

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

siRNA İLETİMİ İÇİN LAZER ABLASYON YÖNTEMİ
KULLANILARAK POLİETİLENİMİN İLE KAPLANMIŞ
ALTIN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ

DURUKAN ŞAHİNGÖZ

HAZİRAN, 2018

Biyomühendislik Anabilim Dalında Durukan ŞAHİNGÖZ tarafından hazırlanan siRNA İLETİMİ İÇİN LAZER ABLASYON YÖNTEMİ KULLANILARAK POLİETİLENİMİN İLE KAPLANMIŞ ALTIN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
(Anabilim Dalı Başkanı)

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN
(Danışman)

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Leyla AÇIK _____
Üye (Danışman) : Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN _____
Üye : Prof. Dr. Mustafa TÜRK _____
..... /..... /.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
(Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü)

ÖZET

siRNA İLETİMİ İÇİN LAZER ABLASYON YÖNTEMİ KULLANILARAK POLİETİLENİMİN İLE KAPLANMIŞ ALTIN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ

ŞAHİNGÖZ, Durukan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Haziran, 2018, 59

Hücrelere gen aktarımı son zamanlarda sıklıkla artan çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Özellikle siRNA' nın aktarımı bu olaylarda başı çekmektedir. DNA-temelli terapötikler, plazmid içerisinde, antisens oligonukleotidler ve küçük RNA parçaları (siRNA) olarak uygulanmaktadır. Gen terapisi, genetik temeli bulunan hastalıkların tedavisinde stratejiler geliştirmek için kullanılan ve günümüzde tedavisi olmayan hastalıklar için umut vaat eden bir yöntemdir. Başarılı bir gen terapisi, ilgili transgenlerin hedeflenmiş hücrelere transfeksiyonunu gerektirir. Dolayısıyla gen terapisinin iyileştirici etkisi büyük ölçüde uygun gen sağlama vektörlerinin mevcudiyetine bağlıdır. Viral gen sağlama vektörleri yüksek verimlidir fakat hem immünojeniteye hem de sitotoksositeye sahiptir. Nonviral gen dağıtım vektörleri, hem düşük toksisite hem de düşük immünojenite gösterdikleri için giderek daha fazla ilgi görmektedir. Geniş nanopartikül türleri arasında soy metal nanopartiküller son yıllarda özellikle yüzeyel plasmon rezonansı (SPR) da dahil olmak üzere biyoyumluluk ve eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ötürü altın nanopartikül (AuNP)' lere önem vermişlerdir. Son zamanlarda, sıvı fazda bir altın hedefin darbeli lazer ablasyonu, çoğunlukla kimyasal indirgeme yöntemi ile üretilirken AuNP' leri sentezlemek için çekici bir alternatif olarak benimsenmiştir.

Bu çalışmanın amacı hastalıkların tedavisinde kullanılan ve gen susturma işlemleri için gerekli olan siRNA' yı Polietilenimin (PEI) ile modifiye edilmiş AuNP' ler ile birleştirerek, siRNA iletimi için bir yaklaşım oluşturmaktır. Bu tez kapsamında

yapılan işlemler başlıca dört aşamadan oluşmaktadır; İlk bölümde farklı konsantrasyonlarda (%1, %2, %5) PEI çözeltisi hazırlanmış, ikinci kısımda hazırlanan PEI çözeltisi içerisinde lazer ablasyon yöntemi ile altın nanopartiküller üretilmiştir. Üçüncü kısımda üretilen altın nanopartiküllerin Zeta-Sizer cihazıyla boyutlarına ve zeta potansiyellerine bakılmıştır. Ayrıca FTIR spektroskopisi yapılmış ve nanopartiküller karakterize edilmiştir. Dördüncü ve son kısımda farklı oranlardaki AuNP/PEI/İF kompleksleri ile farklı oranlardaki (100 nM, 200 nM) siRNA bağlanmaya çalışılmıştır. Bağlanıp bağlanmadıklarını anlamak için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır ve ultraviyole (UV) ışınları altında gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre AuNP'lerimizin katyonik özellikte olduğu gösterilmiştir. Ayrıca boyut analizlerinin de 100 nm'nin altında olduğu belirlenmiştir. FTIR testi ile PEI/AuNP kompleksinin birbirine bağlandıkları, agaroz jel elektroforezi ile de siRNA ile birleşmenin sağlandığı ve hücreye aktarılma aşamasına hazır hale getirilen bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir.

siRNA'nın kanser tedavisinde PEI/AuNP/İF kompleksleri ile birlikte kullanılabileceği ilk kez yapılan bu tez çalışması ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Altın nanopartikül (AuNP), gen iletimi, ipek fibroin, lazer ablasyon, polietilenimin (PEI), siRNA

ABSTRACT

PRODUCTION OF GOLD NANOPARTICLES CAPPED WITH POLYETHYLENEİMİNE USING LASER ABLATION METHOD FOR SİRNA DELİVERY

ŞAHİNGÖZ, Durukan

Kırıkkale University

Graduate Scholl of Natural and Applied Sciences Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

HAZİRAN, 2018, 59 pages

The gene transfer to the cells is the basis for the studies that have been increasing in recent times. Especially the transfer of siRNA is leading to these events. DNA-based therapeutics are carried out in the plasmid as antisense oligonucleotides and small RNA fragments (siRNA). Gene therapy is a promising method for developing strategies in the treatment of genetically-based diseases and is currently a non-therapeutic disease. Successful gene therapy requires transfection of the relevant transgenes into targeted cells. Thus, the therapeutic effect of gene therapy depends on the availability of large quantities of appropriate gene delivery vectors. Viral gene delivery vectors are highly efficient but have both immunogenicity and cytotoxicity. Nonviral gene distribution vectors are increasingly attracted to both low toxicity and low immunogenicity. Among the broad types of nanoparticles, noble metal nanoparticles have recently gained attention for gold nanoparticles (AuNP) due to their biocompatibility and unique physical and chemical properties, especially including superficial plasmon resonance (SPR). Recently, pulsed laser ablation of a gold target in the liquid phase has been adopted as an attractive alternative to synthesizing AuNPs, often produced by chemical reduction.

The aim of this study is to create an approach for siRNA delivery by combining the siRNA, which is used in the treatment of disease and for gene silencing, with AuNPs

modified with Polyethyleneimine (PEI). The processes carried out within the scope of this thesis mainly consist of four phases; In the first section, PEI solution was prepared at different concentrations (1%, 2%, 5%) and gold nanoparticles were produced by the laser ablation method in the PEI solution prepared in the second part. The gold nanoparticles produced in the third part were examined with their Zeta-Sizer device for their size and zeta potential. In addition, FTIR spectroscopy was performed and the nanoparticles were characterized. In the fourth and last section, different ratios of (100 nM, 200 nM) siRNAs were tried to bind with different proportions of AuNP / PEI / IF complexes. Agarose gel electrophoresis was performed to observe whether they were connected and observed under ultraviolet (UV) light.

According to the results obtained, our AuNPs have been shown to be cationic. It was also determined that size analyzes were below 100 nm. It has been shown that the FTIR assay binds PEI/AuNP complexes, is coupled with siRNA by agarose gel electrophoresis and is a carrier system ready for transfection.

This is the first time that siRNA can be used in combination with PEI / AuNP / IF complexes in the treatment of cancer.

Key Words: gold nanoparticles (AuNP), gene delivery, silk fibroin, laser ablation, polyethylenimine (PEI), siRNA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım başladığı günden bugüne kadar tüm tecrübelerini benimle paylaşan, her fırsatta yardımcı olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN'e

Yüksek lisans tezim boyunca çalışmalarımın büyük kısmında bana destek ve deneyimlerini veren Yrd. Doç. Dr. Ömer AKTÜRK'e

Yüksek Lisans hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sunan, her anlamda yanımda olan, gece gündüz fark etmeksizin hastalandığımda ilgilenen, acıktığımda karnımı doyuran, beni bir dost bilip, büyüklüğü ve dostluğu öğreten, her zaman yanımda olmasını istediğim değerli büyüğüm ve abim Ahmet BÜYÜKASLAN'a

Sıcak gülümsemesiyle her zaman içimi ısıtan, bana hep bir ana kucağı olan halam Zakire Sultan'a

Beni her konuda destekleyen, dualarını benden esirgemeyen değerli ablam Ayseren'e

Her Çarşamba kahrımı çeken, tecrübeleriyle tecrübelendiren, insanlık sıfatlarıyla bana güven veren ve gerçek insan olma yolunu çizen, her fırsatta desteklerini esirgemeyen başta Uysal ÖNDER olmak üzere bütün Anlayış Kümesi'ne

Okuldaki bölüm sorumlusundan daha çok abim, arkadaşım, her konuda bana yardımcı olan Sayın Hasan ULUYOL'a

Yeri gelip zorlayan yeri gelip heyecanlandıran bu çalışma boyunca 24 saat aklıma estiğinde aradığım, kahrımı çeken değerli dostlarım Osman ŞAHİNGÖZ, Yusuf YALÇINSOY, Yunus Furkan SARIBIYIK, Yunus IŞIK, Semih DURU, Nurullah GÖKYURT ve Erkan ATMACA'ya

İnsanın yanında dayanabileceği bir dağ olmalı ya da gövdesine yaslanıp, gölgesinde dinlenebileceği bir dayanağı. Üzerimdeki emeğinin ve sabrının hakkını asla ödeyemem. Seni ne kadar üzdüysem beni o kadar çok sardın, bana hep cesaret kattın.

Her kararında yanımdaydın ve asla içimdeki ışığın sönmesine göz yummadın. Her zaman da yanımda olacağını, elini hiç üzerimden çekmeyeceğini biliyorum. Her şeyin en iyisini hak eden değerli babam Cumhur ŞAHİNGÖZ'e

Nur yüzlü, kalbi çocukları için çarpan güzeller güzeli kadın; seni çok ama çok seviyorum. Hayattaki bütün güzelliklerin ve en güzel özelliklerin sahibi değerli annem Sermin ŞAHİNGÖZ'e

Canımdan çok sevdiğim, keyifsiz anlarımı keyiflendireni baktıkça gurur duyduğum kardeşlerim Yaşar ŞAHİNGÖZ ve Nusret Atakan ŞAHİNGÖZ'e

Sonsuz teşekkürlerimi iletiyor, saygı ve sevgilerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nano Taşıyıcı Sistemler.....	5
2.1.1. Nanopartiküller.....	7
2.1.1.1. Altın Nanopartiküller.....	8
2.2. Polietilenimin (PEI).....	10
2.3. Lazer Ablasyon Yöntemi.....	11
2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi; Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi.....	13
2.4.1. FTIR Kullanma Alanları.....	13
2.5. Antisens Teknolojileri	15
2.5.1. RNA İnterferans Teknolojisi.....	15
2.5.2. siRNA (Small İnterfering RNA; Küçük Engelleyici RNA).....	17
2.6. İpek Fibroin (İF).....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Çözeltiler.....	20
3.3. Yöntemler.....	21
3.3.1. Polietilenimin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu.....	21
3.3.2. Altın Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu	22
3.3.3. AuNP / PEI Kompleksinin Zeta Potansiyellerinin Ölçülmesi.....	22
3.3.4. İpek Fibroin (İF) Hazırlanışı	22
3.3.5. PEI/AuNP/İF Kompleksinin Hazırlanışı.....	23

3.3.6. AuNP / PEI / İF FTIR Testi.....	23
3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. Elde Edilen Altın Nanopartikülün Karakterizasyonu.....	25
4.1.1. Nanopartikül Boyut Analizi	26
4.1.2. Nanopartikül Yük Analizi	26
4.2. PEI/AuNP/İF Komplekslerinin FTIR Testi Sonuçları.....	28
4.3. PEI/AuNP/İF Kompleksinin Bağlanıp Bağlanmadığının Kontrolü	30
4.4. SiRNA Yüklü Nanopartiküllerin Agaroz Jel Elektroforezi Sonuçları	31
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	32
KAYNAKLAR.....	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SayfaNo</u>
2.1. Nano taşıyıcı türleri.....	6
2.2. Polimer Nanopartiküller	8
2.3. Polietilenimin Oluşumu.....	11
2.4. Lazer Ablasyon Yönteminin Şematize Edilmesi	13
2. 5. FTIR spektroskopisinin Uygulaması.....	15
2. 6. RNA İnterferans Mekanizması	17
2. 7. siRNA ile birleşen Nanopartikülün Etki Mekanizması.....	18
2. 8. İpek Fibroin/Polietilenimin/DNA Kompleksi	19
3. 1. Lazer Ablasyon Yönteminin Şematize Edilmesi	22
4. 1. PEI konsantrasyonuna bağlı AuNP üretimi.....	25
4. 2. PEI/AUNP/İF Nanopartikülün Boyut Dağılımı.....	26
4. 3. %1 PEI/AuNP Zeta Potansiyeli Sonuçları	27
4. 4. %2 PEI/AuNP Zeta Potansiyeli Sonuçları	27
4. 5. %5 PEI/AuNP Zeta Potansiyeli Sonuçları	28
4. 6. PEI/AuNP/İF Komplekslerinin FTIR Testi Sonuçları	29
4. 7. Diyaliz Membrandaki PEI/AuNP ve PEI/AuNP/İF Durumu	30
4.8. siRNA ve Farklı Konsantrasyonlara Sahip PEI/AuNP/İF Nanopartiküllerin Birbirlerine Bağlanması	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

Sayfa

3.1. Agaroz Jel Elektroforezi için hazırlanan AuNP/PEI/İF/siRNA örnekleri.....24



KISALTMALAR DİZİNİ

cDNA	Komplementer DNA
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
RNA	Ribonükleikasit
dsRNA	Çift sarmallı RNA
ELİSA	Enzim bağlantılı immün analizi
mRNA	Mesajcı ribonükleikasit
siRNA	Küçük müdahale edici RNA
tRNA	Taşıyıcı ribonükleikasit
RISC	RNA – indüklü susturma kompleksi
RNAi	RNA interferansı
RNAz	Ribonükleaz
PEI	Polietilenimin
NP	Nanoparçacık
İF	İpek Fibroin
shRNA	Küçük Saç Tokası RNA
dsRNA	Çift zincirli RNA
SPR	Yüzey plazmon rezonansı
LAL	Sıvıdan lazer ablasyonu
AgNP	Gümüş nanoparçacık
PtNP	Platinyum Nanoparçacık
AuNSs	Altın nanosfer
AuNCrs	Nanokristaller
AuNCs	Nanokoratlar
AuNs	Üçgen bipiramitler
PEG	Perkütan Endoskopik Gastrostomi
MW	Moleküler ağırlık
RGD	Arginin-glisin-aspartik asit
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrosu

1. GİRİŞ

Nükleik asitler, kanser ve genetik bozukluklarda yer alan yollar ve moleküller dahil olmak üzere terapötik hedefler için ümit verici araçlardır. Bozuk genleri onarmak için plazmidler, minivektör DNA'lar ve küçük interferans RNA (siRNA)'lar kullanılabilir ve bunlar terapötik olarak ilgili süreçleri düzenleyebilirler. Bununla birlikte, nükleik asitler; nükleazlardan ve diğer çevresel ajanlardan korunmak ve hücreye girişi kolaylaştırmak için dağıtım araçlarına ihtiyaç duymaktadırlar [1].

Nükleik asit taşıyıcı araçlar genellikle biyolojik ve sentetik vektörler olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar. Biyolojik viral vektörler verimli bir taşıyıcı olmalarına rağmen, immünojenitesi karsinojenitesi ve bağışıklık sistemini uyarması gibi klinik uygulamalar için bir sorun haline gelebilir. Katyonik lipitler, polimerler ve dendrimerler gibi geleneksel sentetik vektörler de hücre içine nükleik asit taşınmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, transfeksiyon etkinliğine ve büyük ölçekli üretim kolaylığına rağmen, bu vektörler kullanılarak nükleik asitlerin hücre içine taşınmasında, düşük depolama kararlılığı, hedefleme etkinliğinin azlığı ve sınırlı in vivo izleme gibi klinik uygulamalara yönelik sınırlamalara sahiptirler [2].

İnorganik nanopartiküller, geleneksel lipit bazlı vektörlere göre, ayarlanabilen boyut ve yüzey özellikleri, çok işlevli kabiliyetleri ve metal çekirdeğin fiziksel özelliklerini aktarma yeteneği gibi çok çeşitli avantajlara sahip olan sentetik vektörler olarak ortaya çıkmaktadırlar. Altın nanopartiküllerin (AuNP) özellikle düşük boyutlu dağılımı ile ölçeklenebilir bir şekilde üretilebilmeleri, fonksiyonel çeşitlilik, çok işlevli mono tabakaların yaratılması, nükleik asitler ve hedefleme ajanları gibi partikül yüzeyine yerleştirilen çoklu fonksiyonel parçaların oluşturulmasına olanak sağlayarak kolayca elde edilebilmeleri, sitotoksisite, biyo-dağılım ve in vivo ekskresyon özelliklerinin parçacık büyüklüğü ve yüzey işlevselliği tarafından düzenlenebilir olması gibi avantajlara bağlı olarak nükleik asit uygulamaları için çekici malzemeler olarak hizmet etmektedir [3].

Antisens DNA terapisi, geleneksel kemoterapiye yardımcı olarak kullanılma potansiyeli olan, hastalıkla ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenlemek için güçlü bir araçtır. Tek iplikli DNA (ssDNA) oligonükleotidleri, hücrelere verilebilir ve kodlanmış proteinin ifadesini inhibe ederek spesifik mRNA moleküllerini hedef alabilir. Altın nanopartiküller (AuNPs), antisens oligonükleotidi RNazlar tarafından bozunmaya karşı korur, böylece dolaşım yarı ömrünü arttırır ve bu nedenle, hücrelere verilen terapötik maddenin yükü artar. AuNP'lerin basit montaj yoluyla nanoparçacık çekirdeği üzerine gen susturulması için aktivatörleri potansiyelize etme potansiyeli, küçük interferansçı RNA (siRNA) ve antisens ssDNA dahil olmak üzere bir dizi farklı nükleik asit grubu için in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir [4].

Nanoparçacık-siRNA konjugatları siRNA'ların dolaşımını arttırmak için tasarlanmıştır. Hedeflenen mRNA'ların istenilen yere güvenli bir şekilde ulaştırılmasını ve susturulmasını teşvik ederler. siRNA'lar, tekli nükleotid mutasyonlarını hedefleyebildikleri için, gen izoformlarının seçici bir şekilde susturulması ve allelik spesifik susturma üzerinde bir etkiye sahip olabilecekleri gibi, muazzam sekans spesifitesi de gösterirler.

Kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Dünya çapında ölümcül kanserlerin 2030'da 13.1 milyonun üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir. Kanser, kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına ve farklılaşmaya yol açan mutasyonel ve epigenetik değişiklikleri içeren genetik bir hastalıktır. Kanser tedavisinde kullanılan pek çok yöntem vardır. Bunlardan biri de gen tedavisidir. Gen tedavisi bir hastalığı tedavi etmek hatta mümkünse önlemek için kullanılabilir. Mutasyona uğramış hastalıktan sorumlu gen, direkt sağlıklı gen kopyasıyla değiştirilebilir, inaktive edilebilir veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Gen tedavisinde indirekt olarak hastalığın patofizyolojisi ile alakalı genler eklenip çıkartılabilir [5]. Gen tedavisi genel anlamda siRNA ve shRNA kullanımını temel alan yöntemlerdir. siRNA ve shRNA, kansere bağlı gen hedeflerini susturmak için yaygın şekilde kullanılmaktadır [6]. Bunların genel adına RNAi olarak adlandırılan gen baskılama mekanizması denir. Bunun ortaya çıkması ile ilgili ilk bulgular 1980'li yılların sonlarında bitkilerin genetik modifikasyonu üzerine yapılan çalışmalardır [7-8].

RNA interferans, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) hücreye girdiği zaman tamamlayıcı mRNA dizisinin parçalanmasına yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır [9]. RNAi mekanizmasının başlangıç adımı hücredeki uzun dsRNA öncü molekülünün RNaz III enzimi Dicer tarafından 5'- fosfat ve dinükleotid çıkıntısı bulunan 3'- hidroksil uçlara sahip ~ 22 nükleotidlik siRNA moleküllerine parçalanması işlemidir. Bu işlem sitoplazmada gerçekleşmektedir [10].

Fakat buradaki en önemli problem; tedavi için ilgili genin kanser hücresine nasıl aktarılacağıdır. Bu noktada ise siRNA'nın nanoparçacıklarla (NP) taşınması önemlidir [11].

Geniş NP yelpazeleri arasında soy metal özelliği gösteren NP' ler son yıllarda özellikle yüzeysel plasmon rezonansı (SPR) da dâhil olmak üzere biyouyumluluk ve eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden ötürü önem kazanmıştır [12]. SPR, bir elektromanyetik dalga ile AuNP yüzeyinde bulunan serbest iletken elektronlar arasındaki etkileşime dayanır ve bu da, görünür ışığın frekansı ile rezonansa titreşerek salınmasına neden olur. Bunun sonucunda da güçlü manyetik alanlara sebebiyet verir. Bu olay, AuNP' lerle ilişkili tüm radyatif (absorpsiyon ve saçılma) ve radyasyona (absorbe edilen ışığın ısıya dönüştürülmesi) aykırı özelliklerini büyük ölçüde geliştirerek onları farklı biyolojik veya tıbbi yöntemler için uygun hale getirir [13-14].

AuNP' ler çok sayıda yöntemle farklı boyut ve şekillerde kolaylıkla sentezlenebilirler. Üretimlerinin en kolay yolu altın tuzlarının, sodyum sitratın varlığında indirgenmesi sonucu oluşturulur. Bu madde altın iyonlarını indirgeyerek NP oluşturmaya başlar ve AuNP' lerin toplanmasını önleyerek yüzeylerine absorbe edildiğinde onları dengeler [15].

AuNP üretimindeki diğer bir yöntemde lazer ablasyon yöntemidir [16]. Son zamanlarda, sıvı fazda bir altının darbeli lazer ablasyonu, çoğunlukla kimyasal indirgeme yöntemi ile üretilirken AuNP' leri sentezlemek için çekici bir alternatif olarak benimsenmiştir [17].

Polietilenimin ise kanser hücrelerine gen aktarımı yapabilmek için negatif yüklü altın nanopatikülleri ve siRNA' yı kolaylıkla bağlayabilen katyonik bir polimerdir [18].

Bu tezin amacı; kanser hücrelerine siRNA iletimi için pozitif yüklü bir polimer olan polietilenimin çözeltisi içerisinde lazer ablyasyon yöntemiyle altın nanopatiküller oluşturmak, elde edilen bu nanopatikülü karakterize etmek ve ileride kanser hücrelerinin tedavisi için yapılacak olan çalışmalar da PEI/AuNP/ipek fibroin komplekslerinin birlikte kullanılabileceği bir taşıyıcı sistem elde etmektir.



2. GENEL BİLGİLER

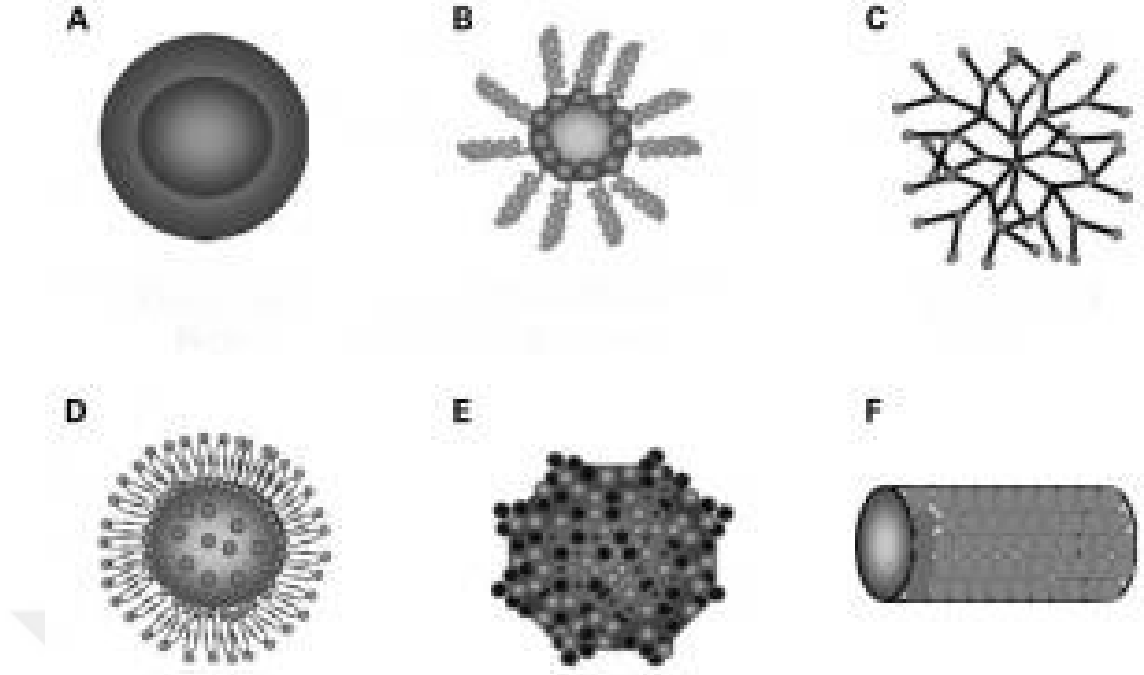
2.1. Nano Taşıyıcı Sistemler

Nano taşıyıcılar, spesifik reseptörlere bağlanıp hücreye giriş yaptığında genellikle endozomlar tarafından kuşatılırlar, böylece hücrenin ilaca karşı olan direnç mekanizması engellenmiş olur. Nano taşıyıcı sistemler, çeşitli biyolojik moleküllerin taşınmasında birçok büyük avantaj sağlar [19]. Nano taşıyıcılar sayesinde iletilen sistemler hedef bölgeye ulaştıklarında organ, doku ve hücreler tarafından alımları kolaylaşır. Bu yapılar etkin maddeyi hedeflenen hücrelere ulaştırmak için aktif ve pasif hedeflendirme yöntemlerini kullanırlar [20].

Nano boyuttaki taşıyıcıların çeşitli biyolojik moleküllerin iletiminde kullanılmasında pek çok avantajı vardır. Örneğin; kanser ilaçlarının salınımında, ilaçların toksik etkisinin azaltılması ve çoklu ilaç dirençliliğinin önüne geçilmesi sebebiyle çokça tercih edilmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, kanser ilacı yüklenmiş nano taşıyıcıların hedeflenmesi sayesinde daha yüksek seçicilikte tedavi alternatiflerinin ortaya çıktığı görülmüştür [21].

Taşıyıcı nanopartiküller 6 tiptedir.

- 1- Polimerik nanopartiküller
- 2- Polimerik miseller
- 3- Sentetik polimerler
- 4- Lipozomlar
- 5- Virüs temelli nanopartiküller
- 6- Karbon nanotüpler [22].



Şekil 2. 1. Nano Taşıyıcı Türleri

- A- Polimerik nanopartiküllerdir ve ilaç nanokapsülün içine hapsedilir.
- B- Polimerik misellerdir ve hidrofobik kabuk alanı hidrofobik ilaçlar için depo görevi görür.
- C- Sentetik polimerik makromoleküllerdir ve yapısında dallanmış monomerler görülür.
- D- Lipozomlardır ve yapıları iki yağ katmanından oluşur.
- E- Genellikle protein kafesi şeklinde oluşan virüs temelli nanopartiküllerdir.
- F- Benzen halkalarından oluşan silindirik tüpler halinde oluşmuş yapılardır [19].

Farklı nano taşıyıcı sistemler üretmek ve geliştirmek için lipid yapıda, polimerik özellikte ve organik bazlı yapılar kullanılır. Günümüzde üzerinde en çok çalışma yapılan ve geliştirilen nano taşıyıcı sistemler; polimerik nanopartiküller, polimerik miseller, lipozomlar, karbon nanotüpler ve altın nanopartiküllerdir [23].

Çok fonksiyonlu görüntüleme modelleri ve teranostik yaklaşımda geniş ve önemli bir yere sahip olan nano tıpta; nanoteknolojinin kullanımı; yeni partiküllerin ve taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine olumlu katkı sağlamıştır. Gelecekte klinik çalışmaların artması ile pek çok hastalığın teşhis ve tedavisinde çok daha geniş yer alacağı düşünülmektedir [24].

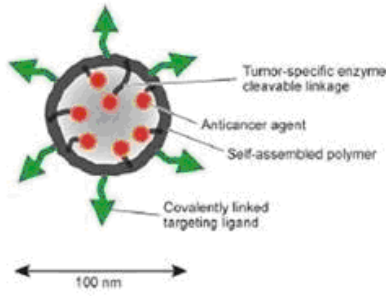
2.1.1. Nanopartiküller

Son zamanlarda nanoteknolojik yaklaşımların git gide popülerliği artmakta olup, bilimsel araştırmalar ve çalışmalar için yeni ve özel bir alan oluşturmaktadır. Nanoteknolojik uygulama alanlarının artmasıyla beraber nano yapıları malzemeler, pek çok alanda kullanılmaya başlanmıştır [25].

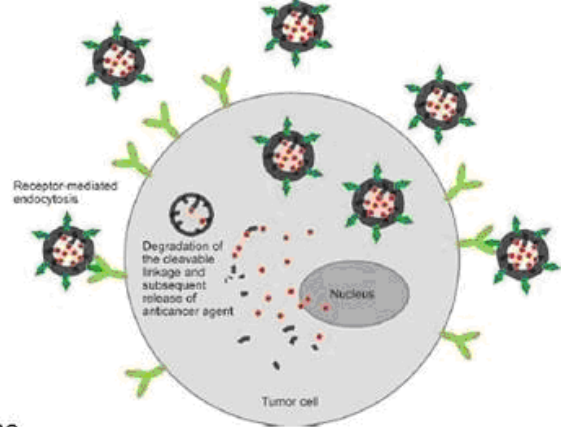
Nanopartiküller, yüksek yüzey-hacim oranı ile ilişkili benzersiz yapıları sebebiyle ciddi önem taşımakta olup, katalizörler, ilaç sanayi, optik materyaller, sensörler, enerji depolama da dahil pek çok alanda uygulamaları mevcuttur [26]. Bu materyallerin fonksiyonları ve kullanım alanları nanopartiküllerin (NP) boyutuna ve bileşimine göre farklılık göstermektedir [27]. Gümüş NP'leri (AgNP) ev aletlerinde [28], platinyum NP'leri (PtNP) endüstride ve biyomedikal uygulamalarda [29], altın NP'leri (AuNP) de sensör alanındaki çalışmalarda [30] kullanılabilir.

Polimerik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey özellikleri organizmada gösterdikleri biyolojik davranışlarda anahtar bir rol oynamaktadır. Bu taşıyıcı sistemlerin yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile hedeflendirme potansiyelleri ve hücrel tutulum düzeyleri artırılmakta, kan dolaşımında kalış süreleri uzamakta, özellikle tümörlü dokularda daha yüksek düzeyde birikimleri söz konusu olmaktadır (Şekil 2.2.C).

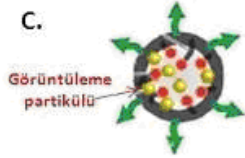
A. Çift fazlı bir nanopartikül hastalıklı ve sağlıklı hücre ayrımı yapabilir.



B. Hücre içerisine emildiğinde polimerik zar erir ve kanser önleyici ilaç serbest kalır.



C.



İlacın yanı sıra gözlemleyici bir partikülde zar içerisine eklenebilir.

Şekil 2. 2. Polimer Nanopartiküller [31].

2.1.1.1. Altın Nanopartiküller

Son yıllarda büyük önem kazanan nanopartiküller (NP), nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Nanoteknoloji; atomsal, moleküler yapılar düzeyinde fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir. Özellikle son 20 yılda nanoteknolojik gelişmelerde hızlı bir artış gözlenmekte ve bu alandaki yatırımlar günden güne artmaktadır. Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nanokristal, nanopartikül, nanotüp gibi nano boyutlu malzemelerin üretilmesi sağlanabilmektedir. Mühendislik nanopartikülleri çok çeşitli alanlarda kullanılabilmesine imkân sağlamıştır. Ev aletleri ve ürün kaplamaları, biyomedikal uygulamalar, mücevhercilik, elektrokimyasal sensör ve biyosensör uygulamaları, tıp ve daha pek çok alanda kullanılabilir [32].

Geniş NP türleri arasında soy metal NP' ler son yıllarda özellikle yüzeyel plasmon rezonansı (Surface Plasmon Rezonans; SPR) da dâhil olmak üzere biyoyumluluk ve eşsiz fiziksel, kimyasal özelliklerinden ötürü AuNP'lere önem vermişlerdir [12]. SPR, bir elektromanyetik dalga ile AuNP yüzeyinde bulunan serbest iletken elektronlar arasındaki etkileşime dayanır ve bu da, görünür ışığın frekansı ile

rezonansa titreşerek salınmasına neden olur. Bu olay güçlü manyetik alanlara neden olur. Bu olgu, AuNP'lerle ilişkili tüm radyatif (absorpsiyon ve saçılma) ve radyasyona aykırı (absorbe edilen ışığın ısıya dönüştürülmesi) özelliklerini büyük ölçüde geliştirerek onları farklı biyolojik veya tıbbi yöntemler için uygun hale getirir. Altın nano partiküllerinin özel bir türü hücre membranından kolayca kayabilir ve sonuçta bu durum onları, hedef hücrelere direkt ilaç taşınması için iyi bir aday yapar [13, 14].

AuNP'ler çok sayıda yaklaşımla farklı boyut ve şekillerde kolaylıkla sentezlenebilirler. Üretimlerinin en kolay yolu ilk önce Turkevich [33] tarafından tanımlanmıştır ve altın tuzlarının, sodyum sitratın varlığında indirgenmesini içerir. Bu madde altın iyonlarını indirgeyerek NP oluşturmaya başlar ve AuNP'lerin toplanmasını önleyerek yüzeylerine absorbe edildiğinde onları dengeler [15].

Altın nanosferler (AuNSs), nanokorutlar (AuNCs), nanokristaller (AuNCrs) ve üçgen bipiramitler (AuNs), nanokütükler (AuNs), nanokartlar (AuNSs, AuBps), sentez işlemlerine ve deneysel koşullara göre farklı şekillerde tanımlanırlar. Bunlar arasında, AuNSs, AuNRs, AuNShs ve AuNCgs en çok araştırılan altın nanopartiküllerdir [34]. AuNP'lerin boyutu ve şekli, özellikleri değiştikten sonra uçlarına göre seçilmelidir [35,36]. Ayrıca, AuNP'lerin yüzey şekilleri, hücreler tarafından alınmalarında önemlidir. AuNP'ler tiol ve amin gruplarını bağlayarak, biyomedikal uygulamalar için farklı biyomoleküllerle etkileşmesine izin verir [37,38]. Örneğin, kimyasal maddeler, siRNA ve terapötik oligonükleotitler gibi terapötik maddeler ile yüklenebilirler. Poli Etilen Glikol (PEG) gibi polimerik dengeleyiciler antikor ve peptidlerin ilaç iletimi de dâhil olmak üzere çözünürlük, biyoyararlanım, dolaşım zamanı ve özel elementlerin hedeflenmesini büyük ölçüde artırır [39,40].

AuNP'ler aynı zamanda biyomedikal uygulamalarda termal ablasyon kapasiteleri ile de tanınırlar. Ayrıca AuNP'ler elektron uyarımı ve gevşemesi nedeniyle elektromanyetik radyasyonu ısı enerjisine dönüştürebilmeleri nedeniyle büyük bir fototerma terapi (PTT) ajanları olabilirler.

AuNP'lerin SPR maksimum dalga boyundaki ışık eksitasyonu verimli bir ışık-ısı dönüşümüne neden olur [39,41]. Üretilen ve çevreye aktarılan ısı miktarına bağlı

olarak, AuNP'ler kanser hücrelerine veya yüzeylerine zarar verebilir veya yok edebilirler [40]. Buna ek olarak, termal tedavinin etkileri kanser türüne bağımlı olmasına rağmen, tümör dokusunun normal dokulardan daha fazla hipoksik, asidik ve besin yetersizliğine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu özelliklerin, kanser hücrelerinin ısıya duyarlılığını arttırdığı düşünülmektedir [42].

2.2. Polietilenimin (PEI)

Polietilenimin (PEI), yüzeyinde bol miktarda amino grupları olan iyi bir genetik vektördür. Yaygın olarak kullanılan ve performansı en iyi bilinen biyo uyumu yüksek bir makro moleküldür [43].

PEI tüm viral olmayan polimerik taşıyıcılar arasında, 1995'ten beri, önemli bir gen transfeksiyon sistemi olarak kullanılmaktadır [44,45]. Dallı ve doğrusal olmak üzere iki PEI formu vardır. 100 ila 1500 kDa arasında değişen farklı moleküler ağırlıklara (MA) sahiptir [44,46]. 25 kDa dallı PEI formu, en uygun polikasyon olarak kabul edilir; çünkü dikkat çekici transfeksiyon kapasitesi vardır [46].

Polietilenimin ve DNA arasındaki güçlü elektrostatik etkileşimler DNA-PEI kompleksini oluşturur bu komplekslere çok sayıda ve nano boyuttaki sitem olan polipleks adı verilir [44,47].

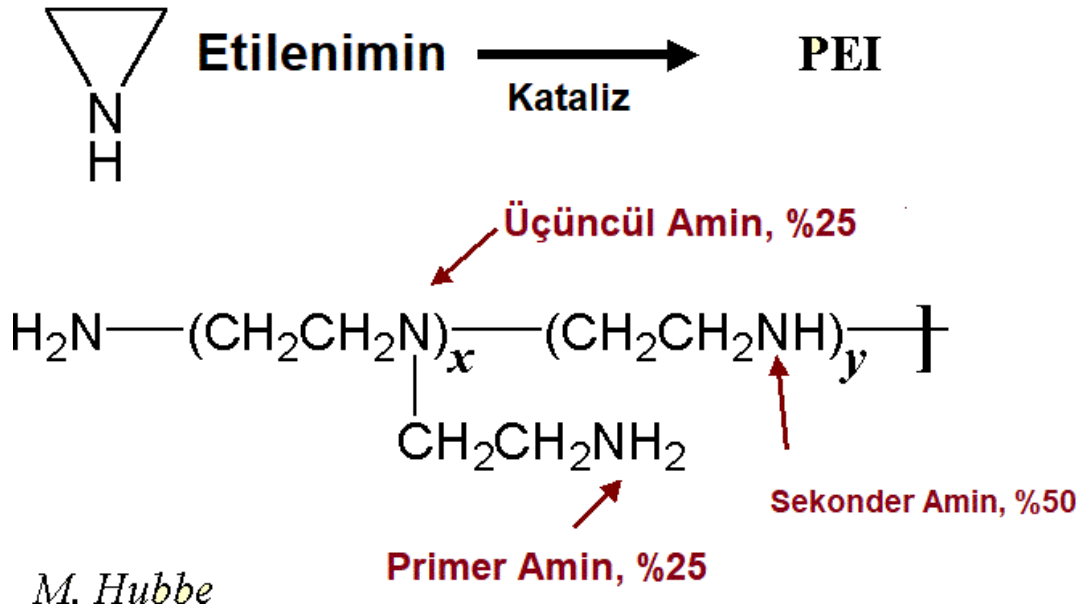
PEI güvenli bir taşıyıcı sistem olmasına rağmen, sitotoksitesi ile ilgili hala endişeler vardır. Çalışmalar, PEI sitotoksite mekanizmasının çok değişken olduğunu ve dallanma derecesine, partikül büyüklüğüne, zeta potansiyeline bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, hücrenin nekrotik ve apoptotik ölüm yollarını da değiştirdiği söylenebilir. PEI, gen nakli sırasında iki tür sitotoksiteye neden olabilir: Transfekte edilmeden önce hücre zarının dengesizleşmesi sonucu serbest PEI ile ilgili acil toksite ve hücre içine geçtikten sonra da PEI/DNA komplekslerinin hücresel ilerlemesiyle ilgili gecikmiş toksiteye neden olur [48].

Polietilenimin, amin grubu ve iki karbon alifatik CH_2/CH_2 izleyici içeren bir polimer türüdür ve polikasyonik karakterinden dolayı güçlü bir siRNA iletim aracı olarak kullanılır. Üçlü bir halkadan oluşur. Molekülün iki köşesi $-\text{CH}_2-$ bağlarından oluşur. Üçüncü köşe, ikincil bir amin grubu (NH) ihtiva eder. Bir katalizörün

mevcudiyetinde bu monomer, yaklaşık %25 birincil amin grupları, %50 ikincil amin grupları ve %25 üçüncül amin grupları ile çok dallanmamış bir polimer haline dönüştürülür (Şekil 2.3). PEI, vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör-2'nin (VEGF R2) hücreye siRNA'yı aktarmak için kullanılabilen Arg-Gly-Asp (RGD) peptit ligandını içerir. Bununla birlikte, siRNA'nın başarılı bir şekilde aktarılmasından dolayı, daha az yanlış bağlanmalar sağlamış ve VEGF R2'nin baskın rolünü hesaba katarak, tümörün büyümesini engelleyici etki yapmıştır [49].

Saf PEI, özellikle asidik ve nötr pH koşullarında aşırı anyonik koloidal yükün nötrleştirilmesi için de çok etkilidir [50].

Polietileniminin Sentezi



Şekil 2.3. Polietileniminin Oluşumu [50].

2.3. Lazer Ablasyon Yöntemi

Lazer ablasyon yöntemiyle nanoparçacık üretimi son 20 yıldır yaygın şekilde uygulanmaktadır. AuNP'leri sentezlemek için kimyasal indirgeme yöntemi kullanılırken, son zamanlarda sıvı fazda altın bir hedefin darbeli lazer ablasyonu yeni bir alternatif yol olarak kabul görmüştür. Sıvıdan lazer ablasyonu (Laser Ablation of

liquid; LAL), metallere yarı iletkenlere uzanan çeşitli ultra saflaştırılmış NP'lerin basit bir aparatla sentezlenebilmesinden dolayı eşsiz bir avantaj sağlamaktadır [17].

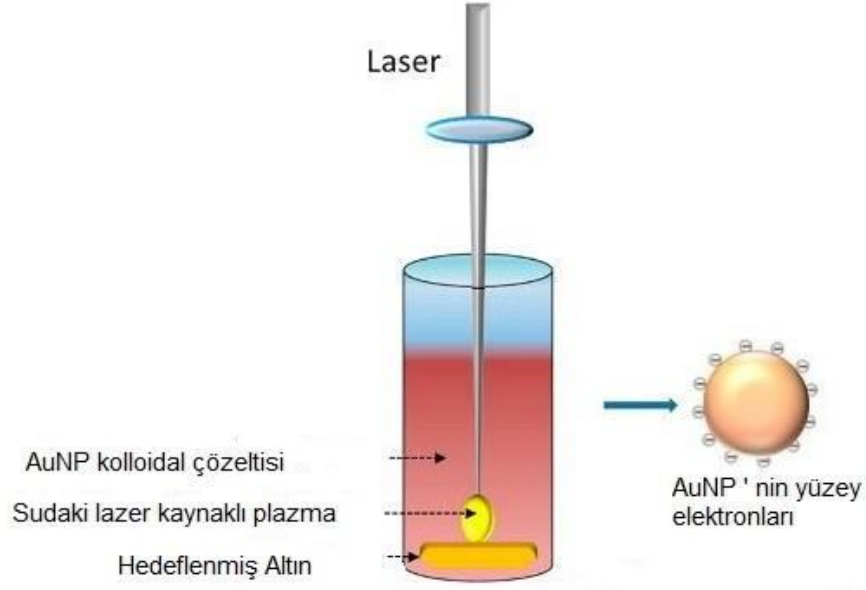
NP'lerin üretimi çeşitli çözücülerde meydana gelebilir, kolloidi stabilize etmek için yüzey aktif madde gerekmez, NP'ler aşırı derecede saf olabilir ve nihayetinde sürecin ince ayarı üretime izin verir. NP'lerin büyüklüğü ve özelliklerine göre farklılık gösterebilir [51,52].

Sıvıda Darbeli Lazer Ablasyonu (Pulsed Laser of liquid; PLAL) veya solüsyon çözeltide lazer ablasyon sentezi olarak bilinen teknik, solüsyondaki metal nanopartiküllerin oluşturulması için alternatif bir tekniktir [53].

PLAL, bir sıvı içindeki dökme metal hedefin odaklanmış lazer darbeleri ışınlanmasını içerir. Kapak ajanlarının ve kimyasal öncüllerin bulunmaması nedeniyle, PLAL çevresel açıdan dosttur ve kolay bir deneysel kurulumda da sahiptir. Bu yolla üretilen nanomalzemeler ve nano yapılar son derece çeşitlidir [54].

Sıvılarda darbeli lazer ablasyonu, NP'lerin üretimi için yaygın olarak kullanılsa da [55,56], karbonnanotüp/nanopartikül (CNT/NP) hibritlerinin üretiminde çok sınırlı bir kullanıma sahiptir. Bu teknik, bir çözücü içine daldırılmış metal bir hedefi kesmek için darbeli bir lazer ışını kullanır. Bu yaklaşımın sunduğu fırsatlar dikkat çekicidir.

Sonuç olarak, zararlı reaktanların kullanılmasını önlemek ve istenmeyen kirleticilerden tamamen arındırılmış NP'lerin üretme olasılığı sayesinde, son yıllarda PLAL ile nanopartiküllerin sentezi daha kolay hale gelmiştir [57,58]. Lazer ablasyon yönteminde, lazer tabancasından yapılan basımlar sonucu hedef alınan maddeyi nano yapıya hale getirme prensibi vardır (Şekil 2.4) [59].



Şekil 2. 4. Lazer Ablasyon Yönteminin Şematize Edilmesi [59].

2.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi; Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) matematiksel fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın kızılötesi yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal ve analitik bir yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; 4000~14000 cm^{-1}), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; 400~4000 cm^{-1}) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; 4~400 cm^{-1}) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır [60].

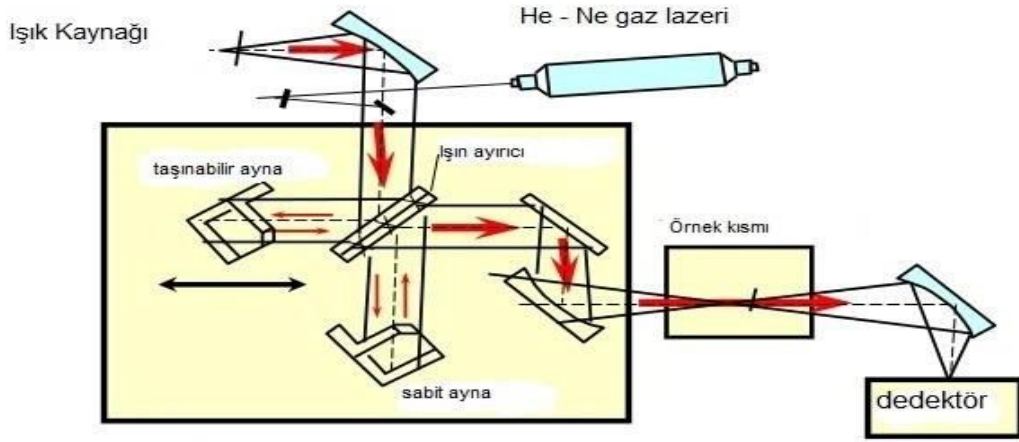
2.4.1. FTIR Kullanma Alanları

W.W. Coblentz 1911'de biyolojik örneklerin analizinde kızıl ötesi spektroskopinin kullanılabilceğini öne süren ilk bilim adamıdır [61]. 1950'li ve 1960'lı yıllarda mikroorganizmaların ayrılmasına yönelik çalışmalarda kızıl ötesi spektroskopisi kullanılmaya başlanmıştır. Yaklaşık 20 yıllık bir duraklamadan sonra, modern kızıl ötesi yöntemleri, bilgisayarlar, yeni geliştirilen çok değişkenli analiz teknikleri, faktör analizleri veya yapay sinir ağları gibi istatistik yöntemleri, araştırmaların tekrar bu alanda yoğunlaşmasını sağlamıştır [62].

FTIR spektroskopisinin, gaz veya sıvı kromatografisi, kütle spektroskopisi gibi diğer analitik yöntemlere kıyasla daha başarılı olduğu ve endüstride çok iyi bir tanımlama aracı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [63].

FTIR spektroskopisi ile yapılan testler sonucunda çiğ sütte bulunan bazı proteinler , β -lakto globülinin yapısı ve süt proteinlerinin bazı işlemlerle denatürasyonları, İsveç peynirinin bazı farklı özelliklerinin belirtilmesi, süt ve süt ürünlerinin nitrat ve nitrit düzeylerine göre sınıflandırılması gibi pek çok araştırma yapılmaktadır. Gürdeniz ve arkadaşları [64], FTIR spektroskopi ile zeytinyağında yağışın belirlenmesine, Gerçekaslan ve arkadaşları [65]mekte bayatlama düzeyinin ölçülmesine yönelik çalışmalar yapmıştır. Ayrıca dondurarak kurutulmuş laktozun kristalleştirilmesindeki ısıl geçişlerin incelenmesinde ve antifungal metil selüloz filmlerin fiziksel özelliklerinin belirlenmesinde de FTIR' den yararlanılmıştır [66]. FTIR spektroskopisinin kullanıldığı başka bir önemli alan ise tıp bilimleridir. Hücrenin farklı biyomoleküler bileşenleri, yapısal ve işlevsel açılarından zengin, karakteristik kızıl ötesi ışık dizisi gösterirler. Bu nedenle, FTIR spektroskopisinin farklı kanser hücrelerinin tespitinde kullanılmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [67].

FTIR spektroskopisinde ışık, kaynağından ayrıldıktan sonra bir ışın ayırıcıya gelir. Burada ışın hem sabit aynaya hem de hareketli ayna gönderilir. Daha sonra ışınlar aynadan yansiyarak ışın ayırıcıya geri gelir. Buradan da örneğin bulunduğu yere gider. Işın örnek ile etkileştikten sonra algılayıcılar tarafından algılanır ve bilgisayar ile ölçülebilecek anlamlı sinyallere dönüştürülür (Şekil 2.5) [68].



Şekil 2.5. FTIR Spektroskopisinin Uygulanması [68].

2.5. Antisens Teknolojileri

Sense, m-RNA veya DNA molekülünün 5'- 3' ipliğidir. Sense'in komplementeri olan iplik de antisens olarak isimlenir [69]. Antisens teknoloji insan, hayvan ve bitkilerdeki hastalıkların daha spesifik tedavisi ve yeni keşifleri için ayrıca, fonksiyonel genomik çalışmalar için çok güçlü silahlardan oluşan uygun tekniklerdir. Doğal olarak oluşan bu mekanizma sekansa spesifik olup ilk kez Caenorhabditis elegans nematodunda keşfedilmiştir [70].

Antisens uygulamalarında, oligonükleotidler mRNA veya pre-mRNA ile etkileşime girer ve bir dupleks oluşturarak translasyonlarını işlenmelerini engellerler. Dolayısıyla protein biyosentezini inhibe ederler [71].

2.5.1. RNA İnterferans Teknolojisi

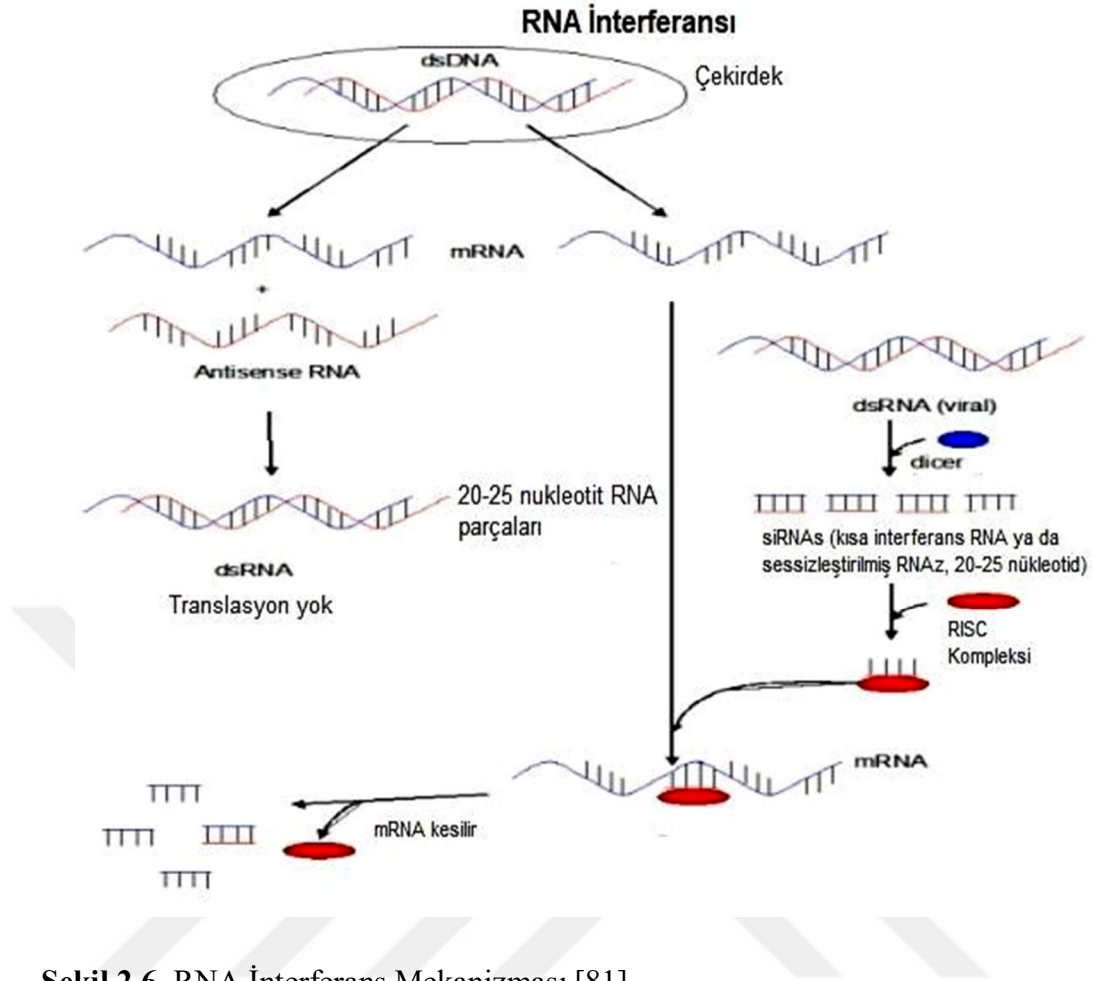
RNAi mekanizması ökaryotlarda, sitoplazmada gerçekleşen bir olaydır. Mekanizmayı sağlayan 2 tür efektör molekül vardır. Birincisi, 21-23 nükleotid uzunluğunda ve çift zincirli RNA (dsRNA) molekülü olan siRNA (small interfering RNA)'dır. İkincisi ise 22 nükleotid uzunluğunda dsRNA molekülü olan miRNA

(micro RNA)'dır. Bu küçük RNA molekülleri kodlayıcı özelliğe sahip değildir [72,73].

siRNA'nın oluşumu, sitoplazmaya uzun dsRNA molekülünün ekzojen olarak gönderilmesinden sonra orada Rnaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Dicer enzimi ile 21-23 nükleotidlik parçalara ayrılmasıyla gerçekleşir [10]. miRNA'nın oluşumu ise çekirdekte başlar. Burada endojen olarak kodlanan primer miRNA (pri-miRNA) molekülü, RNaz III enzim ailesinin bir üyesi olan Drosha ile işlenerek öncül miRNA (pre-miRNA) molekülüne dönüşür. Pre-miRNA'ların saç tokası (hairpin) yapısı vardır ve ilmeklerden (loop) oluşur. Pre-miRNA'lar daha sonra sitoplazmaya gönderilir ve burada Dicer ile ilmekleri açılır, böylece miRNA molekülü oluşmuş olur [74].

Dicer enziminin oluşturduğu kısa zincirlerin karakteristik uçları vardır. Zincirin 3' ucu dinükleotid taşır, 5' ucunda ise bir fosfat grubu bulunur [75]. siRNA ve miRNA'nın gen susturulması işlevini yerine getirebilmesi için Şekil 2.6. da gösterildiği gibi RISC (RNA baskılayıcı sessizleştirme kompleksi; RNA-induced silencing complex) adı verilen bir protein kompleksine girmesi gerekir. siRNA ve miRNA'nın kendine özgü uçları ve uzunlukları RISC tarafından tanınmaları için önemlidir. siRNA ve miRNA'nın zincirleri, RISC'in tamamlayıcısı oldukları hedef mRNA molekülüne yönlendirirler [76,77].

siRNA'lar, iplikçiklerden birinin bozunduğu ve diğer (antisens) iplikçik hedef mRNA dizilerini bulmak için bir rehber olarak bırakılan AGO2-RISC enzim kompleksi tarafından tanınır. miRNA'ların aksine, siRNA'lar dizileri mükemmel veya neredeyse kusursuz tamamlayıcılık ile bağlar ve translasyonel baskılama yerine hedeflerin bölünmesine neden olur [78,79]. Hedef gen ekspresyonunu diziye özel bir yaklaşımla etkili bir şekilde susturdukları için, siRNA'lar tek genlerin işlevini incelemek için en kullanışlı araçlar haline gelmiştir [78,80].

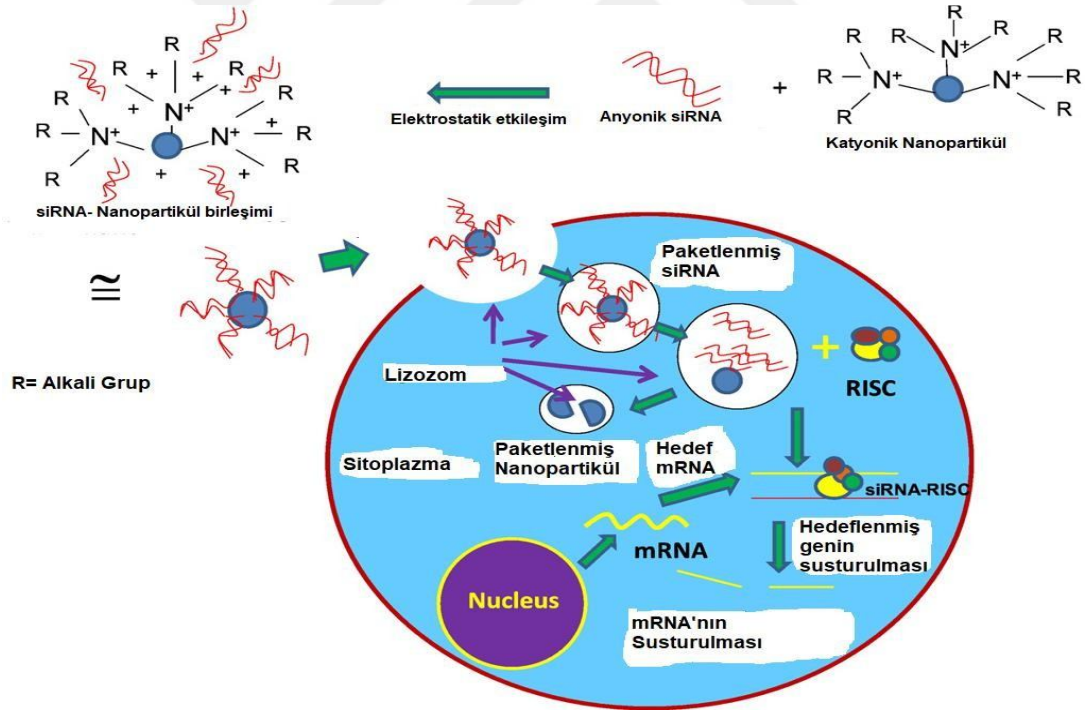


Şekil 2.6. RNA İnterferans Mekanizması [81].

2.5.2. siRNA (Small İnterfering RNA; Küçük Engelleyici RNA)

Transkripsiyon sonrası gen susturma işlemini yerine getiren, gen ekspresyonunu inhibe eden, in vitro spesifik mRNA (messenger RNA) moleküllerini yok eden, RNA moleküllerini kapsayan biyolojik bir süreç olan; RNA interferansını (RNAi) içeren sürecin en geniş uyarlanmış kategorisidir. RNA girişim terapisi öncelikle mikro RNA (miRNA) ve siRNA'lar olmak üzere iki tip küçük ribonükleik asit molekülü kullanılarak gerçekleştirilir. Bu aşamada, siRNA'lar ve oligonükleotidler kanser, edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromu (AIDS), alzheimer gibi çeşitli hastalıklara karşı mücadelede en güçlü araçlardan biridir. RNA parçaları mRNA ile bağlanarak, protein dizisinin spesifik olarak ekspresyonunu baskılayabilir. siRNA'lar, RNA'dan indüklenen susturma kompleksi (RISC) üretir ve bundan sonra mRNA/siRNA dupleksini parçalar.

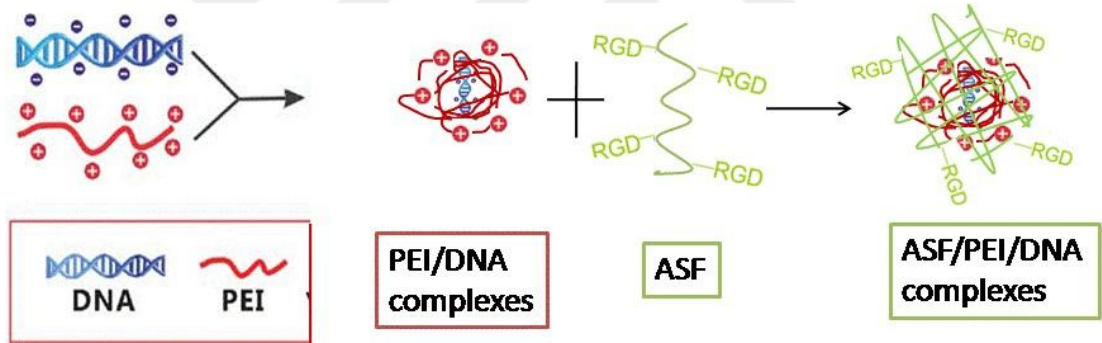
siRNA elektrostatik etkileşimler yoluyla katyonik nanoparçacıklarla sıkı kompleksler oluşturabilir. Ancak siRNA sitoplazmada RNA kaynaklı sessizleştirme kompleksine (RISC) yüklenmeden önce katyonik taşıyıcıdan ayrılmalı ve gen susturma işlemi başlatılmalıdır. Nanoparçacıkların siRNA'ya olan moleküler yakınlıklarını belirleyen fiziko kimyasal özellikleri, endozoma ve sitosolik redüktörlerde pH değişimi gibi hücre içi uyarılarla bozulabilir. Ve sonuç olarak, siRNA/polimer polipeks oluşur. Katyonik yoğunluğun ve moleküler ağırlığın azaltılması ve nanopartikül siRNA komplekslerinin hidrofilik/hidrofobiklikteki değişiklikler gibi spesifik değişiklikler, polipeptidin ayrışmasına yardımcı olur. Pozitif yüklü olan nanopartikül, negatif yüklü olan siRNA ile elektrostatik etkileşim sonucu birleşir. Hücreye aktarılan siRNA/nanopartikül kompleksi RISC kompleksi ile birleşerek gen aktivitesini durdurur (Şekil 2. 6), [82].



Şekil 2.7. siRNA ile birleşen nanopartikülün etki mekanizması [82].

2.6. İpek Fibroin (İF)

İpek proteinleri mükemmel biyouyumluluk ve biyolojik bozunabilirlik nedeniyle yıllardır biyomedikal alanda başarıyla kullanılmaktadır. Vahşi ipekböcekleri arasında en bilinen türlerden biri olan *Antheraea pernyi* ipek fibroin (*Antheraea pernyi* silk fibroin; ASF), alkali amino asitler olan arjinin ve histidin (Arg ve His) ve arginilglisil-aspartik asit (RGD) tripeptit sekanslarınınca zengindir. Bu RGD sekanslarının hücre integrinlerinin reseptörleri olduğu bilinmektedir. Memeli hücreleri ile hücre dışı matrisler arasındaki özel etkileşimlere de aracılık etmektedir. ASF'nin *Bombyx mori* ipek fibroin (BSF) ve kollojen ile karşılaştırıldığında daha güçlü hücre adezyonu sağladığı bildirilmiştir. RGD hedefleme sistemi, PEI gen taşıyıcılarına kovalent olarak değil, sitotoksisiteyi azaltmak ve transfeksiyon verimliliğini artırmak için PEI / DNA komplekslerini RGD açısından zengin ASF ile elektrostatik olarak kaplamaktadır (Şekil 2.7) [83].



Şekil 2.8. İpek Fibroin/Polietilenimin/DNA Kompleksi [83].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

siRNA

RNA interferans çalışmalarında nanotaşıyıcı sisteme takmak için kullanılan siRNA (Sense dizisi: 5' – GUCAACGGAUUUGGUCGUA – 3'; antisense dizisi: 5' – CAACGGAUUUGGUCGUAUU – 3') Dharmacon, a Horizon Discovery Group Firması'ndan temin edilmiştir.

Polietilenimin (PEI)

siRNA'nın taşınmasında kullanılmak üzere katyonik, %50 konsantrasyonda 12 kD ağırlığında, %20 dallanmış Polietilenimin (PEI) Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır.

24 Ayar Altın (Au)

24 Ayar %99 saflıkta gram altın Kırıkkale kuyumcularından temin edilmiştir.

İpel Fibroin (İF)

Çalışmamızda kullanılan ipek fibroin koza halinde Bursa ilinden temin edilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Agaroz Jel Elektroforezi

- Agaroz: %1'lik (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır.
- Tris asetat (TAE) tamponu (x50) (pH 8): 242 g Tris base, 57.1 ml Glacial asetik asit, 0.5 M 100 ml EDTA (pH 8), saf su.
- Yükleme tamponu % 40 sukroz, % 0.025 bromofenol mavisi, % 0.25 ksilen siyanol.

- Etdiyum Bromür: 10 mg/ml derişiminde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

De-İyonize Su

Ultra saf de-iyonize su Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Merkezi (KÜBTAM) 'de Pure H₂O makinesinden temin edilmiştir.

Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon, malzeme ve çözeltiler 121 0C'de 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Bütün çalışmalar boyunca kullandığımız kimyasallar olması gereken saflıkta olduklarından dolayı tekrar bir saflaştırma basamağına gerek duyulmamıştır.

3.3. Yöntemler

Bu tez kapsamında yapılan işlemler başlıca dört aşamadan oluşmaktadır; İlk bölümde farklı konsantrasyonlarda PEI çözeltisi hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için ayrı ayrı stabilite deneyleri yapılmıştır. İkinci kısımda hazırlanan PEI çözeltisi içerisinde lazer ablasyon yöntemi ile altın nanopartiküller üretilmiştir. Üçüncü kısımda üretilen altın nanopartiküllerin Zeta-Sizer cihazıyla boyutlarına ve zeta potansiyellerine bakılmıştır. Ayrıca FTIR spektroskopisi yapılmış ve nanopartiküller karakterize edilmiştir. Dördüncü ve son kısımda farklı oranlardaki AuNP/PEI/İF kompleksleri ile farklı oranlardaki siRNA bağlanmaya çalışılmıştır. Bağlanıp bağlanmadıklarını anlamak için %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır ve ultraviyole (UV) ışınları altında gözlemlenmiştir.

3.3.1. Polietilenimin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

% 50 konsantrasyonda, 12 kD moleküler ağırlığında % 20 dallanmış olarak satın alınan Polietilenimin (PEI) çözeltisi, seyreltilerek % 1, % 2 ve % 5 konsantrasyonlarında hazırlanmış ve Zeta-sizer cihazıyla zeta potansiyelleri ölçülmüştür (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).

3.3.2. Altın Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Çalışmamızda elde etmek istediğimiz altın nanopartikül (AuNP) polietileniminin farklı konsantrasyonları içinde Kırıkkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Labaratuvarında “q swiched nd yag” marka lazer cihazı kullanılarak lazer ablasyon yöntemi ile üretilmiştir [84]. Lazer ablasyon yönteminde AuNP’ler, lazer cihazının 1064’lük lens ucuyla, 1000 basım olacak şekilde %1, %2 ve % 5 PEI konsantrasyonları içerisinde üretilmiştir. Üretim esnasında hedeflenmiş altına 5 cm. mesafeden basım yapılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 3. 1. Lazer Ablasyon Yönteminin Şematize Edilmesi [58].

3.3.3. AuNP / PEI Kompleksinin Zeta Potansiyellerinin Ölçülmesi

Üretilen altın nanopartiküllerin Zeta-Sizer cihazıyla boyutlarına ve zeta potansiyellerine bakılmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3). Hazır olarak alınan PEI'nin 12 pH da çıktığı ve zeta potansiyel sonucunun da negatif özellikte çıktığı tespit edilmiştir. Daha sonra % 1, % 2 ve % 5 konsantrasyonundaki PEI/AuNP örneklerinin her birinin pH' ları 2 ila 14 seviyelerinde hazırlanıp, her pH noktası için ayrı ayrı zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

3.3.4. İpek Fibroin (İF) Hazırlanışı

Altın nanopartikül ve polietilenimin kompleksi ile bağlanacak olan ipek fibroinin sıvı hale getirilmesi için LiBr içerisinde çözdürülmüştür. Ekzotermik bir tepkime

meydana gelmiş ve behere sıkıştırılmış olan İF çözünmeye başlamıştır. 60 0C'lik fırında 4 saat bekletilerek İF' nin sıvı hale gelmesi sağlanmıştır [85].

3.3.5. PEI/AuNP/İF Kompleksinin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan %1, %2 ve %5 konsantrasyonlarındaki PEI/AuNP kompleksi ile İF bire bir oranında birleştirilmiştir.

3.3.6. AuNP / PEI FTIR Testi

AuNP'nin ve PEI'nin ayrı ayrı ve birlikte hangi dalga boylarında hangi bantları verdiğini gözlemlemek ve birbirleriyle bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amacıyla FTIR testi yapılmıştır (Şekil 4.5).

3.3.7. Agaroz Jel Elektrofrez

Ürettiğimiz %1, %2 ve %5'lik PEI/AuNP/İF 100 nM ve 200 nM konsantrasyonlarındaki siRNA ile bağlamak için Çizelge 3.1'deki oranlarda tüp içerisinde karıştırılıp oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Sonrasında 10 µl siRNA – Nanopartikül karışımından alınıp, 2 µl bromofenol tamponu ile karıştırılarak elektroforez kuyucuklarına hazırlanan örnekler yüklenmiştir. Daha sonra PEI/AuNP/İF ve siRNA'ların bağlanıp bağlanmadığını anlamak için % 1'lik agaroz jelde 90 voltta 40 dakika yürütülmüş ve etidyum bromid ile boyanmış ve jel Biometra UV Solo TS görüntüleme cihazında fotoğflanmıştır.

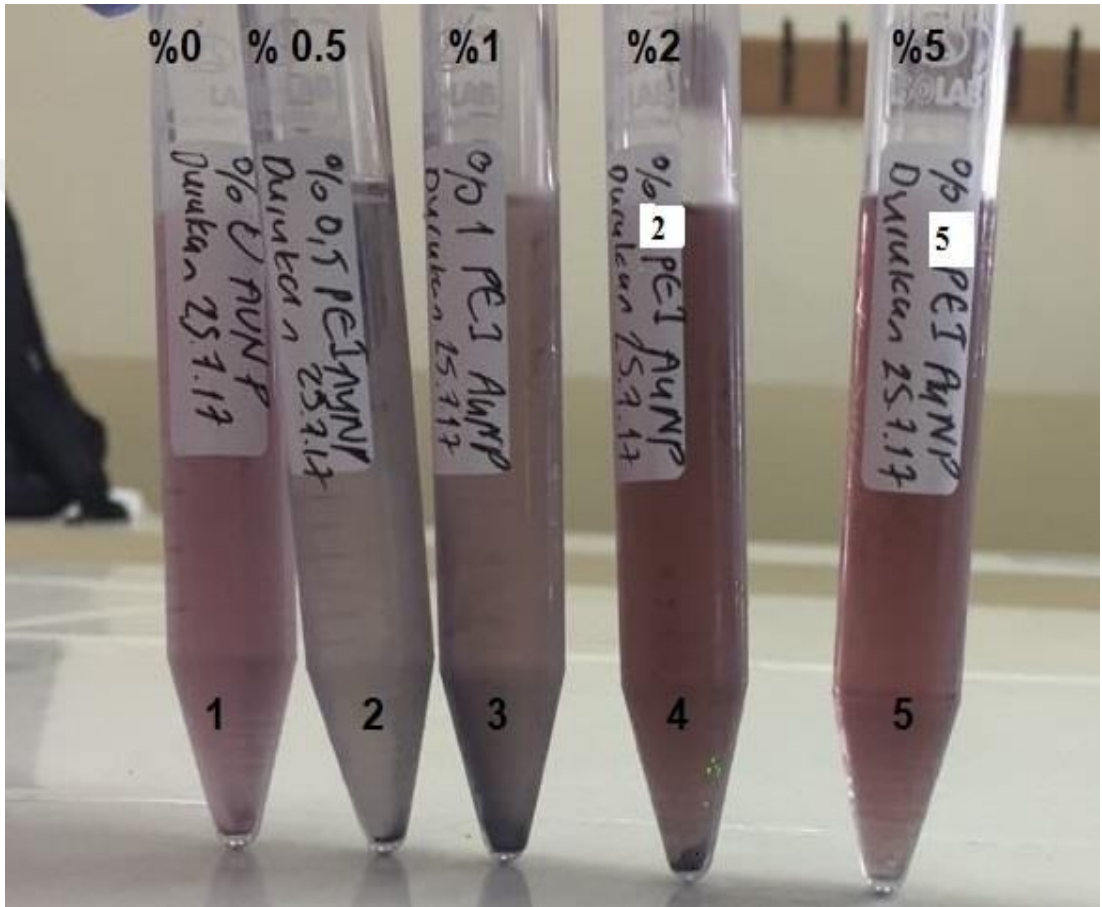
Çizelge 3.1. Agaroz Jel Elektroforezi için hazırlanan AuNP/PEI/İF/siRNA örnekleri

siRNA	Nanopartikül (AuNP/PEI/İF)
200 nM - 10 µl	% 5 - 10 µl
200 nM - 10 µl	% 2 - 10 µl
200 nM - 10 µl	% 1 - 10 µl
200 nM - 10 µl	-
100 nM - 10 µl	% 5 - 10 µl
100 nM - 10 µl	% 2 - 10 µl
100 nM - 10 µl	% 1 - 10 µl
100 nM - 10 µl	-

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Elde Edilen Altın Nanopartikülün Karakterizasyonu

PEI/AuNP/İF nanopartikülleri boyutları ve yüzey yükleri Zeta-Sizer cihazında ölçülerek karakterize edilmiştir. Ayrıca üretilen AuNP' lerin konsantrasyonlarına bağlı olarak renk değişimleri de gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

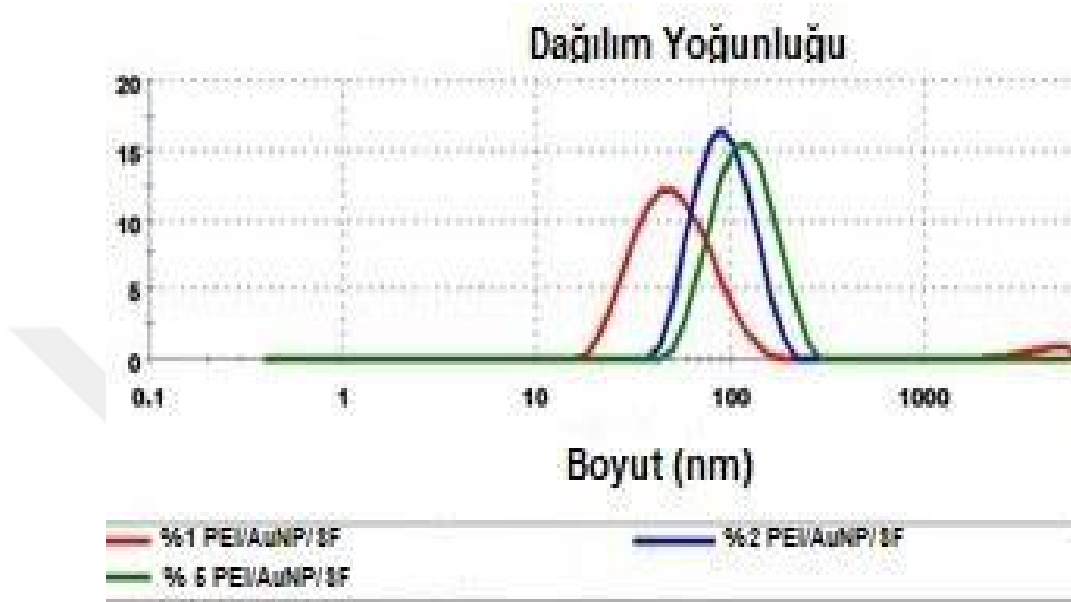


Şekil 4. 1. PEI konsantrasyonuna bağlı AuNP üretimi

- 1- De-iyonize suda lazer ablasyon yöntemiyle üretilen AuNP
- 2- %0.5 PEI konsantrasyonunda lazer ablasyon yöntemiyle üretilen AuNP
- 3- %1 PEI konsantrasyonunda lazer ablasyon yöntemiyle üretilen AuNP
- 4- %5 PEI konsantrasyonunda lazer ablasyon yöntemiyle üretilen AuNP
- 5- %10 PEI konsantrasyonunda lazer ablasyon yöntemiyle üretilen AuNP.

4.1.1. Nanopartikül Boyut Analizi

PEI/AuNP/İF nanopartiküllerinin boyut dağılımı Zeta-Sizer cihazında yapılmıştır (Şekil 4.2).



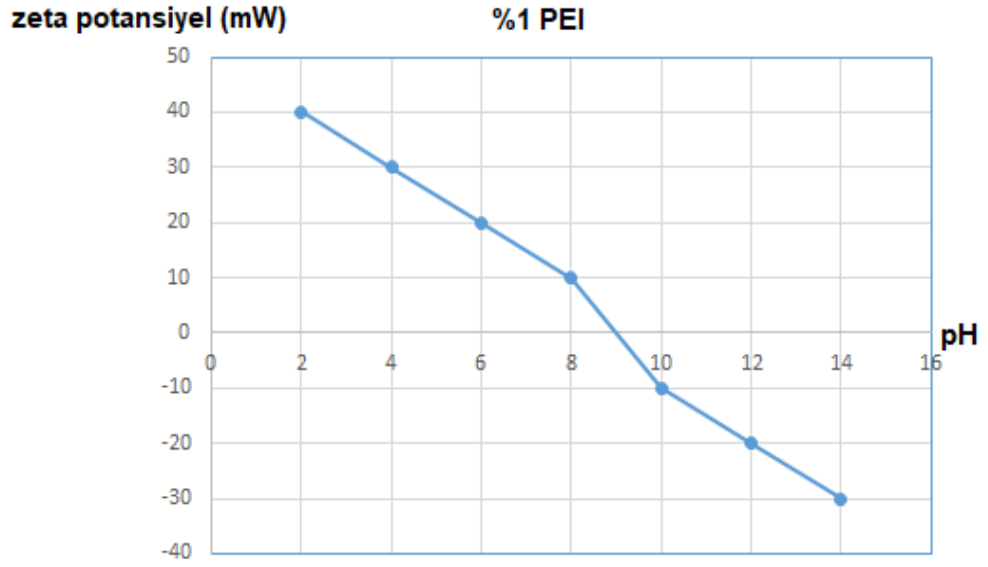
Şekil 4. 2. PEI/AuNP/İF nanopartikülün boyut dağılımı

- %1 PEI/AuNP/İF ~ 80 nm
- %2 PEI/AuNP/İF ~ 90 nm
- %5 PEI/AuNP/İF ~100nm

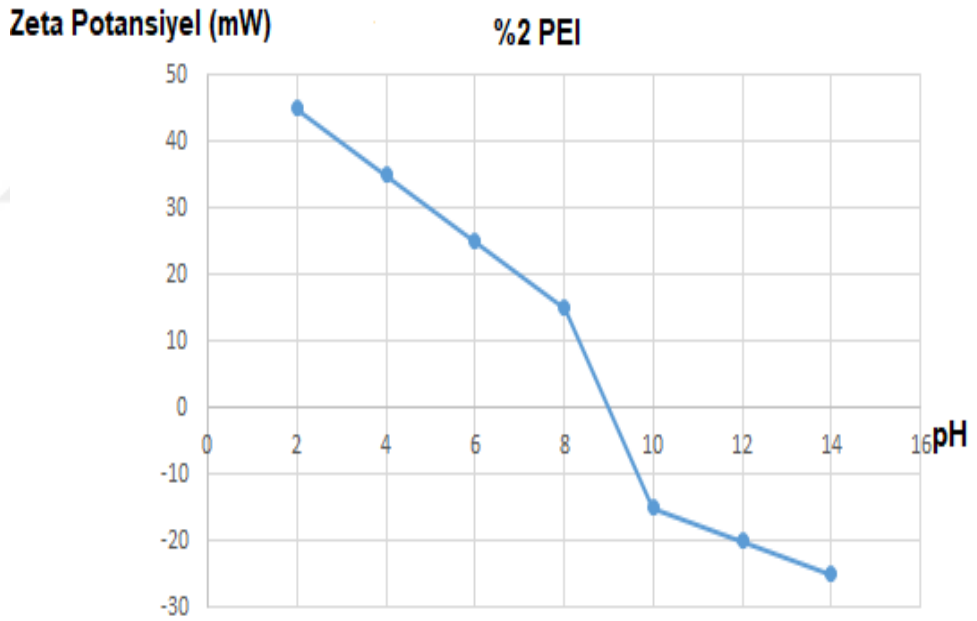
Şekil 4.2 de görüldüğü gibi; %1 PEI/AuNP/İF'nin boyutu yaklaşık 80 nm, %2 PEI/AuNP/İF boyutu yaklaşık 90 nm ve %5 PEI/AuNP/İF' nin boyutu da yaklaşık 100 nm olarak ölçülmüştür.

4.1.2. Nanopartikül Yük Analizi

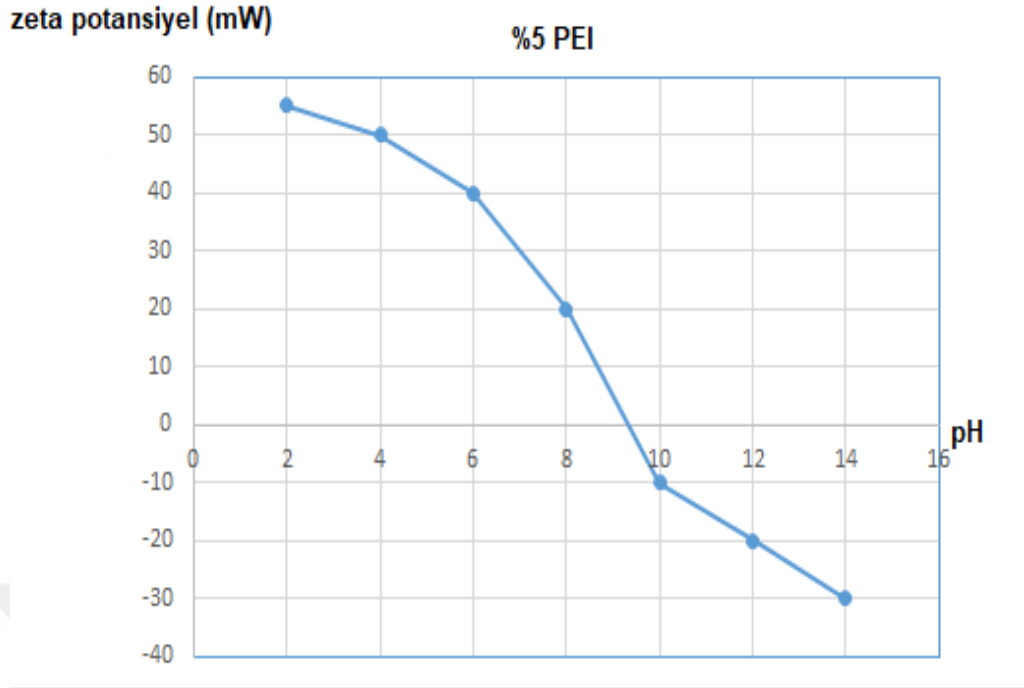
%1, %2 ve %5 PEI konsantrasyonunda lazer ablasyon yöntemi ile üretilen altın nanopartiküllerin yük analizleri Zeta-Sizer cihazında ölçülmüştür ve sonuçlara göre izoelektrik pH noktası oluşturulmuştur. %1 lik PEI/AuNP sonucu Şekil 4.3'de, %2 lik PEI/AuNP sonucu Şekil 4.4 'de, %5 lik PEI/AuNP sonucu ise Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. %1 PEI/AuNP Zeta Potansiyeli Sonuçları



Şekil 4.4. %2 PEI/AuNP Zeta Potansiyeli Sonuçları

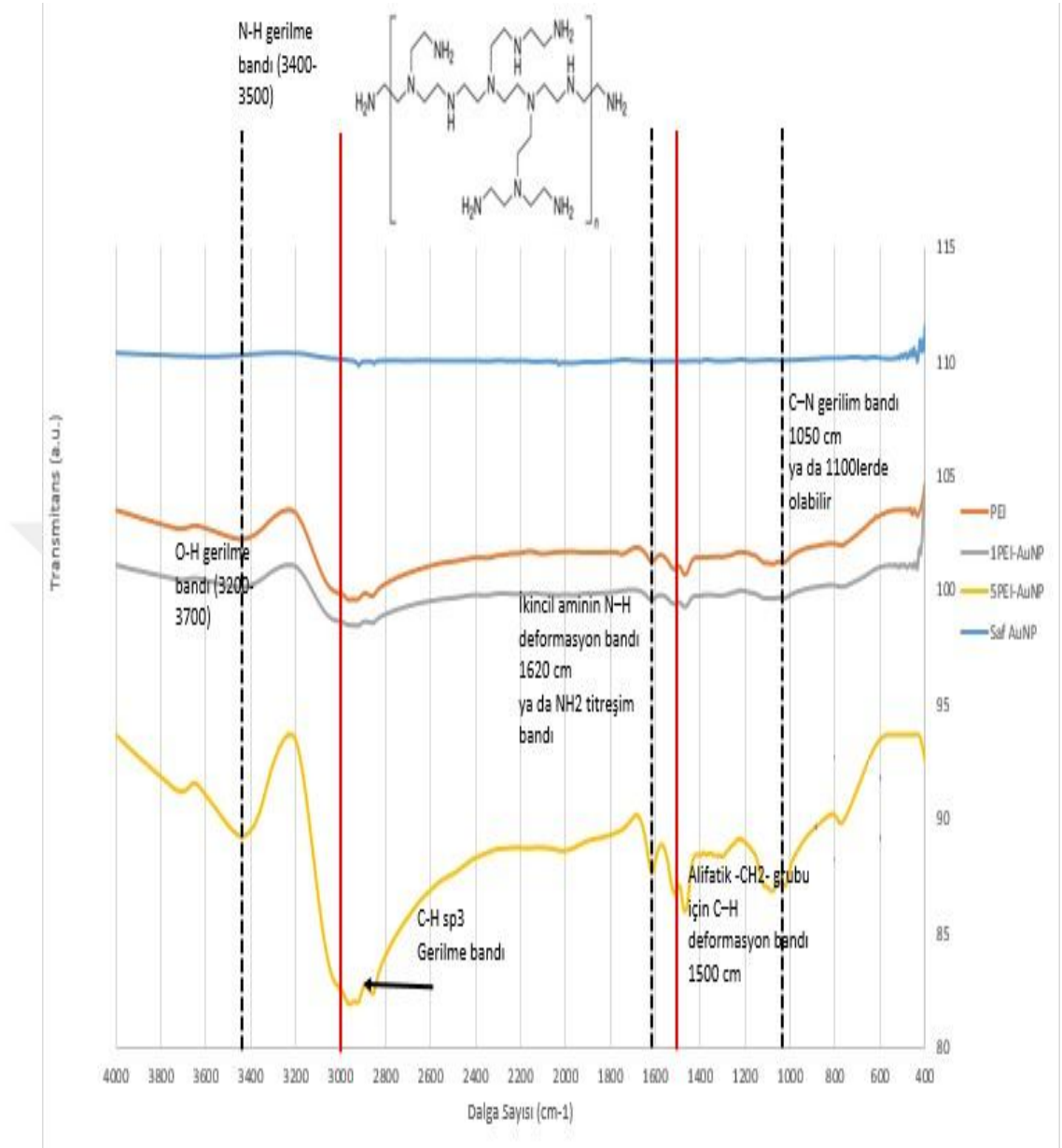


Şekil 4. 5. %5 PEI/AuNP Zeta Potansiyeli Sonuçları

Bu sonuçlara göre PEI/AuNP konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyeli değeri artmaktadır. pH noktası 8 seviyesinden yukarı çıktıkça zeta potansiyeli negatif yönde ilerlemektedir.

4.2. PEI/AuNP Komplekslerinin FTIR Testi Sonuçları

PEI, AuNP'nin birbirlerine bağlanıp bağlanmadığını göstermek amacıyla FTIR testi yapılmıştır. Bu test kapsamında hazırlanan % 1 PEI/AuNP, % 5 PEI/AuNP, % 5 PEI, deiyonize suda üretilmiş AuNP örneklerinden bir damla alınarak FTIR cihazında ölçüm yapılmış ve her bir örnek için ve örneklerin birbirleriyle olan bağlantıları ve transmittans değerleri Şekil 4.6 da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; C-N atomları arasındaki gerilim bandının 1050 cm civarında olduğu tespit edilmiştir. Alifatik -CH₂ grubu için C-H deformasyon bandı 1500 cm civarında ölçülmüştür. İkincil aminin N-H deformasyon bandı 1620 cm civarında olduğu gösterilmiştir. O-H gerilme bandı ise 3200 ve 3700 cm arasında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 6. PEI/AuNP Komplekslerinin FTIR Testi Sonuçları

FTIR testinden elde edilen sonuçlara göre; dallanmış halde bulunan PEI (Polietilenimin)'nin ve AuNP (Altın Nanopartikül)'ün hangi transmittans değerlerinde, hangi dalga boylarında pik verdiği ve birbirleriyle bağlandığı gösterilmiştir.

4.3. PEI/AuNP/İF Kompleksinin Bağlanıp Bağlanmadığının Kontrolü

PEI/AuNP/İF kompleksinin birbirine bağlanıp bağlanmadığını anlamak için diyaliz membran deneyi yapılmıştır. Yaklaşık 10 cm uzunluğunda diyaliz membranından kesilerek, içerlerine AuNP/PEI ve AuNP/PEI/İF komplekslerinden 30 ml konulmuştur. İple iki ucundan bağlanan diyaliz membran karıştırıcı üzerine oda sıcaklığında konulmuştur. Bir balık yardımıyla hareket eden de iyozone su içerisindeki diyaliz membranda difüzyonlar meydana gelmiştir. Bu deneyde 20 kD'luk geçirgenliğe sahip diyaliz membranın AuNP/PEI kompleksini geçirdiği ve membranın büzüştüğü gözlenmektedir [Şekil 4.7. (2)]. Ancak ipek fibroinle kaplandıklarında hacimlerinin artması nedeniyle, diyaliz membranda kaldıkları ve membranın şiştiği gözlenmiştir [Şekil 4.7. (1)]. Bu işlemlerde kullanılan de iyonize su 3 saat aralıklarla değiştirilerek, ortamın sürekli temiz kalması ve yüksek saflıkta diyaliz işleminin gerçekleşmesi sağlanmıştır.

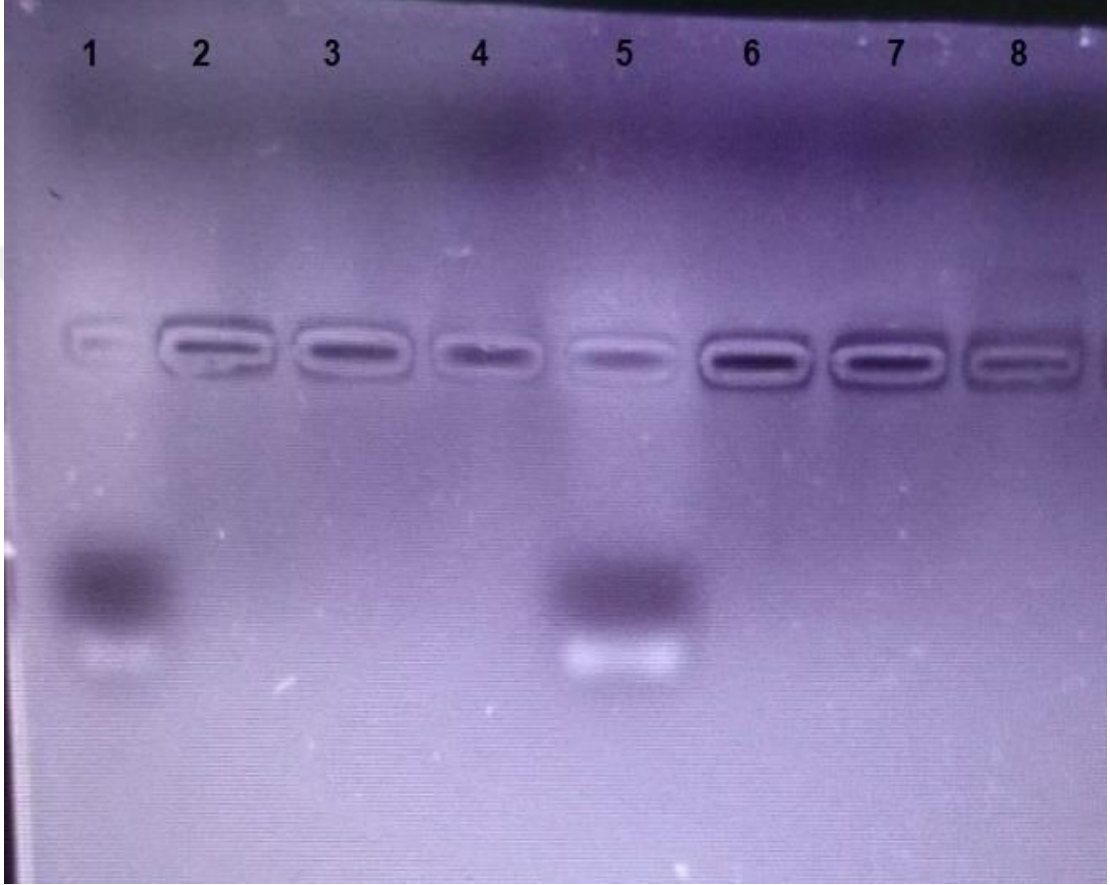


Şekil 4.7. Diyaliz membrandaki PEI/AuNP ve PEI/AuNP/İF durumu

1- PEI/AuNP/İF kompleksi, 2- PEI/AuNP kompleksi

4.4. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Agaroz Jel Elektrofrez Sonuçları

Farklı konsantrasyonlardaki PEI/AuNP/İF Nanopartiküllerin 100 nM ve 200 nM siRNA ile bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amacıyla %1' lik hazırlanan agaroz jel elektrofrezinde yürütülmüştür ve sonuçlar UV ışık altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. siRNA ve farklı konsantrasyonlara sahip PEI/AuNP/İF nanopartiküllerin birbirlerine bağlanması

1- 200 nM siRNA, 2- 200 nM siRNA + %5 NP, 3- 200 nM siRNA + %2 NP, 4- 200 nM siRNA + %1 NP, 5- 100 nM siRNA, 6- 100 nM siRNA + %5 NP, 7- 100 nM siRNA + %2 NP, 8- 100 nM siRNA + %1 NP.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında yapılan tüm testler ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

İlk olarak farklı konsantrasyonlarda Polietilenimin (PEI) çözeltisi hazırlanmıştır. PEI kullanılmasındaki nedenlerden biri güçlü katyonik özellikte olmasıdır. Ancak hangi konsantrasyonda kullanılacağıın tam olarak belirlenememesinden dolayı %1, %2 ve %5 konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

PEI çözeltilerinin pH değerlerine bakılmıştır ve bazik özellikte olduğu gözlemlenmiştir. Hidro Klorik Asit (HCl) ile pH değeri 2 ila 14 seviyelerinde ayarlanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PEI çözeltileri içerisinde, 5 cm mesafeden 1064'lük lazer ucuyla 1000 basım olacak şekilde lazer ablasyon yöntemi ile Altın Nanopartikül (AuNP) üretimi gerçekleştirilmiştir. pH değişimleri yaşamamak için sıcaklık 25-28 0C arasında tutulmuştur.

Pembe renkte gözüken AuNP'ler üretilmiştir. %0.5 PEI/AuNP konsantrasyonunda bilinen AuNP rengi olan pembe renk, belirgin bir şekilde görülemedi. Deiyonize su içerisinde üretilen AuNP, %0.5 PEI/AuNP, %1 PEI/AuNP, %2 PEI/AuNP ve %5 PEI/AuNP konsantrasyonlarından %1 PEI/AuNP, % 2 PEI/AuNP ve % 5 PEI/AuNP' nin zeta - sizer cihazıyla zeta potansiyellerine ve boyutlarına bakılmıştır. Her üç konsantrasyon için 2 ila 14 pH aralığında yüzeysel yük dağılımına bakılmış ve katyonik özellikte olduğu gösterilmiştir. Ayrıca boyut analizlerinin de 100 nm altında boyutta olduğu belirlenmiştir.

Hücreye aktarılma kısmında sitotoksiteyi azaltmak, yanlış bağlanmaların önüne geçmek için kullanılan İpek Fibroin (İF), PEI/AuNP'ne bire bir oranında eklenmiştir.

İF' nin AuNP/PEI nanopartikülüne bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek için diyaliz membran yapılmıştır. Diyaliz membran yalnız PEI/AuNP varlığında yumuşamış ve turgor basıncı azalmıştır. PEI/AuNP/İF çözeltisi ise daha da şişmiş ve

turgor basıncı artmıştır. Bu deney bize İF 'nin nanopartikülle birleştiğini göstermiştir.

Elde edilen altın nanopartiküllerin farklı dalga boylarında verdiği bantları göstermek için FTIR test yapılmıştır. Bu test, çözelti içerisindeki gerilme bantlarını ve kimyasal yapıları bize vermiştir. C-N atomları arasındaki gerilme bandının 1050 cm civarında olduğu tespit edilmiştir. Alifatik -CH₂ grubu için C-H deformasyon bandı 1500 cm civarında ölçülmüştür. İkincil aminin N-H deformasyon bandı 1620 cm civarında olduğu gösterilmiştir. O-H gerilme bandı ise 3200 ve 3700 cm arasında olduğu tespit edilmiştir. Au/PI/İF kompleksinin birbirine bağlandıkları gözlenmiştir.

Daha sonra kanserli hücrelerin tedavisi amacı ile hücrelere göndermek için elde ettiğimiz bu taşıyıcı sistemin siRNA ile bağlanması için, farklı konsantrasyonlarda üretilen PEI/AuNP/İF nanopartikülleri 100 nM siRNA ve 200 nM siRNA ile birleştirilip, agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve UV ışık altında gözlemlenmiştir. Buna göre; bütün konsantrasyonlarda siRNA ile birleşmenin sağlandığı tespit edilmiştir.

siRNA'nın kanser tedavisinde PEI/AuNP/İF kompleksleri ile birlikte kullanılabileceği ilk kez yapılan bu tez çalışması ile gösterilmiştir. siRNA'nın PEI/AuNP/İF kompleksi ile birbirine bağlandığı ve hücreye aktarılma aşamasına hazır hale getirilen bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir.

Gen tedavisindeki en önemli amaç, genin hücre içine taşınması, taşınan bu genin etkinliğini tedavi boyunca sürdürebilmesi, bu genin konakçıya uygun yapıda olması ve ayrıca herhangi bir başka hastalığa yol açmamasıdır. Bunlar bir sorun gibi görülmese de bu işlemlerdeki en önemli problem gen transferinin nasıl gerçekleştirileceğidir. Bunun için bu noktadaki siRNA'nın nanopartiküllerle taşınması önem kazanmaktadır.

Pisuvan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada altın nanopartiküllerin taşıyıcı sistemlerdeki rolü, ilaç salımındaki gen ve gen dağılımları üzerindeki etkileri anlatılmıştır [86].

siRNA ile gen terapisi, günümüzün ve gelecek nesillerin çeşitli ölümcül hastalıklarının tedavisi için yenilikçi bir kavrayışa karşı muazzam bir etki ve olasılık göstermesine rağmen, yine de, bununla ilişkili bir takım ciddi endişeler vardır. Bunlardan başlıcaları, kötü farmakokinetik özellikler, hedef dışı etkiler ve interferon yanıtı gibi biyolojik kısıtlamalardır. Ayrıca, düşük transfeksiyon verimliliği, kısa biyolojik yarı ömür, zayıf penetrasyon; bazen istenmeyen hücre ölümlerine sebebiyet vermektedir. siRNA'yı istenen hücrelere hedeflemek ve transfer etmek için verimli bir taşıyıcı sistemin olmaması, siRNA bazlı transfer yaklaşımının önemli bir sıkıntısıdır. Nanoparçacık-siRNA konjugatlarının, kan akışında anyonik serum proteinleri tarafından kolayca ayıklanabildiği ve bağışıklık hücreleri tarafından kolayca ayırt edilebileceği iyi bilinmektedir. Bu engellerin üstesinden gelmek için, kullanılan taşıyıcı sistemlerin boyut, yüzey işlevselliği ve çekirdek yapıları bakımından iyi seçilmeleri gerekmektedir [49].

Araştırmalar, nano-taşıyıcılar içinde konjuge edilmiş siRNA'nın, etkin antikanser aktivitesi için faydalı sonuçlar verebileceğini göstermiştir [87].

Gautier ve arkadaşlarının [88] yaptıkları çalışmada PEI'nin siRNA temelli taşıyıcı sistemlerde kullanılarak başarıya ulaşıldığı gösterilmiştir.

Günther ve arkadaşlarının [89] yaptıkları başka bir çalışmada ise; PEI ve PEI türevlerinin siRNA'lar için verimli ve biyo-uyumlu bir dağıtım polimeri olduğu, patolojik olarak ilgili genlerin nakavt edilmesi için ümit verici bir yaklaşım sunduğu gösterilmiştir.

Yu Liu ve arkadaşlarının [83] yaptığı çalışmada; İF (İpek Fibroin) kaplı PEI gen vektörleri kullanılarak HEK 293 ve HCT 116 hücrelerine transfeksiyon yapılmıştır. ASF, sitotoksitesini azaltmak ve HEK 293 ile HCT 116 hücrelerine gen transfeksiyonunu arttırmak için PEI/DNA kompleksleri kullanılmıştır. Ayrıca, ASF'deki RGD hücre bağlama motiflerine dayanan ASF/PEI/DNA kompleksleri, yüzeyleri üzerinde integrinlere sahip olan HCT 116 hücrelerinde geliştirilmiş transfeksiyon etkinliğini güçlü bir şekilde desteklemiştir. LDH salınımının sonuçları transfeksiyon verimliliği ile iyi bir uyum içinde idi; yani ASF/PEI/DNA kompleksleri, özellikle HCT 116 hücrelerinde, PEI/DNA'dan daha fazla LDH salınmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar, bu ASF kaplı PEI taşıyıcının, tek başına

PEI'den daha kolay ve etkili bir hedefleme vektörü olduğunu ve nonviral gen vektörlerinin gen transfeksiyon yeteneğini geliştirmek için ümit verici bir araç olarak geliştirilebileceğini göstermektedir. Biz de çalışmamızda PEI/AuNP kompleksini İF ile kaplayarak daha yüksek transfeksiyona imkan sağlamış olduğunu tespit ettik.

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması ile; kanser tedavisinde kullanılmak üzere siRNA taşıyan pozitif yüklü PEI/AuNP/İF kompleksi kanserli hücelere gönderilerek orada istenen proteinleri hedefleyip onların proliferasyonunu engellemek için amaçlanan taşıyıcı bir sistem üretilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre de yapılan bu çalışma; kanserli hücelerin tedavisinde PEI/AuNP/İF komplekslerinin birlikte kullanılabilirliğini ve kanserli hücelerin proliferasyonunu durduran bir taşıyıcı sistemin ileride yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Ding, Y., Jiang, Z., Saha, K., Kim, C.S., Kim, S.T., Landis, R.F., Rotello, V.M., Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery, *The American Society of Gene & Cell Therapy*, 22: 6, 1075-1083, 2014.
- [2] Pantarotto, D., Singh, R., McCarthy, D., Erhardt, M., Briand, J.P., Prato, M., Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed, Engl* 43: 5242–5246, 2004.
- [3] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C.K., Rotello, V.M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 1307–1315, 2008.
- [4] Vinhas, R., Fernandes A.R., Baptista Pedro, V., Gold Nanoparticles for BCR-ABL1 Gene Silencing: Improving Tyrosine Kinase Inhibitor Efficacy in Chronic Myeloid Leukemia, *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 7: 408-416, 2017.
- [5] Öncel, B., Pınarç1, E., Aydın Akova, Y., A New Approach for the Treatment of Glaucoma; *Gene Therapy, Glo-Kat* 7:1-6, 2012.
- [6] Deng, Y., Wang, C.C., Choy, K.W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Kwok, T., Chung, H., Tang, T., Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies a Department of Obstetrics & Gynaecology, Faculty of Medicine, 1;538(2):217-27, 2014.
- [7] Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., Introduction of A Chimeric Chalcone Synthase Gene Into Petunia Result in Supression of homologous Reversible Co-supression of Homologous Genes in Trans, *The Plant Cell*, 2: 279- 289, 1990.
- [8] Alexander R., et al., An Anti-sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation, *Nature*, 333: 866- 869, 1988.

- [9] Atalay A., RNA İnterferans Kursu, s. 25, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yaşam Bilimleri Kursları Serisi, Ankara, 2007.
- [10] Gündoğdu, R., Çelik, V., Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 25 (1-2) 34 – 47, 2009.
- [11] Saka, O.M., Anti-Anjigonik etki gösteren non-viral gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar, Farmösotik Teknoloji A.B.D Doktora Tezi. Ankara, 2009.
- [12] Martins, P., Rosa, D., Fernandes, A.R., Baptista, P.V., Nanoparticle Drug Delivery Systems: Recent Patents and Applications in Nanomedicine, Recent Pat. Nanomed. 3: 1–14, 2013.
- [13] Huang, X., El-Sayed, M.A., Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, J. Adv. Res., 1: 13–28, 2010.
- [14] Sharma, H., Mishra, P.K.; Talegaonkar, S.; Vaidya, B. Metal nanoparticles: A theranostic nanotool against cancer. Drug Discov., 20: 1143– 1151, 2015.
- [15] Arvizo, R., Bhattacharya, R., Mukherjee, P., Gold nanoparticles: Opportunities and challenges in nanomedicine. Expert Opin. Drug Deliv., 7: 753–763, 2010.
- [16] Chichkov, B.N., Momma C.S., Nolte, F., Alvensleben V., Tünnermann, A., Femtosecond, Picosecond And Nanosecond Laser Ablation Of Solids, Applied Physics A Materials Science, 63 (2): 109–115, 1996.
- [17] Kim, K.K.,Kwon, H.J., Shin, S.K., Song, J.K., Park, S.M., Stability of uncapped gold nanoparticles produced by laser ablation in deionized water: The effect of post-irradiation, Chemical Physics Letters 588: 167–173, 2013.

- [18] Akay, O., Ak, F., Preparation of Silk Fibroin Cryogels And Investigation Of Their Mechanical Properties, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014
- [19] Anonim, Sağlık ve ilaç Teknolojileri, Kanser Tedavisinde Nano Taşıyıcı Sistemler, <http://www.kimyasalgelismeler.com>, (Erişim Tarihi 11.03.2018).
- [20] Tüylek, Z., İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşimler, Dergipark, Değim İ. Farmasötik Nanoteknoloji. Mised; 8-13; 198–205, 2011.
- [21] Wang, X., Zhang, L., Lee, S., Dai, H., Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging, A Cancer Journal For Clinicals, 58(97): 2008.
- [22] Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D.M., Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, Cancer Nanotherapeutics for Drug Delivery, 14(5): 2008.
- [23] Saltzman, W.M., Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy. New York: Oxford University Press. RS199:5. S25, 2001.
- [24] Tüylek, Z., Drug Delivery Systems and Nanotechnological Interaction, Bozok Tıp Derg., 7(3): 89-98, 2017.
- [25] Hanks, N.A., J.A., Zhang, C.P., Assessing Pistia stratiotes for phytoremediation of silver nanoparticles and Ag(1) contaminated waters, Journal of Environmental Management, 164: 41-45, 2015.
- [26] Haverkamp, R.G., Marshall, A.T., The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: Limit on accumulation, Journal of Nanoparticle Research, 11, (6): 1453-1463, 2009.

- [27] Haverkamp, R.G., Marshall, A.T., Van Agterveld, D., Pick your carats: Nanoparticles of gold-silver-copper alloy produced in-vivo, *Journal of Nanoparticle Research*, 9, (4): 697-700, 2007.
- [28] Siripattanakul-Ratpukdi S., Ploychankul, C., Limpiyakorn, T., Vangnai, A.S., Khan, E.R., Mitigation of Nitrification Inhibition by Silver Nanoparticles Using Cell Entrapment Technique, *Journal of Nanoparticle Research*, 16, (2): 2014.
- [29] Asztemborska M., Steborowski, R., Kowalska J., Bystrzejewska-Piotrowska, G., Water, Air, and Soil Pollution, Accumulation of Platinum Nanoparticles by *Sinapis alba* and *Lepidium sativum* Plants. 226, (4):, 2015.
- [30] Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J.M., Gold Nanoparticle-based electro chemical biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, (4): 884-886, 2005.
- [31] Nie, S., Xing, Y., Kim, J.G., Simons, J.M., *Nanotechnology Applications in Cancer*, *Annual Review Biomed Engineering*, vol. 9: 257 – 88, 2007.
- [32] Üçüncü Tunca, E., *Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu*, *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, Cilt:5, Sayı:2, 2015.
- [33] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A., Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *J Phys Chem B*. 17;110(32):15700-7, 2006.
- [34] Muddineti, O.S., Ghosh, B., Biswas, S., Current trends in using polymer coated gold nanoparticles for cancer therapy. *Int. J. Pharm.*, 484: 252– 267, 2015.
- [35] Mishra, H., Talegaonkar, P.K., Vaidya, S.B., Metal nanoparticles: A theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov.*, 20: 1143– 1151, 2015.

- [36] Yetişgin, A.A., Güney, B.C., Altın Nanopatüküllerin Tanı ve Tedabide Kullanımı, İstanbul Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Lisans Projesi, 2017
- [37] Díaz, M.R., Pablo, E., Mejia, V., Nanoparticles as Drug Delivery Systems in Cancer Medicine: Emphasis on RNAi-Containing Nanoliposomes, *Pharmaceuticals*, 6:1361-1380, 2013
- [38] Pedrosa, P., Vinhas, R., Fernandes, A., Baptista, P., Gold Nanotheranostics: Proof-of-Concept or Clinical Tool?, *Nanomaterials*, 5:1853–1879, 2015.
- [39] Cabral, R.M., Baptista, P.V., Anti-cancer precision theranostics: A focus on multifunctional gold nanoparticles. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 14: 1–12, 2015.
- [40] Cabral, R.M., Baptista, P.V., The Chemistry and Biology of Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Promises and Challenges. *Nano Life*, 3: 1330001, 2013.
- [41] Jain, S., Hirst, D.G., O’Sullivan, J.M., Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br. J. Radiol.*, 85: 101–113, 2012.
- [42] Abadeer, N.S., Murphy, C.J., Recent Progress in Cancer Thermal Therapy using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, 120: 4691–4718, 2016.
- [43] You, L., Huang, C., Lu, F., Wang, A., Liu, X., Zhang, Q., Facile synthesis of high performance porous magnetic chitosan - polyethylenimine polymer composite for Congo red removal, *International Journal of Biological Macromolecules* 107: 1620–1628, 2018.
- [44] Venkiteswaran, S., Thomas, T., Thomas, T.J., Selectivity of polyethyleneimines on DNA nanoparticle preparation and gene transport, *Chem. Select.* 1 (6): 1144–1150, 2016.

- [45] Yue, Y., Jin, F., Deng, R., Cai, J., Dai, Z., Lin, M.C., Revisit complexation between DNA and polyethylenimine effect of length of free polycationic chains on gene transfection, *J. Control. Release* 152 (1): 143–151, 2011.
- [46] Parhamifar, L., Larsen, A.K., Hunter, A.C., Andresen, T.L., Moghimi, S.M., Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine, *Soft Matter* 6 (17): 4001–4009, 2010.
- [47] Ulasov, A.V., Khramtsov, Y.V., Trusov, G.A., Rosenkranz, A.A., Sverdlov, E.D., Sobolev, A.S., Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy, *Mol. Ther.* 19 (1): 103–112, 2011.
- [48] Oskuee, R.M., Dabbaghi, M., Gholami, L., Bojd, S.T., Balali-Mood, M., Mousavi, S.H., Malaekheh-Nikouei, B., Investigating the influence of polyplex size on toxicity properties of polyethylenimine mediated gene delivery, *Life Sciences* 197, 2018.
- [49] Kunath, K., Merdan, T., Hegener, O., Häberlein, H., Kissel, T., Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer. *J Gene Med.*;5(7):588-99, 2003.
- [50] Hubbe, M., Associate Professor of Wood and Paper Science, NC State University, m_hubbe@ncsu.edu. (Erişim Tarihi: 14.04.2018).
- [51] Giammanco, F., Giorgetti, E., Marsili, P., Giusti, A., Experimental and theoretical analysis of photofragmentation of Au nanoparticles by picosecond laser radiation, *J. Phys. Chem. C* 114: 3354, 2010.
- [52] Giorgetti, E., Marsili, P., Canton, P., Muniz-Miranda, M., Caporali, S., Giammanco, F., Cu/Ag-based bifunctional nanoparticles obtained by one-pot laser-assisted galvanic replacement, *J. Nanoparticle Res.* 15: 1360, 2013.

- [53] Barcikowski, S., Devesa, F., Moldenhauer, K., Impact and structure of literature on nanoparticle generation by laser ablation in liquids, *J. Nanopart. Res.* 11: 1883–1893, 2009.
- [54] Dell’Aglio, M., Gaudiuso, R., De Pascale, O., De Giacomo, A., Mechanisms and processes of pulsed laser ablation in liquids during nanoparticle production, *Appl. Surf. Sci.* 348: 4–9, 2015.
- [55] Zheng, H., Xi-When D., Singh, S.C., Kulinich, S.A., Yang, S., He, J., Cai, W., Nanomaterials via laser ablation/irradiation in liquid: a review, *Adv. Funct. Mater.* 22: 1333, 2012.
- [56] Gondal, M.A., Saleh, T.A., Drmosh, Q.A., Synthesis of nickel oxide nanoparticles using pulsed laser ablation in liquids and their optical characterization, *Appl. Surf. Sci.* 258: 6982, 2012.
- [57] Rehbock, C., Jakobi, J., Gamrad, L., van der Meer, S., Tiedemann, D., Taylor, U., Kues, W., Rath, D., Barcikowski, S., Current state of laser synthesis of metal and alloy nanoparticles as ligand-free reference materials for nano- toxicological assays, *J. Nanotechnol.* 5: 1523–1541. 2014.
- [58] Amendola, V., Meneghetti, M., What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15: 3027, 2013.
- [59] Palazzo, G., Valenza, G., Dell Aglio, M., De Giacomo, A., On the stability of gold nanoparticles synthesized by laser ablation in liquids, *Journal of Colloid and Interface Science* Volume 489, :47-56, 2017.
- [60] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Principles of Instrumental Analysis.* 5th Edition, 1998.

- [61] Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., Giesbrecht, P., The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy. In: Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, Nelson WH (chief ed.) VCH, New York, 43–96, 1991.
- [62] Maquelin, K., Choo-Smith, L.P., Kirschner, C., Ngo-Thi, N.A., Naumann, D., Puppels, G.J., Vibrational spectroscopic studies of microorganisms. In: Handbook of Vibrational Spectroscopy, Chalmers JM, Griffiths PR (eds.) Vol. 5, John Wiley & Sons, New York, 3308– 3334, 2002
- [63] Dziuba, B., Babuchowski, A., Nalecz, D., Niklewicz, M., Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *Int Dairy J*, 17: 183– 189, 2007.
- [64] Gürdeniz, G., Tokatlı, F., Özen, B., Zeytinyağında Tağşiş Tespiti İçin Fourier- Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FTIR) Spektroskopisi Kullanımı, Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21- 23 Erzurum, Mayıs 2008.
- [65] Gerçekaslan, K.E., Kotancılar, H.G., Karaoğlu, M.M., Ertugay, M.F., Ekmek Bayatlaması ve Bayatlama Derecesini Ölçmede Kullanılan Yöntemler: II, *Gıda the Journal of Food*, Cilt 31, Sayı 1; 2008.
- [66] Başyigit Kılıç, G., Karahan, A.G., Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ftir) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması, *gıda* 35 (6): 445-452, 2010.
- [67] Rodriguez-Saona LE, Koca N, Harper WJ, Alvarez VB, Rapid determination of Swiss cheese composition by fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *J Dairy Sci*, 89, 1407-1412, 2006.
- [68] Anonim, FTIR Servis Bakım Validasyon, <http://www.labservis.net/cihaz-periyodik-bakim/ft-ir/>, (Erişim Tarihi 13.03.2018).

- [69] GÜNGÖR, O., HANOL, Z., Antisens Teknolojisi, <http://biyologlar.com/antisens-teknolojisi>, (Erişim Tarihi: 13.02.2018).
- [70] Karaboz, İ., Çolak, C., Antisens Teknolojisi, OrLab On-line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt:5, Sayı:2, Sayfa 14-37, 2007
- [71] Patil, S.D., Rhodes, D.G., Burgess, D.J., DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Connecticut, Storrs, CT 06269, 2005.
- [72] Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*,101: 25-33, 2000.
- [73] Zhao, Y., Srivastava, D., A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences* 32(4) 189-97, 2007.
- [74] Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R., MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol*,342: 33-47, 2006.
- [75] Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W.S., Karpilow, J., The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA*,11:674-682, 2005.
- [76] Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R., Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*,123:631-640, 2005.
- [77] Leuschner, P.J.F., Ameres, S.L., Kueng, S., Martinez, J., Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* Mar;7(3):314-20, 2006.

- [78] Fougerolles, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J., Lieberman, J., Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (6): 443–453, 2007.
- [79] Kim, D.H., Rossi, J.J., Strategies for silencing human disease using RNA interference, *Nat. Rev. Genet.* 8 (3): 173–184, 2007.
- [80] Pecot, C.V., Calin, G.A., Coleman, R.L., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., RNA interference in the clinic: challenges and future directions, *Nat. Rev. Cancer* 11:1 59–67, 2011.
- [81] Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., Mukherjee, S.K., RNA Interference : Biology, Mechanism and Applications, 67:4, 657-658, 2003.
- [82] Acharya, R., Saha, S., Ray, S., Hazra, S., Mitra, M.K., Chakraborty, J., siRNA-nanoparticle conjugate in gene silencing: A future cure to deadly diseases? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 76:1378-1400, 2017.
- [83] Liu, Y., You, R., Liu, G., Li, X., Sheng, W., Yang J., Li, M., *Antheraea pernyi* Silk Fibroin-Coated PEI/DNA Complexes for Targeted Gene Delivery in HEK 293 and HCT 116 Cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 7049-7063, 2014.
- [84] Jean-Philippe, S., Kabashin, A.V., Sacher, E., Meunier, M., Luong, J.H.T., Stabilization and Size Control of Gold Nanoparticles during Laser Ablation in Aqueous Cyclodextrins, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (23): 7176–7177, 2004.
- [85] Akturk, O., Kismet, K., Yasti, A.C., Kuru, S., Duymus, M.E., Kaya, F., Caydere, M., Hucumenoglu S., Keskin, D., Wet electrospun silk fibroin/gold nanoparticle 3D matrices for wound healing applications, *RSC Advances*, 6: 13234-13250, 2016.

- [86] Pissuwan, D., Cortie, M.B., The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems, *J. Control Release*, Volume 149, Issue 1, 65-71, 2011.
- [87] Sonoke, S., Ueda, T., Fujiwara, K., Kuwabara, K., Yano, J., Galactose-modified cationic liposomes as a liver-targeting delivery system for small interfering RNA, *Biol. Pharm. Bull.* 34: 1338–1342, 2011.
- [88] Gautier, M.A., Ntoutoumea, N., Grassotb, V., Brégiera, F., Chabanaish, J., Petitb, J.M., Graneta, R., Sol V., PEI-cellulose nanocrystal hybrids as efficient siRNA deliveryagents— Synthesis, physicochemical characterization and in vitroevaluation, *Carbohydrate Polymers* 164: 258–267, 2017.
- [89] Günther, M., Lipka, J. Malek, A., Gutsch, S., Kreyling, W., Aigner, A., Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77: 438–449, 2011.