T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF-7 KANSER HÜCRE HATTININ KALSİYUM FOSFAT NANOPARTİKÜLÜ KULLANILARAK İNTERLÖKİN-6 SİTOKİNİ İLE ETİKETLENMESİ

Seda GENÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Temmuz, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MCF-7 KANSER HÜCRE HATTININ KALSİYUM FOSFAT NANOPARTİKÜLÜ KULLANILARAK İNTERLÖKİN-6 SİTOKİNİ İLE ETİKETLENMESİ

Seda GENÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 05.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç.Dr. Nelisa TÜRKOĞLU, Danışman _____
Yıldız Teknik Üniversitesi

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

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY, Üye _____
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan MCF-7 Kanser Hücre Hattının Kalsiyum Fosfat Nanopartikülü Kullanılarak İnterlökin-6 Sitokini ile Etiketlenmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksi ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Seda GENÇ
İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü' nün FYL-2020-3773 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Canım aileme,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi süresince tez çalışmalarımın planlaması ve yürütülmesine engin bilgi birikimi ve deneyimi ile büyük katkı sağlayan, ilgi ve anlayışını eksik etmeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU'na,

Laboratuvar ortamında ilk günden itibaren en zor anlarımda yanımda olan, çalışmalarımın tamamlanması için büyük sabır ve emek ile desteklerini esirgemeyen, her an tecrübelerinden yararlandığım değerli ekip arkadaşlarım Hanife Sevgi VARLI MA, Fatma Ceren KIRMIZITAŞ, Meryem YILDIRIM, Nevra Pelin CESUR, Büşra ÖZKAN, Ezgi AKYILDIZ, Sinan ÜNAL ve Beyza DÖNMÜŞ'e,

Lisans eğitimi sürecinde iyi ki tanıdığım ve bu zamana kadar yaşadığım tüm duyguları kendisiyle paylaştığım, moralimin bozuk olmasına asla izin vermeyen, uzakta olmasına rağmen naif ve sıcak kalbi sayesinde her zaman yanımda hissettiğim, çok kıymetli canım dostum Nurcan ERGÜN'e

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, zor durumlarda sabırlı olmayı öğreten, hoşgörülü ve merhametli olmayı bana kazandıran, tüm başarı ve başarısızlıklarımda bana inanan, varlıklarından sonsuz güç aldığım başta annem Kader GENÇ, babam İsmail GENÇ ve kızkardeşlerim Nida GENÇ ve Berfin İrem GENÇ olmak üzere tüm aileme,

Beraber büyüdüğümüz, hayatı beraber öğrendiğimiz, aldığım kararlarda her zaman yanımda olan, hayat enerjisini hiç kaybetmeyen, yüzümü her daim güldüren, başım sıkıştığında kahramanım ilan ettiğim, sevgisi, saygısı, ilgisi ve içten duygularıyla her şeyin üstesinden gelebileceğimize inandığım yol arkadaşım Hüseyin ŞİMŞEK'e

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunuyorum.

Seda GENÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii
KISALTMA LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Kanser 4
2.1.1 Kanser Tanımı ve Tarihçesi 4
2.1.2 Kanser Epidemiyolojisi 5
2.1.3 Kanser Etiyolojisi 6
2.1.4 Kanser Gelişimi 6
2.1.5 Kanserin Moleküler Özellikleri 7
2.1.6 Meme Kanseri 8
2.1.7 Kanser Tedavisinde Geleneksel Tedavi Yöntemleri 9
2.2 İmmünoterapi 11
2.2.1 Kanser İmmündüzenleme 12
2.2.2 İmmün Sistemin Efektör Mekanizmaları 13
2.2.3 İmmünoterapinin Sınıflandırılması 16
2.3 Gen Terapi 21
2.3.1 Gen Aktarımında Taşıyıcı Sistemler 24
2.3.2 Nanopartiküler Sistemler 31
3 MATERYAL VE METOT 38
3.1 Materyal 38
3.1.1 Kullanılan Cihazlar 38
3.1.2 Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Besiyerleri 39
3.1.3 Kullanılan Sarf Malzemeler 40
3.2 Metot 41
3.2.1 IL-6 Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması 41

3.2.2 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Sentezlenmesi 42
3.2.3 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Karakterizasyonu 44
3.2.4 Plazmid DNA / Nanopartikül Konjugatının Hazırlanması 45
3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları 45
3.2.6 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Sitotoksisitesi 48
3.2.7 Nanopartikül/pDNA Konjugatının MCF-7 Kanser Hücre Hattına Transfeksiyonu 49
3.2.8 Nanopartikül/pDNA Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi 49
4 SONUÇ VE ÖNERİLER **50**
4.1 IL-6 Gen Bölgesini Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması 50
4.2 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Sentezlenmesi 52
4.3 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Karakterizasyonu 53
4.3.1 Kalsiyum Fosfat Nanopartikül ve Plazmid DNA/Nanopartikül Konjugatının Zetasizer Analizi 53
4.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 56
4.3.3 Atomik Güç Mikroskobu (AFM) 57
4.3.4 Fourier Transform Infrared (FT-IR) 59
4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları 60
4.5 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün L929 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi 62
4.6 Plazmid DNA ve Nanopartikül Konjugatının MCF-7 Hücrelerine Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi 64
KAYNAKÇA **67**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **76**

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikada dönme hızı
λ	Dalga boyu
^{o}C	Derece santigrat
g	Gram
Ca	Kalsiyum
CO_2	Karbondioksit
L	Litre
Mg	Magnezyum
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
M	Molar
nm	Nanometre
Na	Sodyum

KISALTMA LİSTESİ

AAV	Adeno-assosiye virüs
AFM	Atomik Güç Mikroskobu
ATR	Attenuated Total Reflectance
CaP-NP	Kalsiyum Fosfat Nanopartikül
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritik Hücre
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Medified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Etil alkol
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier Transform Infrared
GFP	Yeşil Florasan Protein
IFN	İnterferon
IL-6	İnterlökin-6
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
LA	Luria Agar
LB	Luria Broth
MCF-7	Meme Kanser Hücre Hattı
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenlytetrazolium Bromide
NK	Doğal Öldürücü
NP	Nanopartikül
OD	Optik Densite
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDI	Polidispersite İndeksi
PD-L1	Hücre Ölümü Ligandı
PDL-1	Programlanmış Hücre Ölümü Protein 1
RNA	Ribonükleik Asit

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medyum
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCR	T Hücre Reseptörü
TIL	Tümör İnfiltre Edici Lenfosit
TME	Tümör Mikro Ortamı
UV	Ultra Violet
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Hücrede mutasyonlar sonucu meydana gelen kanser oluşumu 7
Şekil 2. 2 Kanser hücresinin altı temel özelliği [17] 8
Şekil 2. 3 Kanser immündüzenleme sürecinin üç fazı [37] 13
Şekil 2. 4 İmmünoterapide kullanılan çeşitli tedavi yaklaşımları 19
Şekil 2. 5 2017 verilerine göre gen terapisi ile klinik uygulamalar [68] 22
Şekil 2. 6 2017 verilerine göre gen tedavisinde kullanılan vektörler [68] 26
Şekil 2. 7 Nanoteknolojinin biyomedikal alanındaki uygulamaları [11] 32
Şekil 2. 8 Nanopartiküllerin özellikleri [104] 34
Şekil 2. 9 Gen aktarımında en çok kullanılan nanopartiküler sistemler 35
Şekil 2. 10 Kalsiyum fosfat nanopartikülü ile nükleik asit arasındaki etkileşim [114] 37
Şekil 3. 1 Plazmid haritası [115] 42
Şekil 3. 2 Plazmidleri çoğaltma ve saflaştırma aşaması 42
Şekil 3. 3 Kalsiyum fosfat molekülünün kimyasal yapısı [116] 43
Şekil 3. 4 Nanopartikül sentez aşamaları 44
Şekil 4. 1 Seçici besiyerinde çoğalan bakteri 50
Şekil 4. 2 Plazmid DNA jel görüntüsü 52
Şekil 4. 3 Mg-CaP nanopartikülüne ait SEM görüntüsü 56
Şekil 4. 4 Na-CaP nanopartikülüne ait SEM görüntüsü 56
Şekil 4. 5 Kalsiyum fosfat nanopartikülüne ait AFM görüntüsü 58
Şekil 4. 6 Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları 59
Şekil 4. 7 MCF-7 meme kanser hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü 61
Şekil 4. 8 L929 fare fibroblast hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü 61
Şekil 4. 9 Farklı konsantrasyonlardaki CaP partiküllerinin sitotoksisite analizi 62
Şekil 4. 10 Transfeksiyon sonrası 24. Saat MCF-7 hücre hattının 20x objektifteki görüntüleri A) Nanopartikül taşıyıcı sistem kullanılarak transfeksiyon faz kontrast görüntüsü B) Nanopartikül taşıyıcı sistem kullanılarak transfeksiyon floresan görüntüsü C) pDNA aracılı transfeksiyon faz kontrast görüntüsü D) pDNA aracılı transfeksiyon floresan görüntüsü 65

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 Doğal ve kazanılmış immün sistemin özellikleri [40] 14
Tablo 2. 2 İmmünoterapi çalışmalarının sınıflandırılması 16
Tablo 2. 3 Gen aktarımında viral ve non-viral vektörlerin özellikleri [6] 25
Tablo 2. 4 Kalsiyum fosfat nanopartikülünün avantaj ve dezavantajları [110] 36
Tablo 4. 1 İzole edilen plazmid DNA yoğunluk ve saflık değerleri 51
Tablo 4. 2 Sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikül formülasyonları 53
Tablo 4. 3 Nanopartiküllerin zetasizer analiz sonuçları 54
Tablo 4. 4 Nanopartikül-pDNA konjugatlarının zetasizer analiz sonuçları 55

ÖZET

MCF-7 Kanser Hücre Hattının Kalsiyum Fosfat Nanopartikülü Kullanılarak İnterlökin-6 Sitokini ile Etiketlenmesi

Seda GENÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabili Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmiştir. Bu ölümcül hastalığın tedavi süresi boyunca zahmeti, maliyeti ve hastaya olan yan etkileri oldukça büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması, alternatif bir tedavi yöntemi olan immünoterapinin gelişmesine yol açmıştır. Böylelikle, temel sorunların en aza indirgenmesi, son yıllarda oldukça adından söz ettiren yeni nesil immünoterapi ile mümkün olabilmektedir. Terapötik genlerin hedef hücrelere transfeksiyonu "vektör" olarak adlandırılan taşıyıcı sistemlerle mümkündür. Moleküler biyoloji ve nanoteknoloji alanlarının ortak çalışması ile geliştirilen nanopartiküller, kanser immünoterapisinde oldukça popüler olan nanotaşıyıcılardır. Kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahip olan kalsiyum fosfat nanopartikülleri *in vitro* ve *in vivo* gen aktarım çalışmalarında umut veren bir yaklaşım olmuştur.

Sunulan tez çalışması kapsamında, kanser immünoterapisinde kullanılmak üzere birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak kalsiyum fosfat nanopartikülleri (CaP) sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından, sentezlenen nanopartiküller aracılığıyla MCF-7 meme kanser hücre hattına IL-6 ve GFP genini kodlayan plazmid aktarımı gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin partikül boyutu, zeta potansiyel değerleri ve boyut dağılım indeksi (PDI) dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Nanopartiküllerin kimyasal yapısı ve sahip olduğu fonksiyonel gruplar, Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile tespit edilmiştir. Partiküllerin morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik güç mikroskobu (AFM) ile belirlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin sitotoksisite çalışmaları L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde MTT analizi ile gerçekleşmiştir. Ardından, sentezi ve karakterizasyon çalışmaları tamamlanan nanopartiküller ile transferi gerçekleştirilecek olan pEGFP N1-IL-6 plazmidi çoğaltılmış ve saflaştırılmıştır. MCF-7 hücrelerine nanopartikül aracılığıyla aktarılan genin transfeksiyon verimi değerlendirilmiştir. Transfeksiyon etkinliği, floresan ataçmanlı inverted mikroskop ile 24 saat boyunca GFP ışımasının takip edilmesiyle tayin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İmmünoterapi, meme kanseri, kalsiyum fosfat nanopartikül, gen aktarımı

ABSTRACT

Labeling of MCF-7 Cancer Cell Line with Interleukin-6 Cytokine Using Calcium Phosphate Nanoparticle

Seda GENÇ

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

According to the data of the World Health Organization, approximately 10 million people died from cancer in 2020. The inconvenience, cost and side effects of this fatal disease during the treatment period are of great importance. In this context, the insufficiency of traditional treatment methods has led to the development of immunotherapy, which is an alternative treatment method. Thus, minimizing the basic problems is possible with the new generation immunotherapy, which has become popular in recent years. Transfection of therapeutic genes into target cells is possible with delivery systems called "vectors". Nanoparticles developed by the joint work of molecular biology and nanotechnology are highly popular nanocarriers in cancer immunotherapy. Calcium phosphate nanoparticles, which have their own advantages and disadvantages, have been a promising approach in *in vitro* and *in vivo* gene transfer studies.

In the presented thesis, calcium phosphate nanoparticles (CaP) were synthesized and characterization studies were carried out by using the co-precipitation method to be used in cancer immunotherapy. Subsequently, plasmid encoding IL-6 and GFP gene was transferred to MCF-7 breast cancer cell line by means of synthesized nanoparticles. Particle size, zeta potential values and size distribution index (PDI) of calcium phosphate nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) method using Zetasizer Nano ZS device. The chemical structure and functional

groups of nanoparticles were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Morphological properties of the particles were determined by scanning electron microscopy (SEM) and atomic power microscopy (AFM). Cytotoxicity studies of synthesized nanoparticles were carried out by MTT analysis on L929 mouse fibroblast cells. The cargo plasmid to be transferred was amplified and purified. The transfection efficiency of the gene transferred to MCF-7 cells via nanoparticle was evaluated. Transfection efficiency was determined by monitoring GFP imaging using a fluorescence microscope for 24 hours.

Keywords: Immunotherapy, breast cancer, calcium phosphate nanoparticle, gene delivery

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kanser, en geniş tanımıyla kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde önemli bir halk sağlığı sorunu olan kanser, ölümlerin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Hastalık dünyanın her yerinde yaygın olarak görülmektedir. Fakat insidansı, ölüm oranı ve hayatta kalma oranları dünyanın farklı bölgeleri arasında kayda değer derecede farklılık gösterir, bu da nüfus yapısı, coğrafi konumu, yaşam koşulları, genetik ve çevresel faktörler gibi birçok etmenle ilişkili olabilir [1]. Kanser hücrelerinin kendine özgü temel özelliklerinin bulunmasının yanı sıra her kanser oluşumu bulunduğu doku tipine göre isimlendirilir ve farklılık gösterir. Kanser hastalığı çeşitli türlere sahip olmasına rağmen, tüm türleri için anormal hücrelerin kontrol dışı düzensiz olarak çoğalması ortak noktadır. Meme kanseri, dünyada en çok tanı konulan ikinci kanser türü olmakla birlikte kadınlarda görülen kanserlerin %30'unu oluşturmaktadır [2]. Kanserle mücadelede pek çok tedavi yöntemi mümkündür. Kanser tedavi modaliteleri; hastanın ihtiyaçlarına, tümörün türüne, hastanın ve hastalığın durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri; kemoterapi, radyoterapi, cerrrahi müdahale yöntemi ve biyolojik yöntemler grubunda yer alan hormon tedavisi olarak sınıflandırılmaktadır. Tüm bu farklı tedavi yaklaşımları tek başına kullanılabildiği gibi birbirlerine yardımcı olmak adına birlikte de kullanıldığı görülmektedir. Uzun yıllardır kullanılmakta olan geleneksel tedavi şekillerinin avantajları olduğu kadar dezavantajları da söz konusudur. En çok tercih edilen kemoterapi ve radyoterapi tedavileri sonrasında, hasta kişide günlük hayatı olumsuz yönde etkileyecek yan etkiler görülmesi kaçınılmaz olmaktadır. Ayrıca cerrahi yöntem, tümörün boyutu ve vücut içerisindeki konumuna bağlı olarak olarak her zaman tercih edilememektedir. Biyolojik tabanlı tedaviler ise her kanser türünde istenilen etkiye sahip olamayabilir. Her birey, sağlıklı hücrelerin yanında kanser hücrelerini de vücudunda barındırır. Bağışıklık sistemi sayesinde normal hücreler, istenmeyen hücreleri yakalar ve yok eder. Kanser oluşumunda

görev alan çeşitli gen grupları, mekanizmalar ve mutasyonlar sonucu sağlıklı hücreler bu görevini yerine getirmekte zorlanır. Bu sebeple geleneksel yöntemlere alternatif olarak geliştirilen immünoterapi, bağışıklık sistemini birçok yönden tetikleyerek farklı mekanizmalarla kanser hücrelerini hedefleyen ve öldürmeyi amaçlayan oldukça yenilikçi bir tedavi şeklidir. Kanser immünoterapisi, hastaya ve hastalığa özgü bir yaklaşım sergileyerek hedefe yönelik tedavi sağlamaktadır [3], [4]. İmmünoterapi alanında kullanılan başlıca efektör mekanizmalar; makrofajlar, dendritik hücreler (DC), nötrofiller, doğal öldürücüler (NK), T ve B lenfosit hücreleridir. Tedavi bazlı en çok kullanılan bileşenler; sitokinler, monoklonal antikorlar ve immün sisteme özgü hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Temel olarak immünoterapi, pasif ve aktif olarak iki gruba ayrılmaktadır. Pasif immünoterapi, kişinin kendi savunma sistemi tarafından üretilen çeşitli proteinleri esas alarak kanserle mücadele etme temeline dayanmaktadır. T hücreleri ve kanser antijenlerine spesifik olan antikorlar pasif immünoterapi grubunda yer almaktadır. Aktif immünoterapi ise, immün yanıt oluşturmak için bağışıklık sisteminin iç ve dış uyaranlarla uyarılması sonucu faaliyet gösteren bir yaklaşımdır. Bu yöntem için kullanılmakta olan moleküller; sitokinler, kanser aşıları, onkolitik virüsler ve immün kontrol noktaları olarak sayılmaktadır [5].

Gen tedavisi, kalıtsal bozukluklar ve kanser gibi hastalıkların oluşmasından sorumlu olan gen bölgelerinin yeniden düzenlemesi ile çığır açan bir stratejidir. Tedavi amacıyla, hücre içerisine gönderilecek olan nükleik asitlerin gen aktarım sistemlerinin etkili, güvenli ve kalıcı olması gerekmektedir. DNA, RNA, siRNA gibi biyomoleküler sistemlerin belirli hücrelere gen aktarımını sağlamak viral ve viral olmayan vektörler ile mümkündür. Her iki yaklaşımında kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Yüksek güvenirlik, yüksek gen taşıma kapasitesi, biyouyumluluk, düşük oranda immünojenik tepki, düşük toksisite gibi avantajlara sahip viral olmayan grupta yer alan nanopartiküler sistemler birkaç on yıldır oldukça sık kullanılmaktadır [6]. Nanopartiküler sistemler, nanoteknoloji alanının gelişmesiyle ivme kazanmış nanometrik çapta geliştirilen nanoparçacıklardır. Bu sayede hücre zarına kolayca nüfuz edebilmekte ve zardan geçebilmektedir. Nanopartiküllerin klinik tedavi uygulamalarında, gen tedavilerinde, hücre içi biyolojik süreçlerin izlenmesinde ve yüksek etkide transfeksiyon yapabilme özelliğine sahip olduğu pek çok araştırmada rapor edilmiştir. Nanopartiküllerin

polimerik, lipid, inorganik, misel, dendrimer ve karbon tüpleri gibi çeşitleri bulunmaktadır [7]. Kalsiyum fosfat nanopartikülleri biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirliği bakımından eşsiz özellikler sunan nanomalzemelerdir. Gen iletimi ve etkili transfeksiyon için yaklaşık 40 yıldır var olan nanopartiküller çeşitli metotlar ile sentezlenerek günümüzde kullanılmaya devam etmektedir [8].

1.2 Tezin Amacı

Önerilen tez çalışmasında, Rejeneratif Doku ve Hücre Kültürü laboratuvarı bünyesinde, gen aktarımında kullanılacak olan nanotaşıyıcıların sentezi, karakterizasyonu, sitotoksisitesi ve pEGFP N1-IL6 plazmidinin çoğaltılarak saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilecektir. Sunulan çalışmada amacımız, viral olmayan vektörler grubunda yer alan biyouyumlu kalsiyum fosfat nanopartikülleri aracılığıyla meme kanser hücre hattının hedeflendirilmesi ve tümör hücrelerine aktarılan genin transfeksiyon veriminin değerlendirilmesi olmuştur.

1.3 Hipotez

Sunulan tez çalışması kapsamında, gen aktarımı çalışmalarında yüksek derecede kullanılma potansiyeline sahip nanopartiküler sistem olan kalsiyum fosfat ile inflamatuvar yanıtta ve kanser patogenezinde önemli rol oynayan sitokinler kullanılarak tümör hücreleri hedeflendirilmiştir. Böylece, kanser tedavisinde kullanılan yeni nesil immünoterapi yöntemi için kullanılabilir bir model oluşturulacağı öngörülmektedir. Gen aktarımında kullanılmak üzere sentezlenen nanotaşıyıcılar ile transfeksiyon etkinliğinin arttırılması ve kanser hücrelerinde daha yüksek seviyede ifade edilecek olan hedef genin bağışıklık sistemini indüklemesi amaçlanmaktadır. Geleneksel kanser tedavi yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen terapötik ilaçların yaygınlaştırılması ile ilaç sektörü, biyomühendislik ve tıp alanlarına katkı sağlanacağı, aynı zamanda tedavi sürecinde gerçekleşen sağlıklı hücrelerin de ölmesi gibi karşılaşılan problemlere çözüm yolu olması düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

2.1.1 Kanser Tanımı ve Tarihçesi

Eski çağlara kadar uzanan ve tarih boyunca insanlar ve hayvanlarda görülen kanserin izlerine, fosilleşmiş kemik tümörleri, Mısır'daki insan mumyaları ve eski el yazmaları gibi kanıtlara dayanılarak rastlanılmıştır. Mumyalarda osteosarkom adı verilen kemik kanserini düşündüren büyüme görülmesi, baş ve boyun kanserinde görülen kemik kafatası yıkımı kanıtlara örnek olarak verilebilir. Bu yüzdendir ki, yüzyıllardır hayatımızda olan bu hastalığa dair tıp tarihi boyunca sayısız araştırmanın yapılması şaşırtıcı değildir. Kanser tanımı, ilk olarak M.Ö. 3000'lerde Edwin Smith Papirüsü olarak isimlendirilen ve eskiden Mısır'da okutulan bir cerrahi ders kitabının bir parçası olarak Mısır'da ortaya çıkmıştır. Kanser, henüz kanser terimi olarak kullanılmadan önce pek çok bilim insanı tarafından farklı şekilde isimlendirilmiştir. Kanser terimi ilk defa "Tıbbın Babası" olarak adlandırılan Yunan doktor Hipokrat (M.Ö. 460-377) tarafından kullanılmıştır. Hipokrat'ın, organizmada şifası olmayan yeni yapılanmalar olarak gördüğü, özellikle ülseri ve ülsere meydan olan tümörleri tanımladığı görülmüştür. Vücut yüzeyinde yavaş büyüme seyreden, kırmızı, sıcak, ağrılı ve diğer hastalıklardan farklı karaktere sahip olan şişliklere Hipokrat, "karkinos" ya da "karkinoma" adını vermiştir. Başka bir Yunan hekimi olan Galen (M.S. 130-200) "oncos" adını kullanırken, Romalı hekim Celsus (M.Ö. 28-50) ise yengece benzeyen fiziksel yönü nedeniyle "kanser" adını vermiştir [9].

Türk tıp tarihinde ise kansere "seretan" adı verilmiştir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi'nin "Kenzüsıhhatül Ebdaniye" (1298) adlı eserinde seretan, fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağrılı, etrafı vasküler bir sistem tarafından oluşum gösteren olarak tanımlanmaktadır. Şerafeddin Sabuncuoğlu'nun "Cerrahiye-i İlhaniye" adlı eserinde (1465) ise seretanın çevresinin dağlanarak kitlenin kesilmesi önerilir. Ancak uzun zamandır duran ve büyük olan kitlenin dağlanmaması gerektiği belirtilmektedir. Kanser üzerinde ilk bilimsel, mikroskobik inceleme Marcello Malpighi (1628-1694) tarafından yapılmıştır. Antony van Leeuwenhoek (1632-

1723) tek mercekli mikroskobu geliştirerek kanserin daha iyi anlaşılması için büyük adımlar atmıştır. Günümüzde bilinen birçok kanser türünü ise Morgagni (1682-1771) tanımlamış ve primer tümörleri sekonder yani ikincil tümörlerden ayırmıştır [10].

Kanser, vücudumuzun yapıtaşı olan normal hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla anormal bir büyüme sağlayan, sonrasında diğer doku ve organlara yayılma gösterebilen kısaca kontrolsüz hücre bölünmesi olarak nitelendirilen bir hastalık grubudur. Kanserli dokularda, hücrelerin çoğalması ile apoptozis arasındaki denge bozulmuştur. Hücrelerin olması gerekenden daha fazla sayıda çoğalması durumunda, hücre ölümünün gerçekleşmemesi anormal hücrelerin aşırı artışına sebep olmaktadır. Vücudun herhangi bir yerinde meydana gelen tümörler, benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilir. Benign tümörler, belirli bir bölgede çoğalma gösterirler ve metastatik özelliğe sahip değildirler. Yani vücudun diğer kısımlarına yayılma göstermezler. Malign tümörler ise oluşum gösterdiği bölgede büyüyerek çoğalma gösterir ve yakın çevresindeki organ ya da dokuları da istila eder. Böylece kanser dokusu, çevre dokularla etkileşmeye geçerek vücuttaki normal fizyolojik akışı bozmuş olur.

2.1.2 Kanser Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2020 yılında tehlikeli ve ölümcül olan hastalıkların başında gelen kanser sebebiyle yaklaşık 10 milyon kişi hayatını kaybetmiştir. Yakın gelecekte, kansere yakalanan hasta sayısında artış görüleceği ve 2030 yılı itibari ile kanser sebebiyle gerçekleşen ölüm sayısının 13,1 milyona ulaşacağı öngörülmektedir [11]. En yaygın görülen kanser türleri meme kanseri, akciğer kanseri, kalın bağırsak kanseri, prostat kanseri ve cilt kanseri olurken, kanserden ölenlerin sayısı en fazla akciğer kanseri, kolokteral kanseri, karaciğer kanseri ve mide kanserinden kaynaklanmıştır. 2018 yılında erkeklerde görülen en ölümcül kanser türleri akciğer kanseri %22, karaciğer kanseri %10,2, mide kanseri %10,5 ve kalın bağırsak kanseri %9 iken kadınlarda görülen en ölümcül kanser türleri meme kanseri %15, akciğer kanseri %13,2, kalın bağırsak kanseri %9,5 ve rahim ağzı kanseri %7,5 olmuştur [12]. Bununla birlikte, 2008-2017 tarihleri arasında, kadınlarda meme ve kolorektal kanserlerinde azalma görülmüştür.

2017'de akciğer kanseri, diğer kanser türlerine kıyasla daha fazla ölüme sebebiyet vermeye devam etmiştir [13].

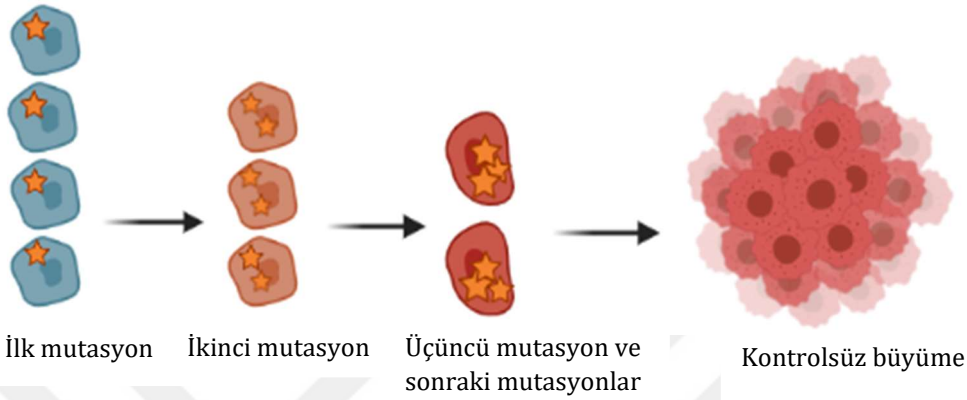
2.1.3 Kanser Etiyolojisi

Kanserin oluşum sürecinde kanser türüne göre farklılık gösteren pek çok etken rol oynamaktadır. Kanser etiyolojisi ve oluşum mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hem kalıtsal hem kazanılmış (edinsel) etmenler etkinlik göstermektedir. Kalıtsal olan etmen, anormal genin nesilden nesile aktarılması temeline dayanmaktadır. Kanser hastalarının çok az bir kısmının (%5-10) kalıtsal geçiş gösterdiği belirlenmiştir. Nadir olarak görülen ailevi geçişli kanser türlerine örnek olarak, çocuklarda görülen retinoblastom verilebilir. Ailesel hastalıklarda kanser gelişme göstermesine rağmen aileye mensup bazı bireylerde kanser görülmeyebilir. Cinsiyete bağlı olarak kadınlarda meme, serviks ve over kanseri erkeklerde ise prostat ve testis kanseri görülme riski fazladır. Kazanılmış faktörler ise fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak 3 başlık altında toplanabilir. Radyasyon ve ultraviyole ışınları, DNA yapısının bozularak kanser oluşum riskini artıran fiziksel faktörlerdir. Sigara, alkol ve alkilleyici ajanlar kimyasal faktörler grubunda yer alırken, biyolojik faktörler ise virüs kaynaklıdırlar [14].

2.1.4 Kanser Gelişimi

Kanser gelişimi (karsinogenez), fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların neden olduğu DNA bozulmaları sonucunda ortaya çıkan genetik veya epigenetik değişimlerden kaynaklanan çok kademeli bir süreçtir. Kanser oluşumundan sorumlu 3 önemli gen mevcuttur. Bunlar: onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir. Normal genler olan proto-onkogenler mutasyonlar sonucu onkogenlere dönüşerek kanser oluşumunu teşvik eder. Tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleri ise onkogenlerin aksine kanser oluşumunu inhibe etmekten sorumludurlar. Hücre döngüsünün kontrolündeki değişiklikler kansere özgü belirleyicidir. Genetik materyal hasarlandığı zaman hücrenin buna vereceği ilk yanıt, hasarı tamir etmektir. Tamir edilemeyecek vaziyette olan hasar durumunda ise hücrenin cevabı kendini apoptoza sürüklemek olacaktır. Hücre döngüsünde bulunan proto-onkogenler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler hücrenin apoptoza sürüklenmesini ya da çoğalmasını kontrol eder. Meydana gelen mutasyonlar, hücrenin pozitif veya negatif kontrolünde değişikliğe yol açarak

normal yapıdaki hücrenin işleyişini bozar ve Şekil 2.1'te gösterildiği gibi kontrolsüz çoğalmasına neden olur. Mutasyonlar sonucu oluşan kanser hücrelerinin malign özellik kazanması, çevrelerindeki dokunun, organların ve hatta organizmanın yaşamını tehdit eder. Böylece metastaz olarak adlandırılan ikinci süreç başlamış olur. Metastazlar, kanserden kaynaklanan birincil ölüm sebebidir [15], [16].

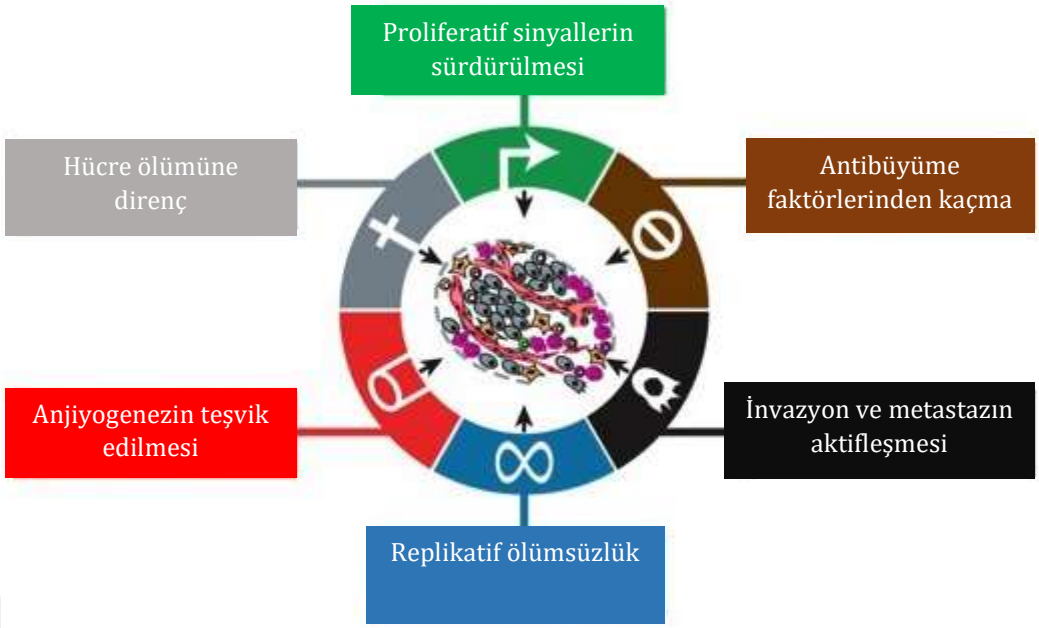


Şekil 2. 1 Hücrede mutasyonlar sonucu meydana gelen kanser oluşumu

2.1.5 Kanserin Moleküler Özellikleri

2000 yılında ünlü iki bilimi insanı Douglas Hanahan ve Robert A. Weinberg yaptıkları araştırmalar doğrultusunda, kanser hücrelerinin hücre bölünmesine sebep olan sinyallerin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçış, invazyonun ve metastazın aktifleşmesi, bölünme temelli ölümsüzlüğün sağlanması, anjiyogenezin teşvik edilmesi ve hücre ölümüne direnç göstermeleri bakımından 6 temel biyolojik özelliğe sahip olduğunu tüm dünyaya göstermişlerdir (Şekil 2. 2) [17].

2011 yılında Douglas Hanahan ve Robert A. Weinberg tarafından sunulan yeni bir çalışma ile kanser hücrelerine dört özellik daha eklenmiştir. Yeni kazandırılan özellikler; tümör hücresini destekleyen inflamasyon, genomik instabilite ve mutasyonlar, immün sistem tarafından gerçekleşecek olan yıkımdan kaçınabilmek ve enerji metabolizmasının tekrar aktif hale getirilmesi belirtilmiştir [18].



Şekil 2. 2 Kanser hücresinin altı temel özelliği [17]

2.1.6 Meme Kanseri

2020 yılında dünya çapında, meme kanseri teşhisi konan 2,3 milyon kadın ve meme kanseri sebebiyle hayatını kaybeden 685.000 kişi bulunmaktadır. 2020 yılının sonu itibari ile son 5 yıl içerisinde 7,8 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve bu da onu dünya çapında en sık tanı konan kanser türü yapmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda genellikle ergenlikten sonra görülmeye başlamakta ve ilerleyen yaşlarda artan bir oranla ortaya çıkmaktadır [19].

Meme kanseri, memenin glandüler dokusunda bulunan kanalların (%85) ya da lobüllerin (%15) epitel hücrelerinde oluşum göstermektedir. Başlangıçta, kanserli büyüme ortaya çıktığı kanallar ya da lobüller ile sınırlıyken, zamanla ilerleyerek invaziv özellik kazanır ve çevredeki meme dokusunu istila eder. Daha sonra lenf düğümleri gibi yakın bölgelere (bölgesel metastaz) ve ardından diğer organlara (uzak metastaz) yayılım göstererek ilerleyebilir [19]. Kalıtsal gen mutasyonları kanseri tetikleyen bazı etmenlerdendir. Meme kanserinin en sık rastlanan nedeni ise BRCA1, BRCA2 ve PALB-2 genlerindeki mutasyonlardır. Meme kanser riskini artıran diğer faktörler; yaş, obezite, genetik yatkınlık, radyasyona maruz kalma, üreme öyküsü, alkol ve tütün kullanımı olarak sayılabilir [20]. Meme kanserinin en

güçlü risk faktörü ise kadın cinsiyetidir. Erkeklerin sadece %0,5-1'inde meme kanseri görülmektedir.

Meme kanserinin tedavisinde hastalığın erken tanı ve teşhisi ile %90 veya daha yüksek oranda hayatta kalma olasılığı bulunmaktadır. Fakat bu oran, ülkenin sağlık sisteminin gücüne, coğrafi konumuna, mali değerlerine, eğitim ve/veya doğurganlık oranlarına bağlı olarak dünya genelinde farklılıklar göstermektedir [21]. Yayınlanan bir çalışma ile 158 ülkedeki kanser kontrol planları incelendiğinde, yüksek gelirli ülkelere kıyasla düşük gelirli ülkelerdeki meme kanser teşhis programlarının daha az olduğu bildirilmiştir [22]. Geçmişte tüm meme kanserleri cerrahi yöntem olarak mastektomi adı verilen memenin tamamen alınması olarak tedavi edilmekteydi. Günümüzde ise neredeyse tüm kanser çeşitlerinde yaygın olarak kullanılan radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapi yöntemleri kullanılmaktadır [23].

2.1.7 Kanser Tedavisinde Geleneksel Tedavi Yöntemleri

Kanser hastalığının seyri kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bu nedenle uygulanacak tedavi yöntemlerinin hastalara özgü olması gerekmektedir. Tedavi yönteminin belirlenmesi için tümörün bulunduğu doku, boyutu ve biyolojik özellikleri gibi bazı kriterler göz önüne alınmaktadır. Geleneksel kanser tedavi uygulamaları; radyoterapi, kemoterapi, cerrahi müdahale ve hormonal yöntemler olarak sınıflandırılmakta ve tekli ya da birlikte olacak şekilde kullanılabilmektedir.

a) Cerrahi Yöntem

Cerrahi yöntem, teşhis edici, engelleyici, iyileştirici ve destekleyici özelliklere sahip olması bakımından kanser tedavisi ve kontrolü için uzun yıllardır kullanılmakta olan temel yöntemlerdendir [24]. Sağlıklı diğer dokulara zarar vermeden, kanserli dokuyu vücuttan tamamen çıkarmak için hastanın ameliyat olması en iyi seçenektir. Fakat tümör metastatik özellik kazanarak yayılma göstermiş ise cerrahi yöntem tercih edilmemektedir. Tümörün boyutunun büyük olduğu ve yayılım gösterdiği durumlarda, cerrahi yöntem yerine radyoterapi ve kemoterapi tercih edilmektedir. Cerrahi yöntemde, tümörlü dokunun durumuna göre lazer cerrahi, elektro cerrahi, robotik cerrahi, kriyo cerrahi gibi birden çok çeşidi mevcuttur [25].

b) Kemoterapi

Kemoterapi (KT), kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntem olmakla birlikte kanser hücrelerinin öldürmesini esas almaktadır. Bu amaçla kemoterapötik ajanlar kullanılarak büyük yapılı tümörlerin küçültülmesi, metastatik özelliğin önlenmesi ve tümörlü hücre ve doku sayısının azaltılması hedeflenmektedir. Genellikle diğer tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılan bu yöntem ile meme kanseri, mesane kanseri, gastrik kanseri, cilt kanseri, akciğer kanseri gibi çok çeşitli kanser türleri üzerinde olumlu sonuçlar alındığı bilinmektedir. Avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunan kemoterapötik ilaçların, kanserli hücreler ile birlikte sağlıklı hücrelere de zarar vererek öldürdüğü bilinmektedir. Dahası, tedavi sonrası hasta kişinin yaşamını olumsuz yönde etkileyecek kusma, yorgunluk, saç dökülmesi, iştah kaybı ve psikolojik sorunlar gibi yan etkileri görülmektedir [25], [26].

c) Radyoterapi

Radyoterapi (RT), kanserli hücrelerin iyonize ışınlarına maruz bırakılarak yok edilmesi temeline dayanan tedavi yöntemidir. Radyoterapide, kanserli dokunun olduğu bölge tespit edilerek vücudun tümünün ışına maruz kalmasını önlemek amaçlanmaktadır. Fakat tedavi alanı içerisinde kalan ve kanserli hücrelere komşu olan normal hücrelerin ölmesi kaçınılmaz olabilmektedir [16]. Radyoterapinin sağlıklı hücreler üzerinde olumsuz etki göstermesinde birçok faktör önemli rol oynamaktadır. Bu etmenler; tedavinin uygulanacağı alanın genişliği, hasta kişinin yaşı ve genel sağlık durumu, toplam ya da günlük ışın maruziyeti ve tedavinin kalitesi olarak sıralanabilir. Kemoterapide olduğu gibi radyoterapi tedavisi sonrasında da hastanın günlük hayatını olumsuz etkileyecek yan etkiler görülmektedir [27].

d) Hormonal Tedavi

Hormonlar vücutta doğal olarak sentezlenen protein grubudur. İç salgı bezleri tarafından üretilerek kan dolaşımına katılır ve hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak doku ve organların davranışlarını kontrol ederler. Hormonlar, kemoterapi ilaçlarından farklı olarak doğal yollarla üretilir ve kanser tedavisinde ilaç olarak kullanılırlar. Özellikle meme kanseri [28], prostat kanseri [29] ve endometriyum kanseri [30] tedavi süreçlerinde uygulanırlar. Hormonal tedavide kullanılan ilaçlar, kanser hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak

tümörün büyümesini teşvik eden hormonların bağlanmasını engeller ve böylece kanser hücrelerinin büyümesi baskılanmış olur. Hormon tedavisinde kullanılan her ilacın işleyiş biçimi ve etkilediği hücre grupları farklılık göstermektedir [25].

2.2 İmmünoterapi

İmmünite, vücuda sonradan dahil edilen toksin, mikroorganizma gibi yabancı bileşenlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınarak vücudun kendisini korumak, direnç göstermek amacıyla savunma sistemini de kullanarak zararlı maddeyi yok etmeyi hedeflemesi olarak tanımlanabilir [31].

Kanser immünoterapisi, spesifik tedaviler arasında yer almaktadır. Kelime anlamı olarak bireyin immün yani bağışıklık sistemini kullanarak, kanser hücreleriyle savaşmasını ve yok etmesini sağlayan tedavi yöntemidir [26]. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile kanser tedavisinde oldukça popüler olan immünoterapi hastaya ve hastalığa özgü bir yaklaşım sergileyerek hedefe yönelik tedavi sağlamaktadır. Kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahale ve hedeflendirilmiş tedavi yöntemleri ile birlikte de uygulanabilen immünoterapi, bu yöntemlere katılarak kanser tedavisinin "beşinci adımı" olarak kabul edilmiştir [32]. Kanser immünoterapisinde asıl amaç, hastanın kendi savunma sistemini aktif kullanarak anti-kanser yanıtın oluşturulması ve kanser ile mücadele edilmesi esas alınmaktadır. Tümörle ilişkili bağışıklık hücreleri, tümör oluşumunda önemli bir role sahiptir. Tümör mikro ortamı (TME) içinde yer almakta olan bağışıklık hücreleri, tümörün oluşumunda ve büyümesinde önemli rol oynar. Bu tümörle ilişkili bağışıklık hücrelerinin tümörü yok edici yani apoptoza sürükleyici ya da tümörü destekleyici yani proliferasyonunu sağlayacağı fonksiyonlara sahip olabileceği bilinmektedir [33].

Tarih boyunca kanser hastalarında yüksek ateşin ve/veya bulaş faktörlerinin tümör boyutunu küçülttüğüne dair pek çok açıklama yer almıştır. Bu bilgiler doğrultusunda kötü huylu tümörün histolojik olarak doğrulanması ancak 18. yüzyılın ikinci yarısında mümkün olmuştur. İki Alman doktor Busch ve Fehleisen tarafından kanser hastaları üzerinde erizipel (Streptococcus pyogenes) enfeksiyonunun bağımsız olarak tümörü küçülterek gerilettiği bulunmuştur [32]. 1891 yılında ise Amerikalı cerrah William B. Coley tarafından geliştirilen ilk sistematik immünoterapi çalışması, "Coley'in toksinleri" olarak adlandırılan ısı ile inaktive edilmiş bakterilerin kanser hastalarına enjekte edilmesiyle olmuştur. Coley

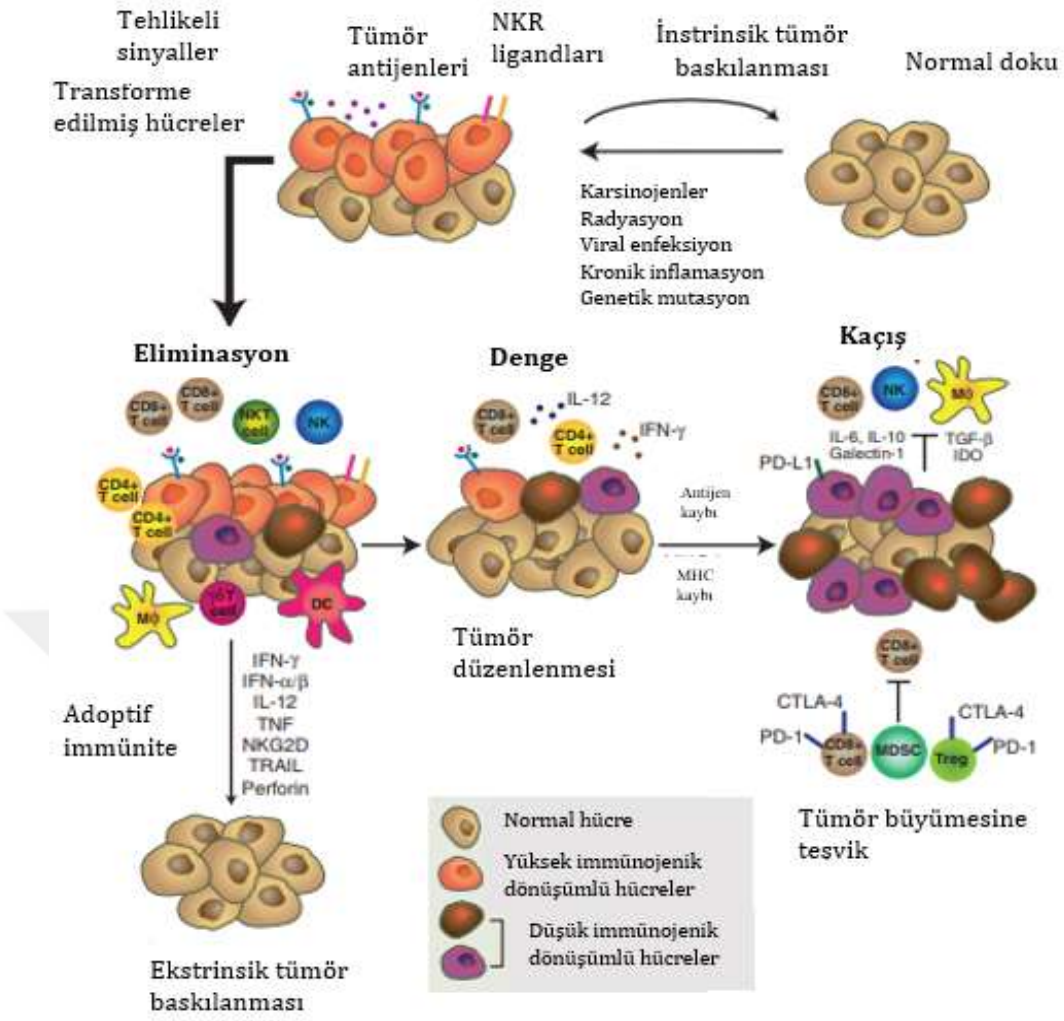
tarafından başlatılan bu proje sonucunda, büyük çoğunluğu sarkoma hastası olan binlerce kanser hastasında tümör gerilemesi olduğu kaydedilmiştir [34], [35].

Coley'in buluşunun ardından literatürde anti-kanser çalışmaları adına pek çok önemli gelişme kaydedilmiştir. Başarıyla elde edilen klinik çalışmalar doğrultusunda kanser immünoterapisi, 2013 yılında Science dergisi tarafından "Breakthrough of Year" olarak adlandırılmıştır [36]. Günümüzde gelişen bilim ve teknolojinin katkısıyla immünoterapi alanında sayısız çalışma yapılmış ve önemi büyük ölçüde artmıştır.

2.2.1 Kanser İmmündüzenleme

Günümüzde kanser hücrelerinin vücuttaki normal hücrelerden biyokimyasal farklılıklar nedeniyle ayrılmakta olmasıyla birlikte bağışıklık sistemi tarafından tanınabildiği bilinmektedir. İmmün sistem hücreleri tümör hücrelerini tanıyarak yok etme potansiyeline sahiptir. Kanser hücrelerinin ise çeşitli mekanizmalarla bağışıklık sisteminin eliminasyonundan kaçabileceği dinamik bir dönem olarak adlandırılan immüno-düzenleme sistemi mevcuttur. İmmüno-düzenleyici hipotezi Şekil 2.3'te görüldüğü gibi "Elimination (Yok etme)", "Equilibrium (Denge)" ve "Escape (Kaçış) olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır [37].

İlk aşama olan eliminasyonda, malign veya potansiyel olarak malign hale gelen ve DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılamayan hücreler başlangıçta bağışıklık sistemi tarafından immüno-gözetim yoluyla tanımlanabilir ve öldürülür. Eliminasyonun ardından ikinci aşama, bağışıklık sistemi tarafından tahrip edilemeyen tümör hücrelerinin tamamen yok edilemediği ancak ilerlemesinin önüne geçildiği denge fazıdır. Bu aşamada, tümör hücreleri bağışıklık sistemi ile birlikte var olmaya devam eder. Yani hem immün gözetimde olduğu gibi bağışıklık hücreleri tarafından öldürülür hem de eliminasyondan kaçmayı başaran kanser hücreleri yeniden mutasyonlar oluşturarak bölünmeye devam eder. Denge fazı, immün düzenleme sisteminde en uzun süren ve teorik olarak yıllarca sürebileceği düşünülmekte olan aşamadır. Sistemin üçüncü aşaması olan kaçış evresinde ise kanser hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından kontrol edilemeyebilir ve eliminasyon eksikliği nedeniyle büyüyerek metastaz yapabilir [38].



Şekil 2. 3 Kanser immündüzenleme sürecinin üç fazı [37]

2.2.2 İmmün Sistemin Efektör Mekanizmaları

İmmünite doğal ve adaptif (kazanılmış) olarak iki kategoriye ayrılmaktadır (Tablo 2.1). Vücudun kendi savunma sisteminin bulunduğu çeşitli mekanizmalar doğal immünite olarak adlandırılırken, zararlı bileşenlere ait antijenlerin vücuda yapay yollarla verilmesi adaptif immünite olarak adlandırılır. Doğal immünite hücreleri; makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller ve doğal öldürücüler (NK) iken adaptif immün hücreleri; T ve B lenfositleridir [39].

Tablo 2. 1 Doğal ve kazanılmış immün sistemin özellikleri [40]

	DOĞAL	**ADOPTİF**
TEPKİ SÜRESİ	• Anında reaksiyon	• Gecikmiş reaksiyon
ÖZGÜLLÜK	• Spesifik olmayan	• Spesifik
HAFIZA	• Aynı patojenlere maruz kalındığında aynı yanıt gösterilir	• Aynı patojenlere maruz kalındığında bağışıklık kazanılmış olur
HÜCRE BİLEŞENLERİ	• Makrofajlar • Dentritik hücreler • Doğal öldürücüler (NK)	• T lenfositleri • B lenfositleri

1. Makrofajlar: Makrofajlar kanser ve çeşitli hastalıkların üstesinden gelmek için savunma sistemlerini kullanarak anormal hücreleri tespit etme ve yok etme yeteneğine sahip doğal bağışıklık sisteminin önemli kritik bileşenidir. Ayrıca vücuttaki hücresel atıkları ve yabancı bileşenleri fagositoz yoluyla sindirerek çöpçü hücreler olarak da adlandırılmaktadır [39]. Doğuştan bağışıklık sisteminin bir parçası olan makrofaj hücreleri sinir sistemi, karaciğer, akciğer, bağ doku, kemik ve eklem bölgelerinde bulunmaktadır. T hücrelerine antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar. Makrofajlar, makrofaj aktive edici faktörler ile aktive olarak ya da antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksisite mekanizmasını kullanarak tümör hücrelerini elimine ederler [41].

2. NK Hücreler: NK (doğal öldürücü) hücreleri kanser hücrelerini hedef alan ve onları sitotoksik granüller salarak lizize uğratan hücrelerdir. NK hücreleri hematolojik kanserlerde ve metastatik yayılmanın kontrol edilebilmesinde önemli rol oynayan anti-tümör bağışıklığının temel faktörlerindendir. NK hücreleri, tümör hücrelerinin yüzeyindeki NK reseptörlerine bağlanarak aktif hale geçerler. Önceden duyarlılaştırılmaya ve kanser hücresi antijenlerine ihtiyaç duymadan dönüştürülmüş ya da değiştirilmiş hücreleri hedefleyebilmekte ve doğrudan

öldürebilmektedir. Bu özellikleri sayesinde T hücresi immünoterapi çalışmalarına alternatif olarak NK hücre bazlı immünoterapi alanında yeni gelişmelere yol açması oldukça heyecan verici olmaktadır [42], [43].

3. Dendritik Hücreler: İmmün sistemin önemli diğer bir parçası olan dendritik hücreler (DC) esas olarak profesyonel antijen sunan hücrelerdir. Beyin, testis ve göz haricinde diğer tüm dokularda bulunmaktadır [44]. Olgun olmayan bu hücrelerin aktive olabilmesinin ilk adımı olgunlaşmasının sağlanmasıdır. Bu bağlamda DC'lerin önce tümör hücreleri ile karşılaşması gerekmektedir. Ardından sayılarını çoğaltarak olgun hale erişim sağlamış olurlar [33]. DC'nin temel fonksiyonları 3 ana başlık altında incelenir [44]:

i) Diğer immün sistem hücrelerine antijen sunumu ve tümör hücrelerini fagosite ederek T hücresi aktivasyonu için sinyaller sağlayabilmek,

ii) İmmün tolerasın oluşturulması ve sürekliliğini koruyabilmek,

iii) Özellikle folliküler DC'de olmak üzere humoral (bellek) immüniteyi oluşturmak ve geliştirmek üzere B hücreleri ile etkileşime girebilmektir.

4. T lenfositleri: Vücuttaki kemik iliği kök hücrelerinden farklılaşarak oluşan T hücreleri kazanılmış bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Bölünüp çoğalarak hücresel savunmada rol oynayan T hücrelerinin farklılaşması sonucunda, sitotoksik T hücreleri (CD8+), yardımcı T hücreleri (CD4+) ve TCR gibi alt sınıfları mevcuttur. Adaptif T hücre tedavisi tümör immünitesinde belirli metastatik ve primer tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için lenfositlerin anti-tümör özelliklerini kullanan umut verici ve en önemli role sahiptir. Bu yöntemde, tolerize edici olmayan bir ortam altındaki lenfositler ex-vivo olarak uyarılır, daha sonra aktive edilmiş T hücreleri hastalara yeniden verilir. T hücrelerinin başlıca iki görevi vardır;

a) kanser hücrelerini doğrudan öldürürler,

b) tümör antijenlerini tanıyarak immün sistemin diğer mekanizmalarını aktif hale getirirler [45], [46].

Son yıllarda, özellikle kişiye özgü ve hedefe yönelik olan CAR-T (kimerik antjen reseptörü) hücre tedavisinin kanser immünoterapisinde çığır açtığı söylenebilir.

5. B lenfositleri: B lenfositleri humoral immün yanıt oluşturarak vücudun savunmasını sağlayan immün sistem hücreleridir. Yani B lenfositleri plazma

hücresine farklılaşıp antikor üretimini sağlayarak vücudun humoral (sıvısal) savunma mekanizmasını gerçekleştirmektedir. B lenfositleri yabancı antijenleri tanıyarak onlara karşı çeşitli antikorları üreterek patojen mikroorganizmaları etkisiz kılabilmekte ya da fagosite özelliği gösteren diğer hücreleri aktive edebilmektedir. B lenfositleri sentezledikleri immünoglobulin-(Ig) reseptörlerini hücre membranında taşımaları özelliği ile diğer lenfositlerden ayrılır. Bu reseptörler antijenlere karşı özgül reseptörleri oluşturarak antikor gelişimini sağlamış olurlar [46].

2.2.3 İmmünoterapinin Sınıflandırılması

Kanser immünoterapisinde çok çeşitli yaklaşımlar yer almakta ve uygulanmaktadır (Şekil 2.4). Bu doğrultuda immünoterapi, genel olarak aktif immünoterapi ve pasif immünoterapi olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir (Tablo 2.2) [47].

Tablo 2. 2 İmmünoterapi çalışmalarının sınıflandırılması

İMMÜNOTERAPİ	AKTİF	PASİF
SPESİFİK	• Kanser aşıları • Onkolotik virüsler	• Monoklonal antikorlar
SPESİFİK OLMAYAN	• Sitokinler • İmmün kontrol noktası inhibitörleri	• Adoptif hücresel terapi

2.2.3.1 Aktif immünoterapi

Aktif immünoterapide, baskılanmış immün sistemin laboratuvar ortamında sentetik olarak sentezlenebilen çeşitli biyolojik uyaranlarla uyarılarak tümör hücrelerinin öldürülmesi amaçlanmaktadır. Bu yaklaşımda, konakçı bağışıklık sistem hücrelerinin tümör hücreleri yüzeyinde bulunan tümörle ilişkili antijenlere hedeflendirilmesi söz konusudur [48]. Aktif immünoterapi yönteminde kullanılan biyolojik ajanlar: kanser aşıları, immün konrol noktası inhibitörleri ve onkolotik virüslerdir.

a) Kanser aşıları: Aktif immünoterapinin kanser tedavisinde kullanılan ve son yıllarda devrim niteliğinde olan kanser aşıları, tümör hücrelerini hedefleyerek onların ortadan kaldırılmasını amaçlar. Kanser aşıları, tümörle ilişkili veya tümöre özgü antijenlere karşı in vivo olarak tümöre spesifik bağışıklık tepkisini indüklemek için tasarlanmıştır Aşılar, profilaktik ve terapötik kanser aşıları olarak iki geniş kategori altında sınıflandırılmaktadır. Profilaktik tedavide kullanılan aşılar, kanser gelişim sürecinde oluşabilecek muhtemel enfeksiyonları yok etmeyi amaçlar. Rahim ağzı kanseri ile ilişkili olan İnsan Papilloma virüsünü (HPV) hedef alan Cervarix ve Gardasil aşıları US FDA tarafından onaylanmıştır. Terapötik kanser aşıları ise vücutta mevcut olan kanser hücrelerini hedef alır ve kanserin nüksetmesini önleyebilir. Terapötik kanser aşıları otolog ya da allojenik hücrelerin kullanımıyla tümöre özgü peptit veya antijenleri hedefleyerek antikor oluşumunu sağlamaktadır. Kanser aşıları içerik olarak peptit bazlı, dendritik hücre bazlı ve tümör hücre bazlı olabilir [49].

b) Onkolotik virüsler: Onkolitik virüs tedavisi, genetik olarak modifiye edilmiş ya da doğal yollarla hücrelere hedef gösterilen virüslerin replikasyonu temeline dayanarak tümör hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Melanom hastalığında onkolotik virüs tedavisi için FDA tarafından onaylanmış ilk virüs 2015 yılında talimogene laherparepvec (T-VEC) olmuştur. Ayrıca, virüsler çeşitli kanser türleri için kemoterapötik ajanlar ve bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ile kombine olarak klinik çalışmalarda ele alınmaktadır [50].

c) İmmün kontrol noktası inhibitörleri: Kanserli hücrelerin immün sistemden kaçışı bilinen en belirgin özelliklerindendir. Bu durumda, bağışıklık sistemi aktivasyonu hem tümör kontrolünü sağlamakta hem de otoimmünitenin düzenlenmesinden sorumlu olmaktadır [51]. Fakat T hücrelerinin kontrolsüz aktivasyonuna bağlı olarak bağışıklık kontrol noktaları otoimmünitenin baskılanmasına sebep olabilir. Bağışıklığın kritik iki noktası, programlanmış hücre ölümü protein 1 reseptörü (PD-1) ve sitotoksik T lenfositle ilişkili molekül-4 (CTLA-4) olarak bilinmektedir. 2018 yılı Nobel Tıp Ödülü "bağışıklığın negatif düzenlemesinin baskılanmasıyla kanser tedavisi konusundaki keşifleri" adına James P. Allison **ve** Tasuku Honjo arasında paylaşılmıştır**.** James P. Allison 1990'lı yıllarda CTLA-4 molekülünün T hücrelerinde bir fren görevi gördüğünü tespit etmiş ve bu

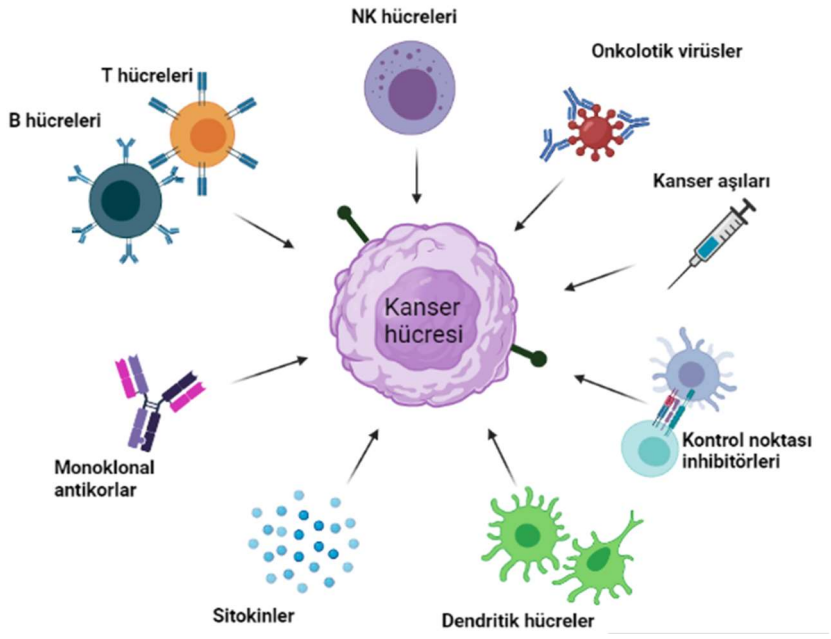
freni inaktif edecek bir başka molekül (antikor) tasarlamıştır. Keşfedilen CTLA-4 etki mekanizması ile inaktif T hücrelerinin aktivasyon etkinliği artmıştır. Ardından, Tasuku Honjo 1992 yılında PD-1 reseptörüne bağlanarak immün sistemin aktive olmasını sağlayan programlanmış hücre ölümü ligandları (PDL-1/PDL-2) ile arasındaki mekanizmayı bulmuştur. PD-1'in de tıpkı CTLA-4 gibi bir fren işlevi gördüğünü fakat farklı mekanizmalarla çalıştığını göstermiştir. Çünkü, PD-1 reseptörünün ekspresyonu CTLA-4 mekanizmasının aksine tümör hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır [48], [52]. İmmün kontrol noktası bazlı olan immünoterapötik ilaçlar günümüz itibari ile klinik çalışmalarda oldukça popüler durumdadır [53].

d) Sitokinler: Hücrelerin büyümesi, farklılaşması özellikle immün sistemin düzenlenmesinde ve inflamasyonunda rol oynayan küçük protein gruplarıdır. Bu protein ya da peptit molekülleri immün ve enfeksiyon gibi ortaya çıkan hastalıklarda çeşitli görevleri yerine getirmek üzere bağışıklık sistemine ait farklı hücre tipleri tarafından doğal olarak salgılanır ve immün hücrelerini doğrudan uyarırlar. İnterferonlar (IFN), interlökinler (IL), kemokinler, monokinler ve büyüme faktörleri sitokinlere örnek olarak verilebilir. Sitokinlerin sayıca çok fazla olması ile farklı fonksiyonlara sahip olmaları doğru orantılıdır. Bazı sitokinler, kanser hücreleriyle savaşmak adına T hücre yanıtını aktif kılarak artırabilir ya da baskılayabilir. Literatürde, kanser tedavisi için kullanılmış olan interlökinlerin ve interferonların kanser immünoterapisi üzerindeki etkileri araştırılmaya devam etmektedir. IFN-α, IFN-β, IFNA-∑, IFN-κ ve IFN-ω interferon ailesinin üyeleridir. İnterferonların dendritik hücre aktivasyonuna ve olgunlaşmasına yardımcı olmak, bağışıklık hücrelerine antijen sunarak anti-tümör yanıtın oluşmasını sağlamak ve NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini arttırarak immün yanıt oluşumunu güçlendirmek adına kanser immünoterapisinde çeşitli mekanizmaları mevcuttur. Özellikle IFN-α rekombinant teknolojisi ile ilk olarak üretilen ve kanser immünoterapisinde en yaygın kullanılan sitokin olma özelliğindedir. CD8+ sitotoksik T hücreleri ve CD4+ yardımcı T hücreleri tarafından salgılanan IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 gibi bazı interlökinler de kanser immünoterapi alanında görev alan önemli ajanlardır. İnterlökinlere ait çeşitli mekanizmalar; antikor salınımı, hücre proliferasyonu, T hücre yanıtının gelişimi ve farklılaşması gibi işlevler olarak sayılabilmektedir.

- **IL-6 sitokini:**

- IL-6, bağışıklık ve enflamatuvar olaylarını düzenleyen, enfeksiyonlara ve doku hasarına cevaben üretilen küçük protein yapılı pleotropik bir sitokindir.
- Fibroblastlar, mast hücreleri, dendritik hücreler ve T ve B hücreleri olmak üzere geniş bir hücre yelpazesi tarafından oluşan medyatörlerdir.
- B lenfosit çoğalması ve Ig yapımında görev alırlar.
- Anjiyogenezi ve kanserli hücrelerin büyümesini direkt olarak inhibe ederek tümörde regresyonun sağlanması gibi etkilerinin olduğu gösterilmiştir.
- Hücre farklılaşması, bağışıklık ve apoptoz gibi birçok önemli görevleri bulunmaktadır.
- Bir çok hücresel olayda önemli role sahip olan IL-6 sitokin seviyesinin arttırılarak apoptotik yolak üzerinde etkili olduğu birçok çalışmayla birlikte görülmüştür. [54], [55], [56].

Sonuç olarak sitokinlerin kanser immünoterapisinde kullanılması; tümör boyutlarında küçülme, metastaz oluşumunun önüne geçilmesi, immünolojik hafızanın gelişimini ve hastalığın tekrar ortaya çıkma olasılığının azaldığı görülmüştür. FDA tarafından lösemi tedavisinde kullanılmak üzere 1986 yılında ilk olarak onay alan sitokin IFN-α olmuştur. 1992 ve 1998 yıllarında ise IL-2 sitokini FDA tarafından onay alan ikinci sitokin olmuştur [57], [58].



Şekil 2. 4 İmmünoterapide kullanılan çeşitli tedavi yaklaşımları

Pasif immünoterapi

Pasif immünoterapi, patojenlere karşı vücudun doğal bağışıklık sistemini kullanma temeline dayanmaktadır. Vücut tarafından doğal olarak üretilen terapötikler ile kanser hücrelerine karşı direkt olarak savunma geliştirilmiş olmaktadır. Pasif immünoterapide sıkça kullanılmakta olan hedefe yönelik tedavi şekli monoklonal antikorlar ve adoptif hücre terapisi ile mümkün olmaktadır [59].

a) Monoklonal antikorlar: Terapötik antikorlar olarak da bilinen monoklonal antikorlar (mAb) günümüzde klinikte en yaygın kullanılan ve US FDA tarafından onaylanan hedefe yönelik kanser immünoterapisidir. mAb'ler kanser hücrelerinin antijenlerine spesifik olarak bağlanarak bağışıklık sisteminin aktive edilmesinde ve kanser hücrelerini apoptoza sürükleyen çeşitli toksik maddeler ile konjuge edilerek tümörün öldürülmesinde önemli rol oynamaktadır [47]. Monoklonal antikorların sınıflandırılması, etki mekanizmalarına göre değişiklik göstermektedir. Antijene bağlanarak hedefi lizize etmek için kullanılacak olan antikorların etki mekanizmaları; antikora bağlı hücresel sitotoksisite (ADCC), antikora bağımlı hücre fagositozu (ADCP) ve komplemente bağlı sitotoksisite (CDC) bulunur. Literatürde, monoklonal antikorlar bir dizi tümör tipinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, meme kanseri tedavisi için trastuzumab (anti-Her-2), lenfoma tedavisi için rituximab (anti-CD20) mAb ilaçlarıdır [50]. Rituximab (Rituxan, Genentech) ayrıca 1997 yılında FDA tarafından onay alan ilk mAb ilacı olma özelliği taşımaktadır [60].

b) Adoptif hücre terapisi: Yönlendirilmiş hücre transferi ile hedefe yönelik spesifik bir yaklaşım sağlayan hücre bazlı immünoterapi tedavi şeklidir. T hücrelerinin *ex vivo* koşullarda doğal ya da genetik olarak modifiye edilmesiyle hastalara yeniden transfer edilmesini içeren T hücre terapisidir. T hücre etkinliğini arttırmak için sitokinler gibi immün sistem modülatörleri kullanılarak kombinasyon halinde hastaya transferi sağlanabilmektedir. Ayrıca adoptif hücre tedavisinde çeşitli T hücreleri kaynakları ve türleri kullanılır. Kanser hücrelerini öldürmek amacıyla T hücrelerinden elde edilen tümör spesifik hücrelerinin (TIL) izolasyonu ile hücre transferi gerçekleşebilir. Tümör antijenlerini tanıyan genetik olarak tasarlanmış T hücrelerinden kimerik antijen reseptörü (CAR) ve T hücresi reseptörü (TCR) elde

edilebilir. CAR ile tasarlanmış T hücre (CAR-T) tedavisi günümüzde ve dünya çapında en umut verici tedavi şekillerinden biri olmuştur [61].

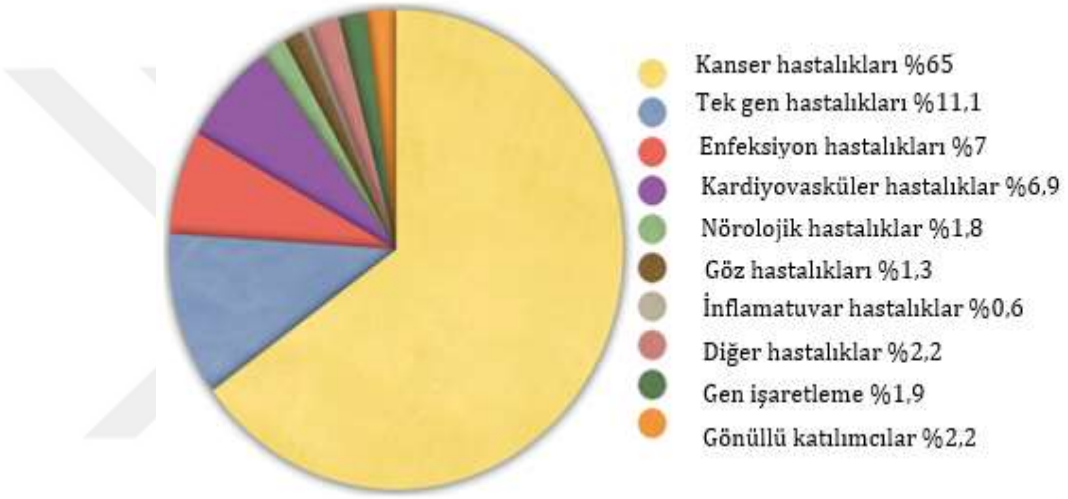
2.3 Gen Terapi

Moleküler biyolojideki son araştırmalar, özellikle rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle birlikte genetik kaynaklı ve kazanılmış hastalıkların tedavisine çare olunabileceğini göstermektedir. Gen terapi olarak adlandırılan bu yöntem, hastalığın temelinde yatan işlevsel olarak hatalı ya da eksik gen bölgelerinin düzeltilerek hedef hücrelere transfekte edilmesine denir [62], [63]. Böylelikle mutant olan gen tarafından üretilen protein ifadesi, ilgili genin düzenlenmesiyle hedef hücrelerde normal gen ekspresyonun sağlanmasını ve hücresel fonksiyonları yenileyerek doğru yanıtların oluşmasını amaçlamaktadır [64]. FDA (Food and Drug Administration) bu amaç doğrultusunda gen terapisinin üç önemli yolla düzenlenebileceğinin altını çizmiştir. Bunlar;

i) mutasyona uğramış olan gen yerine terapötik genin ekspresyonunu sağlamak,
ii) mutant ya da aşırı ekspresyon ile uygunsuz işlevi olan hedef genin inhibe edilmesini sağlamak,
iii) hedef gene terapötik genleri ekleyerek modifiye etmek. Uygunsuz işlevi olan genlerin nakavt ya da inhibe edilmesi, antisens ve siRNA teknikleri kullanılarak özellikle tedavi edilemez hastalıklar için umut kaynağı olmuştur.

Virüsler üzerinde çalışmasıyla ilk gen tedavisinin keşfi 1970 yılında Martine Cline tarafından ortaya atılmıştır. Bu çalışmasıyla genetik materyalin taşınmasında aracı olarak retrovirüslerin hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda genlerin transfeksiyonunu sağlayabildiğini göstermiştir [62]. 1990 yılında Martine Cline fare kemik iliğine yabancı geni entegre etmeyi başarmıştır. 1990 yılında önemli diğer bir gelişme Micheal Blaese ve William French tarafından Adenozin deaminaz (ADA-SCID) geni eksikliğinden dolayı immün yetmezlik görülen iki çocuğun retrovirüs vektörü aracılığıyla tedavi edilmesi olmuştur [65], [66]. FDA tarafından insanlarda gen terapisi denemelerinin onaylanması ilk kez 14 Eylül 1990 yılında klinik çalışmalarla olmuştur [65]. Gen terapisinde klinik olarak kullanılmakta olan ilaçların resmi olarak onaylanması ile şimdiye kadar farklı ülkeler tarafından iki düzineden fazla gen terapi çalışması başarıyla sonuçlanmıştır. Geleneksel

tedavilerle başarı elde edilemeyen bazı hastalıkların tedavisi bu ilaçlarla mümkün kılınmaktadır. Örneğin, Spinal Musküler Atrofi (SMA) adı verilen hastalığın tedavisi Zolgensma gen terapisiyle ve hemofili hastalığının tedavisi ise Luxturna gen terapisi ile yapılmaktadır [67]. Bilim insanları bu zamana kadar gen terapisi ile sadece doğuştan gelen hastalıkları değil, aynı zamanda kanser, diyabet, monogenik ve kardiyovasküler gibi çeşitli hastalıkların da tedavisi için çalışmalarını sürdürmektedirler. Gen terapisinde kullanılan hastalıkların yüzdesi 2017 verilerine göre Şekil 2.5'te gösterildiği gibidir.



Şekil 2. 5 2017 verilerine göre gen terapisi ile klinik uygulamalar [68]

Gen terapisinde uygulanan çalışmaların başarılı ve etkili sonuçlar vermesi, terapötik genin hedef hücreye transferini sağlayan "vektör" olarak adlandırdığımız taşıyıcı sistemlerin uygun bir biçimde elde edilmesine bağlıdır. Çıplak DNA tek başına hücreye giremez ve uzun süre aktivasyonunu koruyabilmesi mümkün değildir. Mikroenjeksiyon yöntemi ile DNA'nın hücreye entegre olması oldukça basit bir yöntem olmasına rağmen gen ekspresyonu oldukça düşüktür. Ayrıca çıplak DNA'nın hücreye tek başına girişi çeşitli nükleazlar tarafından parçalanmasıyla sonuçlanır. Bu yüzden moleküler taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır [7], [69]. İdeal bir vektörün özellikleri şunlardır;

- Konakçı hücreye kolayca entegre olabilmeli,
- Hedef dokuya özgü olarak çoğaltılmalı ve saklama koşullarında stabil kalabilmeli,
- İzolasyonu ve saflaştırılması kolay ve tekrarlanabilir olmalı,

- Uygun işaretleyici (marker) genleri bulundurmalı,
- Gen ifadesi uzun olmalı ve hedef hücreye belirlenen düzeyde gen anlatımını sağlayabilmeli,
- Toksik özellik göstermemeli [70].

Gen terapisinin sınıflandırılması hedef hücreye göre farklılık göstermektedir. Bunlar temel olarak somatik hücre terapisi ve eşey hücre terapisi olarak iki gruba ayrılır.

- **Somatik Hücre Terapisi**

Terapötik genin, hastanın somatik (diploid) hücrelerine aktarılmasına somatik hücre terapisi denmektedir. Bu yöntemde hastanın somatik hücrelerinde genetik modifikasyonlar meydana getirilerek hastalığı tedavi etme amaçlanmaktadır. Somatik hücre terapisi, kalıtsal değildir ve gendeki değişiklikler sadece somatik hücre üzerinde olduğundan dolayı ebeveynlerden çocuklarına genetik geçiş engellenir. Böylelikle mutant olan gen ve modifikasyonlar hastayla sınırlı kalır ve gelecek nesillere aktarılmamış olur. Somatik hücre gen terapisi kısa süreli bir hücre tedavisi olmasına rağmen pek çok hastalığın tedavisinde kullanılması uygun ve kabul görülmektedir [71].

- **Eşey Hücre Terapisi**

Yumurta ve sperm ile birlikte gametlere veya preimplantasyon embriyolarına yapılan değişiklikleri kapsar. Bu yöntemde genetik modifikasyonlar gelecek nesillere aktarılır ve soylar boyu kalıcı etki görülür. Genetik ve kalıtımsal hastalıklarda oldukça etkili olan bir yöntem olmasına rağmen etik açıdan 30'dan fazla ülkede yasaklanmıştır [67]. Ancak 2015 yılında Çinli bilim insanları CRISPR-Cas9 tekniğini kullanarak embriyonik kök hücreler üzerinde genetik modifikasyonu gerçekleştirdiler. Genetik analiz sonucunda 26 embriyonun sadece 4'ünün gen ifadesinin başarıyla değişmesi bu tekniğin daha fazla geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır [72]. Şu anda klinik olarak kullanılması onaylanan mevcut bir germ hücre terapisi yoktur.

Hedef genlerin alıcı hücrelere entegre edilmesi işlemi, ortamına göre *ex vivo* ve *in vitro* olarak isimlendirilir. *Ex vivo* gen iletimi laboratuvar ortamında gerçekleşirken, *in vivo* ortamda ise gen iletimi hastaya direkt olarak nakledilir. *Ex vivo* gen

aktarımında, hastanın hücreleri toplanır, laboratuvar ortamında kültüre edilir ve modifiye edilerek değiştirilir. Daha sonra nakil yapılacak olan hedef hücreler seçilerek gen aktarımı hücre kültürü ortamında *in vitro* olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemde hastanın otolog hücrelerinin kullanılma sebebi bağışıklık sistemi tarafından kolayca reddedilememesi olmasıdır. *In vivo* gen aktarımında ise, anormal işleyişi olan genin normal kopyası spesifik hücrelerin doğrudan hedeflenerek hastaya iletilmesi ile sağlanır. Sonuç olarak sağlıklı genin aşırı ekspresyonu ile terapötik olarak fayda sağlanması beklenilir [67], [73].

2.3.1 Gen Aktarımında Taşıyıcı Sistemler

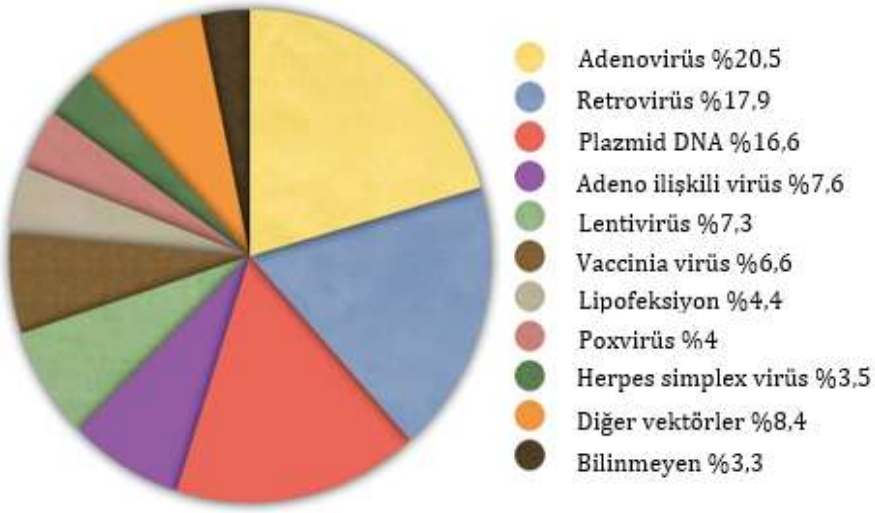
Gen terapisinde dikkat edilmesi gereken pek çok nokta vardır. Alıcı hücrenin spesifik olarak doğru hedeflenebilmesi, DNA ya da RNA nükleik asitlerinin aktarımında kullanılacak olan vektörün doğru seçimi oldukça önem arz eder. Taşıyıcı vektörler genetik materyali hücrelere, dokulara ve tüm organlara taşır [74]. Taşıyıcı sistemler, genetik materyalini iyi koruyabilmeli ve paketleyebilmelidir. Ayrıca boyutu, hedef dokuya olan toksik etkisi, biyouyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve dolaşım sürecinde kalabilme süresi gibi pek çok özellik yönünden incelenmektedir [69]. Halen yapılan gen terapisi çalışmalarında pek çok aksaklık ve eksiklik mevcuttur. Bu da gen aktarım sistemlerini sınırlı kılmaktadır. Gen aktarım sistemleri viral vektörler ve non-viral vektörler olarak 2 ana başlık altında sınıflandırılır. Viral vektörler biyolojik yöntemler, non-viral vektörler ise fizikokimyasal yöntemler olarak da bilinir. Her stratejinin kendine özgü avantajları ve dezavantajları mevcuttur (Tablo 2.3) [6], [75].

Tablo 2. 3 Gen aktarımında viral ve non-viral vektörlerin özellikleri [6]

Vektör	Avantaj	Dezavantaj
Viral	• Yüksek transfeksiyon etkinliği gösterir • Gen aktarımda virüslerin doğal mekanizmasından faydalanılır • Endozomal kaçış için doğal mekanizmaları bulunur	• Gen taşıma kapasitesi oldukça sınırlıdır • Üretim aşaması zordur • Toksisiteye neden olabilir • İmmün yanıt oluşturabilir
Non-viral	• İmmünojenite olma ihtimali düşüktür • Gen taşıma kapasitesi yüksektir • Sentez aşaması kolay ve tekrarlanabilir • Endozomal kaçış için aktifleştirilebilir	• Transfeksiyon etkinliği düşüktür • Yüksek doz kullanımı toksik etki oluşturabilir • İçsel tropizm eksikliği • Endozamal kaçış için başarısız olma ihtimali

2.3.1.1 Viral Vektörler

Sahip olduğu nükleik asite göre DNA ve RNA virüsleri mevcuttur. Virüsler kendi genetik materyalini çoğaltma yeteneğine sahiptirler. Bu özelliğe dayanarak virüsün genetik materyali gen tedavisi amacıyla modifiye edilerek konakçı hücre içerisinde çoğaltılması sağlanır [76]. Viral vektörler, 2017 verilerine göre gen terapide kullanılan taşıyıcı sistemlerin %67'sini oluşturmaktadır [68]. Buraya kadar bahsedilmiş olan pek çok hastalığın tedavisine umut olabilmek için uzun yıllardır kullanılmakta olup, çalışmaların başarıyla sonuçlandığı görülmüştür. Fakat virüslerin elde edilme süreci, üretimi oldukça maliyetli kılar ve aynı zamanda gen aktarımında sınırlı kapasiteye sahip olmaları da kullanım alanlarını sınırlar [69]. Gen aktarımında en çok kullanılan viral vektörler Şekil 2.6'da gösterildiği gibi retroviral vektörler, adenoviral vektörler, adeno ilişkili viral vektörler, herpes simpleks vektörleri olmuştur [68].



Şekil 2. 6 2017 verilerine göre gen tedavisinde kullanılan vektörler [68]

a) Retroviral vektörler

Küçük RNA virüsü olarak bilinirler. Moloney murin lösemi oncoretrovirüs (MMLV) kaynaklı virüsler olup, klinik deneylerde çalışılmaktadır. Viral genomdan cDNA sentezleyerek konakçı genomuna nasıl entegre olduğu Howard Temin ve David Baltimore tarafından virüsün yapısında bulunan ters transkriptazın keşfi ile çözüme kavuşmuştur [77]. Böylelikle kromozomal entegrasyonu sağlayabilmesi için konak hücrenin mitoz bölünme evresinde olması ve çekirdek zarının ortadan kaybolması gerekmektedir [78]. Ancak hücre bölünmesi bazı hücre tiplerinde virüse karşı direnç kazandırabilir [79]. Ayrıca Sadece bölünen hücreleri enfekte etmesi çalışmaların *ex vivo* düzeyde olmasıyla da kısıtlı kalmıştır. Yapısında bulunan *gag, pol* ve *env* genlerine sahip üç transkripsiyon bölgesi sayesinde replikasyonu gerçekleştirir. Mevcut genlerin çıkarılarak yerine terapötik genlerin eklenmesiyle gen terapisi için değişikliğe uğratılırlar [80]. Gen terapisi için retrovirüslerin kullanılmasına dair ilk çalışmalar 1980'lerde başlamıştır. Klonlama kapasitesi 8 kb olan bu virüsler kanser, beyin tümörü gibi çalışmalarda da kullanılmaktadır. Fakat mutasyon oluşturması çalışma faaliyetlerini sınırlı kılan diğer bir neden olmuştur [81].

b) Adenoviral vektörler

Zarfsız ve yaklaşık 30-40 kb genoma sahip çift iplikli DNA virüsleridir. Yaklaşık 25 yıl önce tedavilerde kullanılmaları tavsiye edilmiştir. Ad2 ve Ad5 serotipleri gen tedavisi için kullanılan vektör tipleridir. 100'den fazla üyesi bulunan adenoviral

vektör bulunmaktadır. *Birinci kuşak* adenoviral vektörlerde geç viral ekspresyonunu kodlayan E1 ya da E1 ve E3 bölgeleri çıkarılır. E2 ve E4 bölgelerinin de çıkarılmasıyla *ikinci kuşak* vektörler elde edilir. Son olarak *üçüncü kuşak* vektörleri de tüm viral genomun silinmesiyle karakterize edilir. Üçüncü kuşakta sadece ITR ('ters dönmüş uç tekrarlar-inverted repeats') ve paketleme sinyali (Ψ) silinmez. Bu vektör türleri *gutles* ya da *gutted* olarak adlandırılır [82]. Adenoviral vektörler hem çoğalan hem de çoğalmayan hücrelerde gen ekspresyonunu etkin bir şekilde yapabilmektedirler. Transfeksiyon verimi yüksek olan taşıyıcı vektörler olmasına rağmen immünojenitesi kısa süreli ekspresyon sağlar. Bu yüzden uzun süreli tedavileri gerektiren hastalıklar için kullanımları kısıtlı olmaktadır. Aynı zamanda kısmen toksisiteye sebep olmaları bakımından çalışma alanları pek çok tedavi için sınırlıdır [83]. Pek çok hücresel düzeyde gen ekspresyonunu başarılı olarak gerçekleştirebilmiş olsalar da akut solunum yolu enfeksiyonlarının %5-10' una da sebep olurlar [82].

c) Adeno-ilişkili viral vektörler

Zarfı bulunmayan tek sarmallı DNA virüsüdür. Parvovirüs ailesinin üyesi olan Adeno ilişkili virüslerin (AAV) replike olabilmeleri için herpes simpleks virüsü ya da adenovirüs gibi diğer virüslere ihtiyaçları vardır [84]. Tek sarmallı genomu *Rep* (replikasyon), *Cap* (kapsid) ve *aap* (düzenleme) olmak üzere 3 gen içerir. 4,8 kilobazlık (kb) genoma sahiptir [85]. Bu da kısa dizili DNA taşıyabilme kapasitesine sahip olması sebebiyle vektörün kullanımını kısıtlar. Hemen hemen her adeno ilişkili virüs, serotip 2 kaynaklı olarak meydana gelmiştir. AAV5, AAV6 ve AA8 serotipleri sırasıyla kistik fibroz, kas distrofisi ve hemofili gen tedavilerinde kullanılmak için geliştirilmiştir [86]. Klinik aşamaları çeşitli deneysel terapötik uygulamalarda umut ışığı olmuştur fakat çoğu kişide nötralizan antikor bulunması bu vektörler için sorun teşkil etmektedir [86].

d) Herpes Simpleks vektörleri

152 kb'lık genoma sahip, çift sarmallı DNA virüsüdür. Viral ve hücresel proteinlerden oluşan amorf bir tegument tabakasına ve 12 viral glikoproteini içeren konakçı hücreden elde edilen lipit bir zarf yapısına sahiptir [87]. Herpes simpleks virüsleri genoma entegre olmaz fakat latent kalma mekanizması ile uzun süreli ekspresyon sağlarlar. Herpes simpleks virüsleri diğer virüslere oranla daha büyük

genom kapasitesine sahiptir. Gen aktarımı için tedavi edilecek hastalığa dair birden fazla gen bulunmaktadır. Bu da daha büyük DNA taşıma kapasitesi anlamına gelir. Bu özelliği böylece herpes simpleks virüslerine avantaj sağlamaktadır [88]. Herpes simpleks virüsü serotipleri olan HSV1 VE HSV2 çoğunlukla enfeksiyonlara neden olurlar. HSV1 genelde korneayı etkileyerek körlüğe hatta ciddi boyutları ölüme bile neden olabilirken, HSV2 ise genital enfeksiyonlara ve uçuk oluşumuna sebebiyet verir [89].

2.3.1.2 Non Viral Vektörler

Viral vektör sistemlerinin immünolojik ve sitotoksik etkileri, taşıma kapasitesinin düşük olması, üretiminin maliyetli olması, kalite kontrolünün ve tekrarlanabilirliğinin zor olması gibi dezavantajları sebebiyle biyolojik yöntemlere alternatif olarak non-viral vektörler olan fiziksel ve kimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

- **Fiziksel Yöntemler**

Fiziksel vektörler, ekzojenik nükleik asitler ve hatta proteinler dahil çeşitli kargoları hücrelere aktarmak için fiziksel kuvvet uygulanması temeline dayanmaktadır. Aşağıda belirtilmiş olan fiziksel metotlar da manyetik, ultrasonik, basınç ve lazer gibi çeşitli teknikleri ihtiva etmektedir.

En basit ve en kolay teknik olan ilk fiziksel yöntem çıplak DNA' nın hücreye aktarılmasıdır. Fakat çıplak DNA'nın mikroenjeksiyonu düşük transfeksiyon etkinliği ile sonuçlanmaktadır. DNA molekülünün fosfat gruplarına sahip olmasından dolayı hidrofilik yapısı, boyutunun büyüklüğü, negatif yüklü olması ve en önemlisi hücreye geçişte çeşitli enzimatik parçalanmalara maruz kalarak kendini koruyamaması olarak sayılmaktadır. Bu nedenle gen terapisinin etkinliğini arttırmak için birden çok yöntem geliştirilmiştir [90].

a) Elektroporasyon

Elektrik akımının kullanılmasıyla hücreler üzerinde geçici porlar oluşturarak DNA'yı hücre zarından geçirmeyi amaçlayan bir tekniktir. Elektroporasyonda hücrenin çift tabakalı lipid zarı bozulur. Yüksek transmembran potansiyeli oluştuktan sonra kargo, endositoz yolu ile hücreye girer [91]. Teknik, ilk kez 1982' de Neumann tarafından fare liyoma hücrelerini transfekte etmek için kullanılmıştır.

1991’ den beri ise *in vivo* gen transferinde kullanılmaya devam etmektedir [92]. Elektroposyon ile transfeksiyon verimi çıplak DNA’nın transfeksiyonuna kıyasla 1000 kat daha başarılı olmuştur [93]. 2020 yılında Harris ve Elmer T hücrelerinin transfeksiyonu için elektroporasyonun başarılı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir [91]. Elektroporasyonun araştırılma ve uygulama alanları geniş bir yelpazeye sahip olsa da transfeksiyon etkinliği ve hücre canlılığının düşük olması en büyük dezavantajıdır.

b) Gen Tabancası

Diğer adı biyolistik gen transferi olarak da bilinen gen tabancası gen iletimi için eskilerden beri kullanılan fiziksel metottur. Bu yöntem gen aktarımı için ilk olarak 1987 yılında bitkiler üzerinde kullanılmıştır. Daha sonra hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak hayvan hücreleri üzerinde de kullanılmaya devam etmiştir. Yöntem, DNA kaplı altın parçacıklarının hızlanması için basınçlı inert gazının kullanımına dayanmaktadır [94]. Böylece DNA kaplı partiküllerle bir bombardıman elde edilmiş olur. Gen transferinin verimliliği mikromoleküllerin yoğunluğuna, boyutuna ve bombardımanın gücüne bağlıdır. Gen tabancası şimdiye kadar çeşitli gen terapi ve klinik deneylerde yer almıştır. Basit ve hızlı olması yönünden avantajlıdır. Fakat hücre derinliğine transfekte olamayan nükleik asitin penetrasyonu hücre yüzeyinin transfeksiyonuyla sınırlı kalır [94]. Öte yandan gen aktarım etkinliğinin yüksek olması için saf altın parçalarının kullanılmak zorunda olması maliyet açısından diğer bir dezavantaj teşkil etmektedir [95].

c) Sonoporasyon

Sonoporayon ultrason dalgalarının kullanılarak hücre zarında porlar açılmasını sağlayan bir yöntemdir. Geçici olarak oluşan bu porlar makromoleküllerin geçişine izin verir. Bu yönüyle elektroporasyon tekniğiyle benzerlik göstermekte fakat onun kadar etkili gen iletimi sağlayamamaktadır. Yöntem ultrasonik dalgalarının hücreler üzerine teması ile ortaya çıkan enerji sonucunda, oluşan mikro kabarcıkların genişlemesiyle kavitasyon oluşumuna ve bunu takiben mikrokabarıkların çökmesine dayanır [96]. Bu kabarcıklar sayesinde hücre zarında gözenekler oluşmaktadır. Basit ve güvenilir bir yöntem olması 2000’lerden beri gen tedavisinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanmasını sağlamıştır. Son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaya devam ettiği de görülmektedir [97], [98].

d) Manyetofeksiyon

Manyetik kuvvetler oluşturarak gen transferinin sağlandığı yöntemdir. Manyetik parçacıklar ya da nanopartiküller DNA ile birleştirilerek kompleks bir yapı oluşturulur. Daha sonra bu manyetik parçacıklar hedef hücreye ilgili terapötik geni iletmek için manyetik alan ile yönlendirilir. Manyetofeksiyon yönteminin *in vitro* olarak etkili bir transfeksiyonu için üç önemli adım vardır;

a) düşük miktarda vektör dozu,

b) yüksek manyetofeksiyon/transdüksiyon verimliliği elde etmek için azaltılmış inkübasyon süresi,

c) kolaylıkla DNA materyalini içerisine alamayan hücreler için gen aktarımının mümkün hale getirilmesi [99].

Yöntemin transfeksiyon verimi hızlı ve etkili olmasına rağmen manyetik alan, kaynağından uzaklaştıkça parçacıkların hücreye penetrasyon derinliğini sınırlamaktadır [74], [92]

e) Optoporasyon ya da Fotoporasyon

Lazer temelli olarak gen transferini kolaylaştırmak için hücre zarını daha geçirgen hale getiren ve por oluşumunu sağlayan diğer bir fiziksel tekniktir. Yöntem, 1980'lerde kullanılmaya başlamıştır. Yüksek düzeyde odaklanmış lazer ışını sayesinde kültür ortamındaki ekzojen nükleik asitlerin hücrelere girişini sağlar [100]. Genetik materyalin, sadece belli bir hücreyi hatta çekirdek ya da mitokondri gibi organelleri hedefleyebilmesi dalga boyları ve güç yoğunlukları ile mümkün olmaktadır [95]. Membran üzerinde oluşan gözenekler lazer kaynaklı stres dalgaları (LISW) sayesinde meydana gelir [94]. İlginçtir ki bu delikler hücrelerde ölümcül yaralanmalara sebep olmaz ve hücre kendini bir saniyeden daha kısa bir sürede onarabilir [101]. Yüksek yoğunluklu lazer, hücreyi hedeflediği zaman zar geçirgenliğini arttırmak için membran üzerinde plazma üretir. Dahası bu plazma por oluşumuna yardımcı ikinci şok dalgalarını üreten kabarcıklar oluşturabilmektedir [92]. Yöntemin non-invazif, güvenli ve yeniden oluşturulabilir olması avantajlı yönlerindendir. *In vitro* çalışmalarda başarılı uygulamaları olmuştur. Fakat daha derin dokulara penetrasyonu sınırlı kapasitedir. Bu nedenle *in vivo* çalışmalar deri ve kas gibi bölgelerle sınırlı kalmıştır [95]. Ayrıca optik lazerler

çok büyük ve maliyetlidirler. Daha da önemlisi lazer ışınlaması hücreleri tek tek hedeflemede oldukça etkili olmalarına rağmen geniş hücre popülasyonları için bu maalesef mümkün değildir [101].

- **Kimyasal Yöntemler**

Kimyasal metotlar, biyolojik ve fiziksel yöntemlere alternatif olarak yüksek verimli transfeksiyon ve uzun süreli gen ekspresyonu sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Amaçlarına göre birkaç gruba ayrılabilirler:

1. DNA'yı nükleazlardan ve kandaki diğer bileşenlerden korumak için DNA ile yoğunlaştırılmış kompleks oluşturanlar,

2. Belirli hücre tiplerine spesifik gen hedeflemesi için tasarlanmış olanlar,

3. DNA'nın sitozole ya da çekirdeğe taşınmasını kolaylaştırmak için tasarlanmış olanlar,

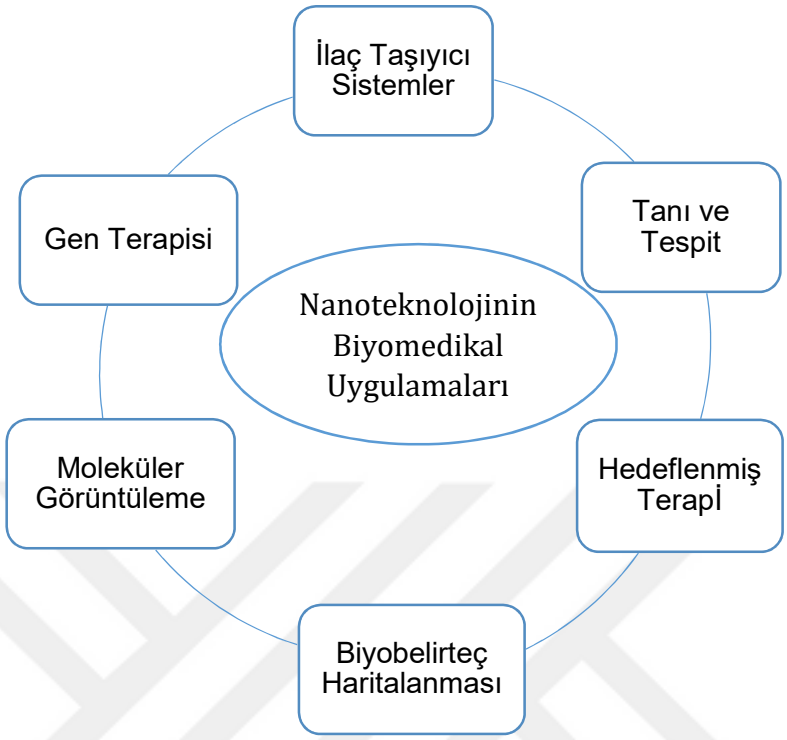
4. Sürekli ve kontrollü gen ekspresyonu sağlamak için tasarlananlar [102].

Viral olmayan kimyasal vektörler, endositoz yolunu kullanarak hücrelere giriş sağlayabilirler. Gen aktarımında en çok kullanılan kimyasal vektörler lipozom bazlı, polimerik bazlı, grafen bazlı ve diğer inorganik nanotaşıyıcılardır [103].

2.3.2 Nanopartiküler Sistemler

Nanoteknoloji kavramı ve nanoteknolojinin önemi ilk kez Nobel Fizik Ödülü sahibi olan Richard P. Feynman tarafından 1959 yılında keşfedilmiştir [104]. Nanoteknoloji, sağlık ve fen bilimlerinin ortak bir paydada buluştuğu, belirli bir amaca hizmet etme açısından nano boyutlu yeni ürünlerin geliştirildiği multidisipliner bir alandır. Nanoteknolojideki gelişmeler ile özellikle sağlık bilimlerindeki çalışma alanları Şekil 2.7'de gösterildiği gibi oldukça geniş bir yelpazeye ulaşmıştır [11]. Nanotıbbın bir alt bölümü olan nanoonkoloji, kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojiden faydalanır. Bu doğrultuda, nano ölçekli malzemeler kullanılarak kanserin tanı ve tedavisine farklı bir boyut kazandırılmıştır. Kuantum noktaları ve nanoshell gibi birçok nanotaşıyıcı bu amaçla geliştirilmiş ve aralarında en çok kullanılanları ise nanopartiküler sistemler olmuştur. Kanser immünoterapisi için umut verici bir fırsat niteliği taşıyan

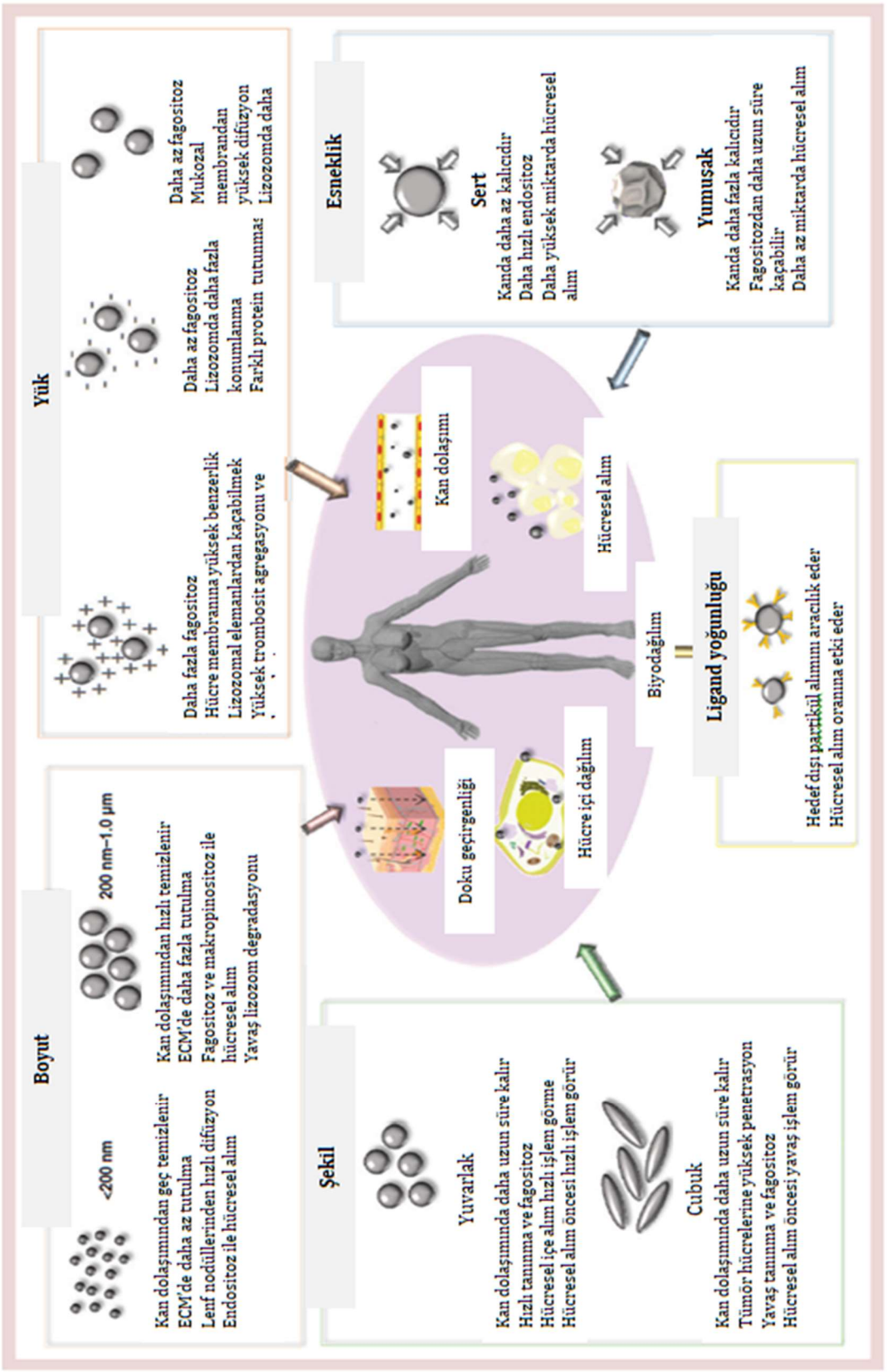
nanopartiküller (NP'ler) kanser hücrelerini tanımak ve tümörün ortadan kaldırılmasında rol oynamak gibi farklı boyutlarda bir platform sağlamaktadır.



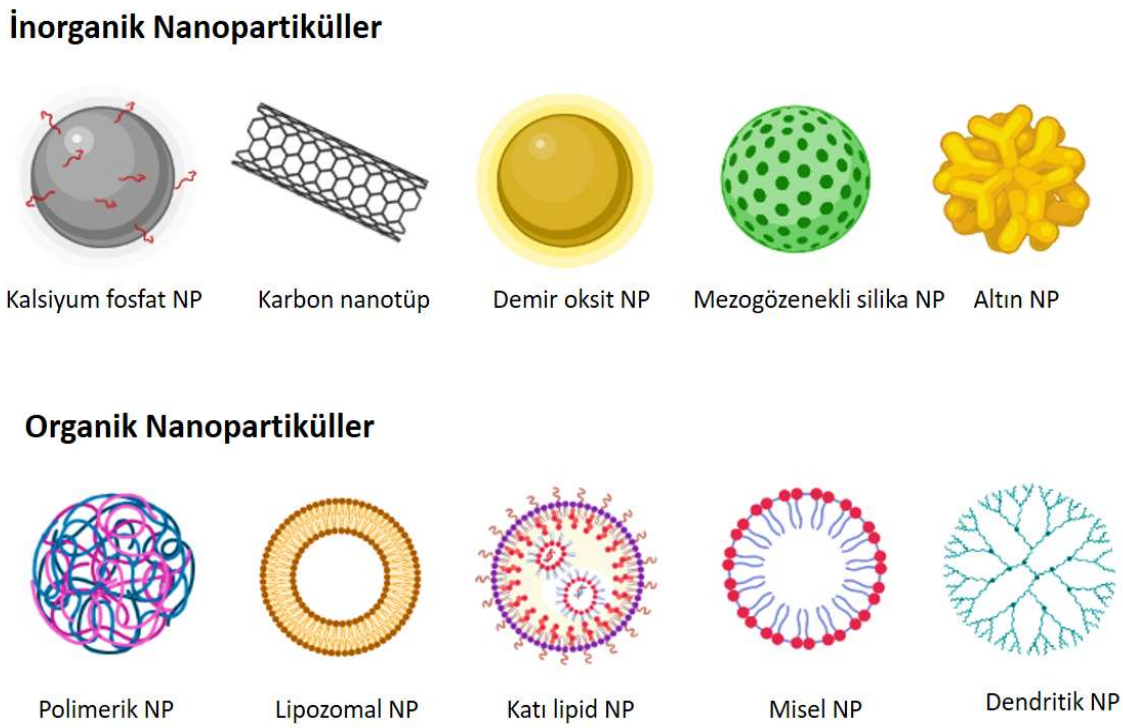
Şekil 2. 7 Nanoteknolojinin biyomedikal alanındaki uygulamaları [11]

NP'ler, boyutları 10-1000 nm arasında değişkenlik gösteren ve farklı şekillere sahip küçük parçacıklardan oluşan malzemeler sınıfıdır. NP'ler şekilleri bakımından 0D, 1D, 2D, 3D boyutlarına sahip olabilirler [105]. NP'ler sahip oldukları yük, şekil, yüzey alanları ve nano ölçekli boyutları ile eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir (Şekil 2.8) [104]. Nanopartikül tabanlı uygulama sistemleri, amaca ve hedefe yönelik olarak tasarlanabilir. Nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri; hüçre içi salınımı, bozunmadan kalabilmesi ve bağışıklık hücreleri ile başarılı bir şekilde etkileşebilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu sebeple, NP'lerin sahip olduğu çeşitli morfolojik ve fizikokimyasal özellikleri X ışını kırınımı (XRD), X ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), kızılötesi (IR), SEM (taramalı eleketron mikroskobu), AFM (atomik güç mikroskobu), TEM (transmisyon elektron mikroskobu), Brunauer–Emmett–Teller (BET) gibi karakterizasyon teknikleri kullanılarak tespit edilmelidir. Optimize edilmiş olan nanomalzemeler, makromoleküllere kıyasla endositoza daha kolay uğrayarak hücre içine alınır. NP'ler, terapötik molekülleri ve nükleik asitleri yükleme kapasiteleri, biyolojik

dağılımları ve biyouyumlulukları sayesinde son otuz yıldır çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde özellikle de gen aktarımında nanotaşıyıcılar olarak kullanılmaktadır. Nanopartiküller DNA, RNA ve ilaç gibi biyoaktif molekülleri hücre içindeki parçalanmalara karşı koruma özelliğine sahiptir. Böylece, nanopartiküller literatürde var olan gen aktarım çalışmalarında en çok tercih edilen vektörler olmuşlardır [106]. Literatürde yer alan çalışmalar doğrultusunda geliştirilmiş olan nano taşıyıcı sistemler; polimerik nanopartiküller, lipozomlar, dendrimerler, miseller, katı lipid nanopartiküller, inorganik nanopartiküller olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 2.9).



Şekil 2. 8 Nanopartiküllerin özellikleri [104]



Şekil 2. 9 Gen aktarımında en çok kullanılan nanopartiküler sistemler

2.3.2.1 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülleri

Gen terapisi başta olmak üzere çeşitli amaçlala hedef gen gruplarının ya da biyomoleküllerin, belirli hücre tiplerine aktarılması için son 30 yıldır sentetik vektörler arasında yer alan kalsiyum fosfat nanopartikülleri kullanılmaktadır. Gen terapisinde plazmid DNA olarak bilinen küçük boyutlu dairesel moleküllere yerleştirilen terapötik genlerin, hücre membranını aşması boyutları ve yükleri sebebiyle olduça zordur. Ayrıca, hedef nükleik asitlerin istenilen hücrelere aktarımında, hücre membranını geçtikten sonra çekirdeğe ulaşabilme yolunda çeşitli enzimatik faktörler tarafından bozulmaları söz konusu olabilmektedir. Hedef genlerin taşıyıcı vektörlere yüklenerek hücrelere transfeksiyonu hem yöntemin oldukça kolaylaştırılmasını hem de biyomolekülleri kendi içerisine dahil ederek bozulmadan aktarılmasını mümkün kılmıştır [107].

Kalsiyum fosfat nanopartikülleri ilk kez 1973 yılında Graham ve Van Der Eb tarafından gen aktarımında kullanılmıştır. Kalsiyum fosfat, kemik ve diş gibi memeli sert dokusunda bulunan inorganik biyomalzemelerdir. Ek olarak kalsiyum ve fosfat bileşenleri vücutta doğal olarak bulundukları için biyolojik olarak biyoparçalanabilir ve biyouyumlu özellik göstermektedir. Böylece kan dolaşımında

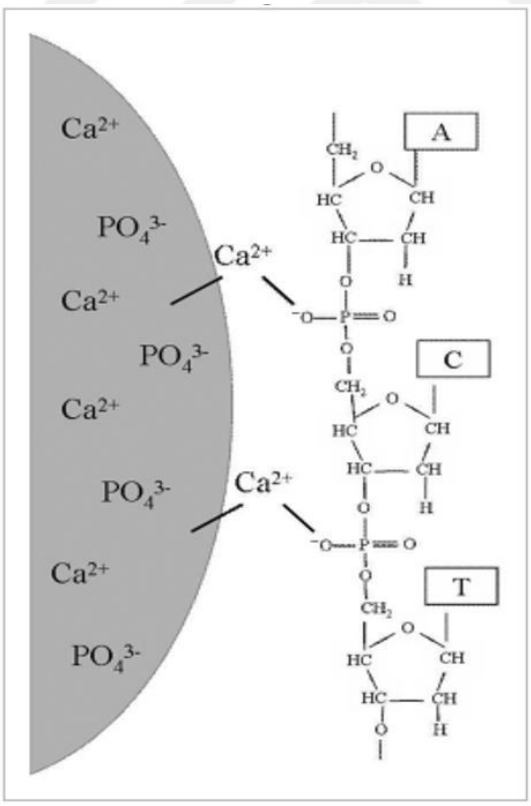
sorun teşkil etmeden aktif olarak bulunabilen, hedef genlerin bulunduğu moleküler kargo elemanlarını taşıyabilen ideal bir sistemdir [108]. Ayrıca, partiküllerin hücre içine alınımı diğer bir deyişle endositozu kolaylıkla olabilmektedir. Hücre içerisine alımdan sonra meydana gelecek olan paketlenerek uzaklaştırılma olaylarını kolaylıkla tolere edebilir ve doğal mekanizması sayesinde endozomal kaçışı sağlayabilir. Nanopartiküler sistemlerin büyük bir avantajı da tekrarlanabilir sentez sunması ve istenilen düzeyde fonksiyonelleştirme ve işlevselleştirilebilir olmasıdır. Kalsiyum fosfat nanopartikülleri diğer inorganik vektörlere kıyasla daha yüksek yükleme kapasitesine sahiptir. İçerisinde barındırdığı Ca^{+2} ve PO_4^{3-} molekülleri sayesinde yüzey alanları oldukça yoğun yük ile doludur. Bu sayede pek çok organik molekül ile bağlanabilme şansına sahiptirler [109]. Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin boyut, şekil, yük, yüzey alanı, yüzey kimyası, morfolojik ve kimsayal yapısı bakımından önemli parametreleri bulunmaktadır. Partiküle özgü avantaj ve dezavantajlar Tablo 2.4'te gösterildiği gibidir.

Tablo 2. 4 Kalsiyum fosfat nanopartikülünün avantaj ve dezavantajları [110]

Avantaj	Dezavantaj
• Yükleme kapasitesi yüksektir • Biyouyumlu ve biyoparçalanabilir • Sentezi basit, maliyeti düşüktür • Toksik etkisi düşüktür • Hücre membranına penetrasyonu güçlüdür	• Hızlı çökelti oluşturur • Partikül boyutları yüksek olabilir • Hücre içerisinde gerçekleşen erken bozunma sebebiyle transfeksiyon verimi düşük olabilir

Nükleik asitlerin, çeşitli ilaç sistemlerinin ve diğer moleküler bileşiklerin hücreye girişi, biyomalzemeler ve kargo elemanlarının sahip olduğu yükler ve aralarındaki elektrostatik çekimden kaynaklanmaktadır. DNA yapısında bulunan fosfat grubu nedeniyle negatif yüklüdür. Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin bileşimininde yer alan pozitif yüklü kalsiyum iyonları ile DNA omurgasında bulunan fosfat bileşikleri bağlanarak biyomoleküller arasında güçlü bir afinite oluşmasını sağlamaktadırlar (Şekil 2.10) [111]. Etkinliği arttırmak için kalsiyum fosfat nanopartikül yüzeyinin pozitif yük gruplarıyla kaplandığı literatürde yer alan bilgiler arasındadır.

Kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için *in vitro* ve *in vivo* ortamda nanopartiküler sistemlerden faydalanılmaktadır. Kalsiyum fosfat nanopartikülleri bu amaçla kullanılmakta olan güvenli ve en yaygın mineral sistemlerindendir. Kanser terapötikleri hidrofobik yapıda ve büyük boyutlu olduklarından dolayı hücre içerisine alınımı oldukça zordur. Nanoparçacıklar, bu maddelerin hücre zarından geçişini kolaylaştırmaktadır. Terapötik biyomoleküllerin transfeksiyonu, hastalığa sebep olan genin susturulması ve ilaç taşıma sistemleri gibi biyomedikal uygulamalar ve klinik araştırmalarda kalsiyum fosfat partikülleri oldukça önemli bir yere sahiptir [107]. Literatürde, kalsiyum fosfat nanopartiküllerin oldukça çeşitli metotlar ile sentezi mevcuttur. Bunlardan bazıları: çökeltme metotu, solvotermal yöntemi, hidrotermal reaksiyon, mikroemülsiyon ve elektrodepozisyondur [112]. Kalsiyum fosfat nanopartikülleri dahil olmak üzere nanoparçacıkların sentezinin ve gen aktarımının başarılı olması seçilecek olan hücre hattı, ortam sıcaklığı, sterilizasyon, pH, partiküllerin çökelme süresi, reaksiyon süresi, kullanılan kimyasalların konsantrasyonu gibi parametrelere bağlıdır [113].



Şekil 2. 10 Kalsiyum fosfat nanopartikülü ile nükleik asit arasındaki etkileşim [114]

3
MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Atomik güç mikroskobu (Shimadzu SPM 9600)
- Biyogüvenlik kabini (Mikrotest MLF120)
- CO_2 inkübatör (Esco, CelCulture CO_2 INCUBATOR)
- Çalkalamalı inkübatör (Mikrotest MCI55)
- Elisa reader (Biotek PowerWave XS2)
- FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 100)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Invert mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)
- Jel görüntüleme sistemi
- Kuru blok ısıtıcı
- Liyafilizatör (Telstar Cryodos)
- Manyetik karıştırıcı (Variomag Mono)
- Mikrodalga Fırın
- Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers)
- Otoklav (Hirayama)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra X-30 R)
- Sonikatör (Bandelin Sonoplus)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeiss, EVO® LS 10)
- Ultrasantrifüj cihazı
- UV-Vis Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Zeta-Sizer (Malvern ZEN 3600 Nano ZS)

3.1.2 Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Besiyerleri

- Agaroz (Sigma Aldrich A9539)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO-ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508001)
- DNA ladder (Sigma Aldrich D0428)
- DNA loading dye (Sigma Aldrich G7654-5ML)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) (Biological Industries 01-052-1A)
- Ethanol (Sgma Aldrich E7023)
- F-12 (HAM) Nutrient Mixture (Biological Industries 01-095-1A)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries 04-007-1A)
- Fosfat Buffered Saline (PBS)
- Kanamisin (Duchefa Biochemie K216.0010)
- Luria Agar (LA) (Sigma Aldrich L3147)
- Luria Broth (LB) (Sigma Aldrich L3522)
- Magnezyum nitrat (Sigma Aldrich 203696)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries 03-031-1B)
- QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN 12963)
- Sodyum sitrat (Sigma Aldrich PHR1416)
- TAE Buffer (Sigma Aldrich 574797)
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT-Sigma M5655)
- Tripan blue (Sigma T8154)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries (03-052-1A)

3.1.3 Kullanılan Sarf Malzemeler

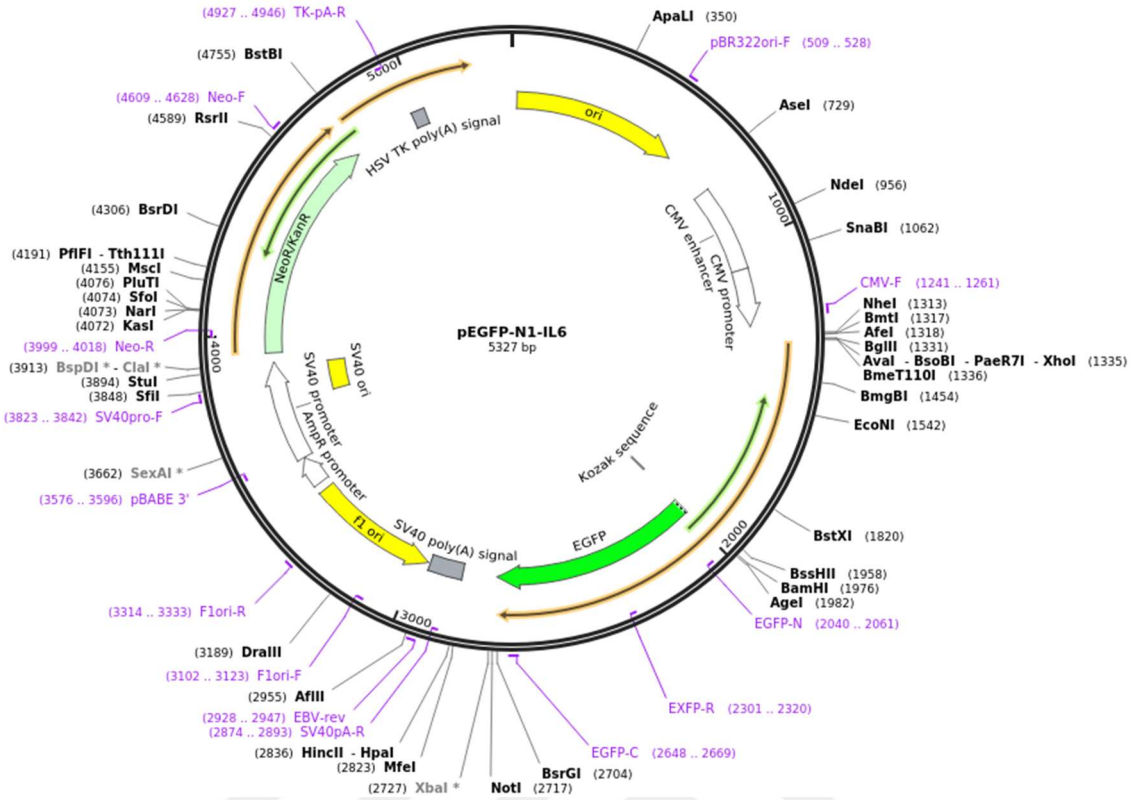
- 24 well plate (TPP 92024)
- 6 well plate (TPP 92006)
- 96 well plate (TPP 92096)
- Hücre kryo tüpler (ISOLAB 09111102)
- Hücre kültür flaskları (T25) (TPP 90026)
- Hücre kültür flaskları (T75) (TPP 90076)
- Pastor pipeti (1 ml) (ISOLAB 08402001)
- Pipet ucu 10 µl (ISOLAB TB10)
- Pipet ucu 200 µl (ISOLAB TB200)
- Pipet ucu 1000 µl (ISOLAB TB 1000)
- Serolojik pipetler (10 ml) (TPP TP94010)
- Serolojik pipetler (2 ml) (TPP TP94002)
- Serolojik pipetler (5 ml) (TPP TP94005)
- Steril falkon tüpler (15 ml) (CORNING 352095)
- Steril falkon tüpler (50 ml) (CORNING 352070)
- Steril öze (ISOLAB 08201001)
- Steril petri kabı (ISOLAB 08102061)
- Thoma lamı (ISOLAB 075.03.002)

3.2 Metot

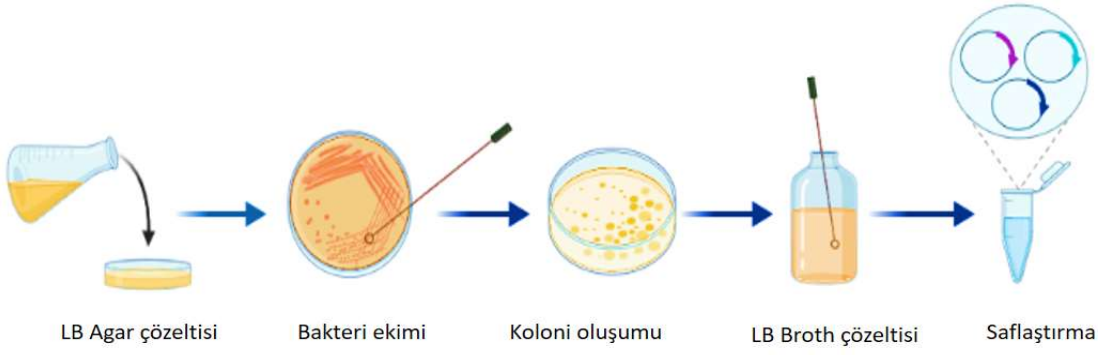
3.2.1 IL-6 Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Tez çalışmasında, MCF-7 kanser hücre hattının transfeksiyonu IL-6 (İnterlökin-6) ve GFP (Green flourescence protein) gen bölgelerini taşıyan ve kanamisin antibiyotiğine duyarlı plazmid ile yapılmıştır. Gen ekspresyonunun takibi, yeşil floresan ışıma sağlayan GFP proteini sayesinde mümkün olmuştur. Plazmid (Addgene Plasmid 111933: pEGFP N1-IL6) *E.coli* DH5alpha suşu içerisinde kültüre edilerek firmadan temin edilmiştir. Plazmid haritasına ait görsel Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.

Konstanrasyonu 35 gr/L olan LB Agar 100 mL çözelti olacak şekilde otoklavda steril edilerek hazırlanmış ve içerisine 1:1 oranında kanamisin antibiyotiği ilave edilmiştir. Bakteri kültürü, 100 µg Kanamisin/mL LB Agar içeren petri kaplarına öze yardımıyla ekilmiştir. Ekimin ardından petri kapları bakteri kolonilerinin oluşumu için bir gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün konsantrasyonu 20 gr/L olan LB Broth sıvı besiyeri 100 mL çözelti olacak şekilde otoklavda steril edilerek hazırlanmış ve içerisine 1:1 oranında kanamisin antibiyotiği eklenmiştir. Kolonilerden bir tanesi seçilerek 100 µg Kanamisin/mL LB Broth içeren erlen içerisine öze yardımıyla ekilmiştir. Koloniler çoğaltılmak üzere bir gece boyunca 37°C 400 rpm'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün bakterilerin yoğunluğu, spektrofotometri cihazı ile 650 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülerek bulunmuş ve blank değeri olarak LB Broth sıvı besiyeri kullanılmıştır. Saflaştırma işlemleri sırasıyla alkali lizis, adsorpsiyon, yıkama ve desorpsiyon aşamalarından oluşmaktadır. QIAGEN Inc ® (Almanya) firmasından temin edilen kit solüsyonları ile kit protokolüne uygun olarak izolasyon yapılmıştır (Şekil 3.2). İzolasyonun ardından elde edilen plazmid DNA'ların (pDNA) saflık tayini için Nanodrop cihazı kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm, 260/280 nm absorbans değerleri dikkate alınarak yapılmıştır. Plazmid DNA'ların ikinci tayini için agaroz jel elektroforezi yapılarak pDNA'ların görüntülenmesi sağlanmıştır. %0,6'lık agaroz olacak şekilde 40 ml TAE buffer çözeltisi hazırlanmış, 100V 1h koşullarında pDNA'lar yürütülmüştür. Ardından pDNA'ların UV ışık altındaki görüntüsü kaydedilmiştir.



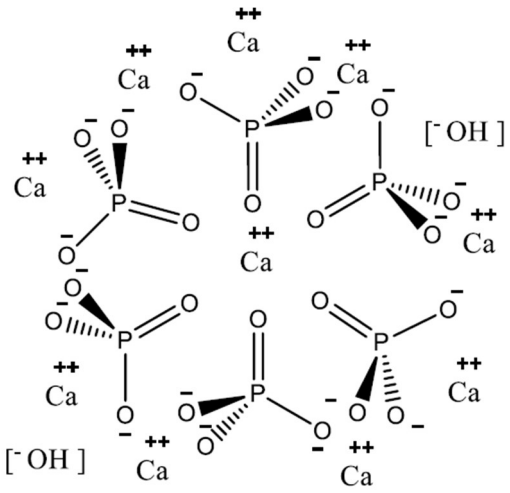
Şekil 3. 1 Plazmid haritası [115]



Şekil 3. 2 Plazmidleri çoğaltma ve saflaştırma aşaması

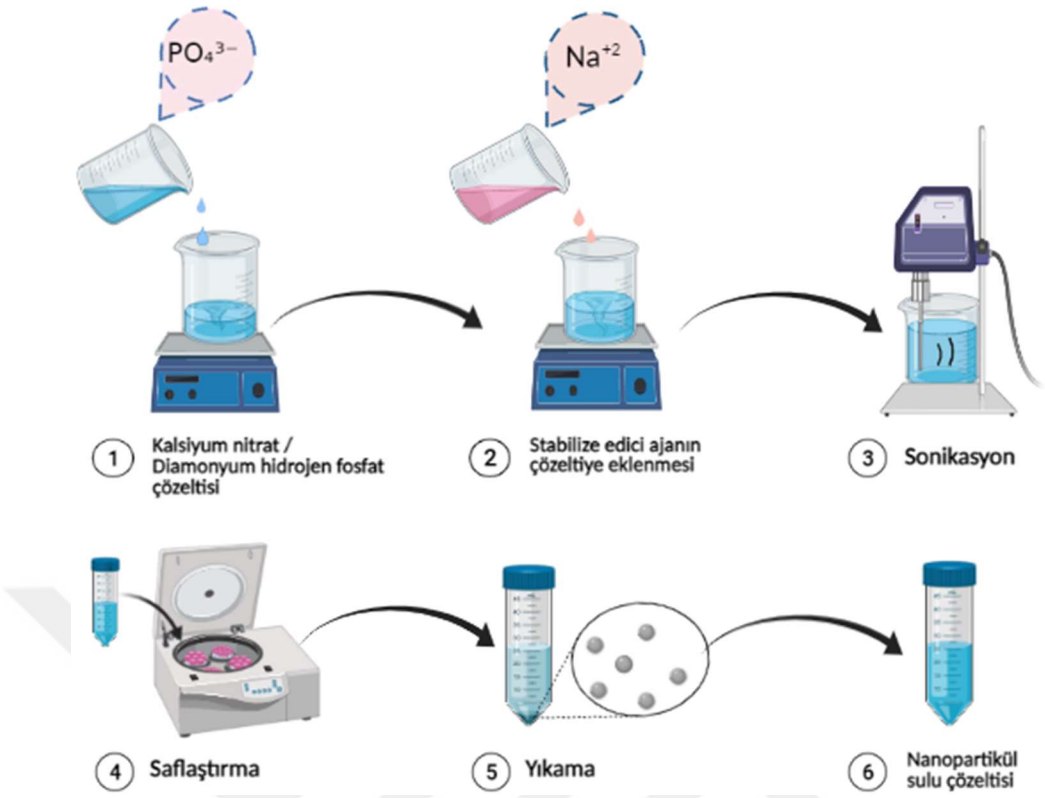
3.2.2 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Sentezlenmesi

Tez çalışmasında pDNA'ların kanser hücresine *in vitro* transfeksiyonu, non-viral vektör olan ve inorganik partikül grubunda yer alan kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin sentezlenmesiyle gerçekleşmiştir. Şekil 3.3'te gösterilen nanopartikülün yapısındaki kalsiyum iyonlarının, DNA'nın yapısında bulunan fosfat gruplarıyla etkileşim kurarak iyonik kompleks oluşturduğu bilinmektedir.



Şekil 3. 3 Kalsiyum fosfat molekülünün kimyasal yapısı [116]

Kalsiyum fosfat nanopartikülleri çökeltme metodu kullanılarak sentezlenmiştir. Sentez için; kalsiyum nitrat, diamonyum hidrojen fosfat ve stabiliteyi sağlayan ajan olarak sodyum sitrat/magnezyum nitrat bileşenleri kullanılmıştır. Bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra sırasıyla kalsiyum nitrat (25 mL), diamonyum hidrojen fosfat (25 mL) ve sodyum sitrat/magnezyum nitrat (50 mL) ayrı beherlerde olmak üzere distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. Hazırlanan solüsyonlar 80°C' de 35 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra kalsiyum nitrat ve diamonyum hidrojen fosfat 60°C'de 7 dakika boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Stabiliteyi sağlayacak olan ajanlar ayrı ayrı hazırlanmış olan karışımların üzerine 6 dakika boyunca 100 µl'lik pipet yardımıyla yavaş bir şekilde damlatılarak eklenmiştir. Hazırlanan sulu çözeltiler sonik prob (%50 ampl., pulse on: 4 sn, pulse off: 2 sn) altında 15 dakika boyunca bekletilerek homojenizasyon işlemi sağlanmıştır. Ardından hazırlanan çözeltiler 20 mL santrifüj tüplerine eşit olacak şekilde aktarılıp 40.000 rpm' de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernant kısım uzaklaştırılarak, pelet kısmı 10 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür (Şekil 3.4). Hazırlanan nanopartikül, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere liyofilizatörde kurutularak +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 4 Nanopartikül sentez aşamaları

3.2.3 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Karakterizasyonu

Sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikülünün karakterizasyon çalışmaları dört farklı cihazla yapılmıştır. Bunlar; Zeta-Sizer Cihazı, Atomik Güç Mikroskobu (AFM) Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR).

a) Zeta-Sizer Cihazı; sentezlenen nanopartikül dispersiyonlarının ortalama parçacık boyutunun, zeta potansiyel analizlerinin ve polidispersite indeksinin (PDI) hesaplanması için kullanılmıştır. Cihaz, zetasizer küvetinde bulunan çözelti içerisinden 633 nm'lik kırmızı lazer ışık geçirilmesi ile saçılan ışığın 90°'lik açıyla yerleştirilen dedektörler tarafından ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Nanopartikülün yukarıda bahsedilen özelliklerinin değerlendirilmesinde dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi kullanılmaktadır. Kurutulmuş olan nanopartikül distile su ile 1/10 oranında (100 µl örnek/1 mL distile su) dilüe edilmiş ve ortam sıcaklığı 25°C olan ZetaSizer (Malvern, Nano ZS) cihazıyla yük ve boy-boy dağılımları belirlenmiştir.

b) Atomik Güç Mikroskobu (AFM); yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu olup, sentezlenen nanopartikülün morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Analiz, nanopartikül çözeltisinin mika diskleri üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmasıyla gerçekleştirilmiştir.

c) Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM); hazırlanan kalsiyum fosfat nanopartikülünün morfolojik özelliklerinin tayini için kullanılmıştır. Atomik güç mikroskobunda olduğu gibi nanopartikül çözeltisi SEM cihazındaki uygun stablara damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutularak ölçümü yapılmıştır. SEM cihazında görüntü, yüksek voltaj altında elektronların numune üzerine odaklanması ve çeşitli sinyallerin yayılması ile edilir. Böylece nanopartiküllerin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu yüzey görüntüsü, ikincil taramalı elektron mikroskobu ile net bir şekilde elde edilmiş ve incelenmiştir.

d) Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR); nanopartikül çözeltisi filizatörde kurutularak FT-IR analizi için hazır hale getirilmiştir. Pelet, doğrudan ATR (Attenuated Total Reflectance) ünitesi ile analiz edilerek IR spektrumları elde edilmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile kalsiyum fosfat nanopartikülünü oluşturan moleküllerin içindeki kimyasal bağların yapısı ve molekül içi fonksiyonel grupların tayini yapılmıştır.

3.2.4 Plazmid DNA / Nanopartikül Konjugatının Hazırlanması

E.coli DH5alpha suşundan amplifiye edilen pDNA ve sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikülünün stabilitesini sağlamak ve sonrasında uygun transfeksiyon ajanı olarak kullanılabilmeleri için pDNA (1µg/3µL)/nanopartikül (40µg/40µL) konjugatı hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, plazmid DNA ve nanopartikülün etkileşmesi amacıyla 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından Zeta-Sizer (Malvern) cihazı ile 25° C'de konjugatların büyüklüğü ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır.

3.2.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan tez çalışması kapsamında, sentezi ve karakterizasyon çalışmaları yapılan kalsiyum fosfat nanopartikülünün ve pDNA/nanopartikül konjugatının *in vitro* hücre kültürü çalışmaları MCF-7 insan meme kanser hücre hattı (ATCC ®HTB-22 ™) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.5.1 Hücrelerin Canlandırılması

MCF-7 hücre kültürü, 196°C sıcaklığındaki sıvı azot tankında kryotüpler içerisinde dondurulmuş şekilde muhafaza edilmektedir. Dondurulmuş stok hücrelerin kullanılabilmesi için çözdürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çözdürme işlemi, hücre canlılığı için son derece önem arz etmekte ve bundan dolayı işlem oldukça hızlı gerçekleştirilmektedir. Çözünen hücreler, 4 mL uygun besiyeri ile pipetaj yapılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant pipet yardımıyla çekilerek atılmış, pelet kısmı ise hücre hattına uygun olan besiyeri ile hücre yoğunluğuna göre tamamlanarak çözdürülmüştür. Pelet, besiyeri ile dikkatlice pipetaj yapılarak hücre kültür flasklarına aktarılmıştır. Üzerine hücre adı, açılma tarihi ve pasaj sayısı yazılan flasklar 37°C %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Hücrelerin yoğunluğu ve yüzeye tutunmaları inverted mikroskop ile takip edilmiştir. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan MCF-7 hücreleri monolayer (yapışkan) kültür özelliğinde olduğu için hücre kültür kapları yatay bir şekilde konumlandırılarak inkübe edilmiştir.

3.2.5.2 Hücrelerin Pasajlanması

Çoğalan hücreler %80-90 konfluent seviyesine ulaştıklarında pasajlanarak, hücre kültürünün bölünmesi sağlanır. İlk adım, hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri pipet ile çekilerek uzaklaştırılmıştır. Subkültür oluşturmadan önce, monolayer kültür olan MCF-7 hücreleri yüzeye bağlı olarak üredikleri için kültür kabından ayrılması, tripsinizasyon işlemi ile sağlanmıştır. Flask içerisine 1X Tripsin-EDTA eklenerek, enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücrelerin kontrolü inverted mikroskop ile sağlanmıştır. Enzimin aktivasyonunu inhibe edebilmek için, enzim miktarının en az iki katı kadar tamamlanmış uygun besiyeri ile yıkama işlemi yapılmıştır. Detripsinizasyon işleminin ardından hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak, pelet hücre kültürüne uygun ve tamamlanmış olan besiyerinde pipetaj yapılarak çözdürülmüştür. Hücreler taze besiyeri içeren hücre kültür kaplarına aktarılarak 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin üreme hızı her gün inverted mikroskop ile takip edilmiş olup, %80-90 konfluent seviyesine ulaştıklarında pasajlama işlemi tekrarlanmıştır.

3.2.5.3 Hücre Sayısının Belirlenmesi ve Canlılık Tayini

Tez çalışması boyunca *in vitro* hücre kültür deneylerinin her aşamasında canlı hücreler sayılarak, ekilecek hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Canlı ve ölü hücrelerin tayini için tripan mavisi kullanılmıştır. Ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için sitoplazmaları mavi ile boyanır ve mat bir görüntü elde edilir. Canlı hücreler ise boyayı hücre içine hapsedemediğinden dolayı boyanmaz ve parlak görünürler. Hücrelerin sayımı, pasajlanma ve ekilme işlemlerinden önce gerçekleştirilmiştir. 10 µL tripan mavisi ve 10 µL hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak karıştırılmış ve hazırlanan karışım Thoma lamının her iki bölmesine 10 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. İnverted mikroskop kullanılarak 16 eşit kareden oluşan Thoma lamının 4 bölmesinde bulunan hücrelerin ortalaması alınarak sayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre sayısı (3.1) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

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

3.2.5.4 Hücrelerin Dondurulması

Kullanılan hücreler çalışma bitmiş ya da tekrar kullanılmak üzere ara verilmiş ise dondurularak muhafaza edilmektedir. Dondurma işlemi diğer adı ile kriyopreservasyon hücrelerin yeniden çözüldüğünde canlılığını ve fonksiyonel özelliklerini kaybetmemesi açısından özenle yapılmalıdır. Hücre dondurulması işlemi DMSO gibi kriyoprotektan gibi maddeler kullanılarak yapılmaktadır. Hücreler çok hızlı soğutulduğu zaman hücre içinde ve dışında oluşan buz kristalleri tarafından mekanik parçalanmayla patlayabilir ya da yavaş soğutulduğunda dehidrasyona maruz kalarak ölebilirler. Kriyoprotektan maddeler, hücrelerin çok hızlı ya da çok yavaş şekilde dondurulmasıyla oluşabilecek ani ısı değişimlerine karşı koruma sağlamaktadır. Çalışmada MCF-7 hücrelerini dondurmak için, hücreler pasajlama işleminde olduğu gibi santrifüj edildikten sonra süpernant uzaklaştırılmış ve pelet hazırlanan 1 mL (%90 FBS, %10 DMSO) dondurma solüsyonu içerisinde çözdürülmüştür. Elde edilen solüsyon, kriyotüplere aktarılmış ve kademeli olarak soğutularak dondurulması sağlanmıştır. Dondurulma koşulları,

hücrelere zarar vermemek amacıyla önce -20°C'de yaklaşık 1 saat muhafaza edilerek, daha sonra -80°C'ye transferi sağlanarak gerçekleşmiştir.

3.2.6 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Sitotoksisitesi

Laboratuvar ortamında sentezlenen kimyasalların ya da ilaçların hücreler üzerinde sitotoksik kapasitesini belirlemek suretiyle çeşitli metotlar mevcuttur. Sunulan tez çalışması kapsamında sentezlenmiş olan kalsiyum fosfat nanopartikülünün L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC ® CRL-6364™) üzerinde *in vitro* sitotoksisitesinin belirlenmesi MTT analizi yapılarak gerçekleşmiştir. Birinci gün; DMEM-F12 besiyerinde önceden üremesi sağlanan hücrelerin MTT analizi için Thoma lamında sayımı gerçekleşmiştir. L929 hücreleri 96 kuyucuklu kültür plakasına, her kuyucukta $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plaka, 37°C ve %5 CO_2 koşullarında 24 saat süresince inkübe edilmiştir. İkinci gün; inverted mikroskop ile hücrelerin yüzeye tutunmaları kontrol edilerek toksisitesine bakmak istediğimiz malzeme için hazırlanmıştır. Kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırılıp, farklı konsantrasyonlarda (10 µg/µL, 20 µg/µL, 30 µg/µL, 40 µg/µL, 50 µg/µL) kalsiyum fosfat nanaopartikülü ayrı ayrı gruplandırılarak eklenmiştir. Negatif kontrol grubu için 100 µL DMEM/F12, pozitif kontrol grubu için ise 100 µL DMSO kullanılmıştır. Nanopartikül ve kontrol grupları plaka üzerinde 5 tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır. Ardından plaka 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarında bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü gün; MTT boyası, hacmi 5 mL olan steril PBS içerisinde çözdürülerek MTT çözeltisi (5 mg/mL) hazırlanmıştır. Kültür plakasında bulunan besiyeri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 1/10 oranında DMEM/F12 ile dilüe edilmiş MTT çözeltisinden 100 µL eklenmiştir. Plaka, kültür koşulları değiştirilmeden 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından MTT çözeltisi uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiştir. 96 kuyucuklu kültür plakası ELISA okuyucusu ile 570 nm dalga boyunda ölçülerek hücrelerin canlılık gösteren absorbans değerleri belirlenmiştir.

3.2.7 Nanopartikül/pDNA Konjugatının MCF-7 Kanser Hücre Hattına Transfeksiyonu

Transfeksiyon işlemi için 6 kuyucuklu kültür kabı ve %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri kullanılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat önce, MCF-7 hücrelerinin her kuyucuğa $5x10^5$ hücre/mL olacak şekilde ekimi yapılarak 37°C ve %5 CO_2 koşullarında bir gece boyunca inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Serum içeren besiyeri, transfeksiyon işleminin gerçekleşmesinden 1 saat önce serum içermeyen DMEM-F12 ile değiştirilmiştir. Aynı zamanda,

i) pDNA/nanopartikül konjugatı,
ii) pDNA,
iii) kontrol grubu (DMEM/F12) olmak üzere transfeksiyon ajanları

hazırlanmıştır. 4 µg plazmid DNA ve 40 µg nanopartikül içeren pDNA/nanopartikül konjugatı oluşturulmuş ve hazırlanan konjugat çözeltileri etkileşim ve stabilizasyon için 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından transfeksiyon ajanlarının ilgili kuyucuklara transfeksiyonu yapılmıştır. Transfekte edilen hücreler 37°C %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda serumsuz besiyeri, %10 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri ile değiştirilmiştir. 6 kuyucuklu plaka 37°C %5 CO_2 koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

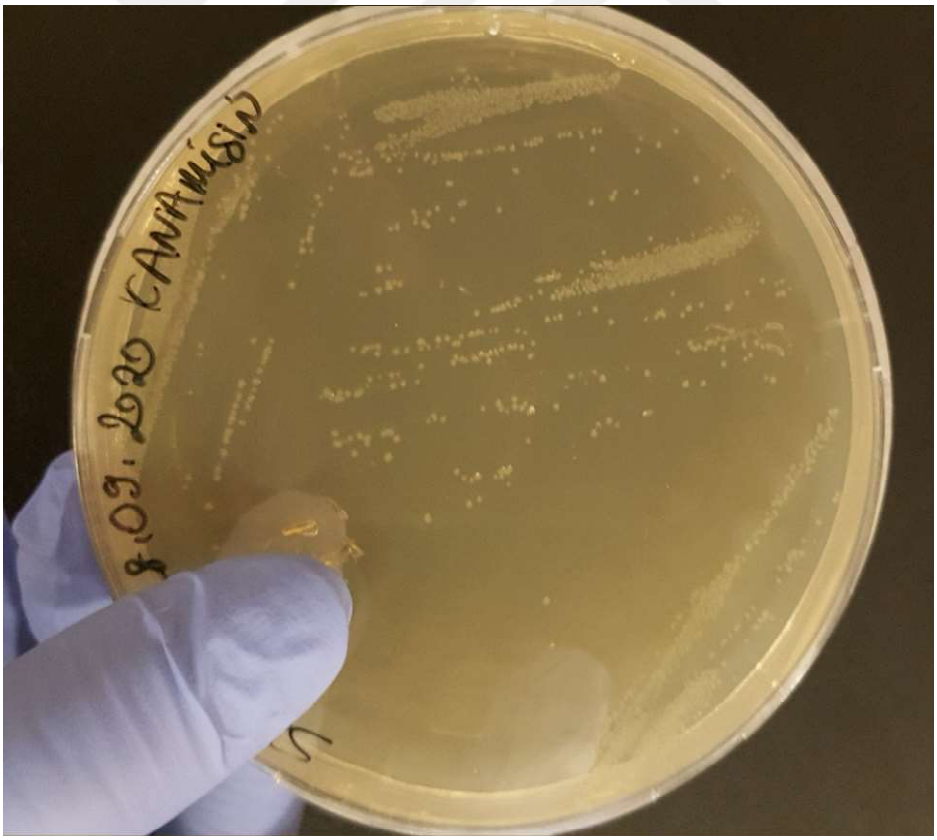
3.2.8 Nanopartikül/pDNA Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyon etkinliği, transfekte edilen hücrelerdeki plazmidin GFP genini kodlayan bölgelerinin ekspresyonu sonucu yayılan GFP ışımasına bağlı olarak belirlenmiştir. Floresan ataçmanlı inverted mikroskobu kullanılarak uygun dalga boyunda floresan ışık altında 24 saat boyunca gözlem yapılmıştır. Transfekte edilen hücrelerin 3 ayrı bölgesi 3 tekrarlı olacak şekilde faz kontrast ve floresan görüntüleri karşılaştırılarak hücre sayımı yapılmış ve transfeksiyon verimi hesaplanmıştır.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 IL-6 Gen Bölgesini Kodlayan Plazmidlerin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Tez çalışması kapsamında hücrelere aktarılmak üzere IL-6 ve GFP genlerini kodlayan, kanamisin antibiyotiğine duyarlı plazmid tercih edilmiştir. Plazmidlerin çoğaltılması için *E.coli* DH5alpha bakterileri saplama kültür yoluyla temin edilmiş olup, petri kaplarındaki 100 µg/ml kanamisin içeren LB Agar besiyerine öze yardımıyla ekilmiştir. Petri kapları, 37°C'de bir gece süresince inkübe edilmiştir. Genomunda direnç genine sahip bakteriler, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi seçici besiyerinde çoğalan kolonileri oluşturmuşlardır.



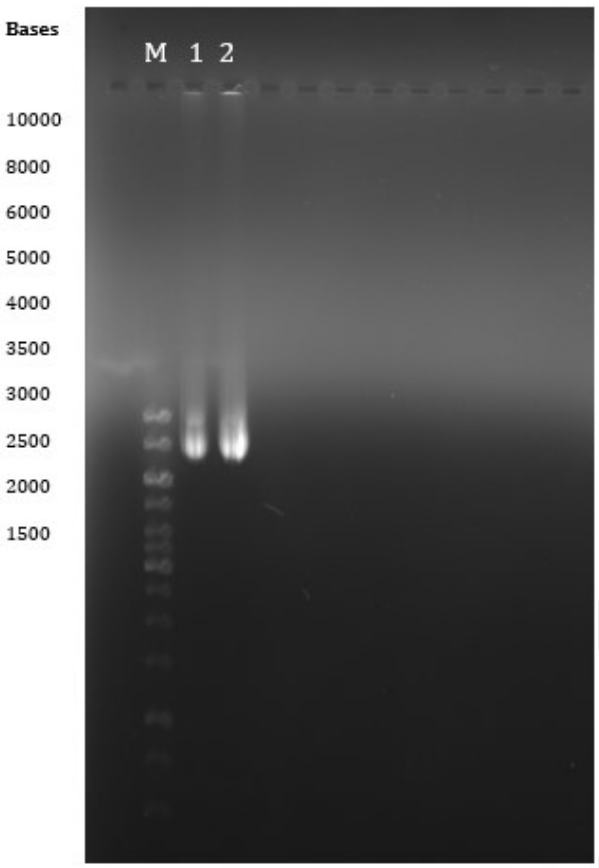
Şekil 4. 1 Seçici besiyerinde çoğalan bakteri

Tek koloni halinde üreyen bakteri kolonilerinden bir tanesi seçilerek, erlenmayer cam şişede hazırlanmış olan 100 µg/mL kanamisin antibiyotiği ilaveli LB Broth sıvı besiyerine ekilmiştir. Erlenmayer 37°C 400 rpm koşullarındaki çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Saflaştırma işleminden önce üreyen bakterilerin yoğunluğu UV visible cihazı ile 650 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Blank değeri, LB Broth sıvı besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Sıvı kültürdeki bakterilerin optik yoğunluğu 0,602 bulunmuştur. Sıvı kültürde çoğaltılması gerçekleşen bakteriler, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, pelet %20 gliserol (w/v) çözeltisinde çözdürülerek 1 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Hazırlanan bakteri kültürü aşamalı olarak dondurularak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Optik yoğunluk değeri saflaştırma işlemi için uygun olan bakteri kültürü QIAGEN Inc ® firmasından temin edilen Plasmid Maxi Kit solüsyonları ile kit prosedürüne uygun olarak izole edilmiştir. İzolasyon işlemleri 4 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen plazmid DNA örneklerinin saflık ve yoğunluk değerleri Nanodrop cihazı ile 260/280 nm absorbans değerlerinde ölçülerek, sonuçlar Tablo 4.1'de gösterildiği gibidir.

Tablo 4. 1 İzole edilen plazmid DNA yoğunluk ve saflık değerleri

	µg/µL	**A260/280**
Plazmid DNA 1	0,284	1,88
Plazmid DNA 2	0,121	1,92
Plazmid DNA 3	0,125	1,91
Plazmid DNA 4	0,206	1,87

Elde edilen plazmid DNA'lara ait iki örneğin ikinci tayini jel elektroforezi ile yapılmıştır. Plazmid DNA'lar DNA marker (1kb) ile %0,6'lık agaroz jelde 100V 1 saat yürütülmüş, UV ışık altında görüntülenmiştir. Şekil 4.2'de plazmid DNA'lara ait agaroz jel görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4. 2 Plazmid DNA jel görüntüsü

Saflaştırılmış pDNA'ların, çalışmalarda kullanılmadan önce spektrofotometrik ve jel elektroforezi analizleri yapılarak kalite kontrolü sağlanmış olmuştur. Literatürde halihazırda yer alan çalışmalar kapsamında DNA'yı "saf" olarak nitelendirebilmek için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında gerçekleşen spektrofotometrik ölçümler sonucu DNA saflığı ~1,8-2,0 arasında olmalıdır. Şekil 4.2'de elde edilen aynı plazmid DNA'ya ait örneklerin jel elektroforezindeki görüntüsü 1 ve 2 numaraları ile DNA marker ise "M" ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, saflık değerleri ve agaroz jel görüntüleri değerlendirilen pDNA'ların tez kapsamında devam edecek çalışmalar için kullanılması uygun bulunmuştur.

4.2 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Sentezlenmesi

Sunulan tez çalışması kapsamında kalsiyum fosfat nanopartikülleri çökeltme metodu kullanılarak sentezlenmiştir. Stabilizeyi sağlayan sodyum ve magnezyum ajanları haricinde aynı kimyasal bileşenler kullanılarak hazırlanan partikül örneklerinin formülasyonu Tablo 4.2'de gösterildiği gibidir. Elde edilen

nanopartiküllerin zetasizer analizleri tamamlandıktan sonra gen aktarımı için uygun olan örnekler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere liyofilize edilerek saklanmıştır.

Tablo 4. 2 Sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikül formülasyonları

Nanopartikül ismi / Formülasyon	**Ca-Nitrat**	**Di-H-P**	**Na-Sitrat**	**Mg-Nitrat**	**Sonikasyon**	**Santrifüj**
Na-CaP	0,069 gr 15mL dH_2O	0,023 gr 15mL dH_2O	0,088 gr 30mL dH_2O	–	15 dk %50 amp.	40.000 rpm 20 dk 20 °C
Mg-CaP	0,069 gr 15mL dH_2O	0,023 gr 15mL dH_2O	–	0,088 gr 30mL dH_2O	15 dk %50 amp.	40.000 rpm 20 dk 20 °C

4.3 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün Karakterizasyonu

Sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikülüne ait kimyasal ve morfolojik özellikler belirlenerek karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Partiküllerin boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer cihazı ile tayin edilmiştir. Partiküllere ait morfolojik özellikler SEM ve AFM görüntüleme cihazları kullanılarak, kimyasal özellikler ise FT-IR analizi ile belirlenmiştir.

4.3.1 Kalsiyum Fosfat Nanopartikül ve Plazmid DNA/Nanopartikül Konjugatının Zetasizer Analizi

Sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikül örnekleri boyut, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel özellikleri bakımından değerlendirilerek uygun transfeksiyon ajanı olarak kullanılabilecek örnekler seçilmiştir. Nanopartiküllerin Zetasizer analiz sonuçları Tablo 4.3'te verildiği gibidir.

Tablo 4. 3 Nanopartiküllerin zetasizer analiz sonuçları

Nanopartikül ismi	Boyut (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)	Ölçüm Öncesi Geçen Zaman
Mg-CaP_1	365±51	0,4	-21,8 ±4,6	15 dakika
Mg-CaP_2	3650±32	0,8	-17,2±4,5	1 saat
Na-CaP_1	248,1±54	0,3	-13,3 ±2,8	15 dakika
Na-CaP_2	1332±98	0,7	-19,0±3,6	1 saat

Hızla büyüme eğiliminde olan kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin stabilizasyonu sağlamak amacıyla, stabilizasyon ajanı olarak sodyum ve magnezyum iyonları kullanılmış ve sentezlenen nanopartiküllerin DLS (dinamik ışık saçıımı) yöntemiyle belirli süre aralıklarla zeta (yük) ve boyut (nm) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin hızla agrege olma özelliği göz önünde bulundurularak parçacıkların sentezlendikten 15 dakika ve 1 saat sonrası olacak şekilde ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda, kısa süre zaman aralığında Mg-CaP ve Na-CaP nanopartikülerinin sırasıyla 365±51 nm ve 248,1±54 nm aralığında olduğunu, 1 saat sonraki ölçümlerde ise boyutlarını arttığını tespit edilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin ultrasonikatöre tutularak tekrar ölçümü gerçekleştiğinde neredeyse ilk değerlerine geri döndüğü tespit edilmiştir. Chowdhury ve arkadaşları memeli hücrelerinde yüksek gen ekspresyonu için magnezyum ilaveli olarak hazırladıkları CaP nanopartiküllerini, 1-30 dakikalık bir zaman periyodunda değerlendirerek boyut dağılımlarının giderek artmakta olduğunu ve magnezyum miktarının yüksek olduğu çözeltilerde partikül boyutunun küçüldüğünü göstermişlerdir [117]. Giger ve arkadaşları bifosfonatla stabilize edilmiş olarak sentezledikleri CaP nanopartiküllerinin yaklaşık 200 nm boyutlarında oluştuğunu yayınlayan başka bir çalışma olmuştur [111]. Benzer şekilde Pedraza ve arkadaşları, sundukları çalışmada CaP partiküllerinin çap oranlarının 200 nm'ye kadar değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir [118]. Wu ve arkadaşları 2017 yılında farklı konsantrasyonlarda lipid moleküller ile kaplayarak

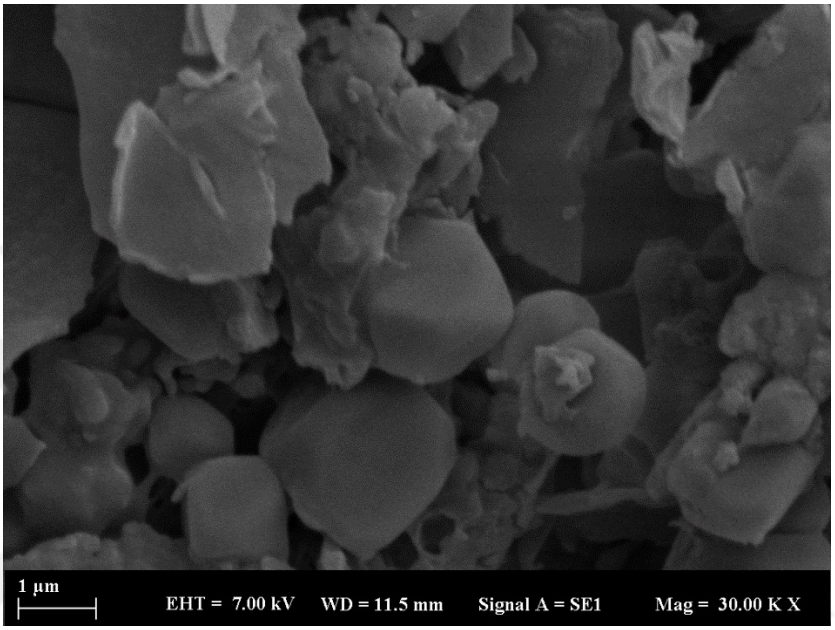
sentezledikleri CaP parçacık boyutlarının 257,3 nm ve 473,8 nm aralıklarında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir [119]. Sentezlenen nanopartiküllerin tüm formülasyonlarına göre PdI değerlerinin 0,3 ve 0,8 aralığında olduğu belirlenmiştir. Böylelikle tez çalışmasından elde edilen partikül boyutları ile literatürdeki değerler parallellik niteliği taşımaktadır. Literatürdeki çoğu çalışmalarla benzer zeta potansiyel değerlerine sahip olan kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin negatif yüke sahip olduğu görülmüştür. Li ve arkadaşları siRNA iletimi içi sentezledikleri partiküllerin yükünü -16 olarak bulmuşlardır [120]. 2019 yılında Khalifehzadeh ve arkadaşları, gen aktarım amacıyla sentezledikleri DNA yüklü CaP partiküllerine ait yükün -18 ve -30 arasında negatif yüklü olduğunu bildirmişlerdir [121]. Çalışma için uygun görülen örnekler liyofilize edilmiş, ardından pDNA (1µg/3µL)/nanopartikül (40µg/40µL) konjugatı hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, plazmid DNA ve nanopartikülün etkileşmesi amacıyla 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra Zeta-Sizer (Malvern) cihazı ile 25° C'de konjugatların büyüklüğü ve zeta potansiyel analizleri tamamlanmıştır (Tablo 4.4). DNA ile yüklenen partikül boyut ve yüklerinde artış olduğu görülmüştür. CaP nanopartiküllerinin yapısındaki kalsiyum ve +2 değerlikli iyonların DNA omurgasındaki fosfat gruplarıyla etkileştiği bilinmektedir. Tez çalışmasıyla benzer nitelikte olan Khan ve arkadaşları, 2016 yılında gen aktarım amacıyla yayınladıkları çalışmada sentezledikleri CaP nanopartikülünün, DNA ile etkileşiminden sonra zeta potansiyelinin negatif yüke sahip olduğunu bildirmişlerdir [109].

Tablo 4. 4 Nanopartikül-pDNA konjugatlarının zetasizer analiz sonuçları

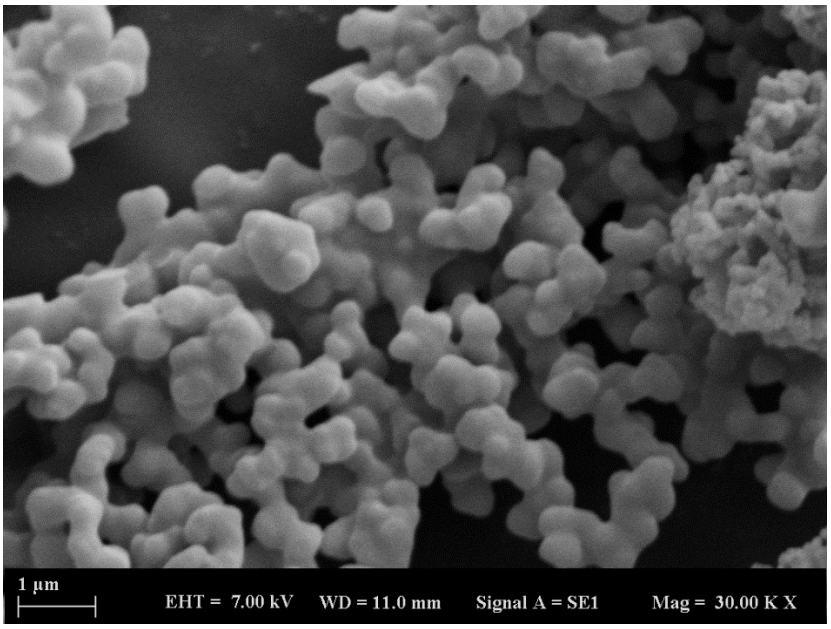
Konjugat ismi	**pDNA**	**Boyut (nm)**	**PdI**	**Zeta Potansiyel (mV)**
Na-CaP_1 (40µg)	1 µg	634,3±90,4	0,5	-19,1±7,3
Mg-CaP_1 (40µg)	1 µg	815,1±56,4	0,6	-29,3±4,14
pDNA	1 µg	1305±12,5	0,5	-15,4±5,6

4.3.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Mg-CaP ve Na-CaP nanopartiküllerine ait morfolojik özellikleri belirlemek üzere kullanılan tekniklerden biri SEM analizi ile mümkün olmuştur. Örnekler, 30000x büyütmede görüntü alınarak incelenmiştir. Liyofilizatörde kurutularak toz haline getirilen Mg-CaP ve Na-CaP örneklerinin SEM analizine ait görüntüleri sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 3 Mg-CaP nanopartikülüne ait SEM görüntüsü

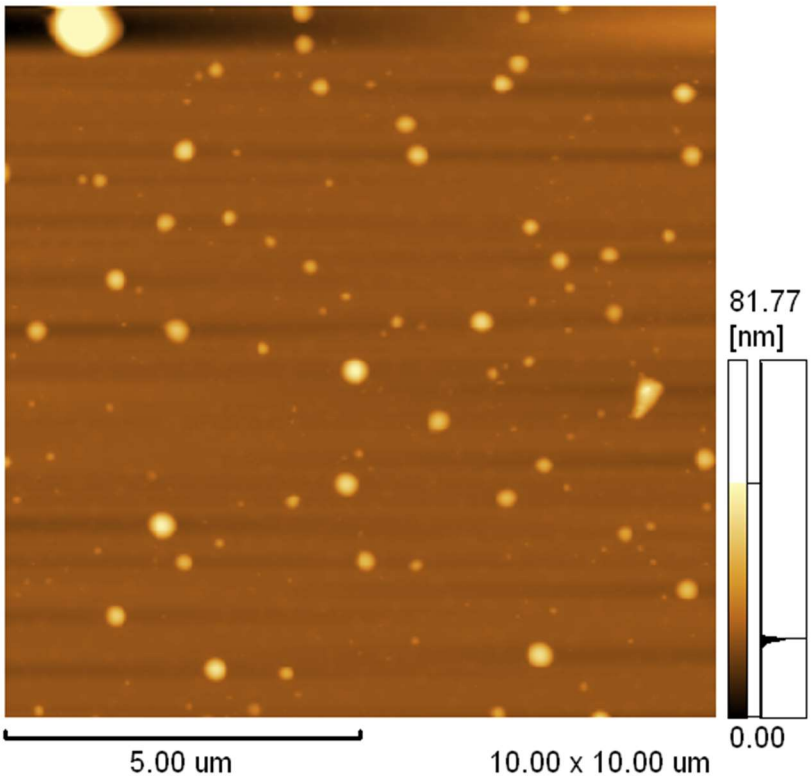


Şekil 4. 4 Na-CaP nanopartikülüne ait SEM görüntüsü

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' e göre, elde edilen görüntüler doğrultusunda partikül örneklerinin küresel şekilli ve dar boyutlarda dağılım gösterdiği görülmektedir. Partikül boyutları ortalama 200-300 nm arasında olup, Zeta ölçümlerini doğrular niteliktedir. Her iki nanopartiküle ait SEM görüntüsü karşılaştırıldığında benzer özelliklere sahip olduğu fakat sodyum içerikli CaP partikülünün daha belirgin hatlara sahip olduğu söylenebilmektedir. Literatürde Kollenda ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladıkları çalışmada HeLa, Caco-2 ve A549 hücre hatlarına transfeksiyonu, sentezledikleri kalsiyum fosfat nanopartikülü ile gerçekleştirmişler ve partiküllerin SEM görüntülerinin küresel şekilli ve dar boyutlu olduğunu belirtmişlerdir [122]. Chernozem ve arkadaşları 2019 yılında farklı bileşenler kullanarak kalsiyum fosfat nanopartikülü sentezlemiş, SEM analizine göre yuvarlak şekile sahip partiküller elde edildiğini bildirmişlerdir [123]. Sokolova ve arkadaşlarının gen aktarımında kullanmak üzere floresan moleküller ile yüklediği CaP'lerin boyutlarının küçük ve küresel şekilli SEM görüntülerine sahip olduğunu belirtmişlerdir [124]. Sonuçları benzerlik gösteren diğer bir çalışma ise, Banik ve Basu'nun sentezini ve karakterizasyon çalışmalarını yaptığı kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin SEM analizine göre, küresel yapıda ve dar boyutlu bir dağılıma sahip olduğudur [112]. Sunulan tez çalışmasında kalsiyum fosfat nanopartiküllerine ait SEM görüntülerinin literatürde yer alan çalışmalarla benzerlik gösterdiği yorumu yapılabilmektedir.

4.3.3 Atomik Güç Mikroskobu (AFM)

Zeta potansiyel ve SEM analizine dayanarak AFM analizine sodyum içerikli nanopartikül ile devam edilmiştir. Na-CaP nanopartiküllerine ait morfolojik özellikleri belirlemek üzere kullanılan tekniklerden bir diğeri ise AFM analizi ile gerçekleşmiştir. AFM analizi ile nanopartiküllere ait boyut dağılımlarının yanı sıra iki boyutlu ve üç boyutlu görüntüler elde edilerek nanoparçacıklara dair dizilimleri de belirlemek mümkündür. Analiz, partikül çözeltisinin mika disklerinin üzerine damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmasıyla gerçekleşmiştir. AFM analizine ait görüntüler Şekil 4.5'te verilmiştir.



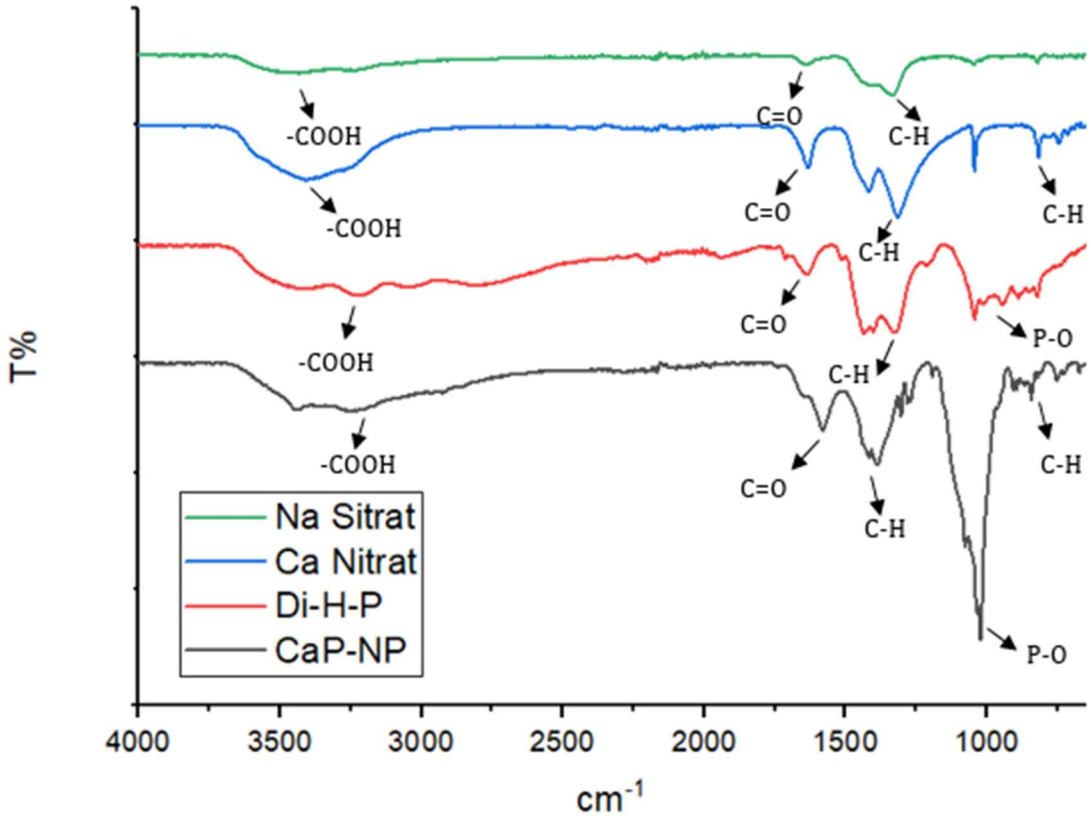
Şekil 4. 5 Kalsiyum fosfat nanopartikülüne ait AFM görüntüsü

Kalsiyum fosfat nanopartikülüne ait örneğin boyut dağılım özelliği, 1 µm x 1 µm boyutlarındaki alanda AFM cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Partiküle ait şekillerin küresel yapıda ve boyutlarının ortalama çapları 81,77 nm olduğu görülmektedir. AFM analizi ile örneklerin boyut dağılımının DLS yöntemi ile belirlenen analize kıyasla daha küçük çaplarda olduğu tespit edilmiştir. Bu da AFM analizinin hidrasyon tabakasına (sıvı faz) sahip olmamasından, örneklerin kuru olarak analiz edilmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Liu ve arkadaşlarının farklı oranlarda hazırladıkları sülfat ile kaplı kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin AFM analiz çalışması neticesinde, neredeyse küresel yapılı partiküller elde ettiklerini ve sülfat yoğunluğu fazla olan nanopartikül boyutlarının 30 nm, daha az oranda kullanılan sülfat kaplı partiküllerin ise 150 nm boyutunda bildirmişlerdir [125]. Hoo ve arkadaşları, elde ettikleri 20-100 nm aralığındaki polistiren nanoparçacıklarının karakterizasyonunu DLS ve AFM analizleri ile gerçekleştirmişlerdir. AFM değerlerinin, DLS ve nominal değerlerinden daha düşük olduğunu bildirmişlerdir [126]. Sonuç olarak, tez çalışmasının literatürde mevcut olan AFM analiz raporları ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

4.3.4 Fourier Transform Infrared (FT-IR)

Sentezlenen sodyum içerikli nanopartiküllerin Zetasizer analiz sonuçları ve morfolojik özellikleri değerlendirilip, çalışmanın devamı için uygun görülmüştür. Ardından, nanopartikül örneklerinin yapısında bulunan kimyasal bağların ve fonksiyonel grupların varlığını belirlemek üzere FT-IR analizi yapılmıştır. IR spektrumundan yararlanılarak partiküllerin yapısında yer alan kimyasal bağlar Şekil 4.6'da gösterildiği gibidir.



Şekil 4. 6 Kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları

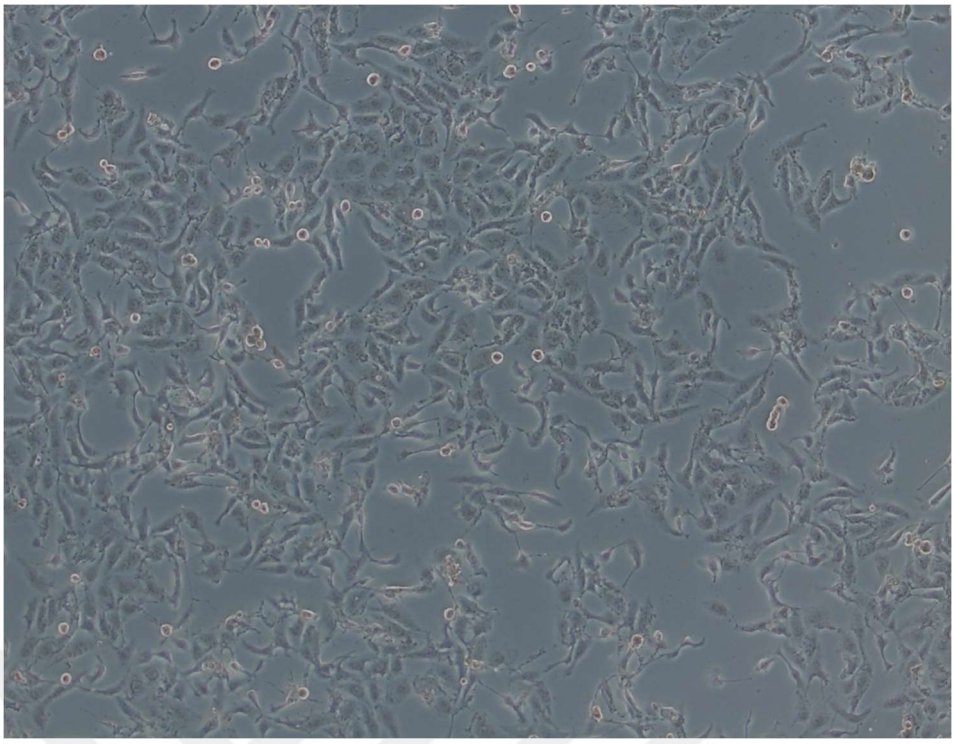
Şekil 4.6'da sodyum içerikli CaP nanopartikülünün FT-IR analizi ile belirlenen spektrumları gösterilmiştir. FT-IR analizi sonuçlarına bakıldığında, nanopartikülün sentez sürecinde kullanılan kimyasallarla aynı karakteristik piklere sahip olduğu söylenebilir. IR spektrumuna göre, saf kalsiyum nitrat kimyasalının yapısında bulundurduğu bağlar; 3409 cm^{-1}, 1633 cm^{-1} ve 1316 cm^{-1} değerlerinin yakınlarında pik veren sırasıyla –COOH, C=O ve C-H bağlarıdır. Kalsiyum nitrat tuzunda bulunan pikler, sodyum sitrat tuzunda bulunan piklere göre daha keskin ve belirgin olmakla birlikte aynı bağ yapılarına sahiptirler. Ayrıca stabilize edici ajanı sodyum sitrat olan nanopartikülün sentezindeki C-H bağları alkali özellikteki sitrat maddesinden

kaynaklanmaktadır. Diamonyum hidrojen fosfat yapısında bulunan bağlar ise 3211 cm^{-1}, 1635 cm^{-1}, 1434 cm^{-1} ve 1043 cm^{-1} gerilmelerine neden olan sırasıyla –COOH, C=O, C-H ve P-O bağlarıdır. Sentezlenen CaP nanopartikülünün IR spektrumuna göre, 3253 cm^{-1}, 1580 cm^{-1}, 1386 cm^{-1}, 1022 cm^{-1}, 843 cm^{-1} değerlerine ait bağlar sırasıyla –COOH, C=O, C-H, P-O ve C-H gerilmelerini temsil eden yapılardır. Di-H-P yapısında bulunan fosfat grupları nanopartikülün en tepe noktalarını temsil etmiştir. Nanopartikülün sentez sürecinde kullanılan kimyasal maddelere ve nanopartiküle ait spektrumlar yapılarında bulundurdukları karakteristik bağlardan kaynaklanmaktadır. Sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikülüne genel olarak bakıldığında, diğer moleküller ile neredeyse benzer yoğunluktaki bantlara sahip olduğu söylenebilmektedir.

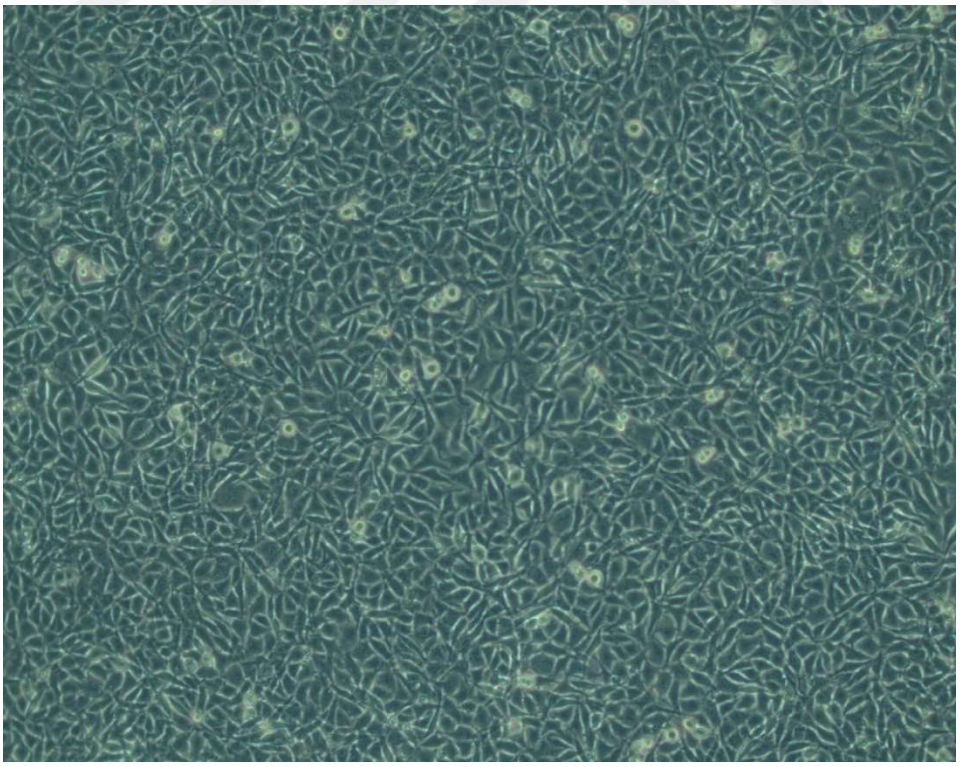
Literatürde çeşitli teknik ve kimyasallar ile sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartikülüne dair farklı piklerin yer alması gibi bu çalışmayla benzerlik gösteren yayınlar da mevcuttur. Banik ve Basu yayınladıkları çalışmada sodyum sitratı stabilize edici ajan olarak kullanmış ve sentezledikleri kalsiyum fosfat nanopartikülünün FT-IR grafiği, bu çalışmadaki ile benzerlik göstermektedir [112]. 2018 yılında Mohiyuddin ve arkadaşlarının terapötik etkinlik amacıyla sitostatik bir ajan ile yüklü olarak sentezledikleri kalsiyum fosfat nanopartikülüne ait FT-IR analizinde, nanopartikülün zirve yaptığı piklerin karakteristik özellik sağlayan fosfat gruplarını temsil ettiği gösterilmiştir [127].

4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan tez çalışması kapsamında sentezlenerek optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının tamamlandığı CaP nanopartiküllerin *in vitro* deneyleri MCF-7 meme kanser hücre hattı ve L929 fibroblast hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Her iki hücre hattı da %10 FBS + 2 mM Glutamin içeren DMEM-F12 besiyerinde 37°C %5 CO2 koşullarında kültüre edilerek büyütülmüştür. Çalışmada kullanılan sağlıklı MCF-7 ve L929 hücrelerinin invert mikroskop altında 10x faz kontrast görüntüleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



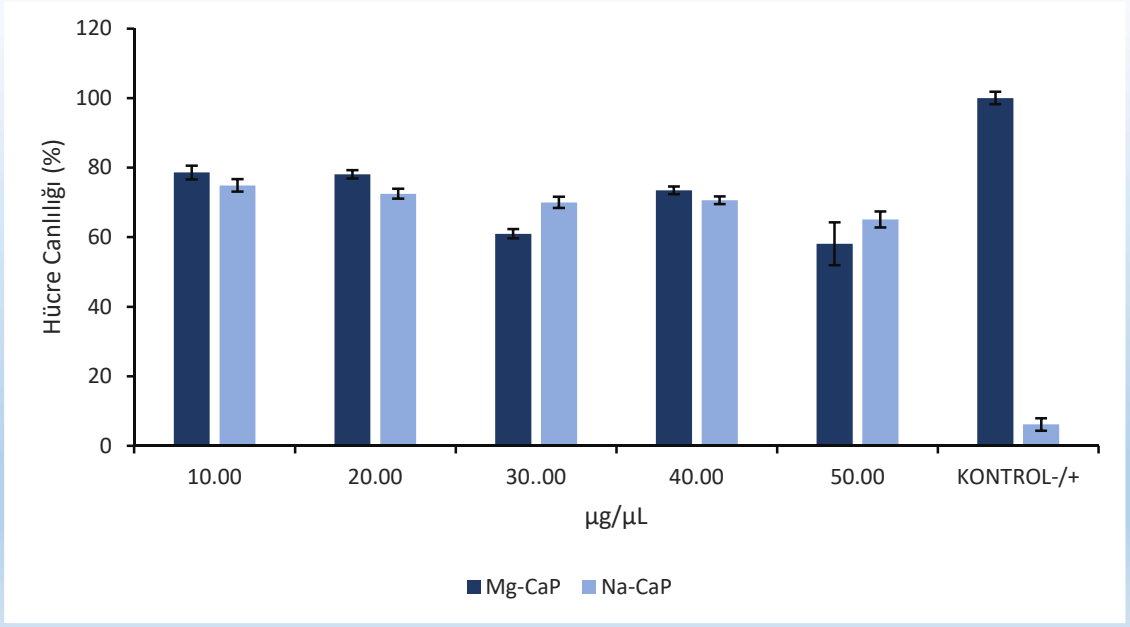
Şekil 4. 7 MCF-7 meme kanser hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü



Şekil 4. 8 L929 fare fibroblast hücrelerinin 10x faz kontrast görüntüsü

4.5 Kalsiyum Fosfat Nanopartikülünün L929 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Magnezyum nitrat ve sodyum sitrat kimyasallarının kullanıldığı iki farklı içeriğe sahip olarak hazırlanan kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin *in vitro* sitotoksisitesi MTT deneyi ile belirlenmiştir. MTT deneyi, L929 fibroblast hücre hattı üzerinde uygulanmıştır. Mg^{+2}-CaP ve Na^{+2}-CaP olarak isimlendirilen nanopartiküller 5 farklı konsantrasyonda (10 µg/µL, 20 µg/µL, 30 µg/µL, 40 µg/µL ve 50 µg/µL) hazırlanarak kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler üzerine hazırlanan nanopartiküller her bir konsantrasyon için 5 tekrar olacak şekilde eklenerek 24 saat boyunca etkileşmesi beklenilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen veriler grafik halinde Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 9 Farklı konsantrasyonlardaki CaP partiküllerinin sitotoksisite analizi

Negatif kontrol grubu DMEM-F12 besiyeri, pozitif kontrol grubu ise %1 DMSO ile oluşturulmuştur. Hücre canlılığı, negatif kontrol grubunun 570 nm'de ölçülen optik absorbans değerine göre hücre canlılık oranının %100 kabul edilmesiyle tespit edilmiştir. MTT analiz sonuçları incelendiğinde; Mg-CaP partiküllerinin hücre canlılığı 10 µg/µL için %78,6 (±2), 20 µg/µL için %78,1 (±1,2), 30 µg/µL için %61 (±1,3), 40 µg/µL için %73,5 (±1,1), 50 µg/µL için %58,1(±6,2) olarak belirlenmiştir. Na-CaP partiküllerinin hücre canlılığı 10 µg/µL için %74,9 (±1,8), 20 µg/µL için

%72,5 (±1,4), 30 µg/µL için %70 (±1,6), 40 µg/µL için %70,6 (±1,1), 50 µg/µL için %65,1 (±2,3) olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, sentezlenen nanopartiküllerin L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi tüm konsantrasyonlar için tolere edilebilir derecede olup, hücre canlılık oranlarının %55'in üzerinde olduğu görülmüştür.

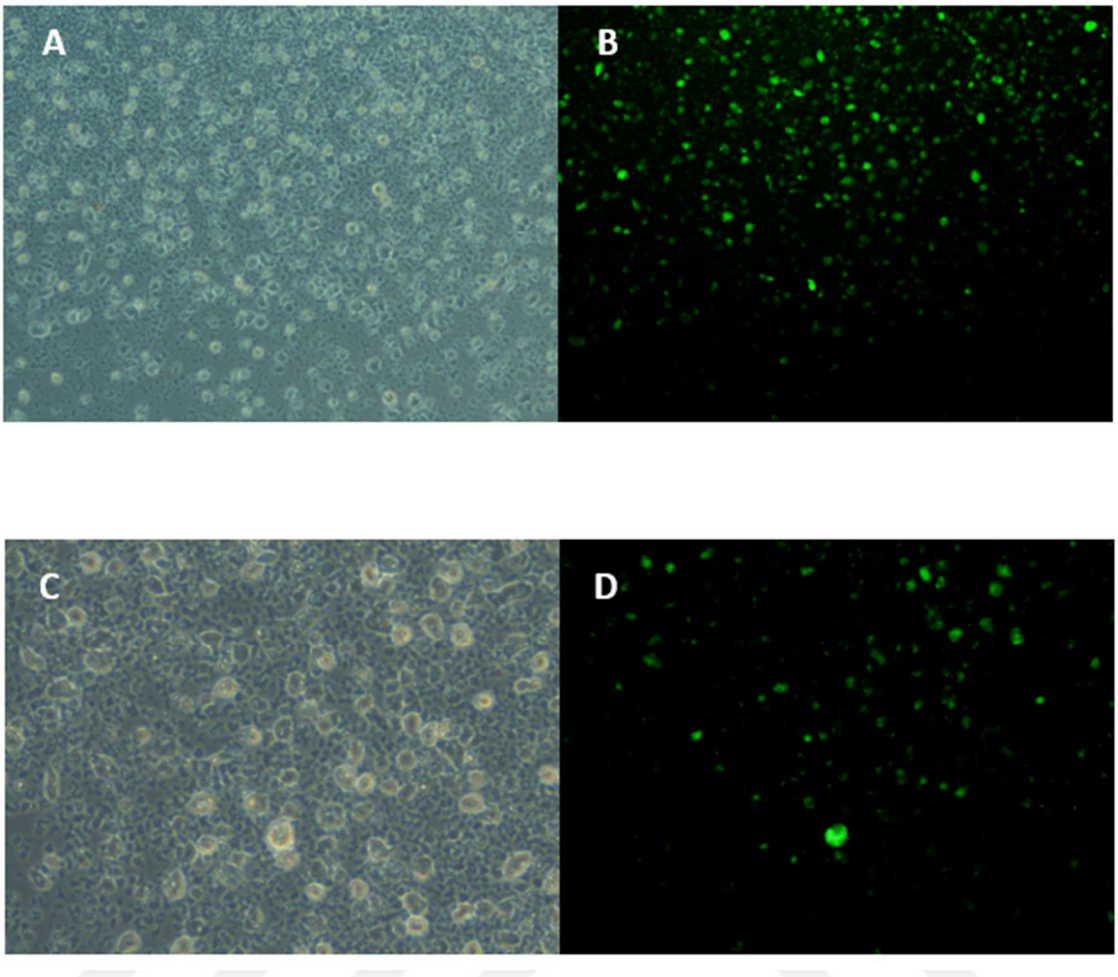
Literatürde 2013 yılında Peetsch ve arkadaşları, gümüş nitrat ve amonyum fosfat içerikli olarak çökeltme metodu ile sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin toksik etkisini memeli ve prokaryot hücreler üzerinde incelemişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan gümüş katkılı kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin hücreler üzerinde tolere edilebilir derecede toksik etki yarattığını fakat saf kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin hücreler üzerinde toksik etkiye neden olmadığını yayınlamışlardır [128]. 2017 yılında Shubhra ve arkadaşlarının yayınladığı bir çalışmaya göre, gen aktarımında kullanılmak üzere sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin, CHO-K1 ve 10T hücreleri üzerindeki canlılık oranlarının ticari olarak satın alınan CaP'ler ile benzerlik gösterdiğini ve toksik etkiye sahip olmadıklarını belirtmişlerdir [129]. 2020 yılında yayınlanan güncel bir çalışmaya göre, Sun ve arkadaşları plazmid DNA'nın transfeksiyon etkinliğini arttırmak üzere bifosfonatla stabilize edilmiş kalsiyum fosfat nanopatikülü (BCP NP) sentezlemişlerdir. Bu çalışmada yer alan bilim insanları, hücre canlılığın tespiti için uygulanan MTT analizi sonuçlarına göre, üretilen kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin oldukça düşük olduğunu beyan etmişlerdir [130].

Literatürde yer alan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, sunulan tez kapsamında sentezlenen kalsiyum fosfat nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlardaki toksik etkisi tolere edilebilir derecede olup, literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. MTT analiz sonuçları değerlendirildiğinde, tez çalışmasının devamı olan pDNA'nın MCF-7 hücrelerine transfeksiyonu 40 µg/40 µL konsantrasyonuna sahip nanopartiküllerle yapılacaktır.

4.6 Plazmid DNA ve Nanopartikül Konjugatının MCF-7 Hücrelerine Transfeksiyonu ve Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Başarılı bir gen aktarımının temelini istenilen gen bölgesinin hedef hücrelere taşıyıcı vektörler yardımıyla aktarılarak, genin hücrede eksprese olması ve istenilen protein ürününün sentezlenmesi oluşturmaktadır. Bu amaçla fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olan taşıyıcı vektörler kullanılarak gen aktarımın gerçekleştiği sayısız çalışma literatürde yer almaktadır. Non viral vektörler, viral vektörlere kıyasla yüksek taşıma kapasitesi ve tolere edilebilir toksisite yönleri bakımından avantaj sağlamaktadır.

Bu çalışmada viral olmayan sentetik kalsiyum fosfat nanopartikülleri kullanılarak IL-6 sitokini kodlayan plazmit DNA'nın MCF-7 kanser hücre hattına transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. Transfeksiyon etkinliği, plazmit DNA içerisinde bulunan GFP raportör gen bölgesinin eksprese olması sonucu saçılan yeşil renkteki ışımanın floresan mikroskop kullanılarak gözlenmesi ile belirlenmiştir. Çalışmada, çıplak DNA ve taşıyıcı vektör ile konjuge edilen plazmit DNA'nın transfeksiyon verimi karşılaştırılmıştır. Transfeksiyon 24 saat boyunca gözlemlenmiş ve transfekte edilen hücrelerin eş zamanlı olarak faz kontrast ve floresan görüntüleri kaydedilmiştir. Her transfeksiyon serisi 3 tekrar şeklinde uygulanmış ve hücrelerin 3 farklı bölgeden görüntüleri alınarak transfeksiyon verim hesabı yapılmıştır. Şekil 4.10'da transfekte edilen MCF-7 hücrelerin 20x objektifle inverted mikroskop kullanılarak 24. saatte çekilmiş faz kontrast ve floresan görüntüleri gösterilmiştir. Çalışma sonucunda transfeksiyon etkinliklerinin pDNA için %24 (±1,7), CaP ile konjuge olan pDNA ise %76 (±2,3) olarak belirlenmiştir. Vektör ile hedefe yönledirilen DNA'nın, çıplak DNA'ya göre transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu görülmüş ve çalışma amacına göre uygun bulunmuştur.



Şekil 4. 10 Transfeksiyon sonrası 24. Saat MCF-7 hücre hattının 20x objektifteki görüntüleri A) Nanopartikül taşıyıcı sistem kullanılarak transfeksiyon faz kontrast görüntüsü B) Nanopartikül taşıyıcı sistem kullanılarak transfeksiyon floresan görüntüsü C) pDNA aracılı transfeksiyon faz kontrast görüntüsü D) pDNA aracılı transfeksiyon floresan görüntüsü

İmmünoterapi alanındaki çalışmalar başta olmak üzere çeşitli gen aktarım sistemlerinde istenilen gen bölgesinin nanopartiküller aracılığıyla hedef hücrelere transfeksiyonu oldukça yaygın bir çalışma konusu olmuş ve olmaya devam etmektedir. Söz konusu çalışma kapsamında viral vektörlere kıyasla güvenlik endişelerine yer vermeyen, düşük toksisiteye sahip ve oldukça kolay üretilebilir olan kalsiyum fosfat nanopartikülleri sentezlenmiş ve çıplak pDNA transfeksiyonuna kıyasla 3 kat daha fazla transfeksiyon verimi elde edilmiştir.

Taşıyıcı vektör kullanılmadan plazmid DNA'nın hücrelere transfekte edilmesinin ardından çıplak DNA'nın hücre içi yolculuğu oldukça karmaşık ve zor olabilmektedir. Çekirdeğe ulaşamadan çeşitli nükleaz aktivisi sebebiyle DNA hızla degredasyona uğrayabilir. Bu da çoğu zaman hedef dokuya aktarılacak olan gen ifadesinin ve transfeksiyon veriminin düşük olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle herhangi bir koruyucu biyomolekül ile ilişiği olmayan olarak ifade edilen çıplak DNA'lar, transfeksiyon ajanı olarak vektörlere ihtiyaç duymaktadırlar. Literatürde bu çalışma kapsamında sayısız örnek bulunmaktadır. Zhou ve arkadaşları, gen aktarımında kullanılmak üzere lipid kaplı kalsiyum fosfat nanopartikülü sentezlemişlerdir. Çıplak DNA ve nano boyutlarda hazırladıkları partiküller ile muamele ettikleri DNA'yı NIH 3T3 hücrelerine transfekte etmişlerdir. Transfeksiyon ajanı olarak kullandıkları kalsiyum fosfat nanopartikülleri aracılığıyla gerçekleşen transfeksiyon veriminin, çıplak DNA'ya kıyasla 24 kat daha fazla olduğu sonucuna ulaşmışlardır [131]. Roy ve arkadaşları, çökeltme metotunu kullanarak elde ettikleri kalsiyum fosfat nanopartikülleri ile *in vitro* ve *in vivo* gen aktarım çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında, raportör geni pSVβgal olan plazmid DNA'sını kullanmışlardır. Farklı vücut dokularında ve albino fareler üzerinde gerçekleştirdikleri transfeksiyon verimini, β-galaktosidaz enzim ifadesinin ölçülmesiyle tespit etmişlerdir. Gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında, çıplak DNA'nın nanopartiküller içerisine hapsedilmiş DNA'ya oranla daha düşük ya da eşdeğer olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sebebini ise, DNA'nın dış ortamdaki Dnaz tarafından bozunabilir olduğu şeklinde açıklamışlardır [132]. Diğer bir çalışma, Bisht ve arkadaşlarının kalsiyum fosfat nanopartikülü ile pUC19, pSVβgal ve pEGFP-N1plazmid DNA'larını HeLa kanser hücrelerine transfeksiyonu olmuştur. Çıplak DNA'nın, vektör tarafından korunmadığı zaman DNaz aktivitesine karşı savunmasız ve degrede olduğunu jel elektroforez yöntemini kullanarak kanıtlamışlardır. CaP NP'nin transfeksiyon veriminin, standart transfekte edici reaktif olan Polyfect ve çıplak DNA'dan daha yüksek olduğunu yayınlamışlardır [133]. Sunulan tez çalışmasında elde edilen tüm veriler ve analizler doğrultusunda, sonuçların literatürdeki çalışmalar ile paralellik göstermesi bakımından doğruluğu ve vektör aracılığıyla gerçekleşen transfeksiyon veriminin çıplak DNA'ya göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKÇA

[1] Z. Momenimovahed, "Bctt-11-151.Pdf," *Breast Cancer - Targets Ther.*, vol. II, pp. 151–164, 2019.

[2] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2020," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, 2020, doi: 10.3322/caac.21590.

[3] J. Couzin-Frankel, "Cancer immunotherapy." American Association for the Advancement of Science, 2013.

[4] S. Tan, D. Li, and X. Zhu, "Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 124, no. December 2019, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.109821.

[5] T. Schlake, A. Thess, M. Thran, and I. Jordan, "mRNA as novel technology for passive immunotherapy," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 2, pp. 301–328, 2019, doi: 10.1007/s00018-018-2935-4.

[6] T. Wang, J. R. Upponi, and V. P. Torchilin, "Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies," *Int. J. Pharm.*, vol. 427, no. 1, pp. 3–20, 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.013.

[7] H. Tian, J. Chen, and X. Chen, "Nanoparticles for gene delivery," *Small*, vol. 9, no. 12, pp. 2034–2044, 2013, doi: 10.1002/smll.201202485.

[8] X. Xu, Z. Li, X. Zhao, L. Keen, and X. Kong, "Calcium phosphate nanoparticles-based systems for siRNA delivery," *Regen. Biomater.*, vol. 3, no. 3, pp. 187–195, 2016, doi: 10.1093/RB/RBW010.

[9] American Cancer Society, "American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin," *Phytochemicals*. 2000.

[10] E. Atici, "Tip tarihinde kanser ve lösemi," *Turk Onkol. Derg.*, vol. 22, no. 4, pp. 197–204, 2007.

[11] V. K. Chaturvedi, A. Singh, V. K. Singh, and M. P. Singh, "Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy," *Curr. Drug Metab.*, vol. 20, no. 6, pp. 416–429, 2018, doi: 10.2174/1389200219666180918111528.

[12] W.H.Organisation, "No Title," *Online*. www.https://www.who.int/cancer/en/ (accessed Apr. 11, 2021).

[13] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, 2018, doi: 10.3322/caac.21492.

[14] R. A. Weinberg, *The biology of cancer*. Garland science, 2013.

[15] G. M. Cooper and R. E. Hausman, *The cell: a molecular approach*. 2004.

[16] O. Baykara, "Current Modalities in Treatment of Cancer," *Balıkesır Heal. Sci. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 154–165, 2016, doi: 10.5505/bsbd.2016.93823.

[17] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.

[18] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

[19] W.H.Organisation, “No Title,” *Online*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer (accessed Apr. 12, 2021).

[20] M. Kamińska, T. Ciszewski, K. Łopacka-Szatan, P. Miotła, and E. Starosławska, “Breast cancer risk factors,” *Prz. Menopauzalny*, vol. 14, no. 3, pp. 196–202, 2015, doi: 10.5114/pm.2015.54346.

[21] S. Vaccarella *et al.*, “Reducing Social Inequalities in Cancer: Setting Priorities for Research,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 5, pp. 324–326, 2018, doi: 10.3322/caac.21463.

[22] Y. Romero *et al.*, “National cancer control plans: a global analysis,” *Lancet Oncol.*, vol. 19, no. 10, pp. e546–e555, 2018, doi: 10.1016/S1470-2045(18)30681-8.

[23] M. Mutebi *et al.*, “Breast cancer treatment: A phased approach to implementation,” *Cancer*, vol. 126, no. S10, pp. 2365–2378, 2020, doi: 10.1002/cncr.32910.

[24] R. Sullivan *et al.*, “Global cancer surgery: Delivering safe, affordable, and timely cancer surgery,” *Lancet Oncol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1193–1224, 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00223-5.

[25] O. Baykara, *Current therapies and latest developments in cancer treatment*, vol. 8, no. 4. 2015.

[26] B. Barbaros and M. Dİkmen, “Kanser İmmünoterapisi Key Words :,” *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, vol. 31, no. 4, pp. 177–181, 2015, [Online]. Available: http://dergipark.gov.tr/download/article-file/235978.

[27] A. Çelik, “Radyoterapi Sonucu Gelişen Yan Etkiler Ve Hemşirelik Yaklaşımı,” *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, vol. 3, no. 3, pp. 933–947, 2014.

[28] H. Iwata *et al.*, “Validation of the 21-gene test as a predictor of clinical response to neoadjuvant hormonal therapy for ER+, HER2-negative breast cancer: the TransNEOS study,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 173, no. 1, pp. 123–133, 2019, doi: 10.1007/s10549-018-4964-y.

[29] C. David and T. Boinet, “Hormone therapy for prostate cancer,” *Actual. Pharm.*, vol. 58, no. 583, pp. 13–17, 2019, doi: 10.1016/j.actpha.2018.12.003.

[30] M. J. Carlson, K. W. Thiel, and K. K. Leslie, “Past, present, and future of hormonal therapy in recurrent endometrial cancer,” *Int. J. Womens. Health*, vol. 6 ., no. 1, pp. 429–435, 2014, doi: 10.2147/IJWH.S40942.

[31] N.C. Institute, “No Title,” *Online*. https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy.

[32] S. J. Oiseth and M. S. Aziz, “Cancer immunotherapy : a brief review of the history , possibilities , and challenges ahead,” 2017, doi: 10.20517/2394-4722.2017.41.

[33] X. Lei *et al.*, "Immune cells within the tumor microenvironment : Biological functions and roles in cancer immunotherapy," *Cancer Lett.*, vol. 470, no. July 2019, pp. 126–133, 2020, doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.009.

[34] W. B. Coley, "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 105, no. 6, p. 487, 1893.

[35] E. F. McCarthy, "The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas.," *Iowa Orthop. J.*, vol. 26, pp. 154–158, 2006.

[36] Y. Yang, "Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 9, pp. 3335–3337, 2015, doi: 10.1172/JCI83871.

[37] G. P. Dunn, L. J. Old, R. D. Schreiber, S. Louis, F. M. Burnet, and L. Thomas, "of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting," vol. 21, pp. 137–148, 2004.

[38] M. Abbott and Y. Ustoyev, "Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy," *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 35, no. 5, p. 150923, 2019, doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.002.

[39] E. Onur, A. Nalbantsoy, and D. Kışla, "Immunotherapy and Potential Use of Propolis in Cancer Immunotherapy," *Food Heal.*, vol. 4, no. 4, pp. 231–246, 2018, doi: 10.3153/fh18023.

[40] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Control of adaptive immunity by the innate immune system," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 4, pp. 343–353, 2015, doi: 10.1038/ni.3123.

[41] G. Aslan, "Tümör İmmünolojisi," *Turk J Immunol*, vol. 15, no. 1, pp. 7–13, 2010, [Online]. Available: file:///Users/aylingokhan/Documents/Mendeley Desktop/Dal - Unknown - Tümör İmmünolojisi.pdf.

[42] F. Souza-Fonseca-Guimaraes, J. Cursons, and N. D. Huntington, "The Emergence of Natural Killer Cells as a Major Target in Cancer Immunotherapy," *Trends Immunol.*, vol. 40, no. 2, pp. 142–158, 2019, doi: 10.1016/j.it.2018.12.003.

[43] C. Guillerey, N. D. Huntington, and M. J. Smyth, "Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy," *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1025–1036, 2016, doi: 10.1038/ni.3518.

[44] M. SÖNMEZ, "Dendritik Hücre İmmünobiyolojisi," *Karadeniz Tek. Üniversitesi, Temel moleküler Hematol. kursu*.

[45] B. M. Hall, "T cells: Soldiers and spies—the surveillance and control of effector T cells by regulatory T cells," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 11, pp. 2050–2064, 2015, doi: 10.2215/CJN.06620714.

[46] B. G. Saruhan *et al.*, "Lenfosit Çeşitleri ve İmmun Sistemdeki Görevleri Özet ışık mikroskobunda ayır t edilemeyen Elektron mikroskobik olarak bu hücreler çok," vol. 1, no. 3, pp. 41–48.

[47] R. Kokate, "A Systematic Overview of Cancer Immunotherapy : An Emerging Therapy A Systematic Overview of Cancer Immunotherapy : An Emerging Therapy," no. March, 2017, doi: 10.15406/ppij.2017.05.00112.

[48] M. Sambi, L. Bagheri, and M. R. Szewczuk, “Current Challenges in Cancer Immunotherapy : Multimodal Approaches to Improve Efficacy and Patient Response Rates,” vol. 2019, 2019.

[49] K. Kaur and G. L. Khatik, “Cancer Immunotherapy: An Effective Tool in Cancer Control and Treat- ment,” no. 144411, pp. 62–69, 2020, doi: 10.2174/1573394715666190913184853.

[50] N. Taefehshokr, B. Baradaran, A. Baghbanzadeh, and S. Taefehshokr, “Immunobiology Promising approaches in cancer immunotherapy,” *Immunobiology*, vol. 225, no. 2, p. 151875, 2020, doi: 10.1016/j.imbio.2019.11.010.

[51] K. Esfahani, L. Roudaia, N. Buhlaiga, S. V. Del Rincon, and N. Papneja, “A review of cancer immunotherapy : from the past , to the present , to the future,” vol. 27, no. April, pp. 87–97, 2020.

[52] M. J. Smyth and M. W. L. Teng, “2018 Nobel Prize in physiology or medicine,” *Clin. Transl. Immunol.*, vol. 7, no. 10, pp. 2–5, 2018, doi: 10.1002/cti2.1041.

[53] S. Khan and D. E. Gerber, “Autoimmunity, checkpoint inhibitor therapy and immune-related adverse events: A review,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 64, no. January 2019, pp. 93–101, 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.06.012.

[54] C. Minichsdorfer, C. Wasinger, E. Sieczkowski, B. Atil, and M. Hohenegger, “Tocilizumab unmasks a stage-dependent interleukin-6 component in statin-induced apoptosis of metastatic melanoma cells,” *Melanoma Res.*, vol. 25, no. 4, p. 284, 2015.

[55] W. Li *et al.*, “Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis,” *J. Toxicol. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 417–428, 2016.

[56] B. M. BALKAN, G. KISMALI, D. TURAN, A. B. BALKAN, and S. E. L. Tevhide, “IL-6 İlavesi HEPG2 Hücrelerinde Kaspaz Aktivitelerini Nasıl Etkiler?,” *Mehmet Akif Ersoy Univ. J. Heal. Sci. Inst.*, vol. 5, no. 2, pp. 85–92, 2019.

[57] G. Alatrash, H. Jakher, P. D. Stafford, and E. A. Mittendorf, “Cancer immunotherapies, their safety and toxicity,” *Expert Opin. Drug Saf.*, vol. 12, no. 5, pp. 631–645, Sep. 2013, doi: 10.1517/14740338.2013.795944.

[58] T. A. Waldmann, “Cytokines in cancer immunotherapy,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 12, pp. 1–24, 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a028472.

[59] T. Rusch, J. Bayry, J. Werner, I. Shevchenko, and A. V Bazhin, “Immunotherapy as an Option for Cancer Treatment,” *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).*, vol. 66, no. 2, pp. 89–96, 2018, doi: 10.1007/s00005-017-0491-5.

[60] C. L. Ventola, “Cancer Immunotherapy , Part 1 : Current Strategies and Agents,” vol. 42, no. 6, pp. 375–383, 2017.

[61] J. S. O’Donnell, M. W. L. Teng, and M. J. Smyth, “Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 3, pp. 151–167, 2019, doi: 10.1038/s41571-018-0142-8.

[62] R. A, D. B, and Ö. F, “Gen tedavisinin temel ilkeleri ve son gelişmeler,” *Ege Tıp*

Derg., vol. 53, no. 4, pp. 231–240, 2014, doi: 10.19161/etd.344096.

[63] A. Mountain, "Gene therapy: The first decade," *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 119–128, 2000, doi: 10.1016/S0167-7799(99)01416-X.

[64] A. Attar, "Gen terapisi yöntemleri: Fiziksel ve kimyasal metotlar," *Turk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, vol. 74, no. 1, pp. 103–112, 2017, doi: 10.5505/TurkHijyen.2016.43255.

[65] T. Wirth, N. Parker, and S. Ylä-herttuala, "History of gene therapy," *Gene*, vol. 525, no. 2, pp. 162–169, 2013, doi: 10.1016/j.gene.2013.03.137.

[66] R. M. Blaese *et al.*, "T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID : Initial Trial Results After 4 Years," no. 18.

[67] R. Tang and Z. Xu, "Gene therapy: a double-edged sword with great powers," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 474, no. 1–2, pp. 73–81, 2020, doi: 10.1007/s11010-020-03834-3.

[68] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, and M. R. Abedi, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update," *J. Gene Med.*, vol. 20, no. 5, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1002/jgm.3015.

[69] R. Mohammadinejad *et al.*, "In vivo gene delivery mediated by non-viral vectors for cancer therapy," *J. Control. Release*, vol. 325, no. June, pp. 249–275, 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.038.

[70] C. S. Katragadda, P. K. Choudhury, and P. N. Murthy, "Nanoparticles as non-viral gene delivery vectors," *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 44, no. 2, pp. 109–120, 2010.

[71] P. Chang, *Somatic gene therapy*. CRC Press., 2018.

[72] R. B. Sciences, R. De Melo, and A. Paiva, "Gene therapy : advances , challenges and perspectives," vol. 15, no. 3, pp. 369–375, 2017, doi: 10.1590/S1679-45082017RB4024.

[73] K. Bulaklak and C. A. Gersbach, "The once and future gene therapy," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 11–14, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19505-2.

[74] M. Ramamoorth and A. Narvekar, "Non viral vectors in gene therapy - An overview," *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 9, no. 1, pp. GE01–GE06, 2015, doi: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394.

[75] N. Nayerossadat, "Viral and nonviral delivery systems for gene delivery," *Adv. BİOMEDİCAL Res.*, 2012.

[76] Y. K. Sung and S. W. Kim, "Recent advances in the development of gene delivery systems," *Biomater. Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2019, doi: 10.1186/s40824-019-0156-z.

[77] M. Finer and J. Glorioso, "A brief account of viral vectors and their promise for gene therapy," *Gene Ther.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–2, 2017, doi: 10.1038/gt.2016.71.

[78] P. D. Robbins and S. C. Ghivizzani, "Viral vectors for gene therapy," *Pharmacol. Ther.*, vol. 80, no. 1, pp. 35–47, 1998, doi: 10.1016/S0163-7258(98)00020-5.

[79] W. Walther and U. Stein, "Viral Vectors for Gene Transfer," *Drugs*, vol. 60, no.

2, pp. 249–271, 2000, doi: 10.2165/00003495-200060020-00002.

[80] A. G. Özcan, "Gen tedavisi ve biyogüvenlik," *Türk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.*, vol. 64, no. 1, pp. 35–50, 2007.

[81] A. N. Lukashev and A. A. Zamyatnin, "Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives," *Biochem.*, vol. 81, no. 7, pp. 700–708, 2016, doi: 10.1134/S0006297916070063.

[82] M. Giacca and S. Zacchigna, "Virus-mediated gene delivery for human gene therapy," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 377–388, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.008.

[83] D. Stone, "Novel viral vector systems for gene therapy," *Viruses*, vol. 2, no. 4, pp. 1002–1007, 2010, doi: 10.3390/v2041002.

[84] T. B. Lentz, S. J. Gray, and R. J. Samulski, "Viral vectors for gene delivery to the central nervous system," *Neurobiol. Dis.*, vol. 48, no. 2, pp. 179–188, 2012, doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.014.

[85] M. F. Naso, B. Tomkowicz, W. L. Perry, and W. R. Strohl, "Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy," *BioDrugs*, vol. 31, no. 4, pp. 317–334, 2017, doi: 10.1007/s40259-017-0234-5.

[86] L. S. Young, P. F. Searle, D. Onion, and V. Mautner, "Viral gene therapy strategies: From basic science to clinical application," *J. Pathol.*, vol. 208, no. 2, pp. 299–318, 2006, doi: 10.1002/path.1896.

[87] W. F. Goins, B. Hall, J. B. Cohen, and J. C. Glorioso, "Retargeting of herpes simplex virus (HSV) vectors," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 21, pp. 93–101, 2016, doi: 10.1016/j.coviro.2016.08.007.

[88] D. S. Latchman, "Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors," *Gene*, vol. 264, no. 1, pp. 1–9, 2001, doi: 10.1016/S0378-1119(01)00322-5.

[89] R. Jahanban-Esfahlan *et al.*, "Toll-like receptors as novel therapeutic targets for herpes simplex virus infection," *Rev. Med. Virol.*, vol. 29, no. 4, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1002/rmv.2048.

[90] A. V. Oliveira, A. M. Rosa da Costa, and G. A. Silva, "Non-viral strategies for ocular gene delivery," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 1275–1289, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.04.068.

[91] E. Harris and J. J. Elmer, "Optimization of electroporation and other non-viral gene delivery strategies for T cells," *Biotechnol. Prog.*, no. August, 2020, doi: 10.1002/btpr.3066.

[92] X. Du *et al.*, "Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation," *Drug Deliv.*, vol. 25, no. 1, pp. 1516–1525, 2018, doi: 10.1080/10717544.2018.1480674.

[93] F. L. and T. M. C. Susan Yung, "Technological Advances in Peritoneal," *Perit. Dial. Int.*, vol. 26, no. September 2005, pp. 292–299, 2006.

[94] M. Jakutavičiūtė, P. Ruzgys, M. Tamošiūnas, M. Maciulevičius, and S. Šatkauskas, "Physical methods for drug and gene delivery through the cell plasma membrane," *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, vol. 227, pp. 73–92, 2017,

doi: 10.1007/978-3-319-56895-9_5.

[95] M. Alsaggar and D. Liu, *Physical Methods for Gene Transfer*, vol. 89. Elsevier Ltd, 2015.

[96] Z. Fan and C. X. Deng, "Therapeutic Delivery," vol. 5, pp. 467–486, 2014.

[97] L. Rinaldi *et al.*, "Sonoporation by microbubbles as gene therapy approach against liver cancer," vol. 9, no. 63, pp. 32182–32190, 2018.

[98] D. Press, "Docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-triggered microbubble destruction for targeted tumor therapy in MHCC-H cells," pp. 4763–4771, 2016.

[99] S. Lakshmanan *et al.*, "Physical energy for drug delivery; poration, concentration and activation," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 71, pp. 98–114, 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.05.010.

[100] H. Schneckenburger, "Laser-assisted optoporation of cells and tissues – a mini-review," *Biomed. Opt. Express*, vol. 10, no. 6, p. 2883, 2019, doi: 10.1364/boe.10.002883.

[101] A. J. Mellott, M. L. Forrest, and M. S. Detamore, "Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 41, no. 3, pp. 446–468, 2013, doi: 10.1007/s10439-012-0678-1.

[102] T. Niidome and L. Huang, "Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors," *Gene Ther.*, vol. 9, no. 24, pp. 1647–1652, 2002, doi: 10.1038/sj.gt.3301923.

[103] E. Keles, Y. Song, D. Du, W. J. Dong, and Y. Lin, "Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications," *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 1291–1309, 2016, doi: 10.1039/c6bm00441e.

[104] M. Incoronato, "Nanoparticle-based strategies for cancer immunotherapy and immunodiagnostics," 2017.

[105] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles : Properties , applications and toxicities," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.

[106] R. A. Saman and M. Iqbal, "Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems : Past , Present and Future," pp. 175–185, 2012.

[107] R. Khalifehzadeh and H. Arami, "Biodegradable calcium phosphate nanoparticles for cancer therapy," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 279, p. 102157, 2020, doi: 10.1016/j.cis.2020.102157.

[108] V. Sokolova *et al.*, "Synthesis and characterization of DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles," *Materwiss. Werksttech.*, vol. 37, no. 6, pp. 441–445, 2006, doi: 10.1002/mawe.200600017.

[109] M. A. Khan, V. M. Wu, S. Ghosh, and V. Uskoković, "Gene delivery using calcium phosphate nanoparticles: Optimization of the transfection process and the effects of citrate and poly(l-lysine) as additives," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 471, pp. 48–58, 2016, doi: 10.1016/j.jcis.2016.03.007.

[110] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, and A. B. Yu, "Inorganic nanoparticles as carriers

for efficient cellular delivery," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, no. 3, pp. 1027–1040, 2006, doi: 10.1016/j.ces.2005.06.019.

[111] E. V. Giger, J. Puigmartí-Luis, R. Schlatter, B. Castagner, P. S. Dittrich, and J. C. Leroux, "Gene delivery with bisphosphonate-stabilized calcium phosphate nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 150, no. 1, pp. 87–93, 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.012.

[112] M. Banik and T. Basu, "Calcium phosphate nanoparticles: A study of their synthesis, characterization and mode of interaction with salmon testis DNA," *Dalt. Trans.*, vol. 43, no. 8, pp. 3244–3259, 2014, doi: 10.1039/c3dt52522h.

[113] D. K. KHOSRAVI, M. R. Mozafari, L. Rashidi, and M. Mohammadi, "Calcium based non-viral gene delivery: an overview of methodology and applications," 2010.

[114] V. Sokolova and M. Epple, "Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 8, pp. 1382–1395, 2008, doi: 10.1002/anie.200703039.

[115] D. R. J. Verboogen, N. H. Revelo, M. Ter Beest, and G. Van Den Bogaart, "Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes," *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 144–157, 2018, doi: 10.1093/jmcb/mjy038.

[116] J. Katić, M. Metikoš-Huković, and R. Babić, "Synthesis and characterization of calcium phosphate coatings on Nitinol," *J. Appl. Electrochem.*, vol. 44, no. 1, pp. 87–96, 2014, doi: 10.1007/s10800-013-0604-8.

[117] E. H. Chowdhury, M. Kunou, M. Nagaoka, A. K. Kundu, T. Hoshiba, and T. Akaike, "High-efficiency gene delivery for expression in mammalian cells by nanoprecipitates of Ca-Mg phosphate," *Gene*, vol. 341, no. 1–2, pp. 77–82, 2004, doi: 10.1016/j.gene.2004.07.015.

[118] C. E. Pedraza, D. C. Bassett, M. D. McKee, V. Nelea, U. Gbureck, and J. E. Barralet, "The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection," *Biomaterials*, vol. 29, no. 23, pp. 3384–3392, 2008.

[119] C. Wu *et al.*, "Application of a lipid-coated hollow calcium phosphate nanoparticle in synergistic Co-delivery of doxorubicin and paclitaxel for the treatment of human lung cancer A549 cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 7979–7992, 2017, doi: 10.2147/IJN.S140957.

[120] J. Li, Y. C. Chen, Y. C. Tseng, S. Mozumdar, and L. Huang, "Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery," *J. Control. Release*, vol. 142, no. 3, pp. 416–421, 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.11.008.

[121] R. Khalifehzadeh and H. Arami, "DNA-Templated Strontium-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles for Gene Delivery in Bone Cells," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 5, no. 7, pp. 3201–3211, 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01587.

[122] S. Kollenda *et al.*, "A pH-sensitive fluorescent protein sensor to follow the pathway of calcium phosphate nanoparticles into cells," *Acta Biomater.*, vol. 111, pp. 406–417, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.05.014.

[123] R. V. Chernozem *et al.*, "Functionalization of titania nanotubes with electrophoretically deposited silver and calcium phosphate nanoparticles: Structure, composition and antibacterial assay," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 97, no. December 2018, pp. 420–430, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.12.045.

[124] V. Sokolova *et al.*, "Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 6, 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0910-9.

[125] Y. Liu *et al.*, "An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 6, pp. 721–727, 2011, doi: 10.2147/ijn.s17096.

[126] C. M. Hoo, N. Starostin, P. West, and M. L. Mecartney, "A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 10, no. SUPPL. 1, pp. 89–96, 2008, doi: 10.1007/s11051-008-9435-7.

[127] S. Mohiyuddin, S. Naqvi, and G. Packirisamy, "Enhanced antineoplastic/therapeutic efficacy using 5-fluorouracil-loaded calcium phosphate nanoparticles," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, no. 1, pp. 2499–2515, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.233.

[128] A. Peetsch *et al.*, "Silver-doped calcium phosphate nanoparticles: Synthesis, characterization, and toxic effects toward mammalian and prokaryotic cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 102, pp. 724–729, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.09.040.

[129] Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, and H. Tsurushima, "Calcium phosphate nanoparticles prepared from infusion fluids for stem cell transfection: Process optimization and cytotoxicity analysis," *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 5, pp. 972–981, 2017, doi: 10.1039/c6bm00870d.

[130] B. Sun, M. Gillard, Y. Wu, P. Wu, Z. P. Xu, and W. Gu, "Bisphosphonate Stabilized Calcium Phosphate Nanoparticles for Effective Delivery of Plasmid DNA to Macrophages," *ACS Appl. Bio Mater.*, 2020, doi: 10.1021/acsabm.9b00994.

[131] C. Zhou *et al.*, "Lipid-coated nano-calcium-phosphate (LNCP) for gene delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 392, no. 1–2, pp. 201–208, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.012.

[132] I. Roy, S. Mitra, A. Maitra, and S. Mozumdar, "Calcium phosphate nanoparticles as no v el non- v iral v ectors for targeted gene deli v ery," vol. 250, no. v, pp. 25–33, 2003.

[133] S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra, and A. Maitra, "pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles : highly efficient non-viral vector for gene delivery," vol. 288, pp. 157–168, 2005, doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.035.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Genç S., Laçin NT, "Kalsiyum Fosfat Nanopartikülü Kullanılarak MCF-7 Kanser Hücre Hattının IL-6 Sitokini ile Etiketlenmesi", 5. Uluslararası Erciyes Bilimsel Araştırmalar Kongresi, Kayseri, Türkiye, 16-17 Nisan 2021, ss 150-151.

Projeler

1. BAP, Proje No: FYL-2020-3773, Türkoğlu LN, Genç S., MCF-7 Kanser Hücre Hattının IL-6 Sitokini ile Etiketlenmesi. 2020-Süresi: 12 ay