
HDACI	: Histon Deasetilaz İnhibitörleri

HSA	: Human Serum Albumin (İnsan Serum Albümini)
IGF	: İnsulin Growth Factor (İnsülin Büyüme Faktörü)
Kda	: Kilodalton
KLL	: Kronik Lenfosötik Lösemi
KLN	: Katı Lipit Nanopartikül
L	: Litre
Mg	: Miligram
miRNA	: MikroRNA
MI	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MTO	: Mitoksantrone
MTT	: 3-(4, 5-Dimetil-2-tiyazolil)-2, 5-difenil -2H tetrazolium bromür
Ng	: Nanogram
OVA	: Ovalbümin
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat sodyum klorür tamponu)
PDGFR	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktörler
PDI	: Polidisperslik İndisi
PEG	: Polietilenglikol
PEI	: Polietilenimin
PLGA	: Poli (D,L-laktit-ko-glikolit)
PLL	: Poli (L-lisin)
PNP	: Polimerik nanopartiküller
PPI	: Poli (propilenimin)
RISC	: RNA-Induced Silencing Complex (RNA ilişkili susturma kompleksi)
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA İnterferans
RoSV	: Rous Sarkom Virüsü
Rpm	: Round Per Minute (Dakikada Dönüş Hızı)
SH	: Standart Hata
siRNA	: Small interfering RNA (Küçük susturucu RNA)
SPARC	: Salgılanmış Protein Asidik ve Sistein Bakımından Zengin

TBE	: Tris-borik asit EDTA
TE	: Tris/EDTA
TFA	: Trifluoroasetik Asit
TGF	: Transforme Büyüme Faktörü
TLS	: Tümör Lizis Sendromu
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TON	: Terapötik oligonükleotitler
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
Tris-HCl	: Hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmış Tris Çözeltisi
Tween80	: Polioksietilen-80-sorbitan monooleat
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında bir sağlık sorunu olan kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize tümör oluşumunun sonucudur. Kontrolsüz çoğalma DNA'daki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkar ve hücrelerin apoptozunu engeller. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü tip I) ve otofajik hücre ölümleri (tip II programlı hücre ölümleri), istenmeyen ve malign hücrelerin gelişimini, homeostazı ve eliminasyonunu kontrol eden önemli fizyolojik mekanizmalardır. *Bcl-2* geni tarafından kodlanan Bcl-2 proteini, çeşitli apoptotik uyarılara yanıt olarak apoptozun kontrolü ve hücre sağ kalımının artırılmasında belirgin bir rol oynamaktadır. Bcl-2 anti apoptatik proteini, ölüm agonistleri veya ölüm antagonistleri olarak kategorize edilebilen ilgili proteinlerin bir üyesi olarak tanınmaktadır. Venetoklaks (ABT199), *Bcl-2*'yi aşırı ifade edildiği tümör hücrelerinde hücre sağ kalımında önemli bir uyarıcı yolağı bloke eder ve hücre ölümüne yol açar. ABT199, kanser hücrelerinde Bcl-2 proteinini hedefleyen ve Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastaların tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylanan (Nisan 2016) ilk ilaçtır. Tümör hücrelerinde *in vitro* koşullarda inhibe edici özelliği gözlemlenmiş olmasına rağmen KLL dışında klinik uygulaması mevcut değildir (AbbVie Inc., 2016).

Birçok kanser türü için birincil tedavi ajanı olarak kabul edilen ilaçlar, belirli bir süre sonra ciddi doz sınırlayıcı yan etkileri göstermektedir. Buna ek olarak, intrensek veya zamanla kazanılmış çoklu ilaca direnç, tedavi sırasında karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir. *Bcl-2*'nin aşırı ifadesi de bazen çeşitli kanser türleri için kemoterapi ve radyasyona karşı direnç gelişmesine yol açabilir. Son zamanlarda, çeşitli modellerde aşağı doğru gen ekspresyonunu düzenleyen küçük susturucu RNA'lar (siRNA'lar) kullanılarak, potansiyel terapötik çalışmalarda bu metodolojinin etkinliği araştırılmaktadır. İki veya daha fazla terapötik yöntemin farklı etki mekanizması ile kombinasyonu, kanser tedavisinde umut verici bir tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir. Bu yaklaşımda antikanser ilaç ve siRNA'nın birlikte kullanılması, albümin taşıyıcı sistemler aracılığı ile hedef seçiciliğinin artırılarak tedavide toksik etkinin azaltılması, etkili şekilde ilaç direncine karşı koyulabilmesinin sağlanması ve böylece terapötik etkinliğin sinerjik olarak artırılması söz konusudur.

Bu tez kapsamında, ABT yüklenmiş, siRNA yüklenmiş ve ABT/siRNA yüklenmiş olmak üzere üç farklı albümin bazlı nanopartiküllerin hazırlanarak, etkinliklerinin

değerlendirilmesi amaçlanmıştır. FDA onaylı ABT'in albümin ile formülasyonunun geliştirilerek, ABT'in *Bcl-2*'nin aşırı ifade edildiği meme kanseri hücreleri üzerindeki etkinliğinin araştırılması ve ABT ile *Bcl-2* siRNA'nın ayrı ayrı ve beraber albümin nanopartiküllerine yüklenmesi ile sinerjik etkiye bağlı doz azaltımın dolayısıyla doza bağımlı toksisitenin hücre bazda araştırılması ilk kez bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, geliştirilen sistemlerin karakterizasyon çalışmaları *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENELBİLGİLER

### 2.1. Gen Tedavisi

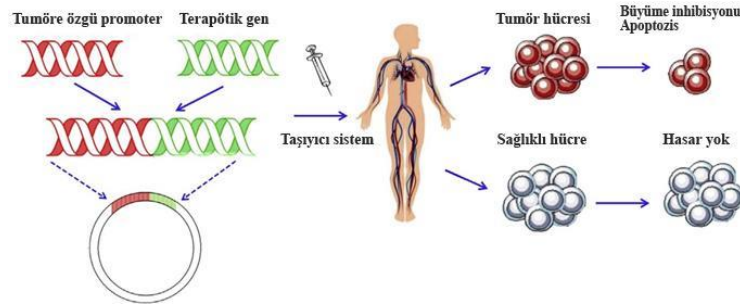
İlk insan gen transferinin 1989'da yapılmasından sonra gen tedavisi çalışmalarında son 30 yılda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Kalıtsal mutasyonları düzeltmek için genom düzenleme teknolojileri ve etkili immün hücre gen tedavisi temel olarak klinik pratiğe dönüşmektedir (Kanad M., 2019).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan genetik ve çevresel koşulların etkilediği kompleks bir hastalıktır. Cerrahi, kemoterapi, radyasyon ve diğer konvansiyonel tedavi seçenekleri olan kanser türleri için bile hala sağ kalım oranları çok düşüktür. Kanserlin klinik sonuçlarını iyileştirmek için güvenli ve etkili alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, dünya çapında araştırmacılar için önemli bir amaç haline gelmiştir. Kanser hastaları için yaygın bir tedavi yaklaşımı olan kemoterapinin başarısı, tümör hücrelerinin normal hücrelere göre seçiciliğinin az olması, tümör dokuya ulaşan ilaç konsantrasyonunun yetersiz kalması, sistemik toksisite göstermesi ve ilaca dirençli tümör hücrelerinin ortaya çıkması nedeniyle sınırlıdır (Fitzmaurice C. vd., 2013).

Biyoteknolojinin gelişmesiyle birlikte malign tümörleri, kardiyovasküler hastalıkları, otoimmün bozuklukları tedavi etmek için gen tedavisi çalışmaları hız kazanmıştır. 2004'te, dünyanın ilk listelenen gen tedavisi ilacı (Gendicine) da kanser tedavisinde kısıtlı bir şekilde uygulanmış olup, kanserlerde de gen tedavisinin aktif ve önemli bir araştırma alanı olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, kanserde gen tedavisinin etkili şekilde uygulanabilmesi için çözülecek birçok problem vardır. Geliştirilen yeni terapötik ajanların uygulamada yer alabilmesi için iki kilit faktör; hedefleme etkinliği ve güvenliğidir. Ayrıca bu terapötik ajanlardan istenen, tümör hücreleri üzerinde etkili olurken normal hücrelere zarar vermemesidir (Zhou J., 2014).

Kanser oluşumunun temellerinden biri, hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekleyen proteinlerde ve reseptörlerde mutasyona veya değişikliklere yol açan genetik profilin değişmesi esasına dayanır. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırabilen bu spesifik genetik değişiklikler moleküler hedefli ilaçların geliştirilmesinde oldukça önemlidir (Røsland ve Engelsen, 2015).

Son zamanlarda hedeflenen tedaviler, kanser hücrelerine özgüllüğü nedeniyle hedef hücrelerde toksisite gösterecek ancak normal hücrelerde oluşan hasarı minimize edecek şekilde tasarlanmaktadır. Bu yaklaşım kanser hücrelerinde, kanser büyümesini destekleyen doku ortamına özgü belirli genleri veya proteinleri hedef alır. Tedavinin etkinliği, normal dokularda oluşan hedef dışı yan etkileri en aza indirirken, hastalık bölgesinde terapötiklerin salınmasıyla doğrudan ilgilidir. Kanser bölgesine hedefli tedavilerde genellikle, kanser hücresi proliferasyonunu bloke eden, hücre döngüsü düzenlemesini teşvik eden, apoptoz veya otofajiyi indükleyen ilaçların geliştirilmesine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar FDA tarafından onaylı birçok moleküler hedefe yönelik tedavi meme, lösemi, kolorektal, akciğer ve yumurtalık kanserleri de dahil olmak üzere sayısız kanser türünün tedavisinde dikkate değer klinik başarı göstermiştir (Lee vd., 2018). Tedavi için seçilen moleküler hedefler arasında büyüme faktörleri, sinyal molekülleri, hücre döngüsü proteinleri, apoptoz modülatörleri ve anjiyogenezi destekleyen moleküller bulunmuştur (Chabner ve Roberts Jr, 2005). Bu nedenle, belirlenen hedefin tanımlanması ve moleküler ilişkisinin belirlenmesi etkili ilaç geliştirilmesinde önemlidir (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Kanser gen tedavisinde promotor-operasyon hedefli ifade ilkesi (Chen vd., 2018)

Gen tedavisi, deoksiribonükleik asit (DNA) veya ribonükleik asitten (RNA) oluşan genetik materyali, anomalliğe sebep olan genetik rahatsızlıkları düzeltmek amacıyla hücre içine aktarılması olarak tanımlanabilir. Bu tedavi yönteminde mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genin terapötik gen ile değiştirilmesi, onkogen ifadesinin inhibe edilmesi, tümöre karşı immün tepkinin uyarılması, siRNA veya antisens oligonükleotitler gibi genetik materyaller ile kanser hücrelerinin yok etmek ya da büyümesini engellemek veya tümör ilişkili anjiyogenezi sürecinin inhibe edilmesi gibi mekanizmalarla gerçekleştirilebilmektedir.

Gen tedavisinde kullanılan yöntemler arasında immünoterapi, onkolitik viroterapi, mikroortam modülasyonu, RNA etkileşimi, oligonükleotit terapötikler, hedeflenen genomik müdahaleler, gen düzenleme ve gen transferi bulunmaktadır (Sadelain, 2016). Terapötik oligonükleotitler (TON), oligonükleotit sentezi ve taşıyıcı sistem teknolojilerindeki son gelişmeler sayesinde gen tedavisinde önemli bir alternatif haline gelmiştir. Bu sistemler, tümör hücrelerini ya da tümör mikro ortamını hedefleyerek etki gösterirler (Palomino-Vizcaino G., 2019).

### **2.1.1. Tümör hücrelerini hedefleme**

Moleküler hedefli gen tedavisinde anahtar mekanizmalardan biri, tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesidir. Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis, normal hücrelerin homeostazını korumak için istenmeyen, zarar görmüş veya anormal hücrelerin ortadan kaldırılması anlamına gelmektedir (Hassan vd., 2014). Bununla birlikte, apoptoz sürecinin devre dışı bırakılması, tümör oluşumunu teşvik etmede önemli bir rol oynamaktadır ve bu da birçok tümör tipinde tedavi direncine yol açmaktadır (Zivny vd., 2010). Örneğin, Bcl-2 familyası proteinleri, apoptotik düzenleyici yolların modülasyonu yoluyla kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir. Bir antiapoptotik Bcl-2 inhibitörü olan Venetoklaks, Bcl-2 proteinlerine güçlü bağlanma kabiliyeti sayesinde KLL'de apoptozise yol açarak etkisini göstermektedir (Zhu ve Almasan, 2017).

### **2.1.2. Tümör mikro ortamını hedefleme**

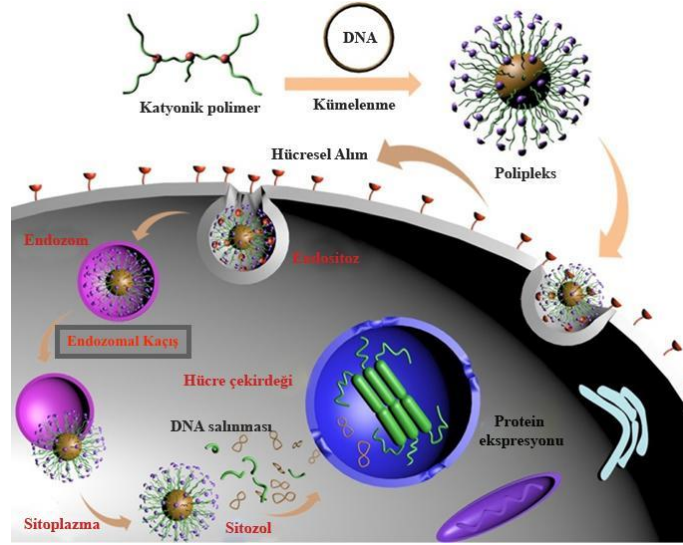
Tümör ve tümör mikro ortamı arasındaki karmaşık iletişim, kanserin tüm aşamalarında vardır. Birçok çalışma, mikro ortamın, tümör hücrelerini normalleştirebildiğini ortaya koymuş olup kendi başına hedeflenen ablasyondan ziyade, stromal kompartmanın yeniden düzenlenmesinin, kanser tedavisi için etkili bir strateji olabileceğini öne sürmüştür (Daniela F., 2013). Doğrudan hücre içi değişiklikler de dahil olmak üzere, bir tümörün oluşması ve ilerlemesi hem komşu kanser hücrelerine hem de mikro ortamı oluşturan normal hücrelere bağlı hücre içi temaslarla ilişkilidir. Tümör stromasının bileşenleri arasında kansere bağlı fibroblastlar ve immün sistemin çeşitli hücreleri bulunmaktadır. Tedavi direnci mekanizmalarının, öncelikle tümörün mikro ortamındaki hücrelerde meydana gelen

değişiklikler tarafından sağlandığı öne sürülmüştür. Bu sebeple bu mikro ortamdaki hücrelerde tümör gelişimden sorumlu belirteçlerin hedeflenerek ilaç geliştirilmesi önemli bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. (Røsland ve Engelsen, 2015). Kanser ilişkili fibroblastlar (cancer-associated-fibroblasts), immün hücreler (örn., tümörle ilişkili makrofajlar), kanser kök hücreleri ve vasküler endotel hücreleri, tümör mikro ortamının önemli bileşenleri arasındadır. Bununla birlikte, tümör hücresinin çoğalması, metastazı, besin ve oksijen temini büyük ölçüde tümör damarlarının oluşumuna bağlıdır (Clarke ve Sharma, 2006). Bu amaçla da vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), bazal fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforme büyüme faktörü (TGF), tümör nekroz faktörü (TNF), trombosit kaynaklı endotel büyüme faktörü (PDGFR), granülosit koloni uyarıcı faktörler, plasental büyüme faktörleri, interlökin-8, hepatosit büyüme faktörü, integrin ve epidermal büyüme faktörleri gibi proteinler hedef alınarak anjiyogenezi inhibe edebilen antianjiyogenez ilaçlar tasarlanmıştır (Carmeliet, 2003).

## **2.2. Gen Aktarılmasında Mekanizmalar ve Hedefler**

Gen tedavisinde, fonksiyonel genetik materyallerin öncelikle doku hücrelerine güvenli bir şekilde yüksek bir etkinlik seviyesinde taşınması ve ardından terapötik işlevlerini yerine getirmeleri istenmektedir (Hirn vd., 2010). Korunmadan, serbest (veya çıplak) DNA, birkaç dakika içinde kandaki veya hücresel bölümlerdeki (endozomlar ve lizozomlar) çeşitli enzimler tarafından bozulabilmektedir (Maeda vd., 2001). Dahası, DNA yüksek negatif yük yoğunluğuna sahip çok büyük bir molekül boyutuna (binlerce baz çiftinden oluşur) sahiptir, bu da güçlü elektrostatik etkileşim nedeniyle hücreler tarafından alınmayı çok zorlaştırmaktadır (Matsumura ve Maeda,1986). Gen tedavisi verimliliğini arttırmak için, genetik materyal genellikle, nanopartiküller gibi bir taşıyıcı vektör ile paketlenmekte ve daha sonra hedef doku hücrelerine ulaştırılmaktadır. Etkili bir gen taşıyıcı vektör; (1) genetik materyali nano boyutlu partiküllere yüksek verimle paketleme, (2) paketlenmiş genetik materyali enzimler tarafından bozulmaya karşı koruyabilme; (3) fagositik hücreler ve retiküloendotelial sistemler tarafından hızlı nanopartikül klirensini önleyebilme; (4) taşıyıcı vektörün yüzeyinin modifikasyonu ile çeşitli etkileşimler yoluyla doku hücre zarı yüzeyine hedeflenip geçişini kolaylaştırabilme; (5) belirli endositoz yolları ile hücreler tarafından

genetik materyalin alımına aracılık etme; (6) taşınan genetik materyalin endozomal bölmelerden kaçmasına yardım etme; ve (7) sitoplazmada paketli genetik materyali belirli bir zamanda serbest bırakma özelliklerinin çoğuna sahip olmalıdır (El-Say ve El Sawy, 2017).



Şekil 2.2. Gen transfeksiyon sürecinin şeması (El-Say ve El Sawy, 2017)

### 2.3. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler

Gen tedavisiyle yeni genler hücrelere aktararak mevcut anormal genler değiştirilebilmekte veya belirli genlerin ifadesi düzenlenebilmektedir. Genellikle, bazı nükleik asitleri hedef hücrelerin hücre membranından sokmak istenilen hedefe ulaşmak için yeterlidir; ancak, moleküllerin negatif yükü ve hücresel membranın negatif doğası nedeniyle, basit pasif difüzyon yöntemleriyle hücre zarına degridenmeden geçmeleri oldukça zordur (Matar vd., 2015). Kendi genetik materyallerini konakçı hücrelere doğal olarak aktarma kabiliyetleri sebebiyle, viral vektörlerin gen tedavisinde oldukça etkili bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir, fakat bunun yanı sıra viral vektörler, birçok toksisite belirtisi, yan veya hedef dışı etkiler de göstermiştir (Soleimani vd., 2016). Viral vektörlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için, viral olmayan vektörler geliştirilmiştir. Bu vektörler, viral olanlardan daha güvenlidir çünkü immün reaksiyonlara ve mutajenlere neden olma olasılığı daha düşüktür, ayrıca daha düşük maliyetli olup üretilmeleri kolaydır (Gawande vd., 2015).

Bu amaçla geliştirilen bu taşıyıcı sistemler, nanometrik büyüklükleri (nanopartiküller), yüksek yüzey hacim oranı ve kararlılıkları nedeniyle gen aktarımı için uygun bir seçenektir. Nanopartiküllerin immünojenik olmaması gen tedavisinde viral olmayan vektörleri ideal bir seçenek haline getirmektedir (Liu vd., 2016; Jin ve Ye, 2007). Bununla birlikte, nanopartikül bazlı gen tedavisinin klinik uygulamalar için, biyobozunurluğu ve biyoyumluluk dahil, fizyolojik sıvılarda toplanma, istenmeyen dokularla spesifik olmayan adsorpsiyon, hedef dokulara ulaşmada düşük verimlilik, hücre içine alınma ve endozomal kaçış gibi sorunları vardır (Miele vd., 2012). Polimerik nanopartiküller, yüksek kararlılık ve biyoyumluluk dahil olmak üzere, üstün gelen özelliklerinden dolayı gen taşıyıcı sistemler olarak ilgi çekmiştir. Gen taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler arasında katyonik polimer, DNA ve RNA moleküllerinin iletimi için en yaygın olarak kullanılan polimerlerdir. Katyonik polimerler, DNA'yı elektrostatik olarak bağlayabilmektedir. Bunlar, adsorptif endositoz veya reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınmakta ve lizozomlara taşınmaktadır (Patnaik ve Gupta, 2013).

### **2.3.1. Nanopartiküller**

Nanopartiküller 1-100 nm boyutlarında olan kolloidal yapılardır. Sentetik veya doğal kaynaklı bir makromolekülden meydana gelmektedir. Üretimlerinde genellikle lipidik ve polimerik yapılar kullanılmaktadır. Polimerik sistemlerde kullanılan her polimerin kendine has özelliği, bunlarla hazırlanan nanopartiküllere çeşitli özellikler kazanmaktadır. Polimer bazlı nanopartiküllerinde düşük sistemik toksisite göstermeleri, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması, dokulara etkin madde hedefleyebilmesi ve kontrollü etkin madde salımı gibi avantajlı özellikleri vardır. Yüzey alanı/hacim oranının mikropartiküllere göre çok yüksek olması hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda daha çok tercih edilmesini sağlamaktadır. Nanopartiküller kanser teşhis ve tedavisinde, hedefli ilaç salımında, biyosensör olarak tıp ve biyoteknoloji alanlarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Khan vd., 2017).



### **2.3.1.1. Polimerik nanopartiküller (PNP'ler)**

Polimeriknanopartiküller (PNP'ler), uygun özelliklerinden dolayı biyomalzemeler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Biyouyumlulukları nedeniyle kolayca sentezlenmekte ve uygulanabilmektedir. PNP'ler, ilaçları insan vücudunda hedeflenen bölgeye taşıyabilmektedir. Terapötikleri daha stabil hale getirmekte ve etkin madde bileşenlerinin aktivite süresini uzatmaktadır (Kayser vd., 2005). İlaçlar genellikle dolaşımın artırılması veya çözünürlüğün artırılması için hidrofilik bir polimere bağlanmaktadır (Alconcel vd., 2011). En iyi bilinen polimer polietilenglikoldür (PEG). PEGilasyonun, etkin maddenin plazmadaki biyolojik yarı ömründe önemli bir artışa neden olduğu bilinmektedir (Benbrook, 2015).

### **2.3.1.2. Polimerik miseller**

Polimerik miseller, hidrofobik iç çekirdeklerinden ve sulu çözeltide dağılmalarını mümkün kılan polar dış yüzeylerinden dolayı hidrofobik ilaçların kontrollü salınımında kullanılabilirler (Xu vd., 2013). Ayrıca, birleştirilen misellerin boyutu ve morfolojisi, hidrofobik-hidrofilik denge nedeniyle diğer faktörlerin yanı sıra kontrol edilebilmektedir. Ek olarak, bu malzemeler geleneksel yüzey aktif madde bazlı miseller ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir kararlılığa sahiptir (Oerlemans vd., 2010).

### **2.3.1.3. Lipit tabanlı nanopartiküller**

En çok kullanılan lipit bazlı nanopartiküller lipozomlardır; hedeflenen ligandları lipozom ilaç taşıyıcılarına entegre edebilen, yeni potansiyel kombinasyonlar yaratabilen, terapötik verimi artırabilen ve kolay sentezlenen nanopartikül türüdür. Farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çoklu moleküllerin hızlı entegrasyonuna kimyasal olarak izin veren sulu bir çekirdeği çevreleyen bir fosfolipit tabakasına sahiptir (Bangham vd., 1965). Yüksek toksisite veya düşük biyoyararlanıma sahip ilaçlar, dolaşımdaki lipozomların dengeleyici doğasından ve geliştirilmiş biyodağılımından yararlanmaktadır. Lipozomların ana avantajları olarak, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler üzerinde kontrol sağlayabilmeleri, gelişmiş biyoyararlanım ve sınırlı toksisiteye sahip olmaları

gösterilmektedir. Bu özellikler, lipozomlara konvansiyonel tedavinin sınırlamalarını aşma yeteneği kazandırmıştır (Bulbake vd., 2017).

#### **2.3.1.4. Protein nanopartikülleri**

Protein nanopartikülleri, dolaşımdaki serum proteinin doğal özelliklerine sahip olduklarından dolaşım sırasında ilaç bileşiklerinin kanda çözünmesini ve taşınmasını sağlayacak karakterdedir. Bu nedenle, ilaçlar, toksisiteyi azaltmak için doğal proteinlerle birleştirilmiştir. Ayrıca, proteinlerin PEGilasyonu 1970'lerin başında ilacın kandaki ömrünü uzatmak ve immünojenikliğini azaltmak için bir strateji olarak geliştirilmiştir (He vd., 2013). Son yıllarda albümin, terapötik ajanlar için önemli bir taşıyıcı olarak görülmektedir, çünkü serbest ilacın farmakokinetik ve toksikolojik profilini iyileştirmektedir. Diğer nanotaşıyıcı sistemler gibi, albümin partikülleri de pasif olarak tümörlerin bulunduğu bölgede birikmektedir. Ek olarak, albümin molekülleriyle kompakt hale getirilmiş nanopartiküllerinin, ilaç taşıyan albümin moleküllerine ayrışmasından sonra, spesifik albümin-reseptör aracılı hücresel alım mekanizmaları da çalışmalara konu olmuştur (Foote, 2007; Desai vd., 2006). Artan sayıda albümin bazlı terapötik ajanlardan en bilineni konjuge paklitaksel ile albümin nanopartiküllerinden oluşan Abraxane'dir. 2005 yılında FDA tarafından onay almış albümin bazlı ilaç taşıyıcı sisteme örnek ilk ilaç olmuştur (Hawkins vd., 2008). Abraxane, dolaşımdaki artmış yarı ömür ve aşırı duyarlılık reaksiyonu göstermemesi nedeniyle Paklitaksel'e kıyasla avantajlara sahiptir. Bu da, protein-ilac nanopartiküllerinin, toksisiteyi ve istenen hedefe pasif iletimi arttırmak için uygun olduğunu göstermiştir (Nyman vd., 2005; Lohcharoenkal vd., 2014).

#### **2.3.1.5. İnorganik nanopartiküller**

İnorganik nanopartiküller, yüksek hücre içi alım kapasiteleri, immünojenik olmayan tepkileri ve düşük toksisiteleri nedeniyle ilaç veya gen taşıyıcılar olarak önemli bir role sahiptir. Altın, gümüş ve platin gibi metal bazlı nano konjüгатların birçok biyomedikal uygulaması vardır; ilaç dağıtımında (proteinler, peptitler) hücresel bileşenleri görselleştirmek için elektron mikroskopisinde prob olarak, birçok hastalığı teşhis ve tedavisinde kullanılmaktadır (Huang vd., 2011; Marciello vd., 2016).

### 2.3.2. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler

Polimerik partiküllerin hazırlanmasında doğal ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır. Albümin, aljinat, jelatin, kitosan sıklıkla kullanılan doğal polimerlerdir. Sentetik polimerler ise poliakrilatlar, polikaprolaktonlar, polilaktitler ve kopolimerleri, poliglikolitler olarak sınıflandırılmaktadır. Nanotaşıyıcı sistem tasarlanırken kullanılacak polimerin yapısı, çözünürlüğü, molekül ağırlığı gibi özellikleri iyi bilinmelidir. Kullanılacak polimer inflamasyon yapmamalı, teratojenik, kanserojenik ve toksik olmamalıdır. Ayrıca polimerin vücutta parçalanabilir olup olmaması da önemlidir. Vücutta parçalanabilen polimerler suda çözünmemekte ancak biyolojik sıvılarda hidroliz olmakta veya enzimlerle parçalanabilmektedir. Vücutta parçalanamayan polimerler ise hidrofilik ya da hidrofobik yapıda olabilirler. Hidrofilik olanlar hidrojeller olarak bilinmekte ve çapraz bağlanma yüzdelere göre şişme özelliği göstermektedir. Hidrofobik polimerler suda çözünmez, vücutta aşınmaz ve şişmezler (Gürsoy, 2004; Nagarwal vd., 2009; Yadav vd., 2012). Polimerik partikül sistemlerin hazırlanmasında daha çok vücutta parçalanabilen polimerler tercih edilmektedir. Bu polimerler, sentetik veya doğal, *in vivo* koşullarda enzimatik veya enzimatik olmayan ya da her iki yolla parçalanabilen, biyolojik olarak uyumlu, toksikolojik olarak güvenli, normal metabolik yollardan elimine olabilen polimerlerdir. Aljinat, kitosan, PLGA gibi polimerler pek çok formülasyonda kullanılmaktadır (Makadia ve Siegel, 2011). Doğal hidrofilik polimerlerden üretilen partiküllerin daha iyi etkin madde yükleme kapasitesine sahip olduğu, daha biyo uyumlu olduğu ve retiküloendotelial sistem tarafından tutulmanın daha düşük olduğu gösterilmiştir (Elzoghby vd., 2012). Tablo 2.1’de polimerik partiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimer örnekleri verilmiştir (Fung ve Saltman, 1997).

**Tablo 2.1.** Doğal ve sentetik polimerlerden bazıları ve özellikleri

Polimerler	Polimer Grupları	Örnek
Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilenler	<i>Proteinler</i>	BSA ve HSA, kolajen, jelatin
	<i>Polisakkaritler</i>	Selüloz, dekstran, kitosan, aljinat, hiyaluronik asit
	<i>Poliamidler</i>	Poli amino asit
Sentetik ve Biyolojik olarak parçalanabilenler	<i>Polyesterler</i>	Poli(laktik asit) Poli(glikolik asit) Poli(kaprolakton)
	<i>Polianhidridler</i>	
	<i>Poliortoesterler</i>	Polifosfat, polifosfonat
	<i>Polifosfoesterler</i>	
Sentetik ve biyolojik olarak parçalanamayanlar	<i>Poliakrilatlar</i>	Poli(metil metakrilat)

### 2.3.2.1. Albümin

Albümin, biyolojik olarak parçalanabilmesi, *in vivo* koşullarda metabolize olup zararsız bozunma ürünleri oluşturması, toksik ve immünojenik olmaması, kolay saflaştırılması ve suda çözünebilmesi nedeniyle enjeksiyonluk uygulamaya imkan veren makromoleküler bir ilaç taşıyıcıdır. Formülasyonlarda genellikle, ovalbümin (OVA), BSA ve insan serum albümini (HSA) çeşitleri kullanılmaktadır (Kumar, 2000; Elzoghby vd., 2012).

Ovalbümin, yumurta albümini olarak bilinen oldukça fonksiyonel bir albümindir. Ulaşılabilmesi kolay ve diğer proteinlere göre ucuz olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Sıcaklığa ve pH'a duyarlı özellikleri nedeniyle kontrollü salım sistemlerinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Elzoghby vd., 2012).

BSA, bol bulunması, düşük maliyeti, kolay saflaştırılması, ligandbağlanma özellikleri ve ilaç endüstrisi tarafından onaylanması nedeniyle sıklıkla kullanılan bir diğer çeşit albümindir (Elzoghby vd., 2012).

HSA, plazmada bol olarak bulunan ve ortalama 19 günlük yarı ömrü olan bir proteindir. BSA, olası bir immünojenik yanıtın önlenmesi amacıyla HSA ile süstitüe edilmektedir. İnflamasyonlu dokulara ve tümör hücrelerine öncelikli alınması, biyolojik olarak

parçalanması ve toksisiteyi bertaraf etmesiyle HSA, ideal bir ilaç taşıyıcı adaydır (Elzoghby vd., 2012). Albüminin yüklü amino asit içeriği sayesinde pozitif veya negatif yüklü bileşiklerle elektrostatik adsorbsiyon sonucu birleşmesi kolaydır. Bununla birlikte, amino ve karboksil grupları gibi fonksiyonlu gruplar içermesi nedeniyle albümin mikro/nanopartiküllerinin ligand ile birleşmesi kolaylaşmakta ve bu özellik hedeflendirme için büyük avantaj sağlamaktadır (Elzoghby vd., 2012).

Albümin, yaklaşık 40 mg/mL konsantrasyona ve ~ 67 kDa moleküler ağırlığa sahip, insan kanında en bol bulunan proteindir (Larsen vd., 2016). Özellikle, 19 günlük yarılanma ömrüne sahip olması nedeniyle dolaşımında oldukça uzun bir süre kalabilmektedir (Sleep vd., 2013). Albümin karaciğerde sentezlenmekte ve dokuya ekstrasvazasyon yaptığıında, bir doğal geri dönüşüm mekanizması vasıtasıyla lenfatik sistem yoluyla vasküler alana geri döndürülmektedir. İntravasküler boşluğa giren yaklaşık 13-14 g albümin kütlesi de her gün katabolize edilmektedir. Önemli olarak, albüminin hem endojen hem de eksojen bileşiklerin çok çeşitli bir taşıyıcısı olduğu bilinmektedir (Kragh-Hansen, 1981). Bu, uzun zincirli yağ asitleri gibi normal hidrofobik moleküllerin yanı sıra bilirubin, çinko ve bakır gibi metal iyonları ve varfarin ve ibuprofen gibi terapötik ilaçlar gibi çeşitli ligandların çeşitli kolloidal sistemlerle taşınmasını kolaylaştırmaktadır (Neumann ve Fiehn, 2010).

Albümin, plazma pH'ını düzenleme ve ozmotik basıncın sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır Kan içerisinde taşıyıcı olabilmesi gibi doğal özellikleri ile albümin, farklı besin maddelerinin ve metal iyonlarının taşınımını regüle etmekte, ayrıca farmasötiklerin biyoyaralanımlarının ve stabilizasyonlarının artmasını sağlamaktadır. Bu nedenle albümin molekülü farklı terapötik ajanların yüklenmesi ve taşınımı için kullanılabilir. Yapılan çalışmalar neticesinde, albüminin tümör bölgelerinde birikebileceği saptanmıştır. Albümin, büyüyen tümör hücreleri tarafından amino asit ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Frei, 2011). Albüminin kan dolaşımından ekstrasvasküler boşluğa taşınması belirli bir reseptör aracılığı ile gerçekleştirilir. Albüminin endotel duvarındaki gp60 reseptörüne (60 kDa'luk bir glikoprotein) bağlanması ile taşınımı (transitöz) başlatılır. Bu reseptör ligand etkileşimi ile vezikül oluşumu (kaveola) ve plazma membranından ekstraselüler boşluğa geçişi sağlanır. Tümör hücreleri arasında ise SPARC reseptörü aracılığı ile albüminin birikmesi sağlanır. 43 kDa'luk bir glikoprotein olan SPARC gp60'a benzerlik göstermekle beraber albümine karşı yüksek afiniteye sahiptir. (Yan ve Sage, 1999). SPARC'ın aşırı

ekspresyonu, tümör yayılımı ve metastazla ilişkilendirilmiş, albüminin SPARC'a bağlanması ve tümör hücreleri tarafından alınımı in vitro ve in vivo tümör modellerinde gösterilmiştir (Elsadek ve Kratz, 2012). Tümör hücrelerinde SPARC'ın aşırı ekspresyonu sonucu albüminin de miktarında artışın olduğu, bu nedenle albümin taşıyıcı sistemlere yüklenen ilaçların tümör hücrelerine daha etkin bir şekilde taşındığı öngörülmektedir (Jiang vd., 2017; Parodi vd., 2019).

Gp60, sürekli vasküler endotel ve alveolar epitelde bulunan bir reseptördür. Albümin, Gp60-albümin'in hücre yüzeyinde kümelenmesini ve kaveola oluşumu için kritik olan ana protein olan Cav-1 ile birleşmesini sağlayan Gp60'a bağlanmaktadır. Cav-1, kümelenmiş Gp60-albümin reseptörlerini çevreleyen yüzey zarının yayılmasını ve daha sonra albümin ve albümine bağlı bileşiklerden oluşan vezikülün daha hücre içine alınmasına neden olmaktadır. Cav-1 bazolateral membran ile taşınır, kaynaşır ve transsitozu tamamlar (Sleep vd., 2013) Bununla birlikte, Gp60 sadece doğal albümine bağlanmaktadır. Gp18 ve Gp30, karşılaştırmalı olarak, lizozomal bozunması modifiye olmuş albümine tercihli bir bağlanma sergilemektedir (Schnitzers ve Oh, 1994). Bu reseptörlerin eski, hasar görmüş veya potansiyel olarak zararlı albüminlerin uzaklaştırılmasında görev aldığı düşünülmektedir (Merlot vd., 2014).

Albüminin oldukça uzun bir yarılanma ömrüne (19 gün) sahip olması, antikanser ajanların farmakokinetik özelliklerini geliştirmek amacıyla potansiyel bir taşıyıcı olmasını sağlamıştır. Bu uzun yarı ömür, albümini bozulmadan kurtarmak için sorumlu olan hücre içi bir reseptör olan yenidoğan Fc reseptörüne (FcRn) bağlanmaktadır. Bu reseptör vücutta yaygın şekilde dağılmıştır ve hem serum albümin hem de immünoglobulin G'nin yarı ömrünü uzattığı bilinmektedir. FcRn, bu proteinleri asidik endozomda bağlamakta ve onları yüksek oranda bozucu lizozomal yoldan ayırarak işlev görmektedir. Her iki molekül de, fizyolojik pH'ta ekzositozla atılmaktadır. Albümin daha sonra lenfatiklerin dolaşıma tekrar girerek yarı ömrünü uzatır. Bu reseptör etkileşimi, endozomun düşük pH'ında meydana gelen kuvvetli afinite nedeniyle pH'la ilişkilendirilmektedir (Sleep vd., 2013).

Büyüyen tümörlerin iç vasküler ağı, anormal, hiperproliferatif lokal ortamlarını desteklemek için gerekli olan oksijen ve besin maddelerini sağlamak için genellikle yetersiz kalmaktadır. Ortaya çıkan hipoksik koşullar ve hücre ölümü, tümör bölgesinde hızlı bir

şekilde yeni kan damarlarının oluşumuna neden olan anjiyogenik faktörlerin salınımı ile ilişkilidir. Bu yeni damarlar, damar endoteldeki normal fenestrasyondan daha büyük olmasıyla ile karakterizedir (Jain ve Stylianopoulos, 2010). Tümör dokuda ayrıca, sağlıklı dokularda hücre dışı sıvıyı sürekli olarak boşaltan ve makromoleküllerin sirkülasyona girmesini kolaylaştıran lenfatik sistem bozulmuştur. Bu nedenle, tümörlerde hızla büyüyen kanser hücrelerinin sıkışması ve lenfatik damarların çökmesi nedeniyle ya zayıf ya da heterojen lenfatik drenaj vardır (Bertrand vd., 2013). Zayıf lenfatik drenajla eşleştirilmiş tümör vaskülatür sızıntısının, gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR) olarak bilinen durumun, nanoyapıların ve makromoleküllerin tercihli tümör birikiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Matsumura ve Maeda, 1996).

Albümin, EPR etkisinin bir sonucu olarak çoğalan tümör hücrelerinde birikme eğilimindedir. Bunun nedeni, albüminin, difüzyonel taşınımını sürdüğü, yaklaşık 14 mg/mL'lik interstisyel konsantrasyonuna kıyasla, yukarıda bahsedilen 40 mg/mL konsantrasyonda kandaki en konsantre protein olmasıdır (Evans, 2002). Ek olarak, hücre dışı alandan dolaşıma geri dönmek için albüminin lenfatik sisteme olan bağımlılığı, zayıf lenfatik drenajları ile tümörlerde birikmeye duyarlı hale getirmektedir (Stehle vd., 1997). Tümör intersistiyumundaki makromolekül birikiminin ilk gözlemleri radyo-etiketli albümin ve diğer serum proteinlerinin tercihli dağılımına ve tutulmasına dayandırılmıştır. Albüminle doğal olarak kompleksleşen Evans mavisini boya ile, hızlı bir şekilde temizlendiği normal dokuya kıyasla tümörlerde uzun süre tutulduğu belirlenmiştir (Matsumura ve Maeda, 1996). Albümin birikimi o zamandan beri sarkom, yumurtalık karsinomu ve Novikof hepatoma gibi hayvan modellerinde de çeşitli katı tümörlerde tespit edilmiştir (Knudsen Sand vd., 2015).

Tümör dokusunda albümin birikimine ek olarak, aynı zamanda terapötik sistemin hücre içine verilmesinde tümör hücrelerinin tercihli alım yaptığı da gösterilmiştir. Commisso ve arkadaşları, 2013 yılında, kanser hücrelerinin mikropinositoz yoluyla hücre dışı proteinlerin aktif alımı ile artan metabolik ve büyüme ihtiyaçlarını destekleyebilecekleri bir mekanizma gözlemlemişlerdir. Malign kanser fenotipinin hemen hemen tüm yönleriyle ilişkili olan bir iç plazma membran proteini olan onkojenik *ras*'ı ifade eden kanser hücrelerinin, hücre büyümesini arttırmak için amino asit kaynağı olarak hücre dışı proteinleri daha fazla kullandıklarını tespit etmişlerdir (Commisso vd., 2013). Bir çalışmada, pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinin o zamandan beri fizyolojik albüminin varlığında esansiyel

amino asitlerin bulunmadığı ortamlarda süresiz olarak büyüdüğü gösterilmiştir (Kamphorst vd., 2015). Bu bulgular, albüminin kanser hücreleri tarafından daha hedefli bir şekilde hücre içine alınması hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Ek olarak, hipoalbumineminin, ilerlemiş katı tümörleri olan hastalarda karakteristik bir özellik olduğu da gözlenmiştir (Hauser vd., 2006). Bu hastalarda azalan serum albümin, yüksek metabolik talepleri karşılamak için kullanılan anormal bir amino asit kaynağı olarak proliferatif tümör tarafından albüminin katabolizmasının arttığına bir göstergesi olduğu önerilmiştir (Stehle vd., 1997).

Bazı kanser hücreleri ayrıca, spesifik olmayan makropinositik mekanizmaların yanı sıra, reseptör aracılı albümin alım yollarını da tercihli olarak kullanabilmektedir. Albümin bazlı tedavilerin etkinliğinde, albümin ilişkili reseptörlerin ifadesi ile farklı kanser tipleri arasında bir korelasyonun bulunduğu keşfedilmiştir. Abraxane olarak da bilinen Nab-paklitaksel (nab-P), FDA onaylı bir albümine bağlı paklitaksel partikülüdür. Son zamanlarda, araştırmacılar bazı pankreas kanseri hasta popülasyonlarının nab-P ile tedaviye daha iyi yanıt vermesinin nedenlerini açıklamaya çalışmıştır. SPARC'nin (salgılanmış protein asidik ve sistein bakımından zengin), metastatik pankreas kanserinde nab-P'nin etkinliğini kolaylaştıran kritik bir albümin bağlayıcı protein olduğu belirtilmiştir (Chatterjee vd., 2017).

Albümin, tümör biyo-dağılımı ve tercihli tümör hücresi alımı için doğal afinitesinden dolayı kanser ilaçlarının terapötik etkinliğini arttırmak için bir taşıyıcı olarak büyük umut vaat etmektedir (Schubert vd., 2001).

### **2.3.2.2. Kitosan**

Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğrusal bir aminopolisakkarittir. Kitin ise, kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında çok miktarda mevcut olan ve yeryüzündeselülozdan sonra en fazla bulunan doğal bir biyopolimerdir (Dutta vd., 2004).

Piyasada kitosan 3.800-20.000 Dalton arasında molekülerağırlığa sahip ve %66-95 oranında deasetillenmiş olarak bulunmaktadır (Bansal vd., 2011). Deasetilasyon derecesi, pH ve serbest amino gruplarının protonlanma oranına bağlı olarak, kitosanın çözünürlüğü farklılık göstermektedir. İnorganik asit çözeltilerinde sınırlı çözünmesine karşın sitrik asit, tartarik asit gibi organik asitlerin seyreltik çözeltilerinde çözünmektedir (Bansal vd., 2011).



Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyuymuluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermektedir (Dutta vd., 2004; Bansal vd., 2011). Biyoadhezif olmasından ötürü nazal, bukkal, gastrointestinal, oküler ve vajinal formülasyonlarda tercih edilmektedir (Bansal vd., 2011).

Biyolojik uyumluluğu yüksek olan kitosan, çeşitlikontrollü salım preparatlarda uygun bir matris olarak kullanılmaktadır. Çeşitli etkin maddeler, kitosan matrisi içerisine (film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmektedir. Farklı şekillerde kitosan içerisine hapsedilmiş ilaçlar da bulunmaktadır. Kitosanın serbest amin grubu katyonik özellik kazandırması nedeniyle negatif yüklü ilaçlar, polimerler ve biyoaktif moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır. Jel oluşturabilmesi, kopolimer gibi çokçeşitli formlarda bulunması, ilaç salım sistemlerinde büyük avantaj sağlamaktadır (Dutta vd., 2004; Bansal vd., 2011; Vrignaud vd., 2011).

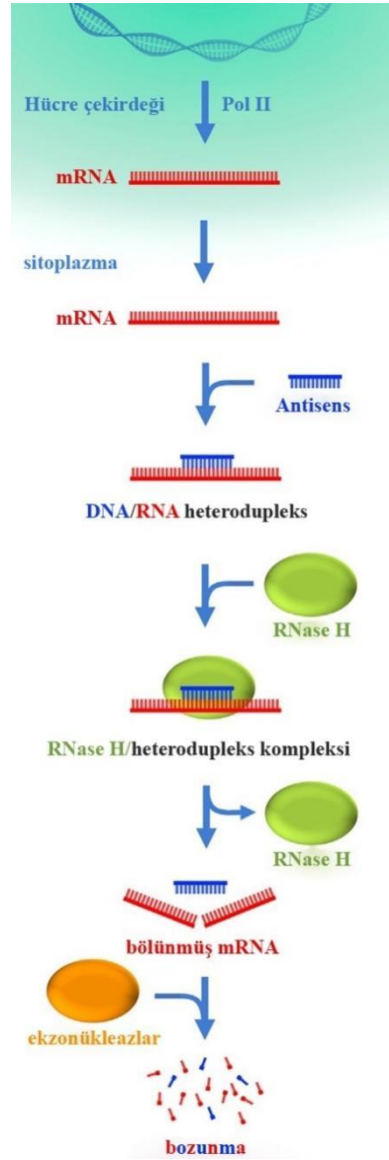
Kitosan sahip olduğu yüksek katyonik özelliği nedeniyle DNA ve RNA gibi negatif yüklü moleküller ile etkileşme yeteneğine sahiptir. Mumper ve arkadaşları ilk kez pDNA'yı, Kats ve arkadaşları da (2006) ilk kez siRNA'yı *in vitro* olarak taşımak için kitosanı kullanan araştırmacılar (Mao vd., 2010). Kitosanın genetik materyale bağlanma afinitesi partikülün kararlılığına, büyüklüğüne, kompleksin hücrede salımına ve formülasyon parametrelerine bağlıdır. Parametreler arasında kitosanın moleküler ağırlığı, deasetilasyon derecesi, kompleksin sitokiyometrisi (N/P oranı), genetik materyal konsantrasyonu, serum konsantrasyonu, transfeksiyon ortamının pH'sı, hücre tipi, vb bulunmaktadır (Kim vd., 2007).

#### **2.4. Antisens Teknolojisi ve Oligonükleotitler (ASO)**

Antisens tedavisi kavramı, geleneksel olarak Stephenson ve Zamecnik tarafından, bir antisens oligonükleotitin, Rous sarkom virüsünün (RoSV) RNA translasyonunu inhibe etme kabiliyetini gösterdiğinde geliştirilmiştir (Stephenson ve Zamecnik, 1978). ASO'lar, mRNA'larını tamamlayıcı oligonükleotitlerini sentezlemek için bir hedef genden sekans verileri kullanır, ya da hedef mRNA'nın bozulmasını indükleyerek ribozom bağlanmasını

veya uzamasını bloke eder (Şekil 2.3) (Calabretta, 1991).

ASO'lar, hücreye doğrudan hücre dışı ortamdan alınabilmektedir. Sitoplazmada, bir ASO, tamamlayıcı Watson-Crick eşleşmesi ile hedef mRNA ile melezlenir. ASO mRNA heterodupleks, hedef mRNA molekülünü parçalamak için hücre içi RNaseH ile tanınır ve sonuçta ortaya çıkan mRNA parçaları, translasyon baskılamasıyla sonuçlanan ekzonükleazlar tarafından parçalanır. ASO'lar hücrelere kolayca iletilse de, önemli ölçüde (ve bazen ölümcül olan) toksisite üreten ve hedef hücreler üzerinde kontrolsüz immünolojik etkileri tetikleyebilecek kimyasal (hedef dışı) etkiler gösterebilmektedirler. Değiştirilmemiş formlarında, ASO'lar spesifik olarak hedef mRNA ile melezlenmekte, bu da tek bir genin diğerlerini etkilemeden translasyonel tutulmasına neden olmaktadır. Bu özgüllük, toksisiteyi en aza indirgeme konusunda açık bir avantaj sağlamaktadır.

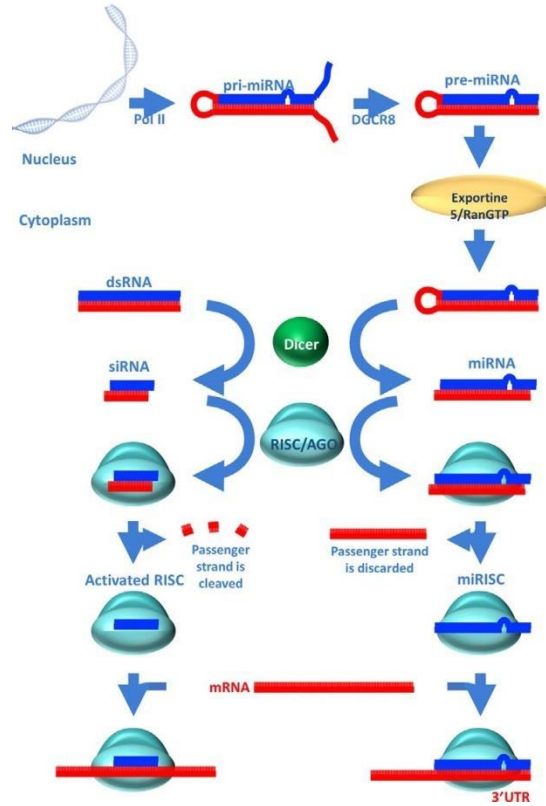


Şekil 2.3. Antisens oligonükleotitlerin (ASO'lar) etki mekanizması (Calabretta, 1991)

## 2.5. RNAi Mekanizması ve Komponentleri

RNA interferans (RNAi), çift zincirli RNA'nın hücreye girdiği zaman, endojenik komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açan, transkripsiyon sonrası susturma mekanizmasıdır. RNA interferans, Dicer adı verilen bir RNase III enzimi tarafından çift zincirli RNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamaktadır. Küçük girişimci RNA'lar (siRNA) olarak bilinen 21-22 nükleotit uzunluğunda dsRNA molekülleri, hedef mRNA'nın bozulmasına yol açan RNAi'nin enzimatik araçları tarafından tanınmalarına

izin veren karakteristik uzantılara sahiptir. Bu siRNA'lar daha sonra, bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA-indükleyici baskılama kompleksine (RISC) bağlanır. RISC, siRNA'ları komplementer mRNA'yı bulmak için kullanır ve hedef mRNA'yı endonükleolitik olarak keser. Hücre içinde spesifik mRNA'nın azalması, ilgili proteinin de azalmasına yol açacağından bu proteini kodlayan gen susturulmuş olur (Şekil 2.4). RNA'ya dayalı susturma mekanizmasının bileşenlerinin bazıları başlatıcı (initiator) olarak rol alırken, bazıları etki edici (effector), çoğaltıcı (amplifier) ya da iletici (transmitter) olarak görev yapmaktadır (Agrawal vd., 2003).



Şekil 2.4. RNA interferans mekanizması (Agrawal vd., 2003)

### 2.5.1. Dicer enzimi

RNase III ribonükleaz ailesine ait enzimler RNA interferansın ilk adımını başlatmaktadır. Bu nükleazlar sahip oldukları dsRNase aktivitesi ile dsRNA'ları siRNA

(small interfering RNA)'lara parçalamaktadır (Bernstein vd., 2001; Zamore P.D vd., 2000). Dicer enzimi, RNA interferansın ilk adımı olan siRNA'ların elde edilmesi fonksiyonunun yanı sıra daha sonraki adımda bu öncü moleküllerin RISC kompleksine yüklenmesinde de önemli rol oynamaktadır (Karagüzel A. vd., 2001; Szweykowska-Kulinska vd., 2003). Dicer enzimi fungus, bitki ve memelilerde evrimsel olarak korunmuştur (Agrawal vd., 2003; Szweykowska-Kulinska vd., 2003). Ancak bunlar bazı farklılıklar gösterebilmektedir. *Drosophila* gibi bazı ökaryotlarda Dicer enziminin kesim aktivitesi ATP gerektirirken, memelilerde Dicer enzimi aktivitesi ATP gerektirmez (Agrawal vd., 2003; Karagüzel A. vd., 2001; Betz N., 2003; Zhang H., 2004).

### **2.5.2. siRNA (Small Interfering RNA, Küçük Engelleyici RNA)**

Hücrelerde RNAi mekanizmasını, uzun dsRNA'lar başlatırken çoğu deneysel çalışmalarda etki edici moleküller olarak siRNA'lar kullanılmaktadır (Filipowicz W., 2005). Örneğin *C.elegans* ve *Drosophila*'da *in vitro* şartlarda uzun dsRNA'lar kullanılırken memeli hücrelerine uzun dsRNA'ların (>30 bp) girişi gen ifadesinde spesifik olmayan inhibisyon ve apoptozis aracılığıyla hızlı hücreölümü gibi antiviral interferon cevaba neden olmaktadır. Bu amaçla memeli hücrelerinde deneysel araştırmalarda 30 baz çifti (bp)'den daha küçük siRNA'lar kullanılmaktadır (Betz N., 2003; Black D. ve Newbury S., 2004).

siRNA'lar uygun mRNA degradasyonu için rehber RNA olarak görev almaktadırlar (Agrawal vd., 2003). Dicer enziminin nükleaz aktivitesi ile dsRNA'lar, 5'-fosfat ve 3'-hidroksil uçlara sahip ve 3'-hidroksil uçlarında 2-3 nükleotitlik çukıntı bulunan 21-23 nükleotit uzunluğunda siRNA'lara parçalanırlar (Zamore vd., 2000; Elbashir vd., 2001). siRNA'nın bu yapısal özelliği RISC kompleksine bağlanması ve RNAi mekanizmasının sonraki aşamaları için önemlidir (Şekil 2.4) (Hannon, 2002; Szweykowska-Kulinska vd., 2003).

### **2.5.3. RISC (RNA İndükleyici Baskılama Kompleksi)**

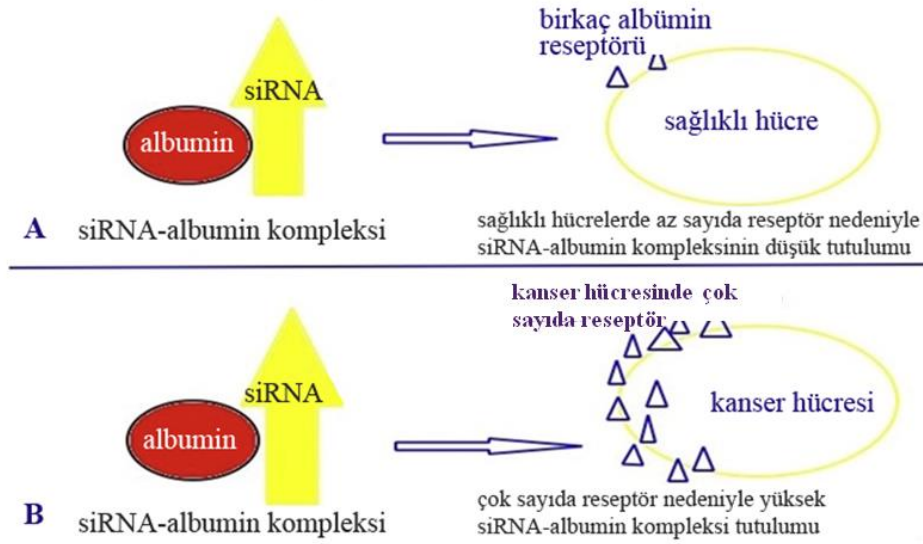
RISC, nükleaz aktiviteli RNA-çoklu protein kompleksi olup asimetric olarak siRNA'larabağlanarak uygun siRNA zincirinin rehberliğinde komplementer hedef mRNA'yı parçalamaktadır (Karagüzel A. vd., 2001). Yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz

enzimlerini içermektedir (Khanna vd., 2007). Bu kompleksin protein bileşenlerinden birisi Argonat ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır (Agrawal vd., 2003). Argonat proteinleri iki korunmuş domain yapısı içermektedir: PAZ domaini ve PIWI domaini. RISC'in temel bileşeni Argonat proteini mRNA kesimi için temel katalitik bölge olup bu proteinin PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmada rol alırken, yapısal olarak RNaseH'in aktif bölgesine benzeyen PIWI domaini hedef mRNA'nın kesiminde rol almaktadır (Filipowicz W., 2005).

## **2.6. Kanser tedavisinde siRNA-Albümin Kompleksinin Potansiyel Etkisi**

İlaç hedeflemesinde, peptit veya protein bazlı ilaçların farmakokinetik profilini geliştirmek için çok yönlü bir protein taşıyıcı olarak öne çıkan albümin, 66,5 kDa moleküler ağırlığa sahip en bol bulunan plazma proteinidir (35-50 g/L insan serumu). Plazma proteinlerinin çoğu gibi, albümin (günlük 10-15 g) yaklaşık 0,7 mg/s hızında karaciğerde sentezlenmektedir (Mendez C. vd., 2005)

Albüminin, siRNA için bir taşıyıcı molekül olarak kullanıldığı bir çalışmada serum albüminin, tümör bölgesinde siRNA'nın Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (VEGF R2)'ye karşı tercihli ve spesifik hedef odaklı bir aktarım sağladığı bilinmektedir. Bu mekanizmanın büyük olasılıkla siRNA'nın hücre içi salıverilmesi için endozomal kaçış ile birleştirilmiş kaveolin aracılı endositoz olduğu düşünülmektedir. Bir çalışmada, kolon kanserli hayvanların tümör dokularında *kaveolin-1* geninin aşırı ifadesine bağlı olarak Gp60 (albodin) reseptörlerinin yüksek sayılarla ifade edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, tümör bölgesinde yüksek konsantrasyonda albümin reseptörleri, hayvanlarının kolonlarındaki tümör bölgesinde siRNA-albümin kompleksinin alımını önemli ölçüde arttırmıştır (Şekil 2.5) (Fung vd., 2018; Desai vd., 2006). Başka bir çalışmada da, paklitaksel-albümin kullanımıyla benzer sonuçlar bildirilmiştir (Gradishar vd., 2005; Desai vd., 2006).



Şekil 2.5. siRNA-albümin kompleksinin kanser hücresi ve sağlıklı hücre üzerine olan etkisi (Liu vd. 2018)

## 2.7. Gen Susturulmasında *Bcl-2* Geni

B hücreli *lenfoma/lösemi 2* (*Bcl-2*) geni ilk kez Tsujimoto tarafından, t (14;18) kromozom translokasyon kırılma noktasında onkogen olarak 1984'te tanımlanmıştır (Tsujimoto vd., 1985; Yip ve Reed, 2008). *Bcl-2* proteini bir anti-apoptotik proteindir. *Bcl-2*, hücre çoğalmasının düzenlenmesini değiştirip apoptozu inhibe ederek karsinogenezi teşvik eder. Apoptozis, kanser baskılanmasının majör bir mekanizmasıdır. Bu nedenle, *Bcl-2* geninin aşırı ifadesi kanserogenezi, tümör gelişimi ve kemoterapiye direnç ile doğrudan ilişkilidir (Gobé vd., 2002).

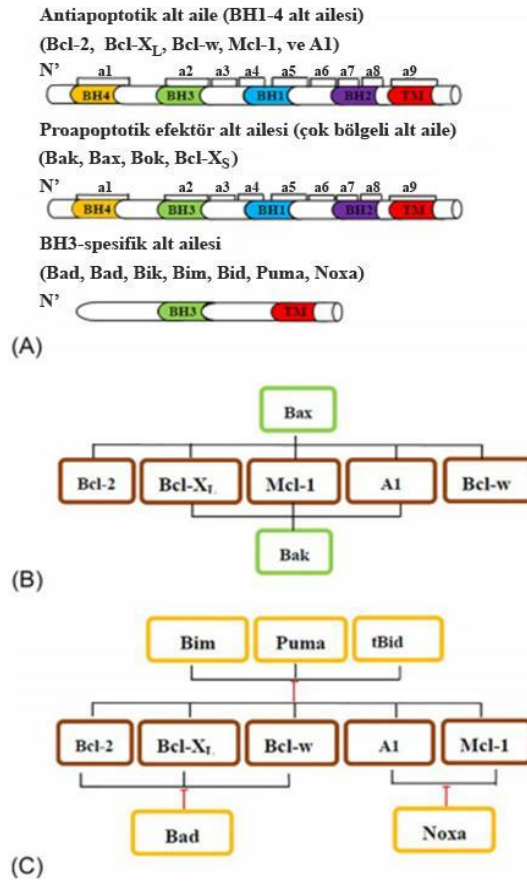
### 2.7.1. *Bcl-2* proteinleri

*Bcl-2*'nin 30 yıl önce keşfedilmesinden bu yana, *Bcl-2* protein ailesinin 20'den fazla üyesinin apoptozun düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir (Birkinshaw ve Czabotar, 2017). *Bcl-2* ailesi proteinleri, antiapoptotik veya proapoptotik olabilir ve normal sağlıklı hücrelerde bu mekanizma dengededir. Antiapoptotik üyeler arasında *Bcl-2*'nin kendisi, *Bcl-XL* (*Bcl-2L1* olarak da adlandırılan ekstra büyük B hücreli lenfoma), *Bcl-w* (*Bcl-2*-benzeri

protein 2, Bcl-2L 2 olarak da adlandırılır), Mcl-1 (miyeloid hücre lösemi 1), A1 (BCF 2 ile ilişkili protein A, BFL-1 olarak da bilinir) ve Bcl-B gösterilir. Bu proteinler yapısal olarak oldukça benzerdir (Birkinshaw ve Czabotar, 2017).

Proapoptotik ve antiapoptotik üyelerin dengesizliği, proapoptotik proteinlerin aşırı aktifleştirilmesiyle olgunlaşmamış hücre ölümüne neden olabilmektedir. Ayrıca antiapoptotik proteinlerin aşırı aktifleşmesi, tümörlerin indüklenmesiyle ve/veya kemoterapiye direnç gelişmesiyle de sonuçlanabilmektedir (Kitada vd., 2002).

### 2.7.2. Bcl-2 homoloji bölgeleri



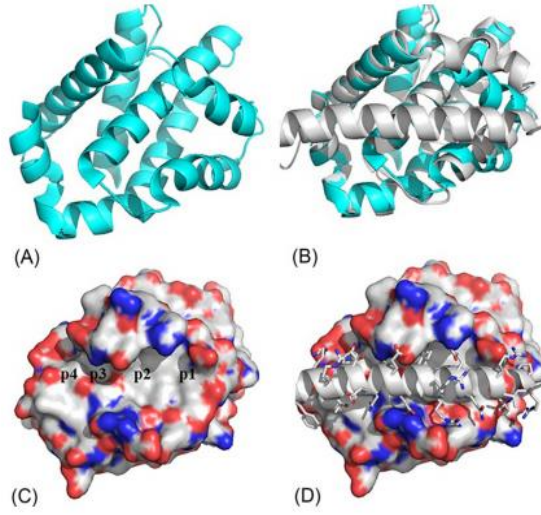
**Şekil 2.6.** Bcl-2 ailesinin yapısı ve Bcl-2 protein ailesi ve bağlanma bölgeleri (A) BH1-4 alt ailesi (antiapoptotik alt ailesi) dahil olmak üzere Bcl-2 ailesi alt tipleri şeması (B) Antiapoptotik Bcl-2 alt familyası ile seçici olarak bağlanan Bax veya Bak şeması (C) Antiapoptotik Bcl-2 alt familyası ile seçici şekilde bağlanan BH3 proteininin şeması. (Lomosova ve Chinnadurai, 2008)



Bcl-2 ailesi proteinlerinin, 20 ya da daha az amino asitten oluşan Bcl-2 homoloji (BH) bölgesi (BH1, BH2, BH3 ve BH4) olarak adlandırılan korunmuş dört motifin en az birini içerdiği bilinmektedir (Adams ve Cory,1998; Kelekar ve Thompson,1998). BH1-4 alt ailesi, proapoptotik alt ailenin aktivitesini antagonize eden Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 dahil olmak üzere dört koruyucu homoloji alanını (BH1-BH4) içermektedir (Şekil 2.6). Çok bölgesli alt ailesi, mitokondri dış zarında gözenekler oluşturarak doğrudan apoptozu indükleyen Bax ve Bak dahil olmak üzere BH4 içermeyen BH1-BH3 bölgelerini içermektedir. Yalnızca BH3 alt ailesi, proapoptotik üyeler ve/veya antiapoptotik üyeler ile etkileşime girerek apoptozu indükleyebilen Bad, Bik, Bim, Bid, Puma ve Noxa dahil, BH3 bölgesini içermektedir (Kang ve Reynolds, 2009).

### **2.7.3. Bcl-2 protein ailesi, yapısı ve etkileşimleri**

Ailenin ilk tanımlanmış üyesi olan Bcl-2, üç ekzon, iki intron ve iki promotor içeren *Bcl-2* geni tarafından kodlanan 239 amino asitten oluşmaktadır. 40 amino asidin korunmuş bir N-terminal bölgesini, ardından prolin bakımından zengin 100 amino asidin oldukça değişken bir orta bölgesini ve 100 amino asidin korunmuş bir C-terminalini içermektedir. Yalnızca BH3 alt ailesi, 9  $\alpha$ -heliksten ( $\alpha 1$ – $\alpha 9$ ) oluşan tipik bir küresel yapıyı içermektedir (Birkinshaw ve Czabotar, 2017; Czabotar vd.,2014). Dokuz sarmalın sekizi ( $\alpha 1$ – $\alpha 8$ ) hidrofobik bir çekirdek oluşturur;  $\alpha 5$ , temsili modelde yedi amfipatik sarmal demeti ile çevrelenmiştir (Rautureau vd.,2010) ve proapoptotik proteinlerin BH3 alanını almak için bir hidrofobik kanal ( $\alpha 2$ – $\alpha 5$ ) üretmektedir (Czabotar vd., 2014; Ko vd.,2007)(Şekil 2.7). Buna ek olarak, antiapoptotik proteinlerde proapoptotik proteinler tarafından oluşturulan korunmuş bir tuz köprüsü de etkileşimler için yüksek afinite göstermede önemli bir rol oynar. Sadece BH3 alt familyası üyeleri doğası gereği düzensizdir (BH3 bölgesi hariç) ve Bcl-2 veya Bcl-XL ile etkileşime girdikten sonra amfipatik heliks haline gelebilmektedir (Huang ve Strasser,2003). Bu yapısal bilgi, BH3 mimetikleri antiapoptotik proteinlerin inhibitörleri olarak tasarlamak ve optimize etmek için önemlidir.



**Şekil 2.7.** BH3 bölgesinin ve antiapoptotik proteinlerin hidrofobik bölgelerinin etkileşimleri (A) Bcl-XL, camgöbeği renkte gösterilmiştir. (B) Bim-BH3 ile bağlanmış Bcl-XL gri renkte (C ve D) gösterilmiştir. P1-p4 ile Bcl-XL ve Bim-BH3 ile bağlı Bcl-XL hidrofobik bölge yüzeyinde gösterilmiştir (Hu vd., 2019)

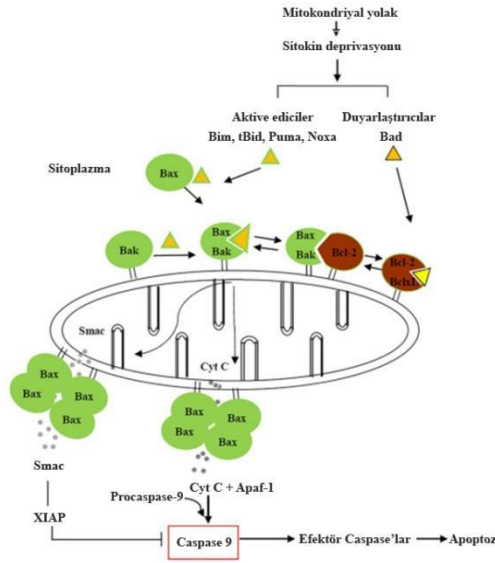
#### 2.7.4. Antiapoptotik ve proapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki etkileşim

Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri, proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak'ın etkilerini iki farklı mekanizma ile inhibe etmekte ve bu mekanizmalar, BH3 bölgesine doğrudan bağlanma ya BH3 bölgesine özgü proteinlerin düzenlenmesiyle etkisini göstermektedir. Bcl-2, apoptozun erken bir basamağı olan Bax/Bax homolog dimerinin oluşumunu önleyen bir heterodimer Bcl-2/Bax oluşturmak için, hücrel Bax ile etkileşime girmektedir. Antiapoptotik üyeler, Bcl-2 ailesinin seçici inhibitörlerini tasarlamak için kullanılan spesifik proapoptotik proteinlerle farklı bağlanma özellikleri göstermektedir (Şekil 2.7B). Tanıma bölgesinde yer alan Alaninin mutasyona uğraması sonucunda, proapoptotik proteinler ve Bcl-2 (ve/veya Bcl-XL) arasında yüksek afinite olduğunu gösterilmiştir ve bu durum temel olarak hidrofobik kanal içinde yer alan p2 ve p4 bağlanma noktalarındaki etkileşimlerle sağlandığı tespit edilmiştir (Sattler vd.,1997). BH3 proteinlerinin yüksek afiniteli tüm antiapoptotik proteinlere bağlanabileceği bilinmektedir (Şekil 2.7C) (Adams ve Cory, 2007). BH3'e özgü proteinler, antiapoptotik proteinlerin hidrofobik kanalında bulunan p2 ve p4 ceplerine bağlanmak için amfipatik sarmalın dört rezidüsünü kullanır. Bu nedenle, p2 ve p4 bağlanma noktaları, Bcl-2 ve Bcl-XL'i inhibe eden seçici BH3mimetiklerini tasarlamak için önemlidir (Bouillet ve Strasse, 2002; Hu vd., 2019).

## 2.8. Başlıca Apoptozis Yolakları

Apoptozis, programlı hücre ölümüdür. Apoptotikkaskadın aktivasyonu, hücre apoptozisini indükleyen anahtar basamaktır. Apoptotik uyarın, ekstrinsik veya intrinsik yolu kullanarak kaspazı aktive edebilir (Hanada vd., 1995; Spierings vd., 2005). Ekstrinsik apoptotik yol (ölüm reseptörü yolu) temel olarak ölüm reseptörlerinin (tümör nekroz faktörü reseptör ailesi) aktivasyonu ile indüklenmiştir. İntrensik apoptotik yol ise, (mitokondriyal yol) temel olarak Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenmekte ve DNA hasarı, oksidatif stres ve büyüme faktörü yoksunluğunu içeren hücre stresi ile tetiklenmektedir (Adams ve Cory, 2007; Reed ve Pellecchia, 2005).

Çeşitli sitotoksik uyarınlar, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenen mitokondriyal yolağın apoptozunu tetikler. Yalnızca BH3 ailesi üyeleri, başlatıcılar olarak görev yaparlar. Bir yandan, Bax ve Bak oligomer oluşumunu aktive etmek için sitoplazmadan mitokondri zarına Bax taşınmasını teşvik etmekte bir yanda da aktive edilmiş Bax veya Bak, XIAP'ı bloke edebilen sitokrom C ve SMAC'yi salmak için mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Sitokrom C ve SMAC ile kombinasyon apoptozu başlatmak için kaspaz 9'u aktive etmektedir (Şekil 2.8) (Adams ve Cory, 2007; Reed ve Pellecchia, 2005).



Şekil 2.8. Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenen mitokondriyal yolak aracılı apoptoz

### 2.8.1. Apoptotik yolakta Bcl-2 proteinlerinin rolleri

İntrinsik yolağın ana düzenleyicileri olan BH3 proteinleri, apoptotik sinyalleri iletmek ve Bax'ı veya Bak'ı aktive etmek için denetleyici bir görev üstlenmektedirler. Antiapoptotik proteinler, hücre sağkalımını arttırmak için koruyucu olarak görev yaparken, proapoptotik efektör proteinler apoptozu tetiklemek için hücre öldürücü olarak işlev görmektedir (Czabotar vd., 2014). Hücreler sitotoksik stres sinyalleri aldığında, sadece BH3 proteinleri, sitoplazmadan mitokondriyal dış membrana translokasyon için uyarılmaktadır. Daha sonra sadece BH3 proteinleri, duyarlılaştırıcı olarak programlanmış hücre ölümünü indüklemek üzere Bax veya Bak oligomerlerinin oluşumunu teşvik etmek için anti-apoptotik proteinleri doğrudan nötralize etmektedir (Letai vd., 2002; Wang vd.,1996). Normal bir hücrede Bak,  $\alpha 9$  kuyruk ankrajı kullanarak mitokondrinin dış zarı üzerinde bulunurken, Bax esas olarak transmembran alanına sıkışmış olarak sitoplazmadadır. Sitotoksik sinyaller, Bax'ın transmembran bölgesine yayılmasını ve mitokondriyal dış membran üzerinde birikmesini sağlamaktadır (Edlich vd.,2011). Bax veya Bak doğrudan işlev gören BH3 proteinlerinin aktivasyonu için büyük bir yapısal değişime neden olarak BH3 bölgesine bağlanabilmektedir. Bunu, BH3 proteinlerinin ayrışması izler, BH3 bölgesi için bağlayıcı kanalı Bax veya Bak'ta boş bırakır ve aktifleştirilmiş monomerik Bax veya Bak, boşaltılan kanalı kullanarak dimerleşir. Bax/Bax veya Bak/Bak dimeri daha sonra, sitokrom C'nin mitokondriyal zardan sitoplazmaya geçmesine izin veren mitokondriyal dış membran geçirgenliğine neden olan proteolipit gözenekleri oluşturmak için oligomerleşir (Czabotar vd.,2014). Bu nedenle, Bax ve Bak apoptozu düzenlemede önemli rollere sahiptir. Toplu olarak, proapoptotik proteinler ve antiapoptotik proteinler arasındaki denge, hücrelerin apoptotik sinyallere ne kadar hassas olduklarını belirlemektedir (Yip ve Reed, 2008; Lam vd., 1994; Luanpitpong vd., 2013).

### 2.8.2. Bcl-2'nin aşırı ifade edilmesi

*Bcl-2*'nin aşırı ifadesi ile kanserin oluşumu, gelişimi ve prognozu arasında güçlü bir ilişki vardır. Yüksek *Bcl-2* ifade seviyesi lenfoma, melanom, akut miyeloid lösemi (AML) ve kronik lenfositik lösemi (KLL) gibi çeşitli hematolojik kanserlerde ve kolorektal, meme, prostat, mesane ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi katı tümörlerde bildirilmiştir. *Bcl-2*'nin

yanı sıra, çeşitli tümörlerde diğer antiapoptotik proteinler de yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Yüksek dirençli prostat kanseri, mezenkimal meme kanseri ve diğer katı tümörlerde yüksek *Bcl-XL* ifadesi de bildirilmiştir (Trisciuglio vd., 2017).

*Bcl-2* antiapoptotik proteinlerin aşırı ifadesine yönelik mekanizmalar, kromozom translokasyonu, inhibitör miRNA kaybı gibi çeşitli nedenlerle açıklanabilmektedir (Rautureau vd., 2010; Bharatham vd.,2011). Bazı kanser türlerinde, antiapoptotik proteinlerin miRNA'larının azalması, antiapoptotik proteinlerin artan aktivitesine neden olmuştur. Ek olarak, miR-195, -24-2, -365-2 ve -204 gibi diğer bazı miRNA'ların kaybının da göğüs, akciğer ve kolon kanserlerinde *Bcl-2*'nin aşırı ifadesi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (Correia vd.,2015).

## **2.9. Bcl-2 Hedefli Tedavi Yaklaşımları**

Günümüzde, *Bcl-2* ailesine ait proteinler (özellikle *Bcl-2*, *Bcl-XL* ve *Mcl-1*), antitümör ilaçlarının araştırılması ve geliştirilmesi için en önemli hedeflerdendir. Bugün itibariyle, *Bcl-2* antiapoptotik proteinleri hedef alan çeşitli terapötik ajanlar geliştirilmiştir ve prelinik veya klinik olarak test edilmektedir. Bir monoterapötik ajan olarak, bu reaktifler *Bcl-2*'nin antiapoptotik etkilerini antagonize ederek apoptozu doğrudan indükleyebilir. Kombine bir tedavide kullanıldığında bu reaktifler, kanser hücrelerinin apoptozis eşiğini düşürerek antitümör ilaçları duyarlı hale getirmektedir (Czabotar vd., 2014).

### **2.9.1. Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri**

Siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin RNA polimeraz II fonksiyonunu bozarak ve *E2F1*'in *Mcl-1* transkripsiyonu üzerindeki negatif düzenleyici etkilerini artırarak, *Mcl-1* ifadesini inhibe edebildikleri düşünülmektedir. CDK inhibitörleri, kombine edilerek kullanıldığında insan lösemi hücrelerinde histon deasetilaz inhibitörleri (HDACI) antitümör aktivitesini önemli ölçüde artırabilmektedir (Rosato vd.,2007). Bu ajanlar *Bcl-2* proteinlerinin klasik inhibitörleri değildir ve etkilerini *Bcl-2* antiapoptotik proteinleri düzenleyerek dolaylı olarak göstermektedirler. Bu nedenle, ilaca dirençli kanser türlerinde umut vaad etmektedirler (Rosato vd.,2007).

## **2.9.2. BH3-mimetikleri**

BH3 protein-mimetikleri olarak da adlandırılan BH3-mimetikleri, Bcl-2 antiapoptotik proteinlerinin hidrofobik bölgelerine, Bax veya Bak ile bağlanmalarını antagonize etmek, Bax ve/veya Bak'ın apoptozu indüklemesini aktive edecek şekilde tasarlanmıştır (Lessene vd., 2008).

### **2.9.2.1. Venetoklaks (ABT-199)**

Spesifik bir Bcl-2 inhibitörü olan Venetoklaks (ABT199), 2016 yılında KLL'yi tedavi etmek için FDA tarafından onay almıştır (Pekarsky vd.,2018). Venetoklaks, ABT263'ün modifikasyonu sonucunda geliştirilmiştir ve Bcl-XL ile seçici olmayan bir şekilde bağlanmasını önlemek üzere tasarlanmıştır. Venetoklaks, X-ışını kristal yapısı ve tiyofenil parçanın bulunmadığı modifiye bir ABT263'ün, seçici bağlanma için kullanılabilir p4-bağlama cebinde alternatif bir bağlanma bölgesi bulundurmaktadır (Souers vd., 2013; Touzeau vd.,2014). Bu durum, Venetoklaks'un Bcl-2'ye sıkıca bağlanırken Bcl-XL'ye bağlanmaması nedeniyle hedefleme için kullanılmasında kritik öneme sahiptir. Klinik çalışmalarda Venetoklaks, trombosit sayısında yalnızca küçük değişiklikler olan üç refrakter KLL hastasında tek bir dozun ardından hemen antilökomik aktivite sergilemiştir (Souers vd.,2013). Tek bir ajan olarak Venetoklaks, dağınık büyük B hücreli lenfoma, foliküler lenfoma, KLL, akut miyeloblastik lösemi (AML) ve multiplmiyelom gibi birçok malignitede ümit verici klinik sonuçlar tespit edilmiştir (Souers vd., 2013; Davids vd.,2013;Seymour vd.,2017). Çalışmalar ayrıca Venetoklaks'ın KLL ve AML hastalarında Rituksimab, Obinutuzumab gibi diğer antitümör ilaçlarla kombinasyon halinde anlamlı bir duyarlılık etkisine sahip olduğu göstermiştir. Bununla birlikte Venetoklaks, özellikle tümör lizis sendromu (TLS) gibi advers etkiler de bildirilmiştir (Seymour vd.,2017). Ayrıca Venetoklaks kullanan hastalarda nötropeni veya enfeksiyonlar da gözlenmiştir (Davids vd.,2013).

### **2.9.2.2. Venetoklaks etki mekanizması**

Gelişmiş bir BH3 mimetiği olan Venetoklaks trombositopeniye yol açmayan, antitümör etkili, oral yolla alınabilen, Bcl-2'ye spesifik bir inhibitördür. Toksik etkilerin sık görüldüğü kanser tedavileri için oldukça iyi bir yan etki profiline sahiptir. Venetoklaks

afinitesi Bcl-2 için yüksek iken, Bcl-XL için daha düşük düzeydedir (Kadia vd., 2016; Hata vd., 2015; Pullarkat ve Newman, 2016). Venetoklaks bazlı tedavi, daha agresif tedaviler için uygun olmayan AML'li yaşlı hastalar için uzun sağkalım sağlayabilme potansiyeli taşımaktadır (Pullarkat ve Newman, 2016). Preklinik bir çalışmada (Pan vd., 2013), AML hücre dizileri Venetoklaks'a daha duyarlı olup yüksek düzeyde Bcl-2 proteini ve nispeten düşük *Bcl-XL* ve *Mcl-1* ifadesi göstermişlerdir. Benzer sonuçlar primer AML miyeloblastlarında da bulunmuştur. Ayrıca, AML miyeloblastları normal kemik iliğinden daha yüksek *Bcl-2* mRNA ifadesi göstermiştir (Valk vd., 2005).

### **2.9.2.3. Venetoklaks'a direnç mekanizmaları**

Venetoklaks, AML dahil olmak üzere birçok kanserde ümit verici sonuçlar ortaya koyan ilk Bcl-2 seçici inhibitör olmasına rağmen, intrinsik ilaç direnci endişe vericidir (Zhao vd., 2016; Schwartz vd.,2016). Venetoklaks *Mcl-1*'i inhibe etmediğinden, artan *Mcl-1* ifadesi, Venetoklaks tarafından Bcl-2 inhibisyonuna karşı potansiyel bir ön direnç kaynağı olabilir. Bunu doğrular şekilde, CRISPR ile AML hücrelerinde *MCL-1*'in susturulması (knock-down), Venetoklaks kaynaklı apoptozu önemli ölçüde arttırmıştır (Pan vd.,2013; Zhao vd., 2016; Schwartz vd., 2016). Bu nedenle, Lin ve diğerleri, *Mcl-1* ve *Bcl-XL*'i hedefleyerek, dirençli AML hücre dizilerinin, Venetoklaks'a karşı yeniden duyarlılaştırılabileceğini göstermiştir (Lin vd., 2016). Ayrıca, *Mcl-1* ve/veya *Bcl-XL* susturulması ile birlikte Venetoklaks uygulamasındaki hedef, ilaç direncini geciktirmek veya ilaç direncini önlemektir (Lin vd.,2016). Niu ve arkadaşları, Venetoklaks'ın, *Mcl-1* seviyelerini azaltan ve ilaç dirençli AML hücrelerinde, ilaç aktivitesini arttıran DNA hasar verici ajanlar ile birleştirerek direnç mekanizmasının aşılabileceğini kanıtlamıştır (Niu vd., 2016).

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

<u>Madde Adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Agaroz	: Prona, İspanya
DKM (Diklorometan)	: Sigma-Aldrich, Almanya
DMSO (Dimetilsülfoksit)	: Applichem, Almanya
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	: BiologicalInd., İsrail
Floresan işaretli protein (GFP)	: Aldevron, ABD
Etanol (%99,8)	: Merck, Almanya
Etidyum bromür	: Amresco, ABD
FITC-siRNA	: SantaCruz, ABD
Fetal Sığır Serumu	: Sigma-Aldrich, Almanya
Kitosan Oligosakkarit Laktat	: Sigma-Aldrich, Almanya
MTT boyası	: Applichem, Almanya
Sığır Serum Albümini	: Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	: Merck, Almanya
Sodyum Klorür	: Merck, Almanya
Tween® 80 (Polioksietilen-20-Sorbitan Monooleat)	: Merck, Almanya

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz Adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Büyük Kapasiteli Santrifüj	: Eppendorf 5810, Almanya
CO <sub>2</sub> 'li Etüv	: Hera Cell 240i, ABD
Plaka Okuyucu	: Cytation 5, Biotek, ABD
Distile Su Cihazı	: Millipore, ABD
Dondurucu (-20°C)	: Arçelik, Türkiye
Dondurucu (-80°C)	: New Brunswicksci., ABD
Floresan Mikroskop	: Leica 400DMI, Almanya
Güç Kaynağı	: Consort E861, Belçika
İnvert Mikroskop	: Leica DMIL, Almanya



Jel Dokümantasyon Cihazı	: Uvitec, İngiltere
Laminar Akış Kabini	: Heal Force, Çin Halk Cumhuriyeti
Manyetik Karıştırıcı	: Heidolph, Almanya
Mekanik Karıştırıcı	: Heidolph, Almanya
Mikrosantrifüj	: Eppendorf, Almanya
Orbital Karıştırıcı	: Stuart Ssl, İngiltere
Otoklav	: Hirayama, Japonya
Otomatik Mikropipetler	: Eppendorf, Almanya
Ph-Metre	: Thermoscientific, ABD
Rotavapor	: Buchir-205, İsviçre
Sem Cihazı	: Carl Zeiss Ultra Plus, ABD
Su Banyosu	: Gfl T-251425, Almanya
Vorteks Karıştırıcı	: Jeitech, Çin Halk Cumhuriyeti
Yatay Çalkalayıcı	: Stuart Ssl, ABD
Yatay Elektroforez Cihazı	: Thermoscientific, ABD
Zeta Potansiyel ve Parçacık Boyutu Ölçer	: Nanozetasizer Zs, İngiltere

## 4. YÖNTEM

### 4.1. Formülasyon Çalışmaları

#### 4.1.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması

Albümin taşıyıcı sistemler için kullanılan en yaygın hazırlama yöntemleri, emülsifikasyon, termal jelasyon, püskürterek kurutma (spraydrying), desolvasyon (koaservasyon), kendiliğinden oluşma ve nanopartikül-albümin bağ teknolojisi (nab teknolojisi) olarak sıralanabilir (Elzoghby vd., 2012).

Protein bazlı nanopartiküllerin sentezinde desolvasyon yöntemi en çok kullanılan tekniklerden biri olup, yöntem etanol veya aseton gibi su ile karışabilen organik çözücüler yardımıyla albümini denatüre etme esasına dayanır. Etanol eklenmesiyle, albüminin sudaki çözünürlüğü giderek azalmakta ve faz ayrışması oluşmaktadır. Etanol veya aseton gibi su ile karışabilen çözücülerin konsantrasyonunu arttırmak, protein hidrasyonuna ve sulu karışımın dielektrik sabitinde azalmaya neden olmaktadır. Bu sabitin desolvasyon aşamasında değişmesi ise oluşan partiküllerin büyüklüğünü belirleyebilmektedir (Elzoghby vd., 2012).

Albümin nanopartiküllerin morfolojik özellikleri incelendiğinde yeterince kararlı olmadığı, su içerisinde tekrar çözünebilir olduğu bildirilmiştir. Glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcıların albümin molekülündeki amino grupları ile kantitatif çapraz bağlanması sağlanarak koaservatların daha kararlı hale gelmesi mümkün olmaktadır (Von Storp vd., 2012; Elzoghby vd., 2012).

Bu çalışmada, albümin nanopartiküllerinin hazırlanmasında desolvasyon (koaservasyon) tekniği kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında kullanılan albümin sığır serum albümini olup 69,323 Da molekül ağırlığında ve 25 °C su içerisinde 4,7'lik izoelektrik noktasına (pI) sahiptir. Formülasyon hazırlama esnasında kullanılan su, otoklavlanmış ve 0,22 µm filtreden geçirilmiştir. pH=7,4 ve pH=5,9 olmak üzere iki ayrı pH değerinde distile su kullanılmıştır. Kullanılan etanol %99,8 saflıkta olup tüm aşamalarda aynı özellikte etanol kullanılmıştır.

### 4.2. Ön çalışmalar

Desolvasyon yöntemi kullanılarak 40 mg albümin 2 mL distile suda (pH=7.4) çözüldürülmüştür. Aynı bir tüpte hazırlanan 0,5 mg Venetoklaks (ABT199) 500 µL DKM

ilave edilerek çözdürülmüş, bunun üzerine (su fazı ile karışmayan DKM'nin albümin çözeltilisine eklendiğinde oluşacak faz ayrımını önlemek için) 1,5 mL etanol eklenmiştir. Başka bir tüpte ise 1 mg kitosan 500 µL distile suda çözdürülüp üzerine 500 µL etanol eklenmiştir. Magnetik karıştırıcıda farklı rpm'de (300-500 rpm) karışmakta olan albümin çözeltilisi üzerine önce Venetoklaks çözeltilisi sonra katyonik özellik kazandırmak amacıyla kitosan çözeltilisi eklenip damla damla ilave edilmiştir. Agregat oluşumunu önlemek ve partikül boyutunu düşürmek amacıyla bulanıklık gözlenen bu karışım üzerine %4 Tween 80 (1 mL) damla damla ilave edilerek organik fazın oda sıcaklığında uçması için beher ağzı açık bir şekilde karışır halde (18-24 saat) bırakılmıştır. Agregasyon nedeniyle gözlenen çökme eğilimi dikkate alınmış, formülasyonda kullanılan oranlar değiştirililerek en kararlı formülasyon seçilmiştir. Bu amaç için, albümin miktarı azaltılıp, etkin madde miktarı artırılarak, kullanılan suyun pH'sı, albümini denatüre etmek için kullanılan etanol miktarı, manyetik karıştırıcıda kalma süresi ve manyetik karıştırıcının dönüş hızı değiştirilerek çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır.

F1 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL distile suda (pH= 7,4) çözdürülüp 2 mL etanol ilave edilerek berrak bir çözelti elde edilmiştir. Ayrı tüpte hazırlanan 2 mg Venetoklaks (ABT199) 500µL DKM ile etkin madde çözdürülmüş ve albümin/alkol çözeltilisine eklenmiştir. Desolve olan albüminin çözeltilisinin bulanıklık gösterdiği bilindiğinden, daha sonra bu karışımın üzerine bulanıklık gözlemlene kadar etanol eklenmeye devam edilmiştir. Albümini denatüre etmek amacıyla tüm çözeltiye 6mL etanol daha ilave edilmiş ve formülasyon 18 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 300 rpm hıza maruz bırakılarak, formülasyondan etanol ve DKM uzaklaştırılmıştır.

F2 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL distile suda (pH= 7,4) çözdürülüp 2 mL etanol ilave edilerek berrak bir çözelti elde edilmiştir. Ayrı tüpte 2 mg Venetoklaks'ı çözebilen minimum DKM miktarı 150 µL olarak belirlenmiş ve etkin madde bu miktar içerisinde çözdürülüp albümin/alkol çözeltilisine eklenmiştir. Bulanıklık ya da çökelti gözlenmemiştir. Formülasyon, ortamdan etanol uzaklaştırılana kadar manyetik karıştırıcıda 300 rpm hıza maruz bırakılmıştır. Partikül büyüklüğünü küçültmek için F2' ye 1 mL %4 Tween 80 ilave edilmiştir. 1.saat, 2.saat, 4.saat ve 18.saat sonunda partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

F3 formülasyonu: Bu formülasyonda öncelikle çözücü olarak kullanılan distile suyun pH'sı 5,98 olarak değiştirilmiştir. 20 mg albümin 2 mL distile su (pH=5,98) ile çözündürülüp 2 mL etanol eklenmiştir. 2 mg Venetoklaks 150 µL DKM ile çözündürülüp albümin çözeltisine ilave edilmiştir. Sonradan eklenen etanol miktarı azaltılarak etanolün formülasyondan uzaklaşma süresi kısaltılmıştır. Formülasyona 4 mL daha etanol ilave edilip, 300 rpm hızda manyetik karıştırıcıda etanol tamamen uçana kadar bekletilerek hazırlanmıştır.

Sığır serum albümini anyonik özelliktedir. Hücre membran yüzeyinin de negatif yüklü olması nedeniyle tasarlanan formülasyonda hazırlanan nanopartiküllerin pozitif yüklü olması membran yüzeyine tutunabilme açısından önemlidir.

F3 olarak isimlendirilen formülasyonda ABT199 yüklendikten sonra zeta potansiyeli  $8,91 \pm 0,8$  mV olarak ölçülmüştür. Venetoklaks yüklenmesinin nanopartiküllere katyonik özellik kazandırdığı gözlenmiş ancak formülasyonun hücre membranına daha kararlı tutunabilmesi için daha yüksek bir zeta potansiyeli değerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle, bu aşamadan sonra hazırlanan formülasyonlara katyonik özellik kazandırma amacıyla kitosan çözeltisinin eklenerek denemeler yapılmasına karar verilmiştir.

F4 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL distile su (pH=5,9) ile çözündürülüp 2 mL etanol eklenmiştir. 2mg ABT199 150µL DKM ile çözündürülüp albümin çözeltisine ilave edilmiştir. Aynı bir tüpte 2 mg kitosan 500 µL distile su ile (pH=5,9) çözündürülerek kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. 4 mL etanol ve kitosan çözeltisi sırasıyla formülasyona eklenip manyetik karıştırıcıda 300 rpm hızda etanol tamamen uzaklaşana kadar bekletilmiştir.

F5 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL distile suda (pH=7,4) çözündürülmüştür. Aynı tüpte 2 mg kitosan 500 µL distile suda (pH=5,98) çözündürülüp üstüne 500 µL etanol eklenmiştir. Albümin çözeltisine 2 mL etanol eklenerek üzerine kitosan çözeltisi ilave edilmiştir. Formülasyon etkin maddesiz olarak hazırlanıp, dönüş hızı artırılarak manyetik karıştırıcıda 500 rpm hızda etanol uzaklaştırılmıştır. Dönüş hızını artırarak, etanolün daha kısa sürede uzaklaştırılması dolayısıyla formülasyonun manyetik karıştırıcıda kalma süresini kısaltmak hedeflenmiştir. Ayrıca partikül boyutuna etkisi de karşılaştırılmıştır.

F6 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL suda (pH=7,4) çözündürülüp, 2 mL etanol eklenmiştir. Aynı bir tüpte 2 mg ABT199 150 µL DKM ile çözündürülüp 500 µL etanol eklenmiştir. Başka bir tüpte ise 2 mg kitosan 500 µLdistile suda (pH=5.9) çözündürülüp 500

$\mu\text{L}$  etanol eklenmiştir. Venetoklaks içeren tüp kitosan çözeltisine ilave edilip karıştırılmıştır. Venetoklaks ve kitosan karışımı albümin çözeltisine ilave edilip manyetik karıştırıcıda 500 rpm hızda etanol uzaklaşmaya kadar karıştırılmıştır.

Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri öncelikli olarak analiz edilmiştir ve formülasyonların içerikleri ve kodları Tablo 4.1’de sunulmuştur.

AlbF: Desolvasyon işleminin albümini nasıl etkilediğinin belirlenmesi için hazırlanmıştır. Bunun için, 20 mg albümin 2 mL suda (pH=7,4) çözündürülmüş ve bulanıklık oluncaya kadar (~6 mL) etanol eklenmiştir. Etanolün uçması için bu karışım ağız açık bir şekilde manyetik karıştırıcıda bırakılmıştır.

**Tablo 4.1.** Formülasyonların içerikleri ve kodları ile partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerinin kıyaslanması

	ABT 199 2 mg	%0,04 Kitosan 500 $\mu\text{L}$	%4 Tween 80 1 mL	pH	Partikül büyüklüğü nm	PDI	Zeta potansiyeli mV
<b>AlbF</b>	-	-	-	7,4	50 $\pm$ 2,4	0,102 $\pm$ 0,01	6,17 $\pm$ 0,65
<b>F1</b>	+	-	-	7,4	1360 $\pm$ 54,7	0,562 $\pm$ 0,05	16,21 $\pm$ 0,57
<b>F2</b>	+	-	+	7,4	140,41 $\pm$ 4,5	0,229 $\pm$ 0,01	-26,51 $\pm$ 0,86
<b>F3</b>	+	-	-	5,9	547,40 $\pm$ 26,5	0,569 $\pm$ 0,05	8,91 $\pm$ 0,23
<b>F4</b>	+	+	-	5,9	581,43 $\pm$ 37,2	0,368 $\pm$ 0,03	46,90 $\pm$ 073
<b>F5</b>	-	+	-	7,4	193,38 $\pm$ 3,8	0,273 $\pm$ 0,01	28,6 $\pm$ 0,36
<b>F6</b>	+	+	-	7,4	364,72 $\pm$ 7,4	0,253 $\pm$ 0,05	41,4 $\pm$ 0,95

\*Tüm formülasyonlar 2 mL olarak hazırlanmıştır ve kullanılan Albümin miktarı 20 mg’dır.

\*Kullanılan suyun pH’ sı 5.9 ve 7.4 olarak ayarlanmıştır.

Bu değerler dikkate alınarak en uygun formülasyon olarak F6 seçilmiştir ve bu formül üzerinden çalışmalara devam edilmiştir.

### 4.3. F6 Formülasyonunun Karakterizasyon Çalışmaları

#### 4.3.1. Partikül boyutu ve dağılımı

Nanopartiküllerin fiziksel olarak kararlı olduklarını anlayabilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımına bakılır. Dinamik ışık saçılması, lazer kırınımı, foton korelasyon

spektroskopisi gibi yöntemlerle partikül boyutu ve partikül dağılımları elde edilebilir. Bu üç yöntemde en önemli parametre PDI (polidisperslik indeksi) değeridir. PDI değeri 0,1- 0,25 arasında olursa, istenilen dar partiküler dağılım (homojen) elde edilebilir. PDI değeri 0,45'in üzerinde olursa geniş partiküler dağılım (heterojen) elde edilir. PDI değeri 0,45'in altında değerler kabul edilebilir sınırlar içerisinde.

Çalışılan tüm formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde kullanılan distile suyun pH' sı 7,4'e ve iletkenliği 50  $\mu\text{S}$ 'e ayarlanmış ve 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik filtrelerden geçirilmiştir. Ölçümler formülasyonlardan 50  $\mu\text{L}$  alınıp, distile su ile 1 mL'ye tamamlanarak partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçme cihazı (NanoZetasizer ZS, İngiltere) cihazında gerçekleştirilmiştir ve her ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.3.2. Zeta potansiyeli**

Nanopartiküllerin stabilitesinin ve kararlılığının ölçülmesi için PDI değerinin ve zeta potansiyelinin belirlenmesi gerekmektedir. Her partikül pozitif ve negatif yüklü oluşuna göre zıt yüklü iyonlarla çevrelenir ve tek tabakalı moleküler bir katmana sahiptir. Bu katmanın etrafında partiküle bağlı olmayan hareketli ikinci bir iyon tabakası bulunur. Partikül yüzeyi ile nötral bölge arasındaki potansiyel farkı 'zeta potansiyel' olarak adlandırılır. Zeta potansiyel ölçümleri elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerden yararlanılarak zetametre denilen aletle ölçülür ve birimi milivolttur (Çelebi, 2002). Elektroforetik hareket ölçüldükten sonra ortamın viskozluğu ve dielektrik sabitibildiği takdirde Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinden faydalanılarak zeta potansiyel hesaplanır (Öner, 2012).

Partiküllerin kimyasına bağlı olarak polaritede pozitif veya negatif olabilen Zeta potansiyeli, partikül yüzeyinde bir yükün varlığı ile oluşturulan bir elektrik potansiyelidir. Zeta potansiyelinin ölçülmesi, koloidal dispersiyonun kararlılığı hakkında genel bilgi sunmaktadır. Zeta potansiyeli, formülasyondaki benzer yüklü parçacıklar arasındaki itme derecesinin bir göstergesidir ve yüzey yükü yüksek olan partiküllerin birbirlerini itme kuvvetleri, saklama sırasında partiküllerin agregasyonunu ve çökmesini engeller. Zeta potansiyelinin 30 mV'tan daha yüksek pozitif veya -30 mV'tan daha yüksek negatif olması sistemin monodispers olmasını sağlamaktadır. Diğer yandan 5 mV'tan düşük, -5 mV'tan

yüksek olacak şekilde nötr değere yakın olması da agregasyona sebep olabilmektedir (Patel ve Agrawal, 2011; Bhattacharjee, 2016) ve dispersiyonlar çökeltme eğilimindedirler.

Zeta potansiyel ölçümü için partikül boyutu analizinde hazırlanan örneklerde aynı cihazın farklı programı kullanılarak yapılmıştır. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyeline dönüştürülmesinde Helmholtz-Smulochowskieşitliği kullanılmıştır. 20 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanan cihazda ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.3.3. F6 formülasyonunun genetik materyal bağlama kapasitesi**

Bu çalışmada bir Bcl-2 inhibitörü olan etkin madde Venetoklaks (ABT199) yüklenmiş formüle ikinci aşama olarak genetik materyal yüklenmesi amaçlanmıştır. Genetik materyal olarak *Bcl-2* siRNA kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, F6 formülasyonunun genetik materyal bağlama yetisinin belirlenmesi için ilk çalışmalar, tez kapsamında siRNA miktarının az olması nedeniyle, Green Floresan Protein plazmid DNA'sı (GFP pDNA) ile gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda siRNA bağlama ve görüntüleme çalışmaları yürütülmüştür.

Genetik materyalin formülasyona yüklenme işlemi elektrostatik olarak etkileşim mekanizması dahilinde DNA/siRNA'nın partiküllere adsorpsiyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, etkin madde (ABT199) yüklü partikülünün genetik materyal tutma yetisini etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi ve etkin maddenin toksik özelliğinin transfeksiyon çalışmalarında gözlenmemesi amacıyla F5 formülasyonunda (boş formülasyon) da gerçekleştirilmiştir.

Genetik materyal yüklenmiş formülasyonların bağlanma kapasiteleri jel retardasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

##### **4.3.3.1. Jel Retardasyon Çalışmaları**

Jel elektroforezi, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir inceleme yöntemidir. Elektroforetik analiz elektriksel bir alanda, ortamda çözülmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri esasına dayanır. Büyük moleküllerin jel üzerinde ilerlemesi daha yavaş olurken küçük moleküller daha hızlı ve rahat hareket edebilirler. Molekülün anota mı

(+ kutup) yoksa katota mı (- kutup) doğru hareket edeceği molekül üzerindeki net yük ile ilişkilidir. DNA ve RNA molekülleri serbest fosfat gruplarından dolayı eksi yüklü moleküllerdir. Bu nedenle jel üzerinde katottan anota doğru ilerler. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, ortamın yoğunluğuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Kullanılan molekülün jel üzerindeki yerini belirlemek için ortamda UV ışığı altında floresan etki gösteren etidyum bromürün (EtBr) veya benzeri bir ışığıcı maddenin bulunması gerekmektedir. Bununla birlikte elektroforez deneylerinde bir tampon çözeltiye ihtiyaç duyulur. Tampon çözelti elektrik akımının geçişini sağlamak ve ortamda elektrolit miktarını arttırmak için kullanılır. Ayrıca tampon, ortamın pH'sında meydana gelebilecek olası radikal değişimlere de izin vermemektedir.

#### **4.3.3.1.1. Kullanılan tamponlar**

##### 10 X TBE (1 L pH 8.0)

Trizma Baz	108 g
Borik asit	55 g
0.5 M EDTA	40 mL

##### 50 X TAE (1 L pH 8.0)

Trizma Baz	242 g
Disodyum EDTA	18,61 g
Glasiyal Asetik Asit	57,1 ml

#### **4.3.3.1.2. Jelin hazırlanması**

%1,5'lük 150 mL agaroz jel hazırlanmak üzere 2,25 g agaroz tartılmıştır. Tartılan agaroz, 150 mL 1 x TAE çözeltisinde manyetik karıştırıcıda, ısıtılarak çözündürülmüştür. Berrak bir çözelti elde edilip, çözelti yaklaşık 45°C sıcaklığa geldiğinde %5 oranında EtBr ilave edilmiştir. Hazırlanan jel hava kabarcığının olmamasına dikkat edilerek kalıba dökülmüş ve uygun taraklar yerleştirilerek 45 dakika boyunca katılaşmaya bırakılmıştır. Jel katılaştıktan sonra tampon çözeltiyle dolu tanka alınmıştır.

siRNA elektroforez işlemi için %2,5 agaroz içeren jel hazırlanmıştır. Yürütme tamponu ve jel hazırlamak için stok 10 X TBE'den hazırlanan 1 X TBE kullanılmıştır.

#### **4.3.3.2. Formülasyonlara DNA yüklenmesi**

DNA konsantrasyonu (1µg/10µL) sabit tutularak, farklı hacimlerde alınan 6 formülasyona DNA yüklenmiştir. Yükleme işleminde DNA ve formülasyonlar elektrostatik etkileşimin gerçekleşmesi için önce bir tüpte mikropipet yardımı ile dikkatlice karıştırılmış



daha sonra 37°C’de 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüpe 10 µL yükleme tampon solüsyonu (1 x TAE) eklenerek jeldeki kuyucuklara uygulanmış ve jel görüntüleri jel dökümantasyon cihazı ile alınmıştır (UViTec, İngiltere). Formülasyona yüklenebilecek maksimum DNA miktarı belirlenmiştir.

#### **4.3.3.3. Formülasyonlara siRNA yüklenmesi**

siRNA yüklemesi çalışmalarında, siRNA (40 µg/mL), DNA çalışmalarında kullanılan formülasyon miktarları ile mikrotüpler içerisinde aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır ve jele yüklenerek görüntülenmiştir.

#### **4.4. Venetoklaks (ABT199) Miktar Tayini için Ultra Basınçlı/Performanslı Sıvı Kromatografisi**

Partiküllere yüklenmiş ve salım çalışmalarındaki ABT199 miktarının belirlenmesi için ultra basınçlı/performans sıvı kromatografisi (UPLC) (Agilent 1290 Infinity LC System, Almanya) kullanılmıştır. Kolon olarak 4,6x150 mm’lik, 0,5 µm çaplı, Intersil® ODS-3 (Tokyo, Japonya) kolonu seçilmiştir. 0. dakikada *h/h* CH<sub>3</sub>OH (% 0,1 TFA) : H<sub>2</sub>O (% 0,1 TFA) oranı 40:60 olarak başlatılan mobil faz, ilk 8 dakikada gradient olarak 100:0 oranına arttırılmış ve analiz 12. dakikada bu oranda sonlandırılmıştır. Analiz şartları; sıcaklık 40 °C, akış hızı 0,65 mL/dk., enjeksiyon hacmi 5 µL ve 289 nm dalga boyu olarak belirlenmiştir.

##### **4.4.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması**

Analitik yöntem validasyonunun temel hedefi kullanılacak yöntemin amacına uygunluğunu kanıtlamaktır. Bu amaçla kullanılan test yönteminin doğruluk ve güvenilirlik parametreleri verilerle kanıtlanarak gösterilmektedir. Miktar tayini validasyonunda doğrusallık, kesinlik, doğruluk parametreleri esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, Uluslararası Harmonizasyon Konferansı’nın ‘Analitik İşlem Validasyon Yöntemi’ kullanılmıştır (ICH, 2014, s. 1-13).

#### **4.4.1.1. Doğrusallık**

Analitik yöntemin doğrusallığı, analizi yapılan maddenin farklı derişimdeki örneklerinin elde edilen pik alanı ile belirli derişim aralığında doğru orantılı olmasıdır. Doğrusallık çalışmasında, analitik derişiminin fonksiyonu olarak sinyal elde edilir. Bu teste ait değerlendirme regresyon analizi ve istatistiksel yöntemle yapılır. Doğrusallığın belirlenmesi için en az 5 derişimde çalışılması önerilmektedir. UPLC yönteminde kullanılacak olan ABT-199'a ait standart eğrinin bulunabilmesi amacıyla stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti, tam olarak tartılmış 100 µg ABT-199/mL hareketli faz CH<sub>3</sub>OH (% 0,1 TFA) ile hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözülden çeşitli seyreltmeler yapılarak 10-100 µg/mL aralığında farklı derişimde (20, 40, 50, 60, 80, 100 µg/mL) çözelti hazırlanmıştır. Analiz sonucunda yedi nokta için ABT199 derişimine karşılık gelen alan değeri saptanmıştır. Her test 6 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.4.1.2. Kesinlik**

Kesinlik, tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile belirlenmektedir. Tekrarlanabilirlik, aynı işlem koşullarında ve kısa zaman aralığındaki kesinliği ifade eder. Yöntemin tekrarlanabilirliği aynı stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümünün tekrarlanması ile elde edilir. Bu işlem 6 kez tekrarlanarak veya 3 farklı derişimde 3'er kez tekrarlanarak yapılır. Ara ürün kesinliği birbiri ile ilişkisi bulunmayan durumların analitik yöntemin kesinliği üzerine etkisini ifade eder. Değişkenler arasında gün, analist, kullanılan malzeme ve farklı laboratuvarlarda bulunan ve analizde kullanılan cihazın (UPLC cihazı, UV spektrofotometre cihazı, vb.) marka ve modeli bulunur. Tekrar elde edilebilirlik ise analiz ve deneylerin farklı laboratuvarlarda tekrarlandığında sonuçlar arasındaki kesinliğin gösterilmesidir. Yöntemin standardizasyonu için genellikle farklı kuruluşlar ile ortak çalışma yapılır. Tekrar elde edilebilirlik zorunlu olmayan validasyon parametresidir. Yöntemin kesinlik çalışmasında, tekrarlanabilirliğini göstermek için kalibrasyon aralığına denk gelen 3 farklı derişimde (10 µg/mL, 60 µg/mL, 90 µg/mL) ABT199 çözeltisi hazırlanmış ve her bir derişim için ölçüm 6 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.4.1.3. Doğruluk**

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığıdır. Doğruluk çalışması, 3 farklı derişimde hazırlanan çözeltinin analizinin en az 3 kez tekrar edilmesi şeklinde gerçekleştirilir. Sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilir. Bu çalışmada doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı derişimde (20 µg/mL, 50 µg/mL, 80 µg/mL) ABT199 içeren çözelti hazırlanmıştır. Her bir çözelti için analiz 6 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.4.2. Formülasyonda yüklenen etkin madde (ABT199) miktar tayini**

ABT199 ile hazırlanan F6 formülasyonunda albümine yüklenen ve yüklenmeyen etkin madde miktarları ayrı ayrı analiz edilmiştir.

F6 formülasyonundan 4 mL'lik tüpe 200 µL alınıp 1 mL distile su eklenmiştir. Hazırlanan numune 11,000 rpm hızda 20 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda 1 mL üst faz (supernatant) ayrılmıştır. Ayrılan kısım 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Filtre, 1 mL CH<sub>3</sub>OH (%0,1 TFA) tampon çözeltisiyle yıkanarak filtreden geçirilen numuneye eklenmiştir. 1:1 oranında hazırlanmış numuneden 500 µL alınarak UPLC'de etkin madde miktar tayini yapmak üzere hazırlanmıştır.

Santrifüj sonunda üst faz alındıktan sonra kalan pellet üzerine 1 mL CH<sub>3</sub>OH (%0,1 TFA) tampon çözeltisi ve 1 mL distile su eklenmiştir. Numune 1 dakika süreyle ultrasonikasyona tabi tutulmuştur. Albümin denatüre edilerek taşıyıcı sisteme yüklenmiş etkin madde (ABT199) ekstrakte edilmiştir.

Santrifüj sonunda üst faz için uygulanan protokol denatüre edilen pellet için de uygulanmıştır. Toplam 2 mL hacimde hazırlanan numuneden 1 mL alınarak 0.22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Filtre, 1 mL CH<sub>3</sub>OH (%0,1 TFA) tampon çözeltisiyle yıkanarak filtreden geçirilen numuneye eklenmiştir. 1:1 oranında hazırlanmış numuneden 500 µL alınarak UPLC'de etkin madde miktar tayini yapılmış ve etkin maddenin taşıyıcı sisteme yüklenme kapasitesi, yükleme etkinliği çalışması ve hesabı Khoshneviszadeh ve diğerlerinin (2016) yaptığı çalışmada kullandığı yöntem ve eşitlik ile gerçekleştirilmiştir. Yükleme verimliliği (%EE), yüklenen etkin maddenin toplam etkin maddeye bölünmesiyle hesaplanır. Yükleme kapasitesi, yüklenmiş etkin maddeye bağıl olarak nanopartikül kütesinin yüzdesini

belirten, nanopartikülün birim ağırlığı başına yüklenen etkin madde miktarıdır. (Khoshneviszadeh vd., 2016).

Yükleme etkinliğini hesaplamak amacıyla denklem 4.1 kullanılmıştır.

$$\%EE = \frac{\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı} - \text{süpernatantdaki etkin madde miktarı}}{\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı}} \times 100$$

(4.1)

#### 4.4.3. *In vitro* salım çalışması

*In vitro* çözünme hızı testleri, yeni formülasyonların geliştirilmesi, bir ilacın seriden seriye kalite güvenliğinin kontrolü ve stabilite değerlendirmesinde oldukça önemlidir. Farmakope monograflarında belirtilmemiş bir preparatın çözünme testi yöntemi ve koşullarının (çözünme ortamı bileşimi, pH'sı, iyonik direnci, ortamın karıştırılma hızı, ortam havasının alınması vb. gibi) belirlenmesi için etkin maddenin çözünürlüğü, stabilitesi, preparatın vücuda tatbik edileceği bölge ve özellikleri, permeabilitesi gibi bilgilerin değerlendirilmesi gerekmektedir (Dyas ve Shah, 2007).

Formülasyonlardan etkin maddenin salım profilinin belirlenmesi için mikrotüp yöntemi kullanılmıştır (Büyükköroğlu vd., 2016) Bu çalışma için 37 °C sıcaklıkta pH 5,5 ve pH 7,4 olmak üzere iki ayrı pH değerinde fosfat tamponu çözeltisi (PBS) hazırlanmıştır. 4 mL'lik 6 ayrı tüpün her birine 500 µL F6 formülasyonu konmuş, bunların üçüne pH değeri 5,5 diğer üçüne de pH değeri 7,4 olarak ayarlanmış fosfat tamponununun 1,5 mL eklenmiş ve salım çalışması için kurulan düzeneğe yatay olarak yerleştirilmiştir. Ortam sıcaklığı 37 °C olarak ayarlanmış düzenek orbital çalkalayıcının üzerine yerleştirilerek, 200 rpm'de çalkalamaya bırakılmıştır. Salım zamanları 30. dakika, 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48. ve 72. saat olarak belirlenmiştir. Her zaman diliminde, çalkalayıcı durdurularak tüpler 11,000 rpm hızda 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst fazdan 1.5 mL, pelletin resüspandeye olmamasına dikkat edilerek, alınmış, yerine taze 37 °C'deki fosfat tamponu pH değerleri dikkate alınarak eklenmiş, tampon içinde pelletler pipetajla resüspandeye edilmiştir ve tekrar salıma bırakılmıştır. Toplanan her salım numunesi 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir ve ayrı ayrı tüplerde toplanmıştır. Her bir numuneden 500 µL hacim alınarak, UPLC ile salınan etkin madde miktarı tayini yapmak amacıyla, 500 µL CH<sub>3</sub>OH (% 0,1 TFA) tampon çözeltisiyle (1:1 oranında) tamamlanmıştır.

## 4.5. Hücre Kültürü

Hücre olarak MDA-MB 231 insan meme kanser hücresi ve NIH-3T3 sağlıklı fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin üretiminde ve formülasyonların uygulanması işlemlerinde hücre kültürü tekniğinden faydalanılmıştır. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 glutamin içeren DMEM içerisinde kültüre edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Hücreler hızlı büyüme evresine ulaştıktan sonra 2X Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilerek alt kültürlere ayrılmıştır ve kullanılmayan alt kültürler kademeli olarak soğutularak -80 °C' de saklanmıştır.

### 4.5.1. Sitotoksosite çalışması

Günümüzde MTT olarak bilinen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür yöntemi ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanmış ve daha sonra Alley vd. tarafından geliştirilmiştir. Hücre biyolojisinde sitotoksosite, hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir (Riss vd., 2016).

MTT, suda çözünebilir bir tetrazolyum tuzudur ve hücre mitokondrisinde suda çözünmeyen formazan denen bir maddeye indirgenir. Formazan, hücre zarından geçemez ve bu sebepten sağlıklı hücrelerde birikme gösterir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Bu durum canlı ve mitokondriyal aktivitesi sağlam hücrelerin mor renge boyanmasını sağlarken, ölü veya mitokondriyal aktivitesi bozulmuş hücrelerin boyanmamasına sebep olur. Hücrelerin MTT indirgeme fonksiyonu hücre canlılığını gösteren bir parametredir ve MTT çalışmaları sonrasında gözlemlenen boya yoğunluğu, hücre canlılığı ile doğru orantılıdır (Van Meerloo vd., 2011; Riss vd., 2016).

Bu tez çalışmasında formülasyonların hücre üzerindeki sitotoksitesinin tespit edilmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır. Kontrol grubunu içeren kuyucuklardaki hücrelerin ölçülen absorbans değeri %100 canlılığı gösterir. Test örneklerinin (formülasyonlar) denendiği hücrelerin absorbans değeri de hesaplanarak kontrol grubuna göre göreceli % canlılık değerleri bulunur. Bu relatif değerler %100'ün altında olduğu zaman uygulanan formülasyon hücre üzerinde toksik etki göstermiş ve hücre ölümlerine sebep

olmuş olarak kabul edilir. Hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonlarında IC50 değerini vermektedir.

Formülasyonların toksisitesinin belirlenmesi için, DMEM hücre kültür besiyeri içerisindeki hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her bir kuyusuna eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 günlük inkübasyon süresi sonunda her bir kuyudaki besiyeri çekilmiş ve etkinliği ölçülecek formülasyonların (Bölüm 4.4.2) daha önce belirlenmiş miktarları hücre kültür besiyeri ile karıştırılarak plakalara eklenmiştir. Plakalar 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik her inkübasyon süresi sonrasında kuyucuklarda bulunan besiyerleri uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkandıktan sonra, her kuyucuğa 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış MTT boyasından 20 µL ilave edilmiştir. Hücreler, MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzuna dönüştürülmesi için 37°C'de 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklenerek formazan tuzunun çözünmesi ve renk oluşturması için tekrardan 37°C'de 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Plakalardaki canlı hücre konsantrasyonu Cytation 5 cihazı aracılığıyla 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Deney her bir derişim için 8 kuyuda yapılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir.

Hücre canlılıklarını kıyaslamak üzere, bu çalışma kapsamında kullanılan genetik materyal, ABT199 etkin maddesi, F5 ve F6 formülasyonları ile bu formülasyonların siRNA ile kombin formlarını içeren (Tablo 4.2) örnekler hücrelere uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.2.** Hücrelere uygulanan 100 µL besiyeri içerisinde bulunan ABT199, siRNA ve formülasyon miktarları

	Hücrelere uygulanan miktarlar		
F6	0,5 µL	1µL	1,5 µL
F5	0,5 µL	1 µL	1,5 µL
ABT199	0,5 µg	1 µg	1,5 µg
siRNA	100 ng	150 ng	200 ng
siRNA+ABT199	200 ng/0,5 µg	200 ng/1 µg	200 ng/1,5 µg
F5-siRNA	0,5 µL/200 ng	1 µL/200 ng	1,5 µL/200 ng
F6-siRNA	0,5 µL/200 ng	1 µL/200 ng	1,5 µL/200 ng

#### **4.5.1.1. Sitotoksik etkileri değerlendirilecek formülasyonların hazırlanması**

Hücre canlılıklarını kıyaslamak üzere, bu çalışma kapsamında kullanılan genetik materyal, ABT199 etkin maddesi, F5 ve F6 formülasyonları ile bu formülasyonların siRNA ile kombin formlarını içeren (Tablo 4.2), örnekler hücrelere uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda hücre canlılıkları değerlendirilmiştir.

##### **4.5.1.1.1. ABT199 çözeltisi hazırlanması**

1 mg ABT199 50µL DMSO ile çözündürülüp 1 ml distile suya tamamlanmıştır. Daha sonra bu 1 mg/mL konsantrasyondaki ABT199 Tablo 4.2.'deki oranlarda 100 µL besiyeri ile karıştırıldıktan sonra hücrelere uygulanmıştır.

##### **4.5.1.1.2. siRNA çözeltisi hazırlanması**

Nano-drop cihazıyla 1µL'sinde 386 ng *Bcl-2* siRNA olduğu ölçülen tüpten 26 µL siRNA alınıp 1 mL'ye otoklavlanmış distile su ile tamamlanmıştır. Konsantrasyonu 40µg/mL olacak şekilde çözelti seyreltilmiştir ve hücrelere uygulanmıştır.

##### **4.5.1.1.3. F5 ve F6 Formülasyonlarının seyreltilmesi**

Her bir formülasyondan ayrı ayrı mikrotüplere 15 µL alınıp 100 µL'ye tamamlanmıştır ve 100 µL besiyerine bu stoktan 5, 10 ve 15 µL konularak disperse edilmiş ve hücrelere uygulanmıştır.

#### **4.5.1.1.4. F5-siRNA ve F6-siRNA kombinasyonunun hazırlanması**

Tablo 4.2’de belirtilen miktarlarda siRNA ve formülasyonlar mikrotüp içerisine alınmış, 37 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 100 µL besiyeri içerisinde dağıtılarak hücrelere uygulanmıştır.

#### **4.5.1.1.5. ABT199 çözeltisi ile siRNA yüklenmesi**

Stok ABT199 çözeltisinden (1 mg/mL) belirtilen miktarlarda (her bir kuyu için 0,5 µL, 1 µL ve 1,5 µL olmak üzere)ayrı tüplere alınmış ve her kuyuda 40 µg/mL siRNA konsantrasyonu ayarlanıp besiyeri ile 100 µL’ye tamamlanmış ve hücrelere uygulanmıştır.

#### **4.5.2. Transfeksiyon Çalışması**

ABT199’un ve Bcl-2 siRNA’nın hücreler üzerinde toksik etkileri görülme ihtimali nedeniyle, transfeksiyon çalışmalarında F5 formülasyonu ve FITC-konjugeli kontrol siRNA kullanılmıştır. FITC-konjugeli kontrol siRNA hücrelere transfekte olduktan sonra hücre içerisine vermiş olduğu ışığa sayesinde floresan mikroskobu altında görüntülenebilmektedir (Pedersen vd. 2009). Hücre olarak MDA-MB 231 insan meme kanser hücresi ve NIH-3T3 sağlıklı fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Yukarıda anlatıldığı gibi seyreltilmiş F5 formülasyon stoğundan 5 µL (0,5 µL formülasyon içeren) alınmış, 200 ng FITC-konjugeli siRNA ile aşağıda belirtilen protokole uygun olarak uygulanmıştır.

1. Birinci gün 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına antibiyotiksiz %10 FBS içeren besiyeri ile hücre ekimi yapılmış ve %60-70 yoğunluk oluncaya kadar 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2. Bir günlük üreme periyodunun ardından kuyucuklardaki besiyerleri ikinci gün çekilmiştir ve 1X PBS tamponu ile bir kez yıkanmıştır.

3. Çeşitli oranlarda hazırlanmış formülasyonlar FBS ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile karıştırılmış ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler üzerine damlatılarak eklenmiştir.

4. Plakalar yeniden 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. 6 saat süre sonunda, her bir kuyucuğa %20 FBS içeren besiyeri eklenmiştir.



5. 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından plakalar floresan mikroskobu altında incelenmiştir.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Formülasyon Çalışmaları

Albümin nanopartikülleri, desolvasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Formülasyon hazırlanırken, yapılan denemeler sırasında albüminin desolvasyonu için kullanılan alkol miktarının azaltılmasında etkili olma ihtimalinin değerlendirilmesi amacıyla albümin iki farklı pH'da (5,9 ve 7,4) distile suda çözündürülmüştür. pH'nın düşürülmesinin alkol ekleme sırasında albüminin desolvasyonunda etkili olduğu gözlenmiştir ancak etanolün ortamdan uzaklaşması sonrasında, partikül boyutları değerlendirildiğinde albümin yapısının tekrar eski haline dönmesinde sorun yarattığı belirlenmiştir. Bu nedenle pH 5,9 distile su yerine 7,4 olan seçilmiştir ve formülasyonlar bu su ile hazırlanmıştır.

Formülasyon geliştirme sırasında ön denemeler yapılmış ve elde edilen dispersiyonların öncelikli olarak partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyelleri belirlenmiş, elde edilen sonuçlara göre optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, en uygun formülasyon belirlenerek, tez aşamasında belirtilen genetik materyal bağlama yetisi, etkin madde yükleme kapasitesi, salım profili ve hücre kültürü çalışmaları bu formülasyon üzerinden yürütülmüştür.

Her partikül pozitif ve negatif yüklü oluşuna göre zıt yüklü iyonlarla çevrelenir ve tek tabakalı moleküler bir katmana sahiptir. Bu katmanın etrafında partiküle bağlı olmayan hareketli ikinci bir iyon tabakası bulunur. Partikül yüzeyi ile nötral bölge arasındaki potansiyel farkı 'zeta potansiyel' olarak adlandırılır. Zeta potansiyel ölçümleri elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerden yararlanılarak zetametre denilen aletle ölçülür ve birimi mili voltur (Çelebi, 2002). Elektroforetik hareket ölçüldükten sonra ortamın viskozluğu ve dielektrik sabiti bilindiği takdirde Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinden faydalanılarak zeta potansiyel hesaplanır (Öner, 2012).

Zeta potansiyelinin  $|30|$  mV' tan daha büyük olması sistemin monodispers olmasını sağlamaktadır. Diğer yandan 5 mV'tan düşük, -5 mV'tan yüksek olacak şekilde nötr değere yakın olması da agregasyona sebep olabilmektedir ve bu özellikte ki dispersiyonların çökme eğiliminde olduğu rapor edilmiştir (Patel ve Agrawal 2011, Bhattacharjee 2016). Formülasyon çalışmalarında, hem genetik materyalin partiküllere elektrostatik olarak adsorbe edilmesi hem de kararlılığının sağlanabilmesi için optimum zeta potansiyellerinin 30

mV üzerinde hazırlanmasına dikkat edilmiştir. Hazırlanan tüm formülasyonların zeta potansiyel ve partikül boyutu değerleri tablo 4.1’de sunulmuştur.

AlbF dispersiyonu, kullanılan BSA’ nin formülasyon aşamaları uygulanılmaktan sonraki davranışlarını belirlemek amacıyla hazırlanmıştır ve bu dispersiyonun partikül boyutu  $50\pm 2,4$  nm, zeta potansiyeli ise  $6,17\pm 0,65$  mV olarak belirlenmiştir. Bu dispersiyonlar partikül boyutu açısından uygun bulursa da, zeta potansiyeli genetik materyali elektrostatik olarak kendisine bağlama açısından yetersiz bulunmuştur.

ABT199 eklenerek hazırlanmış F2 formülasyonunda, etkin madde ilavesi ile partikül boyutunda ve dağılımında ( $1360\pm 54,7$  nm ve  $0,562\pm 0,05$ ) ayrıca zeta potansiyelinde ( $16,21\pm 0,57$  mV) artış gözlenmiştir. Albüminin, amino asit kalıntıları yoluyla çeşitli endojen ve eksojen bileşiklere bağlanabildiği bilinmektedir. Bu bağlanma, esas olarak albüminin IIA (site I) ve IIIA'daki (site II) hidrofobik boşluklarında gerçekleşir (Yuan vd., 2019). ABT199 olmadan albümin nanopartiküllerin boyutu yaklaşık 50 nm gözlenirken, ABT199’un eklenmesiyle bu değerin 1360 nm’ye artış göstermesi, BSA ile hidrofobik karakterde deki etkin maddenin entegrasyonunu işaret etmektedir. Bu bağlanma, oluşan kompleks yapının zeta potansiyelini de etkilemektedir. Mitoxantrone (MTO) ve HSA ile yapılan bir çalışmada, HSA’nın zeta potansiyelinin -15 mV’dan MTO’ya bağlanmasının ardından -0.307 mV’a yükselmesi, MTO’nun HSA'nın hidrofobik boşluğunda gerçekleşen hidrojen bağ, hidrofobik ve elektrostatik etkileşim ile birleşmesine dayandırılmıştır (Yuan vd., 2019). F1 ve F2 iki dispersiyonlarının zeta potansiyel değerleri karşılaştırıldığında benzer durumun bizim çalışmamızda da gözlemlendiği belirlenmiştir. Etkin madde yüksüz ve yüklü albümin nanopartiküllerinin zeta potansiyelinin 6 mV’dan 16 mV’a artış göstermesi, BSA ile ABT199 arasında hidrofobik bir bağın kurulduğuna işaret etmektedir.

F2 formülasyonu ile ABT199’un albümine bağlandığı belirlenmiştir ancak partikül boyutu ve dağılımı yüksek bulunmuştur. Farmasötik uygulamalarda partikül büyüklüğü ve dağılımı, taşıyıcı sistemin fiziksel kararlılığını, biyolojik yollarda davranışını, yüklenmiş maddenin salım hızını belirlediğinden çok önemlidir (Ekambaram vd., 2012). Partikül büyüklüğünün artması ile fagositozun artması ve pinositozun azalması söz konusu olduğundan, partikülün biyodağılımında bu parametreler ayrıca önem taşır. Partiküler dağılımı olarak belirten PDI değerinin 0,1-0,25 arasında olması, istenilen dar partiküler dağılımı yani homojen yapıyı işaret etmektedir. Formülasyon açısından bakıldığında ise,

küçük partikülleri içeren dispersiyonların, partikülün yüzey alanının daha geniş olması ve yüzeyindeki yüke bağlı olarak daha kararlı kaldığı, büyük partiküllere oranla daha az toksik olduğu rapor edilmiştir (Müller vd., 2000). F2 formülasyonunun partikül boyutunun mikron boyutunda ve heterojen dağılımda ( $PDI=0,562\pm 0,05$ ) olduğu belirlendikten sonra, partikül boyutunun küçültülmesi için ortama yüzey etken madde (Tween80) eklenerek formülasyonun optimizasyonu için çalışılmıştır.

Yüzey etkin maddeler tipik olarak aynı molekül üzerinde hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplara sahip olan amfifilik moleküllerdir. Tween80 (Polisorbat80, polioksietilen sorbitan monooleat), ilaçlar ve gıda ürünlerinde maddelerin emülsifikasyonunda ve dağılımında yaygın olarak kullanılan bir hidrofilik noniyonik yüzey aktif maddedir. Partikül boyutunun küçültülmesi için ko-surfaktan olarak da kullanılmaktadır (Prabhakar vd, 2013). Proteinler, yüzey etkinliğine sahip doğal, yüksek molekül ağırlıklı nanopartiküllerdir. Yüzeylerinde farklılık gösteren gruplar nedeniyle, düşük moleküler ağırlıklı ve polimerik yüzey aktif maddelerle değişken kompleksler oluşturabilirler. Sığır serum albümini, üç alanlı yapıya sahip küresel bir proteindir ve her alan, farklı doğalardaki apolar maddelerin bağlanmasını mümkün kılan belirli bir özelliğe sahiptir. İyonik yüzey aktif maddelerin aksine, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler, elektrostatik kuvvetler ile bağlanma göstermediğinden BSA ile zayıf bir şekilde etkileşime girdiği düşünülmektedir. Bu nedenle, noniyonik yüzey etkin maddeler, anyonik olanların aksine protein konfigürasyonunda değişikliğe neden olmaz. Tween80'in varlığında BSA denatürasyon sıcaklığının arttığı dolayısıyla doğal proteinin sıcaklık aralığını genişleterek kararlılığının arttığı bildirilmiştir (Zadymova vd., 2006). Bu nedenlerle, çalışmamızda partikül boyutunun düşürülmesi ve proteinin konfigürasyonunun bozulmadan stabil bir şekilde kalabilmesi amacıyla Tween80 kullanılmıştır. Tween80 polar gruplarıyla BSA moleküllerinin spesifik etkileşimleri (hidrojen bağı) nedeniyle kompleksleşme oluşmaktadır. İyonik olmayan yüzey aktif madde/protein hidrofobik komplekslerin birleşimi, hidrofobik (spesifik olmayan) etkileşimlerden kaynaklanır ve 16-350 nm parçacıkların oluşumuna yol açar (Zadymova vd., 2006). F3 formülasyonu için elde ettiğimiz sonuçlarda, Tween 80'e bağlı olarak partikül boyutunun  $140,41 \pm 4,5$  nm'ye, PDI değerinin ise  $0,229\pm 0,01$  düştüğü belirlenmiştir. Partikül boyutunun hücresel alım için yeterli boyuta indiği, düşük PDI ile homojen dağılım gösterdiği sonucuna varılmıştır. Noniyonik karakterdeki Tween80'nin partikülün yüzey

yüküne etki göstermeyeceği beklenirken formülasyonun zeta potansiyelinin şaşırtıcı şekilde negatif karakter kazandığı ( $-26,51 \pm 0,86$  mV) tespit edilmiştir. Bunun sebebinin ise, BSA ve Tween80'in kompleksleşmesi sırasında hidrojen bağları ile hidrojen iyonlarının nötürleşmesine bağlanmıştır. Hidrojen iyonlarının nötralize olması molekülün negatif özellik kazanmasına neden olmaktadır (Yu, 2015). ABT199 yüklü nanopartikülleri ile negatif yüklü siRNA ile elektrostatik etkileşimini mümkün kılmayacak düzeyde partikülün yüzey yükünü düşürmesine neden olan bu sonuç nedeniyle, formülasyona Tween80 eklenmesi yaklaşımından uzaklaşmıştır.

Genetik materyelin formülasyonlara adsorbe olması ve kararlılık açısından elde edilen bu her iki yüzey yükünün yeterli olmayacağı düşünüldüğünden, formülasyonlara katyonik özellik kazandırmak amacı ile kitosan eklenmesine karar verilmiştir. Katyonik polimerler, bir araya toplanarak nanopartikül oluşumunu gerçekleştirir ve negatif yüklü siRNA'yı enkapsüle edebilir. Kitosan gibi tamponlama kapasitesine sahip katyonik polimerler ile anyonik nükleik asitlerin (siRNA) elektrostatik komplekslerinin oluşması ile polileks nanopartiküller elde edilmektedir. Katyonik ve pH duyarlı nanopartiküller pH 5-7 arasındaki yüksek tamponlama kapasitesi ile endozomun asidifikasyonuna engel olabilmekte, endozomdan kaçabilmektedir (Sahay vd., 2013). Ayrıca endozomdan kaçabilecek nanopartikül sentezi çalışmalarında hücre içine geçebilecek peptitlerin kullanımı da önemli bir stratejidir. Bir çalışmada, lipit nanopartiküller ile taşınan siRNA'nın hücre içi trafiği incelenmiş, siRNA'nın sitoplazmaya endozomal kaçışının çok düşük verimlilikte olduğu (%1-2) ve kısa bir süre için etkili olduğu saptanmış, sınırlı bir süre sonunda siRNA içeren nanopartiküllerin ileri endozom fazında degradasyona uğradıkları bulunmuştur (Gilleron vd., 2013). Bu nedenle hızlı ve etkili bir şekilde endozomal kaçışın gerçekleşmesi, yüksek verimli siRNA dağıtımı için kritik öneme sahiptir. Protein / polisakkarit elektrostatik etkileşimi, iki makromolekül arasındaki sterik ve elektrostatik itiş güçlerini artırarak, kapsüllenmiş maddelerin yanı sıra nanopartikülün stabilitesini de arttırabilmektedir (Niaz vd., 2019). Kitosan, aljinat ve dekstran gibi polisakaritlerin çoğu, protein-polisakkarit hibritlerini sentezlemek için kullanılmıştır. Tipik olarak, kitosan, biyomakromoleküllere ait ayırt edici fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre proteinlerin konjugasyonunda etkinlik gösterir. Proteine konjüge edilen polimerin, proteinin yapısını ve yüzey özelliğini modifiye edilmesinde etkin olduğu belirlenmiştir. Sığır serum albümininin karboksil grubu ile suda

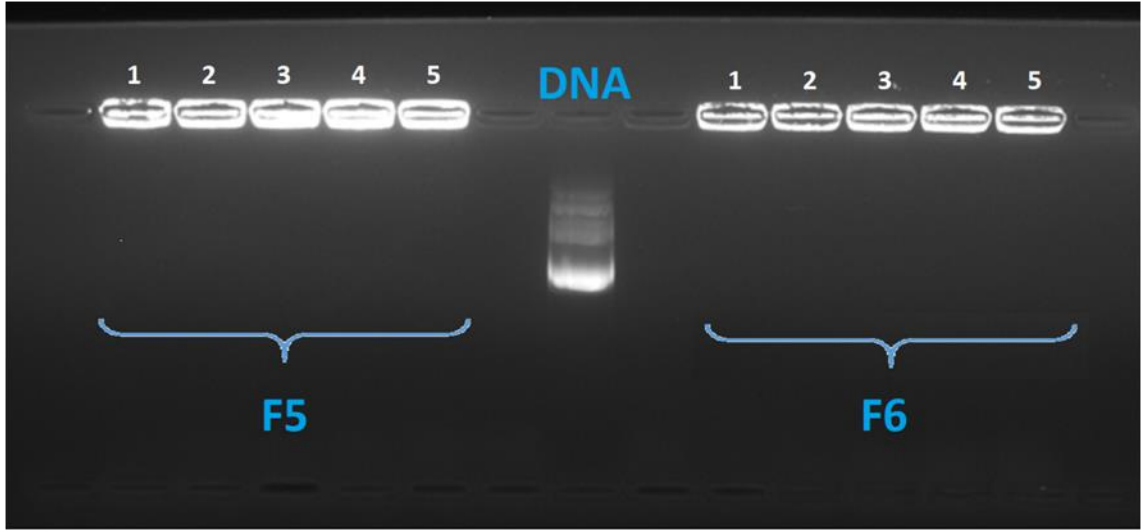
çözünür kitosan omurgasındaki amino grubunun doğrudan konjuge edilebilmektedir (He ve vd., 2012). Albümini kararlı kılmak ve genetik materyal ile elektrostatik etkileşimini kitosan kullanılarak oluşturulan albümin nanopartiküllerine örnek verecek olursak, burundan beyine ilaç taşıma için  $261 \pm 8$  nm boyutunda ve  $+45 \pm 1$  mV zeta potansiyeline sahip kitosan kaplı insan serum albümin nanopartikülleri oluşturulmuştur (Piazzini vd., 2019). Başka bir çalışmada ise meme kanseri tedavisinde kullanılan ve ciddi yan etkilere sahip olan Tamoksifen isimli ilacının kitosan kaplı albümin nanopartikülleri ile taşınımı sağlanmış, sonuç olarak ilacın yan etkilerinin azaltıldığı ve terapötik etkisinin artırıldığı gözlenmiştir. 1 mg albümine 30 µg kitosan ilavesi ile oluşturulan nanopartikülün 137 nm boyutunda ve +15 mV zeta potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Singh vd., 2012). Kitosan eklenerek oluşturulmuş formülasyonlar F4, F5 ve F6 olarak isimlendirilmiştir ve zeta potansiyelleri sırası ile  $46,90 \pm 0,73$ ,  $28,6 \pm 0,36$  ve  $41,4 \pm 0,95$  mV olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kitosanın BSA ile konjugasyonunun sağlandığını ve pozitif yük oranının kitosan varlığında arttığını göstermektedir. pH 5,9 d.su ile hazırlanmış F4 formülasyonunun partikül boyutu ve dağılımı ( $581,43 \pm 37,2$  nm ve  $0,368 \pm 0,03$ ) F6 formülasyonununa göre ( $364,72 \pm 7,4$  nm ve  $0,253 \pm 0,05$ ) büyük bulunmuştur. Farmasötik uygulamalarda partikül büyüklüğü taşıyıcı sistemin fiziksel kararlılığını, biyolojik yollarda davranışını, yüklenmiş maddenin salım hızını belirlemektedir (Ekambaram vd., 2012). Ayrıca partikül büyüklüğünün artması ile fagositozun artması ve pinositozun azalması partikülün biyodağılımında önemli bir parametredir. Taşıyıcı sistemlerde partikül boyutu ve dağılımının belirlenmesi, hazırlanan sistemin belirlenen amaca uygunluğunun tayin edilmesinde önem taşımaktadır (Müller vd., 2000). Partikülün küçük olması kararlılığı arttırırken, toksisiteyi de azaltmaktadır. Ayrıca, nanopartiküllerin uygun/kabul edilebilir partikül dağılımına sahip olduğunu değerlendirmek için PDI değerinin 0,4'in altında olması beklenmektedir (Patel ve Agrawal 2011; Bhattacharjee, 2016).

Bu bilgiler ışığında zeta potansiyeli düşük, partikül boyutu ve PDI değeri yüksek bulunan F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları elenerek, F5 ve F6 formülleri en uygun formüller olarak belirlenmiş, karakterizasyon çalışmaları bu formüller üzerinden yürütülmüştür.

## 5.2. Albümin Nanopartiküllerine Genetik Materyal Yüklenmesi

Katyonik polimerler, pH'ya duyarlı polimerler, kalsiyum fosfat ve hücre içine nüfuz eden peptitler dahil nanopartikül aracılı siRNA iletimi için kullanılan endozomal kaçış stratejilerine odaklanmaktadır. Endozomal kaçışın arttırılması ve diğer biyolojik engellerin aşılmasıyla (hedefe yönelik birikim ve yüksek hücre alımı sağlanması), nanopartikül aracılı siRNA taşınmasında büyük ilerleme kaydedilmiştir. Ayrıca, hedef bölgede spesifik birikme, yüksek hücre alımını ve düşük toksisiteyi sağlamak için siRNA dağıtımının diğer yönleriyle birlikte endozomal kaçışın arttırılması düşünülmüştür. Böylece RNAi aracılı mRNA aşağı regülasyonunun indüklenmesi (*Bcl-2* inhibisyonu) önlenmektedir. Bu nedenle siRNA'ların endozomal etki ile terapötik etkilerinin azalmasını engellemek için siRNA taşıyıcı sistemler üzerinde çalışılmış, nanopartikül sistemlerinin iyi bir taşıyıcı oldukları saptanmıştır (Tatiparti vd., 2017).

Albümin nanopartiküllerine yüklenecek olan optimum *Bcl-2* siRNA miktarının tespit edilmesi için model olarak GFP'yi kodlayan plazmid DNA kullanılmıştır. Hücre kültürü ve transfeksiyon çalışmalarında, yüklenen siRNA'nın tek başına olan etkinliğinin belirlenmesi için ABT199 yüklü olmayan (plasebo) F5 formülasyonu da genetik materyal yükleme çalışmalarına dahil edilmiştir. F5 ve F6 formülasyonlarına farklı konsantrasyonlarda DNA yüklenerek maksimum genetik materyal yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Öncelikle jelle yüklenecek optimum formülasyon miktarını belirleme çalışmaları yapılmıştır. F5 ve F6 formülasyonlar ve pDNA Tablo 5.1'de belirtilen miktarlarda bölüm 4.3.3.2'de anlatıldığı gibi inkübe edildikten sonra kuyulara yüklenmiştir ve jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.1).



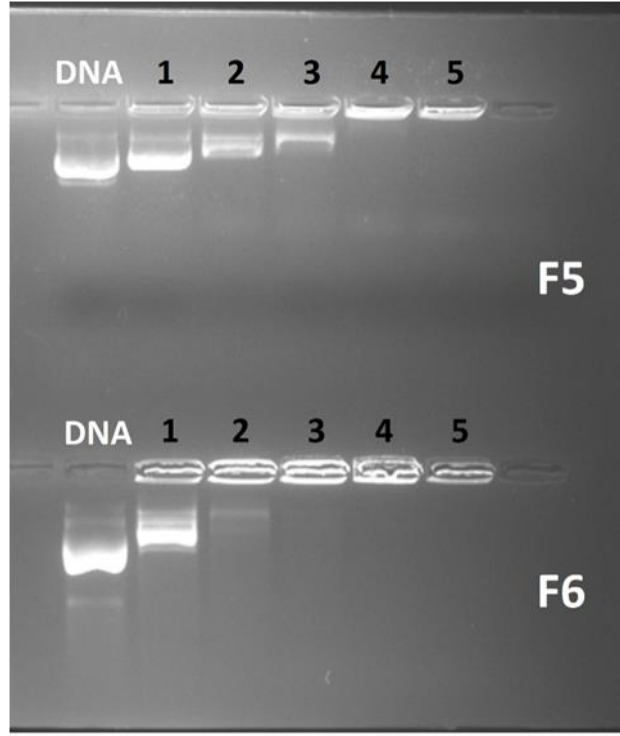
**Şekil 5.1.** DNA yüklenen F5 ve F6 formülasyonlarının jel görüntüleri

**Tablo 5.1.** Jele yüklenen 1 µg DNA ile inkübe edilmiş F5 ve F6 formülasyon miktarları

Kuyucuklar	1	2	3	4	5	DNA
Formülasyon Miktarları	7,5 µL	10 µL	12,5 µL	15 µL	20 µL	1 µg

Elde edilen jel görüntüleri, yukarıda belirtilen miktarlardaki formülasyonların 1 µg DNA'yı tamamen bağladığını göstermektedir. DNA'nın tamamının bağlanması için gerekli en düşük formülasyon miktarının belirlenmesi için ve F5 ile F6 formülasyonlarının bağlama yetilerinin arasındaki farklılıkları bulmak amacıyla, formülasyon miktarları 7,5 µL'nin altına düşürülerek yeniden jelde yürütülmüştür. Bu çalışma ayrıca transfeksiyon çalışmalarında ABT199'a bağlı hücre ölümünün gerçekleşmemesi için Fitc siRNA yüklenecek plasebo formülasyonunun miktarının belirlenmesi için de gerekli görüldüğü için gerçekleştirilmiştir.





Şekil 5.2. 1 µg DNA için gerekli en düşük F5 ve F6 miktarlarının belirlenmesi

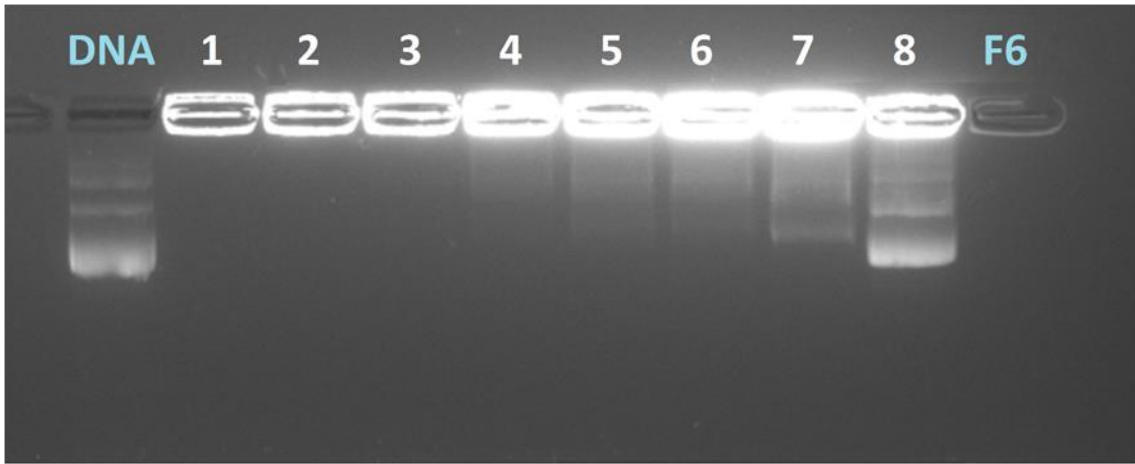
**Tablo 5.2.** 1 µg DNA için F5 ve F6 formülasyonlarının DNA bağlama için minimize edilmiş miktarları

Kuyucuklar	1	2	3	4	5	DNA
Formülasyon Miktarları	1 µL	2 µL	3 µL	4 µL	5 µL	1 µg

Jel görüntüleri değerlendirildiğinde, Tablo 5.2’de belirtilen miktarlarda F6 formülasyonunun 3 µL’de, F5 formülasyonun ise 4 µL’de 1 µg DNA’yı tamamen tuttuğu belirlenmiştir (Şekil 5.2). F6 formülasyonunun F5 formülasyonuna göre daha düşük miktarda DNA bağlama yetisine sahip olduğu gözlenmektedir. F5 formülasyonu ise 4 µL’de DNA’nın tamamının kuyucukta kalmasını sağlayabilmiştir. Bu sonuç, formülasyonların zeta potansiyelleri ile de uyumlu görünmektedir. Artan yüzey yükü ile (F6 için  $41,4 \pm 0,95$ ; F5 için  $28,6 \pm 0,36$  mV) DNA ile elektrostatik etkileşimin de arttığı jel görüntülerinde de gösterilmiştir. Ayrıca, formülasyona yüklenen ABT199’un kitosan varlığında albümine pozitif yük kazandırdığı gözlenmiştir. Bu sonuç, Tablo 4.1’de de görüldüğü üzere, alkolle

desolve edilip alkolün uçması ile hazırlanan AlbF çözeltisindeki zeta potansiyel değerine ( $6,17 \pm 0,65$  mV) göre ABT199'un ilavesi ile elde edilen F1 formülasyonunun zeta potansiyel değerindeki ( $16,21 \pm 0,57$  mV) artış ile de desteklenmektedir.

Son olarak, F6 formülasyonunun en yüksek DNA bağlama miktarının belirlenmesi için,  $7,5 \mu\text{L}$  hacimde alınan F6 formülasyon ile artan miktarlarda DNA (Tablo 5.3) ile inkübe edilmiştir. F6'nın DNA bağlama yetisinin karşılaştırmalı belirlenmesi için 1.'i kuyucuğa  $1 \mu\text{g}$  çıplak pDNA (D), formülasyonun ışımaya verip vermediğinin gözlenmesi ve DNA ışımından ayrılması için ise son kuyucuğa da formülasyon (F) konulmuş ve yürütme işlemi tamamlandıktan sonra görüntülenmiştir (Şekil 5.3).



**Şekil 5.3.** Formülasyon miktarı sabit tutularak yüklenebilen maksimum DNA konsantrasyonunun jel görüntüleri

**Tablo 5.3.**  $7,5 \mu\text{L}$  F6 Formülasyonuna yüklenebilen maksimum DNA miktarı

Kuyucuklar	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA	$1 \mu\text{L}$	$2 \mu\text{L}$	$3 \mu\text{L}$	$4 \mu\text{L}$	$5 \mu\text{L}$	$6 \mu\text{g}$	$7 \mu\text{g}$	$7,5 \mu\text{g}$

Alınan jel görüntüsü ile  $7,5 \mu\text{L}$  konsantrasyondaki formülasyona maksimum  $3 \mu\text{g}$  DNA yükleme yapılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5.3).

DNA bağlama yetileri belirlenen F5 ve F6 formülasyonları için siRNA yükleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ve transfeksiyon çalışmalarında kullanılması düşünülen  $200 \text{ ng}$  siRNA sabit tutulup F5 ve F6 formülasyonlarından çeşitli miktarlarda alınarak jele yüklenmiştir (Tablo 5.4). Formülasyon miktarları, hücre kültürü çalışmalarında

toksik olmayan 0,5, 1, 1,5, 3 ve 5  $\mu$ L dozlarına göre arttırılmış ve siRNA bağlama jel görüntüleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Formülasyonların siRNA bağlama yetilerininin jeldeki görüntüleri

Tablo 5.4. Jele yüklenen siRNA ve Formülasyon miktarları

Kuyucuklar	1	2	3	4	5	siRNA
Formülasyon	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	3 $\mu$ L	5 $\mu$ L	200 ng

Elde edilen siRNA jel görüntülerinin sonuçları değerlendirildiğinde, 200 ng siRNA'nın tamamının, F5 ve F6 formülasyonların en düşük miktarında dahi tutulduğu belirlenmiştir.

Çıplak siRNA kan dolaşımında kararsızdır ve immünojenik olmanın yanı sıra hücre zarlarını verimli bir şekilde geçemez, endozomal degradasyona uğrar (Whitehead vd., 2009). Asidik pH' a sahip endolizozomal veziküller içerisine alınan çıplak siRNA, lizozomal enzimler tarafından parçalanır. Çıplak siRNA'nın hücre içine transfeksiyonu yapılan bir çalışmada siRNA'nın endozomlarda lokalize olduğu saptanmıştır. Endozomal ve lizozomal belirteçlerin immüno sitokimyasal boyama deneyi sonucu, florasan maddeye bağlı siRNA'nın endozom ve lizozom içine alındığını göstermektedir (Lingor vd., 2004).

Transfeksiyon etkinliği, transfekte edilmiş genetik materyalin (DNA veya RNA) endozomal kaçış kabiliyetine bağlıdır. Nanopartikül aracılı taşıyıcı sistemlerin kullanılması, siRNA'ların sitoplazmada endozomal kaçışlarının sağlanması ve inhibitör etkisinin gözlenmesi için büyük öneme sahiptir. Endozomal kaçışın yeterli düzeyde olmaması, siRNA etkinliğini önemli ölçüde sınırlamaktadır. Nanopartikül aracılı siRNA iletimi için katyonik

polimerlerin, pH duyarlı polimerlerin ve hücreye nüfuz eden peptitlerin kullanıldığı farklı endozomal kaçış stratejileri geliştirilmiştir (Kotterman ve Schaffer, 2014). Nanopartiküller, endositoz yoluyla hücre içine alınır. Nanopartikülün boyutuna, şekline, yüzey özelliklerine ve farklı hücre tiplerine bağlı olarak hücreler farklı endositoz yöntemlerini tercih ederler. Genellikle endositoz; fagositoz ve pinositoz olarak iki şekilde gerçekleşir. Fagositoz daha çok makrofaj ve dendritik hücreler gibi özelleşmiş hücrelerde gerçekleşirken, pinositoz tüm hücrelerde gerçekleşir. Pinositoz, klatrin aracılı ve klatrin bağımsız yollarla oluşabilir. Klatrin bağımsız yolağı, kaveolin aracılı, kaveolin bağımsız ve makropinositoz yollarına ayrılır. Nanopartiküllerin endositozu kompleks bir süreçtir. Nanopartikülün hücre içine girmesiyle birden fazla yolağın kullanılması gerekmektedir. Sıklıkla kullanılan yol, klatrin aracılı endositozdur. Kaveolin bağımsız ve makropinositoz gibi bazı endositoz yolları lizozimler üzerinden geçmemektedir. Bu durumda aktif bir endozomal kaçış mekanizması gerekli olmayabilir. Bunun dışında, daha yaygın olan endolizozomal yolak üzerinde bulunan endositoz söz konusu olduğunda, endozomal kaçış stratejileri önemli olmaktadır. Normal bir endolizozomal yolakta, nanopartiküller önce erken endozomlar içerisine alınır, geç evre endozomun oluşması ve lizozomla birleşmesini takiben enzimler tarafından parçalanmaması için bu aşamadan önce endozomdan kaçışının gerçekleşmesi gerekmektedir. Böylece nanopartikül içindeki yükü hücre içine boşaltabilecektir (Sahay vd., 2010).

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, F5 ve F6 formülasyonlarının genetik materyali bağlayabildiği ve bu materyali hücreye ulaşma aşamaları sırasında serbest bırakmadan taşıyabileceği ve biyolojik sıvı içerisinde enzimler ile parçalanmadan hücreye ulaştırabileceği kabiliyetine sahip olduğu görüşü hakim olmuştur.

### **5.3. Formülasyonda yüklenen etkin madde (ABT199) Miktar Tayini**

Miktar tayini çalışmaları Bölüm 4.4.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. ABT199 mobil fazda çözünerek stok çözelti hazırlanmış, farklı derişimlerde analiz edilmiştir. Bu derişimlere karşılık gelen alan değerleri Tablo 5.5'de verilmiştir ve bu değerler kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Eğriye ait doğrusallık eşitliği  $y = 1,7154x - 1,0883$  ( $r = 0,9997$ ) olarak bulunmuştur (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. ABT199'un UPLC kalibrasyon eğrisi [n=6, ort±SH]

**Tablo 5.5.** UPLC kalibrasyon eğrisi eldesi için ABT199'a ait konsantrasyonlara bağlı Alan/Alıkonma Zamanı değerleri [n=3, ort±SH]

	Konsantrasyon	Alan/Alıkonma Zamanı (Ort)
1	0 µg/mL	0±0
2	10 µg/ mL	15,70± 0,90
3	20 µg/mL	32,46±1,36
4	40 µg/mL	66,69±0,21
5	50 µg/mL	84,21±1,06
6	60 µg/mL	102,44±1,91
7	80 µg/mL	137,82±1,00
8	100 µg/mL	169,49±1,21

Nanopartikül sisteme etkin madde yüklemesinin başarılı olabilmesi için yükleme kapasitesinin yüksek olması istenir. İlaç yüklemesi ve yükleme etkinliği, katı haldeki etkin maddenin polimer içindeki çözünürlüğü (çözünme veya dispersiyon), polimer bileşimi, polimerin molekül ağırlığı, etkin maddenin polimer ile etkileşimi, polimerin sahip olduğu ester ya da karboksil grupları gibi fonksiyonel kısımların varlığı ile doğrudan ilişkilidir

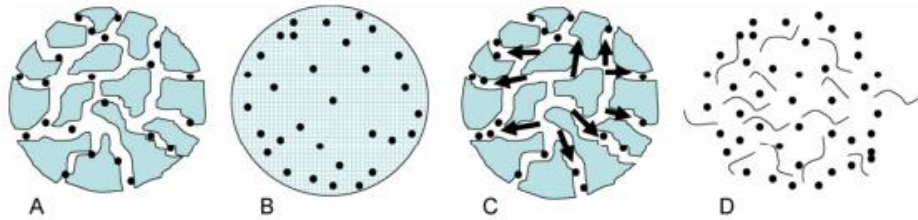
(Mohanraj ve Chen, 2006).

Pellette ve üst fazda bulunan madde miktarları, UPLC’de belirlenen Alan/Alıkonma Zaman (ortalama)’ları dikkate alınarak, kalibrasyon eğrisi ile tayin edilmiştir ve yükleme etkinliği (%EE) %95,5 olarak bulunmuştur.

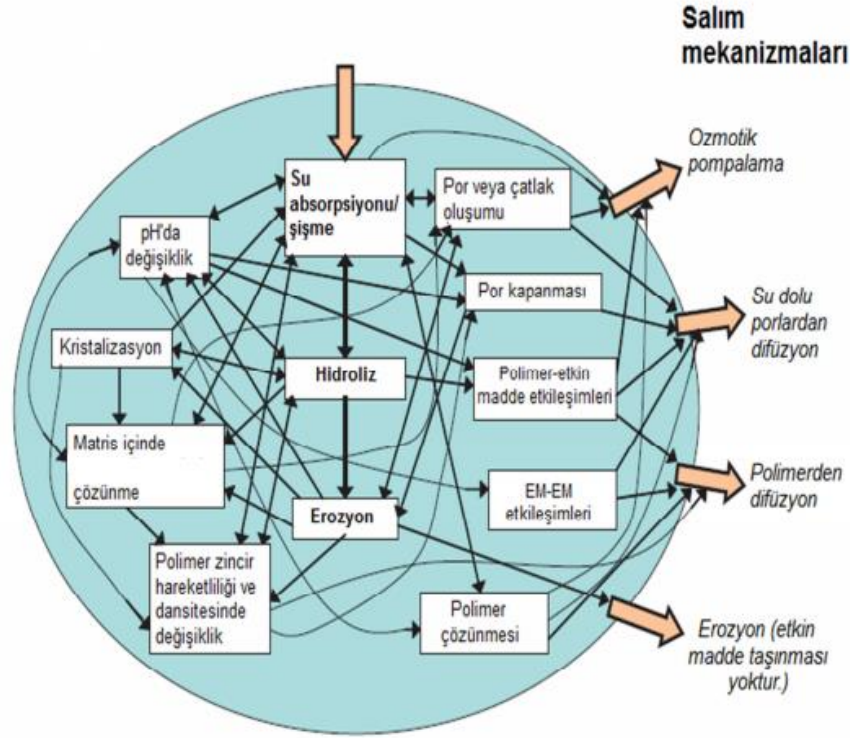
Albüminin yüklü aminoasit içeriği sayesinde pozitif veya negatif yüklü bileşiklerle elektrostatik adsorbsiyon sonucu birleşmesi kolaydır (Elzoghby vd., 2012). Yükleme etkinliği %95,5 oranında bulunması, ABT199’un bir serum proteini olan albümine yüksek oranda bağlanma eğiliminde olduğunu göstermektedir.

#### 5.4. *In vitro* Salım Çalışması

Salım mekanizması, etkin madde moleküllerinin taşınma veya salınma şekli olarak tanımlanabileceği gibi salım hızını belirleyen olay veya işlem olarak da tanımlanabilir (Kranz vd., 2000; Sansdrap ve Moes, 1997). Polimer matrislerden etkin madde; su dolu porlardan difüzyonla, polimerden difüzyonla, ozmotik pompalama ya da erozyon mekanizmalarıyla çıkabilir (Şekil 5.6, Şekil 5.7). Difüzyon, partiküllerin çok yoğun olduğu ortamdan az yoğun ortama geçişi ile etkin maddenin matris içindeki ve dışındaki konsantrasyonunun eşitlenmesi süresince devam eder (Fredenberg vd., 2011, Li ve Jasti, 2006).



**Şekil 5.6.** Salım mekanizmaları: (A) Su dolu porlardan difüzyon, (B) Polimerden difüzyon, (C) Ozmotik pompalama, (D) Erozyon (Fredenberg vd., 2011)



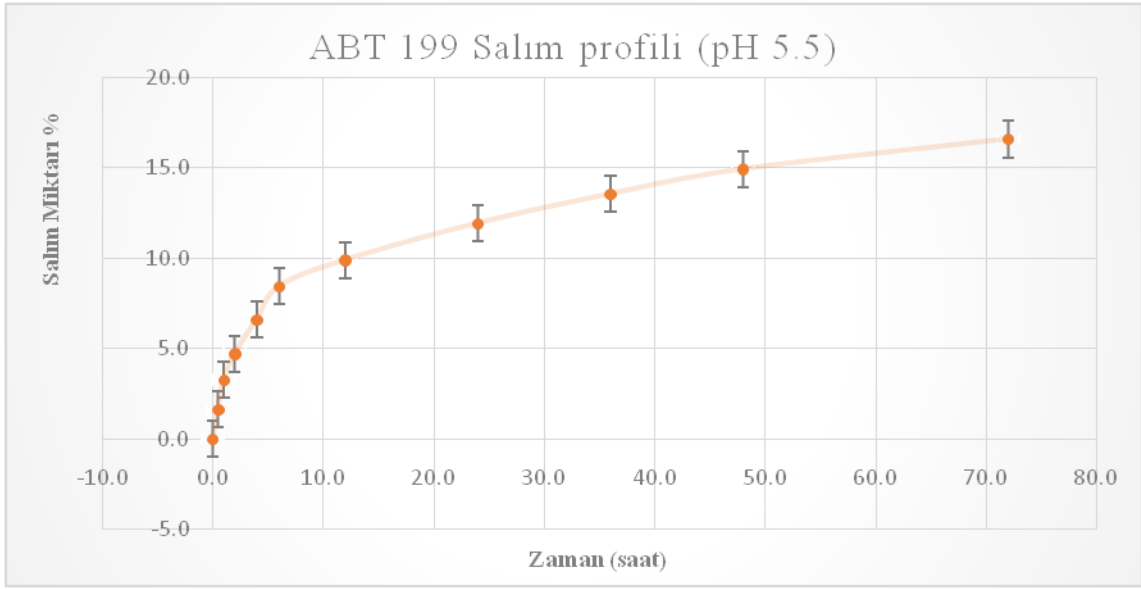
**Şekil 5.7.** Matrisler içinde meydana gelen ve etkin madde salımını sağlayan fizikokimyasal süreçler (Fredenberg vd., 2011)

Etkin maddenin salım hızını belirleyen, birim zaman içinde matristen çözünme ortamına geçen etkin madde miktarıdır ve bu faktör çözünme hızı olarak tanımlanır. Partikül şekli ve büyüklüğü, kullanılan polimer ve yardımcı maddelerin özellikleri, hazırlama yöntemi, etkin maddenin özellikleri etkin madde salımını etkilemektedir (Çapan, 2004).

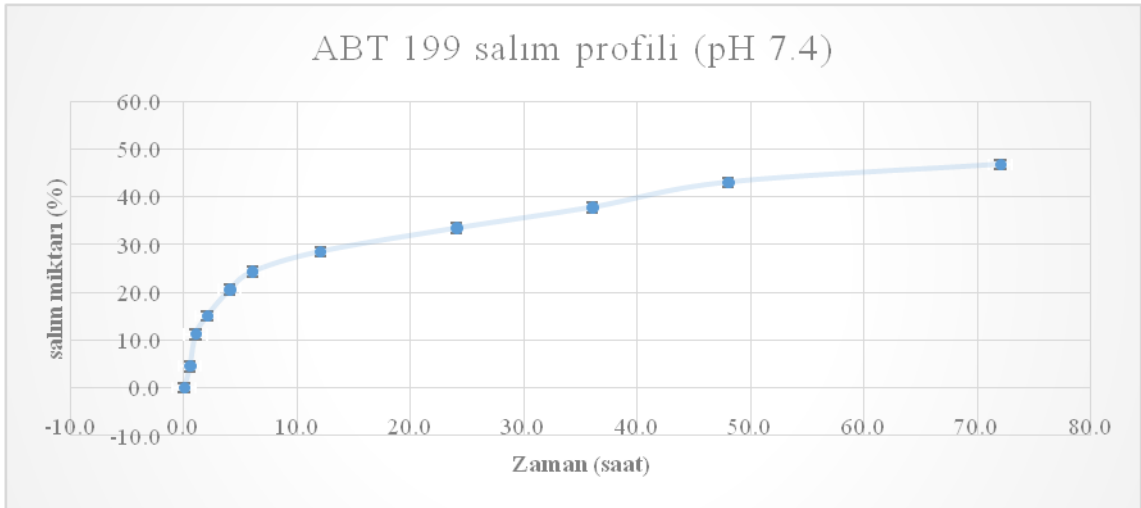
Belirli koşullar altında yapılan bir çözünme testi sonucunda etkin maddenin dozaj formundan çözünme profili, zamana karşı çözünen kümülatif (yığılmalı) etkin madde miktarının ölçülmesiyle oluşturulmaktadır. Çözünme profilleri ve çözünme verileri değerlendirilerek, etkin maddenin dozaj formundan çözünme mekanizması belirlenmekte ve sayısal parametreler elde edilmektedir; böylece aynı etkin maddenin farklı durumlar için (örn: formülasyon gelişimi / değişimi, imalat yöntemi veya yerinin değişmesi, seri içi ve seriler arası çözünme değişiminin veya stabilitenin incelenmesi gibi) elde edilen çözünme profilleri karşılaştırılabilmektedir.

UPLC ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda salım ortamının pH'sının değiştirilmesinin salınan madde miktarını önemli ölçüde etkilediği görülmüştür (Şekil. 5.8

ve 5.9). 72 saat sonunda, pH 5,5 değerinde salım ortamında kümülatif salım yüzde değeri  $16,6 \pm 1,01$  bulunurken, pH 7,4 salım ortamında bu değerin  $46,8 \pm 2,23$  kadar çıktığı tespit edilmiştir. Bu salım profillerine ait değerler tablo 5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.8. Albümün nanopartiküllerinden pH 5,5'deki 72 saatlik salım profili



Şekil 5.9. Albümün nanopartiküllerinden pH 7,4'deki 72 saatlik salım profili



**Tablo 5.6.** ABT199'un zamana bağılı salınan kümülatif madde miktarları

Örnek Alma Zamani (saat)	Kümülatif Çözünen etkin madde ( $\mu\text{g}$ ) pH=5.5	Kümülatif Çözünen etkin madde ( $\mu\text{g}$ ) pH=7.4	Kümülatif Salım Miktarı % pH=5.5	Kümülatif Salım Miktarı % pH=7.4
0	0,0 $\pm$ 0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
½ (30 dakika)	6,8 $\pm$ 1,31	19,2 $\pm$ 1,40	1,6 $\pm$ 0,33	4,5 $\pm$ 0,32
1	13,8 $\pm$ 3,42	47,6 $\pm$ 2,31	3,3 $\pm$ 0,80	11,2 $\pm$ 0,71
2	20,0 $\pm$ 0,13	64,0 $\pm$ 0,10	4,7 $\pm$ 0,01	15,1 $\pm$ 0,01
4	27,9 $\pm$ 1,43	87,3 $\pm$ 1,21	6,6 $\pm$ 0,31	20,6 $\pm$ 0,22
8	35,7 $\pm$ 1,44	103,2 $\pm$ 1,31	8,4 $\pm$ 0,30	24,3 $\pm$ 0,21
12	41,9 $\pm$ 1,23	121,2 $\pm$ 1,43	9,9 $\pm$ 0,32	28,6 $\pm$ 0,20
24	50,6 $\pm$ 0,02	141,9 $\pm$ 0,12	11,9 $\pm$ 0,01	33,5 $\pm$ 0,03
36	57,4 $\pm$ 1,31	160,3 $\pm$ 0,82	13,5 $\pm$ 0,32	37,8 $\pm$ 0,41
48	63,2 $\pm$ 1,02	182,5 $\pm$ 0,82	14,9 $\pm$ 0,23	43,0 $\pm$ 0,42
72	70,3 $\pm$ 0,02	198,3 $\pm$ 0,01	16,6 $\pm$ 1,01	46,8 $\pm$ 2,23

İki farklı pH değerinde salım ortamı sağlanan formülasyonların salım profillerindeki farklılığının, pH 5,5 salım ortamında elektrostatik etkilişimin daha yüksek olması nedeniyle etkin maddenin daha sıkı tutulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, pH' nın düşmesi albümin molekülünün izoformunun değişmesine neden olmaktadır. Albümin pH 7,4'de N izoformdayken, pH 3,5 de ise F izoformuna geçmektedir. N – F izoform geçişi sırasında, sığır serum albümini (BSA) pH 4,7'deki izoelektrik noktasını geçer ve pH 7,4'deki protein üzerindeki -16 olan net yük artarak pH 3,5' da 100'e kadar ulaşabilir (Baler vd., 2014). ABT199'un F5 formülasyonuna yüklenmesinden sonra elde edilen F6 formülasyonunun, artan zeta potansiyeli (28,6  $\pm$  0,3'den 41,4 $\pm$ 0,95 mV'a), ABT199'un albüminin izormunda N'den F'e doğru yöneldiğini göstergesi olabilir. Bu farklılaşma da salım sırasında düşen pH ile artış göstererek ABT199'un albümine daha güçlü bağlarla bağlanmasını dolayısı ile salımın yavaşlamasında etkili olduğu şekilde yorumlanmıştır.

Formülasyon hazırlama sırasında albümin üzerine eklenen alkolün albümini desolve etmekte, etkin madde ilavesinin ardından ile etkin maddenin albümin yapısı içinde elektrostatik, kovalent ve hidrojen bağları ile bağlanması ve alkolün uçurulması ile albüminin eski konfigürasyonuna yönelmesi ile partikülün yapısı Şekil 5.6'da su dolu porlardan difüzyon gösterecek forma dönüşmektedir. pH düştükçe, albüminin izoform değişimi ile bu

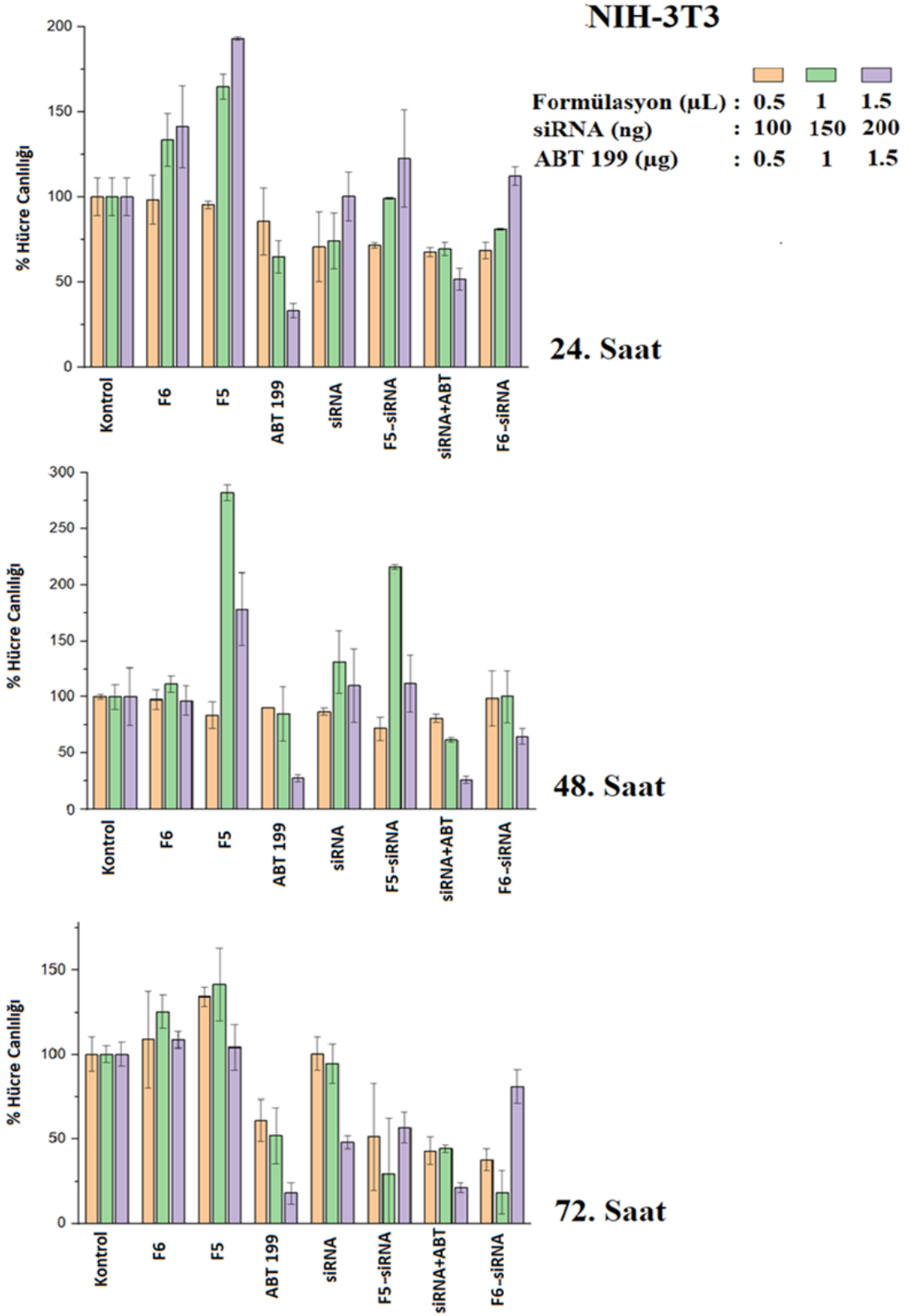
bu form daha sıkı kompakt hale yöneldiğinden, porlardan sıvı girişi ve etkin maddenin bu sıvı ile ıslanmasıyla düfüzyonu yavaşlamaktadır.

## 5.5. Hücre kültürü Çalışmaları

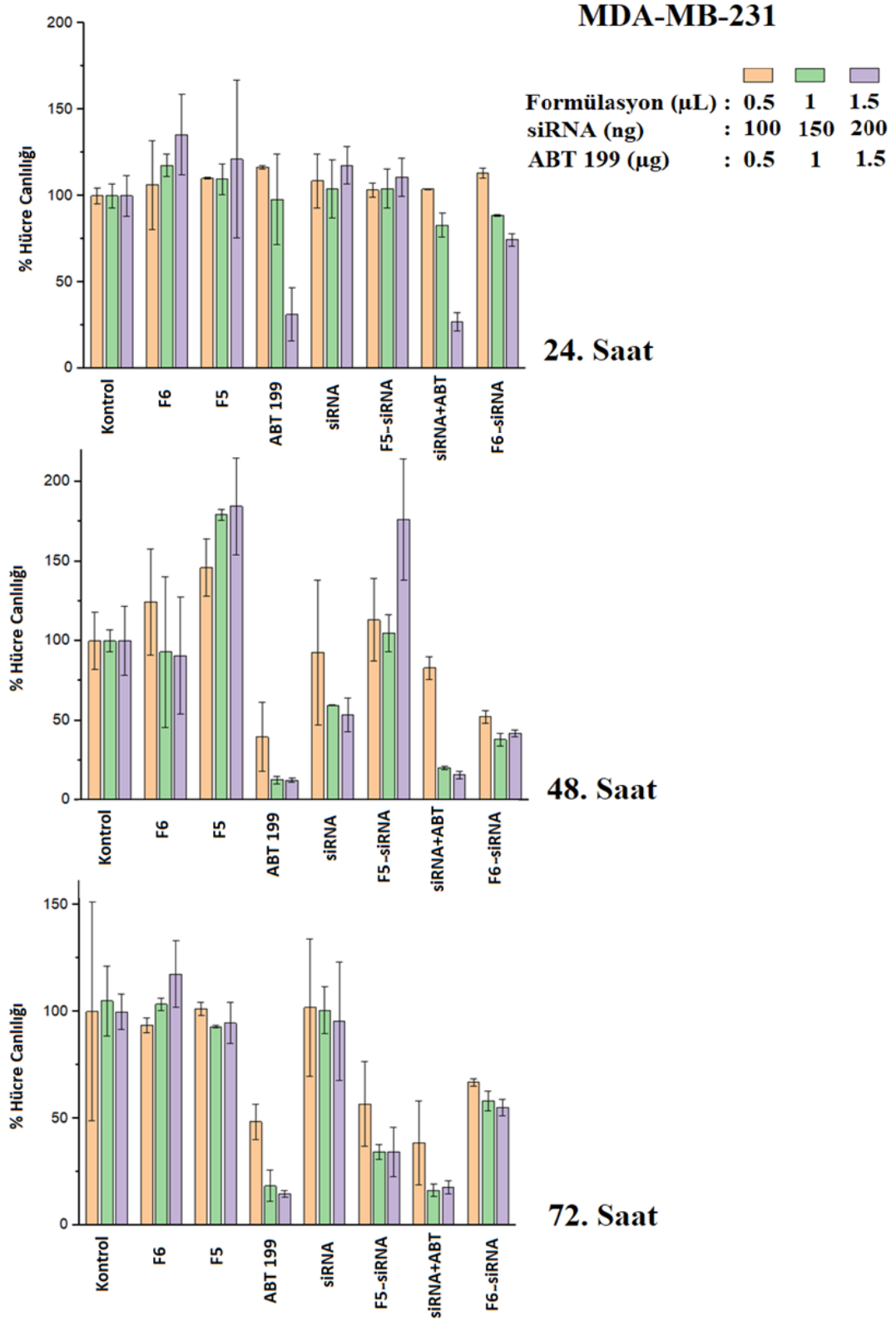
### 5.5.1. Sitotoksiste

Hazırlanan formülasyonlar (F5, F6, F5-siRNA ve F6-siRNA) ile saf ABT199 ve çıplak siRNA'nın MDA-MB-231 ve NIH-3T3 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri 3 farklı konsantrasyonda incelenmiştir. siRNA miktarları formülasyonlara adsorbe edilen siRNA miktarları ile, ABT199 miktarı ise formülasyon içerisindeki miktarlar ile aynı olacak şekilde bölüm 4.5.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış, hücrelere uygulanmış ve 24, 48, 72 saat süresince etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı oranları belirlenerek grafiğe aktarılmıştır (Şekil 5.10 ve Şekil 5.11).

Elde edilen sonuçlara göre, her iki hücrede de kitosan ve albümin konjugasyonu ile elde edilen F5 formülasyonunun (boş formülasyon) hücrelere toksik özellik göstermediği aksine hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Sağlıklı NIH-3T3 hücrelerinde, 24 saat sonrasında 1 ve 1,5 µL'de %164 ve %192, 48 saat sonunda ise aynı konsantrasyonda sırasıyla %282 ve %172'ye kadar hücre canlılığında artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu oranın 72 saat sonunda %147 ve %103 olması kontrol hücrelerinde aynı orana ulaşarak kuyucukta büyüyecek yer bulamayarak ölüme gitmesi ile ilişkilendirilmiştir. Kitosanın hücre proliferasyonu üzerine etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kitosanın, hücre proliferasyonunu arttırarak bağ doku oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir (Graeme vd., 2001). *In vitro* koşullarda hücre büyüme hızı üzerine olumlu etkisi sebebiyle hücre sayısını ve dokuda tabaka sayılarının artışını hızlandırmaktadır (Poon vd., 2007; Shen vd., 2007). Ayrıca *in vivo* çalışmalarda kitosanın deri fibroblastlarında sayısal bir artışa neden olduğu da gösterilmiştir (Fathke vd., 2004). Yapılan bir çalışmada, 3T3 embriyonik fare fibroblast hücrelerinin uzantılarında belirgin artış, hücre mebranlarının korunması ve hücrelerarası bağlantıların sıklığı gibi bulgular dikkat çekmiştir (Uslu, 2008). Bezer durum MDA-MB-231 hücrelerinde de gözlenmiştir ancak NIH-3T3 hücrelerine oranla düşük olduğu gözlenmiştir. Hücre büyümesi 48 saat sonunda 1 ve 1,5 µL için sırasıyla %179 ve %184 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.10. 24, 48 ve 72 saat sonunda NIH-3T3 hücrelerinde belirlenen sitotoksite



Şekil 5.11. 24, 48 ve 72 saat sonunda MDA-MB-231 hücrelerinde belirlenen sitotoksite

ABT199'un DMSO'da gözündürülerek uygulandığı NIH-3T3 hücrelerinde 0,5 ve 1 µL miktarın 24 ve 48 saat için toksik olmadığı, 72 saat sonunda hücre canlılığını %60 ve %51'de düşürdüğü gözlenmiştir. En yüksek doz olan 1,5 µg ise 24, 48 ve 72 saat sonunda hücre canlılığını sırasıyla %33, %27 ve %18'e kadar düşürmüştür. Aynı miktar ABT199 içeren F6 formülasyonunun ise bu hücreler üzerine toksisite göstermediği hatta 24 saat sonunda hücre canlılığını %133 ve %147 olacak şekilde arttırdığını göstermiştir. F6 formülasyonu için benzer sonuçlar MDA-MB-231 hücrelerinde de gözlemlenmiştir. Ancak, ABT199'un kanser hücreleri üzerinde etkisi sağlıklı hücrelere göre toksik bulunmuştur. Bu toksisite 24 saat için 1,5 µg konsantrasyonda (%31 hücre canlılığı) , 48 ve 72 saat sonunda tüm konsantrasyonlarda (%12 canlılığa kadar artan oranlarda gözlenmiştir. Bu sonuç, F6 formülasyonunun da her iki hücre tipinde toksik etki göstermediğini işaret etmektedir. Salım profili göz önünde bulundurulduğunda, 72 saat sonunda nanopartikülden salınan ABT199 miktarının hücre ölümü için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çıplak siRNA'nın toksisitesi değerlendirildiğinde, 3T3 hücrelerinde sadece 72 saat sonunda 200 ng dozda %47 hücre canlılığı ile toksik olduğu belirlenmiştir. Kanser hücrelerinde ise, 48 saat sonunda 150 ve 200 ng dozda hücre canlılığını %59 ve %58'e kadar azalttığı, 24 ve 72 saat sonunda ise etki etmediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, siRNA'nın hücre içine geçmeden endonükleazlar tarafından parçalandığını ya da hücre içerisine alınmadığını işaret etmektedir. Negatif yüklü ve stabil olmayan çıplak siRNA'nın hücre içine alınmadaki kısıtlar ve endozomal degradasyonu gibi etkilerden dolayı hücreler üzerinde belirgin bir toksisite gözlenmemesi beklenen bir durumdur. Fakat bu alanda yapılan çalışmalar neticesinde az miktarda da olsa çıplak siRNA'nın hücre içi trafiğinde parçalanmadan hücresel yolakları etkileyebildiği, az da olsa toksik etki gösterebildiği saptanmıştır (Luo vd., 2008; Lingor vd., 2004; Hickerson vd., 2008; Wang vd., 2007). F5 formülasyonuna adsorbe edilmiş siRNA (F5-siRNA formülasyonu)'nın ise her iki hücre tipinde 24 ve 48 saat sonrasında toksik olmadığı ancak 72 saat sonunda hücre canlılığını belirgin oranda düşürdüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar, taşıyıcı sistemle hücre içine alınan siRNA'nın gen susturmayı başardığını işaret etmektedir. Nanopartiküllerin taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı zaman siRNA'nın degradasyona uğramadan uzun süre stabil kaldığı raporlanmıştır (Devalliere vd., 2014). ABT199 ile birlikte uygulanan siRNA sonuçları,

ABT199'un tek başına gösterdiği etkinliğe benzer sonuçlarda zamana ve artan doza bağlı olarak arttığını göstermektedir.

F6 formülasyonuna adsorbe edilmiş siRNA (F6-siRNA) formülasyonu ABT ve siRNA'nın kombin bir şekilde hücrelere uygulanmasını mümkün kılmaktadır. Bu formülasyonun etkinliği değerlendirildiğinde ise, her iki hücrede de 24 saat sonunda toksik özellik gösterecek oranda düşürmediği, 48 saat sonrasında kanser hücreleri üzerinde her konsantrasyonda hücre canlılığını sırasıyla %52, %38 ve %47 oranında düşürdüğü belirlenmiştir. Sağlık hücrelerde ise 72 saat sonunda 0,5 µL ve 1 µL'de %35 ve %18'e kadar düşürdüğü ancak 1,5 µL'de %80 canlılık gösterdiği gözlenmiştir.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, boş formülasyonun toksik olmadığı, ABT199'un doğrudan uygulandığında sağlıklı ve kanser hücrelerinde toksisite gösterdiği, çıplak siRNA'nın hücrelere ulaşmadan degrades olduğu ve F6 formülasyonunun belirlenen zaman dilimi içerisinde etkisiz olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ancak, F5-siRNA formülasyonunun 48 saat sonunda tüm dozlarda sağlıklı hücre de toksik özellik göstermeden, kanser hücrelerinde istenilen toksisiteye ulaşabileceği gözlenmiştir. 72 saat sonunda bu formülasyonun 0,5 µL ve 1 µL dozda sağlıklı hücrelere toksisitesi gözlendiğinden, en uygun dozun sağlıklı hücrede %80 canlılık, kanser hücresinde ise %47 canlılık gösteren 1,5 µL olduğu saptanmıştır.

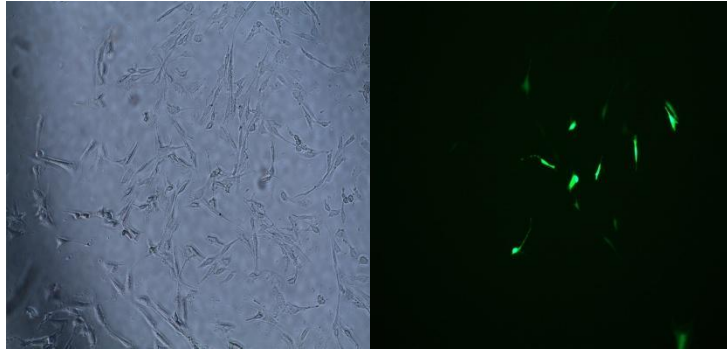
### **5.5.2. Transfeksiyon**

Nanopartiküllerin transfeksiyonunda en önemli etmenlerden biri partikülün yüzey yüküdür. Negatif yüklü siRNA/DNA pozitif yüklü lipit veya polimerle etkileşim kurmaktadır. Bununla birlikte kompleks oluşturduktan sonra hücre membranı ile etkili bir temas için net yük pozitif olmalıdır (Yang ve Huang,1997). Pozitif yüklü partiküllerin hücre membranında bulunan negatif yüklü komponentler ile etkileşimi sayesinde hücre alımı kolaylaşmaktadır (Layek ve Singh, 2017). Hücre kültürü ve transfeksiyon çalışmalarında kullanılan F5 formülünün zeta potansiyeli  $28,6 \pm 0,36$  mV olarak ölçülürken, F6 formülasyonunun zeta potansiyeli  $41,4 \pm 0,95$  mV olarak ölçülmüştür. Etkin madde yüklü F6 formülasyonunun zeta potansiyeli değeri, etkin maddesiz F5 formülasyonu ile kıyaslandığında ABT199'un nanopartikülün kararlılığını pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir.

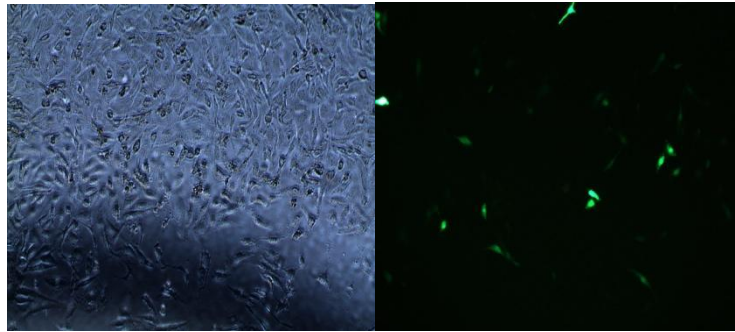
Partikül boyutu genetik materyal taşıyıcı sistemlerde de özellikle transfeksiyonun değerlendirilmesi için en önemli faktörlerden birisidir. Etkili transfeksiyon için optimum

partikül boyutu hücre tipine göre değişiklik göstermekle birlikte yapılan çalışmalar yaklaşık 200 nm çapındaki nanopartiküllerin hücre içine alındığını göstermektedir (Büyükköroğlu vd., 2016). Büyük partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin hücre yüzeyine daha kolay yerleştiği ama küçük partikül boyutundaki nanopartiküllerin hücre içine alınımının daha kolay olduğu belirtilmiştir (Rao, 2010).

Transfeksiyon çalışmalarında F5 formülasyonu ve FITC-konjugeli kontrol siRNA kullanılmıştır. FITC-konjugeli kontrol siRNA hücrelere transfekte olduktan sonra hücre içerisine vermiş olduğu ışığa sayesinde floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir. Formülasyonların sağlıklı ve kanser hücrelerine alımları arasındaki farkın belirlenmesi için, transfeksiyon çalışmaları NIH-3T3 ve MDA-MB 231 hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon çalışmalarından 24 saat sonunda transfeksiyonun gerçekleşmediği tespit edilmiş, 48 saat sonunda alınan sonuçlar Şekil 5.12. ve 5.13’de verilmiştir.



**Şekil 5.12.** NIH-3T3 hücrelerine uygulanmış F5 formülasyonu ve FITC-konjugeli kontrol siRNA transfeksiyon görüntüsü



**Şekil 5.13.** MDA-MB 231 hücrelerine uygulanmış F5 formülasyonu ve FITC-konjugeli kontrol siRNA transfeksiyon görüntüsü

Transfeksiyon çalışmalarında, hücrelerin davranışları da farklılık göstermektedir. COS-7 ve HEK-293 hücreleri üzerinde, aynı miktarda lusiferaz geni içeren pDNA'nın, aynı dozda 100 nm'nin altında ve üstünde boyuta sahip olan taşıyıcı sistemle yapılan transfeksiyon çalışmalarında, küçük partiküllerin büyük partiküllere oranla COS-7 hücresinde lusiferaz protein üretiminin 27 kat fazla olduğu belirlenirken, HEK-293 hücrelerinde bu değer 4 kat fazla olarak tespit edilmiştir. Burada ayrıca, transfeksiyon süresince hücrelerin yüksek oranda üremeleri ve ölüme gitmeleri nedeniyle, partiküllerin hücrelerle inkübasyon süresi de önemli rol oynamaktadır (Xuemei vd., 2019; Prabha vd., 2002).

Yapılan çalışma sonucunda, iki hücre tipine de formülasyonun transfekte etkilerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin, hazırlanan formülasyonun partikül boyutunun 100 nm'den yüksek olması, hücre tipine bağlı olarak, hücrelerin aşırı büyüme göstermesi ve apoptoza gitmeleri nedeniyle formülasyonların çok uzun süre ortamda bulundurulamaması olduğu düşünülmektedir. Bu deneylerin, partikül boyutunun küçültülmesi için optimizasyon çalışmaları sonrasında tekrarlanmasına ihtiyaç vardır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *Bcl-2* geni inhibitörü olan Venetoklaks (ABT-199) ve *Bcl-2* gen susturucu siRNA yüklü albümin nanopartikülleri tasarlanmış ve bu sistemlerin karşılaştırmalı etkinliği araştırılmıştır. ABT 199, 2016 yılından bu yana FDA onaylanmış ve KLL'yi tedavi etmek için kullanılmaktadır. Çalışmamız kapsamında, *Bcl-2* geni overkesprese olan MDA-MB 231 insan meme kanser hücreleri üzerinde etkinliğinin araştırılması yer almaktadır. Bu amacı ile bu çalışma literatürde ilklerden biri olma niteliğindedir. Ayrıca bu etkin maddenin hücrenin aynı apoptotik yolağını hedef almış *Bcl-2* siRNA ile kombin bir şekilde taşıyıcı sisteme entegrasyonu ve ABT 199 ile siRNA'yı taşıyan bu sistemin sinerjik etkisinin araştırılması da ilk kez gerçekleştirilmiştir.

Bu amaç doğrultusunda, ABT 199'nin ilk kez albümin ile formülasyonu, siRNA'nın albümin nanopartiküllerine adsorbsiyonu ve ABT 199 yüklü albümin nanopartiküllerine siRNA'nın adsorbsiyonunu kapsayan sistemler hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ABT 199'un albümin nanopatiküler sistem içerisine % 95,5 oranında yüklendiğini ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde 72 saat süresince % 46,8 oranında salındığı göstermiştir. Bu sistemin 0,5 µL gibi çok düşük miktarda dahi 200 ng siRNA'yı adsorbe edebildiği ve transfeksiyonda etkili olabileceği sonucu elde edilmiştir. Hücre kültürü sonucunda, ABT 199 yüklü sistemin NIH-3T3 sağlıklı ve MDA-MB 231 kaser hücrelerinde saf ABT 199'a oranla toksik olmadığı ancak, bu sistemin siRNA ile kombinasyonu ile 48 saat sonunda sadece kanser hücrelerinde toksisite gösterdiği belirlenmiştir. 72 saat sonunda düşük konsantrasyonlarda (0,5 ve 1 µL/100 µL) sağlıklı hücrelerde görülen toksik etkinin 1,5 µL/100 µL konsantrasyonda gözlenmediği belirlenmiştir dolayısıyla kanser hücrelerine uygulanabilecek doz olarak 1,5 µL/100 µL olack şekilde uygun bulunmuştur. Sistemin transfeksiyon etkinliği düşük bulunmuştur bu durum nanopartikülün partikül boyutu ile ilişkilendirilmiştir.

Sonuç olarak, ABT 199 ile siRNA yı kombin şekilde içeren sistemin, KLL haricinde *Bcl-2* geni overkesprese olan kaser hücreleri için de etkili olacak şekilde kullanılabilir olabileceği belirlenmiştir. ABT 199 ve siRNA'nın albümin taşıyıcı sistem ile formülasyonu, her iki etkin materyalin sinerjik etki için birlikte bir sistem içinde yer alması ve KLL haricinde başka kanser hücresi üzerinde denenmesi ile bu çalışma literatürde bir ilktir ve etkili olduğu ilk kez kanıtlanmıştır.

Sistemin, partikül boyutunun düşürülmesi, salım profilinin geliştirilmesi ve *Bcl-2* geni overekspresye farklı kaser hücreleri üzerinde araştırılması uygun olacaktır. Albüminin 19 gün süresince sistemik dolaşımında degrades olmadan kaldığı göz önünde bulundurulduğunda, bu sistemin ABT 199'u ne kadar süre içerisinde taşıyabileceği ya da salılabileceği araştırılmalıdır. Bu sistemin, kontrollü salım sağlayan bir ilaç taşıyıcı sistem olarak uygunluğu, kanserli hücre ve dokuya hedefleme için albüminin GP 60 yolağına bağlanma kapasitesi ve etkinliğinin belirlenmesi amacıyla *in vivo* hayvan deneylerinin planlanması uygun olacaktır.

## KAYNAKÇA

- Ackler, S., Oleksijew, A., Chen, J., Chyla, B. J., Clarin, J., Foster, K., McGonigal, T., Mishra, S., Schlessinger, S., Smith, M.L., Tahir, S.K., Levenson, J.D., Souers, A.J., Boghaert, E.R., Hickson, J. (2015). Clearance of systemic hematologic tumors by venetoclax (Abt-199) and navitoclax. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(5).
- Adams, J. M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337.
- Aied, A., Greiser, U., Pandit, A., and Wang, W. (2013). Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. *Drug Discovery Today*, 18(21-22), 1090–1098.
- Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M., & Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The Journal of Gene Medicine*, 7(5), 657–663.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4), 341–345.
- Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace Jr. AJ. (2000) An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Research*, 60(21), 6101–10.
- Andtbacka, R. H. I., Kaufman, H. L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(25), 2780–2788.
- Arana RM, Sobrevilla-Calvo P, Rivas-Vera S, Baez E, Baltazar S, Duque J, Gregorio I, Tripp F, Garces O, Aguilar L, Flores L. (2005) High incidence of Bcl-2/IgH rearrangement in Mexican patients with follicular lymphoma and its relevance as a marker for minimal residual disease. *Blood*, 106(11), 4493.
- Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D., & Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(4), 273–284.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
- Baum, C., Schambach, A., Bohne, J., & Galla, M. (2006). Retrovirus Vectors: Toward the Plentivirus? *Molecular Therapy*, 13(6), 1050–1063.
- Benfer, M., & Kissel, T. (2012). Cellular uptake mechanism and knockdown activity of siRNA-loaded biodegradable DEAPA-PVA-g-PLGA nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 80(2), 247–256.

- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25.
- Besbes S., Mirshahi M., Pocard M., Billard C. (2015) New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins. *Oncotarget*, 6 (15), 12862-12871.
- Bharatham N, Chi SW, Yoon HS (2011) Molecular Basis of Bcl-XL-p53 Interaction: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE* 6(10): e26014.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
- Billiet, L., Gomez, J.-P., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Le Gall, T., Montier, T., Midoux, P. (2012). Gene transfer by chemical vectors, and endocytosis routes of polyplexes, lipoplexes and lipopolyplexes in a myoblast cell line. *Biomaterials*, 33(10), 2980–2990.
- Birkinshaw, R. W., & Czabotar, P. E. (2017). The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 72, 152–162.
- Bloomfield, V. A. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*, 44(3), 269–282.
- Bonner, W. (1975). Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *The Journal of Cell Biology*, 64(2), 421–430.
- Bos, P. D., Zhang, X. H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., Massagué, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, 459(7249), 1005–1009.
- Bouillet P, and Strasser A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *Journal of Cell Science*, 115, 1567–1574.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., & Masurier, C. (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Human Gene Therapy*, 21(6), 704–712.
- Burke, R. S., & Pun, S. H. (2010). Synthesis and Characterization of Biodegradable HPMA-Oligolysine Copolymers for Improved Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 21(1), 140–150.

- Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., Yazan, Y., (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109 174–183.
- Calabretta B. (1991). Inhibition of protooncogene expression by antisense oligodeoxynucleotides: biological and therapeutic implications. *Cancer Research*, 51, 4505–4510.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 857–866.
- Calin, G. A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Shimizu, M., ... Croce, C. M. (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), 5166–5171.
- Cao, X.X., Mohuidin, I., Ece, F., McConkey, D. J., and Smythe, W. R. (2001). Histone Deacetylase Inhibitor Downregulation of bcl-x1 Gene Expression Leads to Apoptotic Cell Death in Mesothelioma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25(5), 562–568.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653–660.
- Carrabino, S., Di Gioia, S., Copreni, E., & Conese, M. (2005). Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells. *The Journal of Gene Medicine*, 7(12), 1555–1564.
- Cavazzana-Calvo, M. (2000). Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*, 288(5466), 669–672.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563–572.
- Chatterjee, M., Ben-Josef, E., Robb, R., Vedaie, M., Seum, S., Thirumoorthy, K., Williams, T. M. (2017). Caveolae-Mediated Endocytosis Is Critical for Albumin Cellular Uptake and Response to Albumin-Bound Chemotherapy. *Cancer Research*, 77(21), 5925–5937.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2011). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1-2), 35–48.
- Chen, C., Yue, D., Lei, L., Wang, H., Lu, J., Zhou, Y., et al Xu, L. (2018). Promoter-Operating Targeted Expression of Gene Therapy in Cancer: Current Stage and Prospect. Molecular therapy. *Nucleic acids*, 11, 508–514.
- Chen, X., Mangala, L. S., Rodriguez-Aguayo, C., et. al. (2018) RNA interference-based therapy and its delivery systems, *Cancer and Metastasis Reviews*. 37 (1) 107–124.

- Cheng N, Liu W, Cao Z, et al. (2006). A study of thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)/polyarginine bioconjugate non-viral transgene vectors. *Biomaterials*. 27 (28):4984-4992.
- Cheson BD. (2007). Oblimersen for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Therap Clin Risk Manage*,3(5), 855–70.
- Chien, Y. W., & Lin, S. (2002). Optimisation of Treatment by Applying Programmable Rate-Controlled Drug Delivery Technology. *Clinical Pharmacokinetics*, 41(15), 1267–1299.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., et al Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (39), 13944–13949.
- Clément, N., & Grieger, J. C. (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3, 16002.
- Commisso, C., Davidson, S. M., Soydaner-Azeloglu, R. G., Parker, S. J., Kamphorst, J. J., Hackett, S., Bar-Sagi, D. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 497(7451), 633–637.
- Correia, C., Lee, S.-H., Meng, X. W., Vincelette, N. D., Knorr, K. L. B., Ding, H., ... Kaufmann, S. H. (2015). Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(7), 1658–1671.
- Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 218–227.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63.
- Çelebi, N., (2002). Koloitler, Kontrollü Salım Sistemleri, A.Z. Gürsoy (ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1, İstanbul, 245-255
- Dash, P. R., Read, M. L., Fisher, K. D., Howard, K. A., Wolfert, M., Oupicky, D., Seymour, L. W. (2000). Decreased Binding to Proteins and Cells of Polymeric Gene Delivery Vectors Surface Modified with a Multivalent Hydrophilic Polymer and Retargeting through Attachment of Transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3793–3802.
- Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Miller TP, Gerecitano JF, Kipps TJ, Anderson M-A, Huang DCS, Rudersdorf NK, Gressick LA, Montalvo NP, CCRP, Yang J, Busman TA, Dunbar M, DRPH, Cerri E, Enschede SH, Humerickhouse RA, Roberts AW. (2013) Bcl-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) monotherapy shows anti-tumor activity including

completer emissions in high-risk relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocyticleukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL). *Blood*, 122(21), 872.

Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P. (2010). BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British Journal of Cancer*, 103(5), 668–675.

Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S, Schmidt M, et al. (2007). Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2225–2232.

Demirel, M. and Yazan, Y., (2000). Katı lipid nanopartiküller (SLN) FABAD, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 167-179.

Deng, J., Zhou, Y., Xu, B., Mai, K., Deng, Y., Zhang, L-M. (2011). Dendronized chitosan derivative as a biocompatible gene delivery carrier. *Biomacromolecules*, 12(3), 642–649.

Derakhshandeh, K., & Fathi, S. (2012). Role of chitosan nanoparticles in the oral absorption of Gemcitabine. *International Journal of Pharmaceutics*, 437(1-2), 172–177.

Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., et al. (2006). Increased antitumor activity, intra tumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel, *Clinical Cancer Research*, 12, 1317–1324.

Devalliere, J., Chang, W. G., Andrejcsk, J. W., Abrahami, P., Cheng, C. J., Jane-Wit, D., Saltzmanand, W. M., Pober, J. S. (2014). *The FASEB Journal.*, 28, 908–922.

Dias, N. And Stein, C.A. (2002) Potential roles of antisenseoligonucleotides in cancer therapy. The example of Bcl-2 antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm*,54(3), 263–9.

Djokic, D., Jankovic, D., Maksin, T. (2002). Radiochemical purity and particles number determinations of modified <sup>99m</sup>Tc-macroaggregated albumin, *J Serbchem*, 67, 573–579.

Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., Youle, R. J. (2011). Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell*, 145(1), 104–116.

Ekambaram, P., Sathali, A.H. and Priyanka, K., (2012). Solid lipid nanoparticles: A review, *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(1), 80-102.

- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 347–357.
- Elbashir, S. M. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15(2), 188–200.
- Elsadek, B.; Kratz, F. (2012). Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157, 4-28.
- El-Shabouri, M. (2002). Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *International Journal of Pharmaceutics*, 249(1-2), 101–108. doi:10.1016/s0378-5173(02)00461-1
- Fan, Y., Yi, J., Zhang, Y., Yokoyama, W. (2018). Fabrication of curcumin-loaded bovine serum albumin (BSA)dextran nanoparticles and the cellular antioxidant activity, *Food Chemistry*, 239 121.
- Fathke, C., Wilson, L., Hutter, J., Kapoor, V., Smith, A., Hocking, A., Isik, F. (2004). Contribution of bone marrow derived cells to skin, collagen deposition and wound repair. *Stem Cells*, 22, 5: 812-822.
- Ferreira, G. N. M., Monteiro, G. A., Prazeres, D. M. F., & Cabral, J. M. S. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in Biotechnology*, 18(9), 380–388.
- Fidler, I. J. (2002). Critical determinants of metastasis. *Seminars in Cancer Biology*,
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... Wolfe, C. (2015). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncology*, 1(4), 505.
- Flotte, T., Carter, B., Conrad, C., Guggino, W., Reynolds, T., Rosenstein, B., ... Wetzel, R. (1996). A Phase I Study of an Adeno-Associated Virus-CFTR Gene Vector in Adult CF Patients with Mild Lung Disease. *Johns Hopkins Children's Center, Baltimore, Maryland. Human Gene Therapy*, 7(9), 1145–1159.
- Francis, G. L. (2010). Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*, 62(1), 1–16.
- Frei, E. (2011). Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3, 11.
- Fung, L. K., & Saltzman, W. M. (1997). Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 26(2-3), 209–230.



- Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., ... Zerial, M. (2013). Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology*, *31*(7), 638–646.
- Gilleron, J., Querbes, W., Zeigerer, A., Borodovsky, A., Marsico, G., Schubert, U., ... Zerial, M. (2013). Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nature Biotechnology*, *31*(7), 638–646
- Gobé, G., Rubin, M., Williams, G., Sawczuk, I., & Buttyan, R. (2002). Apoptosis and Expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in Renal Cell Carcinomas. *Cancer Investigation*, *20*(3), 324–332.
- Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, et al., (2005) Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, *23*, 7794–7803.
- Green, J. J., Shi, J., Chiu, E., Leshchiner, E. S., Langer, R., & Anderson, D. G. (2006). Biodegradable Polymeric Vectors for Gene Delivery to Human Endothelial Cells. *Bioconjugate Chemistry*, *17*(5), 1162–1169.
- Graeme, IH., Dettmar, PW., Goddard, PA., Hampson, FC., Michael, D., Edward, J W., (2001).The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*,; *22*: 2959-2966.
- Hacein-Bey-Abina, S., Pai, S.-Y., Gaspar, H. B., Armant, M., Berry, C. C., Blanche, S., ... Thrasher, A. J. (2014). A Modified  $\gamma$ -Retrovirus Vector for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, *371*(15), 1407–1417.
- Hanada, M., Aimé-Sempé, C., Sato, T., & Reed, J. C. (1995). Structure-Function Analysis of Bcl-2 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 11962–11969
- Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2015). The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discovery*, *5*(5), 475–487
- Hauser, C. A., Stockler, M. R., & Tattersall, M. H. N. (2006). Prognostic factors in patients with recently diagnosed incurable cancer: a systematic review. *Supportive Care in Cancer*, *14*(10), 999–1011.
- He, Y., Cheng, G., Xie, L., Nie, Y., He, B., & Gu, Z. (2013). Polyethyleneimine/DNA polyplexes with reduction-sensitive hyaluronic acid derivatives shielding for targeted gene delivery. *Biomaterials*, *34*(4), 1235–1245.
- Hélène, C., & Toulmé, J.-J. (1990). Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1049*(2), 99–125.

- Hickerson, R. P., Vlassov, A.V., Wang, Q. et al. (2008). Stability study of unmodified siRNA and relevance to clinical use. *Oligonucleotides*, 18(4), 345–354.
- Hinderer, C., Katz, N., Buza, E. L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Wilson, J. M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Human Gene Therapy*, 29(3), 285–298.
- Hoogenboezem, E. N., & Duvall, C. L. (2018). Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell Death. *New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570–1583.
- Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K. et al. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *Journal of Clinical Investigation*, 118(9), 3143–3150.
- Hsu, S., Ho, T.-T., & Tseng, T.-C. (2012). Nanoparticle uptake and gene transfer efficiency for MSCs on chitosan and chitosan-hyaluronan substrates. *Biomaterials*, 33(14), 3639–3650.
- Hu, J., Duan, Z., Yu, G., and Wang, S. (2019). Chapter 10 - Bcl-2 Inhibitors as Sensitizing Agents for Cancer Chemotherapy, Editor(s): Zhe-Sheng Chen, Dong-Hua Yang, In Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy, Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for Chemotherapy, Academic Press, 4, p 151-168, ISSN 24683183, ISBN 9780128164358,
- Huang, D. C. & Strasser, A. (2000). BH3-Only Proteins—Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. *Cell*, 103(6), 839–842.
- Huang, S., Pettaway, C. A., Uehara, H., Bucana, C. D., & Fidler, I. J. (2001). Blockade of NF-κB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion and metastasis. *Oncogene*, 20(31), 4188–4197.
- Huber, M.A. et al. (2004). NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 114, 569–581.
- Hwang, H.-W., & Mendell, J. T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death and tumorigenesis. *British Journal of Cancer*, 94(6), 776–780.
- Ibrahim, N. K., Desai, N., Legha, S. et al. (2002). Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 8(5), 1038–1044.

- Inao, T., Iida, Y., Moritani, T., Okimoto, T., Tanino, R., Kotani, H., & Harada, M. (2018). Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin. *Oncotarget*, 9(39).
- Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(11), 653–664.
- Jiang, Y., Wong, S., Chen, F., Chang, T., Lu, H., & Stenzel, M. H. (2017). Influencing Selectivity to Cancer Cells with Mixed Nanoparticles Prepared from Albumin–Polymer Conjugates and Block Copolymers. *Bioconjugate Chemistry*, 28(4), 979–985.
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2), 147–171.
- Kadia, T. M., Ravandi, F., Cortes, J., & Kantarjian, H. (2016). New drugs in acute myeloid leukemia: Table 1. *Annals of Oncology*, 27(5), 770–778.
- Kakimoto, S., Hamada, T., Komatsu, Y., Takagi, M., Tanabe, T., Azuma, H., Nagasaki, T. (2009). The conjugation of diphtheria toxin T domain to poly(ethylenimine) based vectors for enhanced endosomal escape during gene transfection. *Biomaterials*, 30(3), 402–408.
- Kamphorst, J. J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S. R., Lu, W., Grabocka, E., ... Rabinowitz, J. D. (2015). Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. *Cancer Research*, 75(3), 544–553.
- Kanada, M., Bachmann, M. H., Contag, C. H. (2016). Signaling by extracellular vesicles advances cancer hallmarks. *Trends Cancer*, 2(2), 84–94.
- Kanada, M., Gilad, A. (2019). Nanocarrier-Based Gene Therapy Imaging Strategies. *Nucleic Acid Nanotheranostics*, 409-420.
- Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A., Anderson, D. (2013). Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials*, 12(11), 967–977.
- Kang, M. H., Reynolds, C. P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 15(4), 1126–32.
- Kang, M. H., Wan, Z., Kang, Y. H., Sposto, R., Reynolds, C.P. (2008). Mechanism of synergy of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and ABT-737 in acute lymphoblastic leukemia cell lines: Mcl-1 inactivation. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(8), 580–95.
- Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3(6), 537-549.

- Keeler, A. M., El Mallah, M. K., Flotte, T. R. (2017). Gene Therapy: progress and future directions. *Clinical and Translational Science*, 10(4), 242–248.
- Khan, I., Saeed, K. ve Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khvorova, A., Watts, J. K. (2017). The chemical evolution of oligo- nucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, 35, 238–248.
- Kim, T. H., Jiang, H. L., Jere, D., Park, I.K., Cho, M.H., Nah, J.W., Choi, Y.J., Akaike, T., Cho, C.S. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier *in vitro* and *in vivo*, *Progress in Polymer Science*, 32(7), 726–753.
- Kitada, S., Takayama, S., De Riel, K., Tanaka, S., Reed, J. C.(1994). Reversal of chemoresistance of lymphoma cells by antisense-mediated reduction of bcl-2 gene expression. *Antisense Research and Development*, 4(2), 71–9.
- Ko, J. K., Choi, K. H., Pan, Z., Lin, P., Weisleder, N., Kim, C.W., Ma, J. (2007) .The tail-anchoring domain of Bfl1 and HCCS1 targets mitochondrial membrane permeability to induce apoptosis. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 16), 2912–23.
- Kopatz, I., Remy, J. S., Behr, J. P. (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*, 6(7), 769–776.
- Kotterman, M. A., Schaffer, D. V. (2014). Engineering adeno- associated viruses for clinical gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15(7), 445–451.
- Kozlow, W. & Guise, T. A. (2005). Breast cancer metastas is to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 10, 169–180.
- Kragh-Hansen, U. (1981) “Molecular aspects of ligand binding to serum albumin.,” *Pharmacological Reviews*, vol. 33, no. 1
- Lai, E., Van Zanten, J. H. (2012). Monitoring DNA/poly-L-lysine polyplex formation with time-resolved multi angle laser light scattering. *Biophysical Journal*, 80(2), 864–873.
- Lam M., Dubyak, G., Chen, L., Nunez, G., Miesfeld, R. L., Distelhorst, C. W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A*, 91(14), 6569–73.
- Larsen, M. T., Kuhlmann, M., Hvam, M. L. and Howard, K. A. (2016). Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies*, 4(1), 3.
- Layek, B., & Singh, J. (2016). Chitosan for DNA and gene therapy. *Tissue Engineering and Therapeutics*, 2, 209-244.

- Ledford, H. (2015). Cancer-fighting viruses win approval. *Nature*, 526(7575), 622–623.
- Lessene, G., Czabotar, P. E., Colman, P. M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Molecular and Cellular Therapies*, 7(12), 989–1000.
- Lestradet, H. (2018). The antagonistic action of albumin against the activity of insulin, *Presse Med.* 28(69), 1961.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2(3), 183–92.
- Leverson, J. D., Cojocari, D. (2018). Hematologic Tumor Cell Resistance to the BCL-2 Inhibitor Venetoclax: A Product of Its Microenvironment?. *Frontiers in Oncology*, 8, 458.
- Li, C., Guo, T., Zhou, D. et al. (2011). A novel glutathione modified chitosan conjugate for efficient gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 154(2), 177–188.
- Lin, T. L., Strickland, S. A., Fiedler, W., Walter, R. B., Hou, J-Z., Roboz, G. J., et al. (2016). Phase Ib/2 study of venetoclax with low-dose cytarabine in treatment-naive patients age  $\geq 65$  with acute myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology* ., 34(15), 7007.
- Lingor, P., Michel, U., Schöll, U., Bähr, M. & Kügler, S. (2004). Transfection of “naked” siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(4), 1126–1133.
- Liu, C., Deng, Z., Du, E., & Xu, C. (2018). Long non-coding RNA BC168687 small interfering RNA reduces high glucose and high free fatty acid-induced expression of P2X7 receptors in satellite glial cells. *Molecular Medicine Reports*.
- Liu, H., Zang, C., Fenner, M. H., Possinger, K., Elstner, E. (2003). PPAR gamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells *in vitro*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 79(1), 63-74.
- Liu, N., Qi, Y.-H., Cheng, C.-T., Yang, W. B., Malhotra, A., & Zhou, Q. (2018). Potential of siRNA-albumin complex against cancer. *Chemico-Biological Interactions*.
- Loakes, D., & Holliger, P. (2009). Polymerase engineering: towards the encoded synthesis of unnatural biopolymers. *Chemical Communications*, (31), 4619.
- Lomonosova, E., Chinnadurai, G. (2008) BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27, S2–S19.
- Luo, D., and Saltzman, W.M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*, 18(1), 33–37.

- Luo, G. H., Lu, Y. P., Song, J., Yang, L., Shi, Y. J., Li, Y. P. (2008). Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering RNA prevents renal fibrosis in rats undergoing chronic allograft nephropathy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 40, 2365-9.
- Maeda, H. (2015). Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 91, 3–6.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, 65(1-2), 271–284.
- Malhotra, B. R., Mittal, S. (2014). siRNA gene therapy using albumin as a carrier, *Pharmacogenetics Genom.*, 24 (12), 582–587.
- Mao, S., Sun, W., Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 12-27.
- Maraz, A., Furak, J., Palfoldi, R., Eller, J., Szanto, E., Kahan, Z., Thurzo, L., Molnar, J., Tiszlavicz, L., Hideghety, K. (2011). Roles of BCL-2 and MDR1 expression in the efficacy of paclitaxel-based lung cancer chemoradiation. *Anticancer Research*, 31(4), 1431–6.
- Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286(5448), 2244–2245.
- Matsumura, Y. and Maeda, H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research.*, vol. 46, no. 12 Pt 1, pp. 6387–92.
- Matsumura, Y., Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agents. *Cancer Research.*, 46(12 Pt 1), 6387–6392.
- Mayumi, M., Yuichi, K., Yoko, W., Kozue, K., (2003). Laminin-1 peptide –conjugated chitosan membrans as a novel approach for cell engineering. *The FASEB Journal*, 17: 875-877.
- Mc Ivor, R. S. (2011). Therapeutic delivery of mRNA: the medium is the message. *Molecular Therapy.*, 19(5), 822–823.
- Mendez, C. M., McClain, C. J., & Marsano, L. S. (2005). Albumin Therapy in Clinical Practice. *Nutrition in Clinical Practice*, 20(3), 314–320.
- Merlot, A.M., Kalinowski, D.S., and Richardson, D.R. (2014). Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein. *Frontiers in physiology*, 5, 299.

- Miller, D. G., Adam, M. A., Miller, A. D. (1990). Gene transfer by ret-rovirus vectors occurs only in cells that are reactively replicating at the time of infection. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8), 4239–4242.
- Ming, X., Sato, K., Juliano, R. L. (2011). Unconventional internalization mechanisms underlying functional delivery of antisense oligonucleotides via cationic lipoplexes and polyplexes. *Journal of Controlled Release*., 153, 83–92.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., Massagué, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(7050), 518-524.
- Minn, A. J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G. P., Giri, D. D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W. L., Blasberg, R., Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumours. *Journal of Clinical Investigation*, 115(1), 44-55.
- Miyashita, T., Reed, J. C. (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH I7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Research*, 52(19), 5407–11.
- Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K., & Wasan, E. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 9(4), 53.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- Mundy, G. R. (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 584–593
- Murthy, N., Campbell, J., Fausto, N., Hoffman, A. S., Stayton, P. S. (2003). Bioinspired pH-responsive polymers for the intracellular delivery of biomolecular drugs. *Biocon- jug Chem.*, 14(2), 412–419.
- Müller, R. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery; review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161–177.
- Neumann, E., Frei, E., Funk, D., Becker, M. D., Schrenk, H.-H., Müller-Ladner, U., & Fiehn, C. (2010). Native albumin for targeted drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(8), 915–925.

- Nishiyama, N., Iriyama, A., Jang, W.-D., Miyata, K., Itaka, K., Inoue, Y., ... Kataoka, K. (2005). Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nature Materials*, 4(12), 934–941.
- Noga, M., Edinger, D., Roedel, W., Wagner, E., Winter, G., Besheer, A. (2012). Controlled shielding and deshielding of gene delivery polyplexes using hydroxyethyl starch (HES) and alpha-amylase. *Journal of Controlled Release*., 159(1), 92–103.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., et al. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nature Medicine*., 12(4), 401–409.
- Öner, F. (2012). A. Z. Gürsoy (Editör). Süspansiyonlar: Zeta Potansiyel. Farmasötik Teknoloji – Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. 257-272.
- Paal, K., Shkarupin, A., & Beckford, L. (2007). Paclitaxel binding to human serum albumin—Automated docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(3), 1323–1329.
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), 581–593.
- Palomino-Vizcaino, G., Alvarez-Salas, L. (2019). Nucleic Acid. *Nanotheranostics*, 1-26.
- Pan, R., Hogdal, L. J., Benito, J. M., Bucci, D., Han, L., Borthakur, G., ... Letai, A. G. (2013). Selective BCL-2 Inhibition by ABT-199 Causes On-Target Cell Death in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discovery*, 4(3), 362–375.
- Parodi, A., Miao, J., Soond, S. M., Rudzińska, M., & Zamyatnin, A. A. (2019). Albumin Nanovectors in Cancer Therapy and Imaging. *Biomolecules*, 9(6), 218.
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 271–282.
- Patel, V. R., Agrawal, Y. K. (2011) Nanosuspension: an approach to enhance solubility of drugs, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2, 81–87.
- Pekarsky, Y., Balatti, V., & Croce, C. M. (2017). BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 21–26.
- Piazzini, V., Landucci, E., D'Ambrosio, M., Fasiolo, L. T., Cinci, L., Colombo, G., ... Bergonzi, M. C. (2019). Chitosan coated human serum albumin nanoparticles: A promising strategy for nose-to-brain drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Poon, YF., Zhu, YB., Shen, JY., Siu Choon, Ng., Mary, B., Park, C., (2007). Cytocompatible hydrogels based on photocrosslinkable methacrylated O-Carboxymethylchitosan with



- tunable charge: synthesis and characterization. *Advanced Functional Materials*, 17 (13): 2139-2150.
- Porter, P. L., Sage, E. H., Lane, T. F., Funk, S. E., & Gown, A. M. (1995). Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 43(8), 791–800.
- Pullarkat, V. A., & Newman, E. M. (2016). BCL2 Inhibition by Venetoclax: Targeting the Achilles' Heel of the Acute Myeloid Leukemia Stem Cell? *Cancer Discovery*, 6(10), 1082–1083.
- Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in cell biology*, 5, 85–87.
- Rao, N. M. (2010). Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(3), 245–252.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383.
- Rautureau, G. J. P., Day, C. L., & Hinds, M. G. (2010). The structure of Boo/Diva reveals a divergent Bcl-2 protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, NA–NA.
- Reed, J. C. (2005). Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*, 106(2), 408–418.
- Rimann, M., Lühmann, T., Textor, M., Guerino, B., Ogier, J., & Hall, H. (2008). Characterization of PLL-g-PEG-DNA Nanoparticles for the Delivery of Therapeutic DNA. *Bioconjugate Chemistry*, 19(2), 548–557.
- Robin, A. Y., Krishna Kumar, K., Westphal, D., Wardak, A. Z., Thompson, G. V., Dewson, G., ... Czabotar, P. E. (2015). Crystal structure of Bax bound to the BH3 peptide of Bim identifies important contacts for interaction. *Cell Death & Disease*, 6(7), e1809–e1809.
- Rojanasakul, L. Y. (2013). Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *MolBiol Cell*, 24(6), 858–69.
- Roodman, G. D. (2004). Mechanisms of Bone Metastasis. *New England Journal of Medicine*, 350(16), 1655–1664.
- Rosato, R. R., Almenara, J. A., Kolla, S. S., Maggio, S. C., Coe, S., Gimenez, M. S., ... Grant, S. (2007). Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interactions. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(2), 692–702.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., ... Anderson, W. F. (1990). Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with

- Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New England Journal of Medicine*, 323(9), 570–578.
- RosewellShaw A, Suzuki M. (2016) Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. *CurrOpinViro.*, 21:9
- Røsland, G. V., & Engelsen, A. S. T. (2014). Novel Points of Attack for Targeted Cancer Therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(1), 9–18.
- Rungsardthong, U., Ehtezazi, T., Bailey, L., Armes, S. P., Garnett, M. C., & Stolnik, S. (2003). Effect of Polymer Ionization on the Interaction with DNA in Nonviral Gene Delivery Systems. *Biomacromolecules*, 4(3), 683–690.
- Sahay, G., Alakhova, D. Y., & Kabanov, A. V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 145(3), 182–195.
- Sahay, G., Querbes, W., Alabi, C., Eltoukhy, A., Sarkar, S., Zurenko, C., ... Anderson, D. G. (2013). Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nature Biotechnology*, 31(7), 653–658.
- Sana Abbasi, Arghya Paul, Satya Prakash. (2011) Investigation of siRNA-Loaded Polyethylenimine-Coated Human Serum Albumin Nanoparticle Complexes for the Treatment of Breast Cancer. *Cell Biochem Biophys* 61:277–287
- Sand, K. M. K., Bern, M., Nilsen, J., Noordzij, H. T., Sandlie, I., & Andersen, J. T. (2015). Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. *Frontiers in Immunology*, 5.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, NY)*., 275(5302):983–6.
- Sayiner, Ö., Çomoğlu, T. (2016). Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. Ankara Ecz. Fak. Derg. / *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 40(3), 62-79.
- Schaffer DV, Fidelman NA, Dan N, Lauffenburger DA. (2000) Vector unpacking as a potential barrier for receptor mediated polyplex gene delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(5):598–606.
- Schnitzers, E. ve Oh P. (1994). Albondin-mediated Capillary Permeability to Albumin Differential Role of Receptors in Endothelial Transcytosis and Endocytosis of Native and Modified Albumins. *Journal of Biological Chemistry*., 269(8), 6072–6082.
- Schubert, P. G. Frank, B. Razani, D. S. Park, C. W. Chow, and M. P. Lisanti (2001) “Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo.” *Journal of Biological Chemistry*., vol. 276, no. 52, pp. 48619–22.

- Schwartz J, Niu X, Walton E, Hurley L, Lin H, Edwards H, et al. (2016) Synergistic anti-leukemic interactions between ABT-199 and panobinostat in acute myeloid leukemia ex vivo. *American Journal of Translational Research.*, 8(9):3893–902.
- Seymour JF, Ma S, Brander DM, Choi MY, Barrientos J, Davids MS, Anderson MA, Beaven AW, Rosen ST, Tam CS, Prine B, Agarwal SK, Munasinghe W, Zhu M, Lash LL, Desai M, Cerri E, Verdugo M, Kim SY, Humerickhouse RA, Gordon GB, Kipps TJ, Roberts AW. (2017) Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *The Lancet Oncology*, 18 (2):230–40.
- Sharaf, H., Matou-Nasri, S., Wang, Q., Rabhan, Z., Al Eidi, Hamad., Al-Abdulrahman, A., Ahmed, N. (2014). Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochimica et biophysica acta*. 1852.
- Shen, JY., Pan, XY., Lim, CH., Park, C., Zhu, X., Beuerman, RW., (2007): Synthesis, Characterization, Photocuring Characteristics, In Vitro Degradation and Biocompatibility of Biodegradable Liquid Photocurable PCL/LGA Copolymers. *Biomacromolecules*, (2): 376-385.
- Sheridan C. (2017) First approval in sight for Novartis' CAR-T therapy after panel vote. *Nature Biotechnology.*, 35(8):691–693.
- Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. (2017) Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1):20–37.
- Shi, P., Oh, Y.-T., Deng, L., Zhang, G., Qian, G., Zhang, S., ... Sun, S.-Y. (2017). Overcoming Acquired Resistance to AZD9291, A Third-Generation EGFR Inhibitor, through Modulation of MEK/ERK-Dependent Bim and Mcl-1 Degradation. *Clinical Cancer Research*, 23(21), 6567–6579
- Siafaka PI, Titopoulou A, Koukaras EN, Kostoglou M, Koutris E, Karavas E, Bikiaris DN. (2015) Chitosan derivatives as effective nanocarriers for ocular release of timolol drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 10; 495(1):249-264.
- Sieuwert, A. M., Klijn, J. G., Peters, H. A., & Foekens, J. A. (1995). The MTT tetrazolium salt assays scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 33(11), 813-824.
- Singh, R., Sankar, C. and Rajasree, P. H. (2012). Human serum albumin nanoparticles for enhanced drug delivery to treat breast cancer: Preparation and *In vitro* assessment. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 3(10).

- Sleep D1, Cameron J, Evans LR. (2013) Albumin as a versatile platform for drug half-life extension,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1830, no. 12, pp. 5526–5534,
- Smalley E. (2017) First AAV gene therapy poised for landmark approval. *Nature Biotechnology* ., 35(11):998–999.
- Son, Y. J., Jang, J. S., Cho, Y. W. et al. (2003). Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect,” *Journal of Controlled Release*, vol. 91, no. 1-2, pp. 135– 145
- Sonawane ND, Szoka FC, Verkman AS. (2003) Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *Journal of Biological Chemistry.*, 278(45):44826–44831.
- Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, Jin S, Khaw SL, Kovar PJ, Lam LT, Lee J, Maecker HL, Marsh KC, Mason KD, Mitten MJ, Nimmer PM, Oleksijew A, Park CH, Park CM, Phillips DC, Roberts AW, Sampath D, Seymour JF, Smith ML, Sullivan GM, Tahir SK, Tse C, Wendt MD, Xiao Y, Xue JC, Zhang H, Humerickhouse RA, Rosenberg SH, Elmore SW (2013): ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine.*, 19(2):202-8.
- Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green DR. (2005) Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science (New York, NY).*, 310(5745):66–7.
- Stephenson ML, Zamecnik PC. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 75:285–288.
- Strand SP, Lelu S, Reitan NK, de Lange Davies C, Artursson P, Vårum KM. (2010) Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials.*, 31(5):975–987.
- Suh J, Wirtz D, Hanes J. (2003) Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100(7):3878–3882.
- Suh W, Han SO, Yu L, Kim SW. (2002) An angiogenic, endothelial cell-targeted polymeric gene carrier. *Molecular Therapy*, 6(5):664–672.
- T. W. Evans, “Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure,” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 16, no. s5, pp. 6–11, Dec. 2002

- Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*, 7(4), 77.
- Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han HD, Sood AK, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. 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. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2013;2:e121.
- Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5):346–358.
- Trisciuglio, D., Tupone, M. G., Desideri, M. et al. (2017). BCL-XL overexpression promotes tumor progression-associated properties. *Cell Death & Disease*, 8, 3216.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science (New York, NY)* 228 (4706):1440–3.
- Uslu, B., Arbak, S., Biltekin, B., Denir, S., Özbaş-Turan, S., Akbuğa, J., Bilir, A., (2008) Farklı Kitozan Formlarının Fibroblast Hücre Aktivitesi Üzerine Proliferatif Etkisinin İn vitro Karşılaştırması, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi
- Valk PJ, Delwel R, Lowenberg (2005) B. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 12:76-81
- Van der Meel R, Fens MH, Vader P, van Solinge WW, Eniola-Adefeso O, Schiffelers RM. (2014) Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field. *Journal of Controlled Release.*, 195:72–85.
- Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ. (2011) Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release.*, 151(3):220–228.
- Von Gersdorff K, Sanders N. N., Vandenbroucke R, De Smedt SC, Wagner E, Ogris M. (2006) The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Molecular Therapy*, 14(5):745–753.
- Wagner E. (1999) Application of membrane active peptides for nonviral gene delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 38(3):279–289.
- Wajant H. (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, NY)*, 296 (5573):1635–6.
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & Development*, 10(22):2859–69.
- Wang, Q., Ilves, H., Chu, P., et. al. (2007). Delivery and inhibition of reporter genes by small interfering RNAs in a mouse skin model. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 2577–2584.

- Whitehead, K. A., Langerand, R., Anderson, D. G. (2009). Nature Reviews Drug Discovery, 8, 129–138.
- Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, et al. (1999) Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjugate Chemistry*,10(6):993–1004.
- Wu GY, Wu CH. (1987) Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *Journal of Biological Chemistry*., 262(10):4429–4432.
- Wu SY, Lopez-Berestein G, Calin GA, Sood AK. (2014) RNAi therapies: drugging the undruggable. *Science Translational Medicine*, 6 ( 240):240 ps247.
- Yan, Q.; Sage, E. H., SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1999, 47, 1495-506
- Yang S, May S. (2008) Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: a theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. *The Journal of Chemical Physics*, 129(18).
- Yang, J.P., Huang, L., (1997) Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA, *Gene Therapy*, 4, 9 950–960.
- Yip KW, Reed JC. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*., 27(50):6398–406.
- You YZ, Yu ZQ, Cui MM, Hong CY. (2010) Preparation of photo luminescentnanorings with controllable bioreducibility and stimuli-responsiveness. *Angewandte Chemie International Edition*., 49(6):1099–1102.
- Yung-Chi, C., &Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I50) of an enzymaticreaction. *Biochemical pharmacology*, 22(23), 3099-3108.
- Zelphati O, Szoka FC. (1996) Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*., 93(21):11493–11498.
- Zeng, Y., Cullen, B. R. (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm, *RNA*, 8, 855–860.
- Zhao J, Niu X, Li X, Edwards H, Wang G, Wang Y, et al. (2016) Inhibition of CHK1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*., 7(23):34785–99.
- Zhao T, Zhang H, Newland B, Aied A, Zhou D, Wang W. (2014) Significance of branching for transfection: synthesis of highly branched degradable functional poly (dimethyl aminoethyl methacrylate) by vinyl oligomer combination. *Angewandte Chemie International Edition*., 53 (24):6095–6100.

Zhou D, Li C, Hu Y, et al. (2012) PLL/pDNA/P(His-co-DMAEL) ternary complexes: assembly, stability and gene delivery *Journal of Materials Chemistry*, 22: 10743.

Zhou J. (2014,) Advances and Prospects in Cancer Immunotherapy, *New Journal of Science*, 1-13.

Ziegler Heitbrock L. (2015). Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Frontiers in Immunology*, 6