



KANSER İMMÜNÖTERAPİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE PHBHHX BAZLI KATI LİPİD NANOPARTİKÜL DİZAYNI

Nelisa TÜRKÖĞLU LAÇIN¹ 

¹ Moleküler Biyoloji ve Genetik, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Kanser tedavisinde immünoterapi yaklaşımının kullanılması her geçen gün popülaritesini artırarak bu alanda yerini sağlamlaştırmaktadır. Mevcut kanser immünoterapi sistemleri ile yapılan tedaviler tek başına istenen verimlilikte çalışmamaktadır. İlgiZzli alanda terapötik maddelerin tümöre iletilmesi için oldukça karmaşık ve sınırlayıcı olan tümör mikroçevresini aşarak tümör hücresine iletilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, IL-6 kodlayan plazmid DNA model olarak kullanılarak, plazmidi tümör hücrelerine aktarabilecek bir taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi üzerine odaklanılmıştır. Farklı miktarlarda bileşenler kullanılarak ve farklı koşullarda çözücü difüzyon yöntemiyle bir katı lipit katyonik nanopartikül sisteminin üretimi hedeflenmiştir. Elde edilen nanotaşıyıcının kimyasal yapısı ATR-FTIR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Zeta-sizer cihazı kullanılarak, nanopartiküllerin ortalama büyüklüğünün 208,1 nm (\pm 256,8) [Polidispersite Endeksi (PDI), 0,06] ve 13,7 mV (\pm 5,4) zeta potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) cihazları ile incelenmiştir. PHBHHX bazlı SLN'nin sitotoksitesi, fare fibroblast hücre hattında (L929) MTT testi ile belirlenmiştir. PHBHHX bazlı nanopartikül, yeşil floresan protein (GFP) ve IL-6 kodlayan plazmid DNA ile konjuge edildikten sonra MCF-7 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilip, transfeksiyon verimi GFP ekspresyonunu floresan mikroskobu ile takip edilmesi ile belirlenmiştir. GFP ekspresyon etkinliği %73 (\pm 5,8) olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İmmünoterapi, Nanotaşıyıcı, IL-6, GFP

PHBHHX-BASED SOLID LIPID NANOPARTICLE DESIGN FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

The usage of the immunotherapy approaches for cancer treatment increases its popularity every day and strengthens its place in this field. Existing cancer immunotherapy systems for cancer treatment alone is not efficient. The therapeutics has to be delivered to tumor cells efficiently. The carrier vehicle needs to pass tumor microenvironment, which is quite complicated and limiting. This study focuses on the development of a carrier system that can transfer plasmid DNA encoding IL-6 and GFP as a model to tumor cells. The production of the solid lipid cationic nanoparticle system is achieved by the solvent diffusion method. The chemical structure of the PHBHHX nanoparticle was determined by ATR-FTIR spectroscopy. The zeta-sizer analysis confirmed that the PHBHHX nanoparticle with an average size of 208,1 nm (\pm 256,8) [polydispersity index (PDI),0,06] and a Zeta potential 13,7 mV (\pm 5,4) was obtained. The morphological characterization of nanoparticles was investigated by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) devices. Cytotoxicity of PHBHHX-based SLN was determined by MTT assay in mouse fibroblast cell line (L929). The PHBHHX-based nanoparticle was conjugated with plasmid DNA encoding green fluorescent protein (GFP) and IL-6 and, transfected to MCF-7. The transfection efficiency was determined by monitoring GFP expression by fluorescence microscopy. GFP expression efficiency was 73% (\pm 5,8).

Keywords: Immunotherapy, Nanocarrier, IL-6, GFP

1. GİRİŞ

Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel antikanser tedavileri, primer tümörlerin tahrip edilmesi gibi önemli yararları sahiptir fakat bununla birlikte, aynı zamanda sağlıklı hücrelere zarar vermesi, yan etkilerinin ağır olması ve hastalık nüksü insidansının hala yüksek olması önemli sorunlardır [1]. İmmünoterapi tedavileri, eradikasyona dirençli tümör hücrelerini yok etme şansı verir. Kanser immünoterapisi, bir antitümör yanıtı oluşturmak için “bağışıklık sistemini” uyandırmak yolunu kullanan değerli bir tekniktir. Yöntemin önceliği, tümör hücresi ve tümör mikro ortamı tarafından susturulmuş bağışıklık sistemini çeşitli şekillerde yeniden aktif hale getirmektir. Kansere karşı gücüne tanık olduktan sonra, immünoterapi Science tarafından “2013’s Breakthrough of the Year” seçilmiştir.

*Sorumlu Yazar: nelisalacin@gmail.com

Geliş: 27.06.2019 Yayın: 30.07.2020

Daha sonra, 2018'de Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, immünoterapi alanındaki çalışmaları ile James P. Allison ve Tasuku Honjo'ya verilmiştir [2].

Genel olarak, kanser immünoterapisi aktif ve pasif immünoterapi olarak sınıflandırılır. Pasif immünoterapi, laboratuvar ürünü immün sistem bileşenleri veya hücrel proteinleri içerir [3]. Bu bileşenler hastalığa karşı mücadelede destek sağlamak için hastaya transfer edilir. Antikorlar aracılığı ile yapılan kanser tedavisine pasif immünoterapi adı verilir. Aktif immünoterapi başka bir immünoterapi türüdür, genellikle konağın bağışıklık sistemini bir hastalığa karşı tepki göstermesini teşvik etmeyi amaçlamaktadır. Sitokinler, aktif immünoterapinin en çok tercih edilen elemanlarıdır. Sitokinler, bağışıklık sisteminin ve enflamatuvar olayların düzenlenmesinde rol oynar ve sitokinler, bağışıklık sisteminin homeostazını düzenlemek için hücre içi sinyal araçları olarak görev yapan proteinlerdir [4], [5]. Mikroorganizmalara ve tümör antijenlerine cevap olarak doğal ve adaptif immün hücreler tarafından üretilirler. Sitokinlerle yapılan çok sayıda araştırma, bu çözünür proteinlerin, tümör hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırarak, doğrudan veya dolaylı olarak tümör hücresi büyümesini sınırlandırma konusunda egemen olduğunu ortaya koymuştur. Sitokinlerin, antitümör aktivitelerinin yanı sıra, hücre büyümesi, farklılaşması, farklı hücre tipleri arasındaki sinyalleşmelere aracılık ettiği ve hücre kaderini etkilediği bilinmektedir [6].

Sitokinler, immün efektör hücreleri ve tümör tarafındaki stromal hücreleri uyararak tümör hücrelerini tanımak için sitotoksik efektör hücreleri uyarır. Pek çok çeşidi olmasına rağmen, en yaygın kullanılan interlökinler, interferonlar ve GM-CSF'dir (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör)[7]. Bağışıklık sisteminden salgılanan sitokinlerin çoğu interlökinlerdir. Şimdiye kadar, metastatik melanom ve renal hücreli karsinom için yüksek dozlu IL-2 ve faz III melanom için INF- α tedavileri ile iki interlökin bazlı tedavi Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onay almaya hak kazanmıştır [8].

Ayrıca, nano ölçekli dağıtım sistemleri, terapötiklerin tümör hücrelerine iletilmesi için hızla gelişmiştir. Onlarca yıldır ilaç aktarım sistemleri viral vektörlerden viral olmayan vektörlere doğru değişim göstermektedir. Viral vektörlerle karşılaştırıldığında viral olmayan vektörlerin sentezlenmesi daha kolay, daha ucuz, hedefleme olanağı sağlaması ile gün geçtikçe yaygın hale gelmektedir. Ayrıca, immunolojik etkileri daha az olduğu için biyoyararlanım da daha yüksektir. Gen aktarım uygulamalarında; geliştirilen vektörün özellikleri, aktarılacak kargonun özellikleri ve hedeflenen hücre veya dokunun özellikleri vektör tasarımı için önemlidir [9]. Nanopartiküllerin temel özelliklerinden biri taşıdıkları etken maddenin, vücutta bozulmadan dolaşım süresini arttırmaktır. Çok sayıda farklı kimyasal, fiziksel özelliklere sahip taşıyıcılar bulunmasına rağmen, son zamanlarda katı lipid nanopartiküller, hücre membranını kolayca geçebilmesi sebebi ile ön plana çıkmaktadır. Katı lipid nanopartiküller, zayıf suda çözünürlük, yüksek uyumluluk, yüksek biyoyararlanım nedeniyle son zamanlarda oldukça sık kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, pEGFP N1- ve IL6 plazmidini taşıyan katı lipid nanopartikül ile MCF-7 hücre hattını etiketlenmesi amaçlanmaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Nanopartikül sentezinde kullanılmak üzere, 12 mol %3 hidroksiheksanoat (3-HHX) taşıyan PHBHHX [Mw=454.000] Protector&Gamble (ABD) şirketinden alındı. Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) [Mw = 364,450], MTT [Mw = 414,320] ve poli (vinil) alkol [Mw = 89,000] Sigma Aldrich (ABD) 'den satın alındı. Hücre kültürü çalışmaları için tripsin-etilendiamin tetra asetik asit (Trypsin-EDTA), fetal sığır serumu (FBS) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM F-12) Biological Industries'den (İsrail) temin edildi. pEGFP N1-IL6 plazmid Addgene (plazmid 111933) alındı. Meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ŞAP Enstitüsü (Türkiye)'den satın alındı. Temin edilen tüm reaktifler analitik dereceli idi ve herhangi bir değişiklik yapılmadan deneylerde kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. IL-6 ve GFP'yi kodlayan plazmidin çoğaltılması ve saflaştırılması

Bu çalışmada plazmid (Addgene Plasmid 111933: pEGFP N1-IL6.) amplifiye edilmek üzere kompetan bakteri içerisine alındı. Bakteri kültürü, steril bir kürdan ile alındı ve 100 µg Kanamisin mL-1 LB agar içeren petri kaplarına ekildi. Kanamisin içeren ortamda bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra koloniler elde edildi. Koloniden alınarak 100 µg kanamisin mL-1 içeren LB ortamına aktarıldı ve bir gece boyunca 37 ° C'de 200 rpm'de inkübe edildi. Ertesi gün, pürifikasyon işlemi için alkali lizis, adsorpsiyon, yıkama ve desorpsiyon aşamaları Qiagen Inc® (Almanya) şirketinin tampon çözeltileri kullanılarak uygulandı ve saflaştırma gerçekleştirildi. Saflaştırma tayini spektrofotometrik olarak 260/280 nm absorbans değerlerinde ölçüldü.

2.2.2. PHBHHX katı lipid nanopartikül sentezi

Bu çalışmada katı lipid nanopartikülleri çözücü difüzyon yöntemi ile sentezlendi. 0,5 gram Polivinil Alkol (PVA), bir beher içinde yavaşça 50 mL distile suya manyetik bir karıştırıcı üzerinde ilave edildi. Sıcaklık 900 C'e ayarlandı ve karışım 40 dakika boyunca 1200 rpm'de manyetik karıştırıcıda tutuldu. Bu sürenin sonunda, çözelti oda sıcaklığında soğutuldu. Aynı zamanda, 0,031 gram poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) PHBHHX ve 0,031 gram cetyltrimetilamonyum bromür (CTAB) 2 mL kloroform içinde çözüldü. PHBHHX-CTAB çözeltisi, 1400 rpm'de çalışan manyetik karıştırıcıda PVA karışımına damlatıldı. Damlatma işlemi sonrası beher, buzlu su ile dolu olan bir kap içerisine alınır ve sonik prob (50 sn, %30) altında emülsiyeye edildi. Beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı ve karışım 4 saat 800 rpm'de manyetik karıştırıcıda inkübe edildi. 4 saat sonra karışım, 50 mL'lik bir falkon tüpe aktarıldı ve 6000 rpm'de 30 dakika boyunca 12 °C'de santrifüjlendi. Santrifüjün sonunda, süpernatant başka bir falkon tüpe aktarıldı ve 1 saat boyunca 13000 rpm'de, 12 °C'de santrifüjlendi. 1 saat sonra, üst faz atıldı. Sonrasında, pelete saf su ilave edildi ve 13000 rpm'de 12 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama aşamasından sonra, üst faz atıldı ve pelet, 5 mL distile suda çözüldü.

2.2.3. PHBHHX katı lipid nanopartikül karakterizasyonu

Nanopartikül büyüklüğü ve yükü transfeksiyon verimi açısından çok önemlidir. Nanopartikül dispersiyonlarının ortalama büyüklüğü, zeta potansiyeli ve Polidispersite Endeksi (PDI) 25 °C'de ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc, İngiltere) çözücü olarak distile su kullanılarak karakterize edildi. PHBHHX nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskopu (SEM) (Carl Zeiss, ABD) ve atomik kuvvet mikroskopu (AFM) (Shimadzu SPM 9600, Japonya) ile belirlendi. Bu çalışmada, nanopartiküllerin kimyasal yapıyı tayin etmek için Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR spektrometre cihazı (Perkin Elmer Inc., ABD) ile Fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) analizi yapıldı.

2.2.4. PHBHHX katı lipid nanopartiküllerin sitotoksitesitesi

PHBHHX bazlı nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için in vitro MTT kolorimetrik deneyi uygulandı. L929 fare fibroblast hücre hattı %10 FBS içeren DMEM-F12'de kültüre edildi. Daha sonra konfluent olan hücreler, %10 FBS, pH 7,4 ile büyüme ortamında 40x104 olarak 96 kuyulu bir plakaya ekildi. Plaka, gece boyunca 37 °C'de %5 CO2'lik nemli bir atmosferde inkübe edildi. Ertesi gün, farklı konsantrasyonlarda PHBHHX nanopartikül çözeltileri NP1(462µg µL-1), NP2(616µg µL-1), NP3(770µg µL-1), NP3 (1540 µg µL-1) ve NP4 (2310 µg µL-1) DMEM-F12 ortamında FBS karışımı olmadan kuyulara ilave edildi. 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardan nanopartikül içeren medyum uzaklaştırıldı ve 100 µl MTT çözeltisi (fenol kırmızısı olmayan ortamda MTT 50 µg ml-1) eklendi 4 saat inkübasyon sonrası MTT çözeltisi atıldı ve her bir kuyuya 100 µL DMSO eklendi. Kuyuların absorbansı, ELISA okuyucusunda 560 nm'de okundu (Thermo Scientific Multiskan Go, ABD). Pozitif kontrol kuyusuna nanopartikül solüsyonu yerine 100 µL %1 Fenol çözeltisi, negatif kontrol kuyusuna ise 100 µL DMEM-F12 eklendi.

2.2.5. PHBHXX / pEGFP N1- ve IL6 plazmid konjugatının hazırlanması ve karakterizasyonu

PHBHXX / pEGFP N1- ve IL6 plazmid konjugatı hazırlamak üzere farklı oranlarda nanopartikül ve plazmid DNA etkileştirilerek, hazırlanan konjugatlarının zeta potansiyel değerleri Zeta-sizer cihazı kullanılarak karakterize edilmiştir. Optimum değerlere sahip konjugatın zeta potansiyeli 8,29 (\pm 4,16) olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyelin pozitif bulunması plazmid DNA'nın PHBHXX bazlı nanopartikülün içine başarılı bir şekilde alındığını göstermektedir.

2.2.6. PHBHXX / pEGFP N1- ve IL6 plazmid konjugatının MCF-7 hücre hattına transfeksiyonu

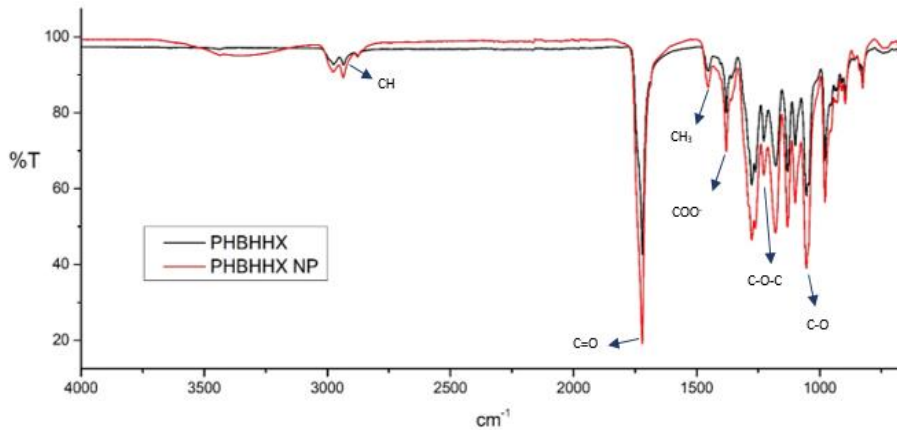
Transfeksiyon, hücreler logaritmik büyüme fazındayken 24 kuyulu bir plaka üzerinde gerçekleştirildi. Transfeksiyondan bir gün önce MCF-7 hücreleri, %10 FBS içeren DMEM ortamı ile 24 kuyulu bir plakaya ekildi ve hücre konsantrasyonu, kuyu başına 4 mL ortam içinde 4×10^4 olacak şekilde hesaplandı. Gece boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 hava nemli bir atmosferde inkübasyondan sonra, transfeksiyondan bir saat önce serum içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine serumsuz besiyeri ilave edildi. Transfeksiyon için DNA saflığı, 260/280 nm'de 1.9 olarak tespit edildi. Daha sonra, 100 µl nanopartikül çözeltisi (7,7 µg µl⁻¹): her kuyu için 1µL plazmid DNA (0,6 µg µl⁻¹ plazmid DNA) oranıyla nanopartikül-konjugat hazırlandı. Etkileşim için, konjugat oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildi. Transfekte edilmiş hücreler, uygun atmosferik koşullar altında 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saat sonra, PHBHXX / pEGFP N1- ve IL6 plazmid konjugatını içeren ortam, %10 FBS içeren DMEM ortamı ile değiştirildi. GFP ekspresyon verimi 3 gün boyunca floresan mikroskopla takip edildi. Transfeksiyon verimi, transfekte edilmiş hücrelerin, transfekte edilmeyen hücrelere kıyaslanması ile hesaplandı. 3 gün boyunca hücreler fotoğraflandı, ardından her bir fotoğrafın 3 farklı bölgesi sayıldı ve değerlerin ortalaması alınarak hesaplama yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Katı Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

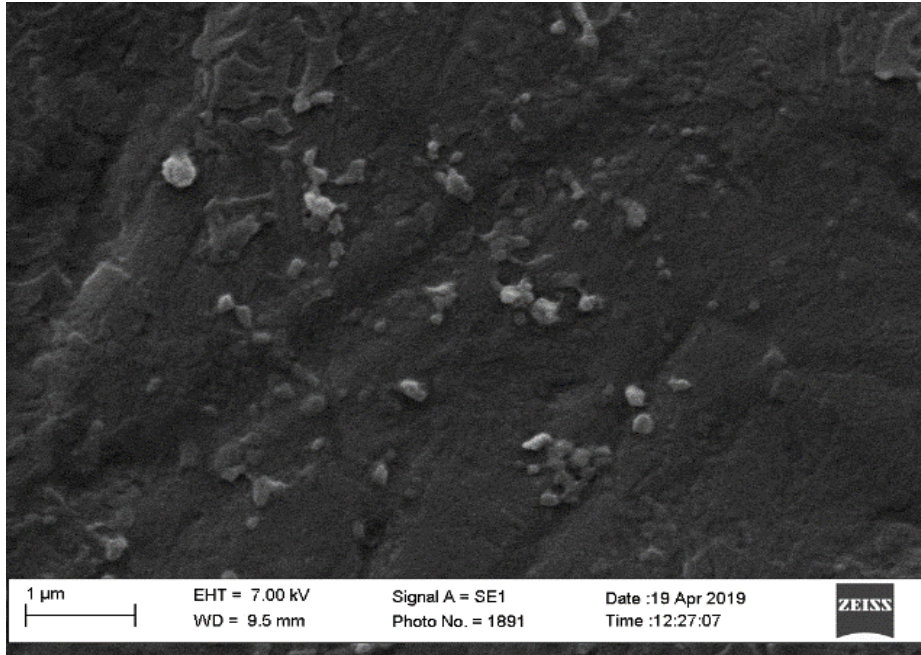
PHBHXX nanopartiküller, çözücü difüzyon yöntemi ile sentezlendi. Parçacık yükü, boyutu ve Polidispersite Endeksi (PDI), 25 °C'de Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, İngiltere) ile ölçüldü. Deneyler 3 tekrar olarak gerçekleştirildi. Ortalama büyüklük, PDI ve zeta potansiyelleri 208,1 nm, (\pm 256,8), 0,06 ve 13,7 mV (\pm 5,4) olarak hesaplandı. Bu çalışmada elde edilen zeta potansiyel değerleri “negatif yüklü” plazmid DNA ile doğal olarak bağ yapabilen “pozitif yüklü” nanopartiküller bulma hedefimizi desteklemektedir.

Nanopartiküllerin kimyasal yapısı Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) ile analiz edilmiştir. PHBHXX bazlı nanopartikül ve PHBHXX'in FTIR pikleri Şekil 1.'de verilmiştir.

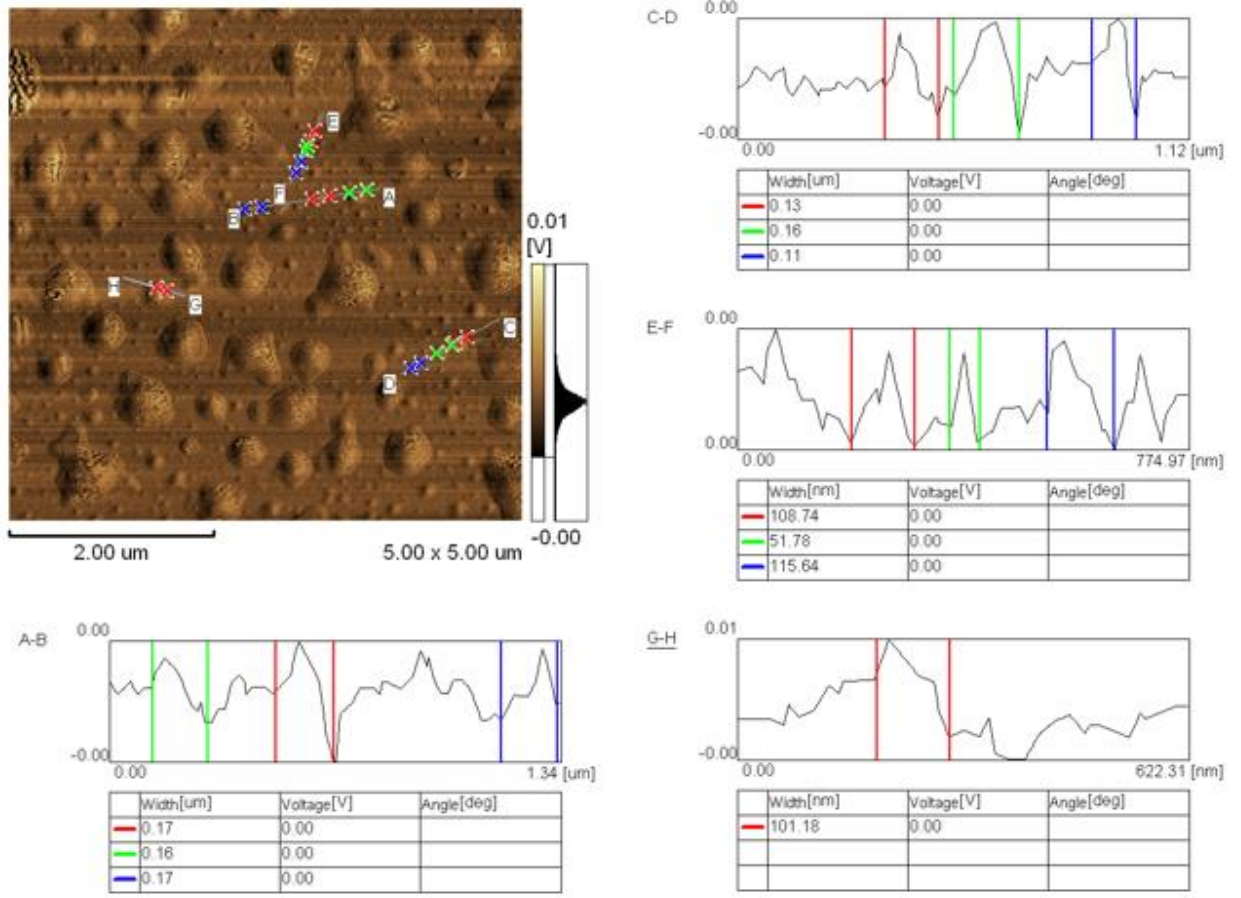


Şekil 1. PHBHXX ve PHBHXX nanopartikül FTIR grafiği

Sentezlenen nanopartiküller işlem görmemiş PHBHHX ile neredeyse aynı yapıdadır. PHBHHX'in kimyasal yapısına ait karakteristik pikler Şekil 1.'de oklar ile gösterilmiştir. Nanoparçacıkların yüzeyindeki küçük konsantrasyon nedeniyle bantlar nispeten düşük yoğunlukta gözlemlendi. Literatürde yer alan PHBHHX çalışmalarında benzer FTIR sonuçlarına rastlanmıştır [10]–[12]. Nanopartiküllerin morfolojisi SEM ve AFM ile incelenmiştir. Hem SEM hem de AFM ile ölçülen ortalama boyut değerleri birbirlerine oldukça yakın olarak tespit edildi. Ölçüm esnasında nanopartiküllerin kurutulması nedeniyle SEM ve AFM sonuçlarında elde edilen boyut değerleri Zetasizer cihazında ölçülen değerden daha küçüktür. Nanopartiküllerin temsili SEM Şekil 2.'de ve AFM görüntüleri Şekil 3.'de verilmiştir. İki şekilde de görüldüğü gibi elde edilen nanopartiküller, tek boyut dağılımına sahip ve şekilleri küreseldir. Karakterizasyon sonucu elde edilen sonuçlar, literatürde yer alan PHBHHX bazlı gen aktarımı çalışmalarında elde edilen veriler ile paralel olup birbirini doğrular niteliktedir [13]. Gen aktarımı çalışmalarında, katyonik lipid nanopartiküller oldukça sık tercih edilmektedir. Bu katyonik özellikteki nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri +10 ile 20 mV olmasının ve boyutlarının 120-250 nm arasında olmasının uygun olduğu bildirilmiştir [14]. Yaptığımız çalışmada, zeta potansiyeli ve boyut ile ilgili datalar ile, SEM ve AFM sonuçlarından elde edilen veriler bu aralıklarda olup, geçmiş çalışmalar ile birbirlerini desteklemektedir. Klinik ve klinik öncesi çalışmalarda kıyasla küçük boyutlardaki nanopartiküllerin hem gen aktarımı hem de hedeflemede daha etkili olduğu görülmüştür [12]. Literatürdeki bu bilgiye dayanarak sentezlenen nanopartiküllerin mümkün olan en küçük boyuttaki seçeneği deneyler için esas alınıp kullanılmıştır.



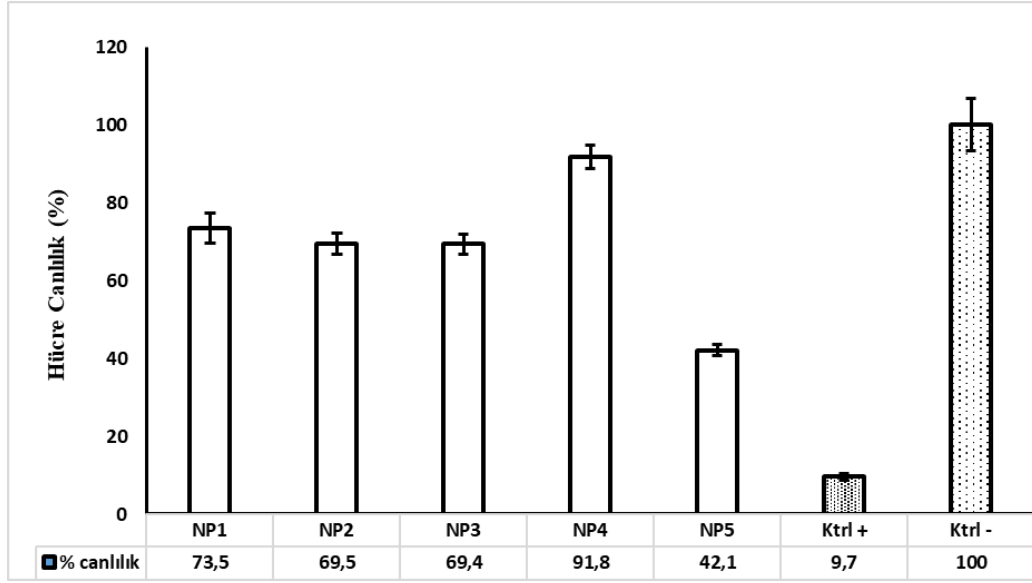
Şekil 2. PHBHHX bazlı nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü



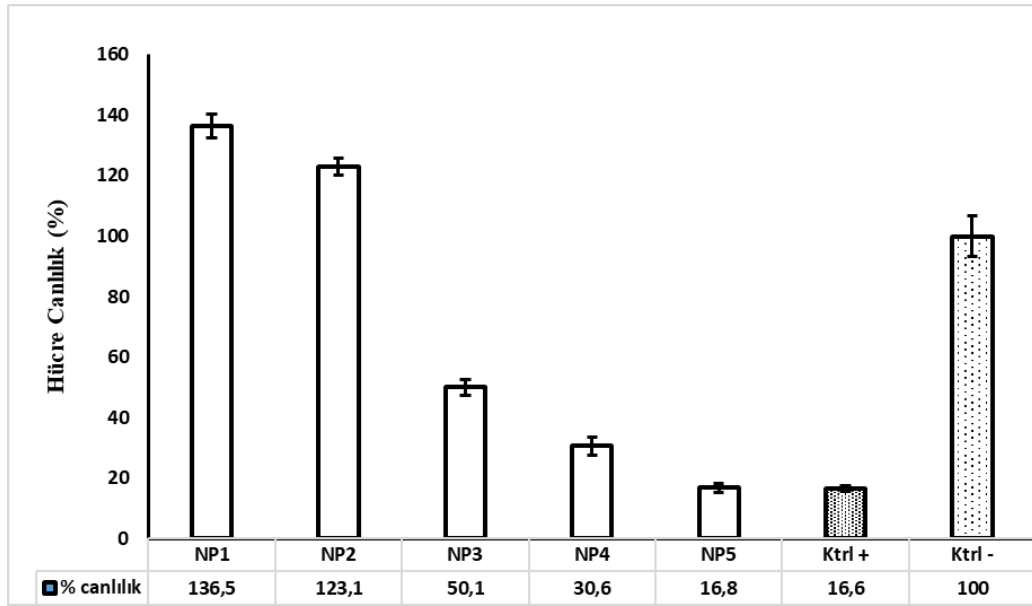
Şekil 3. PHBHHX bazlı nanopartiküllerin atomik güç mikroskobu (AFM) görüntüsü

3.2. PHBHHX Bazlı Nanopartiküllerin Sitotoksitesisi

Bu çalışmada hazırlanan PHBHHX bazlı nanopartiküllerin sitotoksitesite etkileri MTT deneyi ile yapıldı. Analiz için L929 fare fibroblast hücre hattı kullanıldı. Farklı PHBHHX nanopartikül çözeltisi konsantrasyonları ($462\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, $616\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, $770\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$, $1540\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ ve $2310\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) ve aynı oranda hazırlanmış pDNA / PHBHHX konjugatı analiz edildi. Pozitif kontrol olarak %1 DMSO ve negatif kontrol olarak DMEM F-12 besiyeri kullanıldı. Çeşitli nanopartiküller ile yapılan önceki çalışmalarda, başta gümüş nanopartiküllerin [15], [16] ve demir oksit nanopartiküllerin [17] çoğunlukla kullanılan doza bağlı olarak hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda katı lipid nanopartiküllerin önem kazanmasıyla beraber, hücrelere ilaç enkapsülasyonu amacıyla kullanılmaya başlanmış ve sitotoksik değerlendirmeleri MTT yöntemi ile yapılmıştır ve sonuçlar gelecek çalışmalar için örnek teşkil etmiştir. Katı lipid nanopartiküllerin hücreler üzerindeki toksik etkisi diğer nanopartiküllere göre daha az olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [18].



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PHBHHX nanopartiküllerin sitotoksitesisi

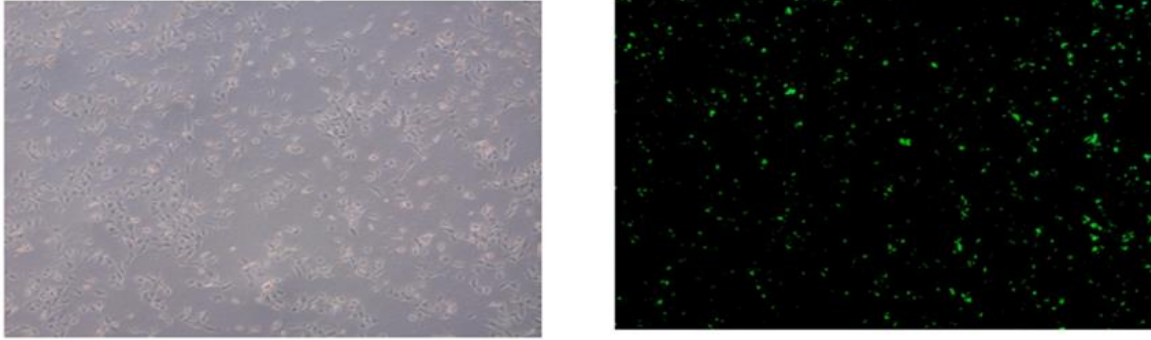


Şekil 5. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan pDNA/PHBHHX konjugatının sitotoksitesisi

Sitotoksite analizinde, 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan nanopartikül çözeltilerinin hücreler üstündeki etkisi gözlemlendi. NP1, NP2, NP3, NP4 VE NP5 şeklinde isimlendirilen çözeltiler sırasıyla $462\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, $616\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, $770\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, $1540\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ve $2310\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ konsantrasyonlarındadır. Hücre canlılığı oranlarına bakıldığında nanopartikül solüsyonu konsantrasyonu arttıkça hücreler üzerindeki toksik etki de paralel olarak artmaktadır. Daha önceki çalışmalarda da nanopartiküllerin benzer sonuçları verdiği yukarıda belirtilmiştir. Bu sonuçlar, genetik materyallerin hücreye taşınabilmesi için taşıyıcı yapısının katyonik olma zorunluluğundan kaynaklanmaktadır. Nano-taşıyıcının yapısındaki amin gruplarının katyonik özellikte olması, lipidlerin hücre üzerinde kısmi bir toksik özellik kattığının belirtilmesiyle açıklanmıştır [19].

3.3. PHBHHX / pEGFP N1- ve IL6 Plazmid Konjugatının Transfeksiyon Verimi

Literatürde, katyonik lipid nanopartiküller ile yapılan transfeksiyon çalışmalarında transfeksiyon verimi ve toksisite arasındaki ilişkinin gen aktarımında ve sonrasında yapılabilecek klinik araştırmalarda önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir [20], [21]. Bu bilgiler göz önüne alınarak transfeksiyon verimi ve hücre canlılığı deneyleri titizlikle yapılmıştır. Transfeksiyon verimi, 3 gün boyunca GFP ekspresyonu gözlemlenerek değerlendirilmiştir. Hücre görüntüleri, *in vitro* koşullarda PHBHHX bazlı nanopartiküllerin plazmid DNA'yı etkin bir biçimde MCF-7 hücrelerine taşıdığını gösterdi. 3 günlük incelemeye göre, hücrelerin florasan ve faz kontrast görüntüleri Şekil 4'te verildi. Transfekte edilen hücreler 3 gün boyunca izlendi ve transfeksiyon verimi hesaplanırken, görüntünün 3 farklı bölgesi seçildi ve 3 tekrar olarak şekilde hesaplandı. MCF-7 hücrelerinin etkinliği birinci gün için %85 ($\pm 3,4$), ikinci gün için %73 ($\pm 2,6$) ve üçüncü gün için %59 ($\pm 4,7$) olarak hesaplandı. 3 günlük ortalama transfeksiyon verimi ise %73 ($\pm 5,8$) olarak hesaplandı. Gen aktarımı yapılmayan kontrol kuyularında florasan ışık altında herhangi bir ışımaya gözlenmemiştir. Transfekte edilen MCF-7 hücrelerinin faz kontrast ve florasan mikroskop altında çekilen görüntüleri Şekil 4'te verilmiştir. Literatürde yer alan ve sıkça kullanılan altın nanopartiküller ile yapılan çalışmalarda gen aktarımında transfeksiyon verimi yaklaşık %50 olarak verilmiştir, ancak bizim çalışmamızda da kullanıldığı gibi lipid bazlı nanopartiküller hücreler üzerinde daha az toksik özelliğe sahiptir ve daha yüksek transfeksiyon verimi sağlamaktadır [22]. PHBHHX bazlı nanopartikülün, diğer katı lipid nanopartiküller ile yapılan benzer çalışmalara göre transfeksiyon veriminin daha yüksek olduğu görülmüş ve bu sonucun da gelecek çalışmalar için umut vaat edici olduğu düşünülmüştür [19]. Aynı zamanda ürettiğimiz nanopartiküller, literatürde yer alan polimerik bazı nanopartiküllere göre de hem daha yüksek transfeksiyon verimi hem de daha az toksisiteye sahiptir [23].



Şekil 6. Transfeksiyon sonrası MCF-7 hücrelerinin A) Faz kontrast mikroskobu görüntüsü ve B) Florasan mikroskobu görüntüsü

4. SONUÇ

Son zamanlarda, kanser immünoterapisi, tümörler ile savaşmada için oldukça popüler bir yaklaşım. İmmünoterapi, tümörleri tedavi edebilme ve ayrıca metastazı önleme potansiyeli açısından umut vaat eden bir yöntemdir. Bununla birlikte, mevcut kanser immünoterapi yöntemleri, terapötik biyomoleküllerin aktarılmasının sınırlamaları nedeniyle sınırlı klinik faydalara sahiptir. Kanser immünoterapisinde nanopartiküllerin kullanıldığı son çalışmalar, nano ölçekli taşıyıcıların avantajlarını ortaya koymuştur. Nanopartiküller, immün uyarıcı ajanların, tümör hücrelerine sunumunu sağlamak adına birtakım modifikasyonlara da imkan sağlamaktadır. Nanopartiküller için kullanılan malzemeler, nanopartikül kompozisyonunu değiştirerek farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip taşıyıcılar elde etmemize imkan sağlar. Çalışma kapsamında sentezlenen PHBHHX bazlı katı lipid nanopartikül literatürde yer almayan yeni bir taşıyıcıdır. PHBHHX bazlı katı lipid nanopartikül, pEGFP N1- ve IL6 plazmid DNA model etken molekülü başarılı bir şekilde MCF-7 hücre hattına taşımıştır, transfeksiyon verimi oldukça yeterli gözükmektedir ve bu yeni taşıyıcı kanser immünoterapisinde kullanılmak için aday niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- [1] He X *et al.* Sequentially Triggered Nanoparticles with Tumor Penetration and Intelligent Drug Release for Pancreatic Cancer Therapy. *Adv. Sci.*, 2018, doi: 10.1002/advs.201701070.
- [2] Zhang H and Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy, *Journal of Cancer*. 2018; doi: 10.7150/jca.24577.
- [3] Schuster M, Nechansky A, Loibner H and Kircheis R. Cancer immunotherapy, *Biotechnology Journal*. 2006, doi: 10.1002/biot.200500044.
- [4] Lee S and Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 2011; doi: 10.3390/cancers3043856.
- [5] Riley RS, June CH, Langer R and Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019; doi: 10.1038/s41573-018-0006-z.
- [6] Zarogoulidis P. et al. Interleukin-7 and interleukin-15 for cancer. *Journal of Cancer*. 2014; doi: 10.7150/jca.10471.
- [7] Özlük AA, Oytun MG and Güneç D. Kanser immünoterapisi. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplant. Derg.*, 2017; doi: 10.5606/FNG.TRANSPLANTASYON.2017.004.
- [8] Gill D, Hahn AW, Sonpavde G, and Agarwal N. Immunotherapy of advanced renal cell carcinoma: Current and future therapies. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2016; doi: 10.1080/21645515.2016.1212794.
- [9] Güven GU, Laçın NT, and Pişkin E. Monosize polycationic nanoparticles as non-viral vectors for gene transfer to HeLa cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2008; doi: 10.1002/term.78.
- [10] Sun M, Zhou P, Pan LF, et al. Enhanced cell affinity of the silk fibroin- modified PHBHHx material. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2009; doi: 10.1007/s10856-009-3739-8.
- [11] Xi J, Kong L Gao Y, et al. Properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) films modified with polyvinylpyrrolidone and behavior of MC3T3-E1 osteoblasts cultured on the blended films. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2005, doi: 10.1163/156856205774472344.
- [12] Yang H.-X, Sun M, Zhang Y, et al. Degradable PHBHHx Modified by the Silk Fibroin for the Applications of Cardiovascular Tissue Engineering. *ISRN Mater. Sci.*, 2011; doi: 10.5402/2011/389872.
- [13] Kiliay E, Demirbilek M, Türk M, et al. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2011; doi: 10.1016/j.ejps.2011.08.013.
- [14] Lin G, Zhang H, and Huang L, Smart polymeric nanoparticles for cancer gene delivery, *Mol. Pharm.* 2015; doi: 10.1021/mp500656v.
- [15] Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, *Toxicol. Lett.*, 2009; doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.009.

- [16] Navarro E. *et al.*, Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, doi: 10.1021/es801785m.
- [17] Laffon B *et al.*, Cellular and molecular toxicity of iron oxide nanoparticles, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018.
- [18] Z. Xu *et al.*, The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma, *Biomaterials*, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.014.
- [19] Büyükköroğlu G. Development of solid lipid gene delivery system. *Turkish J. Pharm. Sci.*, 2016; doi: 10.5505/TJPS.2016.44153.
- [20] Olbrich C, Bakowsky U, Lehr CM, et al. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release*, 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(01)00506-5.
- [21] del Pozo-Rodríguez A, Delgado D, Solinís MA et al. Solid lipid nanoparticles: Formulation factors affecting cell transfection capacity. *Int. J. Pharm.*, 2007; doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.03.015.
- [22] Thomas M and Klivanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid dna into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, doi: 10.1073/pnas.1233634100.
- [23] Sunshine JC, Sunshine SB, Bhutto I, Handa JT and Green JJ. Poly (β -amino ester)-nanoparticle mediated transfection of retinal pigment epithelial cells in vitro and in vivo. *PLoS One*, 2012; vol. 7, no. 5.