TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİ-ANJİOGENİK ETKİ GÖSTEREN NON-VİRAL GEN TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ ÜZERİNE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Ongun Mehmet SAKA

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Bu tez, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2001K 120 240 (178) proje numarası ile desteklenmiştir.

2009 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Doktora **Programı**

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/02/2009

Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Tamer BAYKARA
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Jülide AKBUĞA
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi

ÖNSÖZ

Kanser, vücuttaki çok çeşitli hücrelerin anormal çoğalmalarıyla oluşabilir. Kontrolsüz bir şekilde çoğalarak oluşan hücre kümeleri tümör olarak adlandırılır. Kanser hücrelerinin oluşturduğu bir kitle, stromal hücreler ve damarlardan oluşan Katı tümörleri oluştururlar. Bu nedenle de katı tümörlerin oluşumu anjiogenezis olarak adlandırılan yeni kan damarlarının oluşumunu gerektirir. Bu nedenle anjiogenezi baskılamak, tümör tedavisinde etkin bir yaklaşımdır.

Çalışmamızdaki amacımız, farklı yolaklardan anjiogenezi baskılayan ve hücre apoptozisini uyaran trompospondini kodlayan geni ekspresyon vektörüne klonlamak ve bu vektörü etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak kanserli hücre içine taşıyabilecek farmasötik formülasyon geliştirmektir. Çalışmamız da, farklı polimer ve lipitlerle hazırlanan katyonik formülasyonların fizikokimyasal özellikleri, hemolitik aktiviteleri ve gen aktarım etkinlikleri araştırılmış ve tartışılmıştır.

Lisansüstü öğrenimim ve çalışmalarımız süresince beni isabetli bir şekilde yönlendiren ve motive eden, sorunların çözümlenmesinde çok önemli katkılar sağlayan ve destekleyen saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a sonsuz saygı ve şükranlarımı yürekten arz ediyor ve kendileriyle çalışmanın benim için büyük bir şans ve onur verici olduğunu belirtmek istiyorum.

Tez izleme jürisinde yer alan ve bu vesileyle de hem çalışmanın şekillenmesinde hem de karşılaşılan sorunların giderilmesindeki katkılarından dolayı saygıdeğer hocalarım sayın Prof. Dr. Fügen Aktan ve Prof. Dr. Tamer Baykara ile başta Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten Özdemir olmak üzere, tez çalışmalarım sırasında bana her türlü kolaylığı göstererek laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve her konuda yardımcı olan tüm hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamız da vektörün klonlanma ve çoğaltma aşamasında Doç.Dr. Ahmet Pınar'a ve Uzm. Biol. Funda Demirsoy'a, H-NMR analizlerinde Prof.Dr. Hakan Göker'e, analiz ve hücre kültürü çalışmalarında Uzm. Biol. Tolga Acun'a ve lipozom formülasyonları aşamasında Doç. Dr. Suna Erdoğan ve Ecz. Mine Silindir'e yardımlarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Bölümümüzde çalışan ve çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi ve destekten dolayı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman için manevi destekçilerim olan aileme, eşim Alime'ye ve çocuklarım Kerem ve Yunus Emre'ye de sonsuz sevgilerimi iletiyor ve onları kucaklıyorum.

Ayrıca, bu tez çalışmasını Biyoteknoloji Araştırma Projeleri Birimi kanalıyla 2001K 120 240 (178) nolu proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Müdürlüğüne de teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
KABUL ve ONAY		ii
ÖNSÖZ		iii
İÇİNDEKİLER		v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ		xi
ŞEKİLLER DİZİNİ		x
TABLOLAR DİZİNİ		xiii
1.	**GİRİŞ**	1
1.1.	Giriş ve Amaç	1
1.2.	Gen Tedavisi	2
1.2.1.	Gen Tedavisinin Tarihsel Gelişimi	3
1.2.2.	Gen Tedavisindeki Aşılması Gereken Engeller	5
1.2.3.	DNA Taşıyıcı Sistemler	7
1.2.3.1.	Viral Vektörler	7
1.2.3.2.	Viral Olmayan Vektörler	8
1.2.3.2.1.	Fiziksel Teknikler	9
1.2.3.2.2.	Katyonik Polimerler	9
1.2.3.2.3.	Katyonik Lipitler	10
1.3.	Kanser	13
1.3.1.	Kanser Oluşumun Nedenleri	13
1.3.1.1.	Anormal Hücrelerin Apoptozise Gidememesi	14
1.3.1.2.	Tümör Anjiogenezi	15
1.3.2.	Kanser Olgusunda Gen Tedavisi	19
1.3.2.1.	Kanser Olgusunda Gen Tedavisi Stratejileri	20
1.3.2.1.1.	Onkogen İnaktivasyonu	20
1.3.2.1.2.	Tümör Baskılayıcı Gen Replasmanı	21
1.3.2.1.3.	Suikastçı Gen Tedavisi	21
1.3.2.1.4.	İmmünomodulasyon	21
1.3.2.1.5.	Anjiogenezin Baskılanması	22

1.3.3.	Kanser Tedavisinde Kullanılan Anjiogenez İnhibitörleri	22
1.3.3.1.	Anjiostatin	24
1.3.3.2.	Endostatin	25
1.3.3.3.	Heparin ve Kortizon	25
1.3.3.4.	Platelet Faktör 4	25
1.3.3.5.	Interlökin-2	26
1.3.3.6.	Trombospondin	26
1.4.	Kullanılan Katyonik Polimer ve Lipitler	28
1.4.1.	Katyonik Polimerler	28
1.4.1.1.	Kitozan	28
1.4.1.2.	Polietilenimine (PEI)	30
1.4.2.	Katyonik Lipitler	33
1.4.3.	Polietilen Glikol (PEG)	35
2.	**GEREÇ ve YÖNTEM**	36
2.1.	Materyal Listeleri	36
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.1.2.	Kullanılan Biyolojik Maddeler	38
2.1.3.	Kullanılan Malzemeler	38
2.1.4.	Kullanılan Cihazlar ve Aletler	39
2.2.	Yöntem ve Deneyler	40
2.2.1.	Terapötik Gen	40
2.2.1.1	Terapötik Genin Eldesi	40
2.2.1.2.	Terapötik Geni Taşıyacak Plazmid'in Seçimi	43
2.2.1.3.	pDNA Eldesi ve Çoğaltılması	44
2.2.2.	Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	46
2.2.2.1.	PEG	46
2.2.2.1.1.	Aktif PEG Hazırlanması	46
2.2.2.1.2.	PEG-katyonik Polimer Konjugatlarının Hazırlanması	47
2.2.2.1.3.	PEG-katyonik Polimer Konjugat Oluşumunun Belirlenmesi	49
2.2.2.2.	Formüllerin Hazırlanması	50

2.2.2.2.1.	Kitozan Poliplekslerinin Hazırlanması	51
2.2.2.2.2.	PEI Poliplekslerinin Hazırlanması	52
2.2.2.2.3.	Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması	54
2.2.2.2.4.	Terapötik Gen Kullanılarak Hazırlanan Formüller	55
2.2.2.2.5.	Kombine Tedavi Amacı İle Hazırlanan Formüller	56
2.2.2.2.5.1.	Genetisin İçeren Kombine Formüllerin Hazırlanması	57
2.2.3.	Hazırlanan Formülasyonların Değerlendirilmesi	58
2.2.3.1.	Formüllerin Enkapsülasyon Etkinliklerinin İncelenmesi	58
2.2.3.2.	Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelin Ölçülmesi	59
2.2.3.3.	pDNA'nın İn-vitro Salım Çalışması	59
2.2.3.4.	Jel Elektroforez Yöntemi ile pDNA Etkileşiminin İncelenmesi	60
2.2.3.4.1.	Partiküllerin pDNA'yı Formüle Etme Kapasitesini ve pDNA'yı Koruma Etkisinin Ölçülmesi	62
2.2.3.5.	Formüllerin Hemolitik Aktiviteleri	62
2.2.3.6.	Formüllerin Elektron Mikroskop Analizleri	63
2.2.3.7.	Formüllerin Sitotoksisite Analizleri	63
2.2.3.8.	Formüllerin Gen Aktarım Etkinliklerinin İncelenmesi	65
3.	**BULGULAR**	70
3.1.	Genetik Materyalin Elde Edilmesi	70
3.1.1.	Terapötik Genin Eldesi ve Saflık Kontrolüne İlişkin Bulgular	70
3.1.2.	Model Plazmidin Saflık Kontrolü	72
3.2.	Taşıyıcı Sistem Üzerine Yapılan Araştırmalar	73
3.2.1.	PEG konjugatlarının kontrolü	73
3.2.2.	Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontroller	77
3.2.2.1.	Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi	77
3.2.2.2.	Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Analizlerine İlişkin Bulgular	79
3.2.2.3.	Terapötik genin in-vitro ortamda Salımına İlişkin Bulgular	81
3.2.2.4.	Jel Elektroforez Görüntülerine İlişkin Bulgular	84

3.2.2.5.	Hemolitik Aktiviteye İlişkin Bulgular	86
3.2.2.6.	Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntülerine İlişkin Bulgular	86
3.2.2.7.	Formüllerin Sitotoksisite Analizine İlişkin Bulgular	91
3.2.2.8.	Formüllerin Gen Aktarım Etkinliğine İlişkin Bulgular	91
4.	**TARTIŞMA**	96
4.1.	Genetik Materyal	96
4.2.	Gen Taşıyıcı Sistem	97
4.2.1.	PEGilasyon	97
4.2.2.	Formüllere Ait Parametreler	99
4.2.2.1.	Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	99
4.2.2.2.	Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Değerinin Değerlendirilmesi	100
4.2.3.	Terapötik Gen İçeren Formülasyonlar	102
4.2.3.1.	Genetisin İçeren Formüllerin Değerlendirilmesi	102
4.2.3.2.	In-vitro pDNA Salımının Değerlendirilmesi	103
4.2.3.3.	Formüllerin Dayanıklılığının Değerlendirilmesi	104
4.2.3.4.	Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi	105
4.2.3.5.	Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	105
4.2.3.6.	Gen Aktarım Etkinliğinin Değerlendirilmesi	106
5.	**SONUÇ ve ÖNERİLER**	107
ÖZET		108
SUMMARY		109
KAYNAKLAR		110
ÖZGEÇMİŞ		124

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PEI	Polietilenimin
Ch	Kitozan
PEG	Polietilen glikol
DNA	Deoksiribonükleik asit
pDNA	Plazmid DNA
PBS	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
TBE	Tris-borik asit – EDTA
OD	Optik dansite
Bp	Baz çifti
E.coli	Escherichia coli
RNA	Ribonükleik asit
ADA	Adenozin deaminaz
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamin
DC-Chol	Karbomil kolesterol
DOTAP	Dioleiloksi-trimetilammonio propan
VEGF	Damar endotel büyüme faktörü
TSP	Trombospondin
PLL	Poli-L-lizin
MTT	Dimetil tiyazolil difeniltetrazolyum bromid
FBS	Fetal sığır serumu
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı
BSA	Sığır serum albümin
Trizma	Tris(hidroksimetil)amino metan
FITC	Floresein isotiyosiyanat
TEM	Geçirmeli elektron mikroskobu

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
Şekil 1.1	Intravenöz uygulama sonrası DNA taşıyan non-viral vektörün kan damarlarından, hücre içi matriks yapısına kadar geçen süreçte karşılaştığı bariyerlerin şematik gösterimi	6
Şekil 1.2	Gen tedavisine ait klinik denemelerde kullanılan vektörler	8
Şekil 1.3.	Normal ve tümör damarlanması	16
Şekil 1.4.	Gen tedavisine ait klinik denemelerin kullanıldığı tedavi alanları	19
Şekil 1.5.	TSP-1 proteinin anjogenezi inhibe etme yolaklarının şematik gösterimi	27
Şekil 1.6.	Kitozanın kimyasal yapısı	28
Şekil 1.7.	Lipitlerin moleküler yapıları	34
Şekil 2.1.	pBluescriptR vektörünün gen dizilimi	41
Şekil 2.2.	pCR3.1'in gen dizim bölgeleri ve şematik gösterimi	43
Şekil 2.3.	PEG:katyonik polimer konjugatlarının hazırlanmasının şematik gösterimi	48
Şekil 2.4.	Kitozan nanopartiküllerinin hazırlanış şeması	51
Şekil 2.5.	PEI nanopartiküllerinin hazırlanış şeması	53
Şekil 2.6.	Lipozom formülasyonlarının üretiminin şematik gösterimi	55
Şekil 3.1.	Elde edilen pCR3.1-TSP1 vektörünün jel elektroforez görüntüsü	71
Şekil 3.2.	PEG:kitozan konjugatının 13-(-1) ppm arasındaki H-NMR spekturumu	73
Şekil 3.3a.	Kitozanın H-NMR spekturumu	74
Şekil 3.3b.	PEG:kitozan konjugatının H-NMR spekturumu	74
Şekil 3.4a.	PEI'nin H-NMR spekturumu	75
Şekil 3.4b.	PEG:PEI konjugatının H-NMR spekturumu	75
Şekil 3.5a.	Kitozan:PEG konjugatı ile hazırlanan (Ch5 kodlu) formülasyonun TEM mikrografı	76

Şekil 3.5b.	PEG kaplı kitozan formülasyonun (Ch6 kodlu) TEM mikrografı	76
Şekil 3.6.	Kitozan ile hazırlanan formüllerin PBS ortamında in vitro salım grafiği	81
Şekil 3.7.	PEI ile hazırlanan formüllerin PBS ortamında in vitro salım grafiği	82
Şekil 3.8.	Lipozom formülasyonlarının PBS ortamında in vitro salım grafiği	82
Şekil 3.9.	Terapötik gen içeren poliplekslerin agaroz jel elektroforez görüntüsü	84
Şekil 3.10.	Terapötik gen içeren lipozomların agaroz jel elektroforez görüntüsü	84
Şekil 3.11.	Formül C1, C2 ve C3'ün enzimatik yıkımı, P1,P2 ve P3 kimyasal yıkımı sonucunda elde edilen jel eletroforez görüntüsü	85
Şekil 3.12.	Lipozom formülasyonlarının pDNA'yı koruma etkisi ve DNazI enzimi muamele edilmiş formüllerin gel elektroforez görüntüleri	85
Şekil 3.13.	C1,C2,P1,P2,L1 ve L2 kodlu formüllerin hemolitik aktiviteleri	86
Şekil 3.14.	Kitozan:PEG konjugatı ile hazırlanan (C2 kodlu) formülasyonun TEM mikrografı	87
Şekil 3.15.	PEG kaplı kitozan formülasyonun (C3 kodlu) TEM mikrografı	87
Şekil 3.16.	PEI:PEG konjugatı ile hazırlanan (P2 kodlu) formülasyonun TEM mikrografı	88
Şekil 3.17.	PEG kaplı PEI formülasyonun (P3 kodlu) TEM mikrografı	88
Şekil 3.18.	L1 kodlu formülasyonun (DOTAP/DOPE/PEG) TEM mikrografı	89
Şekil 3.19.	L1 kodlu formülasyonun (DOTAP/DOPE/PEG) TEM mikrografı	89

Şekil 3.20.	L2 kodlu formülasyonun (DC-Chol/DOPE/PEG) TEM mikrografı	90
Şekil 3.21.	L2 kodlu formülasyonun (DC-Chol/DOPE/PEG) TEM mikrografı	90
Şekil 3.22.	MCF-7 hücrelerinde formüllerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	91
Şekil 3.23.	Normal mikroskop ve floresan filtreli görüntüler	92
Şekil 3.24.	Floresan ışık altındaki P2 ve L2 formüllerinin floresan filtreli mikroskop görüntüleri	93
Şekil 3.25.	MCF-7 hücrelerinde gen aktarım etkinliğinin protein miktarı olarak teşhisi	93
Şekil 3.26.	Hücre kültürü uygulamalarından alınan örneklerin poliakrilamid jele uygulanması , ve bu görüntünün PVDF membranındaki aksi	95

ÇİZELGELER

Çizelge		Sayfa
Çizelge 1.1.	Normal ve tümör damarlanmasındaki farklılıklar	15
Çizelge 1.2.	Bilinen anjiogenik faktörler	17
Çizelge 1.3.	Bilinen anjiogen inhibitör faktörler	18
Çizelge 1.4.	Anti-anjiogenik etki elde etmek üzere onay almış ilaçlar	23
Çizelge 1.5.	Anti-anjiogenik etkiyi dolaylı yoldan sağlayan, onay almış ilaçlar	24
Çizelge 2.1.	Hazırlanan kitozan formülasyonları	52
Çizelge 2.2.	Hazırlanan lipozom formülasyonları	54
Çizelge 2.3.	Terapötik gen (pCR3.1-TSP1) içeren polimerik nanopartikül ve lipozom formülasyonları	56
Çizelge 2.4.	Genetisin içeren kombine formüller	57
Çizelge 3.1.	PCR yöntemi ile elde edilen vektörün saflığı ve konsantrasyonu	71
Çizelge 3.2.	Model vektörün saflığı ve konsantrasyonu	72
Çizelge 3.3	Kitozan ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri	77
Çizelge 3.4.	PEI ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri	78
Çizelge 3.5.	Lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri	78
Çizelge 3.6.	Kitozan ile hazırlanan formüllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular	79
Çizelge 3.7.	PEI ile hazırlanan formüllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular	80
Çizelge 3.8.	Lipozom formüllerine ait partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerleri	80
Çizelge 3.9.	Terapötik gen içeren formüllerin salım kinetik modellerine ait verileri	83

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Son on yıl içerisinde ilke ve amacı çok iyi tanımlanan gen tedavisinin asıl hedefi hatalı genin yerine normal genin yerleştirilmesidir. Ancak, çok yönlü uygulamaları olmasına rağmen, beklentileri karşılayacak başarılı terapötik yaklaşımlar sınırlı sayıdadır. Gen tedavisi, günümüzde asıl amacının yanı sıra hastalığa neden olan gen veya proteinleri baskılayacak veya istenilen fonksiyonel protein üretimini olumlu etkileyecek, gen modifikasyonlarının aktarımı olarak da tanımlanmaktadır. Hücre içinde gerçekte olmayan terapötik fonksiyonun kazandırılmasında nükleik asitlerin kullanımı öngörülmektedir. Bu DNA-temelli terapötikler; plazmid içerisinde ya da antisens oligonukleotidler ve küçük RNA parçaları (siRNA) olarak uygulanmaktadır. Tedavide kullanım için onay alan gen ilaçları; Vitravene (ABD, 1998), Gendicine (Çin, 2003) ve Türkiye ilaç piyasasında da bulunan Macugen (ABD, 2004) gibi son derece sınırlı sayıdadır (Wiley, 2008). Çalışmaların büyük çoğunluğu henüz klinik denemeler safhasında ise de, kanser, AIDS, kardiyovasküler ve nörolojik pek çok ciddi hastalığın tedavisinde gelecek vaat etmektedir (Akbuğa, 2006).

Hastalığa çözüm olacak genin tanımlanması ve uygun vektöre aktarılması gerekmektedir. Ayrıca vektöre entegre edilmiş gen dizilimi istenilen hücreye nakledilip orada aktif olarak çalışabilmelidir. Farklı faz aşamalarında bulunan gen ilaçlarının klinik çalışmaları incelendiğinde, çoğunu viral kaynaklı taşıyıcılar ve gen dizilimlerinin tek başına uygulandığı araştırmalar oluşturmaktadır. Katyonik lipit formülleri %7'lik bir oran içerisinde yer alırken, katyonik polimer ile yapılan çalışmalar %4'lük oranın bir kısmını oluşturmaktadır (Wiley, 2008). Ancak, 2005 yılında ilk defa katyonik polimer ile DNA kompleksi klinik çalışmalara dahil olmuş ve mesane kanseri olan iki hastada %70 oranında tümör hücrelerinde küçülme gözlenmiştir (Ohana ve ark., 2005).

Dünya'da ölüm ile sonuçlanan hastalıklar incelendiğinde, ilk sırayı alan kalp hastalıklarının arkasından kanser vakaları yer almaktadır. Kanser kısaca, vücut hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanır. Kanser hücrelerinin oluşumu iki ana mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlar; anormallik gösteren hücrelerin apoptozise (hücre ölümüne) gidememesi ve tümör anjiogenezi (yeni damar oluşumu) gelişmesidir. Bu tez çalışmamızdaki öncelikli amacımız, anjiogenezi inhibe ederek tümör büyümesini önleme potansiyeline sahip doğal anjiogenez inhibitörü Trombospondin-1 genini taşıyan biyolojik materyali, etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak hücreye taşıyabilecek, normal damarlanma gösteren hücrelere zarar vermeden sadece anjiogenik tümör hücrelerine özgü yanıt oluşturacak farmasötik formülasyonlar geliştirmek ve daha önce genetik olarak aktarımı araştırılmamış olan trombospondin terapötik genin aktarım etkinliğini incelemektir. Bu amaç doğrultusunda, ideal vektör olarak tanımlayabileceğimiz kitozan ve polietilenimin partikülleri hazırlanmıştır. Aynı zamanda kullandığımız polimerlerin polietilen glikol ile modifikasyonu gerçekleştirilerek, klinik çalışmalarda kullanılabilecek formüllerin hazırlanması hedeflenmiştir. Polietileniminin biyogeçimlilik problemi nedeni ile çalışmamızda ön plana çıkan kitozan partikülleri, farmasötik kalitedeki kitozan ve suda çözünür ultra saf kitozan türevleri ile hazırlanmıştır. Ayrıca, tez çalışmamızın bir kısmını, belli bir alt yapısı olan lipozom formülasyonları oluşturmaktadır. Genel olarak stabilite problemi olan bu taşıyıcı sistemlerin, biyolojik yarı ömrünü uzatarak hücre içine alımını kolaylaştıracak modifikasyonlar gerçekleştirilerek, gen aktarım veriminin artırılması hedeflenmiştir.

1.2. Gen Tedavisi

Gen tedavisi, hastalıkların tedavisinde genetik prensiplerin uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde kullanılan çoğu ilaç ise hastalık semptomlarının ortadan kaldırılması esasına dayanmaktadır (Wolff ve Lederberg, 1994). Gen tedavisinin temel amacı, hücrelerin hastalığa yol açan eksik ya da kusurlu gen veya genlerinin yerine, sağlam kopyalarının hücreye yerleştirilmesiyle genetik hatanın düzeltilmesi ya da hücreye yeni bir işlev kazandırılmasıdır (Fry ve Wood, 1999;

Sağıroğlu, 2008). Gen tedavisi ile kalıtsal olarak meydana gelen hastalıklar ile sonradan meydana çıkan birçok genetik hastalığa çare bulmaya çalışılmaktadır. Teorik olarak, hedef hücrenin ürettiği eksik veya hatalı enzim veya diğer proteinlerin, moleküler düzeyde, gen modifikasyonu veya gen aktarılması ile tedavisi amaçlanmaktadır. Adenozin deaminaz (ADA) yetersizliği, ailesel hiperkolesterolemi ve kistik fibröz gibi tek-gen bozukluklarının ilk uygulamalarında, etkin gen aktarım vektörlerinin kullanılmamış olmasına rağmen, tedavi protokolleri tamamlanmış ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (Fry ve Wood, 1999). Bu nedenle, gen tedavisi uygulamaları birden fazla genetik hatanın neden olduğu ölümcül hastalıklara alternatif olmaktadır. Örneğin; nükleik asitlerin hücre içerisine girmesiyle, onkogenler gibi kısmi genlerin regüle edilmesi, mRNA ile baskın etkileşme sağlanması ile kanser tedavisi için potansiyel bir strateji oluşturulmaktadır (Merdan ve ark, 2002).

1.2.1. Gen Tedavisinin Tarihsel Gelişimi

İbn-i Sina, Tıp Kanunu adlı eserinde; "Vücutta varolan üç tür yetenek arasında yer alan doğal yeteneklerden birisi, bireyin korunması, diğeri ise ırkın korunması ile ilgilidir. Irkın korunmasına hizmet eden yetenek, erkek ve kadın tohumunun biçimlendirilmesini ve çeşitli organların farklı yapı ve özelliklere göre gelişmesini sağlayan üreme yeteneğidir. Kuşaktan kuşağa aktarılan bu yetenek, yaşamın devamından ve ırkın bekasından sorumludur" şeklinde ifade etmektedir (Ozturk, 2001). Bin yıl öncesinde bile gen yapısı bilinmesine rağmen, gen tedavisinin uygulanabilirliği viral genomun konakçı hücrenin genomunun bir parçası haline gelmesi, yani farklı bir gen diziliminin hücreye ait nükleik asite entegre olması ile anlaşılmıştır (Wolff ve Ledenberg, 1994). Modern gen çalışmaları ilk kez Haskova ve Hrubesova (1958) tarafından DNA doku transferinde uygulanmıştır. Aynı yılda Medawar (1958) adlı araştırmacı da farelerde deri nakli sırasında baskın geni taşıyan DNA dizisi üzerinde çalışmalar yapmıştır. 1966 yılında, insan gen mühendisliğinin tanımlanmasıyla, teorik olarak gen tedavisi dile getirilmiştir. 1966-1969 yılları arasında hastalıklı hücrelere yeni bir genin virüslerle teorik olarak aktarılabileceği

tartışılmıştır. 1968 yılında Anderson gen tedavisinin nasıl gerçekleşeceğini makale haline getirmiş, ama o dönemde editörler tarafından spekülatif bulunmuş ve ret edilmiştir (Anderson, 1998).

1970'lerde genetik hastalığı bulunan iki Alman kız üzerinde ilk genetik mühendislik deneyleri yapılmıştır. Herkese duyurulmayan bu deneyin potansiyel riskleri, gen tedavisinin etik yönden tartışılmasını başlatmıştır. 1970'lerin başlarında genlerin, memelileri enfekte eden DNA virüsüne aktarılması ve başarılı klonlamanın gerçekleşmesi ile bu yeni teknolojinin gücü ve tehlikesi anlaşılmıştır. Rekombinant DNA araştırmalarını içeren ilk resmi kılavuzlar 1976'da yayınlanmıştır. 1979'larda kılavuzların, halkın gözünde güven ve saygınlık kazanması ile konu ile ilgili korkular azalmıştır (Anderson, 1998).

İnsan üzerinde gerçekleşen ilk gen tedavisi çalışmasına 1989 yılında onay verilmiştir (Anderson, 1998). Adenozin deaminaz (ADA) geninin ürettiği enzim, savunma sisteminin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. ADA eksikliği ile doğan çocuklarda, savunma sisteminde ciddi boyutlarda sorun gerçekleşmektedir. En basit virüs enfeksiyonu bile hayati tehlike yaratmaktadır. 1990 yılında, Birleşik Devletler'in onayını da alan, French Anderson tarafından gerçekleştirilen bir denemede, ADA defektinin tek bir gen bozukluğu nedeniyle ortaya çıkması ve üretilen az miktarda enzimin dahi vücutta istenilen cevabı oluşturması nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Rolland, 1998). Ümit verici sonuçların diğer klinik denemeler için cesaret verici olmasından sonra, dünya çapında 300'den fazla klinik protokol onay almış ve 3000 hastaya genetik olarak değiştirilmiş hücreler aktarılmıştır.

2002 yılında trajik bir geri bildirim rapor edilmiştir. Gen tedavisi uygulanan 3 yaşındaki erkek çocukta, gen tedavisine bağlı olduğu düşünülen lösemi benzeri durum gerçekleşmiştir. Bu bildirimden sonra gen tedavisi uygulanan farklı on çocuk da hayatlarını tehlikeye atan hastalıklara maruz kalmışlardır. Gen tedavisi alanında oluşan gerileme, uzmanların yeni stratejiler geliştirmesine ve oluşabilecek risklerin araştırılmasına yol açmıştır (Check, 2002). Bu dönemde gen tedavisinin etik

boyutları şiddetli bir şekilde tartışılmış, insan vücudunun nasıl çalıştığı ve yeni stratejilerin görülebilecek uzun süreli yan etkileri araştırılmıştır.

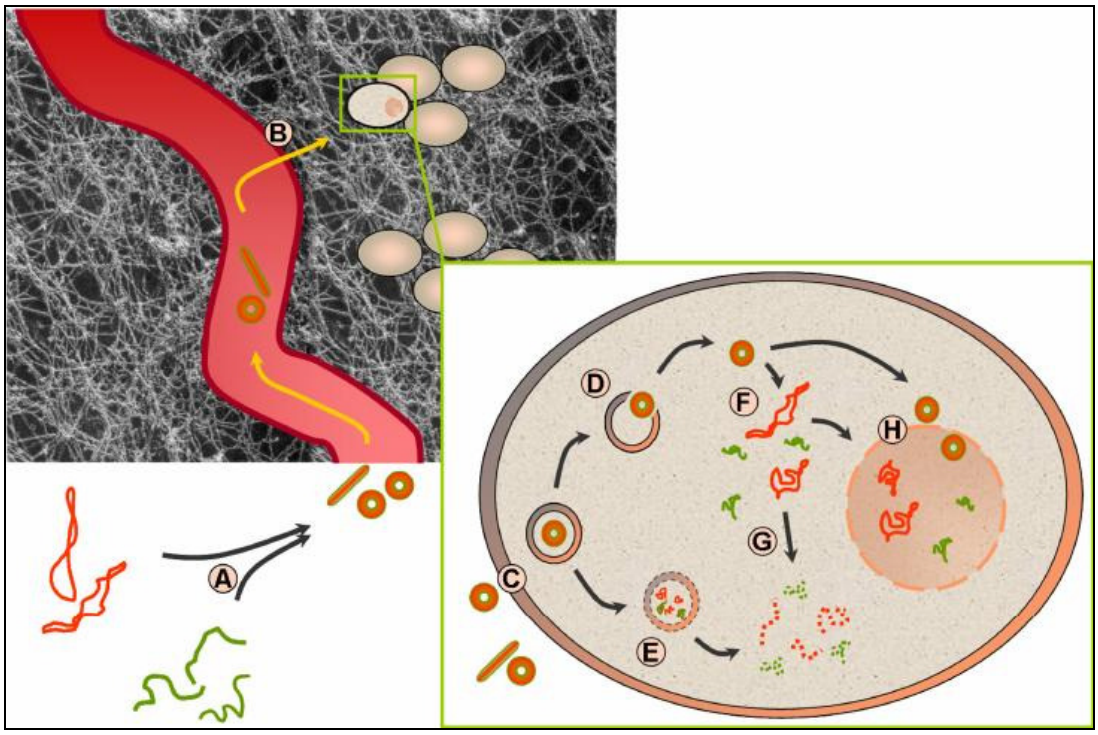
Hastadan alınan ve başarılı bir şekilde genleri yapısına aktarılan hücre ve dokuların hastaya geri verilmesine dayanan ex-vivo gen tedavisi, protokolünün pahalı olması ve özel teknikler, bilim ve ilaç uzmanlığı gerektirmesi nedeniyle, büyük medikal merkezlerde uygulanmakta, sınırlı sayıda hastaya hizmet sunulmaktadır (Mahato ve ark,1997a). Gen tedavisinde hedef, terapötik gen veya genleri hedef hücreye güvenilir ve etkin taşıyan stratejilerin geliştirilmesidir.

1.2.2. Gen Tedavisindeki Aşılması Gereken Engeller

Gen tedavisinin başarılı olması için taşıyıcı vektördeki terapötik içeriğin hücreye nakledilmesi ve orada aktif olarak çalışması gerekmektedir (Bout, 1997; Wiethoff ve Middaugh, 2003). Öncelikle DNA bir taşıyıcı içerisinde paketlenmeli ve hedef doku veya hücreye ulaşabilmelidir. Direk enjeksiyondan sonra en basit ve uygun yöntem intravenöz uygulamadır (Wiethoff ve Middaugh, 2003). Etkin gen tedavisi sağlamak için farklı uzmanlıklar ve varsayımlar göz önüne alınarak vektör tasarımı yapmak gerekmektedir. Şekil 1.1'de olası mekanizmalar özetlenmiştir.

DNA'nın özelliklerine bakıldığında, yoğun negatif yüke sahip olduğu ve boyutunun birkaç mikrometre olduğu görülecektir (Gelbart ve ark, 2000). Partiküllerin büyüklüğü, yüzey yükü, serum proteinleri ve hücre yüzeyi ile etkileşimine bağlı olarak partiküller vücutta dağılırlar. Bu nedenle hücre içine hedeflenen taşıyıcı sistemlerde, DNA'nın boyutu azaltılmalı ve negatif yükü maskelenmelidir. Ayrıca hücre yüzeyine kadar ulaşması için kan serum proteinleri ile etkileşimi minimuma indirilmelidir. Ekstraselüler matriks içerisinde DNA'nın hızla degredasyonu da engellenmelidir (Wiethoff ve Middaugh, 2003). Birçok makromolekül gibi DNA'nın hücre içine alımı, pinositoz, endositoz ve reseptör aracılığı ile endositoz yoluyla gerçekleşmektedir.DNA gibi negatif yüklü olması nedeniyle bu yapının hücre yüzeyi ile etkileşimi oldukça güçtür. Pozitif yüklü taşıyıcıların kullanılması veya reseptör tarafından algılanan ligantların bağlanması ile bu sorun çözülebilir (Merdan ve ark.,

2002). Endozom veya lizozom içerisindeki DNA'nın düşük pH ve enzimler tarafından yıkımı önlenmeli, endozomal kaçış gerçekleştikten sonra terapötik DNA konakçı genomu ile etkileşmeye girmelidir. DNA'nın nükleus içine girmesi ve kendini entegre edebilmesi için hücrenin çoğalması gerekmektedir. Yavaş bölünme gösteren hücrelerde DNA entegrasyonu için özel stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir (Wiethoff ve Middaugh, 2003). Kanser hücrelerinin, normal hücrelere göre kontrolsüz ve sürekli çoğalması, gen tedavisi için kanser hücrelerinin spesifik olarak etkilemesini sağlamaktadır.



Şekil 1.1: Intravenöz uygulama sonrası DNA taşıyan non-viral vektörün kan damarlarından, hücre içi matriks yapısına kadar geçen süreçte karşılaştığı bariyerlerin şematik gösterimi. Önemli basamaklar; A) DNA'nın taşıyıcı içerisinde formülasyonun hazırlanması, B) Damar içerisinde stabilitesini koruyan sistemin, kan-damarı duvarını geçerek ekstraselüler matrikse geçişi, C) Endozomal yolak ile hücre içine alınması, D) Endozom içerisinden kaçış, E) Lizozomal yapı içerisinde yıkıma uğraması, F) DNA'nın hücre içine salınması, G) DNA'nın hücre içinde yıkıma uğraması, H) Çekirdeğe giriş ve ekspresyonu.

DNA'nın bu bariyerleri aşması, enzimatik yıkıma karşı stabilitesinin korunması gibi taşınma özelliklerinin geliştirilmesi için DNA'nın viral vektör içine dahil edilmesi veya viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerle formüle edilmesi gerekmektedir.

1.2.3. DNA Taşıyıcı Sistemler

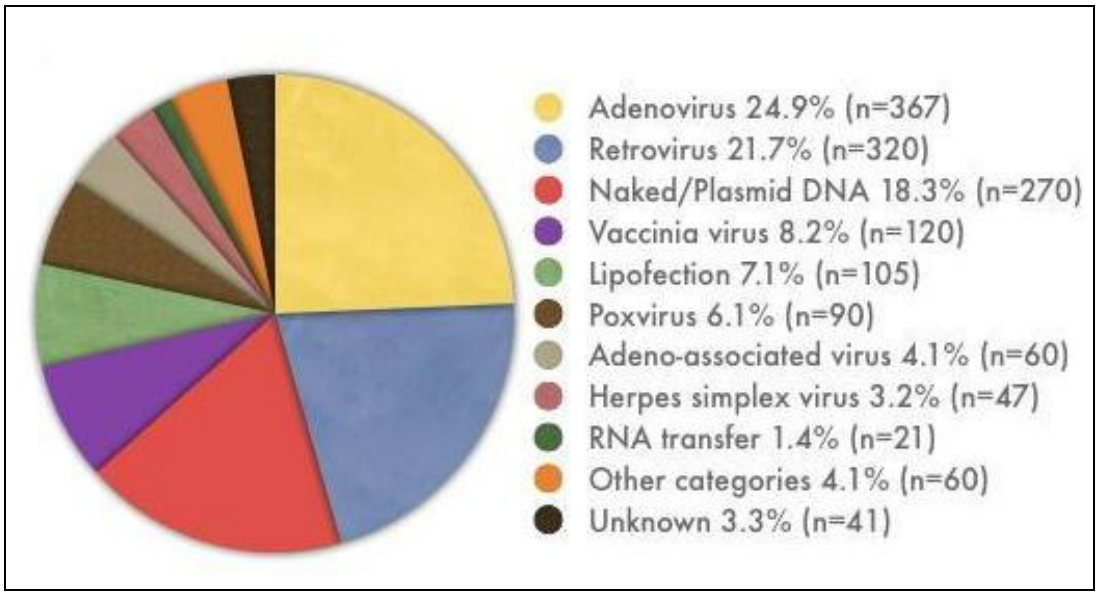
Başarılı bir gen tedavisi için, terapötik gen veya genleri hedef hücreye verimli olarak taşıyabilecek gen aktarım vektörleri gerekmektedir. Gen aktarım vektörleri;

- İstenilen terapötik geni taşıyabilme kapasitesine sahip olmalı,
- Üretimi tekrarlanabilir olmalı,
- Saklama koşullarında stabil kalabilmeli,
- Hedef hücreye gen aktarımını istenilen düzeyde sağlamalıdır (Felgner ve Rhodes, 1991; Felgner ve ark, 1987).

1.2.3.1. Viral Vektörler

Viral bazlı gen taşıyıcı sistemler, viral hastalık oluşturmadan terapötik genleri hedef hücrelere aktarmak üzere, üzerinde modifikasyonlar yapılan taşıyıcılardır (Russell ve Hirata, 1998). Genetik modifikasyona uğramış rekombinant, retrovirüs vektör (Ding ve ark, 2000), adenoviral vektör (Curiel, 1994), adeno-bağlantılı viral vektör (Ponnazhagan, 2002), herpes simpleks virüs vektör (Wozniak ve ark., 2008), enzimatik yıkımdan korumak için terapötik geni viral kapsid içerisinde taşımaktadır. Yoğunlaştırılmış DNA ile karşılaştırıldığında viral kapsid içerisinde 10^4-10^6 oranında sıkılaştırılmış şekilde taşımaktadır. Viral vektörler, hedef hücrenin yüzeyi ile etkileşmekte, reseptör aracılığı ile hücre içerisine alınmakta ve etkin bir şekilde endozom ile çekirdek arasında geçiş sağlamaktadır. Ayrıca çekirdek içerisinde taşıdığı genomik yapı ile konakçı hücrenin kromozomal DNA'sına entegre olma kapasitesine sahiptir (Rolland, 1998). Bu nedenlerden dolayı şu andaki klinik protokollerin %75'ini viral rekombinant vektörler oluşturmaktadır (Şekil 1.2). Bu protokollere rağmen, güvenlik nedeniyle, insan üzerinde kullanımının limitli olması ise düşündürücüdür. Tümörojenik mutasyonu başlatmasındaki olasılık veya rekombinasyon ile aktif viral partikülleri meydana getirebilme olasılıkları ve immünojeniteleri nedeniyle tekrar dozu uygulamada büyük sorunlar oluşmaktadır (Lee ve Huang, 1996). Bölüm 1.2.1'de bahsedildiği gibi immün yetmezliği olan kişilere uygulanan retroviral kaynaklı gen tedavisinde, taşıyıcıya ait toksisite problemine bağlı lösemi benzeri tablo gelişmiştir (Kaiser, 2003). Viral vektörlerin

diğer zayıf yanları, özel hücre türlerine sınırlı hedefleme, taşıyabileceği DNA'nın sınırlı olması, büyük miktarda üretim zorluğu ve maliyeti olarak sıralanabilir (Lee ve Huang, 1996). Bu nedenlerle alternatif olarak görülen, viral olmayan sistemlere ilgi artmaktadır.



Şekil 1.2: Gen tedavisine ait klinik denemelerde kullanılan vektörler (http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical).

1.2.3.2. Viral Olmayan Vektörler

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin terapötik geni taşıyabilmesi için plazmidlere ihtiyaç duyulmaktadır. Plazmidler, kromozomdan bağımsız olan, kapalı dairesel yapılı, çift iplikli DNA molekülleridir. Memeli hücresinin nükleusuna aktarıldığında, üzerinde taşıdığı farklı sekans gruplarının (promotor-"ilerletici bölge", enhansır-"hızlandırıcı bölge" ve intron bölgeleri gibi) kontrolünde protein ekspresyonu gerçekleşir. Plazmidleri, nükleaz ataklarından korumak ve hücresel bariyerlerden geçirmek için genellikle bir taşıyıcı ile kombine edilmesi gerekmektedir (Blaisonneau ve ark, 1997). Bu grupta en çok araştırılan vektörler katyonik lipidler ve katyonik polimerler olmasına rağmen Şekil 1.2'de görüldüğü üzere partikül bombardımanı gibi farklı metodlar ile pDNA'nın yalnız uygulandığı klinik çalışmalar da bulunmaktadır.

1.2.3.2.1. Fiziksel Teknikler

pDNA yapısının taşıyıcı içermeden (çıplak pDNA) hücre zarından geçmesini sağlamak ve kolaylaştırmak amacıyla uygulanan yöntemlerdir (Mahato ve ark, 1997b). pDNA, boyutunun büyük olması ve yüzey yükünün yüksek negatif değerlerde olması nedeniyle kendi başına hücresel bariyerleri geçemez ve DNase degredasyonuna uğrayarak vücuttan elimine olur. Şaşırtıcı olarak, DNA aşısı uygulaması ile damarın tekrar daralması (restenoz) ve iskemik kalp hastalığı uygulamalarında az da olsa klinik yarar sağlanmıştır (Sylven ve ark, 2001; Calarota ve ark, 1998). Çıplak pDNA'nın hücre içerisine direkt mikroenjeksiyonu ile yüksek etkinlik elde edilmiştir. Tek hücre için verimli bir yöntem gibi gözükse de hücre sayısı arttığında yöntem işlevsiz kalmaktadır (Crystal, 1995). Çıplak pDNA etkinliğini artırmak için fiziksel stratejiler geliştirilmiştir. Gen tabancası olarak adlandırılan altın kaplı pDNA'nın yüksek basınç altında helyum akımı ile iğnesiz olarak aktarımını sağlayan yöntem, daha çok bitki dokularında kullanılmaktadır. In-vitro koşullarda ve sadece deriye yüzeyel olarak in-vivo uygulamaları ile gen tabancası yöntemi başarılı olmuştur (Mountain, 2000). Uygulanan düşük doz nedeniyle, yüksek basınç altında sıvı yardımıyla aktarımı sağlayan intraject veya jetgun isimli aletlerin kullanıldığı yöntemler ile doz miktarı göreceli yükseltilebilmiştir. Elektirik akımı ile hücre zarında oluşturulan geçiş alanı ile pDNA aktarımı, elektroporasyon ile sağlanmaya çalışılmış, hücrenin zarar görmesinden dolayı tercih edilmemektedir.

1.2.3.2.2. Katyonik Polimerler

Katyonik özellik gösteren, poli-l-lizin (PLL) (Kwoh ve ark, 1999), polietilenimin (PEI) (Godbey ve ark, 2000; Neu ve ark, 2005; Florea ve ark., 2002), poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri (Fu ve ark, 2008; Nam ve ark, 2008), kitosan (Bozkır ve Saka, 2004a; Bozkır ve Saka, 2004b) gibi polikatyonik peptit ve polimerler ile pDNA'nın negatif yüklü fosfat grubu, kompleksler oluşturmaktadır. Oluşan komplekse, polipleks adı verilmektedir (Bloomfield, 1997). Genel olarak, pDNA ile

oluşturdukları kompleksin fiziko-kimyasal özelliklerinin, katyonik lipozomlardan daha üstün olduğu tanımlanmaktadır (Gao ve Huang, 1996; Sorgi ve ark, 1997). DNA ile elektrostatik olarak oluşturulan polipleks yapısı, DNA'yı daha küçük yapılar halinde paketlemektedir. Böylelikle sıkıştırılmış olan DNA, nükleaz yıkımından korunmaktadır (Bozkır ve Saka, 2004a; Dash ve ark, 1997). En uygun koşullar sağlandığında, yaklaşık 5.500 baz çifti içeren supersarmal (kendi içerisinde kıvrılmış, daha sıkı yapı) pDNA, küresel yapı içerisinde sıkılaştırılarak, boyut olarak 1/5 oranında küçülme sağlanmaktadır (Blessing ve ark., 1998). Boyutunun azalmasına bağlı olarak hücre dışı sıvılarına geçişinin daha kolay olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca negatif yük taşıyan hücre zarı ile etkin bir şekilde etkileşmekte ve endositoz ile hücre içine alınmaktadır (Aneed, 2004).

Üstteki paragrafta; polikatyonların, pDNA ile oluşturdukları yapıların endositoz yoluyla alındığını ifade etmemize rağmen, gen aktarım verimi kullanılan polimere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Tang ve Szoka, 1997).

1.2.3.2.3. Katyonik Lipitler

Katyonik lipitler amfifilik moleküllerdir. Genel yapılarına bakıldığında, baş kısmında bulunan hidrofilik özellik gösteren grup gliserol gibi bir bağlayıcı ile genellikle hidrofobik özellik gösteren çift hidrokarbon zinciri veya kolesterol türevlerini içermektedir. Vektör olarak kullanıldığında, amfifilik yapısının yanında gösterdikleri geometri de önem arz etmektedir. Hidrofilik ve hidrofobik kısımların kapladığı alana bağlı olarak, her amfifilik molekül gibi sulu ortamda süspande edildiğinde miseller, lameller, kübik faz veya ters altıgen faz şekilleri oluşturmaktadır. Oluşan bu şekil içerisine aktarılan gen veya oligonükleotid, sitozol içerisine salınmasında önemli bir yer tutmaktadır (Hsu ve ark, 2005). Gen aktarım çalışmalarında katyonik lipidler genellikle yardımcı lipidler olarak adlandırılan, dioleilfosfatidilethanolamin (DOPE) veya kolesterol ile hazırlanırlar. Bu sayede DNA ile hazırlanan lipopleks (lipid-DNA kompleksi) lameller fazdan, lameller olmayan faza geçer. Böylece katyonik lipid taşıyıcıların gen aktarım etkinlikleri artar (Woude, 1995; Koltover ve ark., 1998;

Scarzello ve ark, 2005). Katyonik lipidler, polietilen glikol (PEG) gibi farklı fonksiyonel gruplarla modifikasyona uygunluk göstermektedir (Song ve ark, 2002; Rejman ve ark, 2004). Böylelikle kan dolaşımında makrofajlar tarafından yıkıma uğramadıklarından, in vivo uygulamalarda biyolojik yarı ömürleri uzamış olur. Makrofajlar tarafından algılanamayan bu lipoplekslere, radar tarafından algılanamayan hayalet uçaklar gibi "stealth" ismi yakıştırılmıştır (Woodle, 1998). Igarashi ve arkadaşları (2006), dimetilaminoethan karbomil kolesterol (DC-Chol) ve DOPE içeren formülasyona şeker bağlı biyosurfaktan ilavesi ile gen aktarım etkinliğinde artış olduğunu göstermiştir. Inoh ve arkadaşları (2004) ise benzer modifikasyonların kan dolaşımında önemli bir etki göstermediğini açıklamışlardır. O halde farklı bir mekanizma ile gen aktarım etkinliği artmaktadır. Bölüm 1.2.2.'de açıklanan bariyerlerden, endozomlardan kaçış, pH duyarlı katyonik lipitlerle sağlanabilmektedir. Birçok araştırmacı DC-Chol ve/veya şeker bağlı sürfaktanlar ile kaçışın sağlandığını belirtmektedir (Hafez ve ark, 2000; Fielden ve ark, 2001). PEG modifikasyonu ise bu kaçış mekanizmasını olumsuz etkilemektedir (Walker ve ark, 2005). Bu nedenle hazırlanacak formülasyonda PEG miktarı ile kolesterol türevinin miktarı maksimum yarar sağlayacak düzeyde hazırlanmalıdır. Lameller fazdan, altıgen faza dönüşümde önemli rol oynayan DOPE, ortamdaki katyonik yükleri nötralize ederek pDNA'nın yüksek oranda bağlanmasına engel olmaktadır. Diğer taraftan neden olduğu faz değişimi gen aktarım etkinliğinde oldukça önemli yer tutmaktadır (Zuidam ve Barenholz, 1998). Bu nedenle, molekülün formülasyondaki miktarı çok önemli bir parametre olarak göze çarpmaktadır.

Farklı araştırmacılar farklı katyonik lipitler kullanarak gen aktarım çalışmaları yapmışlardır (Woude ve ark., 1995; Koltover ve ark., 1998; Scarzello ve ark, 2005). Hepsinde ortak nokta, hazırlanan formülasyonların tamamının lameller olmayan altıgen faz'da olmasıdır.

Piyasada kullanıma hazır katyonik lipozom formülleri;

- Lipofektin□; DOTMA (Dioleiloksipropil trimetilammonyum klorür)/DOPE ,
- Lipofektamin□; DOSPA (Dioleiloksi sperminkarboksiamidoetil dimetil propanamonyum trifluoroasetat) / DOPE,
- Transfektam□; DOGS (Dioktadesilamidospermin),

adları ile satılmaktadır. DOTMA gibi, monovalan katyonik lipit özelliği gösteren yapılardan oluşan formüllerle DNA ile etkin yükleme sağlanamamakta ve hazırlanan formüller oldukça büyük yapılar göstermektedir. Elde edilen taşıyıcılar agregasyona meyillidirler ve fiziksel olarak stabil değildirler (Gustafsson ve ark, 1995). pDNA'nın protamine veya poli-l-lizin (PLL) gibi bir polikatyon ile sıkılaştırılarak formüle edilmesiyle, daha stabil formüller elde edildiği gözlenmiştir. Bu çalışmalarda partikül büyüklüğü >500 nm civarındadır (Liu ve Huang, 2002; Gao ve Huang, 1996). DOPE gibi yardımcı lipit kullanmadan, Transfektam ile başarılı yükleme ve boyut elde edildiği de bildirilmektedir (Remy ve ark, 1998). Partikül boyutunun 30 nm civarına inildiği bildirilen ve katyonik lipit taşıyıcılarında yeni yaklaşım olarak lanse edilen, katyonik tiyol-deterjan türevleri ile hazırlanan (Dauty ve ark., 2001; Dauty ve ark., 2002) formüllerin fiziksel özelliklerinin yanı sıra diğer lipozom formüllerine göre sitoplazma ve nükleus geçişleri de üstünlük göstermiştir. Kullanılan deterjan türevleri açısından soru işaretleri yaratsa da bu formüllerin in-vivo sonuçlarını beklemek daha doğru olacaktır.

DOPE ve kolesterol türevi içeren formülün kistik fibröz ve akciğer hücrelerinde kullanımı bu türevlerin öne çıkmasını sağlamıştır (Ruiz ve ark, 2001). Gösterdiği hafif toksik etki nedeniyle inflamasyon yanıt oluşturması, aşı ve antitümor immünoterapötikler için de avantaj olarak düşünülmektedir.

1.3. Kanser

Kanser, kontrolsüz olarak tek bir hücrenin anormal şekilde çoğalması ve diğer dokulara saldırma potansiyeli olan hastalığa verilen addır. Kan veya lenf yolu ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilmektedir (National Cancer Institue, 2008).

Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Azalmış hücre çoğalması veya artmış ölüm hızı herhangi bir aşırı artışı önler. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler (Nuamov ve Folkman, 2008). Bazen bu olağan proses içinde bazı hatalar oluşur. DNA'nın değişmesi veya zarar görmesine bağlı olarak hücrenin büyüme ve bölünmesinde farklılıklar meydana gelir. Vücudun ihtiyacı olmamasına rağmen hücre sayısı artar ve istenmeyen hücre yığını oluştururlar (Jain ve Duda, 2008; National Cancer Institue, 2008).

1.3.1. Kanser Oluşumun Nedenleri

Kanser vücudun temel yapısı olan herhangi bir hücrenin çoğalmasıyla oluşmaktadır. İnsan vücudu anormal hücre oluştuğunda, veya çoğalmaya başladığında, buna karşı önlem alır. Bazı durumlarda bu koruyucu mekanizmalar görevini eksik yapmakta veya hiç yapamamaktadır (Jain ve Duda, 2008).

1.3.1.1. Anormal Hücrelerin Apoptozise Gidememesi

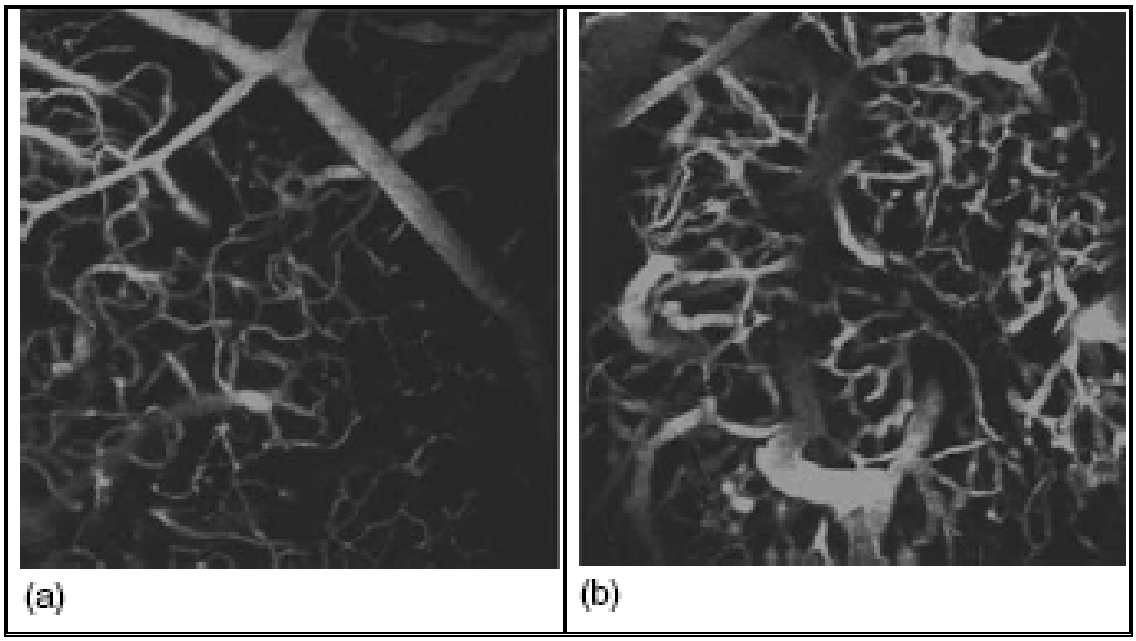
Apoptozis, programlı hücre ölümü demektir. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarıyla oluşmakta ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla çoğalmış DNA'dan dolayı oluşmaktadır. Buradaki apoptosis, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve aneploidinin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin çoğalma prosesine girmesi sağlanır (Crissman, 1995). Apoptozis, yaşamın idame edilmesinin yanında türün gelişiminden ve genç kalmasından da sorumludur. Örneğin, primatlarda embriyogenez döneminde var olan parmaklar arası perdelerin kaybolmasından da apoptozis sorumludur. Apoptozis yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdan yok edilmelerini sağlar. Apoptozis organizmanın kendi dokularını tanıyan T hücrelerinin eliminasyonunda da rol alır. Böylece, bu hücrelerin organizmaya karşı immun atağı önlenir (Bertrand ve Pommier, 1995; Ramachandra ve Studzinski, 1995). Bu hücrelerde intrasellüler organeller biraraya toplanırlar. Hücre çekirdeği yoğunlaşır ve fragmanlara ayrılır. Hücreler apoptotik cisimciklere ayrıldığında, bu cisimcikler fagositozla komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından alınırlar. Nekrozisin tersine, apoptozis inflamatuar reaksiyona yol açmaz (Silvestrini ve ark, 1995; Darzynkiewicz ve ark., 1995). Vücut içerisinde apoptozis, genetik olarak düzenlenir. p53 tümör supressör onkogeni apoptozisi uyarır. Kanser hücrelerinde ise bol miktarda salınan Bcl-2 onkogeni apoptozisi inhibe eder. Böylece, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açar (Darzynkiewicz ve ark., 1995).

1.3.1.2. Tümör Anjiogenezi

Anjiogenez, katı (solit) tümörlerin büyümesi ve metastazları için birincil öneme sahip, önceden var olan damar sisteminden farklı olarak yeni damar oluşumudur. Doğal damar oluşumu ile tümöral damar oluşumu arasındaki fark Çizelge 1.1'de özetlenmiştir ve Şekil 1.3.'te gösterilmektedir. Artan araştırmalar doğrultusunda, katı tümörler yeni damar oluşmadan çok nadir 2 veya 3 mm^3 hacmine ulaşabilmektedir. Oksijen ve besinlerin ortama ulaşması ile katı tümörler büyüme göstereceklerdir (Ciesielski ve ark., 2006). Kan akımı sağlandıkdan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür. Ayrıca, metastazın oluşması için dolaşıma katılmasını sağlayacak ortam, birincil tümörde yeni damar sistemlerinin meydana gelmesi ile gerçekleşmektedir (Ciesielski ve ark., 2006; Koido ve ark., 2005).

Çizelge 1.1. Normal ve tümör damarlanmasındaki farklılıklar (Jain ve Duda, 2008)

Normal Damarlanma	Tümöral Damarlanma
- Organizedir	- Organize gelişmez
- Düzenli dağılım gösterir	- Düzensiz dağılım gösterir
- Benzer yapılar gösterir	- Büklümlü, sarmal yapılar gösterir
- Geçirgen değildir	- Sızıntılıdır
- Damar basıncı, dokular arası basınçtan büyüktür	- Damar basıncı ile tümör içi basınç aynıdır
- Yaşlanma gösterirler	- Yaşlanmazlar
- Destekleyici hücreler bulunur	- Destekleyici hücre bulunmaz
- Uygun zar proteini ekspresyonu	- Uygun olmayan zar proteini ekspresyonu
- Hücresel yaşam faktörlerinden bağımsızdır	- Hücresel yaşam faktörlerine bağımlıdır



Şekil 1.3. Normal ve Tümör damarlanması (Jain ve Duda, 2008). a) Fare beynindeki normal damar ağı (Damarlanma organize,düzenli, birbirleriyle bağlantılı ve besin ve oksijen taşımak için optimum olarak ağ oluşturmuş). b) Fare beynindeki tümör damarlanması (Damarlanma organize değil, birbirleriyle bağıntılı değil, düzensiz, eğri-büğrü ve dolambaçlı sonuçta ortam oksijensiz kalır).

Anjiogenez, proteinaz ile hücre zarı yıkımı, endotel hücrelerin anjiogenik uyaranı vasıtasıyla değişime uğraması, hücre zarına göç ve istila etmesi gibi çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. Endotel hücreler birbirine yapışarak yeni damar boşluğunu oluştururlar. Son basamak olarak yapı içine tüp yapısı filizlenir ve kan akımı yeni oluşan yapı içinde dolaşıma başlar. Mikro çevre içinde anjiogenezin her basamağı, anjiogenez öncüsü ve karşıtı moleküllerle (Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3.) bir denge halindedir. Anjiogenez uyaranı lehine denge bozulduğu an damar oluşum mekanizması başlamaktadır (Risau, 1997). Damar endotel büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiogenezi sürükleyen en önemli faktörlerdir (Ferrara, 2008). Habis tümörde çok yüksek oranda VEGF bulunmaktadır. VEGF ve VEGF reseptör kompleksleri, tümör anjiogenezinde çok önemli rol oynamaktadır (Ferrara, 2008; Manley ve ark., 2002). Kondo ve arkadaşları (2000) insan kolon kanser hücre hattını VEGF121cDNA ile muamele ettiklerinde, anjiogenezi dolayısıyla tümör büyümesini ve yayılımını aktive ettiklerini bildirmektedirler. Riedel ve çalışma grubu da (2003), baş-boyun bölgesinden elde edilen tümör hücre hattında, VEGF antisense oligonükleotid uygulaması ile, tümör

boyutunda küçülme olduğunu ifade etmektedirler. Mesane, prostat, kolon ve göğüs kanserinde bFGF miktarı oldukça fazla gözlenmiştir. Anjiogenez inhibitörleri ile bu oran, normal düzeye indirilmiştir (Baker ve Fidler, 2008).

Çizelge 1.2. Bilinen anjiogenik faktörler (Tonini ve ark., 2003'ten modifiye edilmiştir)

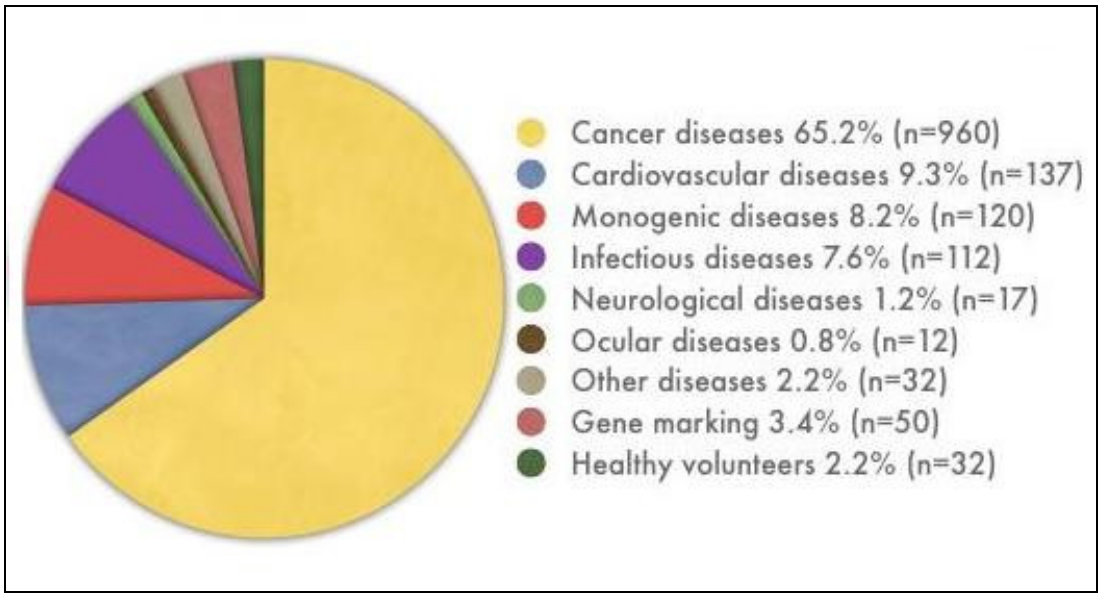
- 1-Butiril gliserol - Asit fibroblast büyüme faktörü - Adenozin - Anjiogenin - Anjiopoetin-1 (Ang1) - Del-1 - Entaktin - Epidermal büyüme faktörü - Ephirin - Fibroblast büyüme faktörü,(asit ve temel) - Fibronektin - Follistatin - Fosfolipitler (SPP,LPA) - Granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) - Heparin / heparin sülfat - Hepatosit büyüme faktörü (HGF) - Interlökin 8 (IL-8)	- Iaminin - Kollajen - Leptin - Midkin - Nikotinamit - Perlekan - Plasenta büyüme faktörü - Platelet türevi endotelial büyüme faktörü - Pleitropin - Proliferin - Prostaglandin E1 ve E2 - Yayılma faktörü (Scatter; SF) - Transforming büyüme faktörü alfa (TFG-a) ve beta (TGF-b) - Tümör nekroz faktörü (TNF-□) - Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

Çizelge 1.3. Bilinen anjiogen inhibitör faktörler (Tonini ve ark., 2003'ten modifiye edilmiştir)

- 2-metoksi-estradiol	- Kanstatin
- 1.25-dihidroksivitamin D3	- Kartilaj-türevi inhibitörü (CDI)
- ADAMTS-1	- Maspin
- Anjiopoetin-2	- Metaloproteinaz inhibitörü (TIMPs)
- Anjiostatin	- METH-I
- Anjiojenik antitrombin III	- PEDF
- CD59 komploment fragmenti	- Pex
- Çözünür VEGF reseptörü	- Pigment-epitelyum-türev faktörü
- Dekorin	- Plasenta ribonükleaz inhibitörü
- Endostatin	- Platelet faktör 4 (PF4)
- Fibronektin fragmenti	- Prolaktin 16kDa fragmenti
- Gro-□	- PPARy ligantları
- Heparinaz	- Retinoitler
- Heparin hekzasakkarit fragmenti	- Tetrahidrokortizol-S
- İnsan çoriok gonadotropin (hCG)	- Trombopondin (TSP-1, TSP-2)
- İnterferon □, □, □	- Vasküler endotelial büyüme inhibitörü (VEGI)
- İnterferon ikna edici protein (IP-10)	- Vaskülostatin
- İnterlökin (IL-1, IL-4, IL-12)	- Vazostatin
- Kalretukilin	

1.3.2. Kanser Olgusunda Gen Tedavisi

Eylül 2008 tarihinde, 1472 adet gen tedavisi alanında klinik çalışma bulunmaktadır. Bunların 960 kadarı kanser hastalığına karşıdır (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4.: Gen tedavisine ait klinik denemelerin kullanıldığı tedavi alanları. (http://www. wiley.co.uk/genetherapy/clinical).

Kanser olgusunda gen tedavisinin avantajları;

- Kanser ilaçlarında sık görülen yarılanma ömrü ve sistemik toksisite problemlerine, düşük ve devamlı protein üretimi yapan gen ürünlerinin çözüm getirebilmesi,
- Kanserde kullanılan, fonksiyonel rekombinant proteinlerin üretim maliyetinin hakikaten yüksek olması,
- Tekrar doz verilmesine gerek kalmaması,
- Gerektiğinde radioterapi, kemoterapi veya diğer tedavi şekilleriyle kombine kullanılabilmesidir.

1.3.2.1. Kanser Olgusunda Gen Tedavisi Stratejileri

Kanserin genetik bir hastalık olduğu bilinmektedir (Nuamov ve Folkman, 2008). Onkogenlerin mutasyona uğraması ve tümör uyarıcı genler, tümör hücre populasyonunun oluşmasını ve artmasını sağlamaktadır. Büyüme faktörlerinin beklenmeyen ekspresyonları, tümör kütlesini arttırmakta ve anjiogenezisi uyarmaktadır. Yeni gen mutasyonlarının oluşması ve farklı modifikasyonlar, kanser hücrelerin çok farklı heterojen fenotiplerini oluşturmaktadır. Her tümörün farklı olması nedeniyle, gen tedavisi stratejileri de farklılık göstermektedir.

Günümüzde uygulanabilecek, kanser gen tedavisi stratejileri;

- Onkogen inaktivasyonu
- Tümör baskılayıcı gen replasmanı
- Suikastçı gen tedavisi
- İmmünomodulasyon
- Anjiogenezin baskılanması, olarak sıralanabilmektedir.

1.3.2.1.1. Onkogen İnaktivasyonu

Antijen oligonükleotidleri; kısa, tek zincirli DNA dizilimine sahiptirler. Onkogenler üzerindeki bölgeye spesifik olarak bağlanarak, üç dizilimli sarmal yapı oluşmaktadır. Oluşan yapı onkogenin etki göstermesi ve çoğalmasına engel olmaktadır. Shen ve arkadaşları (2003), (99m)teknetium bağlı bcl-2 antijeni ile tümör oluşumunu destekleyen bcl-2 genine bağlanarak, stabil üç dizilimli yapı oluşturmuşlardır. Böylece bcl-2 üretimi engellenmiş olmaktadır. Ziemba çalışma grubu ile (2005), Her-2/neu onkogenini, bis-peptid nükleik asidiyle etkisiz hale getirmişlerdir.

RNA molekülleri üzerinde de benzer antisens oligonükleotid tedavisi araştırılmıştır. Oligonükleotid bağlandığında iki zincirli RNA oluşmakta ve bu yapı hücre içi enzimler tarafından yok edilmektedir.

1.3.2.1.2. Tümör Baskılayıcı Gen Replasmanı

Mutasyona uğramış tümör baskılayıcı gen yerine, kanser içerisine yabani türünün aktarılmasıdır. p53 geni en çok çalışılan tümör baskılayıcı gendir. Ayrıca Rb ve p16 genlerinin yerine konulmasıyla da başarı elde edilmiştir (Tamm ve ark., 2002).

1.3.2.1.3. Suikastçı Gen Tedavisi

Kanser hücresinin içerisine aktarılan gen ile formülasyonda bulunan toksik olmayan önilacın, hücre içinde toksik ajana dönmesi esasına dayanmaktadır. En çok araştırılan suikastçı gen-önilaç sistemi; herpes simpleks virus timidin kinaz / gansiklovir (HSV-tk / GCV) sistemleridir (Kwon ve ark., 2003)

1.3.2.1.4. İmmünomodulasyon

Araştırmacılar farklı yaklaşımlarla bu stratejiyi uygulamışlardır. Shi ve arkadaşları (2002) tümörün içine, immün baskılayıcı IL-12 genini aktararak, tümöre özgü sitotoksik T ve doğal öldürücü hücreleri tarafından tanınmasını sağlamışlardır. Ayrıca hücre içinde IFN-□ üretiminin attığını da bildirilmektedir. Diğer bir yaklaşım gen aşısı ile sağlanmıştır. Tümöre özgü antijen veya bir taşıyıcı içerisindeki tümör antijeni, antijen sunan hücrelere aktarılarak, immün yanıt oluşturmaya çalışılmıştır (Ciesielski ve ark, 2006).

1.3.2.1.5. Anjiogenezin Baskılanması

Tümör hücreleri farklı fenotip göstermektedir. Dolayısıyla her tümörün farklı antijeni oluşmaktadır. Ayrıca antijenini saklayarak hücre immün sistemden rahatlıkla kaçabilmektedir. Kontrolsüz büyüyen ve yayılan her hücre yığını istisnasız yeni kan damarlarına ihtiyaç duymaktadır (Carmeliet ve Jain, 2000). Bu nedenle anjiogenezi baskılamak, tümör tedavisinde etkin bir yaklaşımdır.

Gen tedavisi aracılığı ile anti-anjiogenez tedavisinin avantajları;

- Anjiogenez baskılayıcıların ekspresyonuna yardımcı olma potansiyeli yüksektir.
- Endotelial hücreler çok hızlı çoğalabilirler fakat tümör hücreleri ile karşılaştırıldıklarında genetik olarak daha stabildirler. Bunun sonucunda ilaca karşı erken direnç kazanmaya neden olan mutasyon riski daha azdır (Kerbel ve Folkman, 2002).
- Anjiogen inhibitörlerinin, normal dokuya oranla tümör dokularındaki endotel hücrelerine yatkınlık göstermesidir. Bunun sebebi ;
    - Normal dokulara göre tümör hücresindeki endotel hücrelerin hızlı çoğalması,
    - Tümör endotel hücrelerinde yüzey markırların normal endotel hücrelerine göre daha fazla olması,
    - Tümör damarlanmasında düzensizlik ve hücre zarının kaidesindeki olası açıklık olarak açıklanmaktadır.

1.3.3. Kanser Tedavisinde Kullanılan Anjiogenez İnhibitörleri

Uygulamalar ve araştırmalar incelendiğinde, gen içerisinde kodlanan çok az anjiogenez inhibitörü bulunmaktadır. Yapılan araştırmaların çoğu peptid veya proteinin aktarılması şeklindedir. Biyoteknolojik olarak üretilmiş, onay almış veya faz aşamasında oldukça ilerlemiş formüller bulunmaktadır (Çizelge 1.4. ve Çizelge 1.5.).

Çizelge 1.4. Anti-anjiogenik etki elde etmek üzere onay almış ilaçlar

Sınıf	Hangi aşamada olduğu	Etkin madde (ticari adı)	Hedefi	Tanımı
Anti-VEGF	Piyasada	Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Monoklonal antikor
	Faz II/III	VEGF-trap	VEGF, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D	Çözünür reseptör
	Faz I	VEGF-AS (Veglin)	VEGF, VEGF-C, VEGF-D	Antisense oligonükleotid
		Aplidin	VEGF	Peptit
Anti-VEGFR	Faz III	Vatalanib (PTK787/ ZK22258)	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, (PDGFR-b), ve c-Kit	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		Sunitinib (SU11248, Sutent)	VEGFR-2, PDGFR-b	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar)	VEGFR-2, PDGFR-b, Flt-3, c-Kit	Küçük molekül- raf kinaz ve tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		AE-941 (Neovastat)	VEGF–VEGFR MMP-2,MMP-9	Köpekbalığı kıkırdak bileşiği
	Faz I-II	AG-013736	VEGFR, PDGFR-b, c-Kit	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		AMG 706	VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR-b, c-Kit	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		Cediranib (AZD2171, Recentin)	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		CEP-7055	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		CHIR258	VEGFR-1, VEGFR-2, FGFR1=3	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		CP-547632	VEGFR-2	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		GW786034	VEGFR-2	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		IMC-C1121b	VEGFR-2	Monoklonal antikor
		KRN-951	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-b, c-Kit	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		OSI-930	VEGFR, c-Kit	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		XL999	FGFR, VEGFRs, PDGFR, ve Flt-3	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		ZK-CDK	VEGFRs, PDGFR, CDKs	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü
		Vandetanib (ZD6474, Zactima)	VEGFR-2, EGFR	Küçük molekül- tirozin kinaz reseptör inhibitörü

Çizelge 1.5. Anti-anjiogenik etkiyi dolaylı yoldan sağlayan, onay almış ilaçlar

Sınıf	Hangi aşamada olduğu	Etkin madde
EGFR/HER inhibitorü	Piyasada / Faz III	Cetuximab
		Gefitinib
		Erlotinib
		Panitumumab
		Pertuzumab
		Trastuzumab
mTOR inhibitorü	Faz III	CCI-779
COX-2 inhibitorü	Piyasada	Celecoxib
PPAR-*g* agonisti	Piyasada	Rosiglitazone
Proteozom inhibitörü	Piyasada	Bortezomib
Bifosfanatlar	Piyasada	Zoledronic asit
Sitokinler	Piyasada	Interferon-*a*
Thalidomit ve anologları	Piyasada / Faz III	Thalidomide Lenalidomide
Hormon türevleri	Faz II	2-Methoxyestradiol

1.3.3.1. Anjiostatin

Primer tümör hücrelerinin ürettiği bir protein olan plazminojenin 38 kDa'luk internal parçasının özgül olarak endotel hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Toksik olmayan anjiostatin sistemik olarak verildiğinde tümör gelişimini çok güçlü şekilde baskılamaktadır (Reilly ve ark., 1997). Anti-anjiogenik ve anti-tümör aktivitesini, bFGF ve VEGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerini baskılayarak ortaya koymaktadır (Griscelli ve ark., 1998).

1.3.3.2. Endostatin

Kolajenin 18. karboksi terminalinde Ala-His bağının elastaz enziminin kesimiyle oluşan peptittir. Endostatinin, anjiostatine benzer etkilerinin olduğu, özgül olarak endotel hücrelerinin çoğalmasını, tüp formasyonunu baskıladığı ve endotel hücrelerde apoptozu indüklediği görülmüştür (Reilly ve ark., 1997). Anjiostatin ve endostatin beraber uygulandıklarında tümör gerilemesinde sinerjistik etki ortaya koyması, bu iki molekülün hedeflerinin farklı olmadığını göstermektedir (Yokoyama ve ark., 2000).

1.3.3.3. Heparin ve Kortizon

Heparin ve kortizon beraber uygulandığında anjiogenez inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Anjiostatik steroidlerin endotelyal plazminojen aktivatör baskılayıcısını indükleyerek bazal membranın yıkımını engellemektedir. Anjiogenezin önemli unsurlarından olan adezyon molekülleri üzerinde de baskılayıcı etkileri görülmüştür (Rizea ve Silvestro, 2003).

1.3.3.4. Platelet Faktör 4

Anti-anjiogenik aktivitesi nedeniyle anjiogenez inhibitörü olduğunu göstermektedir. Doğal olmasına rağmen toksik etkileri nedeniyle kullanılmamaktadır. Protamin molekülüyle benzer şekilde heparini nötralize ettiğinin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır (Maione ve ark., 1991).

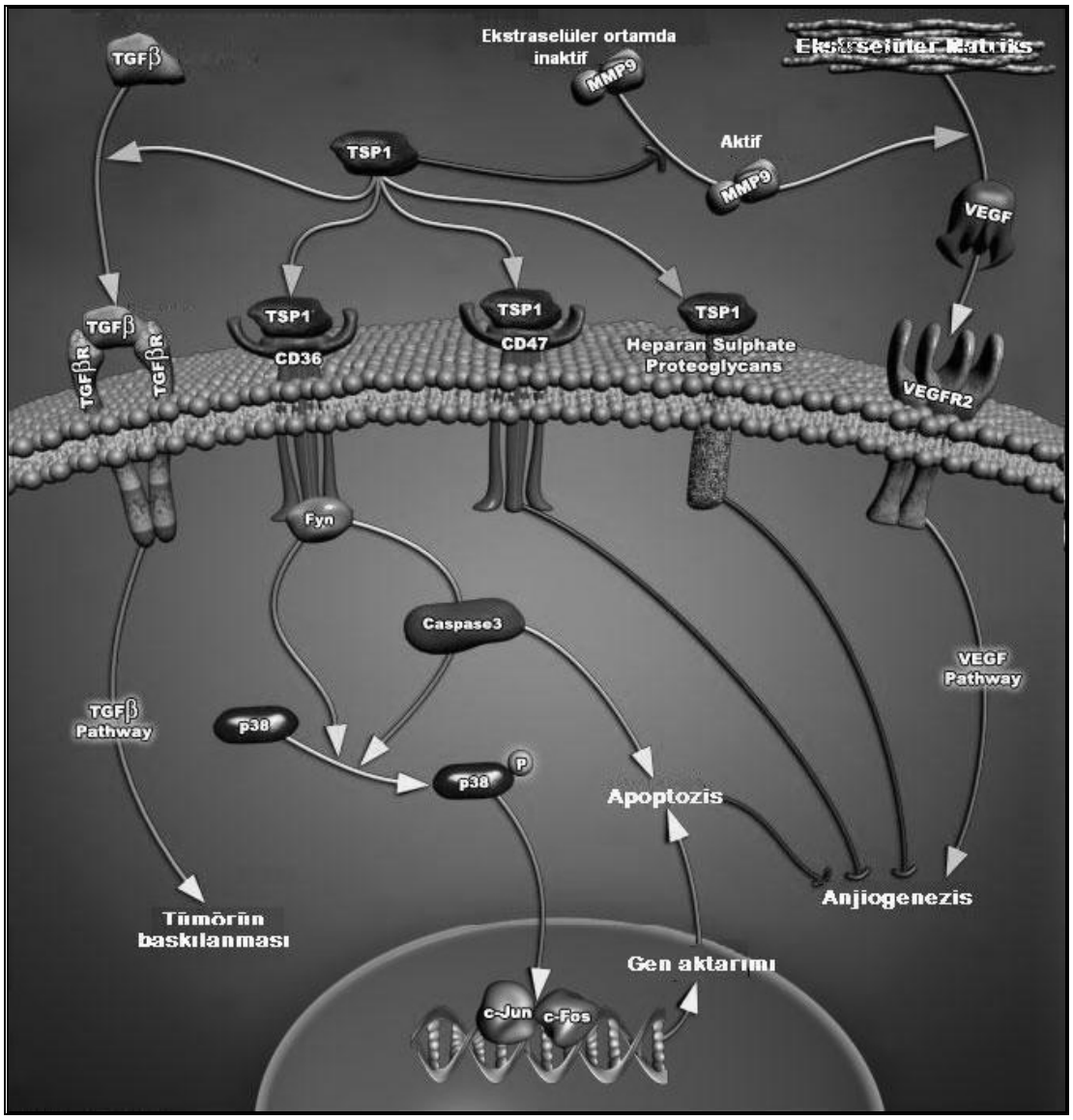
1.3.3.5. Interlökin-2

Vücudun doğal olarak sentezlediği sitokinler anti-tümör tedavide önemli yer tutmaktadır. IL-2 sitokininin çok kısa biyolojik yarı-ömründen dolayı tümörojenik etki göstermesi için yüksek dozda uygulanması gerekmektedir. Diğer taraftan ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımı limitlidir. Bu problemin üstesinden gelmek için gen tedavisi çalışmaları yapılmıştır (Ozgel ve Akbuğa, 2006; Akbuğa ve ark., 2004).

1.3.3.6. Trombospondin

Birçok normal hücre tarafından salgılanan heparin bağlayıcı 5 üyeli bir ekstraselüler protein ailesidir. Trombospondinin birçok farklı dokuda endotel hücrelerin çoğalmasını durdurduğu ve endotel hücreler arasında ilişkiyi engellediği gösterilmiştir. TSP-1 ve TSP-2 hipoksi ve onkogenlere modüle edilen anti-anjiogenik proteinlerdir (Fraifont ve ark., 2001; Lawler ve Detmar, 2004). Hücrede ras onkogenin aktif hale gelmesine bağlı tümör çoğalması ve apoptozisin engellendiği görülmektedir (Bonni ve ark., 1999). Buna ek olarak ras aktivasyonunun, VEGF proteinini indüklemesi ve TSP-1'i baskılaması ile dolaylı olarak anjiogenezi uyardığı ifade edilmektedir (Watnick ve ark., 2003). p53, PTEN ve Smad 4 gibi tümör baskılayıcı gen ilave edildiğinde, TSP-1'in önemli oranda attığı ifade edilmektedir (Chandrasekaran ve ark., 2000).

Naumov ve arkadaşları (2006), insan göğüs kanserinden izole edilmiş anjiogenik ve non-anjiogenik tümör hücreler üzerinde yaptığı çalışmada, anjiogenik tümör hücreleri non-anjiogenik tümör hücrelerine göre belirgin oranda TSP-1 miktarında azalmayı göstermişlerdir. 20 kat azalmayı Watnick ve arkadaşları da (2003) ifade etmektedirler. TSP-1 ilavesi ile anjiogenik hücrelerde geri dönüş ifade edilirken non-anjiogenik hücrelerde değişim gözlenmemiştir. Şekil 1.5.'de trombospondin proteinin vücut içinde gösterdiği mekanizma şematize edilmiştir.



Şekil 1.5. TSP-1 proteinin anjogenezi inhibe etme yolaklarının şematik gösterimi (http://www4.appliedbiosystems.com/tools/pathway).

Doğal anjiogenez inhibitörü olan TSP-1'in çok düşük toksisitesine ek olarak normal damarlanmaya zarar vermeden özgül olarak patolojik damarlanmaya etki etmesi, terapötik ajan olarak ilgiyi artırmaktadır (Naumov ve Folkman, 2008). Bu tez çalışmamız, daha önce gen tedavisi açısından çalışması yapılmamış olan, TSP-1 geni taşıyan taşıyıcı sistemin normal damarlanma gösteren hücrelere zarar vermeden sadece anjiogenik tümör hücrelerine özgü yanıt oluşturmayı hedeflemektedir.

1.4. Kullanılan Katyonik Polimer ve Lipitler

1.4.1. Katyonik Polimerler

1.4.1.1. Kitozan

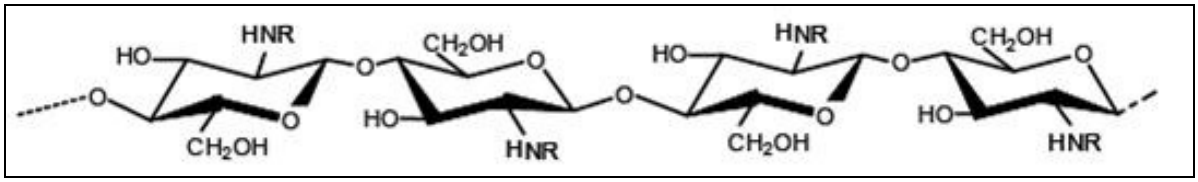
Kitozan, ilk kez 19. yüzyılın ortalarında organik asitlerde eriyebilen kitinin derişik potasyum hidroksit çözeltisinde kaynatılması ile elde edilmiştir.

Viral olmayan taşıyıcı sistem dışındaki farmasötik uygulamaları;

- Yara, yanık tedavisi (Illum, 1998),
- Diyet ve yağ emilim azaltıcı olarak (Illum, 1998),
- Antiasit, antiülser (Erden ve Çelebi, 1990),
- Antifungal ve antimikotik (Pavenetto ve ark., 1996),
- Tablet basım ajanı (Illum, 1998; Singla ve Chawla, 2001)
- Salım özellikleri değiştirilmiş sistemler (Felt ve ark., 1998; Akbuğa ve ark., 2004; Lim ve ark., 2000; Kas, 1997)
- Mukoadhesif formüller (Akıncıbay ve ark, 2007)

gibi pek çok alanda kullanıldığı için, selülozdan sonra en çok kullanılan doğal polisakkarittir (Kas, 1997; Singla ve Chawla, 2001)

Hidrofilik, doğrusal ve katyonik biyopolimer olan kitozan, □(1,4) 2-amino-2deoksi-D-glukoz (Glukozamin; D-birim) ve □(1,4) 2-asetamido-2deoksi-D-glukoz (N-asetilglukozamin; A-birim) yapılarını rastgele olarak içeren hetero-polisakkarittir (Şekil 1.6.). Kitinin alkali ortamda aminoasetil grubunun hidrolize edilmesiyle elde edilmektedir (Varum ve ark., 1991).



Şekil 1.6. Kitozanın kimyasal yapısı. Asetile edilmiş (A birimi; R:$COCH_3$) ve asetile edilmemiş (D birimi; R:H) grupların kombinasyonları ile oluşmaktadır.

D-biriminin miktar olarak ifadesi, yapının deasetilasyon derecesini vermektedir. Deasetilasyon derecesinden bağımsız olarak, kitozanın nötr ve asidik çözeltilerinde polikatyonik özelliğini veren, D-biriminindeki primer amino grubunun pKa değeri 6.5 olarak bildirilmektedir (Anthonsen ve Smidsrod, 1995). Kitozanın yapısı iki şekilde işlenebilmektedir. Deasetilasyon derecesinin (D ve A birimlerinin molar konsantrasyonu) değiştirilmesi veya zincir uzunluğunun hidrolizis (Varum ve ark., 1991), enzimatik yıkım ve nitrik asit yıkımı (Tommeraas ve ark., 2001) ile molekül ağırlığının değiştirilmesi olarak işlenebilmektedir.

Kitosanın katyonik özelliklerinin yanında biyogeçimli olması ve en önemlisi güvenli toksik profili nedeniyle, gen taşıyıcı sistemler için ilgi çekici bir alternatif olmuştur. DNA taşıyıcısı olarak DNA ile sıkı bir yapı oluşturduğu ilk olarak Mumper ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Mao ve ark, 2001). Oluşan yapının DNA'yı nükleazların yıkımından koruduğu gösterilmiştir (Mao ve ark., 2001; Lee ve ark., 2001; Bozkır ve Saka, 2004a). Hücre kültürü çalışmalarında kitozanın, PLL (Bozkır ve Saka, 2004b) ve PEI (Lee ve ark., 2001) formüllerine göre daha yüksek gen aktarım etkinliği ve daha düşük toksik cevap oluşturduğu gösterilmiştir. Kitozan her ne kadar toksik olmayan polimer gibi düşünülse de, Hoggard ve çalışma gurubu (2001) yüksek molekül ağırlığına sahip kitozanın doza bağlı toksik yanıt oluşturduğunu ifade etmektedirler. Aynı grup molekül ağırlığının düşmesi ile toksik etkinin ortadan kalktığını söylemektedir. Molekül ağırlığına bağlı olarak, DNA'yı bağlama ve yükleme etkinliği, hücrelere gen aktarım etkinliği gibi parametreleri doğrudan etkilediği bulgularla gösterilmiştir (Ishii ve ark., 2001; Mao ve ark., 2001). Kitozanın deasetilasyon derecesinin de gen aktarım etkinliği üzerinde major bir etkisinin olduğu ilk defa çalışmamız tarafından ortaya konmuştur (Bozkır ve Saka, 2004a).

DNA:kitozan komplekslerinin hücresel alımı, endositozis yoluyla gerçekleşmektedir (Ishii ve ark., 2001; Liu ve ark., 2002). Ishii ve çalışma grubu (2001) DNA'nın endozomlardan kaçışını işaret etmişlerdir. Farklı mekanizmalar, farklı araştırmacılar tarafından telafuz edilmektedir. Bazıları, PEI-DNA sistemi için Boussif'in varsayımı olan "proton sünger" etkisi ile açıklarken, Hoggard ve

arkadaşları (2001) gibi araştırmacılar ise polimer yıkımına bağlı olarak endozomlar içinde osmolaritenin artışına bağlı kaçışın gerçekleştiğini öne sürmektedirler. Bu savlarını, PEI ve kitozan gen aktarım kinetiklerindeki farklılıklara dayandırmaktadırlar.

Kitozanın üzerinde yapılan modifikasyonlar, primer amin grubu üzerinden gerçekleşmektedir. Yapının dallanmasına bağlı olarak gen aktarım etkinliğinin arttığı ifade edilmektedir (Gao ve ark., 2003). Benzer sonuçlar kuaterner amin grubu içeren trimetillenmiş kitozan araştırmalarından da elde edilmiştir (Thanou ve ark., 2002). Ayrıca gen tedavisinde verimi arttırmak için deoksikolik asit, galaktoz ilavesi gibi modifikasyonlar yapılmıştır (Gao ve ark., 2003; Kim ve ark., 2001). Polietilen glikol, kitozanın çözünürlüğünü arttırmak için kullanılmış (Sugimoto ve ark., 1998; Chung ve ark., 2006) ama gen taşıyıcı olarak henüz düşünülmemiş bir modifikasyondur. PEG ilavesi ile yükleme kapasitesinde oluşacak olası kaybı, biyolojik yarı ömrünün uzaması ve endozomal kaçışta yaratacağı olumlu etki ile telafi edeceği ve gen aktarım etkinliğinin artacağı düşünülmektedir.

1.4.1.2. Polietilenimine (PEI)

Yüksek oranda katyonik yükü bulunan ve etkin gen aktarımı sağlayan bir polimerdir (Bousiff ve ark., 1995; Gebhart ve Kabanov, 2001). Endozomal kaçış mekanizması üzerinde oldukça fazla tartışılmıştır. PEI poliplekslerinin yüksek verim göstermesi, endozom veya lizozom gibi asidik pH'da (pH 4-6), proton tutabilme özelliğinden kaynaklanmaktadır. Fizyolojik pH'da PEI'in içerdiği primer, sekonder ve tersiyer amino gruplarının, sadece %15 azot grubu pDNA ile etkileşerek (proton kazanarak) poliplekslerı oluşturur. Oluşan kompleks yapı içerisinde protonlanmaya müsait amin grubu bulunmaktadır. pH değerinin düştüğü endozom veya lizozom içerisine girdiğinde, PEI'nin tamponlama kapasitesi "proton süngeri" şeklinde davranmaktadır. "Proton sünger etkisi" adı verilen bu işlem sayesinde polipleks hücre sitozolüne salınmaktadır. Proton yakalama kapasitesi, hücreyi endozom veya lizozom içerisine proton pompalamasına zorlamaktadır. Endozom hücresi içerisine

giren H^+ iyonlarına eşit sayıda klorür iyonları ve su da eşlik eder. Eşlik eden klorür ve su, vezikülü patlatıp, içeriğini sitozole bırakana kadar şişmesini sağlamaktadır. (Remy ve ark., 1998; Bousiff ve ark., 1995; Kichler ve ark., 2001; Akinc ve ark., 2005). Polipleksin kaçışı uygulamadan 4 saat sonra oldukça hızlı gelişmektedir (Kichler ve ark., 2001).

PAMAM dendrimerleri de yüksek tamponlama kapasitesine sahiptir. Bazı hayvan modellerinde PEI'nin etkisine yaklaşırken, genelde gen aktarım etkinliği daha düşüktür. Godbey adlı araştırmacı (2000) farklı bir hipotez sunmaktadır. PEI üzerindeki amin gruplarının protonlanması ile oluşan iyonik itme kuvveti PEI'nin uzamasını ve dolayısıyla uzayan PEI endozom membranını zorlayarak zarar görmesini sağlamaktadır. Polipleks ile transfer edilen hücrelerin lizozomal pH'sı ile transfer edilmeyen hücrelerinki arasında fark bulunamaması bu teoriyi desteklemektedir.

PEI polipleksi sitozole çıktıktan sonra hücre çekirdeğine kadar pDNA'yı taşıyarak sitozolik DNase yıkımından korumaktadır. Lipopleksler ise sitozole çıkınca pDNA'yı ortama salmaktadır (Pollard ve ark, 2001). Çekirdek zarı son bariyer olarak polipleksin karşısına çıkmaktadır. Buraya kadar pDNA taşıyan polipleks, çekirdek içine pDNA'yı salması gerekmektedir. Hücre bölünürken, çekirdek içine moleküllerin girmesi kolaydır, ama durgun fazda geçişin ve entegrasyonun mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Direkt çekirdek içerisine verilen taşıyıcı sistemler kıyaslandığında PLL, PEI türevlerine üstünlük göstermektedir (Schaffer ve ark., 2000). Kemirgen hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, akciğer metastazlarında (Densmore, 2003) ve kistik fibroz (Wiseman ve ark., 2003) hastalıklarında gen taşıyıcı sistem olarak başarılar göstermiştir.

Bizim çalışmamıza yön ve cesaret veren en önemli araştırma Ohana ve arkadaşları (2004, 2005) tarafından gerçekleştirilmiştir. 2005 yılında terapötik gen taşıyan ilk polimerik vektör formülasyonu klinik olarak uygulanmıştır. Difteri toksini sentezleyen geni içeren pDNA, PEI ile kompleksi hazırlanmış ve 56-57 yaşında mesane kanseri olan iki erkek hastaya transüretel sonda vasıtasıyla aktarılmıştır.

Herhangi bir yan etki gözlenmeden, tümor boyutunda %75 oranında küçülme saptanmıştır.

PEI'nin en büyük problemi toksik etkisidir (Florea ve ark., 2002). Toksik etki, molekül ağırlığı küçüldükçe azalma eğilimi göstermektedir. Gen aktarım etkinliği de molekül ağırlığı ile doğru orantılı gerçekleşmektedir. Ahn adlı araştırmacı (2002) yüksek gen aktarım etkinliğine sahip kabul edilebilir toksik etkisi olan 25 kDa ağırlığındaki PEI'yi en uygun seçenek olarak göstermiştir. Transferin, galaktose, polietilen glikol içeren PEI türevlerinin yüksek gen aktarım etkinliğine ek olarak daha düşük sitotoksisite gösterdiği bildirilmektedir (Kursa ve ark., 2003; Sagara ve Kim, 2002; Thomas ve Klibanov, 2002; Saka ve Bozkır, 2008).

Genel olarak PEI poliplekseleri, lipopleks formülasyonlarına göre, daha az toksik (Gebhart ve Kabanov, 2001) ve daha etkin gen aktarımını in vitro ortamda (Gebhart ve Kabanov, 2001) ve in vivo ortamda (Bragonzi ve ark., 2000; Wiseman ve ark., 2003) sağlamaktadır. Bu nedenle PEI poliplekseleri, altın standart olarak tanımlanır.

Viral olmayan gen tedavisi ile ilgili aktarılan bilgileri özetleyecek olursak; ideal vektörün kimyasal özelliklerinin çok iyi tanımlanmasının yanı sıra;

- pDNA ile küçük boyutlarda kompleks oluşturma kapasitesi bulunması (doku dağılımı ve endositozis ile alımına olanak sağlaması için),
- pDNA'nın endozomal kaçışını sağlayacak endoosmolitik özelliklere sahip olması,
- Çekirdek içine etkin olarak pDNA'yı taşıması,
- Biyolojik ortamla geçimli olması,
- Büyük çaplı üretim için, sentez ve saflaştırma işlemlerinin kolay olması,
- Üzerinde hücre dışı veya hücre içi hedefleme yapmak için gerekli ligandların bağlanacağı fonksiyonel grupları taşıması,

gerekmektedir. PEI sayılan beş maddeye uygunluk gösterse de, zayıf noktası olarak görülen biyogeçimlilik problemi araştırmacıları pDNA ile kompleks oluşturacak, daha etkin ve biyogeçimli katyonik polimerlere yöneltmektedir. Bu nedenle

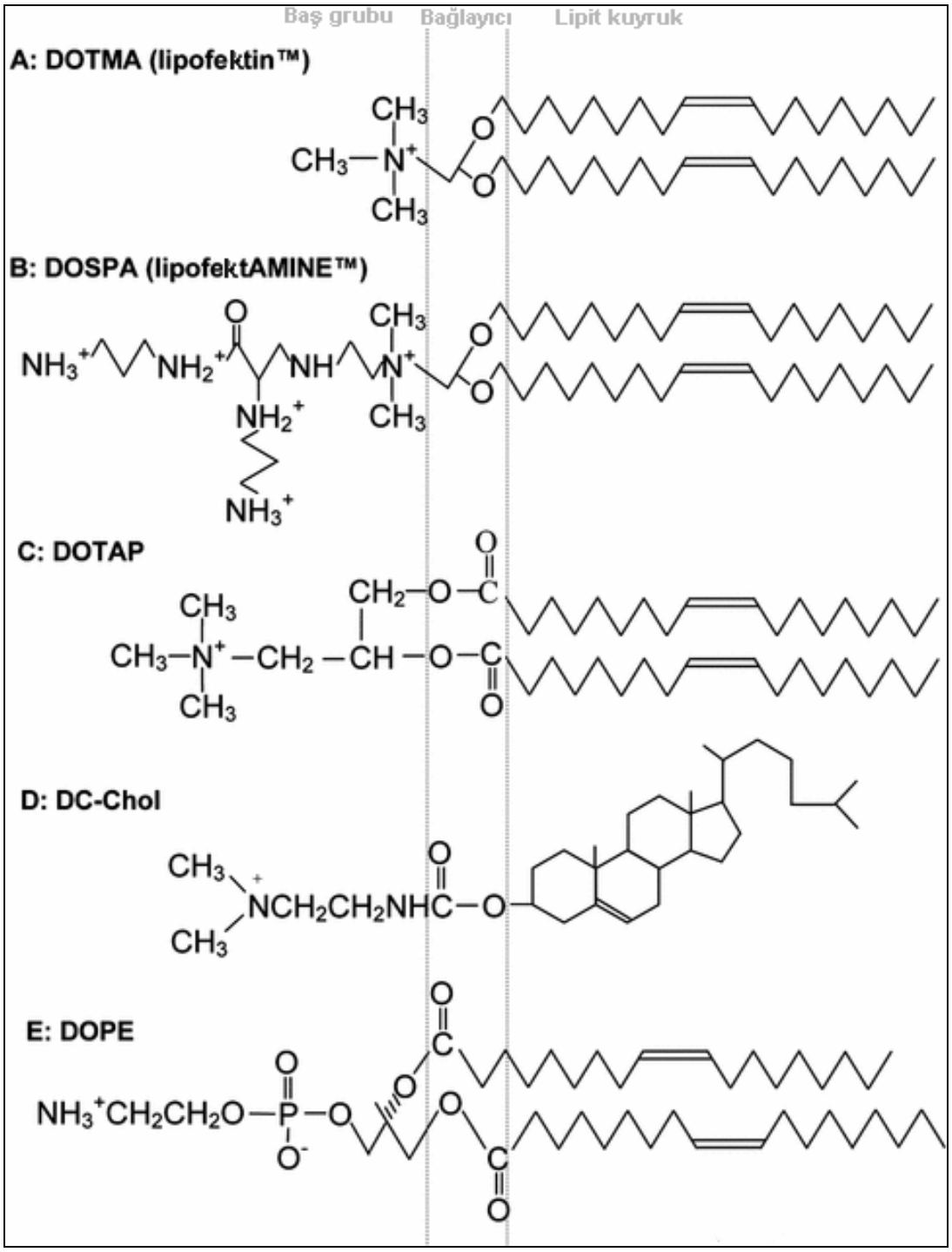
çalışmamızda, doğal polimer olan ultra saflaştırılmış kitozan, PEI'e alternatif olarak araştırılmıştır.

1.4.2. Katyonik Lipitler

Katyonik lipitlerin, yan zincirlerindeki pozitif yük ile DNA etkileşerek lipozom formülleri elde edilmiştir. Lipozomların hidrofobik grubu ile hücre zarının etkileşmeye gireceği düşünülerek, tasarlanmışlardır. Gen tedavisi amacı ile kullanılan lipozomların net yükü pozitif olmalıdır (Sternberg ve ak., 1994). Gen aktarımı için tasarlanmış katyonik lipozomlar, pozitif yüklü lipit yapının yanında yüksüz yardımcı bir lipit de içermektedir.

Lipofektin ticarı adıyla DOTMA/DOPE lipitlerini içeren formül katyonik lipozom olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Gustafsson ve ark, 1995). Ayrıca, bu formülün pozitif yükünü artırmak amacıyla, Lipofektamin adı ile bilinen, DOTMA lipitine spermin grubunun eklendiği DOSPA ile DOSPA/DOPE formülünün toksik etkilerinden bahsedilmektedir (Gilbert ve ark., 2008).

Araştırmamızda, katyonik grup ile lipit grubu ester bağıyla bağlanarak toksik etkisi azaltılmış DOTAP ile DOPE veya DC-Chol lipozom formülasyonları ve DC-Chol/DOPE lipozom formülasyonu üzerinde çalışılmıştır. Bu bölümde adı geçen lipitlerin kimyasal yapıları Şekil 1.7.'de verilmektedir.



Şekil 1.7.: Lipitlerin moleküler yapıları. A: Dioleiloksipropil trimetilammonyum klorür, B: Dioleiloksi sperminkarboksiamidoetil dimetil propanamonyum trifluoroasetat, C: 1,2-bis(oleoiloksi)-3-(trimethilammonio)propan,
D: Dimetilaminoethan karbomil kolesterol, E: Dioleilfosfatidilethanolamin .

1.4.3. Polietilen Glikol (PEG)

Polikatyon-nükleik asit kompleksleri katyonik lipit (lipopleks) veya katyonik polimer (polipleks) formülleri in-vitro ortamda incelenmek üzere sıkça hazırlanmıştır. Hazırlanan formüllerin yüzeyi pozitif yüklüdür ve fizyolojik tuz konsantrasyonunda (150 mM) ve/veya serum ortamında agregat oluştururlar. Hazırlanan formüllerin in vivo uygulanabilmesi için tuz stabilizasyonunun sağlanması ve/veya serum proteinleri ile etkileşmesinin önlenmesi gerekmektedir. Biyolojik yarı ömrü artıracak olan bu modifikasyon katyonik polimerin nükleik asit ile muamelesinden önce (Kursa ve ark., 2003) veya partiküler sistem hazırlandıktan sonra (Ogris ve ark., 1999) yapılabilmektedir.

Polietilen glikol (PEG) biyolojik yıkıma uğratacak yapılar tarafından görünmez partikül yaratmada sıkça kullanılan kaplama materyalidir (Peppas ve Blanchette, 2004; Ahsan ve ark., 2002). Biyolojik içerik ile partikülün etkileşmesini önlemek için dış yüzeyine PEG zincirleri ilavesi ile stabil partiküller hazırlanabileceği ifade edilmiştir (Betancourt ve ark., 2008). PEG zincirleri fiziksel olarak yüzeye adsorbe edilebileceği gibi kimyasal olarak kovalen bağlarla da yüzeye dahil edilebilir. Her iki koşulda da hidrofilik bir bariyer oluşturarak kan serumlarında bulunan opsoninlerle etkileşimi önlenmiş olur. Böylece partiküller kamufle edilmiş olur ve makrofajlar tarafından tanınamazlar (Owens ve Peppas, 2006; Betancourt ve ark., 2008). Adsorbe edilmiş PEG'in en büyük dezavantajı, PEGlenmiş kısımın zamanla ayrışması ve arkasında bıraktığı boşlukların opsoninlerle doldurularak, hızlı elimine olmasıdır (Owens ve Peppas, 2006). Bu nedenle çalışmamızda dış yüzeyin ve polimerin kendisine PEG kimyasal olarak bağlanmıştır.

Sugimoto ve arkadaşları (1998), suda çözünürlüğü olmayan kitin ve kitozan türevlerinin, hidrofilik özelliğini artırmak amacıyla PEG ile konjugatlarını hazırlamıştır. PEG'in molekül ağırlığı arttıkça, kitozan konjugatlarının suda çözünürlüklerinin arttığını ifade etmektedirler.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Materyal Listeleri

Tüm kimyasallar aksi belirtilmediği sürece herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır. Arıtılmış su olarak ise sterilize edilmiş, bidistile su kullanılmıştır.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-merkaptoetanol	Sigma
%0.25 Tripsin-EDTA	Sigma
Agaroz (düşük erime sıcaklığına sahip)	Fluka
Borik asit	Merck
Bromfenol mavisi	Sigma
BSA (Sığır serum albümin)	Biochrom
DC-Chol	Avanti Polar Lipids
Detöro hidroklorik asit	Sigma
Detöro kloroform	Sigma
Detöro su	Sigma
Dibütil dilaurat	Fluka
Dietil eter	Merck
Dimetil sülfoksit	Sigma
Dimetil tiyazolil difeniltetrazolyum bromid (MTT)	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı)	Biochrom
DOPE	Avanti Polar Lipids
DOTAP	Avanti Polar Lipids
Etanol	Merck

Etidyum bromür	Sigma
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Merck
FBS (Fetal sığır serumu)	Biochrom
Genetisin	Invitrogen
Glasiyel asetik asit	Merck
Gliserol	BDH Chemicals
Glukoz	Merck
Iyodoasetik asit	Sigma
Iyodoasetik asit	Sigma
Kitozan (Chitech M-010)	Medicarb
Kitozan (LMW)	Fluka
Kitozan (Protasan UP CL 113)	Novamatrix
Kloroform	Merck
L-glutamin	Biochrom
Magnezyum asetat	Merck
Magnezyum klorür	Merck
Penisilin	Biochrom
Polietilen glikol	Merck
Polietilenimin	Fluka
Potasyum asetat	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Potasyum klorür	Merck
Sitrik asit	Merck
Sodyum asetat trihidrat	Merck
Sodyum hidroksit	Sigma
Sodyum klorür	Merck
Sodyum piruvat	Biochrom
Strepsilin	Biochrom
Tris.HCl	Sigma
Trizma Baz	Sigma

2.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler

Anti-V5-FITC	Invitrogen
Anti-trombospondin antikor (fare kaynaklı)	Sigma
DNA Molekül Ağırlık Standartları	Sigma, New England Labs
DNA polimeraz (kit içerisinde)	Invitrogen
DNaz I	Sigma
Hind III kısıtlayıcı enzim	Fermentas
Kitozanaz enzimi	Sigma
MCF-7 hücre hattı	ATCC
Non-esansiyel aminoasitler	Biochrom
pBluescriptR (Klon ID:5266513)	ATCC
pcDNA□3.1/V5-His-TOPO (kit içerisinde)	Invitrogen
pSV-□-Galaktosidaz Kontrol Vektör	Promega
TSP-1A ve TSP-1B primer dizilimleri	Alpha DNA
Xho I kısıtlayıcı enzim	Fermentas

2.1.3. Kullanılan Malzemeler

0.22 µm ve 0.45 µm filtreler	Sartorius
0.22 µm ve 0.45 µm şırınga tipi filtreler	Sartorius
DNaz ve RNaz içermeyen ephendorf tüpler	USA Scientific
Diyaliz torbaları	Sigma
Hücre kültür flaskları	Greiner
Pasteur pipet	IsoLab
Pipet uçları	Dateks
TOPO□TA ekspresyon kiti	Invitrogen
Vivaspin 20□ (10000 MWCO)	Sartorius
Wizard□ Plus Maxipreps DNA Saflandırma Sistemi	Promega

2.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

CO_2 inkübatorü	Nuaine DH Autoflow CO_2 Air-Jacket, Thermo 31/11
Çalkalayıcı su banyosu	GFL 1083
Çoklu manyetik karıştırcı	IKA RT10
Elektroforez güç kaynağı	EC Apparatus Corporation
Etüv	Heraeus
Geçirmeli elektron mikroskobu	LEO 906 E
Jel Elektroforez sistemleri	Thermo
Laminar Flow	Thermo-Holten Maxi Safe 2010 Nüve MR120
Lipozom ekstruder	Avestin
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 CSC
Manyetik karıştırıcı	IKA RH basic 2
Mikrosantrifüj	Hermle 2-160M
Mikroskop hücre sayımı	Nikon Eclipse TS100
Optik mikroskop	Leica DM 4000B
Partikül ve zeta potansiyel ölçer	Malvern Zetasizer Nano ZS
PCR Termocycler	Real Time QRT-PCR
Rotavapor	Büchi R-200
Rotavapor soğutucusu	Wise Circu Fuzzy Control System
Santrifüj	Sigma 2-16P
Spektrofotometre	Molecular Devices Spectra Max190
Su banyosu	Techne TE-8D (besi yeri çözücüsü) Büchi B-490 (ratovapor ısıtıcısı)
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC30
Vorteks karıştırıcı	IKA Genius 3

2.2. Yöntem ve Deneyler

2.2.1. Terapötik Gen

Tedavi amaçlı gen üzerinde yapılan çalışmalar bu bölümde irdelenmiştir.

2.2.1.1. Terapötik Genin Eldesi

Kanser tedavisinde, anjiogenez basamağını baskılamak için uygulanan trombospondin geni için, gen bankası incelendiğinde (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene) genellikle memeli hayvanlardan elde edilen trombospondin gen dizilimleri ile karşılaşılmıştır. Araştırmamız için tür farklılıklarından oluşabilecek problemlerin önüne geçmek amacı ile insan kaynaklı reprolisin tipi metaloproteaz ile trombospondin tip 1 motifi içeren gen dizilimi seçilmiştir (cDNA klonuclone MGC:32979, IMAGE Klon ID:5266513. vektör: pBluescriptR). Trombospondin içeren pBluescriptR vektörünün gen dizilimi Şekil 2.1'de verilmiştir.

Terapötik geni saklamak amacı ile tasarlanmış pBluescriptR vektörü, SV40 bölgesi içermediği için, yüksek verim ile çoğalmaya ve hücre içerisine aktarmaya uygun değildir. Bu nedenle terapötik geni taşıyabilecek ve aktarıldığı hücre içerisinde yüksek kopya sayısına ulaşabilecek bir plazmide aktarılması gerekmektedir.

Trombospondin genini taşıyan plazmid, 5' ucundan Hind III ve 3' ucundan Xho I kısıtlayıcı endonükleazlar tarafından tanınan kesim bölgelerini taşımaktadır. pCR3.1 plazmidin sadece çoklu klonlama bölgesince aynı endonükleazlar tarafından tanınmaktadır. Her iki kısıtlayıcı enzim taşıyıcı plazmidi sadece bir bölgede

tanımaktadır. Böylece PCR ürünleri için aynı enzim tarafından aynı dizilime ait yapışkan uçlu hale getirilmiştir.

GCACTCGCTG GAAAGCGGCT CCGAGCCAGG GGCTATTGCA AAGCCAGGGT GCGCTACCGG ACGGAGAGGG 70
GAGAGCCCTG AGCAGAGTGA GCAACATCGC AGCCAAGGCG GAGGCCGAAG AGGGGCGCCA GGCACCAATC 140
TCCGCGTTGC CTCAGCCCCG GAGGCGCCCC AGAGCGCTTC TTGTCCCAGC AGAGCCACTC TGCCTGCGCC 210
TGCCTCTCAG TGTCTCCAAC TTTGCGCTGG AAGAAAAACT TCCCGCGCGC CGGCAGAACT GCAGCGCCTC 280
CTCTTAGTGA CTCCGGGAGC TTCGGCTGTA GCCGGCTCTG CGCGCCCTTC CAACGAATAA TAGAAATTGT 350
TAATTTTAAC AATCCAGAGC AGGCCAACGA GGCTTTGCTC TCCCGACCCG AACTAAAGCT CCCTCGCTCC 420
GTGCGCTGCT ACGAGCGGTG TCTCCTGGGG CTCCA**ATGCA GCGAGCTGTG CCCGAGGGGT TCGAAGGGCG** 490
CAAGCTGGGC AGCGACATGG GGAACGCGGA GCGGGCTCCG GGGTCTCGGA GCTTTGGGCC CGTACCCACG 560
CTGCTGCTGC TCGCCGCGGC GCTACTGGCC GTGTCGGACG CACTCGGGCG CCCCTCCGAG GAGGACGAGG 630
AGCTAGTGGT GCCGGAGCTG GAGCGCGCCC CGGGACACGC GACCACGCGC CTCCGCCTGC ACGCCTTTGA 700
CCAGCAGCTG GATCTGGAGC TGCGGCCCGA CAGCAGCTTT TTGGCGCCCG GCTTCACGCT CCAGAACGTG 770
GGGCGCAAAT CCGGGTCCGA GACGCCGCTT CCGGAAACCG ACCTGGCGCA CTGCTTCTAC TCCGGCACCG 840
TGAATGGCGA TCCCAGCTCG GCTGCCGCCC TCAGCCTCTG CGAGGGCGTG CGCGGCGCCT TCTACCTGCT 910
GGGGGAGGCG TATTTCATCC AGCCGCTGCC CGCCGCCAGC GAGCGCCTCG CCACCGCCGC CCCAGGGGAG 980
AAGCCGCCGG CACCACTACA GTTCCACCTC CTGCGGCGGA ATCGGCAGGG CGACGTAGGC GGCACGTGCG 1050
GGGTCGTGGA CGACGAGCCC CGGCCGACTG GGAAAGCGGA GACCGAAGAC GAGGACGAAG GGACTGAGGG 1120
CGAGGACGAA GGGcCTCAGT GGTCGCCGCA GGACCCGGCA CTGCAAGGCG TAGGACAGCC CACAGGAACT 1190
GGAAGCATAA GAAAGAAGCG ATTTGTGTCC AGTCACCGCT ATGTGGAAAC CATGCTTGTG GCAGACCAGT 1260
CGATGGCAGA ATTCCACGGC AGTGGTCTAA AGCATTACCT TCTCACGTTG TTTTCGGTGG CAGCCAGATT 1330
GTACAAACAC CCCAGCATTC GTAATTCAGT TAGCCTGGTG GTGGTGAAGA TCTTGGTCAT CCACGATGAA 1400
CAGAAGGGGC CGGAAGTGAC CTCCAATGCT GCCCTCACTC TGCGGAACTT TTGCAACTGG CAGAAGCAGC 1470
ACAACCCACC CAGTGACCGG GATGCAGAGC ACTATGACAC AGCAATTCTT TTCACCAGAC AGGACTTGTG 1540
TGGGTCCCAG ACATGTGATA CTCTTGGGAT GGCTGATGTT GGAACTGTGT GTGATCCGAG CAGAAGCTGC 1610
TCCGTCATAG AAGATGATGG TTTACAAGCT GCCTTCACCA CAGCCCATGA ATTAGGCCAC GTGTTTAACA 1680
TGCCACATGA TGATGCAAAG CAGTGTGCCA GCCTTAATGG TGTGAACCAG GATTCCCACA TGATGGCGTC 1750
AATGCTTTCC AACCTGGACC ACAGCCAGCC TTGGTCTCCT TGCAGTGCCT ACATGATTAC ATCATTTCTG 1820
GATAATGGTC ATGGGGAATG TTTGATGGAC AAGCCTCAGA ATCCCATACA GCTCCCAGGC GATCTCCCTG 1890
GCACCTCGTA CGATGCCAAC CGGCAGTGCC AGTTTACATT TGGGGAGGAC TCCAAACACT GCCCTGATGC 1960
AGCCAGCACA TGTAGCACCT TGTGGTGTAC CGGCACCTCT GGTGGGGTGC TGGTGTGTCA AACCAAACAC 2030
TTCCCGTGGG CGGATGGCAC CAGCTGTGGA GAAGGGAAAT GGTGTATCAA CGGCAAGTGT GTGAACAAAA 2100
CCGACAGAAA GCATTTTGAT ACGCCTTTTC ATGGAAGCTG GGGAATGTGG GGGCCTTGGG GAGACTGTTC 2170
GAGAACGTGC GGTGGAGGAG TCCAGTACAC GATGAGGGAA TGTGACAACC CAGTCCCAAA GAATGGAGGG 2240
AAGTACTGTG AAGGCAAACG AGTGCGCTAC AGATCCTGTA ACCTTGAGGA CTGTCCAGAC AATAATGGAA 2310
AAACCTTTAG AGAGGAACAA TGTGAAGCAC ACAACGAGTT TTCAAAAGCT TCCTTTGGGA GTGGGCCTGC 2380
GGTGGAATGG ATTCCCAAGT ACGCTGGCGT CTCACCAAAG GACAGGTGCA AGCTCATCTG CCAAGCCAAA 2450
GGCATTGGCT ACTTCTTCGT TTTGCAGCCC AAGGTTGTAG ATGGTACTCC ATGTAGCACA GATTCCACCT 2520
CTGTCTGTGT GCAAGGACAG TGTGTAAAAG CTGGTTGTGA TCGCATCATA GACTCCAAAA AGAAGTTTGA 2590
TAAATGTGGT GTTTGCGGGG GAAATGGATC TACTTGTAAA AAAATATCAG GATCAGTTAC TAGTGCAAAA 2660
CCTGGATATC ATGATATCAT CACAATTCCA ACTGGAGCTC CCAACATCGA AGTGAAACAG CGGAACCAGA 2730
GGGGATCCAG GAACAATGGC AGCTTTCTTG CCATCAAAGC TGCTGATGGC ACATATATTC TTAATGGTGA 2800
CTACACTTTG TCCACCTTAG AGCAAGACAT TATGTACAAA GGTGTTGTCT TGAGGTACAG CGGCTCCTCT 2870
GCGGCATTGG AAAGAATTCG CAGCTTTAGC CCTCTCAAAG AGCCCTTGAC CATCCAGGTT CTTACTGTGG 2940
GCAATGCCCT TCGACCTAAA ATTAAATACA CCTACTTCGT AAAGAAGAAG AAGGAATCTT TCAATGCTAT 3010
CCCCACTTTT TCAGCATGGG TCATTGAAGA GTGGGGCGAA TGTTCTAAGT CATGTGAATT GGGTTGGCAG 3080
AGAAGACTGG TAGAATGCCG AGACATTAAT GGACAGCCTG CTTCCGAGTG TGCAAAGGAA GTGAAGCCAG 3150
CCAGCACCAG ACCTTGTGCA GACCATCCCT GCCCCCAGTG GCAGCTGGGG GAGTGGTCAT CATGTTCTAA 3220
GACCTGTGGG AAGGGTTACA AAAAAAGAAG CTTGAAGTGT CTGTCCCATG ATGGAGGGGT GTTATCTCAT 3290
GAGAGCTGTG ATCCTTTAAA GAAACCTAAA CATTTCATAG ACTTTTGCAC AATGGCAGAA TGCAGTTAAG 3360
TGGTTTAAGT GGTGTTAGCT TTGAGGGCAA GGCAAAGTGA GGAAGGGCTG GTGCAGGGAA AGCAAGAAGG 3430
CTGGAGGGAT CCAGCGTATC TTGCCAGTAA CCAGTGAGGT GTATCAGTAA GGTGGGATTA TGGGGGTAGA 3500
TAGAAAAGGA GTTGAATCAT CAGAGTAAAC TGCCAGTTGC AAATTTGATA GGATAGTTAG TGAGGATTAT 3570
TAACCTCTGA GCAGTGATAT AGCATAATAA AGCCCCGGGC ATTATTATTA TTATTTCTTT TGTTACATCT 3640
ATTACAAGTT TAGAAAAAAC AAAGCAATTG TCAAAAAAAG TTAGAACTAT TACAACCCCT GTTTCCTGGT 3710
ACTTATCAAA TACTTAGTAT CATGGGGGTT GGGAAATGAA AAGTAGGAGA AAAGTGAGAT TTTACTAAGA 3780
CCTGTTTTAC TTTACCTCAC TAACAATGGG GGGAGAAAGG AGTACAAATA GGATCTTTGA CCAGCACTGT 3850
TTATGGCTGC TATGGTTTCA GAGAATGTTT ATACATTATT TCTACCGAGA ATTAAAACTT CAGATTGTTC 3920
AACATGAGAG AAAGGCTCAG CAACGTGAAA TAACGCAAAT GGCTTCCTCT TTCCTTTTTT GGACCATCTC 3990
AGTCTTTATT TGTGTAATTC ATTTTGAGGA AAAAACAACT CCATGTATTT ATTCAAGTGC ATTAAAGTCT 4060
ACAATGGAAA AAAAGCAGTG AAGCATTAGA TGCTGGTAAA AGCTAGAGGA GACACAATGA GCTTAGTACC 4130
TCCAACTTCC TTTCTTTCCT ACCATGTAAC CCTGCTTTGG GAATATGGAT GTAAAGAAGT AACTTGTGTC 4200
TCATGAAAAT CAGTACAATC ACACAAGGAG GATGAAACGC CGGAACAAAA ATGAGGTGTG TAGAACAGGG 4270
TCCCACAGGT TTGGGGACAT TGAGATCACT TGTCTTGTGG TGGGGAGGCT GCTGAGGGGT AGCAGGTCCA 4340
TCTCCAGCAG CTGGTCCAAC AGTCGTATCC TGGTGAATGT CTGTTCAGCT CTTCTGTGAG AATATGATTT 4410
TTTCCATATG TATATAGTAA AATATGTTAC TATAAATTAC ATGTACTTTA TAAGTATTGG TTTGGGTGTT 4480
CCTTCCAAGA AGGACTATAG TTAGTAATAA ATGCCTATAA TAACATATTT ATTTTTATAC ATTTATTTCT 4550
AATGAAAAAA ACTTTTAAAT TATATCGCTT TTGTGGAAGT GCATATAAAA TAGAGTATTT ATACAATATA 4620
TGTTACTAGA AATAAAAGAA CACTTTTGGA AAAAAAAAAA AAAAA

Şekil 2.1. pBluescriptR vektörünün gen dizilimi. Açık renk ile görülen bölgeler 3' aktarılmayan bölgeleri, koyu renkli dizilimler ise trombospondin bölgesini ifade etmektedir.

Xho I enzimi pBluescriptR vektörünün 5' ucunun C ↓ TCGAG ve 3' ucunun GAGCT ↑ C bölgesinden, Hind III enzimi ise 5' ucunun A ↓ AGCTT ve 3' ucunun TTCGA ↑ A bölgesinden kesmektedir.

Terapötik genin eldesi için kullanılacak enzimlere göre tampon seçimi gerekmektedir. Her enzime göre farklılık gösteren tamponlar, ikili enzim tamponları başlığında, tamponun yanında belirtilen internet sayfalarından seçilerek bulunmuştur.

Kısıtlayıcı enzimler 10 mM Tris-HCl tamponu içerinde aşağıdaki yapıda ve stok olarak hazırlanmıştır.
(http://www.fermentas.com/techinfo/re/5bufferplussystem.htm)
10 mM Tris-HCl (pH:8.5 ; 37℃)
10 mM Magnezyum klorür
100 mM Potasyum klorür
0.1 mg/mL BSA (Sığır serum albümini)

Kesim işleminin yapılacağı tampon (X10);
(http://www.fermentas.com/techinfo/re/5bufferplussystem.htm)
30 mM Tris-asetat
10 mM Magnezyum asetat
66 mM Potasyum asetat
0.1 mg/mL BSA

Trombospondin-1 genini elde etmek için 4 µl kesim tamponu üzerine 5 µl bidistile su ilave edilmiştir. Üzerine 10 µl pBluescriptR (0.2 µg) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Stok çözeltisi hazırlanmış Hind III (10 U/µl) ve Xho I (10 U/µl) enzimlerinden 0.5 µl ilave edilmiştir. 20 µl hacmindeki karışım 3 saat boyunca, 37°C'de tutulmuştur. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra 80°C'de 20 dakika bekletilerek kısıtlayıcı enzimler inaktif hale getirilmiştir. Elde edilen ürünün %0.8'lik agaroz jelde kontrolü yapılmıştır (60 V, 150 mA'lık elektirik akımı altında). Böylece

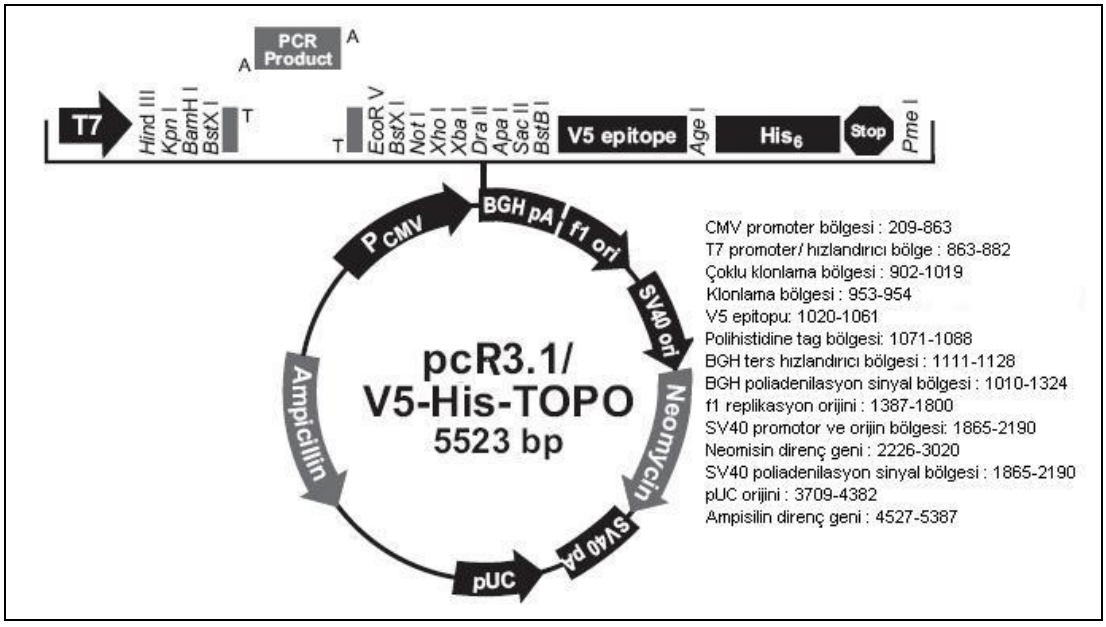
Hind III ve Xho I kesim uçlarına sahip 2221 baz çiftine sahip trombospondin geni elde edilmiştir.

2.2.1.2. Terapötik Geni Taşıyacak Plazmid'in Seçimi

pcDNA 3.1/V5-His-TOPO (pCR3.1) plazmidinin;

- PCR teknolojisi ile terapötik genin aktarımına ve pDNA'nın çoğaltılmasına uygun olması,
- 5 dakika gibi kısa bir süre içerisinde direkt ve indirekt klonlanma ile işlenebilmesi (Terapötik genimizin uzun olmasından dolayı, bizim işlem zamanımız 8 dakikaya uzamaktadır),
- Hata yüzdesinin çok düşük olması,
- Yüksek oranda ekspresyonu sağlayan CMV ilerletici (promotor) bölgesine sahip olması,
- Kolay tayin edilmesi ve hızlı saflaştırılmasını sağlayan C-terminalinde V5 bölgesine ve polihistidin (His) tag bölgesine sahip olması,
- Ampisilin ve neomisin direnç genlerini taşıması,

nedeniyle terapötik geni üzerinde taşıyabilecek, kolay teşhis edilebilecek ve yüksek kopya sayısına sahip pDNA olarak tercih edilmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. pCR3.1'in gen dizim bölgeleri ve şematik gösterimi (www.invitrogen.com)

2.2.1.3. pDNA Eldesi ve Çoğaltılması

TSP-1 geninin pBluescriptR kalıbından, pCR3.1'e aktarılması ve çoğaltılması işlemi için, PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) teknolojisinden yararlanılmıştır. pCR3.1-TSP1 plazmidi, TOPO®TA ekspresyon kiti yardımıyla elde edilmiş ve miktarı artırılmıştır.

PCR teknolojisi kısaca, bir çeşit "in vitro klonlama"dır. PCR reaksiyonu, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu), sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu - çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR döngüsü oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. Bu teknikle; bir DNA hedefini 106 ile 1012 kopya sayısına kadar çoğaltmak mümkündür.

PCR ile klonlama ve çoğaltma işlemi;

DNA kalıbı (yapışkan uçlu TSP-1 ve pCR3.1) …….. 200 ng (her biri için)
PCR Tamponu ……..…….. 2 µl
%50 PEG 4000 ……... 2 µl
Steril su ……y.m…… 18 µl
Taq Polimeraz enzimi (1 ünite/µl) ……. 2 µl

Klonlama için 20 µl hazırlanan tampon hafifçe vortekslenmiş ve PCR termal döngü cihazına aktarılmıştır. Klonlama işleminin tamamlanması için 22°C'de 1 saat bekletilmiştir. Hazırlanan pCR3.1-TSP1 vakit kaybetmeden çoğaltma işlemine tabi tutulmuştur.

50 µl'lik PCR çoğaltma reaksiyon ortamı aşağıda ifade edilen miktarda hazırlanmıştır.

DNA kalıbı (pCR3.1-TSP1) …….…… 20 ng
PCR Tamponu……. 5 µl
50 mM dNTPs …… 0.5 µl (her biri için)

Primer dizilimleri …….. 100 ng (her biri için)
Steril su ……y.m. 49 µl
Taq Polimeraz enzimi (1 ünite/µl)…….. 1 µl

Kitin içinde yer alan primerler yerine, terapötik gene özgü kodlattırdığımız primer dizilimleri kullanılmıştır. 5'→3' primer TSP-1A (sentez no:328833), 3'→5' primeri ise TSP-1B (sentez no:328834) adı ile dizdirilmiştir. Saflık derecesi yüksek olan ve 5'→3' sekansları sırası ile; GTTGCATGTGTGTGGAAGCAAC ve ACCACACTGAAGATCTGGCCAG olarak satın alınmıştır.

Elde edilen PCR ortamı PCR içerisinde aşağıda ifade edilen şartlar altında çoğaltma işlemine maruz bırakılmıştır.

Basamak	Zaman (dakika)	Sıcaklık (℃)	Devir sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	2	94	1 X
Denatürasyon	1	94	35 X
Soğutma	1	60	
Zincir uzaması	4	72	
Final kodlama	7	72	1 X

Elde edilen pDNA çözeltilerinin saflık ve konsantrasyon belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

DNA molekülü 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermekte iken DNA'nın proteinler varlığındaki maksimum absorbansı 280 nm dalga boyuna kayma göstermektedir. Spektrofotometrik olarak okunan 260 ve 280 nm'deki değerlerin oranı ile optik yoğunluk (OD) hesaplanır (Eşitlik 2.1). OD oranı 1.8 – 2.0 arasında ise saf DNA çözelti elde ettiğimizi işaret etmektedir. 1 OD'nin 50 µg/mL çift sarmal DNA'ya eşdeğer olduğu ifade edilmektedir (Sambrook ve ark, 1989; Lee ve ark., 2001). Eşitlik 2.2. kullanılarak elde edilen çözeltinin DNA konsantrasyonu µg/mL cinsinden hesaplanmaktadır. Ayrıca elde edilen ürünün 60V, 150mA akım altında %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek de saflık kontrolü de yapılmıştır.

Optik Dansite (OD) = A_{260} / A_{280}	(Eşitlik 2.1.)

C_{DNA} (μg/mL) = OD_{260} x Seyreltme faktörü x 50 (Eşitlik 2.2.)

2.2.2. Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Terapötik geni taşıyan pCR3.1-TSP1 plazmidi hücre içerisine taşıyacak taşıyıcı sistemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla katyonik özellik gösteren kitozan ve PEI içeren polimerik nanopartiküller ve lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca, hazırlanan bu formüllasyonların in vivo uygulanabilmesi için serum proteinleri ile etkileşmesinin önlenmesi amacıyla biyolojik yarı ömrünü artıracak olan PEG ile modifikasyonu yapılmıştır. Bu modifikasyon polimer üzerinden gerçekleştirildiği için PEG:polimer konjugatı ile hazırlanmış partiküller elde edilmiştir. PEG içermeyen partiküller de PEG ile muamele edilmiş ve PEG kaplı partiküller elde edilmiştir. Lipozom formülasyonlarının yapısına PEG ilavesi ile PEG içeren lipozom formülleri de hazırlanmıştır.

2.2.2.1. PEG

PEG zincirlerinin fiziksel olarak yüzeye adsorbe edilebileceği gibi kimyasal olarak kovalen bağlarla da yüzeye veya polimere dahil edilebilir. Her iki koşulda da hidrofilik bir bariyer oluşturarak kan serumlarında bulunan opsoninlerle etkileşimi önlenmiş olur. Ancak adsorbe edilmiş PEG zamanla desorbe olarak partikülün hızlı elimine olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda dış yüzeyin ve polimerin kendisine PEG'in kimyasal olarak bağlanmasını sağlayacak modifikasyonlar üzerinde durulmuştur.

2.2.2.1.1. Aktif PEG Hazırlanması

Katyonik yapının serbest amin grupları üzerinden kimyasal olarak PEG'in bağlanması için, PEG aktif bileşeni hazırlanmalıdır. Hazırlanan aktif PEG'in, kitozan ve polietilenimin ile konjugatları hazırlanmıştır. Ayrıca lipozom formülasyonları ile

PEG içermeyen PEI ve kitozan formülasyonlarının dış yüzeyine de aktif PEG ilavesi yapılarak PEGilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Dimetil sulfoksit (DMSO) ile PEG'in oksidasyonu ile PEG-aldehitleri hazırlanmıştır (Petersen ve ark., 2002) (Şekil 2.3.(a)).

- 10 gram PEG tartıldı (Mw:2000)
- Çözünmeyi kolaylaştırmak için 2 mL kloroform ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
- Hemen üzerine susuz DMSO'ten 30 mL ilave edildi.
- Sistem sıkıca kapatıldı ve 15 saat boyunca, oda ısısında, karıştırma işlemine devam edildi.
- Karışım 400 mL dietileter üzerine aktarıldı. Oluşan çökelti santrifüj (20.000g, 10 dakika) ile alındı.
- Kloroform:dietileter (1:1) çözeltisi ile iki kez yıkandı, santrifüj edildi ve kurumaya bırakıldı.

Beyaz toz olarak elde edilen aktive edilmiş PEG, kullanım anına kadar, oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.2.2.1.2. PEG-katyonik Polimer Konjugatlarının Hazırlanması

Aktive edilmiş PEG ile PEI ve kitozan konjugatları hazırlanmıştır (Şekil 2.3.).

Kitozan-PEG konjugatı;

Kitozan üzerindeki amin gruplarına proton kazandırmak için 3 farklı kitozanın pH 5.5'taki çözeltileri hazırlanmıştır. Suda çözünmeyen iki tip kitozanın, %1'lik asetik asit içerisinde çözeltileri hazırlanmıştır. Her iki çözeltide 0.22 μm'lik filtrelerden geçirilmiştir. Farmasötik kalitedeki kitozanın, diğer kitozana göre çok çabuk süzüldüğü görülmüştür. Suda çözünen kitozan ise pH 5.5'a ayarlanmış sodyum asetat tamponu içerisinde hazırlanmıştır (Şekil 2.3.(b)).

Sodyum Asetat Tamponu (pH:5.5)

(http://www.redbirdservice.com/catalog23/solutions%20A.htm)

Sodyum asetat trihidrat……..150 g

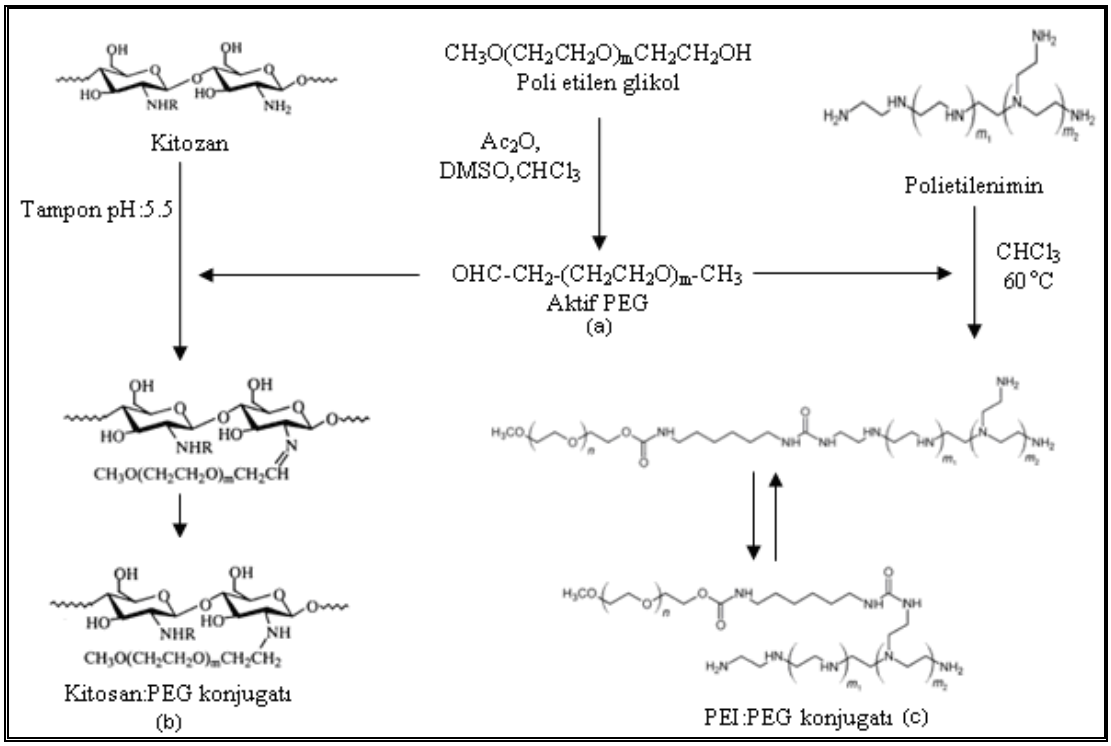
Sitrik asit ……..…15 mL

Distile su ……..……y.m…1000 g

Hazırlanan %5'lik kitozan çözeltilerine 2.75 g aktive edilmiş PEG ilave edilerek ve 15 dakika karışmaya bırakıldı. 7 mL formaldehit ilavesi ile 1 saat boyunca tekrar karıştırıldı. Sodyum hidroksit çözeltisi ile çözelti nötralize edildi. Sartorius firmasından alınan vivaspin kolonuna (Vivaspin 20 ultrafilte, 10.000 MWCO, Sartorius) aktarıldı ve 1000 g de 15 dakika santrifüj edildi. Üst kısıma aseton ilave edildi ve tekrar santrifüj edildi. Beyaz toz toplanırak kullanıma kadar oda sıcaklığında saklandı.

PEI-PEG konjugatı;

9 gram PEI ve 1 g aktive edilmiş PEG sırası ile 180 mL ve 20 mL kloroform içinde çözeltileri hazırlandı. Manyetik karıştırıcı üzerinde PEI çözeltisi üzerine PEG çözeltisi damla damla ilave edildi. 5 dakika karıştırmadan sonra, 1.2 mL (%0.6) dibütil dilaurat ilave edildi. Son karışım 16 saat boyunca 60℃'de karıştırıldı. Oluşan berrak, uçuk sarı solusyon, yüksek oranda (en az son hacmin 3 katı kadar) dietileter ile çöktürüldü. Oluşan PEI-PEG Whatman 42 filtre kağıdından süzüldü ve kurumaya bırakıldı (Şekil 2.3.(c)).



Şekil 2.3. PEG:katyonik polimer konjugatlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.

2.2.2.1.3. PEG-katyonik Polimer Konjugat Oluşumunun Belirlenmesi

Elde edilen yapıların serbest amino grup derecesini ve PEG'in bağlanma derecesini tayin etmek için H^1 nüklear magnetik rezonans (NMR) spektroskopisinden yararlanılmıştır.

PEI ve kitozan toz örneklerinin H atomu içermeyen solusyonlar içerisinde çözeltileri hazırlanmış ve H-NMR sprekturumları çekilmiştir. PEI ve PEI-PEG konjugatı için $CDCl_3$ (detöro kloroform) kullanılmıştır. Detöro kloroformun kullanılma sebebi; PEI türevlerinin çözeltisini elde etmek ve ^{1}H- NMR spektrumlarında kloroformdaki hidrojeninin çok büyük bir sinyal vererek diğer sinyalleri baskılamasını engellemektir. Kitozan ile çalışılırken ise; D_2O/DCl çözeltisi kullanılmıştır.

PEI çalışmaları için spekturumlar 26℃'de 400 BB civa basıncı altında 6402 Hz, 45° eğim ile çekilmiştir. 20 mg civarında tartılan örnek, 1 mL $CDCl_3$ içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Suda çözünen kitozan örnekleri de aynı şartlar altında 20-30 mg örnek üzerinde çalışılmıştır. Kitozanı çözmek için D_2O içerisine 1 damla %20'lik DCl/D_2O çözeltisi ilave edilmiştir. Suda çözünmeyen iki farklı kitozan için ise 20 mg örnek 0.8 mL %20'lik DCl/D_2O içerisinde daha yüksek sıcaklıklarda spektrum alınmaya çalışılmıştır. Çözünme işlemi gerçekleşmediği için örnek üzerine ekstra DCl ilave edilmiştir.

2.2.2.2. Formüllerin Hazırlanması

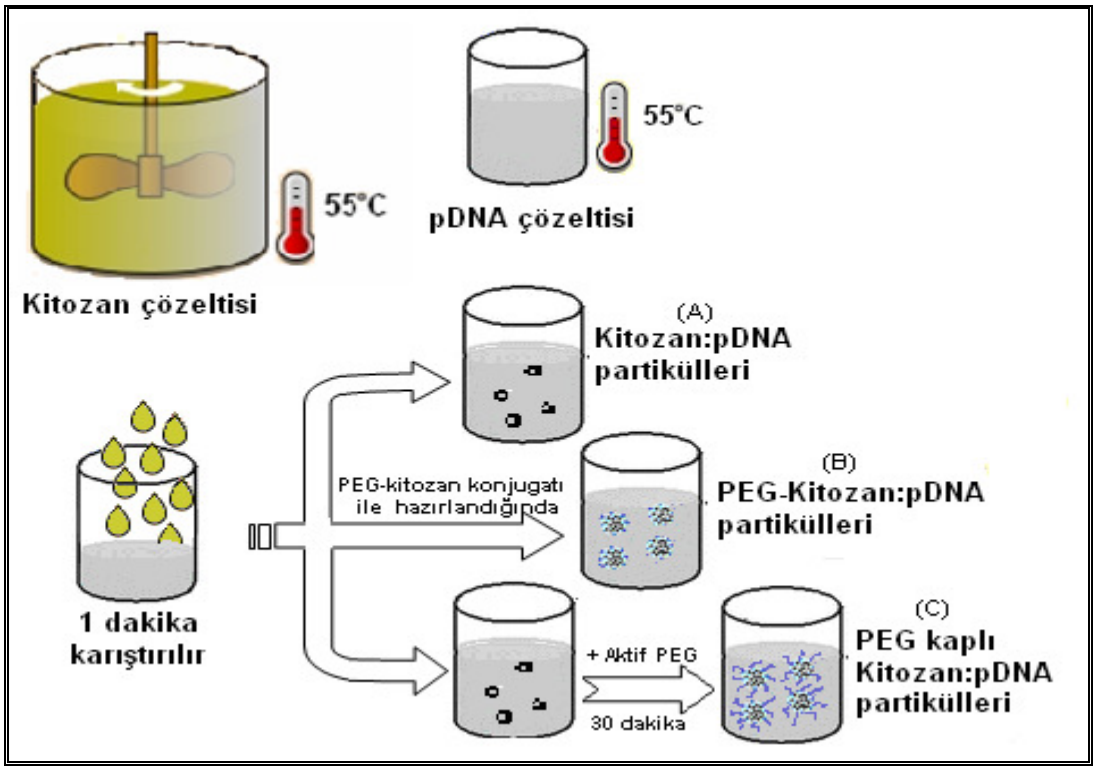
Katyonik özellikteki polimer ile pDNA içeren nanopartikül hazırlamak için en uygun yöntemin farklı yük taşımalarına dayanan kompleks koaservasyon yöntemi olduğu bildirilmektedir (Bozkır ve Saka, 2004a; Mao ve ark, 2001; Gao ve ark., 2003,Chan ve ark., 2007). Hazırlanan formülasyonlar incelendiğinde, partikül büyüklüğü, pDNA yükleme etkinliği ve gen aktarım verimi yüksek olan polimer:DNA oranı 2:1 olan formülün bu çalışmamızda kullanılmasına karar verilmiştir. Kitozan tipi olarak karşılaştırma yaptığımızda, deasetilasyon dereceleri farklı olan yüksek molekül ağırlığına (HMW) sahip kitozan en uygun aday olarak görülmektedir (Bozkır ve Saka, 2004b). Ancak HMW kitozanın süzme işleminin zor olması ve en iyi sonucu veren ikinci formülü oluşturan düşük molekül ağırlıklı kitozanın PEG ile modifikasyonunun daha kolay olacağı düşünüldüğünden (Chan ve ark., 2007) düşük molekül ağırlıklı formüller ön plana çıkmıştır. Bu nedenle suda çözünen kitozan türevinin de düşük molekül ağırlığında olmasına karar verilmiştir. Deasetilasyon derecesinin, gen aktarımına olumlu etki gösterdiği bildirilmektedir (Bozkır ve Saka, 2004a). Ancak PEG ile bağlanmanın da serbest amin grubu üzerinden olduğu düşünülürse, tüm grupların kapatılıp, pDNA ile etkileşmesini önlemek amacıyla daha

düşük olan deasetilasyon derecesine ait kitozan seçilmiştir. Aynı özelliklere sahip olması ve karşılaştırma yaparken yanlış yorumlamamızı engellemek için PEI'de aynı oranda pDNA ile maruz bırakılarak, formüller hazırlanmıştır. Ayrıca, PEI varlığından kaynaklanabilecek olası toksisite problemini en aza indirmek için 25kDa uzunluğunda olan türevi kullanılmıştır.

Hazırladığımız lipozom formülasyonları için ise, labovatuvarımız da üretebileceğimiz, ince film oluşturma yöntemine uygun katyonik lipitler tercih edilmiştir. Gen aktarım etkinliğinde yanlış yorumlara neden olabilecek toksik etki göz önüne alınarak; lipofektin ve lipofektamine göre daha az toksisite gösteren DOTAP/DC-Chol ve DOTAP/DOPE formüllerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca hücre zarı ile etkileşiminde avantaj sağlayabileceğini düşündüğümüz DC-Chol/DOPE formülleri de hazırlandı.

2.2.2.2.1. Kitozan Poliplekslerinin Hazırlanması

Şekil 2.4.'de şematik olarak anlatılan kompleks koaservasyon yöntemine göre kitozan polipleksleri hazırlanmıştır. Suda çözünmeyen kitozan türevlerinin %1'lik asetik asit içerisinde (100µg/mL) hazırlanmıştır. Suda çözünen kitozan türevi ise aynı oranda sodyum asetat tamponunda çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0.22 µm'lik tek kullanımlık filtrelerden süzülmüştür. Özellikle farmasötik kalitede olmayan ve suda çözünmeyen kitozan türevi (Fluka) ile hazırlanan çözelti gözle görülür safsızlıklar içerdiğinden süzme işlemi mutlaka yapılmalıdır. 50 mM sodyum sülfat çözeltisi içerisindeki 50 µg/mL pDNA çözeltisi ile kitozan çözeltileri 55°C'ye kadar ısıtılmıştır. Her iki çözeltiden Çizelge 2.1.'de ifade edilen miktarlarda alınmış ve vorteks karıştırıcıda 1 dakika boyunca karıştırılmıştır (Bozkır ve Saka, 2004a). PEG ile kaplama yapılan formüller ise 35 µl aktive edilmiş PEG (100 mg/ml çözeltisinden) ilave edilmiş, 1 dakikalık karıştırma sürecini takiben oda ısısında 30 dakika PEGilasyon işleminin tamamlanması için bırakılmıştır (Pun ve Davis, 2002).



Şekil 2.4. Kitozan nanopartiküllerinin hazırlanış şeması.

Çizelge 2.1. Hazırlanan kitozan formülasyonları

Kod	Kitozan kaynağı	PEG varlığı*	Kitozan miktarı	pDNA** miktarı
Ch1	Fluka – LMW	-	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch2	Fluka – LMW	+	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch2(x3)	Fluka – LMW	+ + +	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch3	Fluka – LMW	kaplama	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch3(2)	Fluka – LMW	kaplama ***	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch4	Chitech - LMW	-	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch5	Chitech - LMW	+	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch5(x2)	Chitech - LMW	+ +	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch5(x1/2)	Chitech - LMW	½ +	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch6	Chitech - LMW	kaplama	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch7	Protosan - LMW	-	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch7(PBS)	Protosan - LMW	-	100 µg/mL	50 µg/mL

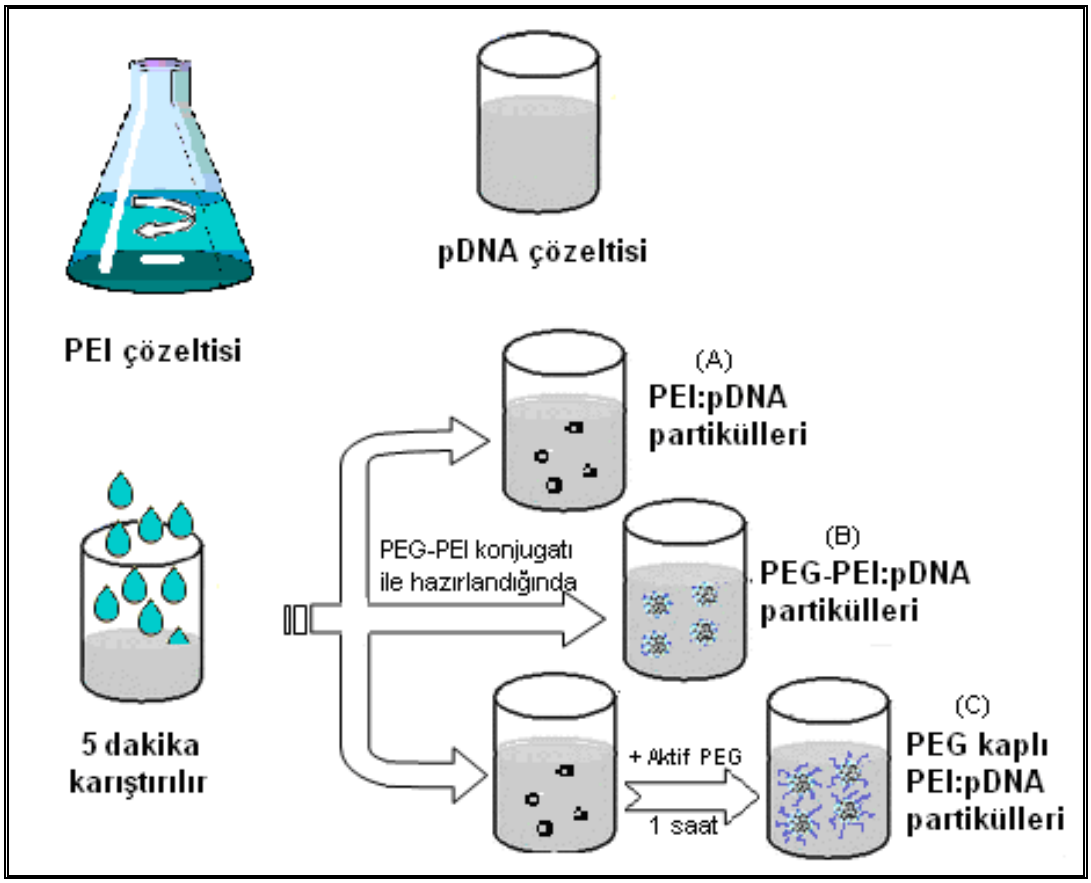
Ch8	Protosan□- LMW	+	100 µg/mL	50 µg/mL
Ch9	Protosan□- LMW	kaplama	100 µg/mL	50 µg/mL

* "-"; PEG içermeyen formülleri, "+"; PEG'in konjuge edildiği formülleri, "+ sayıları"; PEG miktarının ifade edilen oranlarda değiştirildiği formülleri ifade etmektedir.
** Ön formülasyon aşamasında pSV-□-Gal plazmidi kullanılmıştır.
*** 55℃ altında kaplama süresi iki katına çıkarılmıştır.

2.2.2.2.2. PEI Poliplekslerinin Hazırlanması

Şekil 2.5.'te şematik olarak anlatılan kompleks koaservasyon yöntemine göre PEI polipleksleri hazırlanmıştır. 5 mg PEI, 50 mL PBS (pH 7.4) içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, 0.22 µm'lik tek kullanımlık filtrelerden süzülmüştür. 50 µg plazmid DNA ile 2 katı oranında PEI ilave edilmiş ve oda ısısında 5 dakika boyunca vorteks karıştırıcıda tutulmuştur. 50 µg/mL pDNA konsantrasyonuna karşı final polimerin konsantrasyonu PEI için 95 µg/mL iken PEG ile aktive edilmiş PEI için oran 338 µg/mL'dir. Ayrıca PEG içermeden hazırlanan kompleksler 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra %10 oranında aktive edilmiş PEG ilave edilmiş ve 1 saat oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. PEG kaplaması yapılan formüller, inkübasyondan sonra Vivaspin 20□ tüpleri içinde 4000 g'de santrifüj uygulanarak ortamda kalan serbest PEG uzaklaştırılmıştır.

Fosfat Tamponu (PBS)
Sodyum klorür ……..……..…7.650 g
Susuz disodyum hidrojen fosfat …....0.724 g
Potasyum dihidrojen fosfat ……... 0.210 g
Distile su …….y.m…....1.000 Litre
1 N Sodyum hidroksitle pH 7.4'e ayarlanır.
(http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/r59.html) sayfasından alınmıştır.



Şekil 2.5. PEI nanopartiküllerinin hazırlanış şeması.

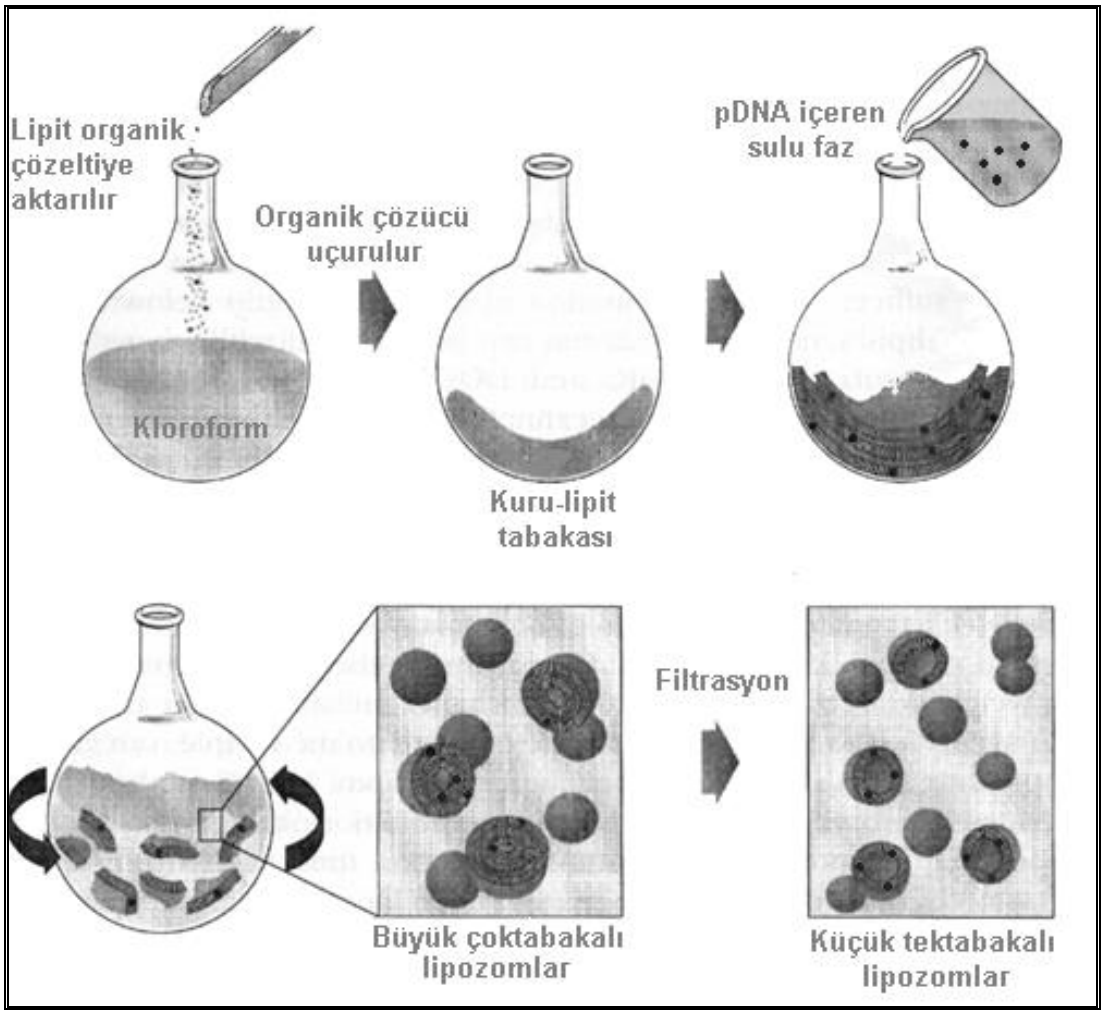
2.2.2.2.3. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Lipozom formülleri Şekil 2.6.'te şematize edildiği gibi kuru-film metodu ile hazırlanmıştır. Çizelge 2.2.'de verilen oranlardaki lipitler kloroform içerisinde çözülür. 100 ml'lik şilifli altı yuvarlak cam kaba aktarılır. Rotavapora takılan çözelti 30℃'deki su banyosuna daldırılır ve vakum oluştuktan sonra kendi ekseni etrafında hızlı devirde dönme işlemi başlatılır. Rotavaporda, 30 dakika boyunca film oluşturmaya bırakılır. Cam kapta çözelti var ise ekstra 15 dakika daha beklenir. 3 mL (50µg/mL pDNA içeren) steril bidistile su ilave edilir ve 30℃'de 10 dakika döndürülerek, film ajite edilir. 2ml bidistile su çözeltisi (%10 aktive edilmiş PEG içeren) ilave edilir ve 10 dakika 45℃'de tekrar döndürülür ve elde edilen çözelti filtreden geçirilir ve gerekli kontroller taze hazırlanmış formüller üzerinden yapılır.

Çizelge 2.2. Hazırlanan lipozom formülasyonları

Kod	Kullanılan Lipitler	Lipit oranları*	Filtrasyon basamağı
$L_{DD1:1}$	DOTAP/DOPE	50 / 50 / 0	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{DD1:1PEG}$	DOTAP/DOPE	45.5 / 45.5 / 9	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{DC1:1}$	DOTAP/DC-Chol	50 / 50 / 0	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{DD2:1}$	DOTAP/DOPE	67 / 33 / 0	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{DD2:1PEG}$	DOTAP/DOPE	57 / 33 / 10	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{DC2:1}$	DOTAP/DC-Chol	67 / 33 / 0	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{DC2:1PEG}$	DOTAP/DC-Chol	57 / 33 / 10	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{CD2:1}$	DC-Chol/DOPE	67 / 33 / 0	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{CD2:1PEG}$	DC-Chol/DOPE	57 / 33 / 10	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{CD1:1}$	DC-Chol/DOPE	50 / 50 / 0	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{CD1:1PEG}$	DC-Chol/DOPE	45.5 / 45.5 / 9	0.45 µm filtrasyon 3 kere
$L_{CD2:1fx5}$	DC-Chol/DOPE	67 / 33 / 0	0.45 µm filtrasyon 5 kere

* Kullanılan lipit oranları % olarak verilmiştir. İlk iki değer yan kutudaki lipitlere, son değer PEG miktarına aittir.



Şekil 2.6. Lipozom formülasyonlarının üretiminin şematik gösterimi.

2.2.2.2.4. Terapötik Gen Kullanılarak Hazırlanan Formüller

Terapötik genin herhangi bir kontaminasyon ve konsantrasyon farklılığına uğramaması için bakteri ortamında çoğaltma yoluna gidilmemiştir. Miktarı sınırlı olan pCR3.1-TSP1 yerine ön formülasyon çalışmalarında pSV-□-galaktosidaz (pSV-□-Gal) kontrol vektörü kullanılmıştır. Ultra saf kitozan ile hazırlanan CH7,CH8 ve CH9 kodlu kitozan partikülleri ile aynı oranda (2:1) hazırlanan PEI partikülleri ve $L_{DD1:2PEG}$ ve $L_{CD1:2PEG}$ kodlu lipozom formülasyonları başarılı bulunmuş, Çizelge 2.3'te özetlendiği şekilde bu sefer pCR3.1-TSP1 plazmidi ile tekrar hazırlanmıştır. Lipozom formülasyonlarında istenilen boyuta ulaşılamaması nedeniyle filtrasyon aşamasında azot gazı altında 0.45 μm'den bir kez, çift katlı 0.22

μm'den ise 3 kez geçirilerek istenilen özellikte lipozom formulasyonları hazırlanmıştır.

Çizelge 2.3. Terapötik gen (pCR3.1-TSP1) içeren polimerik nanopartikül ve lipozom formülasyonları.

Kod	Modifiye edilen formül
C1	Ch7; Protasan:pCR3.1-TSP1 (2:1)
C2	Ch8; (PEG/Protasan): pCR3.1-TSP1 (2:1)
C3	Ch9; PEG (Protasan: pCR3.1-TSP1) (2:1)
P1	PEI: pCR3.1-TSP1 (2:1)
P2	(PEG/PEI): pCR3.1-TSP1 (2:1)
P3	PEG (PEI: pCR3.1-TSP1) (2:1)
L1	$L_{DD2:1PEG}$*
L2	$L_{CD2:1PEG}$*

* Lipozom formülasyonları, 0.45 μm'den bir kez, çift katlı 0.22 μm'den ise 3 kez geçirilmiştir.

2.2.2.2.5. Kombine Tedavi Amacı İle Hazırlanan Formüller

Tümör büyümeye başladığında, anjiogenik molekülleri fazla miktarda üretmeye başlamaktadır (Risau, 1997). Bu nedenle sadece VEGF bloke edildiğinde, tümör anjiogenezi farklı (örneğin; bFGF veya IL-8 gibi) moleküle oluşuma devam edebilmektedir (Carmeliet ve Jain, 2000). Trombospondin, VEGF'in salınmasını azaltması, heparin-sülfat proteoglikan ve CD47 reseptörlerini kapatması gibi farklı mekanizmalarla, anjiogenezi engellemektedir (Şekil 1.5.).

İki farklı ilaç vermek yerine, farklı iki anti-anjiogenik protein taşıyan genin tek bir formülasyon içinde verilmesi düşünülmüştür (Turan ve ark., 2003). Formülasyon içerisine IL-2 taşıyan gen ilavesi ile trombospondin'in mekanizmasında bulunmayan bFGF'nin de baskılanmasının artı bir değer sağlayacağı düşünülmüş ama bu plazmidin elde edilememesi ve ekstra maliyet getireceğinden daha kolay bir molekül üzerinde kombine formülasyon tasarlanması planlanmıştır.

2.2.2.2.5.1. Genetisin İçeren Kombine Formüllerin Hazırlanması

Göğüs hücrelerindeki katı tümörler üzerinde, hücre çoğalmasının geç fazını bloke ederek etki gösteren aminoglikozit türevi olan genetisin ile pCR3.1-TSP1'in kombine verilmesi amaçlanmıştır. Tümör çoğalması ve anjiogenez mekanizmasında etkin olan oksijen azlığı durumunda trombospondin gibi genetisin de yüksek oranda etki göstermektedir (Lee ve ark., 2002). Trombospondinin aksine genetisinin tümör anjiogenezini için seçici olmaması nedeniyle mümkün olan en düşük doz tercih edilmiştir.

Bölüm 2.2.2.2.1.'de anlatıldığı gibi suda çözünen kitozan türevleri ile formüller hazırlanmıştır. Farklı olarak pCR3.1-TSP1 ile genetisin 1:10 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Çizelge 2.4'te hazırlanan kombine formüller özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Genetisin içeren kombine formüller

Kod	Protasan □	PEG	pCR3.1-TSP1	Genetisin
K1	100 µg/mL	-	50 µg/mL	5 µg/mL
K2	100 µg/mL	+	50 µg/mL	5 µg/mL
K3	100 µg/mL	Kaplama	50 µg/mL	5 µg/mL
K4	100 µg/mL	+	50 µg/mL	10 µg/mL
K5	100 µg/mL	+	50 µg/mL	0.5 µg/mL

2.2.3. Hazırlanan Formülasyonların Değerlendirilmesi

Farklı polimer veya lipitlerden oluşan katyonik taşıyıcıların, enkapsülasyon etkinlikleri hesaplanmış, yüzey yükü değerleri ile partikül büyüklükleri ve dağılımlarına ilişkin ölçümler yapılmıştır. İstenilen özellikleri taşıyan formüller, terapötik gen içeren pCR3.1-TSP1 ile tekrardan (Çizelge 2.3.) formüle edilmiş ve bu formüllerin in vitro salım kinetikleri ile pDNA etkileşimleri incelenmiştir. Ayrıca bu formüllerin hemolitik aktiviteleri, sitotoksite ve gen aktarım etkinlikleri de incelenmiştir.

2.2.3.1. Formüllerin Enkapsülasyon Etkinliklerinin İncelenmesi

Taze olarak elde edilmiş formüller yüksek devirde santrifüj edilmiş ve oluşan çökeleğin üzerinde bulunan süpernatan alınıp 260 nm'de okunmuştur. Formül yapısına katılamayan serbest pDNA miktarı, Bölüm 2.2.1.3.'te verilen Eşitlik 2.2 ile hesaplanmış, formüle eklenen pDNA miktarından çıkartılarak formül yapısına dahil olan nükleik asit miktarı hesaplanmıştır. Formüllerin etkin madde yükleme oranı (Eşitlik 2.3.) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) eşitlik 2.4. kullanarak hesaplanmıştır.

%Etkin madde yükleme (a/a) = 100 x (a / b)	Eşitlik 2.3.

EE (%) = 100 x [(c x a / b-a) / d]	Eşitlik 2.4.

a: Serbest pDNA miktarı

b: Elde edilen taşıyıcı sistemin ağırlığı

c: Formüle konulan katyonik yapının miktarı

d: Formüle konulan pDNA miktarı

2.2.3.2. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelin Ölçülmesi

Hazırlanan partiküllerin hücre membranından giriş ve endozomlardan kaçış için önemli bir parametre olan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerinin ölçülmesi için Zetasizer Nano ZS kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanmış örnekler 1/40 oranında bidistile su ile seyreltilmiş ve hemen okuması yapılmıştır. Veri analizleri için viskozite değeri olarak 0.8905 ve 25°C'deki suyun kırılma oranı değeri olarak (refraktif indeksi) 1.333 kullanılmıştır. Cihaz, 5 ayrı okuma yapıp ortalama değerini verecek şekilde ayarlanmıştır.

2.2.3.3. pDNA'nın İn-vitro Salım Çalışması

Formülasyonların in-vitro salım profillerini elde etmek için, bir gün önceden ıslatılmış diyaliz membran (Mw cut of: 12.000) içerisinde 37°C'ye ayarlanmış 20 mL steril fosfat tamponu (PBS, pH:7.4; Bölüm 2.2.2.2.2.) içeren ortama konulmuştur. Çalkalayıcı su banyosunda bulunan örneklerden belirlenen zaman aralıklarında, etkin madde salımı tamamlanıncaya kadar 400 µl örnek alınmış ve yerine alınan miktar kadar ortam ilave edilmiştir. Alınan örnekler 260 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Eşitlik 2.2.'den yararlanılarak hesaplanan DNA miktarı, Eşitlik 2.5.'e göre yüzdeye geçilmiş ve zamana karşı grafiğe geçirilerek değerlendirilmiştir.

% Çıkan etkin madde : 100 x a / (bxc/100)	Eşitlik 2.5.

a: Bulunan DNA miktarı

b: Ortama konulan formül miktarı

c: Etkin madde yükleme yüzdesi

Çözünme verileri farklı matematiksel modellere göre değerlendirilmiş, bu modellere göre r^2 değeri, hız sabiti, standart hata ve kareler toplamı değerleri SPSS 9.0 versiyonu kullanarak hesaplanmıştır.

2.2.3.4. Jel Elektroforez Yöntemi ile pDNA Etkileşiminin İncelenmesi

Agaroz jel elektroforez yöntemi; DNA'nın ayırımı, tayin edilmesi ve saflaştırılmasında kullanılan standart yöntemdir. Basit, tekrarlanabilir ve diğer yöntemlerle ayrımını yapamadığımız hassaslıkta DNA fragmanlarına ayırımını gerçekleştirebilecek kapasitededir. Ultraviyole ışık altında jel, etidyum bromür ile boyandığı zaman 1-10 ng gibi DNA düşük konsantrasyonlar bile belirlenmektedir.

Agaroz jeller amaca göre farklı porozitede hazırlanabilir ve farklı şartlar altında yürütülebilir. Bu parametreleri belirleyen en önemli faktör ayırımı sağlanacak genomik maddenin büyüklüğüdür. Boyutları 5-500 bp (baz çifti) olan DNA bantlarının ayırımı için, yüksek ayırım gücü gösteren 1 bp'ni bile diğerinden ayırabilen yüksek konsantrasyonda hazırlanmış jel gerekmektedir. Poliakrilamid jellerin ayırım gücü agaroz jellere göre daha fazladır. Agaroz jeller genellikle yatay ve sabit bir akım ile sürüklenme gerçekleştirilir. 200 bp'den 50 kb'a (kilo baz) kadar geniş bir aralıkta ayırım sağlanmaktadır. 10.000 kb'dan büyük DNA parçalarının ayırımı için belirli aralıklarda akım gücü ve yönü değiştirilerek, ayırım sağlanmaktadır (Sambrook ve ark., 1989).

Elektroforez işlemi için %0.8'lik agaroz jel kullanılmıştır. Düşük erime sıcaklığına sahip agarozdan 1.6 g tartılmış, manyetik karıştırıcının ısıtıcısından yararlanarak, 200 mL TBE tamponu içerisinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. 5-6 dakika içinde elde edilen berrak çözelti, yan destekleri takılmış, düz zemin üzerindeki jel tepsisine dökülmüştür. Jelin soğumasına yakın uygun tarak jel tepsisine monte edilmiş ve polimerleşmenin tamamen gerçekleşmesi için soğumaya bırakılmıştır. Polimerleşme tamamlandıktan sonra, tarak ve yan destekler dikkatlice çıkarılmış, elektroforez tank sistemi içerisine yerleştirilmiştir. Uygulanacak örnekler, örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra tarak ile oluşturulan kuyucuklara aktarılmış, ve tankın içi jeli örtecek şekilde TBE tamponu eklenmiştir. 60 V, 150 mA'lık elektirik akımı uygulanmış, brom fenol mavisinin jelin sonlarına gelinceye kadar sürüklenmesi sağlanmıştır. Jel boyama kabına aktarılmış ve burada etidyum bromür çözeltisi ile yaklaşık 45 dakika muamele edilmiştir. Ardından jel yıkama

amacıyla yarım saat daha distile suda bekletilmiş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Elektroforez işleminde kullandığımız çözeltiler;
(**T**ris-**b**orik asit-**E**DTA) TBE tamponu (5x);
Trizma baz …… 54.0 g
Borik asit ……..27.5 g
EDTA (0.25 M, pH:8.0)…….10.0 mL
Distile su ……y.m.....100 mL

Konsantre olarak hazırlanan TBE tamponu, kullanım sırasında 1/5 oranında seyreltilmelidir. Seyreltilmiş tampon o gün içinde kullanılmalıdır.

Örnek yükleme tamponu;
Bromfenol mavisi ……..% 0.25
Gliserol (su içerisinde)……... % 30

Örnek yükleme tamponu hazırlandıktan sonra buz dolabında 4℃'de saklanmıştır.

Boyama çözeltisi;
Etidyum bromür, jele uygulanıp yürütülen DNA fragmantları ile birleşerek UV ışığı altında floresans verirler. Etidyum bromür stok çözeltisi su içerisinde 10 mg/mL olacak konsantrasyonda hazırlanmıştır. Oda ısısında saklanmıştır. Boyama işlemi yapıldığında, boyama tankına alınan 200 mL distile su içine 10 µl stoktan ilave edilmiştir (0.5µg/mL). Etidyum bromür güçlü bir mutajenik etki gösteren toksik bir maddedir. Bu nedenle boyama çözeltisi dikkatli kullanılmış, kullanılmayan stok çözeltisi ise dikkat çekici uyarılar ile çeker ocak altında saklanmıştır.

2.2.3.4.1. Partiküllerin pDNA'yı Formüle Etme Kapasitesinin ve pDNA'yı Koruma Etkisinin Ölçülmesi

Poliplekslerin DNA ile kompleks oluşturup oluşturmadığı agaroz jel yöntemi ile kontrol edilmiştir. pCR3.1-TSP1 kullanarak hazırlanan formülasyonlar %0.8 agaroz jele uygulanmıştır. Movius ve Lab (1998)'ın tarifine göre; DNA'nın bulunduğu bölgeler, yeni açılmış bir neşter başlığı ile kesilip alınmıştır. 1 mL ependorf tüpün baş kısmı kesilip, tüpün alt kısmına sıcak uygulanmış iğne ile taban kısmından delinmiştir. Delinen kısmın üzerini örtecek kadar cam pamuğu yerleştirilip, kesilen parça konulmuştur. 1.5 mL DNaz, RNaz içermeyen ependorf tüpünün içine yerleştirilip 2875 g'de 45 dakika santrifüj edilmiştir. Kitozan bantlarından elde edilen tüplere kitozanaz, PEI içeren bantlardan elde edilen tüplere de fenol:kloroform (1:2) solusyonu ilave edilmiş ve bu örnekler tekrar agaroz jele uygulanarak UV ışığı altında bantlar gözlenmiştir.

Ayrıca nanopartiküller, pDNA'nın nükleaz varlığında stabilitesi hakkında fikir sahibi olmak için, 40 µg/mL DNaz I enzimi ile 37℃'de muamele edilmiştir. 15 dakika sonra reaksiyonu durdurmak için iyodoasetik asit ilave edilmiş, ve bu numunelerin DNA içerikleri jel elektoroforezinde incelenmiştir.

2.2.3.5. Formüllerin Hemolitik Aktiviteleri

Hazırlanan formüllerin kan serumu ile geçimliliğini artırmak için yapılan PEG modifikasyonunun başarısını görmek için uygulanmıştır. Sağlıklı gönüllülerden, EDTA içeren tüplere kan alınmış ve serum proteinleri elde edilmiştir. EDTA'lı tüpler, 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılıp, üzerine PBS (pH:7.4) ilave edilmiş ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Süpernatan renksiz ve berrak oluncaya kadar bu işlem tekrar edilmiştir. %5 glukoz içeren 25mM HEPES tamponu içinde eritrositler (ve diğer kan komponentleri) süspande edilmiştir. 150 µl eritrosit süspansiyonu (%2.5 h/h), 15 µl formül ile 60 dakika boyunca 37℃'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda kan hücreleri santrifüj ile uzaklaştırılmış ve

elde edilen süpernatan 570 nm'de okunmuştur. %5 glukoz ve %1 Triton X-100 çözeltileri negatif ve pozitif kontrol olarak okunmuş, formüllerin eritrosit ile etkileşmeleri oluşan renk şiddetine göre yorumlanmıştır.

2.2.3.6. Formüllerin Elektron Mikroskop Analizleri

Formüllerin yapıları hakkında fikir sahibi olmak için geçirimli elektron mikroskopu (TEM) kullanarak fotoğrafları çekilmiştir. Daha önceki çalışmamızda taramalı elekron mikroskobu (SEM) ile görüntüler elde edilmeye çalışılmış, görüntü nanopartiküle yaklaştıkça yapıda bozulmalar gözlenmiştir. SEM ile örnek almak için basınçsız ortam gerektiği bildirilmektedir. Böyle bir düzeneğe ulaşamadığımız için TEM analizini yapmak daha uygun görünmüştür.

Süspande halindeki numuneden bir damla bakır levha üzerine uygulanmış ve %1'lik uranil asetat solusyonu ile boyanmıştır. 10 dakika kadar bir zaman içerisinde solusyonun kuruması beklenmiş ve numunenin analizi için TEM'e uygulanmıştır.

2.2.3.7. Formüllerin Sitotoksisite Analizleri

Laminar flow altında aseptik şartlarda hazırlanan formüller (5 µg/ml), MCF-7 (insan meme kanser hücre hattı-ATCC) hücreleri ile 1 gün boyunca uygulanmıştır. Canlı kalan hücreler MTT analiz yöntemi ile spektrofotometrik olarak 570 nm'de okunarak tayin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan formüller aseptik şartlar altında hazırlanmıştır. Kullanılan tampon çözeltiler ve bidistile su, büyük hacimli şişelere konulmuş ve otoklavda 1 saat boyunca 1 atm basınç altında 121℃'de 20 dakika tutulmuştur. Şişelerin sterilizasyonu, üzerlerine yapıştırılmış sterilizasyon bandı ile kontrol edilmiştir. Üretimin yapıldığı ortam olan laminar flow kabini üretim başlamadan 1 saat önce UV lambası açılmış, hepa filtreler çalıştırılarak istenilen

kalitede hava sağlanmıştır. Çalışmaya başlanıldığı zaman UV lambası kapatılmış ve üretim mümkün oldukça bu alan içerisinde gerçekleştirilmiştir. Steril malzeme ve maddelerin ambalajları %70'lik etanol ile silinerek kabin içerisine alınmıştır. Sterilizasyonu mümkün olmayan çözeltiler, laminar flow altında, tek kullanımlık 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir.

Sitotoksisite analizi;

3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi, indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Mossman, 1983). Canlı hücrelerde bulunan mitokondrial dehidrojenaz enziminin tetrazolyum halkasına uçuk sarı renkli MTT'nin bağlanmasıyla oluşan koyu renkli formazan kristallerinin teşhisine dayanmaktadır. Oluşan kristaller hücre zarını geçemezler, bu yüzden deterjan ilave edilerek hücre zarı bozulur ve yaşayan hücre sayısı ile orantılı oluşan kristaller ortamda çözünür. Renk şiddeti 570 nm'de okunur ve eşitlik 2.6.'ya göre canlı hücre sayısı % olarak elde edilir.

- MTT testi için, 96 kuyulu plaklara 50 µl besi yeri içinde MCF-7 hücrelerinin ekimi yapılmıştır.

Besi yeri (-20℃'de saklanır, kullanılacağı zaman 37℃'ye getirilir);
DMEM*……..50 mL
Fetal sığır serumu ……..…5 mL - (%10)
Sodyum piruvat (1mM) …..500 µl
L-glutamine (0.1 mM) ……500 µl
Penisilin/strepsilin ……500 µl
*Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı

- Hazırlanan her bir formül, besi yeri ile birlikte 5 kuyucuğa uygulanmıştır. 1 gün boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

- Aynı şartlarda formüller uygulanmadan inkübe edilen hücreler negatif kontrol, formüllerin uygulandığı ama hücre içermeyen kuyucuklar pozitif kontrol olarak hazırlanmıştır.

- İnkübasyonun bitimine 5 saat kala 20µl MTT çözeltisi (PBS içerisinde 5mg/ml MTT) ilave edilmiştir.

- 5 saat sonunda (1 günlük inkübasyon bitince) eski besi yeri uzaklaştırılmış yerine 200µl DMSO (dimetil sülfoksit) ilave edilmiştir.

- Ortam pipet ile ajite (sıvı pipete çekilip-bırakılmış) edilerek oluşan kristallerin çözünmesi sağlanmıştır.

- Plak eliza okuyucuya aktarılmış, olası hava kabarcıkların yok olması için 5 dakika çalkalama sonrası kuyucuklar 570 nm'de verdiği değerler kaydedilmiştir.

- Eşitlik 2.6. ile % hücre ölümü hesaplanmıştır.

% Hücre ölümü = 1 – [(a-b)/c] x 100	Eşitlik 2.6.

a: Ortalama A_{570} formülasyon içeren kuyular
b: Ortalama A_{570} hücre içermeyen kuyular (pozitif kontrol)
c: Ortalama A_{570} formülasyon içermeyen kuyular (negatif kontrol)

2.2.3.8. Formüllerin Gen Aktarım Etkinliğinin İncelenmesi

Kademeli olarak dondurulmuş, ml'sinde $5x10^6$ hücre içerdiği bilinen MCF-7 hücre vasatları sıvı azot tankından alınmış ve aşağıdaki prosedür uygulanarak hazır hale getirilmiştir.

Hücrelerin çözülmesi;

- Azot tankından alınan hücreler çözünme işlemi için hemen 37□C'lik su banyosuna kondu.
- Besi yeri 37□C'lik su banyosuna yerleştirildi.

Besi yeri;
DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı)…… 500 mL
FBS (Fetal sığır serumu) …… % 10
Aminoasit çözeltisi (Esansiyel olmayan aminoasit)….% 1
Penisilin/strepsilin ……% 1

- Tepesinden tuttuğumuz hücre kültürü içeren tüpler, içerisine su sızmayacak şekilde nazikçe çalkalandı.

- Çözünme gözle görülür şekilde tamamlanınca, 15 mL'lik tüplere aktarıldı.

- 10 mL beslenme ortamı ilave edildi ve 5 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildi.

- Süpernatan uzaklaştırıldı, 10 mL civarında besi yeri ile çökmüş olan hücre ajite edilerek, süspande hale getirildi.

- 25 cm^2'lik küçük hücre kutularına aktarıldı ve %5'lik CO_2 inkübatöründe 1 gün tutuldu.

- Hücre kutusunun alt yüzeyine canlı olan hücreler inkübasyon sonunda tutunmakta, ölmüş olanlar ise besi yeri ile yüzer halde gezinmektedir. Üst kısım pipet vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırıldı.

- Hücre sayısı yüzeyi kaplayacak düzeyde ise 4 mL tripsin/EDTA ilavesi ile yüzeyden koparıldı ve 75 cm^2'lik hücre kutularına alındı. Yeterli sayıda hücre olduğuna kanaat getirilmemişse, 10 mL besi yeri konup tekrar 1 gün inkübasyona bırakıldı.

Sağlıklı çoğaltılmış hücrelerin gen aktarım etkinliği için kuyucuklara aktarıldı.

- 1 saatlik inkübasyon sonunda hücre kutusundaki kültür, 4 mL tripsin/EDTA tripsin ile ajite edildi, tüpe aktarıldı ve 5 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildi.

- Süpernatan uzaklaştırıldı, besi yeri pipet ile tüp içine eklenip-alınması ile süspande hale getirildi. Hücre sayımı gerçekleştirildi (Nikon, Eclipse TS100) ve 24 kuyucuklu sisteme aktarıldı (Her kuyucukta yaklaşık $0.5x10^6$ hücre olacak şekilde). Fazla olan hücreler ise kademeli olarak dondurulup, daha sonra kullanılmak üzere azot tankına kaldırıldı.

- 500 □l besi yeri aktarıldı ayrıca kuyucuklara 50 □l formül ilave edildi. Negatif kontrol için pDNA içermeyen 50 □l %1'lik polimer veya lipit çözeltisi, pozitif kontrol içinse 20 □l pCR3.1-TSP1 ilave edildi. 3 saat boyunca 37□C'lik %5'lik CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı. 3 saat sonunda, transfeksiyon ortamı pipet ile çekilip yerine 500 □l besi yeri aktarıldı. 24 saat inkübasyon sırasında 12 saatlik ara ile ortam değiştirildi, ve ortamlar TSP miktar tayini için -20□C'de saklandı.

- Hücreler PBS ile yıkanıp üzerine 50 □l metanol ilave edilerek yüzeye fikslendi. 1:500 dilüsyon oranında Anti-V5-FITC antikoru ilave edilip, aktarım etkinliği mikroskop altında görüntülendi.

Gen aktarımının gerçekleştiği hücrelerde, trombospondin proteininin sentezlenmiş olması gerekmektedir. Bunun kontrolüde hücre ortamından alınan örneklerin poliakrilamid jel üzerine aktarımı ile gerçekleştirilmiştir.

Western blotting uygulama için kademeli jel dökme işlemi ile yapılması tavsiye edilmektedir. Uygun ekipman elimizde olmadığı için süreli olmayan (discontinues) jel dökülmüştür.

%15'lik ayırma jeli

Akrilamid stok çözeltisi ….. 5 mL (29.2 g akrilamid + 0.8 g bisakrilamid)

1.5 M Tris-HCl çözeltisi …. 2.5 mL (pH:8.8)

%10'luk SDS …… 25 µL

Distile su ……. 2.38 mL

%10 Amonyum persulfat … 0.1 mL

TEMED …….. 0.005 mL

%7.5'lik yükleme jeli

Akrilamid stok çözeltisi ….. 1.24 mL

1M Tris-HCl çözeltisi …….. 0.63 mL (pH:6.8)

%10'luk SDS …… 12.5 µL

Distile su ……. 3.138mL

%10 Amonyum persulfat … 0.05 mL

TEMED …….. 0.004 mL

- Önce ayırma jeli dökülüp, üzerine yükleme jeli döküldü ve örnek tamponu ile numuneler 1:3 oranında karıştırılıp kuyucuklara uygulandı.

Örnek tampon

1M Tris-HCl çözeltisi …….. 0.3 mL (pH:6.8)

%50 Gliserol …… 2.5 mL

%10 SDS ……. 0.25 mL

%1 Brom fenol mavisi ……. 0.5 mL

Distile su …….. 1.15 mL

Elektroforez tamponu

Tris HCl …… 3 g

Glisin ……..14.4 g

SDS …… 1 g

Distile su ……ym….. 1Litre

- Tampon içerisinde jel 60mV 150 mA'lik akım altında 2.5 saat sürüklenmeye bırakıldı.

- Örnekler SDS-PAGE yöntemi ile ayrıldıktan sonra, transfer tamponu ile jel yarım saat bekletilerek, dengeye gelmesi sağlandı.

Transfer tamponu (www.millipore.com/immobilon)

25 mM Tris …….. 3 g
192 mM Glisin ……. 14.4 g
%10 Metanol …… 200 mL
D.su ……y.m...1000 mL

- Jel ile aynı büyüklükte 4 adet filtre kağıdı ve 1 adet polivinidin fluorid (PVDF) mikroporlu (0.45 μm) membran kesilerek, yarım saat transfer tamponunda tutuldu.

- Western Blot cihazının uygun bölmesine (katot-anot sıralaması ile) sırası ile sünger, iki adet filtre kağıdı, poliakrilamid jel, PVDF membran, iki adet filtre kağıdı ve iki adet sünger yerleştirildi ve cihazda sızıntı olmamasına dikkat edilerek kapatıldı.

- 10 kDa üzerindeki proteinlerin aktarımı için uygun olan PVDF membranına 15 V'luk akım 2.5 saat boyunca uygulandı.

- Transfer tamamlandıktan sonra membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca antikor içeren bloklama tamponu (PBS içerisindeki %1'lik BSA, 10mM Sodyum fosfat ve %0.05 Tween 20; pH:7.2) içerisinde bekletildi.

- Membran bloklama tamponu ile yıkandı ve 20 mL bloklama tamponu içine ilave edilen 3 μl hidrojen peroksit çözeltisi ile muamele edildi.

- Kırmızı-mor lekeler görününceye kadar çalkalandı, ve membran distile su ile 3 kez yıkandı. Kırmızı-mor lekeler protein varlığını göstermektedir.

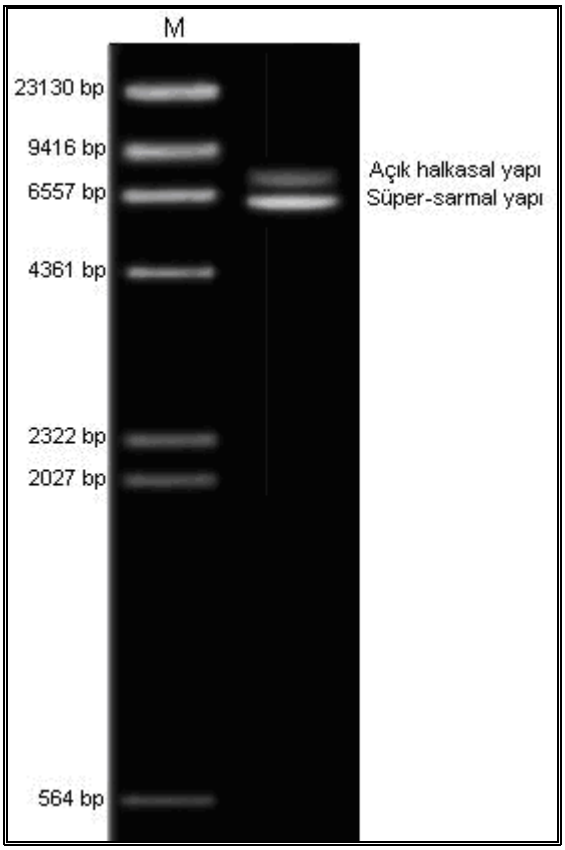
3. BULGULAR

3.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesi

Ön formülasyon aşamasında kullanılan pSV- □-Galaktosidaz Kontrol Vektörünün saflaştırılması ve formülasyonda kullanılan pCR3.1-TSP1 Vektörünün eldesi bu bölüm içerisinde irdelenmiştir.

3.1.1. Terapötik Genin Eldesi ve Saflık Kontrolüne İlişkin Bulgular

Öncelikle, TSP-1 genini taşıyan pBluescriptR vektöründen kısıtlayıcı enzimler kullanarak kesim işlemi yapılmıştır. Aynı enzimlerin pCR3.1 vektöründe sadece çoklu klonlama bölgesini tanımasından faydalanarak, klonlamaya hazır TSP-1 geni ile aynı yapışkan uçlu kesim bölgelerine sahip dizimler elde edilmiştir. TSP-1 genlerinin PCR içerisinde çoğaltılması için bu gene özgü primer dizilerinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla insan TSP-1 genine ait cDNA dizileri gen bankası veri tabanları incelenerek ORF dizisini (proteine dönüşen dizi) özgün bir şekilde çoğaltacak olan primer dizileri belirlenmiş ve elde edilmiştir. Kit içerisinde bulunan primer dizisi yerine belirlenen primer dizileri, genlerin okuma çerçevesini bozmayacak şekilde 5' uçlarına ilave edilmiştir. Kalıp olarak kullanılan pCR3.1-TSP1 vektörü ile elde edilen PCR ürünlerinin saflık ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak bölüm 2.2.1.3.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ürünün jel elektroforez görüntüsü Şekil 3.1.'de verilmiştir. Ürünün büyüklüğü genlere ait referans dizimler üzerinden yapılan hesaplar ile uyumludur. Kısıtlı miktarda elde edilen terapötik gen ürünlerinin saflık ve konsantrasyonları ile ilgili verileri Çizelge 3.1.'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Elde edilen pCR3.1-TSP1 vektörünün jel elektroforez görüntüsü. M: Marker (Lambda DNA-HindIII digest belirteci)

Çizelge 3.1. PCR yöntemi ile elde edilen vektörün saflığı ve konsantrasyonu

İşlem No	$OD_{260\ nm}$	$OD_{280\ nm}$	Saflık (OD_{260}/OD_{280})	Konsantrasyon (µg/mL)
Tüp 1	0.275	0.139	1.98	1718.8
Tüp 2	0.342	0.175	1.95	2137.5
Tüp 3	0.316	0.160	1.97	1975.0
Tüp 4	0.348	0.181	1.92	2175.0
Tüp 5	0.285	0.148	1.92	1781.3
Tüp 6	0.315	0.162	1.94	1968.8
Tüp 7	0.296	0.152	1.95	1850.0
TSP-1A*	0.280	0.141	1.98	870.8
TSP-1B*	0.289	0.145	1.99	890.1

* Ürettirilen primer dizinlerine ait saflık verileri

3.1.2. Model Plazmidin Saflık Kontrolü

Elde edilen pCR3.1-TSP1 vektörünün TOPO kiti ile üretimi yüksek saflıkta ama sınırlı miktarda gerçekleşmiştir. Vektörün yüksek miktarda üretimi için *Escherichia coli* (E.coli) bakterilerine aktarılıp, izole edilmesi gerekmektedir. Bu işlem sonunda farklı saflıksızlıklar içeren yüksek miktarda vektör elde edilebilmektedir (Bozkir ve Saka, 2004a). Bu neden ile ön formülasyon çalışmalarında elimizde daha fazla miktarda bulunan pSV- -Galaktosidaz Kontrol Vektörü kullanılmıştır. Model vektörün 1.80 ile 1.85 arasında olan saflık oranının, hazırlanan formülasyonlar da farklılığa neden olmaması için ileri saflaştırma protokolü uygulanmıştır.

İleri saflaştırma protokolü, Wizard Plus Maxipreps DNA Saflaştırma sisteminde yer aldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elimizdeki pDNA çözeltileri ile eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımı eklenmiş ve DNaz-RNaz içermeyen ephendorf tüp alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Tüpler 19.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatan başka bir tüpe aktarılmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi üç kez uygulandıktan sonra, iki kez daha sadece kloroform ile tekrarlanmıştır. 10 da 1 oranında 3 M'lık sodyum asetat (pH 5.2) çözeltisi ve %95'lik etanol ilave edilmiştir. Oda ısısında çöken pDNA, süpernatan kısmından santrifüj uygulamadan kurtulduktan sonra, Tris-EDTA tamponu ile süspande edilmiştir. Elde edilen model vektörün saflık ve konsantrasyon değerleri Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Model vektörün saflığı ve konsantrasyonu.

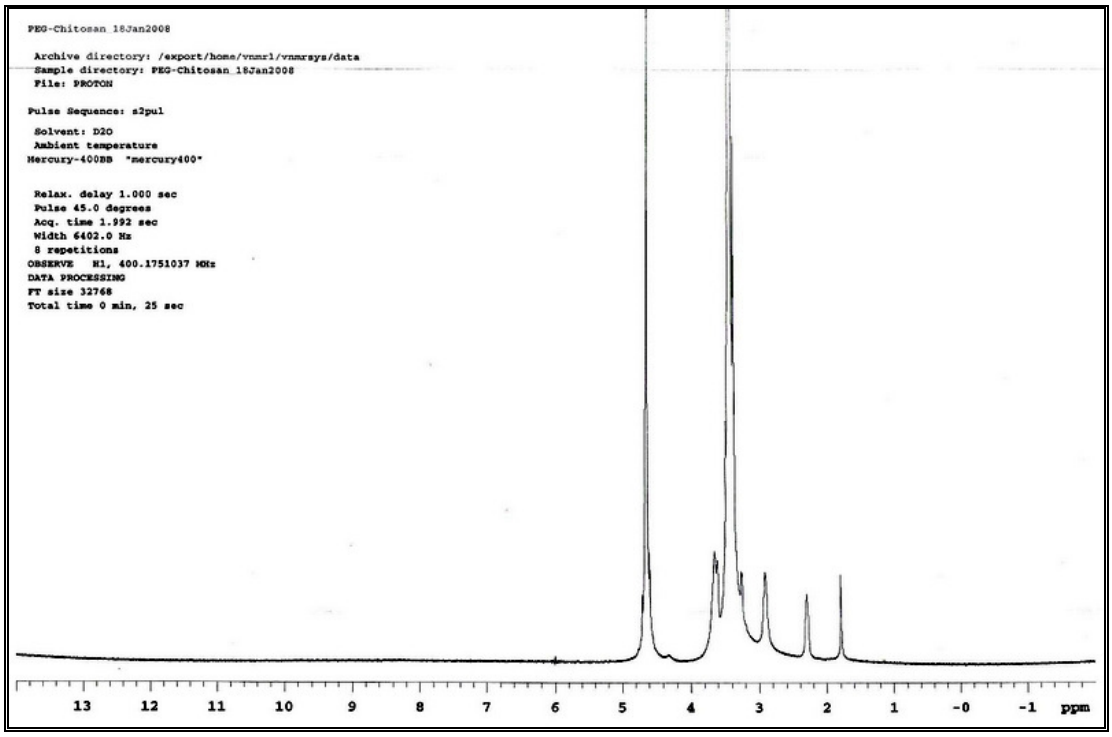
İşlem No	$OD_{260\ nm}$	$OD_{280\ nm}$	Saflık (OD_{260}/OD_{280})	Konsantrasyon (μg/mL)
Tüp 1	0.342	0.181	1.89	17100
Tüp 2	0.420	0.219	1.92	21000
Tüp 3	0.482	0.256	1.88	24100
Tüp 4	0.249	0.132	1.89	12450
Tüp 5	0.454	0.243	1.87	22700

3.2. Taşıyıcı Sistem Üzerine Yapılan Araştırmalar

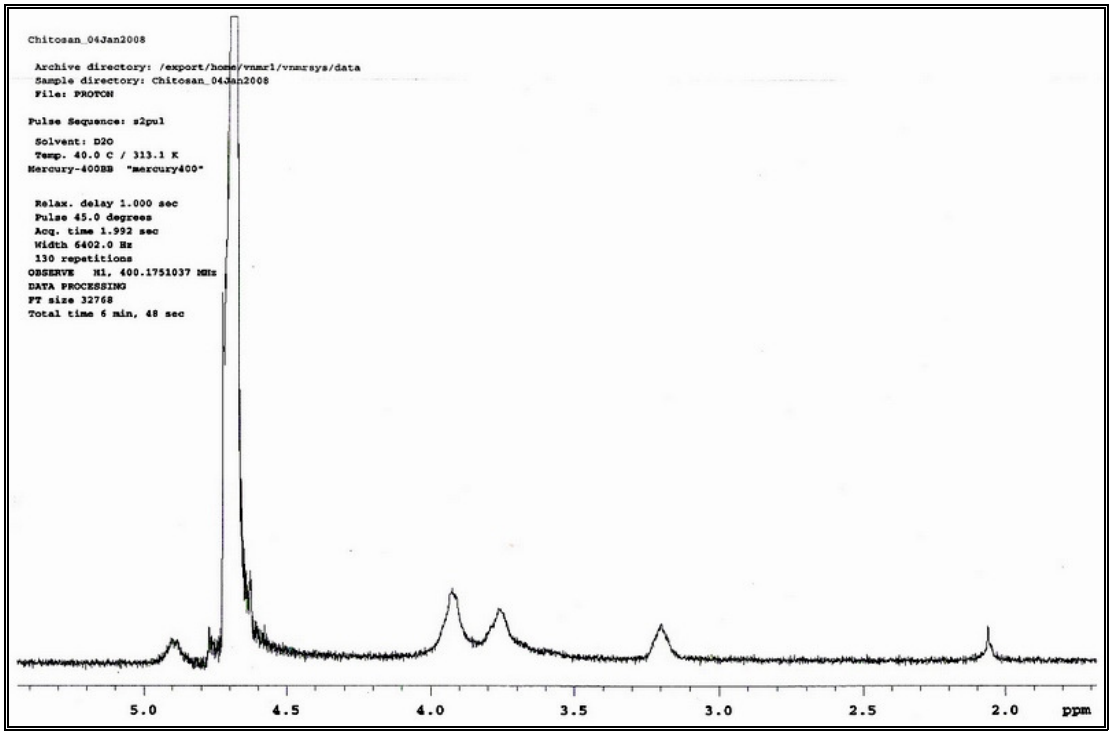
Taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için yapılan PEGilasyon basamağının kontrolü ve hazırlanan formülasyonlar üzerinde yapılan kontroller bu başlık altında özetlenmiştir.

3.2.1. PEG konjugatlarının kontrolü

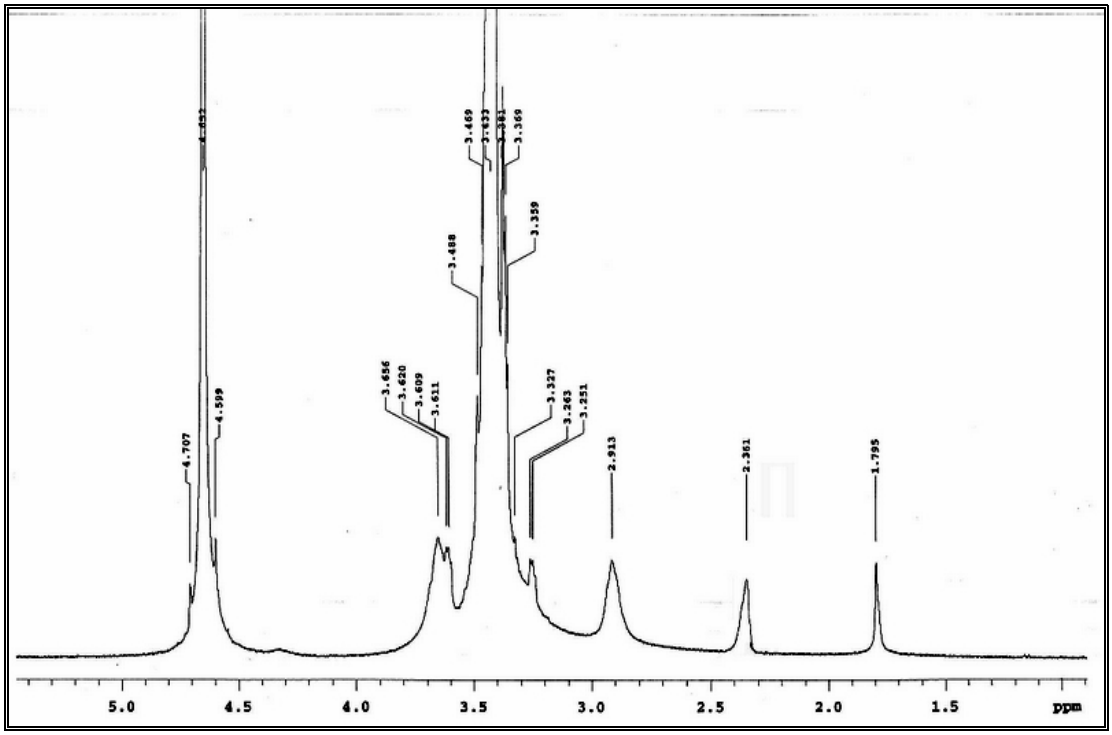
Katyonik polimerlerin PEG konjugasyonlarının gerçekleştiğine ait bulgular, Şekil 3.2., Şekil 3.3a., Şekil 3.3b., Şekil 3.4a. ve Şekil 3.4b. H-NMR görüntüleri ile gösterilmiştir. PEG ile konjuge edilmiş, ultra saf kitozanın 13-(-1) arasındaki geniş spekturumu Şekil 3.2'de verilmiştir. PEGilasyonun daha iyi anlaşılması ve pik şiddetinin ölçülebilmesi için ultra saf kitozanın (Şekil 3.3a.) ve kitozan konjugatının (Şekil 3.3b.) H-NMR spekturumları piklerin gözlendiği 5-2ppm arasında çekilmiştir. Ayrıca farmasötik kalitedeki kitozan ile hazırlanmış terapötik gen içermeyen Ch5 ve Ch6 formüllerinin TEM fotoğraflarında da PEGilasyonun varlığı görülmektedir (Şekil 3.5.).



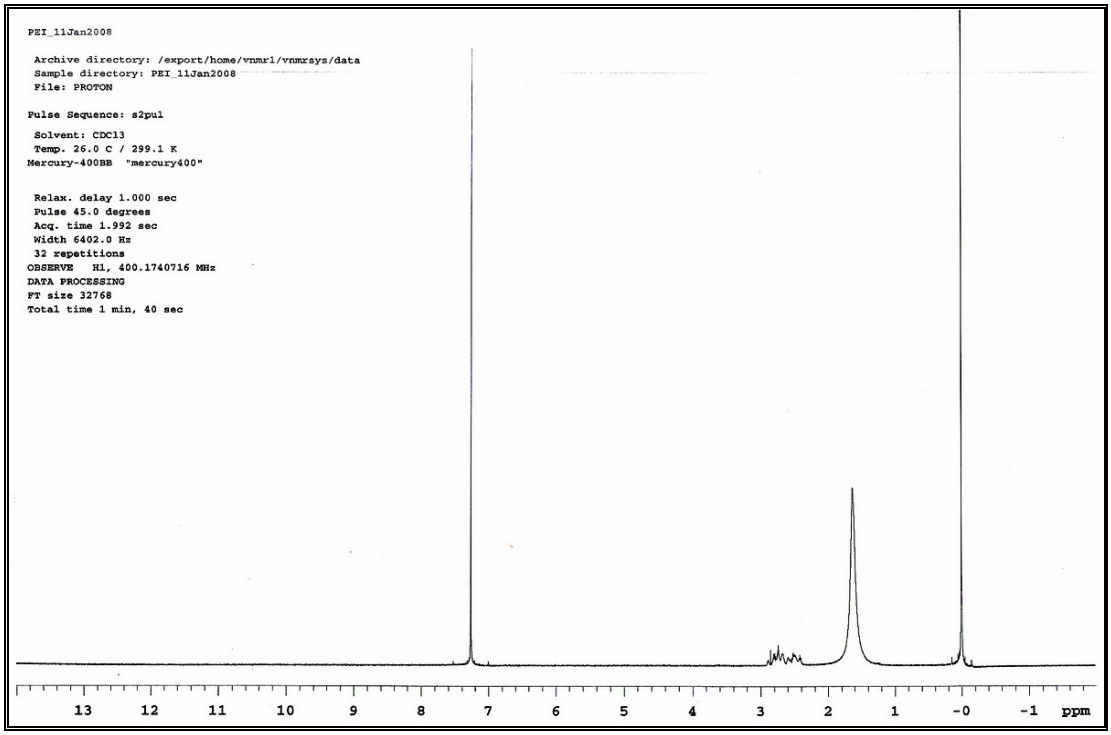
Şekil 3.2. PEG:kitozan konjugatının 13-(-1) ppm arasındaki H-NMR spekturumu.



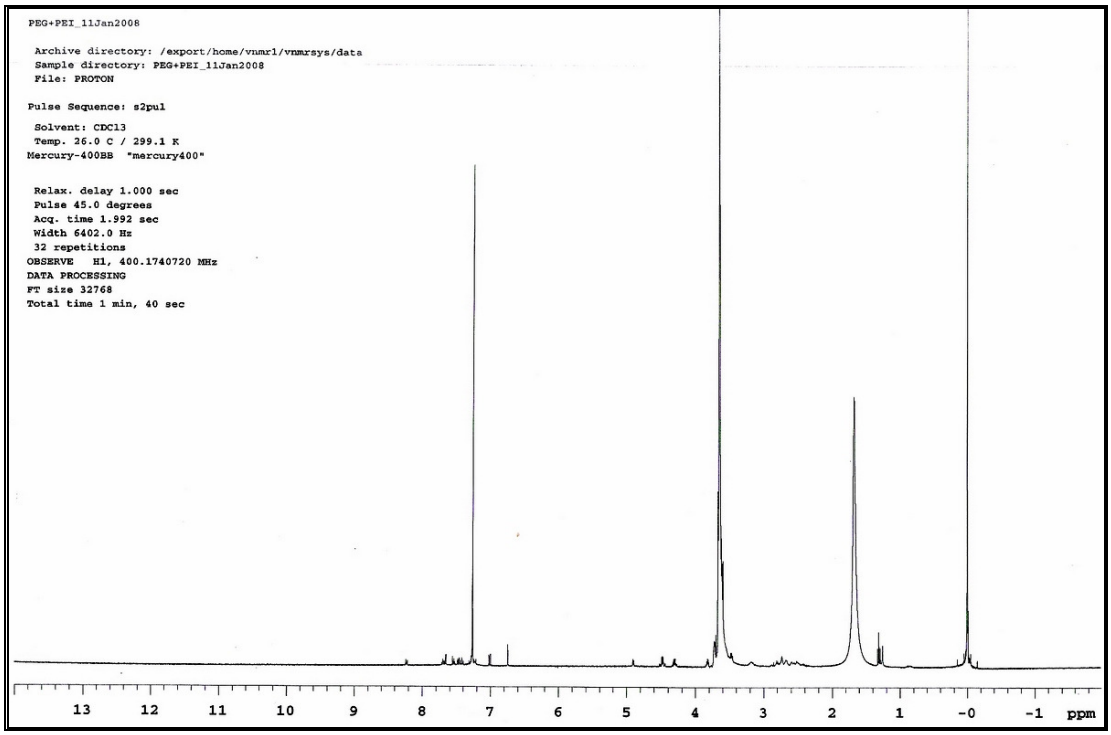
Şekil 3.3a. Kitozanın H-NMR spekturumu.



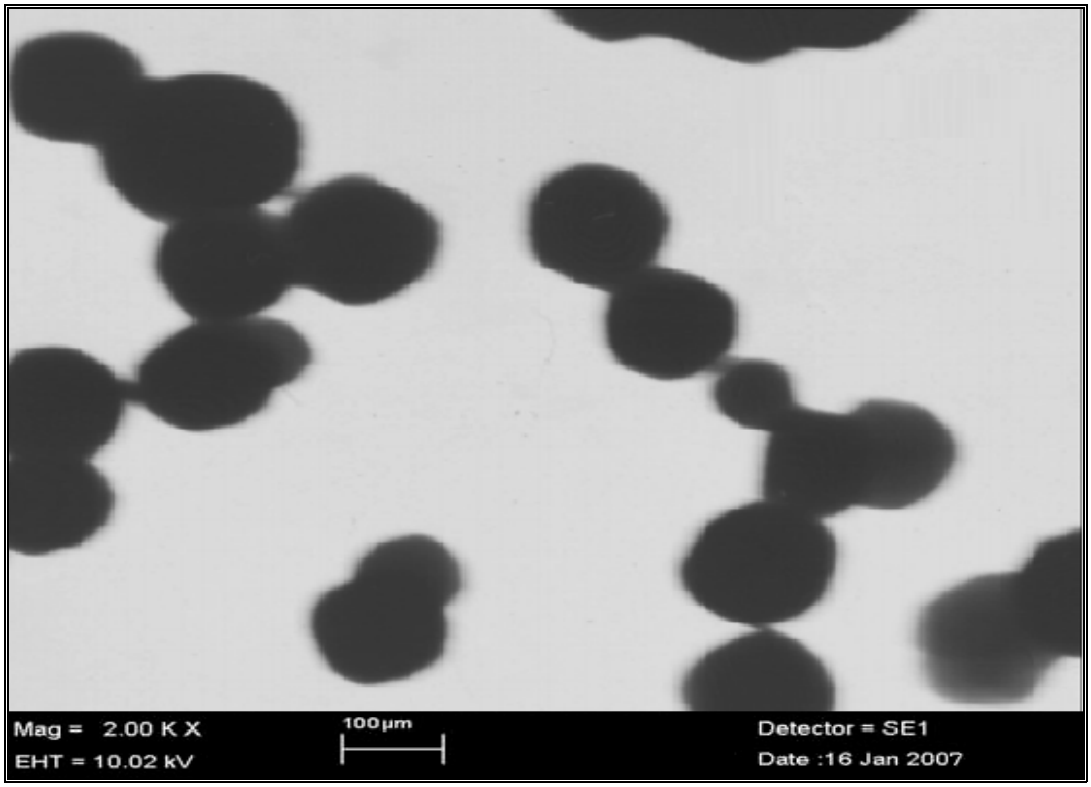
Şekil 3.3b. PEG:kitozan konjugatının H-NMR spekturumu.



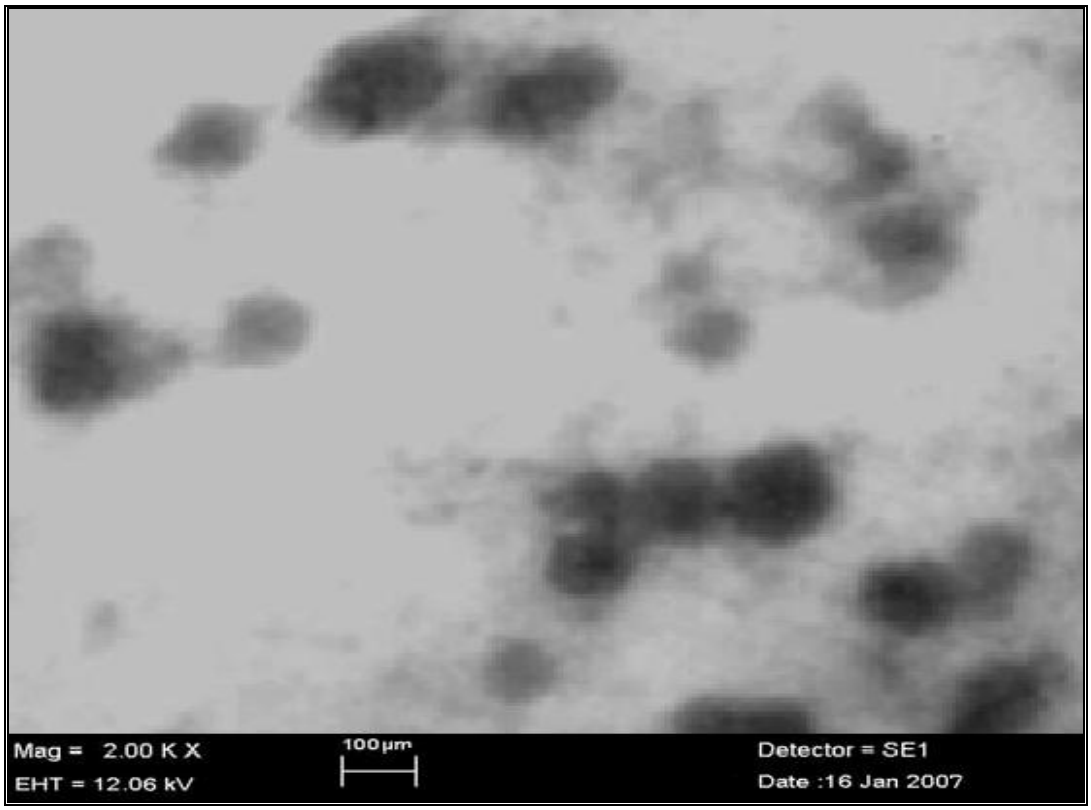
Şekil 3.4a. PEI'nin H-NMR spekturumu.



Şekil 3.4b. PEG:PEI konjugatının H-NMR spekturumu.



Şekil 3.5a. Kitozan:PEG konjugatı ile hazırlanan (Ch5 kodlu) formülasyonun TEM mikrografı.



Şekil 3.5b. PEG kaplı kitozan formülasyonun (Ch6 kodlu) TEM mikrografı.

3.2.2. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Kontroller

3.2.2.1. Enkapsülasyon Etkinliğinin İncelenmesi

Hazırlanan formülasyonlarda pDNA'yı hangi oranda yükleme yaptığımızı anlamak için bölüm 2.2.3.1.'de anlatılan eşitlikler üzerinden sonuçlara varılmıştır. Çizelge 2.1'de ve Çizelge 2.3'de formül yapıları belirtilen kitozan içeren formüllerin enkapsülasyon bulguları Çizelge 3.3.'de özetlenmiştir. PEI içeren formüllerin enkapsülasyon bulguları Çizelge 3.4'de, lipozom formülasyonlarına ait enkapsülasyon bulguları da Çizelge 3.5'de verilmiştir. Genetisin içeren formüllerde partiküler yapı oluşmadığından anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

Çizelge 3.3. Kitozan ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri

Kod	pDNA	Yüklenen pDNA oranı	Enkapsülasyon etkinliği
Ch1	pSV-□-Gal	% 18.2	% 94.46 □ 2.3
Ch2	pSV-□-Gal	% 14.6	% 82.27 □ 7.4
Ch2(x3)	pSV-□-Gal	*	*
Ch3	pSV-□-Gal	% 15.7	% 92.32 □ 5.6
Ch3(2)	pSV-□-Gal	% 13.6	% 89.13 □ 9.1
Ch4	pSV-□-Gal	% 19.4	% 95.12 □ 3.1
Ch5	pSV-□-Gal	% 13.6	% 76.35 □ 4.2
Ch5(x2)	pSV-□-Gal	% 12.1	% 70.24 □ 14.6
Ch5(x1/2)	pSV-□-Gal	% 13.8	% 75.67 □ 5.2
Ch6	pSV-□-Gal	% 16.4	% 87.23 □ 4.9
Ch7	pSV-□-Gal	% 17.7	% 79.12 □ 1.4
Ch7(PBS)	pSV-□-Gal	% 8.3	% 47.56 □ 5.2
Ch8	pSV-□-Gal	% 12.1	% 68.20 □ 3.1
Ch9	pSV-□-Gal	% 14.2	% 71.13 □ 5.3
C1	pCR3.1-TSP1	% 12.5	% 69.32 □ 1.7

C2	pCR3.1-TSP1	% 9.7	% 54.27 □ 5.6
C3	pCR3.1-TSP1	% 10.1	% 58.23 □ 2.9

*: partikül elde edilemedi

Çizelge 3.4. PEI ile hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri

Kod	pDNA	Yüklenen pDNA oranı	Enkapsülasyon etkinliği
PEI1	pSV-□-Gal	% 16.45	% 54.27 □ 1.2
PEI2	pSV-□-Gal	% 12.52	% 46.14 □ 2.5
PEI3	pSV-□-Gal	% 15.23	% 48.26 □ 1.9
P1	pCR3.1-TSP1	% 13.21	% 52.43 □ 2.0
P2	pCR3.1-TSP1	% 9.56	% 42.67 □ 3.1
P3	pCR3.1-TSP1	% 10.92	% 46.14 □ 2.1

Çizelge 3.5. Lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri

Kod	pDNA	Yüklenen pDNA oranı	Enkapsülasyon etkinliği
$L_{DD1:1}$	pSV-□-Gal	%12.24	% 54.34 □ 3.8
$L_{DD1:1PEG}$	pSV-□-Gal	%10.85	% 48.12 □ 4.2
$L_{DC1:1}$	pSV-□-Gal	%13.21	% 37.45 □ 3.6
$L_{DD2:1}$	pSV-□-Gal	%7.12	% 72.35 □ 1.8
$L_{DD2:1PEG}$	pSV-□-Gal	%6.93	% 71.02 □ 3.2
$L_{DC2:1}$	pSV-□-Gal	%8.12	% 45.21 □ 2.7
$L_{DC2:1PEG}$	pSV-□-Gal	%7.15	% 36.25 □ 3.5
$L_{CD2:1}$	pSV-□-Gal	%8.03	% 74.78 □ 2.2
$L_{CD2:1PEG}$	pSV-□-Gal	%7.12	% 67.55 □ 4.2
$L_{CD1:1}$	pSV-□-Gal	%12.19	% 52.34 □ 3.7
$L_{CD1:1PEG}$	pSV-□-Gal	%11.06	% 47.16 □ 6.1
$L_{CD2:1fx5}$	pSV-□-Gal	%8.13	% 68.92 □ 8.7

L1	pCR3.1-TSP1	%5.82	% 35.12 □ 1.7
L2	pCR3.1-TSP1	%6.06	% 32.78 □ 1.3

3.2.2.2. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Analizlerine İlişkin Bulgular

Formülasyonların partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri bölüm 2.2.3.2.'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Hazırlanan formüllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular kitozan partikülleri için Çizelge 3.6'da, PEI partikülleri Çizelge 3.7'de, lipozom formülasyonları için Çizelge 3.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.6. Kitozan ile hazırlanan formüllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular

Kod	Partikül Büyüklüğü (nm □ SS)	Zeta Potansiyel (mV)
Ch1	580.23 □ 58	8.56
Ch2	475.27 □ 83	1.52
Ch2(x3)	*	*
Ch3	590.35 □ 78	3.25
Ch3(2)	a	a
Ch4	120.69 □ 23	24.47
Ch5	189.17 □ 15	12.84
Ch5(x2)	*	*
Ch5(x1/2)	182.56 □ 56	14.23
Ch6	178.38 □ 47	16.35
Ch7	108.13 □ 14	24.47
Ch7(PBS)	*	*
Ch8	110.37 □ 21	18.23

Ch9	110.12 □ 15	22.78
C1**	145.26 □ 20	29.44
C2**	168.39 □ 36	24.31
C3**	159.25 □ 39	26.71

a: agregasyon nedeniyle okuma gerçekleşmedi; * okuma gerçekleşmedi
** Terapötik gen (pCR3.1-TSP1) içeren formülasyonlar

Çizelge 3.7. PEI ile hazırlanan formüllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerlerine ait bulgular

Kod	Partikül Büyüklüğü (nm □ SS)	Zeta Potansiyel (mV)
PEI1	158.35 □ 34	38.27
PEI2	174.56 □ 56	26.14
PEI3	162.23 □ 49	28.34
P1*	212.76 □ 34	42.56
P2*	246.25 □ 56	35.52
P3*	232.74 □ 49	38.36

* Terapötik gen (pCR3.1-TSP1) içeren formülasyonlar

Çizelge 3.8. Lipozom formüllerine ait partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerleri

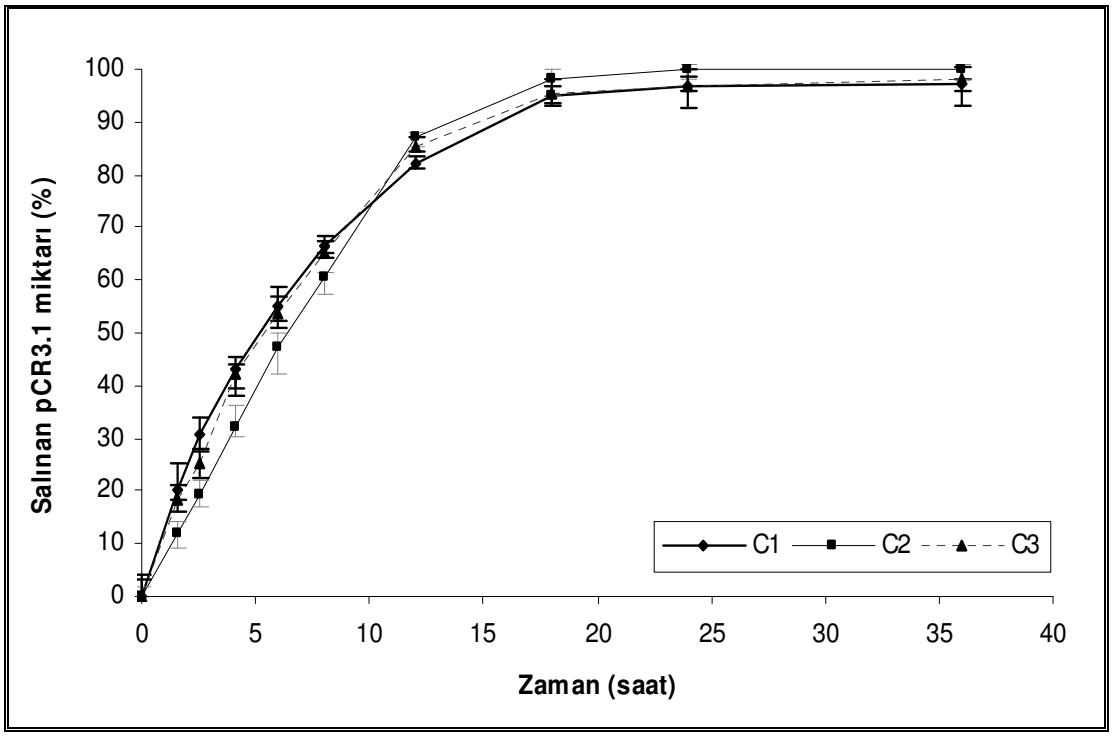
Kod	Partikül Büyüklüğü (nm □ SS)	Zeta Potansiyel (mV)
$L_{DD1:1}$	985 □ 49	54.12
$L_{DD1:1PEG}$	1012 □ 53	48.96
$L_{DC1:1}$	840 □ 54	38.17
$L_{DD2:1}$	890 □ 39	48.50
$L_{DD2:1PEG}$	1024 □ 65	36.47
$L_{DC2:1}$	796 □ 26	58.25
$L_{DC2:1PEG}$	825 □ 97	39.12
$L_{CD2:1}$	830 □ 68	56.12

$L_{CD2:1PEG}$	1150 □ 54	43.58
$L_{CD1:1}$	1005 □ 81	51.36
$L_{CD1:1PEG}$	970 □ 40	39.47
$L_{CD2:1fx5}$	819 □ 92	52.24
L1*	149.34 □ 18	34.58
L2*	135.56 □ 24	36.56

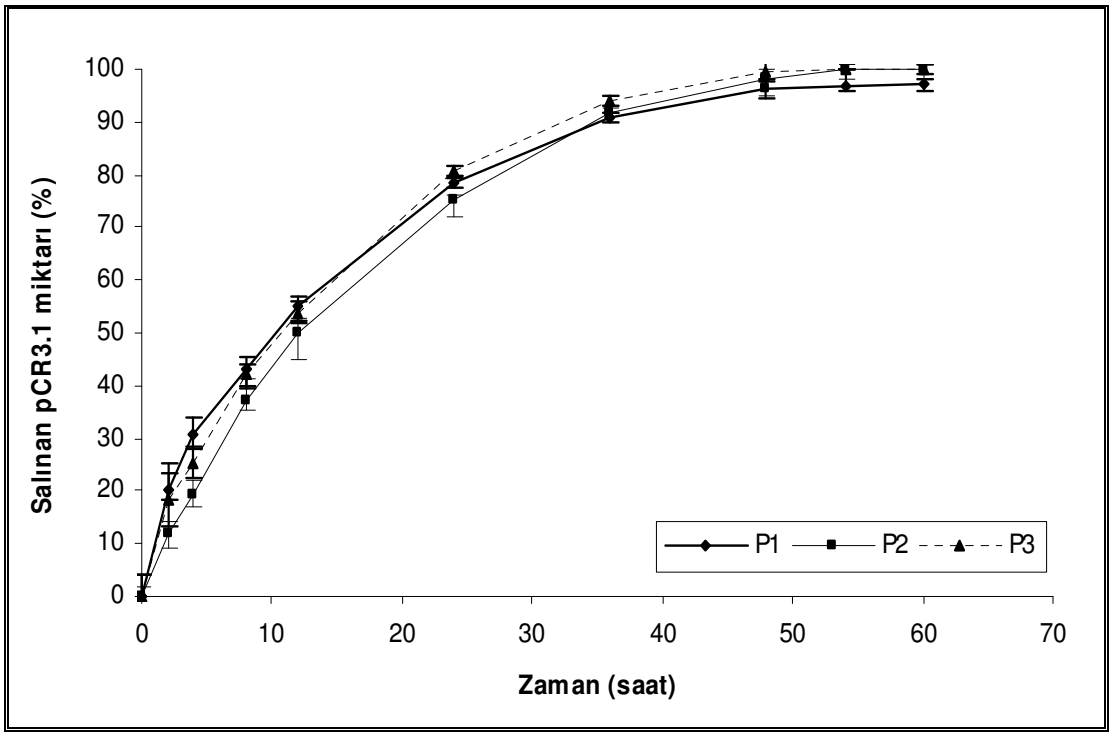
* Terapötik gen (pCR3.1-TSP1) içeren formülasyonlar

3.2.2.3. Terapötik Genin İn-vitro Ortamda Salımına İlişkin Bulgular

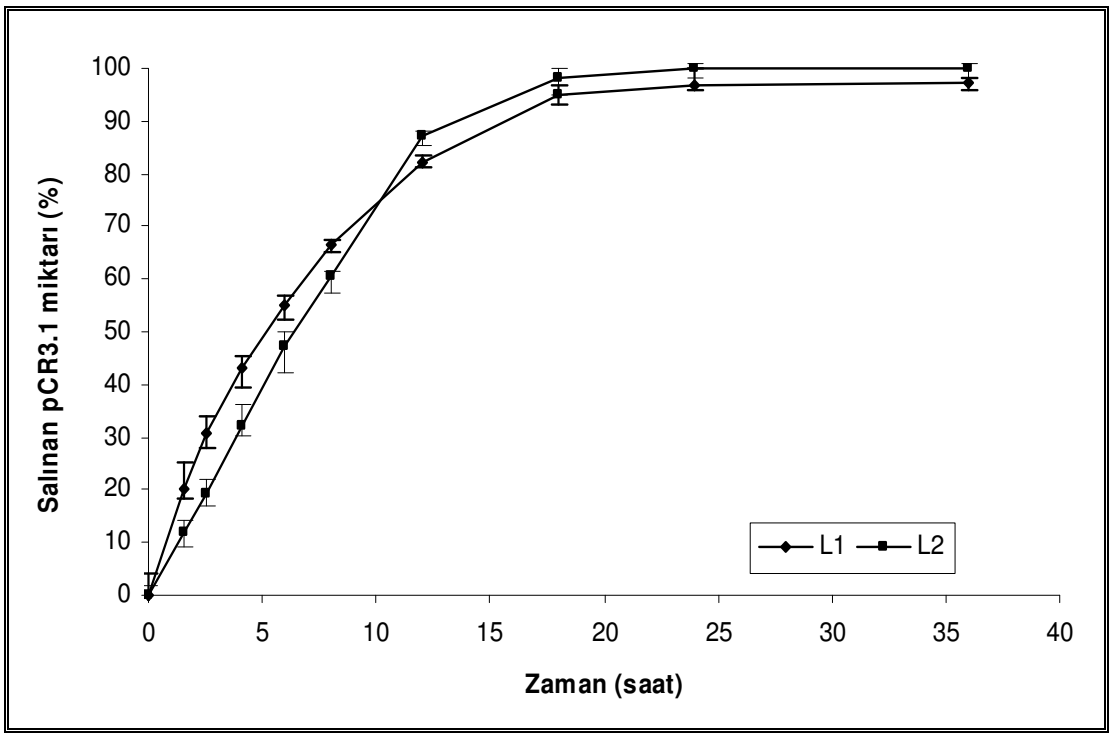
Terapötik gen içeren formülasyonlardan PBS tamponu içeren ortama salınan pDN miktarları hesaplanarak zamana karşı grafikleri çizilmiştir. Salınan pDNA'nın % açığa çıkan madde oranının zamana karşı grafikleri kitozan içeren partiküller için Şekil 3.6'da, PEI içeren partiküller için Şekil 3.7'de ve lipozom formülasyonları için Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.6. Kitozan ile hazırlanan formüllerin PBS ortamında in vitro salım grafiği.



Şekil 3.7. PEI ile hazırlanan formüllerin PBS ortamında in vitro salım grafiği.



Şekil 3.8. Lipozom formülasyonlarının PBS ortamında in vitro salım grafiği.

PCR3.1-TSP1'in zamana karşı yüzde açığa çıkan miktarları ile SPSS 9.0 versiyonu kullanarak elde edilen korelasyon katsayısı (r^2), standart hata (SH), hız sabiti (k), artık kareler toplamı (RMS) Çizelge 3.9'da verilmektedir.

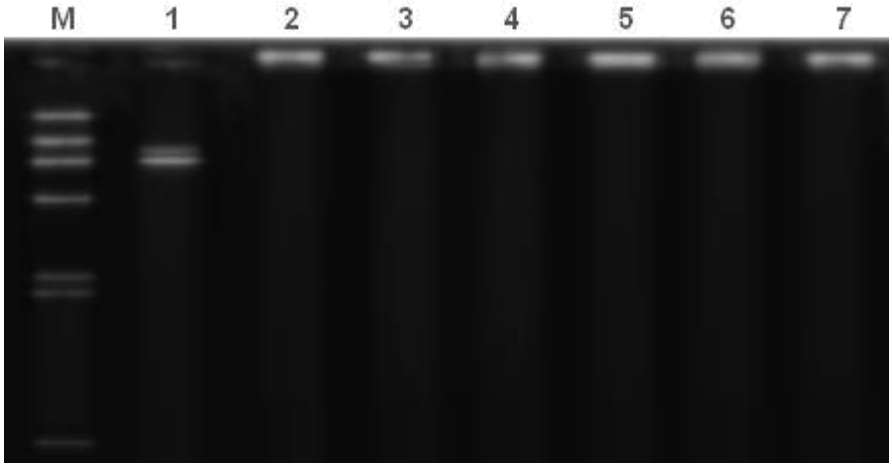
Çizelge 3.9. PCR3.1-TSP1 içeren terapötik gen içeren formüllerin salım kinetik modellerine ait verileri

		$C=C_o-k.t$	$lnC=lnC_o-k.t$	$W_0^{1/3}-W^{1/3}=k.t$	$Q=k.t^{1/2}$	$Log(ln(1/1-Q))= \square log \square - \square log \square_d$
C1	r^2	0.730	0.924	0.931	0.979	0.985
	SH	0.551	0.012	0.011	0.965	0.044
	k	2.561	0.117	0.120	19.896	0.962*
	RMS	366.66	0.168	0.291	104.601	0.003
C2	r^2	0.756	0.950	0.963	0.971	0.990
	SH	0.588	0.020	0.010	1.136	0.064
	k	2.930	0.216	0.156	19.652	1.410*
	RMS	417.59	0.105	0.254	144.822	0.003
C3	r^2	0.856	0.993	0.972	0.992	0.983
	SH	0.350	0.002	0.004	0.471	0.044
	k	2.420	0.063	0.078	15.873	0.934*
	RMS	148.01	0.005	0.049	24.936	0.003
P1	r^2	0.856	0.992	0.980	0.992	0.992
	SH	0.210	0.002	0.003	0.407	0.030
	k	1.447	0.062	0.062	13.968	0.849*
	RMS	210.08	0.018	0.095	41.052	0.002
P2	r^2	0.896	0.978	0.994	0.993	0.991
	SH	0.196	0.005	0.002	0.381	0.045
	k	1.624	0.078	0.077	13.871	1.072*
	RMS	183.07	0.048	0.042	35.934	0.003
P3	r^2	0.868	0.944	0.997	0.993	0.970
	SH	0.214	0.010	0.001	0.399	0.080
	k	1.551	0.100	0.081	14.272	1.008*
	RMS	219.08	0.214	0.020	39.538	0.010
L1	r^2	0.676	0.841	0.875	0.964	0.964
	SH	0.409	0.009	0.009	1.074	0.054
	k	1.671	0.056	0.075	16.759	0.737*
	RMS	401.46	0.178	0.417	173.818	0.006
L2	r^2	0.675	0.816	0.878	0.963	0.938
	SH	0.443	0.010	1.400	1.099	0.087
	k	1.805	0.063	11.251	16.793	0.900*
	RMS	469.73	0.262	63.386	182.052	0.016

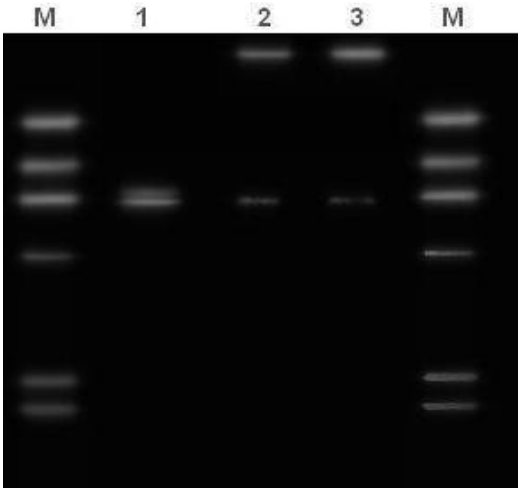
* Weibull dağılım modelinde hız sabiti □ olarak tanımlanmaktadır.

3.2.2.4. Jel Elektroforez Görüntülerine İlişkin Bulgular

Formüllerin pDNA ile kompleks oluşumunun gerçekleştiğinin belirlenmesinde ve DNaz I enzimine karşı korunduğunun kanıtlandığını gösteren agaroz jel elektroforez görüntüleri elde edilmiştir. C1,C2,C3,P1,P2 ve P3 kodlu polimerik partikülleri (Şekil 3.9) ve lipozom formülleri (Şekil 3.10) ile pCR3.1-TSP1'in kompleks oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiştir. C1,C2,C3,P1,P2 ve P3 kodlu polimerik partiküllerinin pCR3.1-TSP1'i içerisinde koruduğu Şekil 3.11'de gösterilmiştir. C1,P1,L1 ve L2 kodlu formüllerin DNaz I enzimine karşı pCR3.1-TSP1'i koruduğu Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

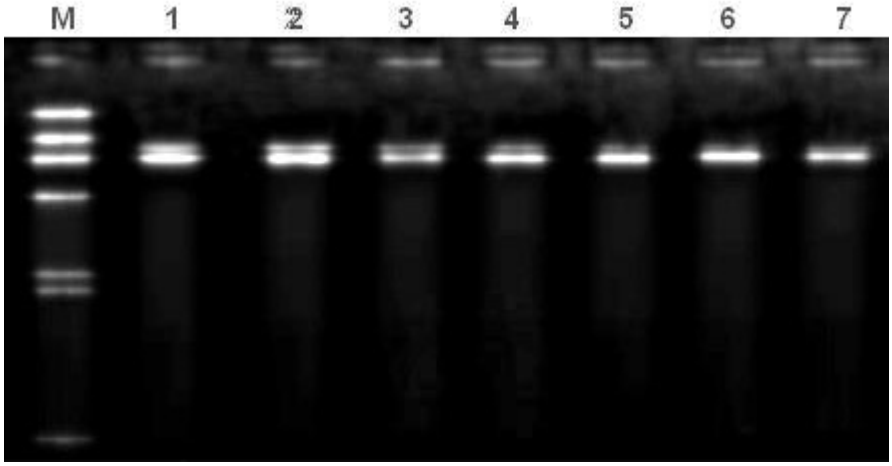


Şekil 3.9. Terapötik gen içeren poliplekslerin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Lambda DNA-HindIII digest belirteci, Satır 1 : pCR3.1-TSP1 terapötik geni, Satır 2-7: C1,C2,C3,P1,P2,P3 formülleri.

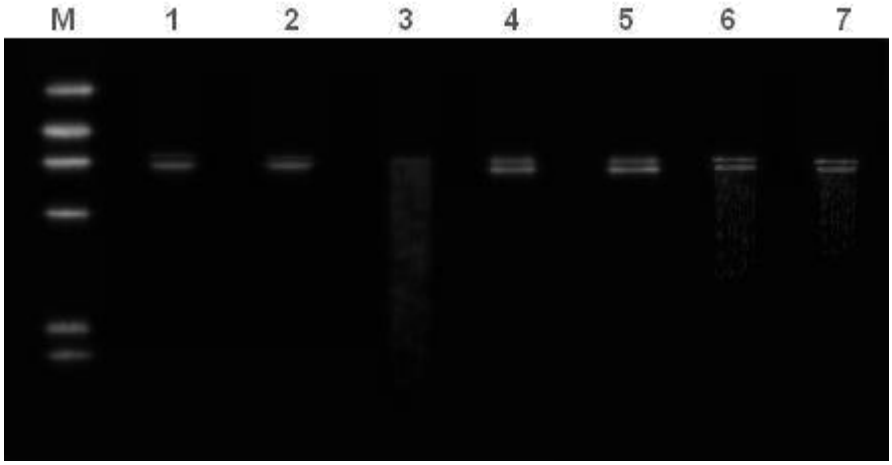


Şekil 3.10. Terapötik gen içeren lipozomların agaroz jel elektroforez görüntüsü.

M: Lambda DNA-HindIII digest belirteci, Satır 1 : pCR3.1-TSP1, Satır 2: L1 formülü, Satır 3: L2 formülü.



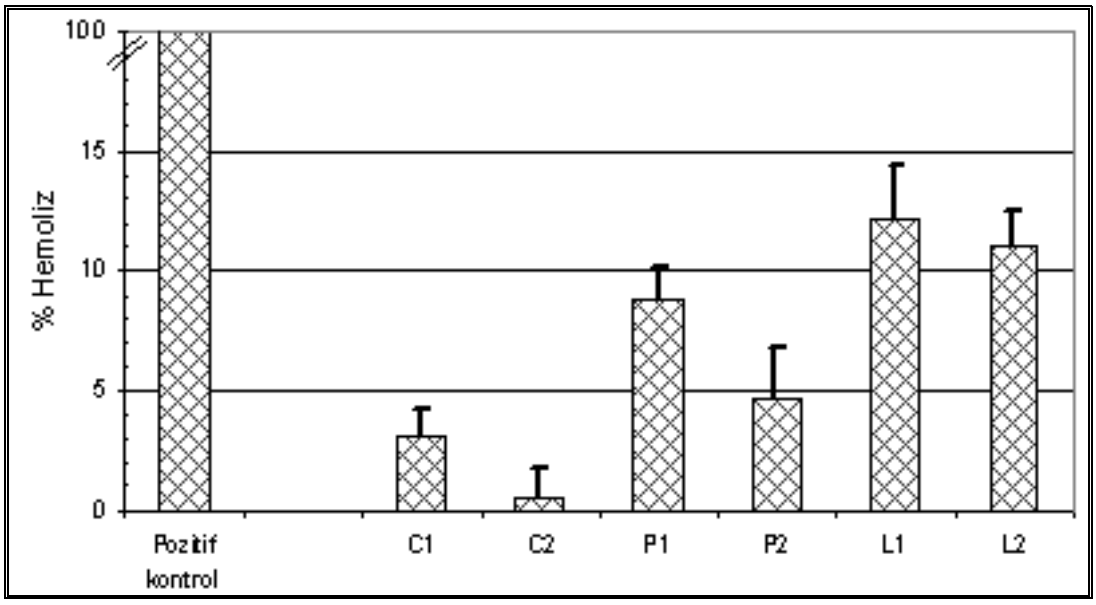
Şekil 3.11. Formül C1, C2 ve C3'ün enzimatik yıkımı, P1,P2 ve P3 kimyasal yıkımı sonucunda elde edilen jel eletroforez görüntüsü.
M: Lambda DNA-HindIII digest belirteci,
Satır 1 : pCR3.1-TSP1,
Satır 2,3 ve 4: C1,C2 ve C3 formülleri + kitozanaz
Satır 5,6 ve 7: P1,P2 ve P3 formülleri + fenol:kloroform



Şekil 3.12. Lipozom formülasyonlarının pDNA'yı koruma etkisi ve DNaz I enzimi muamele edilmiş formüllerin jel elektroforez görüntüleri.
M: Lambda DNA-HindIII digest belirteci,
Satır 1,2 : L1 ve L2 + sıcaklık uygulaması
Satır 3 : pCR3.1-TSP1 + DNaz I
Satır 4: C1 + DNaz I; kitozanaz
Satır 5: P1 + DNaz I; fenol:kloroform
Satır 6: L1 + DNaz I; sıcaklık uygulaması
Satır 7: L2 + DNaz I; sıcaklık uygulaması

3.2.2.5. Hemolitik Aktiviteye İlişkin Bulgular

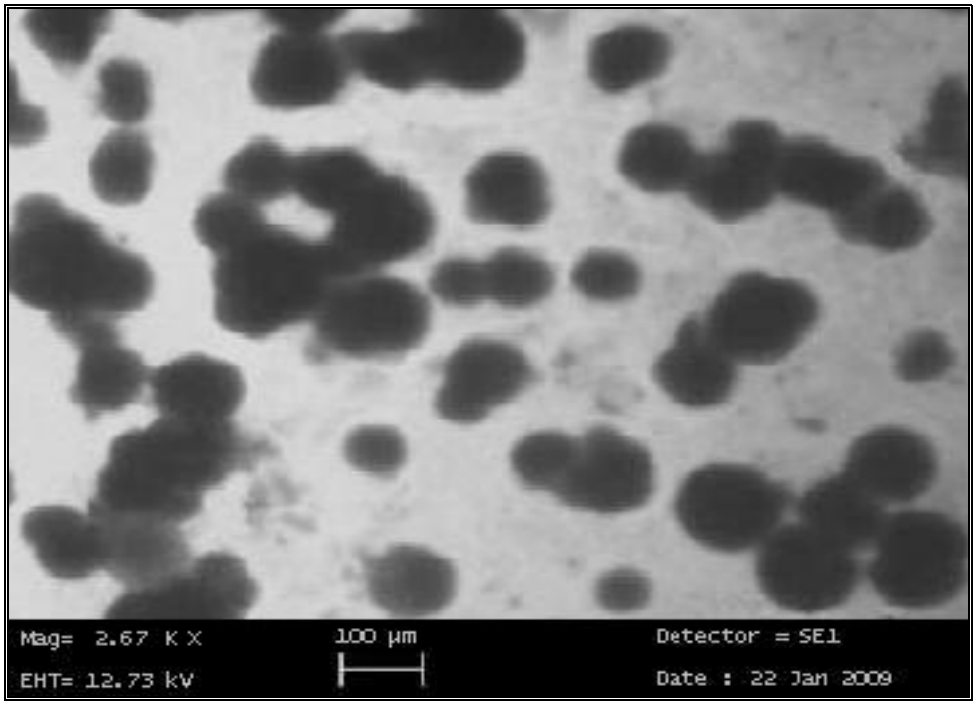
Formüllerin kan proteini varlığında etkileşimleri Şekil 3.13'de verilmiştir.



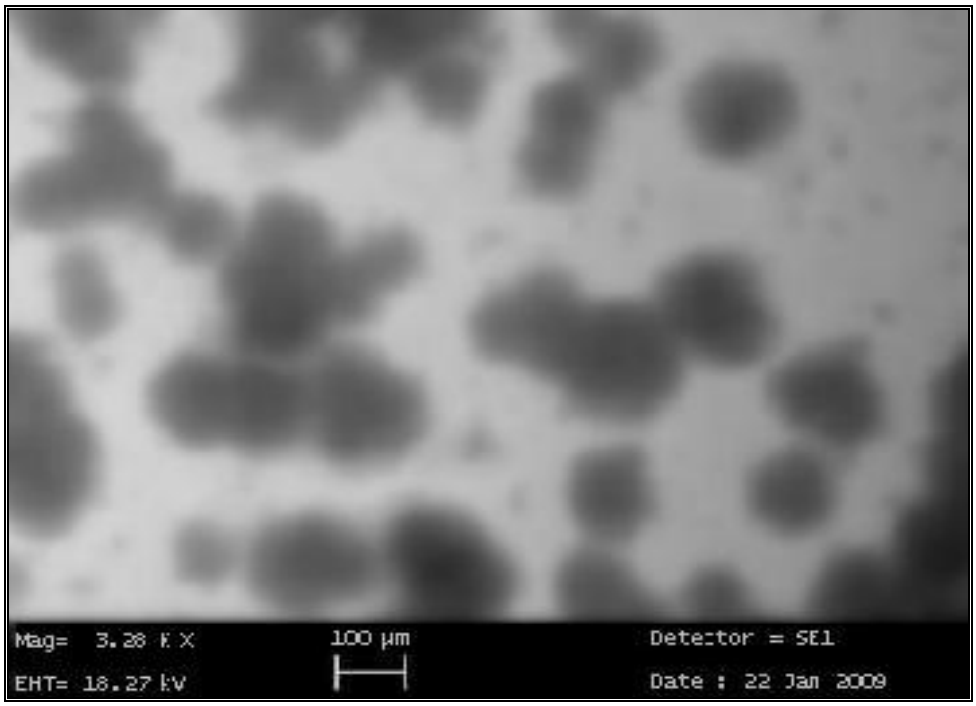
Şekil 3.13. C1,C2,P1,P2,L1 ve L2 kodlu formüllerin hemolitik aktiviteleri.

3.2.2.6. Geçirimli Elektron Mikroskobu Görüntülerine İlişkin Bulgular

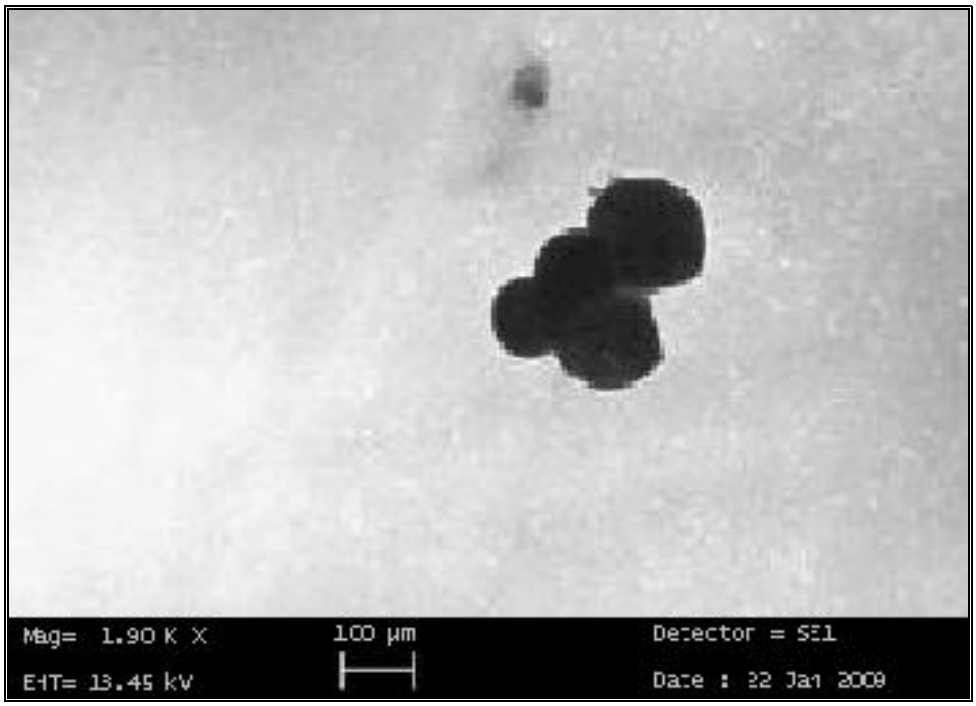
Terapötik gen ve PEG içeren C2,C3,P2,P3,L1 ve L2 formülasyonlarının geçirimli elektron mikroskobundaki (TEM) görüntüleri bölüm 2.2.3.6.'da anlatıldığı şekilde fotoğraflanmıştır (Şekil 3.14-3.21).



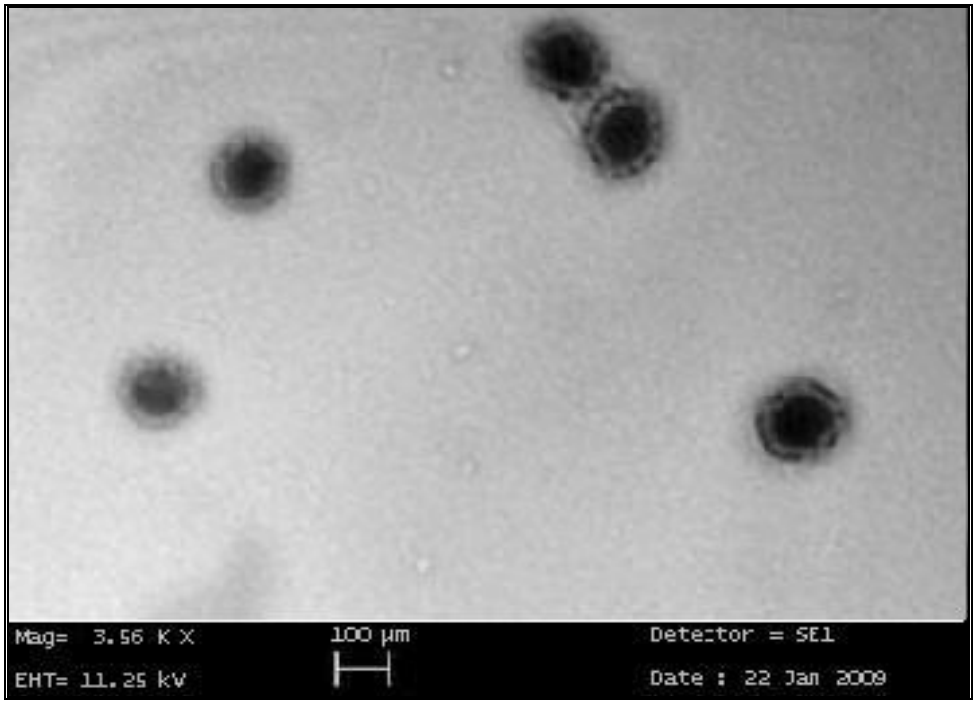
Şekil 3.14. Kitozan:PEG konjugatı ile hazırlanan (C2 kodlu) formülasyonun TEM mikrografı.



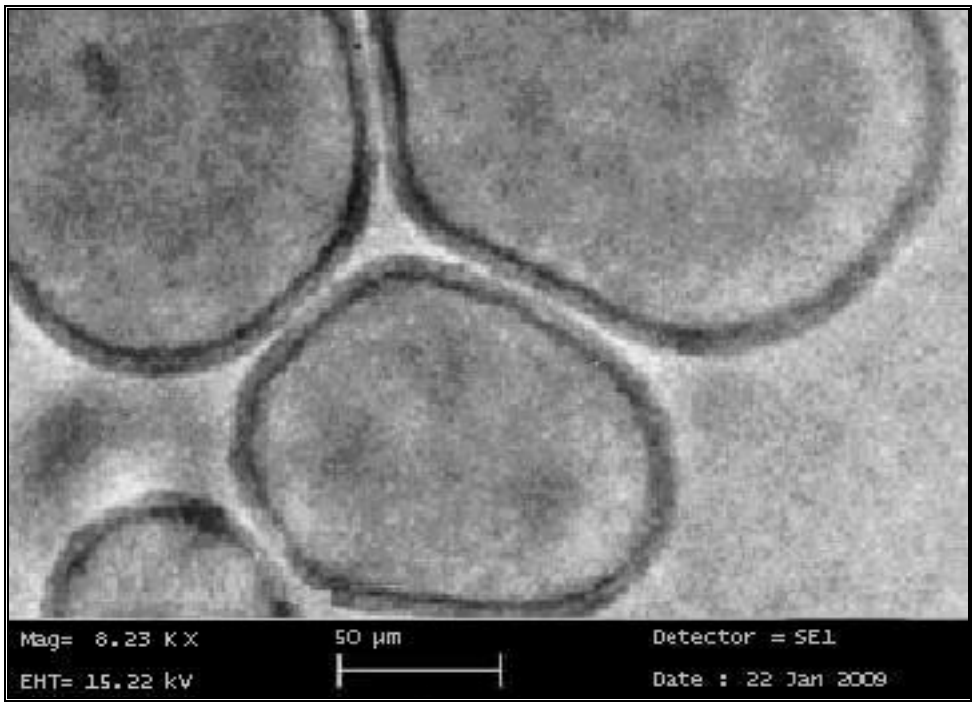
Şekil 3.15. PEG kaplı kitozan formülasyonun (C3 kodlu) TEM mikrografı.



Şekil 3.16. PEI:PEG konjugatı ile hazırlanan (P2 kodlu) formülasyonun TEM mikrografı.



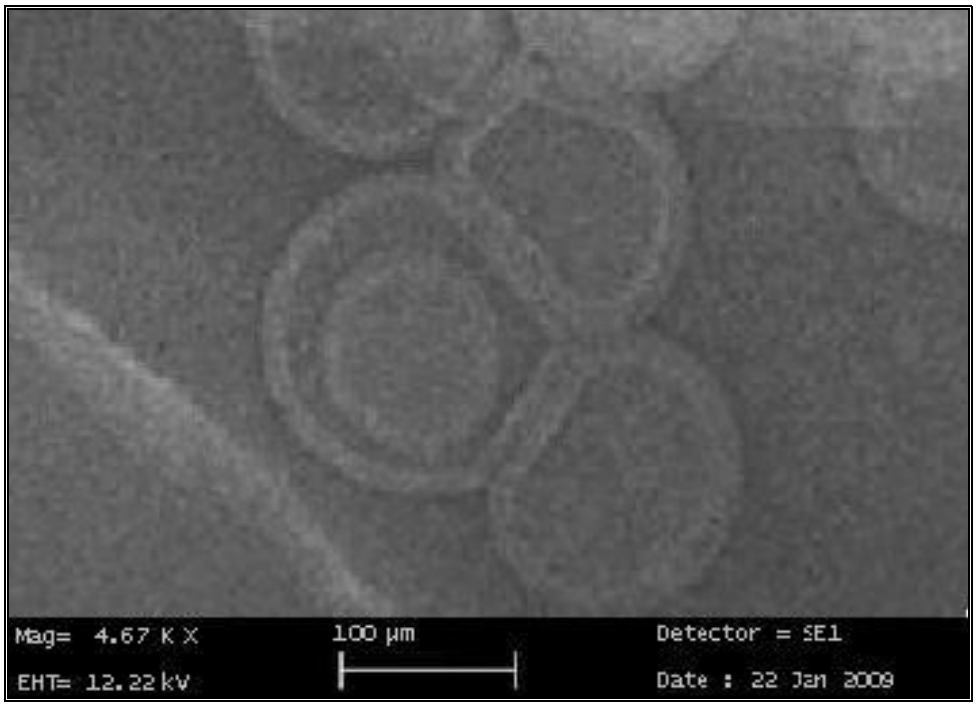
Şekil 3.17. PEG kaplı PEI formülasyonun (P3 kodlu) TEM mikrografı.



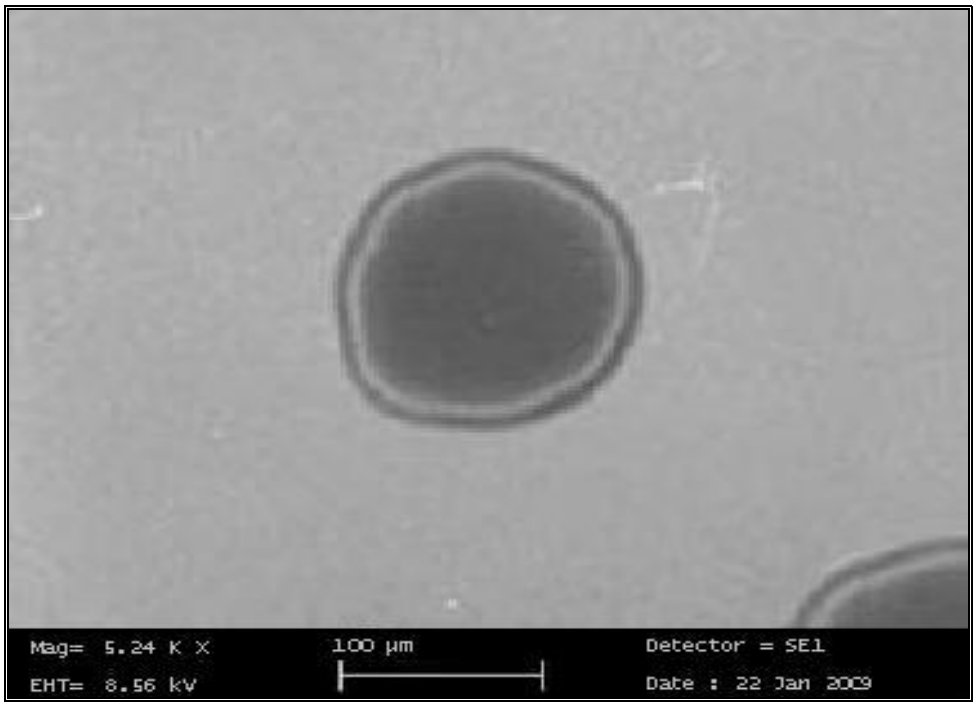
Şekil 3.18. L1 kodlu formülasyonun (DOTAP/DOPE/PEG) TEM mikrografı.



Şekil 3.19. L1 kodlu formülasyonun (DOTAP/DOPE/PEG) TEM mikrografı.



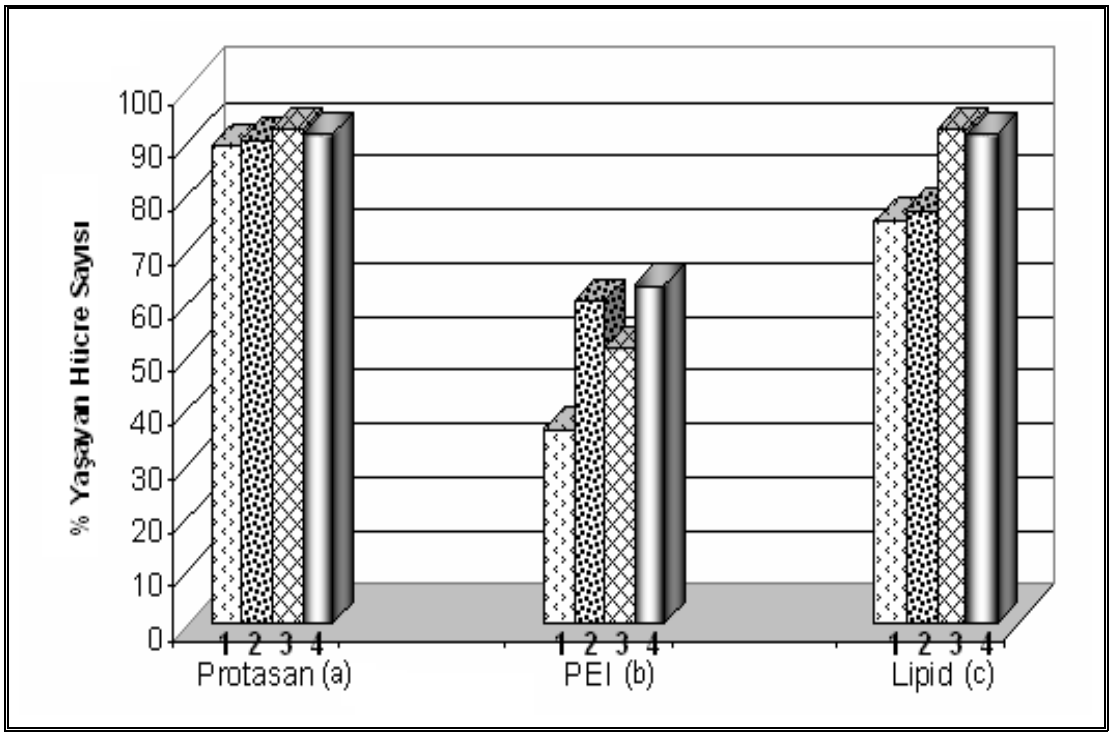
Şekil 3.20. L2 kodlu formülasyonun (DC-Chol/DOPE/PEG) TEM mikrografı.



Şekil 3.21. L2 kodlu formülasyonun (DC-Chol/DOPE/PEG) TEM mikrografı.

3.2.2.7. Formüllerin Sitotoksisite Analizine İlişkin Bulgular

Formül ve konjugatların MCF-7 hücrelerine 5 μg/mL oranında 24 saat boyunca uygulanması sonrası, ortamda yaşayan hücre sayısı, kontrol grupları ile orantılanarak hesaplanmıştır (Şekil 3.22.).

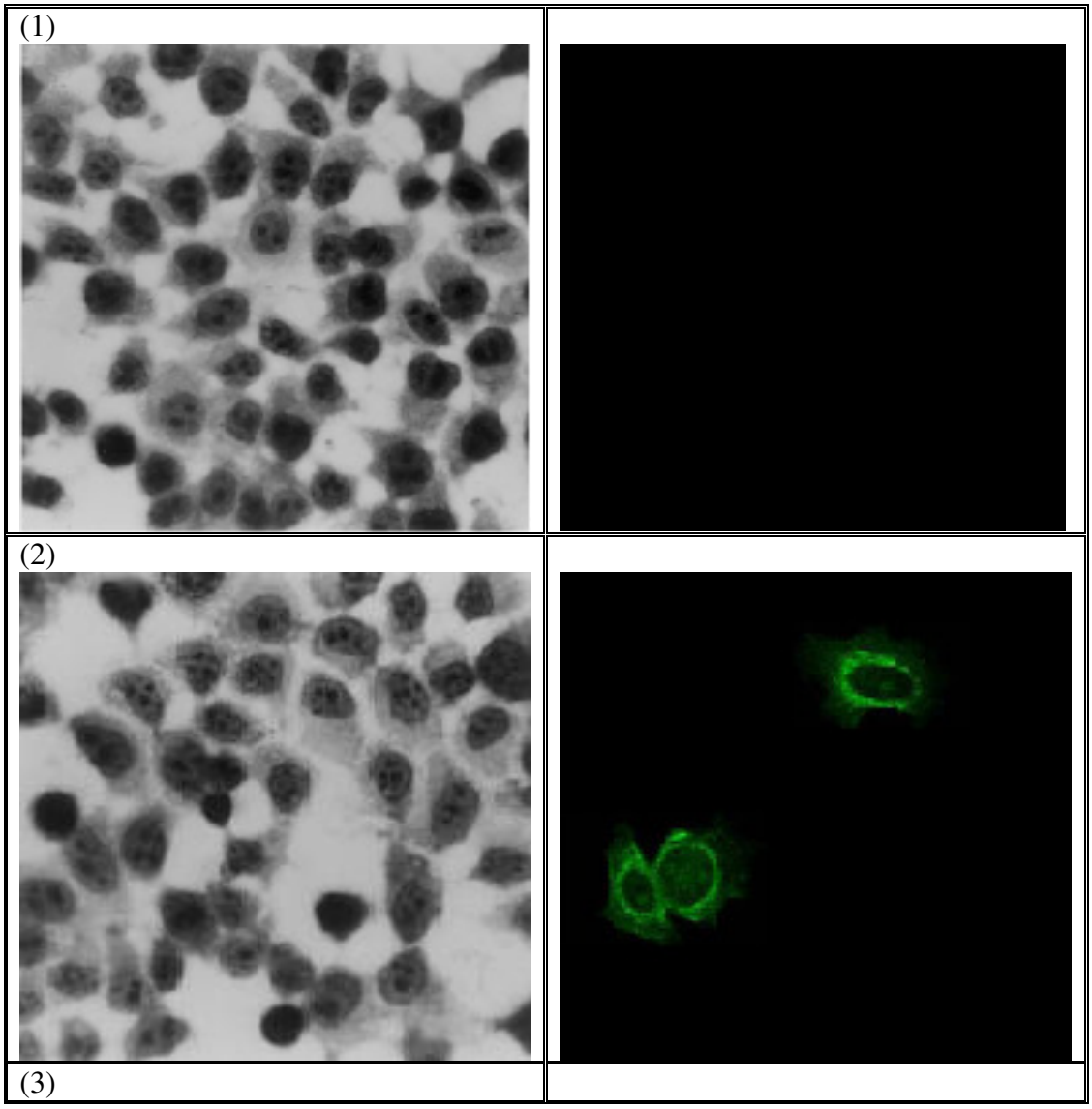


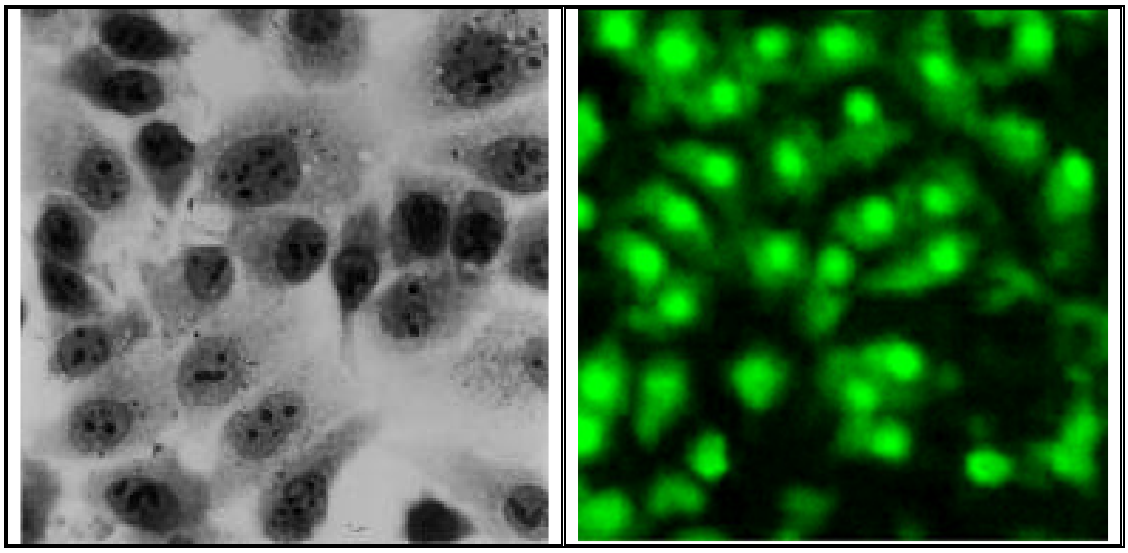
Şekil 3.22. MCF-7 hücrelerinde; a) kitozan (1), kitozan konjugatı (2), kitozan+pDNA(3) ve kitozan konjugatı+pDNA (4), b) PEI (1), PEI konjugatı (2), PEI+pDNA (3), ve PEI konjugatı+pDNA (4), c) DOTMA+DOPE (1), DcChol+DOPE (2), L1 formülü (3) ve L2 formülünün (4) sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi.

3.2.2.8. Formüllerin Gen Aktarım Etkinliğine İlişkin Bulgular

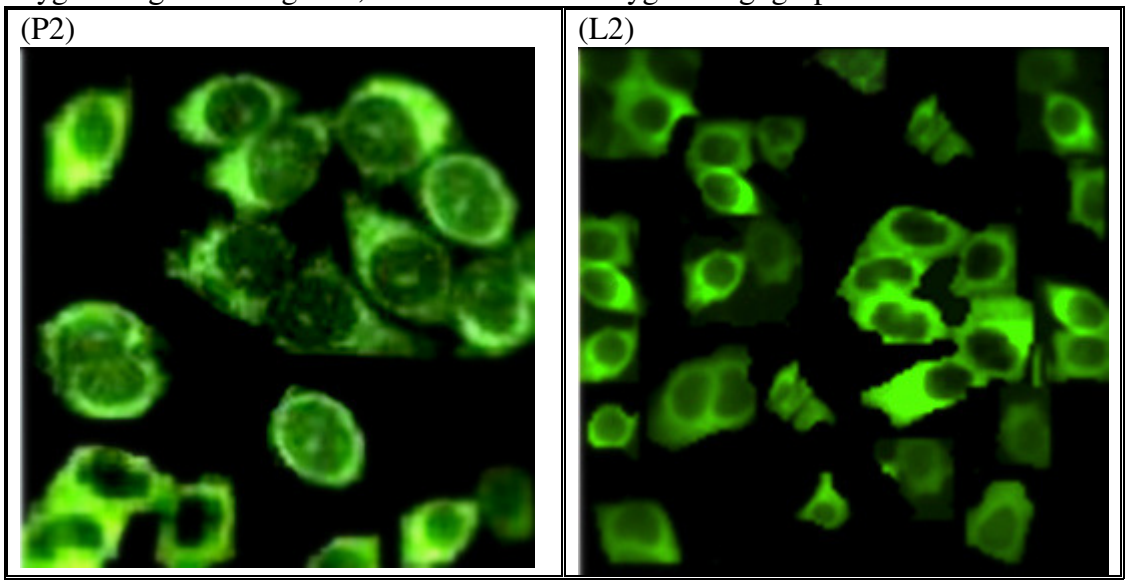
MCF-7 hücre hattında formüllerin gen aktarım etkinlikleri Şekil 3.25.'de özetlenmiştir. Ayrıca anti V5-FITC ile pCR3.1-TSP1 plazmidi ve sentezlediği V5

proteini floresan ışık altında incelenmiş ve yeşil renkli yayılan floresans Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'de görülmektedir.

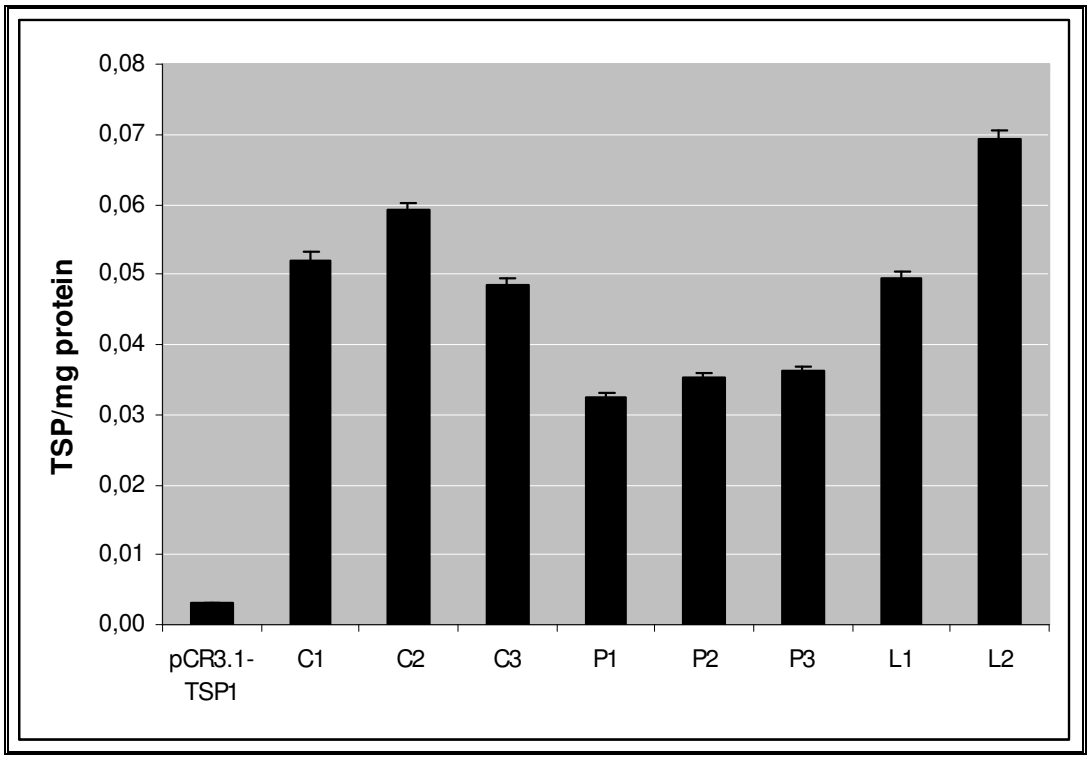




Şekil 3.23. Normal mikroskop ve floresan filtreli görüntüleri (X40)
1:Polimer ve lipid çözeltilerin uygulandığı kontrol grubu; 2: pCR3.1-TSP1'nin yalnız uygulandığı kontrol grubu; 3: C2 formülünün uygulandığı grup.

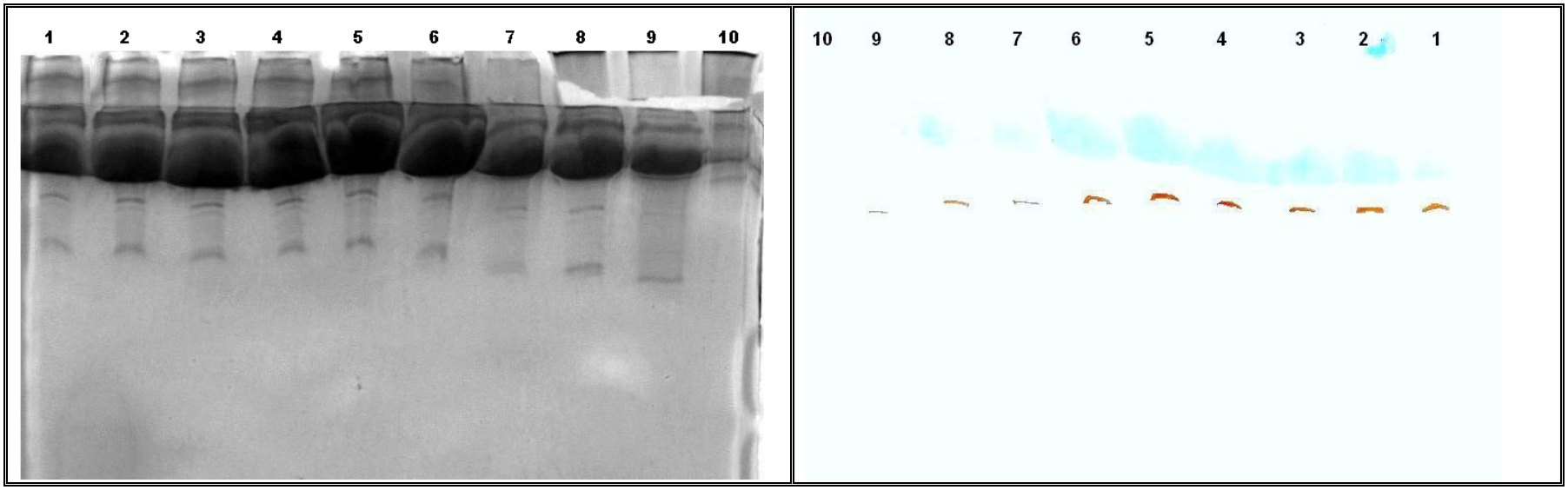


Şekil 3.24. Floresan ışık altındaki P2 ve L2 formüllerinin floresan filtreli mikroskop görüntüleri (X40).



Şekil 3.25. MCF-7 hücrelerinde gen aktarım etkinliğinin trombospondin proteinin miktarı olarak teşhisi. 48 saat sonunda ortama salınan protein miktarının kümülatif miktar tayini (n=5)

MCF-7 hattına uygulanan formüllerin inkübasyonu sonrası alınan besi yeri örnekleri 2.2.3.8. başlığı altında belirtildiği üzere, poliakrilamid jele aktarılmış (Şekil 3.26a.), western blot tekniği ile ortamdaki TSP-1 protein miktarı membran üzerinde görüntülenmiştir (Şekil 3.26b.). Jel üzerinde görünen protein bantları, 0.45 μm por çapına sahip PVDF mikropor membrana aktarılmıştır. Kullanım kitapçığında 10 kDa üzerindeki proteinler için aktarım uygundur ifadesi yer almasına rağmen, 45 kDa civarındaki TSP proteini için yine de uzun zaman altında düşük voltaj uygulanmıştır. Bölüm 2.2.3.8.'de yer alan protokole göre uygulama yapıldığında jelin iz düşümü olan PVDF membran görüntüsünde TSP proteinleri kırmızı-mor lekeler olarak görülmektedir. Bu lekelerin varlığı MCF hücrelerinde TSP'nin başarılı bir şekilde ortama salındığını göstermektedir.



Şekil 3.26. Hücre kültürü uygulamalarından alınan örneklerin poliakrilamid jele uygulanması (a), ve bu görüntünün PVDF membranındaki aksi (b).
Satır 1-3: Kitozan formülasyonları (1:PEG içermeyen, 2:PEG konjugasyonu ile hazırlanan, 3: PEG kaplaması yapılan formüller)
Satır 4 ve 5: PEG içeren lipozom formülasyonları (4:DOTAP/DOPE içeren formül, 5:DC-Chol/DOPE içeren formül)
Satır 6-8: PEI formülasyonları (6:PEG içermeyen, 7:PEG konjugasyonu ile hazırlanan, 8: PEG kaplaması yapılan formüller)
Satır 9: pCR3.1-TSP1 tek başına uygulaması
Satır 10: Molekül ağırlığı standart belirteci

4. TARTIŞMA

4.1. Genetik Materyal

Kısıtlayıcı enzimlerle pBluescripT taşıyıcı vektöründen (cDNA klonuclone MGC:32979, IMAGE Klon ID:5266513) yapışkan uçlu 2221 bp TSP1 geni elde edilmiştir. pCR3.1 vektörüne aynı enzimlerle kesilerek TSP1 geni aktarıldığında 7 kb'lık yüksek saflıkta vektör elde edilmiştir (Şekil 3.1. ve Çizelge 3.1.). PCR kullanılarak çoğaltılan plazmidin hem halkasal yapı gösterdiği, hem de üzerine kıvrılarak süper sarmal (süpercoiled) yapıda bulunduğu gözlenmiştir. Artık ürün veya yanlış kodlanmış ürün jel elektroforezinde belirlenemediğinden, herhangi bir saflaştırma işlemine gerek duyulmadan elde edilen plazmid kullanılmıştır.

Çalışmamızda ürettiğimiz vektörün süper sarmal yapısının, açık halkasal yapıdan daha fazla bulunması, bize gen aktarımında ve daha küçük partikül hazırlamada avantaj sağlamıştır. Tseng ve arkadaşları (2008) süper sarmal yapının, hazırladıkları gen taşıyıcı sisteminde, gen aktarımında olumlu etki gösterdiğini ifade etmesi de bulgumuzu desteklemektedir. Kit ile yaptığımız üretimin sınırlı olması nedeniyle, plazmidin bakteri ortamında çoğaltılması ve bu ortamdan saflaştırılması gerekmektedir. Süper sarmal aleyhine dengenin bozulmaması ve oluşabilecek farklı safsızlıkların önüne geçmek için terapötik gen taşıyan plazmid, bakteri ortamında çoğaltılmamıştır. Saf ama belli miktarda bulunan pCR3.1-TSP1 plazmidinin çok fazla harcanmaması için sadece istenilen özellikleri taşıyan C1,C2,C3,P1,P2,P3,L1 ve L2 kodlu formüller hazırlanırken kullanılmıştır. Ön formülasyon çalışmalarında ise 5 kb büyüklüğündeki model plazmid kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.2. Gen Taşıyıcı Sistem

4.2.1. PEGilasyon

Yeni nesil taşıyıcı sistemlerde yapılan modifikasyonundan biri de formülasyona polietilen glikol ilavesidir. Song ve arkadaşları (2002) lipozom formülasyonunda yapılan PEGilasyonun zamanla bozulduğunu ve bu nedenle yapı içerisine entegrasyonu tam sağlanamadığında opsoninler tarafından daha çabuk eliminasyona uğradığını ifade edilmektedir. Böyle bir olumsuzlukla karşılaşmamak için PEG'in kimyasal olarak yapı içerisine modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PEG'in katyonik yapı ile konjugasyonu aktif PEG bileşikleri ile sağlanmıştır (Neu ve ark, 2007).

Asetil gruplarının uzaklaşması sonucu kitozan türevlerinin katyonik özellik kazandığı bilinmektedir (Singla ve Chawla, 2001). Bu grup üzerinden pDNA'nın fosfat grupları ile etkileşmeye girerek nanopartikül oluşumu sağlanmaktadır (Bozkir ve Saka 2004a). PEG de aynı grup üzerinden yapıya katılmaktadır. Bu nedenle PEG miktarının çok olması durumunda pDNA ile etkileşecek bölgenin kısıtlı olmasına bağlı problemler oluşacaktır. Farklı oranlarda farklı molekül ağırlığındaki PEG ile yapılan çalışmalarda (Zhang ve ark, 2007; Neu ve ark, 2007) en uygun oranın %10'u aşmaması gerektiği bildirilmektedir. Bu oran dikkate alınarak hazırlanan formüller ile partiküller elde edilmiştir. Oran yarıya düşürüldüğünde, PEG'in etkisinin olmadığı üç katına çıkan oranda ise partiküler yapı elde edilmediği kitozan ön formülasyonlarında görülmüştür.

PEGilasyonun başarı ile gerçekleştiği elde edilen partiküllerin yapısal özelliklerinin değiştiğinden de anlaşılmaktadır. Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelindeki değişimler ve çekilen TEM mikrografları PEGilasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu modifikasyonun kimyasal olarak gerçekleştiği ise H-NMR analiz sonuçları ile elde edilmiştir.

H-NMR ile analizi gerçekleştirmek için numunelerin H içermeyen çözeltilerde çözünmesi gerekmektedir. Bu nedenle kitozan için DCl ve D_2O (Sugimoto ve ark., 1998) kullanılırken, PEI için $CDCl_3$ (Tian ve ark., 2005) kullanılmıştır.

Çalışmamızda üç farklı kitozan türevi kullanılmıştır. İlk ikisi suda çözünmeyen, diğeri ise suda çözünen tuz formundadır. Suda çözünmeyen kitozan türevlerinin PEGilasyonu ile Ch2,Ch3,Ch5,Ch6 kodlu formüller hazırlanmıştır. Ancak, PEG konjugasyonu yapılmış suda çözünmeyen kitozan partiküllerinin H-NMR analizleri yapılamamıştır. Sugimoto ve arkadaşları (1998) suda çözünmeyen kitozanın PEGilasyonu ile kitozanın hidrofilik özellik kazandığını iddia etmektedirler. Analiz için numune hazırlama ve okuma sırasında, cihazın sıcaklığının artırılması ve/veya DCl miktarının artırılmasına rağmen, çözünme problemi nedeniyle H-NMR spekturumları alınamamıştır. Diğer taraftan suda çözünür ve yüksek saflıktaki kitozan ile H-NMR analizleri problemsiz gerçekleştirilmiştir. Suda çözünür özellikteki (Protasan) kitozanın spekturumunda 3.2-2.0 ppm (Şekil 3.3a.) arasında pik bulunmazken, PEG:kitozan konjugatında □=2.361 ppm 'de (Şekil 3.3b.) $–NH-CH_2CH_2O-$ grubuna ait pik gözlenmektedir. Bu pikin varlığı kitozan polimer iskeleti üzerinde başarı ile PEG konjugasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Kitozanın, pDNA veya PEG ile bağlanmasına birinci derecede etki eden serbest amin grubunu ($-NH_2$) etkileyen asetil grubu, kitozan spekturumunda 2.1 ppm iken konjugasyon sonrasında 1.8 ppm'e gerilemiştir. Bu veri bize PEG konjugatı ile hazırlanan formüllerdeki enkapsulasyon etkinliğindeki azalmayı açıklamaktadır.

Polietilenimine ait H-NMR spekturumlarından, PEI'nin PEG konjugasyonu rahatlıkla gözlenmektedir (Şekil 3.4.) PEI'e çok benzer yapı gösteren polihidroksietil aspartamit polimeri ile yapılan çalışmada (Craparo ve ark, 2006) PEG'e ait $–CH_2CH_2O-$ pikinin 3.5 ppm'de yüksek şiddette görüldüğü belirtilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz spekturumlar karşılaştırıldığında polimere ait pikler 1.5-2 ppm arasında görülürken, konjugatda ise ayrıca $–CH_2CH_2O-$ grubuna ait yüksek şiddet gösteren □=3.6 ppm piki görülmektedir.

4.2.2. Formüllere Ait Parametreler

4.2.2.1. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler incelendiğinde enkapsülasyon etkinliği üzerine etki eden parametrelerin varlığı görülmektedir. PEGilasyon enkapsülasyon üzerine olumsuz etki göstermektedir. Kitozan formülasyonlarındaki enkapsülasyon etkinliklerinde yaklaşık %10 oranında düşüş gözlenirken diğer formüllerde bu oran daha azdır. Kitozanın PEGilasyondan çok etkilenmesinin sebebi, bu partiküllerin oldukça yüksek enkapsülasyon değerine sahip olması ve pDNA ile PEG'in aynı bölgeye bağlanması olarak açıklanmaktadır. Prego ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışma sonucunda peptit özellikteki maddeler ile hazırlanan kitozan nanopartiküllerinin PEG ile muamelesinden enkapsülasyon etkinliklerinin yüksek oranda düştüğünü göstermişlerdir. Ayrıca bizim bulgularımıza paralel olarak PEG ilave edilmiş formüllerin partikül büyüklüklerinde de artış gözlemişlerdir.

pDNA'nın büyüklüğünün değişmesi de enkapsülasyon etkinliği ve yüklenen plazmid miktarını olumsuz etkilemektedir. 5 kb büyüklüğündeki model plazmid yerine 7 kb büyüklüğündeki terapötik gen içeren plazmid (PSV3.1-TSp) uygulandığında, daha fazla bulunan fosfat grubunun daha fazla katyonik yapı ile etkileşme eğilimi nedeniyle, daha fazla katyonik yapı formüle dahil olmaktadır. Bu nedenle katyonik yapı daha artmakta dolayısıyla enkapsülasyon etkinliği negatif yönde etkilenmektedir. Tseng ve arkadaşları (2008) çalışmamızda kullandığımız plazmid büyüklüğüne benzer iki farklı plazmid ile yaptıkları çalışmada, kullanılan polimer:pDNA oranı artıkça negatif etkileşmenin çok daha fazla olduğunu belirtmektedirler.

Farmasötik kalitede kullanılan kitozan türevlerinin, ultra saf özellikte ve suda çözünür özellikte olmayan kitozan türevlerinden (fluka) daha düşük enkapsülasyon etkinliği göstermeleri, aralarındaki deasetilasyon derecesinin farklılığına

bağlanmaktadır. PEGilasyon basamağının enkapsülasyon aşamasındaki olumsuz etkisinden kaçınmak için %70-%80 oranında deasetilasyon derecesine ait türevler seçilmiştir. Ultrasaf özellikte olmayan kitozanın (Fluka) deasteilasyon derecesi %82 olarak tayin edilmiştir (Bozkır ve Saka, 2004a). Farmasötik kalitede ve ultra saf özellikte olmasına rağmen suda çözünmeyen kitozan (Chitech) benzer deasetilasyon derecesi göstermesine rağmen, farklı enkapsülasyon etkinliği göstermektedir. Bu beklenmeyen durumun, kitozanın farmasötik kalitede elde edilmesi için geçirildiği aşamaların etkisinden kaynaklanmakta olduğu, ultra saf özellikte olmayan kitozan türevinin (Fluka) süzülürken birçok safsızlığının uzaklaştırılmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. Böylece tartılan kitozan miktarından daha az kitozanın kısmi olarak daha fazla asetik asit ile etkileşmeye girmesinin bu farklılığa neden olabileceği sonucuna varılnıştır.

4.2.2.2. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Değerinin Değerlendirilmesi

Nanoteknoloji bilimi, üretilen taşıyıcıların etkin gen aktarımını başarı ile sağlaması amacıyla nano taşıyıcıların 100 nm ve altında olmasını amaçlamaktadır (Bozkır ve Saka, 2006). Hazırladığımız formüller ile bu boyutun altına inmek oldukça zordur. Bu boyutlara inmek için daha yeni bir teknoloji olan dot-matriks gibi farklı formülasyon teknikleri ile çalışmak gerekmektedir. Suda çözünen özellikteki kitozan ile hazırlanan formüllerde 100 nm sınırına oldukça yaklaşılmıştır (CH7:108 nm; CH8:110 nm) (Çizelge 3.6.). Terapötik pDNA büyüklüğünün fazla olması ve PEGilasyonun partikül büyüklüğünü artırması nedeniyle, çalışmaya uygun bulunan formüllerin ortalama partikül büyüklükleri 135-245 nm arasında değişmektedir. (C1:145 nm, C2:168 nm, C3:159 nm, P1:212 nm, P2:246 nm, P3:232 nm, L1:149 nm, L2:136 nm, Çizelge 3.6.)

Lipozom formülasyonları ise ilk hazırlandıklarında oldukça büyük boyutlarda elde edilmiştir (yaklaşık 1 μm). Taze hazırlanan lipozomal yapılar, zorlanarak 0.45 μm'lik filtreden geçirilmiş ama elastik özelliklerinden dolayı istenilen boyuta ulaşılamamıştır. Yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren iki formül, azot gazı

altında hem 0.45 μm hem de 0.22 μm'lik filtrelerden geçirilmiş ve arzu edilen boyutlara ulaşılmıştır (L1:149 nm, L2: 136 nm, Çizelge 3.8.). Ancak uygulanan basınç nedeniyle veziküler yapılarında parçalanmalar oluşmuş, bu nedenle enkapsülasyon etkinlikleri değeri düşmüştür.

Partiküllerin hem stabiliteleri hem de vücut içerisindeki etkileşmelerinin bir ölçütü olan zeta potansiyel değeri, hazırladığımız formüller için çok önemli bir parametredir. Partikülün yüzey yükünün ifadesi olan zeta potansiyelin, sıfırdan farklı olması istenir. Nötr değerdeki partiküllerin stabilitesi oldukça zayıftır. +30 mV'un üzerindeki ve -30 mV'un altındaki zeta potansiyele sahip formüllerin stabilite özellikleri olumlu kabul edilir. Kitozan türevleri ile hazırlanan partiküllerin zeta potansiyel değerleri sırası ile C1:29 mV, C2:24 mV, C3:27 mV arasındadır (Çizelge 3.6.). Bu değerlerin diğer formüllere P1:43 mV, P2:36 mV, P3:38 mV, L1: 35 mV, L2:37 mV (Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.8.) göre daha düşük olması nedeniyle salım çalışmaları 20 saatte sonlanırken; diğer formüllerin salımı 48 saat boyunca devam etmektedir. Negatif yük özelliği gösteren hücre çeperi ile pozitif yüzey yüküne sahip formüller daha etkin bir taşıma sağlamaktadırlar (Merdan ve ark., 2002). Özellikle lipozom formülasyonunun (L2:37 mV) hücre çeperi ile etkileşmesi nedeniyle gen aktarım etkinliği diğer formüllere göre oldukça yüksektir. Polimerik yapılar ise hücre çeperi ile etkileşmeden hücre içine alındığından yüksek pozitif yüzey yüküne sahip PEI partikülleri hücre içerisine daha zor alınacaktır. Kitozanın bu avantajı gen aktarım etkinliğine de yansımıştır.

Tüm formüller incelendiğinde, partiküllerin "+" zeta potansiyel değerine sahip olduğu görülmektedir. Kodlu olan suda çözünmeyen formüler 2 ila 9 mV değerine sahiptirler. Bunun sebebinin enkapsülasyon etkinliğinde belirtilmiş olan safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmüştür. Diğer formüllerin nispeten yüksek zeta potansiyel değeri göstermesi, pDNA'nın daha çok formüllerin iç yüzeyinde göstermektedir. PEG içeren formüllerin, içermeyenlere oranla daha düşük zeta potansiyel değeri göstermesi, PEGilasyonun başarı ile gerçekleştiğinin bir diğer kanıtı olduğu düşünülmüştür.

4.2.3. Terapötik Gen İçeren Formülasyonlar

Bölüm 4.1.'de de bahsedildiği üzere sınırlı miktarda bulunan pCR3.1-TSP1 nedeniyle yüksek enkapsülasyon etkinliğine uygun zeta değerine sahip formüller ile terapötik gen içeren formüller hazırlanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarımız C1,C2,C3,P1,P2,P3,L1 ve L2 kodlu formüller üzerinden yapılmıştır.

4.2.3.1. Genetisin İçeren Formüllerin Değerlendirilmesi

Aminoglikozit türevi olan genetisin ile pCR3.1-TSP1'in kombine verilmesi amaçlanarak Çizelge 2.4'de özetlenen K1,K2,K3,K4 ve K5 kodlu formüller hazırlanmıştır. Oldukça düşük oranda genetisin formüle ilave edilmiş olmasına rağmen, partikül elde edilememiştir. Genetisinin, pDNA'nın adenozin grubu üzerinden hidrojen bağları ile bağlanarak (Vicens ve Westhof, 2003), fosfat grubu ile katyonik polimerin etkileşmesini engellediği düşünülmüştür. Bu nedenle kombine tedavi düşünülürse pDNA'nın aminoglikozit içerisinde verilmesi uygun bir yaklaşım değildir. Turan ve arkadaşlarının (2003) mikroküre içerisinde başarılı olarak iki farklı plazmidi taşımaları, kombine tedavi için bir alternatif olabileceğini düşündürmüştür.. Fakat taşıyıcı sistemimizin nanopartikül boyutlarında olması bu yöntemin başarısını zorlamaktadır. Taşıyıcı sistem üzerine farklı bir terapötik proteinin füzyon edilmesinin uygun bir yaklaşım olacağı tasarlanmıştır. Uygun füzyon kiti satın alınmıştır, ama farklı protein için araştırmalarımız devam etmektedir. Protein füzyonu çalışmamızın ilerleyen aşamalarında kombine tedavi de "b plan" olarak tasarlanmıştır.

4.2.3.2. In-vitro pDNA Salımının Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların hakkında fikir elde etmek için 3 gün boyunca PBS tamponun (pH:7.4) içeren ortamda salınan pCR3.1-TSP1 miktarı izlenmiştir.

Formülasyonların kısa sürede salımlarını tamamlaması, formüllerin PBS ortamında labil olmadığını göstermektedir. Katyonik polimer ile yapılan çalışmalarda (Mao ve ark., 2001; Florea ve ark., 2002) salımın bir günde tamamlanması, bulgularımızı desteklemektedir. Pan ve arkadaşları (2002) hazırladıkları kitozan-insülin nanopartiküllerinin 5 saat içerisinde salımının gerçekleştiğini bildirmektedir. Partikül boyutlarının küçük olduğu durumlarda pDNA'nın daha fazla orandaki yüzey ile etkileşmesi nedeniyle, küçük partiküllerin büyük partiküllere oranla daha hızlı salım gösterdiği bildirilmektedir (Capan ve ark., 1999). Hedeflenen hücre içerisinde sitozollerden kaçış mekanizması ile formüllerin kısa sürede salınması istenilen bir özelliktir.

Salım profilleri incelendiğinde (Şekil 3.6.,Şekil 3.7 ve Şekil 3.8), kendi içerisinde formüllerin grafik üzerinde birbirlerine benzer salımlar gösterdikleri gözlenmektedir. Annova testi ile (SPSS v:9.0) kitozan formüllerinin salım hız sabitelerinin arasında farkın anlamlı olduğu ($p>0.05$), polietilenimin formüllerinin kendi içinde ve lipozom formüllerinin de kendi içinde %95 oranından daha fazla benzerlik gösterdiği bulunmuştur ($\alpha<0.05$). Formüller arasında (hepsi Weibull dağılım modeline uygun olduğu kabul edildiğinde) salım hız sabitlerinde anlamlı fark gözlenmiştir.

PEG ile yapılan konjugasyon ve kaplama işlemleri sayesinde partikül sistemlerinin biyolojik sistem içerisindeki etkileşmesinin azaltılması amaçlanmaktadır. Bu nedenle serum veya kan proteini içermeyen in-vitro salım ortamında PEG içeren ve içermeyen formüllerin benzer salım özelliği göstermesi beklenmektedir. Fakat polietilenimin formülleri incelendiğinde, PEG içermeyen P1 formülü Weibull dağılımına, Higuchi ve birinci derece kinetik modeline uyum

gösterirken (r^2:0.992), Hixson-Crowell modeline daha az uyum göstermektedir (r^2:0.980). PEG içeren P2 ve P3 formülleri ise Hixson-Crowell modeline diğerlerine göre daha fazla uyum sağlamaktadır (sırası ile r^2: 0.994 ve r^2: 0.997). Bu durum PEG'in başarılı bir şekilde entegre olduğunun başka bir kanıtıdır. Weibull dağılım modeli açısından incelendiğinde, PEG içermeyen P1 formülünün değeri 1'in altında iken (0.849), PEG içeren P2 ve P3 formüllerin de değeri 1'in üzerine çıkmaktadır (sırası ile 1.072 ve 1.008). Bu durumda PEG içermeyen P1 formülünün başlangıçta hızlı etkin madde salımını takiben basit birinci derece eğri ile uyumlu hızda platoya ulaşması söz konusudur. PEG ilavesi ile su içinde bir sterik engel oluşmuş bu nedenle başlangıçtaki hızlı salım yerine daha yavaş bir etkin madde salımı gerçekleşmiştir. Kitozan formüllerinde ise PEG içermeyen C1 formülü ile PEG içeren C2 formülü arasında polietilenimin formüllerine benzer durum söz konusudur. Ancak, aktif PEG ile kaplanan C3 formülü farklı olarak PEG içermeyen C1 formülüne değeri açısından benzerlik göstermektedir. Bunun sebebinin PEG kaplamanın kitozan türevlerinde PEI formüllerine göre daha başarısız olmasıdır.

4.2.3.3. Formüllerin Dayanıklılığının Değerlendirilmesi

Hazırlanan formüllerin, pDNA ile formül oluşturma kapasitesi jel elektroforezi ile incelenmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Polimerik yapının pCR3.1-TSP1 ile kompleks oluşturduğu gösterilmiştir. Lipozomların boyutlarını küçültmek için uygulanan prosedür nedeniyle bazılarının yıkılmasından dolayı bir kısım pCR3.1-TSP1 formül içerisinde bulunmamaktadır (Şekil 3.10 – satır 2 ve 3).

Serbest DNA'nın serum nükleazları tarafından parçalandığı bilinmektedir. Bu nedenle pCR3.1-TSP1'in fizyolojik ortamda nükleazların etkisinden koruması gerekmektedir. Kompleks oluştuğu gösterilen formüllerin agaroz jelindeki bantları kesilmiş ve formüller geri elde edilmiştir. Bu formüller DNaz I ile muamele edilmiş ve bu enzime karşı koruma gösterdiği Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de gösterilmiştir. Sitotoksisite ve hücre kültürü çalışmalarında da etkin olarak formulasyonlar yapılarını korumuşlardır.

4.2.3.4. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Hazırlanan formüllerin kan proteinleri ile etkileşimlerini incelemek amacıyla, sağlıklı gönüllülerden elde edilen serum proteinleri ile 1 saat inkübe edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Polimerik partiküller incelendiğinde serum proteinlerini PEI:pCR3.1-TSP1 formülünün yüksek oranda (~%9) hemolize ettiği gözlenmektedir (Şekil 3.13.). Kitozan içeren formüllerde bu oran %5'in altında kalmaktadır. Genel olarak tüm polimerik formüllerin kritik olan %10 sınırının altında kalması bu formüller için ümit verici verilerdir. Ayrıca, PEGilasyon ile etkileşimin %50 oranında düştüğü gözlenmiştir. Lipozom formülleri ise PEGilasyon'a rağmen, %12 oranında hemolize neden olmuştur. Serum ve kan proteinleri ile stabilite problemi olan lipozomların (Bozkır ve Koçyiğit, 1995; Bozkır ve Duman 1996) bu oranı kabul edilebilir düzeydedir.

4.2.3.5. Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Formüllerin, MCF-7 hücrelerinde ölüme sebebiyet verme oranları incelenmiştir. Doğal polimer olan, farmasötik kalitedeki suda çözünür kitozan türevinin herhangi bir sitotoksik etkisi bulunmadığı gözlenmiştir. Toksik etkisi en düşük olan 25 kDa'luk PEI yalnız uygulandığında %70 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Polimerin pDNA ile formüle edilmesiyle bu oran %53'lere, PEG ilavesi ile %44'lere düşmüştür (Şekil 3.22.). PEG konjugatlarının pDNA ile formülasyonun da ise ölüm oranı %40'lara kadar gerilemiştir. PEG ilavesi PEI'nin sitotoksik etkisini kısmen engellemiştir. Lipozom formülasyonlarında kullanılan lipitlerin yalnız uygulamasında ölüm oranı % 30'un altında iken PEG ile formülasyonu ile %10'un altına düşmüştür. Hücre ölümü açısından incelendiğinde, kitozan türevleri ve lipozom formülasyonlarının, PEI içeren formülasyonlara göre üstünlüğü bulunmaktadır.

4.2.3.6. Gen Aktarım Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Formüllerin gen aktarım etkinlikleri incelendiğinde L2 kodlu formülasyonun oldukça başarılı olduğu görülmektedir. Salımı çabuk gerçekleşen diğer formüllere göre daha düşük zeta potansiyeline sahip kitozan formülleri de başarılı sonuçlar vermiştir. Gen aktarım etkinliği incelendiğinde L2>C2>C1=L1=C3>P2=P3>P1>çıplak pCR3.1-TSP1 olarak sıralanmaktadır (Şekil 3.25.).

PEGilasyon gen aktarım etkinliğinde kısmen bir avantaj sağlamıştır. Ancak PEG konjugasyonu ve PEG kaplaması arasında gen aktarım etkinliği açısından bir fark yoktur. PEI formüllerinin az miktardaki sitotoksik etkisi nedeniyle gen aktarım etkinliği en düşük formüller olarak göze çarpmaktadır. L2 kodlu kolesterol ve DOPE içeren lipozom formülasyonun, hücre çeperi ile uyumlu olması nedeniyle, serum proteinlerine karşı stabilite problemleri olmasına rağmen en başarılı formül olarak göze çarpmaktadır. Kitozan:PEG konjugatı ile hazırlanan C2 kodlu formülasyonumuz da diğer formüller arasından sıyrılarak etkin bir taşıyıcı potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser hastalığının anjiojenik basamağını baskılayacak TSP1 proteinini sentezleyen tedaviye alt yapı oluşturmak amacıyla hazırlanan farmasötik formülasyonların tasarımı ve incelenmesi ile ilgili bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Başarılı bir şekilde TSP genini taşıyacak vektör klonlanmış ve PCR ile çoğaltılan rekombinant vektör pCR3.1-TSP1 olarak adlandırılmıştır.
- Kompleks koaservasyon yöntemi ile polimerik; katı film hidratasyonu ile lipozomal taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.
- pDNA ile genetisini birlikte içeren polimerik formülasyon çalışmalarında başarısız olunmuştur.
- Hazırlanan formüllerin in vivo uygulamasında oluşabilecek problemlerin üstesinden gelmek için PEGilasyon işlemi başarı ile gerçekleştirilmiştir.
- Formüllerin fiziko-kimyasal özellikleri incelenmiş ve başarılı olanlar göğüs kanser hücrelerine uygulanarak potansiyelleri belirlenmiştir.
- Bu deneyler sonucu Dc-Chol:DOPE:PEG:pDNA ve PEG:Protasan:pDNA formülleri ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Öneriler;

Gerek maddi yetersizlikler nedeniyle (kullanılan materyallerin pahalı, bütçe ve zamanın sınırlı olması) çalışmaya dahil edilemeyen, gerekse çalışma sırasında oluşan düşünce ve öneriler doğrultusunda ileride yapılması planlanan çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

- Farklı bir mekanizmayı durduracak geni içeren ikinci bir plazmid ile formülasyonların tasarlanması,
- Farklı bir mekanizmayı durduracak proteinin, taşıyıcı sistem ile füzyon edilmesi ile kombine tedavi uygulanması,
- Damarlanmayı ne kadar inhibe ettiğini gözlemlemek amacı ile kanser oluşturulmuş hayvan türlerinde formülasyonların denenmesi,
- Dot matriks teknolojisinin formülasyonlara adaptasyonu.

ÖZET

Anti-Anjiogenik Etki Gösteren
Non-Viral Gen Taşıyıcı Sistemlerin
Geliştirilmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Bu tez çalışmasında, anjiogenezi inhibe ederek tümör büyümesini engelleme potansiyeline sahip trombospondin geni içeren pDNA'yı etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak hücreye taşıyabilecek nanopartikül ve lipozom formülasyonlarının hazırlanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmamızdaki hedeflerimiz, normal damarlanma gösteren hücrelere zarar vermeden sadece anjiogenik tümör hücrelerine özgü yanıt oluşturacak farmasötik formülasyonlar geliştirmektir. Bunu sağlamanın yollarından biri, polikatyonların, polietilen glikol ile kimyasal modifikasyonlarının sentezlenmesi ile kan dolaşımındaki stabilitelerini artırmaktır. PEGilasyon basamağı ve etkisi in-vitro ortamda incelenmiştir. Ayrıca, polipleks ve lipoplekslerin fizikokimyasal özellikleri, sitotoksiteleri ve fizikofarmasötik özellikleri araştırılmış, MCF-7 hücre hattında gen aktarım etkinlikleri incelenmiştir.

Formülasyon özellikleri iyileştirilmiş ve gen aktarım özelliklerinin yüksek olduğu anlaşılan L2 ve C2 kodlu formülasyonların, ileride in vivo çalışmalarda anti-anjiogenik yaklaşım ile kanser tedavisine yönelik ön bulgu elde etmek için kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Nanopartikül, lipozom, PEGilasyon, trombospondin, gen tedavisi

SUMMARY

Investigations on Development of Non-Viral Gene Delivery Systems With Anti-Angiogenic Effect

In this study, novel techniques have been proposed for the development of nanopartical and liposome formulations that will transfer a pDNA with a thrombospondin gene, which has been shown to prevent tumor growth by inhibiting angiogenesis, to an active, safe and resistant cell.

The objectives of this present work are to develop formulations that can directly affect angiogenic tumor cells without harming cells that exhibit vasculogenesis. This can be achived by synthesizing polycations, which are chemically modified with polyethylene glycol, to improve stability in blood circulation. To this end, PEGylation step and its effects are invastigated in-vitro. Moreover, physicochemical properties, cytotoxicities and physicopharmaceutical properties of polyplexes and lipoplexes are examined. Furthermore, MCF-7 (breast cancer epithelia) cells have been used to investigate the applicability of polyplexes and lipoplexes for gene transfection efficiancy.

The results of this thesis reveal that formulations, which are coded as L2 and C2, have improved formulation properties with high gene transfection properties. Accordingly, these formulations can be further used as a gen delivery system in the in vivo studies to obtain preliminary findings on anti-cancer treatment by anti-angiogenesis approach.

Key Words: Nanoparticle, liposome, pDNA, thrombospondin, gene therapy

KAYNAKLAR

AHN, C.H., CHAE, S.Y., BAE, Y.H., KIM, S.W. (2002). Biodegredable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery, *J Control Release*, **80**: 273-282.

AHSAN, F., RIVAS, I.P., KHAN, M.A., SUAREZ, A.I.T. (2002). Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages, *J Control Release*, **79(1-3)**:29-40.

AKBUĞA, J. (2006). Plazmid DNA içeren gen ilaçları, *TÜFTAD*, **13(2)**: 15-17.

AKBUĞA, J., TURAN, S.O., ERDOĞAN, N. (2004). Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 expression, *Eur J Pharm Biopharm*, **58**: 501-507.

AKINC, A., THOMAS, M., KLIBANOV, A.M., LANGER, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J Gene Med*, **7(5)**: 657-663.

AKINCIBAY, H., SENEL, S., AY, Z.Y. (2007). Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **80(2)**: 290-6.

ANDERSON, W.F. (1998). Human gene therapy, *Nature*, **392**, 25-30.

ANEED, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy, *J Control Release*, **94(1)**: 1-14.

ANTHONSEN, M.W., SMIDSROD, O. (1995). Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring indiced H-Nmr chemical shifts, *Carbohydr Polym*, **26**: 303-305.

BAKER, C.H., FIDLER, I. (2008). Antiangiogenic Cancer Therapy, CRC Press, Ed: Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L., Chapter 5: Tumor Microenvironment and Angiogenesis, s:131-148.

BERTRAIND, R., POMMIER, Y. (1995). Cell Growth and Apoptosis, IRL Press, Ed: Studzınskı, G.P., Chapter 6: Assessment of DNA damage in mammalian cells by DNA fitler elution methodology, s: 97-116.

BETANCOURT, T., BYRNE, J.D., SUNARYO, N., CROWDER, S.W., KADAPAKKAM, M.,PATEL, S., CASCIATO, S., PEPPAS, L.B. (2008). PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles, *J Biomed Mater Res Part B*, elektronik journal: 3 november.

BLAISONNEAU, J., SOR, F., CHERET, G., YARROW, D., FUKUHARA, H. (1997). A circular plasmid from the yeast torukaspora delbrueckii, *Plasmid* **38**: 202-209.

BLESSING, T., REMY, J.S., BEHR, J.P. (1998). Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95(4)**: 1427-1431.

BLOOMFIELD, V.A., (1997). DNA condensation by multivalent cations, *Biopoly*, **44(3)**: 269-282.

BONNI, A., BRUNET, A., WEST, A.E., DATTA, S.R., TAKASU, M.A., GREENBERG, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms, *Science*, **286**: 1358-1362.

BOUSSIF, O., LEZOUALCH, F., ZANTA, M.A., MERGNY, M.D., SCHERMAN, D., DEMENEİX, B., BEHR, P.A. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine, *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 7297-7301.

BOUT, A. (1997). Gene therapy, *Pharmaceutical Biotechnology*, Harwood, Academic publishers, s:167-182.

BOZKIR, A., DUMAN, E. (1996). Lipozomların kan ve plazmadaki stabiliteleri, *Ank Üni Ecz Fak Mec*, **25**: 1-13.

BOZKIR, A., KOCYIGIT, S. (1995). Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitelerinin incelenmesi, *Ank Üni Ecz Fak Mec*, **24**: 42-52.

BOZKIR, A., SAKA, O.M. (2004a). Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics, *Drug Deliv*, **11**: 107-112.

BOZKIR, A., SAKA, O.M. (2004b). Chitosan–DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency, *J Drug Target*, **12(5)**: 281-288.

BOZKIR, A., SAKA, O.M. (2006). Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji, *TÜFTAD*, **13(2)**: 3-10.

BRAGONZI, A., DINA, G., VILLA, A., CALORI, G., BIFFI, A., BORDIGNON, C., ASSAEL, B.M., CONESE, M. (2000). Biodistribution and transgene expression with nonviral cationic vector/DNA coplexes in the lungs, *Gene Ther*, **7**: 1753-1760.

CALAROTA, S., BRATT, G., NORDLUND, S., HINKULA, J., LEANDERSSON, A.C., SANDSTROME, E., WAHREN, B. (1998). Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1 infected patients, *Lancet*, **351**: 1320-1325.

CAPAN, Y., WOO, B.H., GEBREKIDAN, S., AHMED, S., DELUCA, P. (1999). Preperation and characterization of PLGA microspheres for cntrolled release of PLL complexed plasmid DNA, *Pharm Res*, **16**: 509-513.

CARMELIET, P., JAIN, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, **407**: 249-257.

CHAN, P., KURISAWA, M., CHUNG, J.E., YANG, Y.Y. (2007). Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery, *Biomaterials*, **28**: 540-549.

CHANDRASEKARAN, L., HE, C.Z., BARAZI, H., KRUTZSCH, H.C., ARISPE M.L.I., ROBERTS, D.D. (2000). Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1, *Mol Biol Cell*, **11(9)**: 2885-900.

CHECK, E.A. (2002). A tragic setback, *Nature* **420**, 116-118.

CHUNG, Y.C., TSAI, C.F., LI, C.F. (2006). Preparation and characterization of water-soluble chitosan produced by Millard reaction, *Fisheries Sci*, **72**: 1096-1103.

CIESIELSKI, M.J., APFEL, L., BARONE, T.A., CASTRO, C.A., WEISS, T.C., FENSTERMAKER, R.A. (2006). Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine, *Cancer Immunol Immunother*, **55**: 1491-1503.

CIESIELSKI, M.J., APFEL, L., BARONE, T.A., CASTRO, C.A., WEISS, T.C., FENSTERMARKER, R.A. (2006). Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine GL261 gliomas, *Cancer Immunol Immunother*, **55**: 1491-1503.

CRAPARO, E.F., CAVALLARO, G., BONDI, M.L., MANDRACCHIA, D., GIAMMONA, G. (2006). PEGylated nanoparticles based on a polyaspartamide. Preperation, physico-chemical characterization, and intracellular uptake, *Biomacromolecules*, **7**: 3083-3092.

CRISSMAN, H.A. (1995). Cell Growth and Apoptosis, IRL Press, Ed: Studzınskı, G.P., Chapter 2: Cell cycle analysis by flow cytometry, s: 21-42.

CRYSTAL, R.G. (1995). Transfer of genes to humans; early lessons and obstacles to succes, *Science*, **270**: 404-410.

CURIEL, D.T. (1994). High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus-poly-l-lisine DNA complexes, *Ann NY Acd Sci*, **716**: 36-56.

DARZYNKIEWICS, Z., LI, X., GONG, J., HARA, S., TRAGANOS, F. (1995). Cell Growth and Apoptosis, IRL Press, Ed: Studzınskı, G.P., Chapter 8: Analysis of cell death by flow cytometry, s: 143-166.

DASH, P.R., TONCHEVA, V., SCHACHT, E., SEYMOUR, L.W. (1997). Synthetic polymers for vectorial delivery of DNA: characterisation of polymer-DNA complexes by photon correlation spectroscopy and stability to nuclease degredation and disruption by polyanion in vitro, *J Control Release*, **48**: 269-276.

DAUTY, E., REMY, J.S., BLESSING, T., BEHR, J.P. (2001). Dimerizable cationic detergents with a low cmc condense plasmid DNA into nanometric particles and transfect cells in culture, *J Am Chem Soc*, **123**: 9227-9234.

DAUTY, E., BEHR, J.P., REMY, J.S. (2002). Development of plasmid and oligonucleotide nanometric particles, *Gene Ther*, **9**: 743-748.

DENSMORE, C.L. (2003). The re-emergence of aerosol gene delivery: a viable approach to lung cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets*, **3**: 275-286.

DINK, L.H., LIMURA, E., SAIJO, K., HAMADA, H., OHNO, T. (2000). A speedy method of detect inserted DNA fragment in cell lines transfected with retroviral, *Cytotech*, **34(3)**: 243-252.

ERDEN, N., CELEBI, N. (1990). Kitin ve kitozanın farmasötik teknolojide uygulanışı, *FABAD Farm Bil Der*, **15**: 277-287.

FELGNER, P.L., RHODES, G. (1991). Gene therapeutics. *Nature*, **24**: 351-352.

FELGNER, P.L., GADEK, T.R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H.W., WENZ, M., NORTHROP, J.P., RINGOLD, G.M., DANILSEN, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 7413-7417.

FELT, O., BURI, P., GURNY, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery, *Drug Dev Ind Pharm*, **24(11)**: 979-993.

FERRARA, N. (2008). Antiangiogenic Cancer Therapy, CRC Press, Ed: Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L., Chapter 2: Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Biology and Clinical Implications, s:23-42.

FIELDEN, M.L., PERRIN, C., KREMER, A., BERGSMA, M., STUART, M.C., CAMILLERI, P., ENGBERTS, J.B. (2001). Sugar-based tertiary amino gemini surfactants with a vesicle-to-micelle transition in the endosomal pH range mediate efficient transfection in vitro, *Eur J Biochem*, **268(5)**: 1269-1279.

FLOREA, B.I., MEANEY, C., JUNGINGER, H.E., BORCHARD, G. (2002). Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differential Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures, *AAPS PharmSci*, **4**: E12.

FRAIPONT, F., NICHOLSON, A.C., FEIGE, J.J., MEIR, E.G. (2001). Thrombospondins and tumor angiogenesis, *Trends Mol Med*, **7(9)**: 401-407.

FRY, J.W., WOOD, K.J. (1999). Gene therapy: potential applications in clinical transplantation, *Exp Rev Mol Med 8 June*, [Electronic Journal], Erişim: [http://www.expertreviews.org/99000691h.html]

FU, H.L., CHENG, S.X., ZHANG, X.Z., ZHUO, R.X. (2008). Dendrimer/DNA complexes encapsulated functional biodegredable polymer for substrate-mediated gene delivery, *J Gene Med*, **10(12)**: 1334-1342.

GAO, X., HUANG, L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polications, **35**: 1027-1036.

GAO, S., CHEN, J., XU, X., DING, Z., YANG, Y.H., HUA, Z., ZHANG, J. (2003). Galactosylated low molecular weight chitosan as a DNA carrier for hepatocyte-targeting, *Int J Pharm*, **255**: 57-68.

GEBHART, C.L., KABANOV, A.V. (2001). Evaluation of polyplexes as gene transfer agents, *J Control Release*, **73**: 401-416.

GELBART, W.M., BRUINSMA R.F., PINCUS, P.A., PARSEGIAN, V.A. (2000). DNA-inspired electrostatics, *Phys Today*, **53**, 38-44.

GILBERT, J.L, PURCELL, J., STRAPPE, P., MCCABE, M., O'BRIEN, T., O'DEA, S. (2008). Comparative evaluation of viral, nonviral and physical methods of gene delivery to normal and transformed lung epithelial cells, *Anticancer Drugs*, **19(8)**: 783-788.

GODBEY, W.T., BARRY, M.A., SAGGAU, P., WU, K.K., MIKOS, A.G. (2000). Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivey, *J Biomed Mater Res*, **51**: 321-328.

GRISCELLI, F., LI, H., GRISCELLI, A.B., SORIA, J., OPOLON, P., SORIA, C., PERRICAUDET, M., YEH, P., LU, H. (1998). Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 6367-6372.

GUSTAFSSON, J., ARVIDSON, G., KARLSSON, G., ALMGREN, M. (1995). Complexes between cationic liposomes and DNA and cationic liposomes visualized by cryo-TEM, *Biochim Biophys Acta*, **1235**: 305-312.

HAFEZ, I.M., ANSELL, S., CULLIS, P.R. (2000). Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids, *Biophys J*, **79(3)**: 1438-46.

HASKOVA, V., HRUBESOVA, M. (1958). Part played by deoxyribonucleic acid in transplantation immunity, *Nature*, **182**: 61-62.

HOGGARD, P.G., SALES, S.D., KEWN, S., SUNDERLAND, D., KHOO, S.H., HART, C.A., BACK, D.J. (2001). Correlation between intracellular pharmacological activation of nucleoside analogues and HIV suppression in vitro, *Antivir Chem Chemother*, **11**: 353-358.

HSU, W.L., CHEN, H.L., LIOU, W., LIN, H.K., LIU, W.L. (2005). Mesomorphic complexes of DNA with the mixtures of a cationic surfactant and a nrutral lipid, *Langmuir*, **21(21)**: 9426-9431.

IGARASHI, S., HATTORI, Y., MAITANI, Y. (2006). Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome, *J Control Release*, **112(3)**: 362-368.

ILLUM, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm Res*, **15(9)**: 1326-1331.

INOH, Y., KITAMOTO, D., HIRASHIMA, N., NAKANISHI, M. (2004). Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion, *J Control Release*, **94(2-3)**: 423-431.

ISHII, T., OKAHATA, Y., SATO, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes, *Biochim Biophys Acta*, **1514**: 51-64.

JAIN, R.K., DUDA, D.G. (2008). Antiangiogenic Cancer Therapy, CRC Press, Ed: Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L., Chapter 3: Angiogenesis in Solid Tumors, s: 43-90.

KAISER, J. (2003). Gene therapy; Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial, *Science*, **299**: 495.

KAS, H.S. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems, *J Miroencapsulation*, **14(6)**: 689-711.

KERBEL, R., FOLKMAN, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors, *Nat Rev Cancer*, **2**: 727-739.

KICHLER, A., LEBORGNE, C., COEYTAUX, E., DANOS, O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study, *J Gene Med*, **3**: 135-144.

KIM, Y.H., GHIM, S.H., PARK, C.R., LEE, K.Y., KIM, T.W., KWON, I.C., CHUNG, H., JEONG, S.Y. (2001). Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of dexycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier, *Bioconjug Chem*, **12**: 932-938.

KOIDO, S., NIKRUI, N., OHANA, M., XIA, J., TANAKA, Y., LIU, C., DURFEE, J.K., LERNER, A., GONG, J. (2005). Assesment of fusion cells from patient-derived ovarian carcinoma cells and dendritic cells as a vaccine for clinical use, *Gynecol Oncol*, **99**: 462-471.

KOLTOVER, I., SALDITT, T., RADLER, J.O., SAFINYA, C.R. (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery, *Science*, **281**: 78-81.

KONDO, Y., ARII, S., MORI, A., FRUTANI, M., CHIBA, T., IMMAMURA, M. (2000). Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line, *Clin Cacer Res*, **6**: 622-630.

KURSA, M., WALKER, G.F., ROESSIER, V., OGRIS, M., ROEDI, W., KIRCHEIS, R., WAGNER, E. (2003). Novel shielded transferin-polyethlene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer, *Bioconjug Chem*, **14**: 222-231.

KWOH, D.Y., COFFIN, C.C., LOLLO, C.P., JOVENAL, J., BANASZCZYK, M.G., MULLEN, P., PHILLIPS, A., AMINI, A., FABRYCKI, J., BARTHOLOMEW, R.M., BROSTOFF, S.W., CARLO, D.J. (1999). Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver, *Biochim Biophys Acta*, **1444**: 171-190.

KWON, G.Y., JEONG, J., WOO, J.K., CHOI, H.Y., LEE, M.J., KO, J.K., SHIM, Y.H., KIM, C.W. (2003). Co-expression of bfl-1 enhances host response in the herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system, *Biochem Biophys Res Commun*, **303**: 756-763.

LAWLER, J., DETMAR, M. (2004). Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and -2, *Int J Biochem Cell Biol*, **36**: 1038-1045.

LEE, R.J., HUANG, L. (1996). Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer, *J Biol Chem,* **271(14)**: 8481-8487.

LEE, M., NAH, J.W., KWON, J.J., KO, K.S., KIM, S.W. (2001). Water soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery, *Pharm Res*, **18**: 427-431.

LEE, T.S., PARK, S.H., LEE J.W., LIM, S.H. (2002). The effect of geneticin on the survival of a human breast cancer cells under hypoxic condition , *J Korean Breast Cancer Soci*, **5**: 279-283.

LIM, S.T., MARTIN, G.P., BEERY, D.J., BROWN, M.B. (2000). Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan, *J Control Rel*, **66**: 281-292.

LIU, F, HUANG, L. (2002). Development of non-viral vectors for systemic gene delivery, *J Control Release*, **78**: 259-266.

MAHATO, R.I., ROLLAND, A., TOMLINSON, E. (1997a). Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives, *Pharm Res*, **14**: 853-859.

MAHATO, R.I., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. (1997b). Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **14(2)**: 133-172.

MAIONE, T.E., GRAY, G.S., HUNT, A.J., SHARPE, R.J. (1991). Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity, *Cancer Res*, **51**: 2077-2083.

MANLEY, P.W., BARON, G.M., SCHLAEPPI, J.M., WOOD, J.M. (2002). Therapies directed at vascular endothelial growth factor, *Expert Opin Investing Drugs*, **11**: 1715-1736.

MAO, H.Q., ROY, K., TROUNG-LE, V.L., JANES, K.A., LIN, K., WANG, Y., AUGUST, J.T., LEONG, K.W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterisation and transfection efficiency, *J Control Rel*, **70**: 399-421.

MEDAWAR, P. (1958). Part played by deoxyribonucleic acid in transplantation immunity, *Nature*, **182**: 62.

MERDAN, T., KOPECEK, J., KISSEL, T. (2002). Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer, *Adv Drug Deliv Rev*, **54**, 715-758.

MOSSMAN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J Immunol Method*, **65:** 55-63

MOUNTAIN, A. (2000). Gene therapy: the first decade, *Trends Biotechnol* **18**: 119-128.

MOVIUS, J., LAB, H. (1998). Rapid elution of DNA from agarose gels, Elektronik Journal :[http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=1220] Erişim tarihi: 12.10.2007.

NAM, H.Y., HAHN, H.J., NAM, K., CHOI, W.H., JEONG, Y., KIM, D.E., PARK, J.S. (2008). Evaluation of generation 2,3 and 4 arginine modified PAMAM dendrimers for gene delivery, *Int J Pharm*, **363(1-2)**: 199-205.

NATIONAL CANCER INSTITUE, (2008). What is cancer, Erişim: [http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer] Erişim tarihi: 28.11.2008.

NAUMOV, G.N., FOLKMAN, J. (2008). Antiangiogenic Cancer Therapy, CRC Press, Ed: Davis D.W., Herbst R.S., Abbruzzese J.L., Chapter 1: Strategies to Prolong the Nonangiogenic Dormant State of Human Cancer, s: 3-22.

NAUMOV, G.N., BENDER, E., ZURAKOWSKI, D., KANG, S.Y., SAMPSON, D., FLYNN, E., WATNICK, R.S., STRAUME, O., AKSLEN, L.A., FOLKMAN, J., ALMOG, N. (2006). A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype, *J Natl Cancer Inst*, **98(5)**: 316-25.

NEU, M., FISCHER, D., KISSEL, T. (2005). Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J Gene Med*, **8**: 992-1009.

NEU, M., GERMERSHAUS, O., BEHE, M., KISSEL, T. (2007). Bioreversibly crosslinked polyplexes of PEI and high molecular weight PEG show extended circulation times in vivo, *J Cont Rel*, **124**: 69-80.

OGRIS M, BRUNNER S, SCHULLER S, KIRCHEIS R, WAGNER E (1999) PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy,* **6**:595-605.

OHANA, P., GOFRIT, O., AYESH, S., SHAREF, W., MIZRAHI, A., BIRMAN, T., SCHNEIDER, T., MATOUK, I. (2004). Graf of the H19 gene in DNA based therapy of bladder cancer, *Gene Ther Mol Bio*, **8**: 181.

OHANA, P., GOFRIT, O., AYESH, S., SHAREF, W., MIZRAHI, A., BIRMAN, T., SCHNEIDER, T., MATOUK, I. (2005). Plasmid-based gene therapy for human bladder cancer, Erişim: [http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/ weeklyarticle/05_06/ e5/default.aspx] Erişim tarihi: 26.11.2008. (Qiagen News, 2005)

OWENS, D.E.,PEPPAS, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int J Pharm*, **307(1)**: 93-102.

OZGEL, G., AKBUĞA, J. (2006). In vitro characterization and transfection of IL-2 gene complexes, *Int J Pharm*, **315**: 44-51.

OZTÜRK, M. (2001). Moleküler biyoloji: genler ve genom projesinden ilaç sanayine yansımalar, *Ankara Ecza Odası-Meslek İçi Eğitim Programı*, Ankara, s:81-101.

Pan, Y., Lı, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., Weı, G., Hao, J., Cuı, F. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absoption of insülin in vivo, *Int J Pharm*, **249**: 139-147.

PAVENETTO, F., PERUGINI, P., CONTI, B., MODENA, T., GENTA, I. (1996). Evaluation process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method, *J Miroencapsulation*, **13**: 679-688.

PEPPAS, L.B., BLANCHETTE, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv Drug Deliv Rev*, 22;**56(11)**: 1649-1659.

PETERSEN, H., FECHNER, P., FISCHER, D., KISSEL, T. (2002). Synthesis, characterization, and biocompatibility of polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers, *Macromolecules*, **35 (18)**: 6867-6874.

POLLARD, H., TOUMANIANTZ, G., AMOS, J.L., LOISEAU, H., GUIHARD, G., BEHR, J.P., ESCANDE, D. (2001). Ca^{+2} sensitive cytosolic nuclease prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids, *J Gene Med*, **3(2)**: 153-164.

PONNAZHAGAN, S. (2002). Adenoassociated virus vectors for genetic immunization, *Immun Res*, **26(1-3)**: 247-253.

PREGO, C., TORRES, D., MEGIA, F.M., CARBALLAL, R.N., QUINOA, E., ALONSO, M.J. (2006). Chitosan-PEG nanocapsules as a new carriers for oral peptide delivery effect of a chitosan pegylation degree, *J Control Rel*, **112**: 362-368

PUN, S.H., DAVIS, M.E. (2002). Development of a non-viral gene delivery vehicle for systemic application, *Bioconjug Chem*, **13**: 630-639.

RAMACHANDRA, S., STUDZINSKI, G.P. (1995). Cell Growth and Apoptosis, IRL Press, Ed: Studzınskı, G.P., Chapter 7: Morphological and biochemical criteria of apoptosis, s:119-140.

REILLY, M.S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W.S., FLYNN, E., BIRKHEAD, J.R., OLSEN, B.R., FOLKMAN, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell*, **88(2)**: 277-85.

REJMAN, J., WAGENAAR, A., ENGBERTS, J.B., HOEKSTRA, D. (2004). Characterization and transfection of lipoplexes stabilized with novel exchangeable polyethylene glycol-lipid conjugates, *Biochim Biophys Acta*, **1660(1-2)**: 41-52.

REMY, J.S., ABDALLAH, B., ZANTA, M.A., BOUSSIF, O., BEHR, J.P., DEMENEIX, B. (1998). Gene transfer with lipospermines and polyethlenimines, *Adv Drug Deliv Rev*, **30**: 85-95.

RIEDEL, F., GOTTE, K., LI, M., HORMANN, K., GRANDIS, J.R. (2003). Abrogation of VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma decreases angiogeniz activity in vitro and in vivo, *Int J Oncol*, **107**: 1199-1205.

RISAU, W., (1997). Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, **386**: 671-674.

RIZEA, S.S., SILVESTRO, L. (2003). Adhesion inhibation in vitro by heparin derivatives correlates with their activity on angiogenesis in mice, *J Cell Mol Med*, **7(2)**: 187-91.

ROLLAND, A.P. (1998). From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,* **15(2)**: 143-198.

RUIZ, F.E., CLANCY, J.P., PERRICONE, M.A., BEBOK, Z., HONY, J.S., CHENG, S.H., MEEKER, D.P., YOUNG, K.R., SCHOUMACHER, R.A., WEATHERLY, M.R., WING, L., MORRIS, J.E., SINDEL, L, ROSENBERG, M., GINKEL, F.W., MCGHEE, J.R., KELLY, D., LYRENE, R.K., SORSCHER, E.J. (2001). A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibosis, *Hum Gene Ther*, **12**: 751-761.

RUSSEL, D.W., HIRATA, R.K. (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet,* **18**: 325-330.

SAGARA, K., KIM, S.W. (2002). A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes, *J Control Release*, **79**: 271-281.

SAĞIROĞLU, A.K. (2008). Gen terapisi. Erişim: [http://www.genetikbilimi.com/gnbilim/genterapisi.htm], Erişim tarihi: 29.11.2008

SAKA, O.M., BOZKIR, A. (2008). Preperation and characterization of PEGylated chitosan and polyethylenimine as a non-viral carrier for gene delivery, *Int Pharm Technol Symp*, **14**:177-179.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manul. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Chapter 1, Chapter 6.

SCARZELLO, M., CHUPIN, V., WAGENAAR, A., STUART, M.C., ENGBERTS, J.B., HULST, R. (2005). Polymorphism of pyridinium amphiphiles for gene delivery: influence of ionic strength, hepler lipid content, and plasmid DNA complexation, *Biophys J*, **88(3)**: 2104-2113.

SCHAFFER, D.V., FIDELMAN, N.A., DAN, N., LAUFFENBERG, D.A. (2000). Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery, *Biotechnol Bioeng*, **67**: 598-606.

SHEN, C., RATTAT, D., BUCK, A., MEHRKE, G., POLAT, B., RIBBERT, H., SCHIRMEISTER, H., MAHREN, B., MATUSCHEK, C., RESKE, S.N. (2003). Targeting bcl-2 by triplex-forming oligonucleotide-a promising carrier for gene-radiotherapy, *Cancer Biother Radiopharm*, **18**: 17-26.

SHI, F., RAKHMILEVICH, A.L., HEISE, C.P., OSHIKAWA, K., SONDEL, P.M., YANG, N.S., MAHVI, D.M. (2002). Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model, *Mol Cancer Ther*, **1**: 949-957.

SILVESTRINI, R., DAİDONE, M.G., COSTA, A. (1995). Cell Growth and Apoptosis, IRL Press, Ed: Studzınskı, G.P., Chapter 4: Determination of the cell proliferative fraction in human tumors, s:59-77.

SINGLA, A.K., CHAWLA, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects, J *Pharm Pharmacol*, **53**: 1047-1067.

SONG, L.Y., AHKONG, Q.F., RONG, Q., WANG, Z., ANSELL, S., HOPE, M.J., MUI, B. (2002). Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes, *Biochim Biophys Acta*, **1558(1)**: 1-13.

SORGI, F.L., BHATTACHARYA, S., HUANG, L. (1997). Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer, *Gene Ther*, **4**: 961-968.

STERNBERG, B., SORGI, F.L., HUANG, L. (1994). New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy. FEBS Lett. 356, 361–366.

SUGIMOTO, M., MORIMOTO, M., SASHIWA, H., SAIMOTO, H., SHIGEMASA, Y. (1998). Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives, *Carbo Poly*, **36**: 49-59.

SYLVEN, C., SARKAR, N., RÜCK, A., DRVOTA, V., HASSAN, S.Y., LIND, B., NYGREN, A., KALLNER, O., BLOMBERG, P., VAN DER LINDEN, J., LINDBLOM, D., BRODIN, L.A., ISLAM, K.B. (2001). Myocadial doppler tissue velocity improves following myocardial gene therapy with VEGF-A165 plasmid in patients with inoperable angina pectoris, *Coron Arter Dis*, **12(3)**: 239-243.

TAMM, I., SCHUMACHER, A., KARAWAJEW, L., RUPPERT, V., ARNOLD, W., NUSSLER, A.K., NEUHAUS, P., DORKEN, B., WOLFF, G. (2002). Adenovirus-mediated gene transfer of P16INK4/CDKN2 into bax-negative colon cancer cells induces apoptosis and tumor regression in vivo, *Cancer Gene Ther*, **9**: 641-650.

TANG, M.X., SZOKA, F.C. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes, *Gene Ther*, **4(8)**: 823-832.

THANOU, M., FLOREA, B.I., GELDOF, M., JUNGINGEN, H.E., BORCHARD, J.G. (2002). Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines, *Biomaterials*, **23**: 153-159.

THOMAS, M., KLIBANOV, A.M. (2002). Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **37**: 61-65.

TIAN, H.Y., DENG, C., LIN, H., SUN, J., DENG, M., CHEN, X., JING, X. (2005). Biodegredable PEG-PEI-PBLG hyperbranched block copolymer, synthesis and micelle characterization, *Biomaterials*, **26**: 4209-4217.

TOMMERAAS, K., VARUM, K.M., CHRISTENSEN, B.E., SMIDSROD, O. (2001). Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans, *Carbohydr Res*, **333**: 137-144.

TONINI, T., ROSSI, F., CLAUDIO, P.P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer, *Oncogene*, **22**: 6549-6556.

TSENG, S., CHUANG, C.S., TANG, S.C. (2008). Electrostatic immobilization of DNA polyplexes on small intestinal submucosa for tissue substrate-mediated transfection, *Acta Biomater*, **4**: 799-807.

TURAN, S.O., ARAL, C., KABASAKAL, L., UYSAL, M.K., AKBUĞA, J. (2003). Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle, *J Pharm Pharm Sci,* **6(1)**: 27-32.

VARUM, K.M., ANTHONSEN, M.W., GRASDALEN, H., SMIDSROD, O. (1991). 13C-Nmr studies of the acetylation sequences in partially N-deacetylated chitins (chitosans), *Carbohydr Res*, **217**: 19-27.

VICENS, Q., WESTHOF, E. (2003). Crystal Structure of Geneticin Bound to a Bacterial 16 S Ribosomal RNA A Site Oligonucleotide, *J Mol Biol*, **326**: 1175-1188.

WALKER, G.F., FELLA, C., PELISEK, J., FAHRMEIR, J., BOECKLE, S., OGRIS, M., WAGNER, E. (2005). Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro ve in vivo, *Mol Ther*, **11(3)**: 418-425.

WATNICK, R.S., CHENG, Y.N., RANGARAJAN, A., INCE, T.A., WEINBERG, R.A. (2003). Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis, *Cancer Cell*, **3**: 199-200.

WEIDONG, C., JEROME, F., JAMES, L. (2006). Nucleic acid isolation methods and materials and devices thereof, Patent record : WO2006088907.

WIETHOFF, C.M., MIDDAUGH, C.R. (2003). Barriers to nonviral gene delivery, *J Pharm Sci*, **92(2)**: 203-217.

WILEY, (2008). Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, Erişim: [http://www. wiley.co.uk/genetherapy/clinical], Erişim tarihi: 14.10.2008.

WISEMAN, J.W., GODDARD, C.A., MCLELLAND, D., COLLEDGE, W.H. (2003). A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo, *Gene Ther*, **10**: 1654-1662.

WOLF, J.A., LEDENBERG, J. (1994). An early history of gene transfer and therapy, *Hum Gene Ther*, **5**, 169-480.

WOODLE, M.C. (1998). Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers, *Adv Drug Deliv Rev*, **32(1-2)**: 139-152.

WOUDE, I., VISSER, H.W., BEEST, M.B., WAGENAAR, A., RUITERS,M.H., ENGBERTS, J.B., HOEKSTRA, D. (1995). Parameters influencing the introduction of plasmid DNA into cells by the use of synthetic amphiphiles as a carrier system, *Biochim Biophys Acta*, **1240(1)**: 34-40.

WOZNIAK, M.A., MEE, A.P., ITZHAKI, R.F. (2008). Herpes simplex virus type I DNA is located within alzheimer's disease amyloid plaques, *J Pathol*, Electronic journal: www.interscience.wiley.com DOI: I0.I002/path.2449.

YOKOYAMA, Y., DHANABAL, M., GRIFFIOEN, A.W., SUKHATME, V.P., RAMAKRISHNAN, S. (2000). Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth, *Cancer Res*, **60**: 2190-2196.

ZHANG, X., PAN, S.R., HU, H.M., WU, G.F., FENG, M., ZHANG, W., LUO, X. (2007). Poly(ethylene glycol)-block-polyethilenimine copolymers as carriers for gene delivery: Effects of PEG molecular weight and PEGylation degree, *J Biomed Mater Res Part A*, early view, 10.1002/jbm.a.31343.

ZIEMBA, A.J., ZHILINA, Z.V., KHAN, .K.Y., STANKOVA, L., EBBINGHAUS, S.W. (2005). Targeting and regulation of the HER-2/neu oncogene promoter wih bis-peptide nucleic acids, *Oligonucleotides*, **15**: 36-50.

ZUIDAM, N.J., BARENHOLZ, Y., (1998). Electrostatic and structural properties of complexes involving plasmid DNA and cationic lipids commonly used for gene delivery, *Biochim Biophys Acta*, **1368(1)**: 115-128.

ÖZGEÇMİŞ

I – Bireysel Bilgiler

Adı	: Ongun Mehmet
Soyadı	: Saka
Dogum yeri ve tarihi	: Ankara, 14.Ağustos.1975
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	: Evli, 2 çocuklu
Askerlik durumu	: Tecilli
İletisim adresi ve telefonu	: Birlik Mahallesi 18.sokak No:5/1 Çankaya-ANKARA 0312 495 40 05

II – Eğitimi

Doktora	**:** Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2003 -
Yüksek Lisans	**:** Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Biyoteknoloji Programı (2000-2003)
Lisans	**:** Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (1993-97)
Orta ve Lise	**:** Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi (1986-1993)
Yabancı Dil	**:** İngilizce

III- Ünvanları

Uzman Eczacı	**:** Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (2003)
Eczacı	**:** Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (1997)
Araştırma Görevlisi	**:** Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (2001 -)

IV- Mesleki Deneyimi

Yüksek Lisans Tezi (2003), "Gen Tedavisine Yönelik, DNA-Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *in vitro* Değerlendirilmesi", (Danışman: Prof.Dr. Asuman BOZKIR)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

TÜFTAD **:** Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (1997-)

AEO **:** Ankara Eczacı Odası üyeliği (2000-)
Denetleme Kurulu Üyeliği (2004-2005)

H.Ü. Mezunlar Derneği **:** Hacettepe Üniversitesi Mezunlar Derneği (1999 -)

VI – Bilimsel İlgi Alanları

Bilimsel Dergilerde Araştırmaya Dayanan SCI'de Yer Alan Dergilerdeki Yayınlar

1. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Molecular Structure of Chitosan on Formulation and Release Characteristics", Drug Delivery, 11 (2): 107-112, 2004.
2. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Chitosan-DNA Nanoparticles: Effect on DNA Integrity Bacterial Transformation and Transfection Efficiency" , J. Drug Target, 12(5): 281-288, 2004.
3. BOZKIR, A., HAYTA, G., SAKA, O.M., "A Comparison of the Biodegredable Nanoparticles and Multiple Emulsions (water-in-oil-in-water) Containing Influenza Virus Antigen on the *in vivo* Response in Rats" Die Pharmazie, 59(9): 723-725, 2004.

4. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Formulation and Investigation of 5-FU Nanoparticles with Factorial Design-based Studies", Il Farmaco, 60(10): 840-846, 2005.
5. GOKAY O.,ZIRAMAN F,CALI A., SAKA, O.M, "Radicular peroxide penetration from carbamide peroxide gels during intracoronal bleaching", International Endodontic Journal. 41(7):556-560, 2008.

Ulusal Dergilerdeki Yayınlar

1. BOZKIR, A., SAKA, O.M., Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji, TÜFTAD, Biyoteknolojik ürünlerin bugünü ve yarını özel sayısı, Nisan-Haziran 2006, 13(2), 3-10.

2. SAKA, O.M., Nanoteknolojinin Geleceğine Avrupa Açısından Bakış – SWOT Analizi, TÜFTAD, Biyoteknolojik ürünlerin bugünü ve yarını özel sayısı, Nisan-Haziran 2006, 13(2), 11-14.

Kitap Bölümü

1. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Multiple Emulsions: Delivery System for Antigens", Multiple Emulsion: Technology and Applications, Wiley publications, 2008, ISBN: 978-0-470-17093-9 ,293-306.

2. SAKA, O.M., NALAN D.O., BOZKIR, A., "Pegylated Chitosan Nanoparticles for gene delivery", 8th International Conferences of the European Chitin Society, 2007, Advances in Chitin Science vol X,p:281. ISBN: 978-975-491-250-0.

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLERİ

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

1. SAKA, O.M., BOZKIR, A., "Chitosan-Plasmid DNA Nanoparticles: I-Characterization and Properties of Different Molecular Weight Chitosan Nanoparticles", 3rd Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics, IPORSIP 2002, Istanbul, Abstracts, Acta Pharmaceutica Turcica, Suppl. p:20.
2. SAKA, O.M., NALAN D.O., BOZKIR, A., "Pegylated Chitosan Nanoparticles for gene delivery", 8th International Conferences of the European Chitin Society, Antalya, 2007, Advances in Chitin Science vol X,p:281.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

1. SAKA, O.M., İNAL, Ö., HAYTA, G., BOZKIR, A., "Factors Affecting the Stability and Release of a Model Protein, Encapsulated Within Biodegredable PLLA Microparticles", ISOPS6, 27/29 Haziran,Ankara, Poster Abstracts s:300, 2000.
2. SAKA, O.M., BOZKIR, A., "Comparative Study on the Stability and Release of a Model Protein Encapsulated Within Biodegredable PLLA and Chitosan Microparticles, IPORSIP 2000, 6/8 Ekim,Istanbul, Poster Abstracts, Acta Pharmaceutica Turcica, Suppl. s:47, 2000.
3. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "The Experimental Design and Characterisation of PLGA Nanoparticles. I: Factorial Design", 61th International Congress of Pharmaceutical Sciences of F.I.P., 1-6 September, Poster Abstracts s:82, Singapore 2001.
4. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing 5-Fluorouracil. II. Formulation Design", Proceeding 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, 8-11 April, s: 809-810, Florence, 2002.

5. SAKA, O.M., BOZKIR, A., "Chitosan-Plasmid DNA Nanoparticles Effects of different Molecular Weight Chitosan Nanoparticles on Drug Loading and Drug Release", IXth International Symposium on Biomedical Science and Technology, 19-22 Sept., 64, Antalya 2002.
6. SAKA, O.M., DEMİR, H., BOZKIR, A., ALTANLAR, N., "Comparing Two Different Methods at Plasmid Prufication", Proceedings 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran, s:245, Ankara, 2003.
7. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Effects on Different Formulations of Chitosan-DNA Nanoparticles on Gene Transfection", 30th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, July 21-23, 598, Glasgow, Scotland-UK,2003.
8. BOZKIR, A., HAYTA, G., SAKA, O.M., "Multiple Emulsions (w/o/w) and Biodegredable Nanoparticles Containing Influenza Virus Antigen: Immune Response in Rats", 1st EUFEBS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation. New challenges in Drug Delivery, Sept 29-Oct 1, Versailles, France, 2003.
9. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Comparision of the Chitosan-DNA Nanoparticles Gene Transfection and Transformation Efficiencies", IPTS 2004, Proceed. 12th Inter. Pharm. Technol. Symp. Sept 12-15, Istanbul,Turkey, 2004.
10. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Ciprofloxacin loaded ocular nanoparticles: Preparation and *in-vitro* characterization", Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition 2005, June 12-17, Nice, France, 2005.
11. BOZKIR, A., SAKA, O.M., "Comparision study of Chitosan–PEG nanoparticles and PEG coated chitosan nanoparticles for gene delivery", "EUFEPS Workshop on : Optimising Biotech Medicines: Second-Generation Pharmaceutical Proteins" , Munich, Germany, 11-12 Jan, 2007.

12. SAKA, O.M., BOZKIR, A., "Pegylated Chitosan-plasmid DNA Nanoparticles: I) Effect of Pegylation on drug loading and drug release" "3rd World Congress of Pharmaceutical Sciences of FIP" , Amsterdam, Netherland, 22-25 Apr, 2007.
13. SAKA, O.M., BOZKIR, A., "Preperation and characterisation of PEGylated chitosan and polyethylenimine as a non-viral carrier for gene delivery", IPTS 2008, Proceed. 14th Inter. Pharm. Technol. Symp. Sept 6-10, Antalya,Turkey, 2008.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Ödüller

2003-2004 Novartis Farmasötik Teknoloji Araştırma Birincilik Ödülü

Projeler

1. "Investigation on the nanoparticle drug delivery systems", ARFO (Ankara University, Research Foundation)
2. "Development of pDNA-Chitosan nanoparticle formulations for gene delivery and in vitro evaluation", ARFO
3. **"**Determination on the usage of some botanical extracts on insects of protected organic vegetable production", MINISTERY OF AGRICULTURE
4. "Development and characterization of non-viral gen delivery system for gene therapy", BAP (Biotechnological Research Foundation)

VIII- Diğer Bilgileri

Tez Çalışması için Aldığı Kurs ve Katıldığı Seminer Programları

1. 1-10 Mart 2006 tarihlerinde Saarland Üniversitesi Biofarmasötik ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalının düzenlemiş olduğu "6th International Conference and Workshop on Cell Culture and In-vitro Models for Drug Absorption and Delivery (Cell Course)" adlı hücre kültürü kursuna katıldım.
2. 7-8 Aralık 2006 tarihlerinde Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ile Tıp Fakültesinin düzenlemiş olduğu "Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri" konulu kursa katıldım.