

Nanobiyoteknoloji; İlaç ve Gen Tedavisinde Taşıyıcı Nanosistemler

Nanobiotechnology; Delivery Nanosystems in Drug and Gene Therapy

AYŞE GÜLTEN KANTARCI^a

^aEge Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Biyoteknoloji ABD, İzmir, Türkiye

Yazışma Adresi/Correspondence:
Ayşe Gülten KANTARCI
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Biyoteknoloji ABD, İzmir, Türkiye
gulten.kantarci@ege.edu.tr

ÖZET Nanobiyoteknoloji biyoloji, mühendislik, fizik ve kimya alanlarındaki teknolojiyi içine alan çok disiplinli bir alandır. Biyoteknoloji ve nanoteknoloji son yılların en umut verici teknolojilerinden ikisidir. Nanoteknoloji fonksiyonel yapısı en az nanometre ölçeğinde olan malzeme ve cihazların tasarımı, geliştirilmesi ve uygulanmasıdır. Suda çözünemeyen veya biyolojik ortamlarda stabil olmayan ilaçların organizmaya verilebilmesini sağlar. Biyoteknoloji ise mikroorganizmaları da içeren biyolojik maddelerden ürün elde etmek veya onları modifiye etmektir. İki teknolojinin bir araya gelmesi, yani nanobiyoteknoloji ile günümüzde birçok sistem geliştirilmekte ve uygulanmaktadır. Nanobiyoteknoloji, hastalıklı veya iltihaplı dokuların sağlıklı dokulardan fizyolojik ve anatomik farklılıklarına dayanarak, hedefe yönelik lipozom, niosom, katı lipit nanopartikül gibi nano boyutta hedeflenebilen sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlar.

Anahtar Kelimeler: İlaç taşıyıcı sistemler; gen hedeflemesi; nanoteknoloji

ABSTRACT Nanobiotechnology is a multidisciplinary field which includes technology in biology, engineering, physics and chemistry. Biotechnology and nanotechnology are two of the most promising technologies of recent years. Nanotechnology is the design, development and application of materials and devices with functional structures at least on the nanometer scale. It permits the delivery of drugs that are water insoluble or unstable in the biological environments to the organism. Biotechnology is the production or modification of biological materials including microorganisms. Today, many systems are being developed and implemented with the combination of two technologies, called as nanobiotechnology. Nanobiotechnology offers facilities for the development of targeted nano-sized systems such as liposomes, niosomes, solid lipid nanoparticles based on the physiological and anatomical differences of diseased or inflamed tissues from healthy tissues.

Keywords: Drug delivery systems; gene targeting; nanotechnology

Nanobiyoteknoloji nanoteknolojinin biyolojik alanlarda uygulanmasıdır. Günümüzde biyoloji, mühendislik, fizik, kimya alanlarındaki teknolojiyi içine alan çok disiplinli bir alandır. Biyoteknoloji ve nanoteknoloji (nanotech olarak da tanımlanır) 21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden ikisidir. Nanobiyoteknoloji, hastalıklı veya iltihaplı dokuların sağlıklı dokulardan fizyolojik ve anatomik farklılıklarına dayanarak, hedefe yönelik nano boyutta hedeflenebilen sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlar.¹

Kullanılan nanoteknoloji suda çözünemeyen veya biyolojik ortamlarda stabil olmayan ilaçların organizmaya verilebilmesini sağlar. Ayrıca, elektronik ve robotik alanlar gibi farklı bilimsel alanlardaki gelişmelerin nanoteknolojide gen tedavisi, ilaç uygulamaları, görüntüleme ve yeni ilaç buluş tekniklerinde önemli gelişmeler sağlayacağı ümit edilmektedir.² Nanoteknoloji fonksiyonel yapısı en az nanometre ölçeğinde olan malzeme ve cihazların tasarımı, geliştirilmesi ve uygulanmasıdır. Biyoteknoloji ise mikroorganizmaları da içeren biyolojik maddelerden ürün elde etmek veya onları mo-

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:

Kantarci AG. Nanobiyoteknoloji; ilaç ve gen tedavisinde taşıyıcı nanosistemler. Koçdor H, Pabuççuoğlu A, Zihnioğlu F, Sağın F, editörler. Sağlık Biyoteknolojisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2022. p.37-44.

difiye etmektedir. İki teknolojinin bir araya gelmesi, yani nanobiyoteknoloji ile günümüzde birçok sistem geliştirilmekte ve uygulanmaktadır.¹

NANOBİYOTEKNOLOJİNİN AVANTAJLARI

Hastalıklı dokuların belirgin patofizyolojik özelliklerinin avantajlarını kullanarak ilaç hedefleme gerçekleştirilebilir. Bu şekilde ilacın hedefe özgülüğü artırılır.

- Nanopartiküllere ilaç yüklenerek ilacın hücre ve dokulardaki dağılımı değiştirilebilir, bu şekilde biyolojik aktif moleküllerin daha seçici verilmesi sağlanarak ilaç etkinliği artırılır, ilaç toksisitesi azaltılır.

- Nanosistemler iltihaplı dokularda seçici olarak lokalize olabilirler.

- Nanosistemlerle kan beyin bariyeri aşarak ilaçlar beyne hedeflenebilir.

- Tümörlerde nanosistemlerin etkisi tümör içinde artan damar geçirgenliği bozulan lenfatik drenajla birleştiğinde, daha iyi iletim ve tutulma ile artırılır.

- Çeşitli nanoürünler, konvansiyonel ilaçlardan daha yüksek konsantrasyonda birikebilir.¹

GEN TEDAVİSİNDE NANOBİYOTEKNOLOJİ KULLANIMI

Gen tedavisi birçok genetik ve edinsel hastalıkların tedavisinde artan öneme sahiptir. Gen terapisinin amacı genetik materyalin hedef dokuya etkin ve toksik olmayan bir taşıyıcı ile *in vivo* olarak başarılı bir şekilde aktarılmasıdır. Gen aktarımı için viral esaslı taşıyıcı sistemler, plazmit esaslı taşıyıcı sistemler, hibrit bileşikler, viral olmayan sistemler kullanılmaktadır.

Viral sistemler replike olmayan ancak hücrelere gen aktaran sistemlerden oluşurlar. Gen transfeksiyon etkinliği ve uzun süreli ekspresyon gibi avantajları bulunmakla birlikte güvenilirlik ve immunojenisite gibi dezavantajları vardır.

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin viral sistemlere göre birtakım üstünlükleri bulunmaktadır. DNA'yı enzimatik degradasyondan korurlar ve hücre tarafından alınımı kolaylaştırırlar. Üretimlerinde ölçü büyütme kolaydır ve kalite kontrolleri geliştirilmiştir. Gen aktarımı için güvenli, katyonik özellikte ve hedeflenebilir olmaları gerekmektedir.³ Avantajları dolayısıyla laboratuvarımızda gen taşıyıcı sistemler olarak viral olmayan nanosistemler geliştirilmiştir ve makalede çalışma örnekleri verilmiştir.

İLAÇ VE GEN TAŞIYICI SİSTEMLERİN HEDEFLENDİRİLMESİNİN ÖNEMİ

Birçok terapötik etken madde karakteristik özellikleri dolayısıyla hedef organa ulaşmakta başarılı değildir. Örneğin, kanser kemoterapisinde sitostatik ilaçlar hem kanser hücrelerine, hem de normal sağlıklı hücrelere aynı şekilde zarar verebilir. Bu nedenle, malign tümör tedavisinde, kanserli hücrelere seçici olarak ilaçların hedeflenmesine gereksinim vardır, geliştirilen nanotaşıyıcı sistemlerle anti kanser ilaçların, hormonların, nükleik asitlerin ve aşılardan daha etkili ve güvenli verilmesi sağlanabilir.²

NANOBİYOTEKNOLOJİYLE HEDEFLENDİRME MEKANİZMALARI

- **Pasif hedeflendirme;** IV enjeksiyondan sonra taşıyıcı sistemin doğal olarak hedeflenmesidir. Kolloidal partiküller, hidrofobik veya negatif yük taşıyan makromoleküller, vücut tarafından yabancı olarak tanınırsa retikuloendotelial sistem (RES) hücreleri tarafından hızla tutulurlar.

Örneğin 50 nm'den küçük moleküller dalak, kemik iliğinde, 100 nm'den küçük moleküller lenf düğümlerinde tutulurlar.

- **Aktif hedeflendirme;** İlaç veya ilaç taşıyıcı sistemler, özgülük veren, ilacın dağılımını etkileyen birtakım ekler içerirler. Bu ekler, eritrosit membran glikoproteinleri, doğal immüno globulinler, monoklonal antikolar olabilir.

Ultrasonun nanoilaçlarla kombinasyonunda kanser, Alzheimer ve osteoartrit gibi hastalıkların tedavisinin etkinliğini artırma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.⁴ İlaçların taşınması ve nanotaşıyıcı sistemlerden salınması ultrason kullanılarak tetiklenebilmektedir.⁵

Ayrıca, manyetik nanosistemler oluşturularak da manyetik hedefleme yapılabilir. Manyetik nanopartiküller etkili ilaç hedeflemede yeni fırsatlar sunar. Manyetik nanaopartiküllerin potansiyel faydası lokalize manyetik alan gradyanı kullanarak seçilen hedefe partikülleri çekerek tedavi bitene kadar o bölgede tutma ve sonra oradan uzaklaştırma olanağı sağlayabilmektedir.⁶

TEDAVİDE KULLANILAN NANOSİSTEMLER

Biyoloji alanında ve polimer kimyasındaki gelişmeler ve bu alanların nanoteknoloji ile etkileşimleri ilaçların uygulanmasında büyük yenilik getirmiştir. Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistem (<1000 nm) olarak aşağıda belirtildiği gibi birçok sistem geliştirilmiştir:

- Katyonik lipid-nükleik asit kompleksleri (lipopleksler)
- Katyonik polimer-nükleik asit kompleksleri (Polypleksler)
 - Emülsiyonlar
 - Lipozomlar
 - Niozomlar
 - Nanopartiküller
 - Katı lipid nanopartiküller
 - Manyetik nanopartiküller
 - Dendrimerler
 - Polimerik miseller
 - Nanorod
 - Nanofiberler

MİKROEMÜLSİYONLAR

Mikroemülsiyonların dermal yolla ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulanmasına örnek olarak analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkisi olan diklofenak sodyum model madde olarak seçilerek, soya yağı, brij 58, Span ve etanol ile geliştirilen s/y mikroemülsiyon formülasyonuna yüklenmiştir. Tavşan derisiyle yapılan permeasyon çalışmaları sonucunda ilacın yüklendiği mikroemülsiyon formülasyonunun solüsyon formuna kıyasla istatistiksel olarak önemli derecede permeasyonu artırdığı gösterilmiştir.⁷

Laboratuvarımızda parenteral uygulama için model madde mitomisin-C radyoaktif işaretlenerek soya yağı, lesetin, polisorbata 80, etanol ve su ile geliştirilen y/s mikroemülsiyon formülasyonuna yüklenmiş ve tavşanlara IV verilerek gama kamera görüntülemesiyle biyodağılımına bakılmıştır. Mitomisin C solüsyonuna kıyasla, mikroemülsiyonun karaciğer ve dalağa hedeflendiği, organizmadan atılımının geciktiği gösterilmiştir. Mitomisin-C solüsyonu 30 dakikada mesanede gözlenirken, mikroemülsiyon formülasyonu ile verilen mitomisin-C, 90 dakika sonunda da mesanede gözlenmemiş, karaciğer ve dalakta biriktiği görülmüştür. Bu nedenle karaciğere pasif olarak ilaç hedeflenmesinde IV yolla mikroemülsiyonların kullanılabilirliği önerilmiştir.⁸

LİPOZOMLAR

Lipozomlar doğal, toksik olmayan fosfolipidlerin suyla birleşmesiyle şekillenen küçük küre şeklinde koloidal sistemlerdir. Fosfolipitler vücudun yapıtaşları oldukları için biyolojik olarak yıkılırlar, immünojenik ve toksik etki göstermezler. Lipit çift tabaka ve sulu fazdan oluşurlar. Lipit

çift tabakası bir veya daha fazla sayıda olabilir, buna göre lipozom büyüklükleri de farklı olabilir.

Küçük tek tabakalı keseler içerenler 25-70 nm büyüklükte olan, çift tabakalı bir lipidden ibarettirler. Geniş tek tabakalı keseler içerenler 100-400 nm ölçüde, çift tabakalı bir lipidden ibarettir. Çok tabakalı keseler içerenler ise 20 nm'den birkaç mikrona kadar olabilen, iki veya daha fazla konsantrite çift tabakadan ibarettir.² Lipozomların stabiliteyi kolesterol, setil fosfat gibi çeşitli moleküllerin fosfolipid çift tabakası içine yerleştirilmesiyle değiştirilebilir. Örneğin fosfolipid tabakalarına kolesterol yerleştirilmesi lipozom membranını daha stabil hale getirir.

Lipozomlar karaciğer Kupffer hücrelerini pasif olarak hedeflediklerinden, karaciğere ilaç hedeflemede kullanılırlar. Lipozomların yüzeyine immüoglobulinler tutturularak, vücudun belirli bölgelerine aktif hedefleme de yapılabilir.

Lipozomlar vücuttaki özgül hücrelere gen hedeflenmesi için de potansiyel taşıyıcı sistemlerdir. Vasir ve ark. katyonik lipozomları polianyonik plazmid DNA ile kompleksleştirerek net pozitif yük taşıyan kompakt nanoyapılar "lipopleks"ler oluşturmuşlardır. Bu viral olmayan gen taşıyıcı sistemler modifiye galaktolipidlerle konjugasyonla karaciğere gen hedefleme için tasarlanmıştır. Lipoplekslerin asialofetuin ve protamin sülfatla işaretlenmesiyle protamin sülfat içinde nükleer lokalizasyon sinyaliyle çekirdekte etkili hedeflemeye ait *in vivo* etkinlik saptanmıştır.⁶

Lipozomların, biyoyumlu özellikleriyle, esnek yapıları ve boyutlarıyla, ayarlanabilir yüzey yükleri ve çeşitli antijen yükleme mekanizmaları ile bağışıklık sistemini uyarma kapasiteleriyle aşılarda uygulanmasında güvenli ve etkili oldukları kanıtlanmıştır. Lipozomların bakteriyel polisakkarit, ovalbümin, sığır serum albümini ve subünit grip aşısı gibi çeşitli antijenlere karşı hem hümmoral hem de hümmoral bağışıklığı artırabildiği gösterilmiştir.⁹ Son yıllarda lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler, profilaktik ve terapötik aşılarda konvansiyonel formülasyonların yerine modern, düşük maliyetli aşılarda temel özellikler sunmaktadır. Lipozomların yakın gelecekte aşı taşıyıcı sistem olarak Moderna ve Pfizer tarafından üretilen başarılı lipozomal anti-SARS-CoV-2 aşılardan sonra farklı patojenlerin tedavisi için daha fazla kullanılacağı düşünülmektedir.¹⁰

NİOZOMLAR

Niozomlar ilacın kesecik (vesikül) içine enkapsüle edildiği yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Kesecik non-iyonik surfaktanın çift tabakasından ibarettir. Niozomlar stabil oldukları ve maliyetlerinin ucuz olmasından dolayı lipozomlardan daha çok tercih edilir. İlaç moleküllerinin sirkülasyondan atılımını geciktirir, biyolojik ortamlardan ilacı korur, ila-

cın etkisini sadece hedef hücrelere olacak şekilde kısıtlar. Kanser tedavisinde, Leishmania tedavisinde, oral yolla peptit ilaçları uygulamada, oftalmik ve dermal ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılırlar.¹¹

Niozomlar genlerin aktarımı için de umut vadeden formülasyonlardandır. Puras ve ark., 2,3-di(tetradesiloksi)propan-1-amin katyonik lipidi kullanılarak skualen ve polisorbate 80 ile hazırladıkları formülasyonu sıçan retinalarına hedeflemek için kullanmışlardır. Çözücü emülsifikasyonu ile hazırladıkları katyonik niozomlara pCMS-EGFP plazmitini elektrostatik etkileşimle yükleyerek 200 nm boyutunda, 25 mV zeta potansiyele sahip lipopleksler elde etmişlerdir. Niozomların enzimatik degradasyondan DNA'yı koruduğunu, HEK-293 ve ARPE-19 hücrelerini başarıyla transfekte ettiğini gözlemişlerdir. Sıçan gözlerine uygulanarak gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada uygulama yoluna bağlı olarak retinanın farklı tabakalarında transfeksiyon tespit edilmiştir. Subretinal enjeksiyondan 7 gün sonra retinal pigment epitel tabakasında transfeksiyon gözlenmiştir. İntravitreal enjeksiyondan 28 gün sonra ise retinanın internal tabakasında transfeksiyon etkisinin sürdüğü görülmüştür. Sonuç olarak, geliştirilen niozom formülasyonu kalıtsal retina hastalıklarını tedavi etmek amacıyla retinaya genetik materyal sağlamak için önerilmiştir.¹²

Niozomların aşısı olarak çalışıldığı araştırmalar mevcuttur. Obeid ve ark., İnce Film Hidrasyon Tekniği (İFH) ve Mikroakışkan Karıştırma (MK) tekniklerini kullanarak farklı boyutlarda niozomlar elde etmişlerdir. Elde edilen niozomlara İnfluenza antijeni yükleyerek, BALB/c farelere subkutan enjeksiyonla uygulayarak oluşan immün yanıtı araştırmışlardır. Sitokin analizleri sonucunda İFH niozomlarının IgG2a'yı artırdığı ve yüksek seviyelerde INF- γ gözlenmesiyle Th1 immün yanıtı indüklediği, MK ile elde edilen niozomların IgG1'i indükleyerek Th2 immün yanıtı indüklediğini saptamışlardır. Sonuç olarak, farklı niozom hazırlama teknikleriyle elde edilen farklı boyuttaki niozomların farklı immün yanıtı indüklediğini saptamışlardır.¹³

NANOPARTİKÜLLER

Terapötik protein ilaçların verilmesinde nanopartiküller taşıyıcı sistem olarak başarıyla kullanılmaktadır. Laboratuvarımızda da nanopartikül sistem kullanılarak oral uygulama için yeni bir protein-nanokapsüle sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, model ilaç olarak rekombinant insan insülini (rh-insülin) seçilmiştir. İnsülin yüklü kitosan nanopartikülleri (INS-CS-NPs) elde etmek için iyonik jelyasyon metodu kullanarak Kitosan (CS) ve sodyum tripolifosfat (TPP) arasında iyonik jelyasyon ile nanopartiküller elde edilmiştir. Daha sonra, yeni bir strateji

olarak nanopartiküller sürekli salım, artan *in vivo* stabilite ve gastro intestinal kanalda artan ilaç absorpsiyonunu sağlamak için hazırlanan su/yağ mikroemülsiyon formülasyonunun iç fazına yüklenmiştir. Bu şekilde mikroemülsiyon iç fazına yüklenen INS-CS-NP'ler ile (INS-CS-NP-ME) oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmasıyla farklı INS:CS ve CS:TPP oranlarına sahip formülasyonların özellikleri araştırılmıştır. pH 2.5'ta *in vitro* salım çalışması, insülin salımının daha yüksek CS oranları ($p < 0.05$) uygulandığında önemli ölçüde düşük olduğunu ortaya koymuştur. Geliştirilen INS-CS-NP'lerin Dairesel Dikroizm spektrum analizleri insülinin taşıyıcı sisteme yüklenmesiyle konformasyonel stabilitesinin etkilenmediğini göstermiştir. Ayrıca, Wistar Albino sıçan modelindeki *in vivo* deneyler, INS-CS-NP-ME'nin oral uygulamadan sonra 8 saatlik bir süre boyunca kan glukoz seviyelerini etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir. Çalışma bulgularına dayanarak, geliştirilen INS-CS-NP-ME sisteminin oral insülin taşıyıcı sistem olarak umut verici bir alternatif dozaj formu olabileceği önerilmiştir.¹⁴

Çoğu kemoterapötik, tümör hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak apoptozu indükler. Bununla birlikte, bir histon deasetilaz olan Sirtuin 1'in (SIRT1) yüksek ekspresyonu, kemoterapötik kaynaklı DNA hasarının onarımına ve ardından apoptozun önlenmesine yol açan DNA onarım mekanizmalarını aktive eder. Bu nedenle, SIRT1'in inhibisyonu, tümör hücrelerinin daha verimli bir şekilde yok edilmesini sağlamak için kanser tedavisinde yararlı bir stratejidir. Bu amaçla, laboratuvarlarımızda 1,2-di-O-oktadesenil-3-trimetilamonyum propan (DOTMA) içeren lipit nanoparçacıkları ve SIRT1-siRNA'dan oluşan lipopleksler dondurarak kurutma yöntemiyle geliştirilerek SIRT1 susturma etkisi, mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde 2,5-4 kat azalma ile gösterilmiştir. DNA hasarını indükleyen bir kemoterapötik etken madde olan doksorubisinin aktivitesini arttırmada lipoplekslerin etkinliği, farklı p53 ekspresyon paternlerine sahip olan LNCaP, DU145 ve PC3 prostat kanseri hücre hatları üzerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak, geliştirilen lipopleksler aracılığıyla SIRT1'in susturulması, kanser hücrelerinde DNA hasarı tanınmasını ve doksorubisinin kanser hücresi ölümü üzerindeki aktivitesini artırmıştır. Bu sonuçlar, SIRT1-siRNA yüklü lipit nanoparçacıklarının, prostat kanseri hücreleri üzerinde doksorubisinin etkinliğini artırabildiğini göstermiştir.¹⁵

KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLER

Laboratuvarımızda mikroemülsiyon dilüsyon yönteminin modifikasyonu ile Katı Lipit Nanopartiküller (KLN'ler) geliştirilmiştir. Uygulama kolaylığı ve ekstra enerji girişi gerektirmemesi, mikroemülsiyon yöntemini KLN'lerin

üretimi için uygun hale getirmiştir. Faz diyagramı taraması ve modifiye edilmiş sıcak mikroemülsiyon seyreltme yöntemi ile, partikül boyutu 100 nm'nin altında olan KLN'lerin elde edilmesi başarılmıştır. Yöntemin, kontrol edilebilir bileşime ve 100 nm'nin altında partikül boyutuna sahip, düşük sitotoksisteye ve hemolitik aktiviteye sahip KLN'ler hazırlamaya uygun olduğu gözlenmiştir.¹⁶

Geliştirilen bu yöntemle, sisplatine dirençli akciğer kanseri hücrelerinde STAT3'ü baskılamak için RNAi aracılı plazmit DNA'nın taşınması için katyonik katı lipid nanoparçacıklar (kKLN) geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir. Moleküler onkoloji alanındaki gelişmeler, kemoterapötiklere karşı direncin, yaygın onkogenik proteinlerin aşırı ekspresyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla kazanıldığını ortaya çıkarmıştır. Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3 (STAT3), birçok kanser türünde aşırı eksprese edilen bu onkogenlerden biridir. RNA interferansı (RNAi), STAT3'ü aşağı regüle etmek için kanıtlanmış güçlü bir araçtır ve dirençli kanser hücrelerinin yeniden duyarlı hale getirilmesini sağlar. Bununla birlikte, akciğer kanseri hücrelerinde STAT3 aşağı regülasyonu için RNA interferansına aracılık eden moleküllerin taşınması, çoğunda ticari transfeksiyon kitleri kullanılan az sayıda çalışma ile sınırlıdır. Çalışmada, boyutları 100 nm'nin altında veya buna eşit olan ve pozitif zeta potansiyeli olan kKLN:plazmit DNA kompleksleri elde etmeye odaklanılmıştır. Geliştirilen optimal iki formülasyon 98 ve 93 nm partikül boyutlarına ve sırasıyla 10.5 ve 8.9 mV zeta potansiyel değerlerine sahip olarak elde edilmiştir. Bu komplekslerdeki plazmit DNA'nın, DNaseI ve serum aracılı bozulmaya karşı korunduğu gözlenmiştir. DNA'nın önemli bir kısmı, süper sarmal ve dairesel yapısını korumuştur. Her iki formülasyon da sisplatine dirençli Calu1 hücre hattında STAT3 ifadesini yaklaşık 5 kat azaltmış ve hücrelerin sisplatine duyarlılığı artmıştır.¹⁷

Ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada en sık görülen beyin kanserlerinden glioblastomanın tedavisine yönelik gen taşıyıcı, hedeflenebilir taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Beyin kanseri, Alzheimer, Parkinson gibi beyin hastalıklarına yönelik tedavilerin önündeki en önemli engel kan beyin bariyerinin varlığıdır. Bu bariyerin aşılması için mikroemülsiyon dilüsyon tekniği ile elde edilen fonksiyonel katı lipid nanopartiküllerinin dış yüzeyine spesifik olarak tümöre penetre olma özelliği bulunan iRGD peptidi bağlanarak hedeflenebilir nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilerek genetik materyal ile kompleks yapabilmeye, gerektiğinde kompleksten genetik materyali salabilmeye ve serum nükleazlarına karşı genetik

materyali koruyabilme özellikleri incelenmiştir. siRNA-EGFR ve siRNA-PDL1 ile kompleks hale getirilmiş nanopartiküllerin *in vitro* ve *in vivo* gen susturma ve hedefleme etkinlikleri değerlendirilmiştir. Son yıllarda yayınlanan çalışmalarda radyasyon tedavisinin, nanoterapötiklerin tümör alımını makrofaj bağımlı şekilde artırdığını göstermiştir. Bu bulgulara dayanarak gen taşıyıcı sistem temelli tedavimizin etkinliği radyasyon ile kombine şekilde farelerde intrakranial glioblastoma zenograft modelinde radyasyon varlığında ve yokluğunda değerlendirilmiştir. Sonuç olarak geliştirdiğimiz siRNA-EGFR ve siRNA-PDL1 taşıyıcı katı lipid nanopartiküllerin glioblastomalı hayvanlarda sağ kalımı anlamlı derecede artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, radyasyon uygulaması ile kombine tedavi uygulanan grupta en uzun sağ kalım elde edilmiştir ($p < 0,05$). Glioblastomada etkinliği gösterilen iRGD ile hedeflenebilir gen taşıyıcı lipid nanopartiküller diğer kanser türleri için de umut vadetmektedir.¹⁸

Son yıllarda yapılan çalışmalar ING4 proteininin p53 aktivitesini artırdığını ve DNA onarımını, hücre apoptozunu ve hücre döngüsü süreçlerini düzenlediğini göstermiştir. Birçok kanser türünde ING4 ekspresyon seviyelerinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda melanoma, prostat kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, glioma gibi yaygın kanser türlerinin de içerisinde bulunduğu birçok kanser türünde ING4 gen bölgesinin mutasyona veya delesyona uğradığı saptanmıştır.¹⁹ Bu bilgiler ışığında laboratuvarlarımızda yeni katı lipid nanopartikül ve niozom formülasyonları geliştirilerek, bunlara ING4 proteinini kodlayan gen bölgesine sahip plazmit DNA'nın yüklenmesi ve MCF-7 hücrelerinin proliferasyonuna etkisinin *in vitro* olarak test edilmesi amaçlanmıştır. Compritol HD5 ATO katı lipid, Tween 80/Etanol karışımı sürfaktan olarak kullanılarak sıcak mikroemülsiyon yöntemi ile KLN'ler elde edilmiştir. Niozom formülasyonu ince film hidrasyon yöntemi ile Span80 ve kolesterol kullanılarak oluşturulmuştur. KLN'lere Esterquat 1 ve DDAB (Didodecyldimethylammonium bromide) ile, geliştirilen niozomlara ise DDAB ile katyonik özellik kazandırılmıştır. ING4 bir tümör baskılayıcı gen olarak geliştirilen formülasyonlarla kompleksleştirilerek taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır. 24 saatlik XTT hücre proliferasyonu çalışmalarında çıplak DNA'nın hücre proliferasyonuna önemli bir etkisi olduğu gözlenmezken, Niozom ve Katı Lipit Nanopartikül formülasyonlarının belirli dozlarda MCF7 hücrelerinin proliferasyonunu engellediği gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada meme kanseri üzerine etkili olabilecek DNA taşıyıcı iki formülasyon geliştirilmiştir.²⁰

Katı lipid nanopartiküller ve bunların yapısına sıvı lipitlerin eklenmesiyle hazırlanan nanoyapılı lipit taşıyıcılar lipofilik karakterdeki küçük molekülü ilaçların taşınmasında sıklıkla tercih edilmektedir.²¹ Bu lipit taşıyıcı sistemlerin pDNA ve siRNA gibi çeşitli nükleik asitlerin taşınmasındaki kullanımı ise giderek artmaktadır.²² Laboratuvarlarımızda yürütülen bir çalışmada EphA2 reseptörü tirozin kinazı hedefleyen siRNA taşıyan kKLN'ler geliştirilmiştir. Eph reseptör A2 (EphA2) reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir, hücre proliferasyonu, sağ kalım ve farklılaşma gibi anahtar hücre işlemlerini düzenler.²³ EphA2 prostat kanserini de içine alan birçok kanser türünde fazla miktarda ekspresye edilir.²⁴ DDAB ile katyonik özellik kazandırılan siEphA2-yüklü kKLN'lerin gen susturma ve transfeksiyon etkinlikleri PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücreleri üzerinde araştırılmıştır. siEphA2-yüklü kKLN'lerin ticari transfeksiyon etkeni olarak kullanılan Dharmafect'ten daha iyi hücresel transfeksiyon etkinliği gösterdiği ve PC-3 hücrelerinde Dharmafect kadar etkili bir şekilde hedef geni susturduğu kanıtlanmıştır.²⁵

Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri olan apoptozdan kaçış, kanser tedavisinde kullanılan apoptozu indükleyen moleküllerin terapötik etkinliğini azaltan bir durumdur. Hücrede apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinden sorumlu olan P53 proteininin stabilizasyonu bu nedenle önemli bir terapötik hedefdir. Nutlin3a, P53 proteininin proteazomal parçalanmasını engeller, kanser hücrelerinde P53 aracılı apoptozu tetikler ve kemoterapötiklerin etkinliğini artırır. Bununla birlikte, *in vivo* uygulama söz konusu olduğunda, sudaki düşük çözünürlüğü en büyük dezavantajdır. Laboratuvarlarımızda Nutlin3a'nın hücre içine geçişini kolaylaştıran bir formülasyonu gerçekleştirmek ve kanser hücreleri üzerindeki apoptotik aktivitesini arttırmak için Ouzo yöntemiyle hazırlanan KLN'lere Nutlin3a enkapsüle ederek bir taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Nutlin3a, geliştirilen nanopartiküllerin içine enkapsüle edilmiştir ve doğal p53 ekspresyonu gösteren LNCaP prostat kanseri hücre hattı üzerinde apoptoz indükleyici etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, Nutlin3a yüklü katyonik katı lipid nanoparçacıklarının, protein seviyesinde fonksiyonel P53'ü stabilize ettiği belirlenmiştir. Ek olarak, nanopartiküller tarafından apoptoz indüksiyon hızının, çıplak Nutlin3a etkinliğinden daha yüksek olması da, geliştirilen Nutlin3a taşıyıcı nanopartikül formülasyonunun, P53(+) prostat kanserinin tedavisi için umut verici bir aday olduğunu göstermiştir.²¹

MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Manyetik nanopartiküller terapötik etken ile yüklenerek intravenöz olarak enjekte edilebilir ve manyetik alan grad-

yanı etkisi altında hedeflenen bölgeye aktarılabilir. Ayrıca, patolojik şartlarda, örneğin katı tümörlerde doğrudan hedeflenen bölgeye yönlendirecek artere enjekte edilebilir ve daha sonra manyetik alan gradyeni kullanarak tedavinin istendiği alanda lokalize edilebilir.⁶

Leakakos ve ark. doksorubisini mesane içine verme amacıyla normal domuz mesanesinde manyetik hedefli taşıyıcıları incelemişlerdir. Çalışmada manyetik taşıyıcı olarak metalik demir ve aktif karbondan oluşan mikropartiküllere doksorubisin yükleyerek ilacın harici manyetik alan uygulanmasıyla bir tümöre hedeflenmesini amaçlamışlardır. Çalışma sonucunda, manyetik partiküllere yüklenen doksorubisinin manyetik hedefleme kullanılarak mesanedeki belirli konumlarda hedeflenebileceğini ve tutulabileceğini göstermişlerdir. Manyetik hedefleme ile ilacın istenen bölgede yani mesanede sadece doksorubisin verilmesiyle karşılaştırıldığında daha fazla kalmasının ve özgül birikimin sağlanabileceği belirtilmiştir.²⁶

Manyetik nanopartiküller, manyetik çekim kuvvetiyle terapötik genleri hedeflenen organ veya dokulara manyetik alan doğrultusunda taşıyan sistemler olarak da kullanılabilir. Bu işlem manyetofeksiyon olarak adlandırılır. Manyetofeksiyon, manyetik nanopartiküller (MNP'ler) ile ilişkili nükleik asit vektörleri üzerine uygulanan manyetik alanların çekim kuvvetleriyle özgül bölgeye nükleik asitlerin aktarılması, yönlendirilmesidir. Bu yöntem hem *in vitro* hem de *in vivo* transfeksiyon için büyük umut vaat eden aktif taşıma tekniklerinden biridir.^{27,28} Bu amaca yönelik olarak, laboratuvarımızda *in-situ* yüzey kaplamasına olanak veren yeni bir demir oksit yapıda nanopartikül sentez yöntemi geliştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada çoklu emülsiyonlar ilk defa mikroreaktörler olarak kullanılmış ve katyonik katı lipid nanopartiküllerin çekirdeğinde süperparamanyetik özellikte demir(III)oksit nanopartikülleri sentezlenmiştir.²⁹ Elde edilen manyetik nanopartiküller daha sonra plazmit DNA hedefleme sistemi olarak değerlendirilmiş ve göreceli olarak yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip, genetik temelli hastalıkların tedavisi için viral olmayan gen aktarımına yönelik umut verici bir taşıyıcı sistem olarak sunulmuştur.³⁰

NANOBİYOTEKNOLOJİDE GELECEKTEKİ BEKLENTİLER:

Nanobiyoteknolojinin öneminin gelecek yıllarda daha artacağı düşünülmektedir. Moleküler düzeyde hastalık nedenlerinin araştırılarak, moleküler biyolojideki gelişmelerle hastalığa neden olan yeni yolların bulunması, bu yollara ilaçların veya genlerin özgül olarak hedeflenmesiyle günümüzde henüz tedavi edilemeyen hastalıkların

ileriki yıllarda tedavileri mümkün olabilecektir. Biyouyumlu, toksik olmayan yeni polimerlerin nanotaşıyıcı sistemlerde uygulanması da immünojenisite riskini azaltacaktır.

Nanobiyoteknoloji sadece terapötik uygulamalarda değil, hücre içi görüntüleme tekniklerinde teşhis için de kullanılmaktadır. Hedef molekülleri Quantum Dots (QDs)

veya sentetik kromoforlarla işaretleyerek konfokal floresans mikroskopi gibi optik tekniklerle hücre içi sinyal komplekslerinin doğrudan araştırması yapılabilir. Yeni materyallerin ve cihazların yaşama geçmesiyle tıp, elektronik, biyomateryaller ve enerji üretimi alanında gelişmeler sağlanacaktır.¹

KAYNAKLAR

1. Fakruddin Md, Hossain Z, Afroz H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J.Nanobiotechnology*. 2012;10(1):31. doi: 10.1186/1477-3155-10-31. Retraction in: *J Nanobiotechnology*. 2012;10:40.
2. Sahoo SK, Labhasetwar V. Research Signpost, Kerala, India. Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today*. 2003;8(24):1112-20. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02903-9.
3. Kantarcı G, Cavalli R. Non-viral systems for gene delivery; up to date. In: Senyigit T, Ozcan I, Ozer O, eds. *Nanotechnology in Progress: Pharmaceutical Applications*, Research Signpost, Kerala, India; 2012. p.177-208. ISBN: 9788130804798
4. Tharkar P, Varanasi R, Wong WSF, Jin CT, Chrzanowski W. Nano-Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Ultrasound for Cancer Treatment and Beyond. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:324. doi: 10.3389/fbioe.2019.00324.
5. Ahmadi A, Hosseini-Nami S, Abed Z, Beik J, Aranda-Lara L, Samadian H, et al. Recent advances in ultrasound triggered drug delivery through lipid-based nanomaterials. *Drug Discovery Today*. 2020;25(12):2182-200. doi: 10.1016/j.drudis.2020.09.026.
6. Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar VD. Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges, *Current Nanoscience*. 2005;1(1):47-64. doi: 10.2174/1573413052953110
7. Kantarcı G, Özgüney I, Karasulu HY, Güneri T, Başdemir G. In vitro permeation of diclofenac sodium from novel microemulsion formulations through rabbit skin. *Drug Dev Res*. 2005;65:17-25. doi: 10.1002/ddr.20003.
8. Kotmakçı M, Kantarcı G, Aşıkoğlu M, Ozkılıç H, Ertan G. Determination of in vivo behavior of mitomycin C-loaded o/w soybean oil microemulsion and mitomycin C solution via gamma camera imaging. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013;28(7):530-3. doi: 10.1089/cbr.2012.1428.
9. Conacher M, Alexander J, Brewer JM. Niosomes as Immunological Adjuvants. In: Uchegbu IF, ed. *Synthetic Surfactant Vesicles*. Singapore: International Publishers Distributors Ltd.; 2000. p.185-205.
10. Attia MA, Essa EA, Elebyary TT, Faheem AM, Elkordy AA. Brief on Recent Application of Liposomal Vaccines for Lower Respiratory Tract Viral Infections: From Influenza to COVID-19 Vaccines. *Pharmaceuticals* 2021;14(1173):1-22. doi: 10.3390/ph1411173
11. Kauslya A, Borawake PD, Shinde JV, Chavan RS, Niosomes: A Novel Carrier Drug Delivery System, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2021;11(1):162-70. doi: 10.22270/jddt.v11i1.4479
12. Puras G, Mashal M, Zárata J, Agirre M, Ojeda E, Grijalvo S, et al. A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *Journal of Controlled Release*. 2014;174:27-36. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.11.004.
13. Obeid MA, Teeravatcharoenchai T, Connell D, Niwasabutra K, Hussain M, Carter K, et al. Examination of the effect of niosome preparation methods in encapsulating model antigens on the vesicle characteristics and their ability to induce immune responses. *Journal of Liposome Research* 2021;31(2):195-202. doi: 10.1080/08982104.2020.1768110
14. Erel G, Kotmakçı M, Akbaba H, Sözer Karadağlı S, Kantarcı AG. Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2016;36:161-7. doi: 10.1016/j.jddst.2016.10.010
15. Debelec-Butuner B, Oner E, Kotmakçı M, Kantarcı AG. SIRT1 siRNA-loaded lipid nanoparticles enhanced doxorubicin-induced cell death in prostate cancer cell lines. *J Drug Delivery Science and Technology*. 2021;66: 102670. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102670
16. Kotmakçı M, Akbaba H, Erel G, Ertan G, Kantarcı, AG. Improved Method for Solid Lipid Nanoparticle Preparation Based on Hot Microemulsions: Preparation, Characterization, Cytotoxicity, and Hemocompatibility Evaluation. *AAPS. PharmSciTech*. 2016;18(4):135-65. doi: 10.1208/s12249-016-0606-z
17. Kotmakçı M, Bozok Çetintaş V, Kantarcı AG. Preparation and characterization of lipid nanoparticle/pDNA complexes for STAT3 down-regulation and overcoming chemotherapy resistance in lung cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;525:101-11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.04.034
18. Erel-Akbaba G, Carvalho LA, Tian T, Zinter M, Akbaba H, Obeid PJ, et al. Radiation-Induced Targeted Nanoparticle-Based Gene Delivery for Brain Tumor Therapy. *ACS Nano*. 2019;13(4):4028-40. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.8b08177>
19. Wei Q, He W, Lu Y, Yao J, Cao X. Effect of the tumor suppressor gene ING4 on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2012;4(3):438-442. doi: 10.3892/ol.2012.744.
20. Karagöz U, Kantarcı AG. Preparation, characterization and evaluation of solid lipid nanoparticles and niosomes for ING4 gene delivery to breast cancer cells. *J Res Pharm*. 2019;23(5): 935-43. doi: 10.35333/jrp.2019.40.
21. Debelec-Butuner B, Kotmakçı M, Oner E, Ozduman G, Kantarcı AG. Nutlin3a-Loaded Nanoparticles Show Enhanced Apoptotic Activity on Prostate Cancer Cells. *Mol Biotechnol*. 2019;61(7):489-97. doi: 10.1007/s12033-019-00178-2.
22. Oner E, Kotmakçı M, Kantarcı AG. A promising approach to develop nanostructured lipid carriers from solid lipid nanoparticles: preparation, characterization, cytotoxicity and nucleic acid binding ability. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2020;25(8):936-48. doi: 10.1080/10837450.2020.1759630
23. Kinch MS, Carles-Kinch K. Overexpression and functional alterations of the EphA2 tyrosine kinase in cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20(1):59-68. doi: 10.1023/a:1022546620495.
24. Tandon M, Vemula V, Mittal S. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opinion Ther Targets*. 2011. doi: 10.1517/14728222.2011.538682

25. Oner E, Kotmakci M, Baird AM, Gray SG, Butuner BD, Bozkurt E, et al. Development of EphA2 siRNA-loaded lipid nanoparticles and combination with a small-molecule histone demethylase inhibitor in prostate cancer cells and tumor spheroids. *J Nanobiotechnol.* 2021;19(71):1-20. doi: 10.1186/s12951-021-00781-z
26. Leakakos T, Ji C, Lawson G, Peterson C, Goodwin S. Intravesical administration of doxorubicin to swine bladder using magnetically targeted carriers. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;51(6):445-50. doi: 10.1007/s00280-003-0597-9.
27. Ma Y, Zhang Z, Wang X, Xia W, Gu H. Insights into the mechanism of magnetofection using MNPs-PEI/pDNA/free PEI magnetofectins. *Int J Pharm.* 2011;419(1-2):247-54. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.017.
28. Majidi S, Zeinali Sehrig F, Samiei M, Milani M, Abbasi E, Dadashzadeh K, Akbarzadeh A. Magnetic nanoparticles: Applications in gene delivery and gene therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(4):1186-93. doi: 10.3109/21691401.2015.1014093.
29. Akbaba H, Karagöz U, Selamet Y, Kantarcı AG. Synthesis and characterization of cationic lipid coated magnetic nanoparticles using multiple emulsions as microreactors. *J Magn Magn Mater.* 2017;426:518-24. doi: 10.1016/j.jmmm.2016.11.126
30. Akbaba H, Selamet Y, Kantarcı AG. In situ production of cationic lipid coated magnetic nanoparticles in multiple emulsions for gene delivery. *Marmara Pharm J.* 2016;20(2):72-8. doi: 10.12991/mpj.20162069254.