

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN-2 GENİNİN LİPİD
BAZLI NANOPARTİKÜL İLE MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERE TRANSFEKSİYONU**

Şeyda AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş Danışman

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Ocak, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN-2 GENİNİN LİPİD
BAZLI NANOPARTİKÜL İLE MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERE TRANSFEKSİYONU**

Şeyda AYDIN tarafından hazırlanan tez çalışması 23.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY, Üye
Acıbadem Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Kemik Morfogenetik Protein-2 Geninin Lipid Bazlı Nanopartikül ile Mezenkimal Kök Hücrelere Transfeksiyonu” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Şeyda AYDIN



Bu alışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FYL-2023-5486” numaralı yüksek lisans tez projesi, 01.10.2021-01.03.2023 tarihleri arasında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ve 01.03.2023-30.09.2023 tarihleri arasında TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Program ile desteklenmiştir.



Anneme

TEŞEKKÜR

Bilgi ve birikimi ile beni donatan, sadece yüksek lisans tez çalışmalarımı desteklemekle kalmayıp beni başta akademi olmak üzere hayatın her alanına hazırlayan ve deneyimlerini bana cömertçe aktaran sayın tez danışmanım Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU'na,

Bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan sayın eş danışmanım Prof. Dr. Sezgin ÇELİK'e,

Tezimi inceleyerek değerli vakitlerini ayıran sayın jüri üyeleri Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY'e ve Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR'e,

Yüksek lisans eğitimimi 01.10.2021-01.03.2023 tarihlerinde 2210-A Genel Yurt İçi ve 01.03.2023-30.09.2023 tarihlerinde 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK'a),

Tez çalışmamı FYL-2023-5486 numaralı yüksek lisans tez projesi ile destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne,

Rejeneratif Doku ve Hücre Kültürleri laboratuvar ekibi arkadaşlarımdan Seda GENÇ ŞİMŞEK'e, deneylerimle başını sık sık ağrıttığım Hanife Sevgi VARLI MA'ya, hücre çalışmalarımda sonsuz desteklerini esirgemeyen Sinan ÜNAL'a, Nevra Pelin CESUR'a, Meryem AKKURT YILDIRIM'a, Volkan YALMAN'a, Büşra YILMAZ'a, Hasan Hüseyin GÜLERCAN'a ve Mehmet ÖZKIR'a,

Tez çalışmam boyunca beraber aynı zorluklara göğüs gerdiğim, yanımda olan ve desteklerini asla esirgemeyen güçlü arkadaşlarımdan Kosar Zad GHAFARI VAHDAT'a, Vildan SARAÇ'a ve Rabia HIZARCI'ya,

Hayatımın her noktasında beni destekleyen ve dimdik ayaklarımın üzerinde durmamı sağlayan annem Hafize AYDIN'a, babam Hulusi AYDIN'a, abim Engin AYDIN ve değerli yengem Yasemin AYDIN'a, ablam Eda AYDIN'a ve abim Cemal AYDIN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şeyda AYDIN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Tezin Hipotezi	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Mezenkimal Kök Hücreler	4
2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Keşfi	4
2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımı	5
2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kökenleri	7
2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitesi	8
2.2 Rejeneratif Tıp ve Hücresel Tedavi Uygulamalarında Mezenkimal Kök Hücreler	11
2.2.1 Yara Rejenerasyonu	12
2.2.2 Nöral Rejenerasyon	13
2.2.3 Karaciğer Rejenerasyonu	13
2.2.4 Kalp Rejenerasyonu	14
2.2.5 Kemik Rejenerasyonu	14
2.3 Gen Aktarım Sistemleri	19
2.3.1 Viral Vektörler	21
2.3.2 Viral Olmayan Vektörler	25
2.4 Katı Lipid Nanopartikül	29
2.4.1 Katı Lipid Nanopartikül Sentez Yöntemleri	30
2.5 Senesens	34
3 MATERYAL VE METOT	36
3.1 Materyal	36
3.1.1 Kullanılan Hücre Hatları	36

3.1.2	Kullanılan Sarf Malzemeler	36
3.1.3	Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.4	Kullanılan Kitler.....	38
3.1.5	Kullanılan Cihazlar	39
3.2	Metot.....	40
3.2.1	BMP-2 Kodlayan Ekspresyon Plazmidinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması.....	40
3.2.2	Katı Lipid Nanopartikül Sentezi	43
3.2.3	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Karakterizasyonu	45
3.2.4	Hücre Kültürü Çalışmaları	47
3.2.5	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Sitotoksitesi	50
3.2.6	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikül-Plazmid Kompleksinin Stabilitesi	51
3.2.7	BMP-2 Plazmidinin Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülü Aracılığıyla Transfeksiyonu.....	52
3.2.8	Gerçek Zamanlı PCR ile Transfeksiyonun mRNA Düzeyinde Değerlendirilmesi	54
3.2.9	ELISA ile Transfeksiyonun Protein Düzeyinde Değerlendirilmesi	56
3.2.10	Senesens-ilişkili Beta Galaktosidaz Boyaması ile Senesensin Belirlenmesi	57
4	SONUÇ VE TARTIŞMA	58
4.1	BMP-2 Kodlayan Ekspresyon Plazmidinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması	58
4.1.1	BMP-2 Kodlayan Plazmidin <i>E. coli</i> XL10-Gold'a Transformasyonu	58
4.1.2	BMP-2 Kodlayan Plazmidlerin Saflaştırılması.....	59
4.2	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Karakterizasyonu	61
4.2.1	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Boyutunun ve Şeklinin Belirlenmesi	61
4.2.2	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Ortalama Büyüklüğü, Yüğü ve Boyut Dağılımının Belirlenmesi.....	62
4.2.3	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Kimyasal Bağlarının Belirlenmesi	64
4.3	Hücre Çalışmaları	65
4.4	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Sitotoksitesi.....	66
4.5	Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikül-Plazmid Kompleksinin Stabilitesi.....	67

4.6 BMP-2 Plazmidinin Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülü Aracılığıyla Transfeksiyonu.....	69
4.6.1 Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	71
4.7 Gerçek Zamanlı PCR ile Transfeksiyonun mRNA Düzeyinde Değerlendirilmesi.....	72
4.8 ELISA ile Transfeksiyonun Protein Düzeyinde Değerlendirilmesi.....	75
4.9 Senesens-ilişkili Beta Galaktosidaz Boyaması ile Senesensin Belirlenmesi	76
KAYNAKÇA	79
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	110



SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
rpm	Dakikada Dönme Hızı
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
s	Saniye
°C	Santigrat Derece
U	Ünite
V	Volt
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

Ag	Antigen
ALP	Alkalın Fosfataz
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
ALSFRS	ALS Functional Rating Scale
ATR	Attenuated Total Reflection
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CFU	Colony Forming Unit
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblast
DEPC	Diethyl Pyrocarbonate
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
DOGS	Diocetadecylamido-glycylspermine
DOSPA	2,3-dioleyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium Trifluoroacetate
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammoniumpropane
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammonium Chloride
E1	Envelope Protein 1
E3	Envelope Protein 3
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FTIR	Fourier-transform Infrared Spectroscopy
FVC	Forced Vital Capacity
GATA4	GATA Binding Protein 4
GATA6	GATA Binding Protein 6
GDE	Global Disease Evaluation
HA	Hydroxyapatite
HIV	Human Immunodeficiency Virus

HKH	Hematopoietik Kök Hücre
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLB	Hydrophilic–lipophilic balance
HPH	High-pressure Homogenization
HSV	Herpes Simplex Virus
hTGF- β 1	Human Transforming Growth Factor Beta 1
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KLN	Katı Lipid Nanopartikül
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
MyoD	Myoblast Determination Protein 1
NP	Nanopartikül
Oct4	Octamer-binding Transcription Factor 4
OD	Optik Dansite
ODA-NP	Oktadesilamin bazlı nanopartikül
ORF	Open Reading Frame
OSX	Osterix (Sp7 Transcription Factor)
pBMP-2	Plazmid BMP-2
pDNA	Plazmid DNA
PdI	Polydispersity Index
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
RCF	Relative Centrifugal Force
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RUNX2	Runt-Related Transcription Factor 2
SA- β -gal	Senescence-associated Beta-galactosidase
SEM	Scanning Electron Microscope
SMC	Smooth Muscle Cell
Sox2	SRY(Sex Determining Region Y)-Box 2
Sox9	SRY-Box Transcription Factor 9
ssDNA	single-stranded DNA
ssRNA	single-stranded RNA

TCP	Tricalcium Phosphate
TGF- β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
TUS	Tomographic Union Score
UV	Ultraviyole
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Mezenkimal kök hücrelerin kökenleri ve farklılaşma kapasiteleri	6
Şekil 2.2 Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma adımları	10
Şekil 2.3 Mezenkimal kök hücrelerin osteositlere farklılaşmasında rol oynayan faktörler.....	11
Şekil 2.4 Mezenkimal kök hücrelerin doğrudan enjeksiyonla uygulanması	16
Şekil 2.5 Biyo-iskeleler üzerine ekilmiş mezenkimal kök hücrelerin uygulanması	17
Şekil 2.6 Genle modifiye edilmiş mezenkimal kök hücrelerin uygulanması	18
Şekil 2.7 Viral vektörlerin transgeni hücre içerisine aktarımı.....	22
Şekil 2.8 Viral olmayan vektörlerin transgeni hücre içerisine aktarımı	27
Şekil 3.1 BMP-2 cDNA ORF ve GFP kodlayan plazmidin haritası	40
Şekil 3.2 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülünün sentezi	44
Şekil 3.3 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülünün yapısı.....	45
Şekil 3.4 BMP-2 plazmidinin oktadesilamin bazlı KLN ile transfeksiyonu	53
Şekil 4.1 LB agar petriplerde pBMP-2 transformasyonunun değerlendirilmesi	58
Şekil 4.2 Agaroz jel elektroforezinde pBMP-2'nin yürüme görüntüsü.....	60
Şekil 4.3 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin SEM görüntüsü.....	62
Şekil 4.4 Saf oktadesilamine ve oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülüne ait FTIR spektrumu	64
Şekil 4.5 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler.....	65
Şekil 4.6 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülün L929 ve MKH hücrelerindeki toksisitesi	66
Şekil 4.7 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikül-plazmid kompleksinin stabilitesi	68
Şekil 4.8 Transfeksiyon sonrası 24, 48 ve 72 saatin 10x objektifteki faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüsü.....	70
Şekil 4.9 Transfeksiyonun 48. Saatine 10x objektifte faz kontrast (a) ve floresan (b) görüntüsü.....	71
Şekil 4.10 GAPDH ve BMP-2'nin amplifikasyon grafiği.....	73
Şekil 4.11 GAPDH ve BMP-2'nin melt curve grafiği.....	73
Şekil 4.12 BMP-2'nin göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.....	74
Şekil 4.13 Referans örneğin seri dilüsyonu sonucu elde edilen standart eğri grafiği	75
Şekil 4.14 Transfeksiyon deneyleri süresince yapılan SA-β-gal boyaması.....	77

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Mezenkimal kök hücreleri belirli bir hücre hattına farklılaşmasını tetikleyen faktörler	9
Tablo 2.2 Gen aktarım sistemlerinin avantajları ve dezavantajları.....	20
Tablo 3.1 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülün sentez içeriği.....	44
Tablo 3.2 Kullanılan ileri ve geri primer dizileri	55
Tablo 4.1 pBMP-2 izolasyon değeri	60
Tablo 4.2 Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon değerleri	63
Tablo 4.3 RNA izolasyon ve cDNA değerleri	72



Kemik Morfogenetik Protein-2 Geninin Lipid Bazlı Nanopartikül ile Mezenkimal Kök Hücrelere Transfeksiyonu

Şeyda AYDIN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş-Danışman: Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Mezenkimal kök hücreleri (MKH'ler), rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak klinikte MKH'lerin kullanımı günümüzde sınırlıdır, çünkü istenilen hücre tipine farklılaşma gibi hücrel davranışları kontrol etmenin etkili bir yolu bulunmamaktadır. Bu noktada, genetik modifikasyon, MKH'lerin daha aktif bir şekilde kontrol edilmesine olanak sağlayabilir. Fakat MKH'lerin genetik manipülasyonu ile ilgili en büyük zorluk, verimli ve güvenli bir gen aktarım sisteminin henüz bulunmamış olmasıdır. Gen aktarım sistemleri, viral ve viral olmayan olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Viral vektörler, gen transferi için virüslerin kullanıldığı sistemleri içerir. Viral olmayan vektörler ise biyouyumlu ve biyogüvenli materyaller aracılığıyla gen transferini gerçekleştirir. Bu bağlamda, viral olmayan gen aktarım yöntemlerinden biri olan katı lipid nanopartiküller, plazmid taşıyıcısı olarak kullanılmıştır. Yüzeyindeki pozitif yük nedeniyle nanopartiküller, negatif yüklü DNA ile stabil bir kompleks

oluşturur. Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküller, (y/s) tekli emülsifikasyon-çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin boyut ve yük analizleri Zetasizer cihazında gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama büyüklüğü 484.6 ± 211.8 nm, Polidispersite Endeksi (PdI) 0.153 ve yükü 31.8 ± 5.40 mV ölçülmüştür. Nanopartiküllerin sitotoksitesisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Nanopartikül ile BMP-2 kodlayan plazmid kompleksi oluşturulmuştur. Komplekslerin stabilitesi agaroz jelde yürütölerek ile değerlendirilmiştir. Nanopartikül-pBMP-2 kompleksi ile MKH'ler transfekte edilmiştir. Transfeksiyon etkinliği $\%88.2 \pm 0.5$ olarak hesaplanmıştır. Transfeksiyon sonrası, BMP-2 gerçek zamanlı PCR ile mRNA ve ELISA ile protein düzeyinde tespit edilmiştir. Transfeksiyon çalışmaları süresince MKH'lerin senesense girmediği SA- β -gal boyaması ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, gen aktarımı, BMP-2, katı lipid nanopartikül, transfeksiyon

Bone Morphogenetic Protein-2 Gene Transfection of Mesenchymal Stem Cells Via Lipid Based Nanoparticle

Şeyda AYDIN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Co-supervisor: Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Mesenchymal stem cells (MSCs) hold significant potential in the field of regenerative medicine and tissue engineering. However, the clinical utilization of MSCs is currently limited due to the lack of an effective method to control cellular behaviors such as differentiation into the desired cell type. At this juncture, genetic modification may provide an opportunity to actively control MSCs. However, the major challenge in the genetic manipulation of MSCs lies in the absence of an efficient and safe gene transfer system. Gene transfer systems can be broadly categorized into two main classes: viral and non-viral vectors. Viral vectors employ viruses for gene transfer, while non-viral vectors utilize biocompatible and bio-safe materials for gene delivery. In this context, one of the non-viral gene transfer methods, solid lipid nanoparticles have been designed for use as a plasmid carrier. Solid lipid nanoparticles, owing to their positive surface charge, form a stable complex with negatively charged DNA. Octadecylamine-based solid lipid nanoparticles were synthesized using (o/w) single emulsification-solvent evaporation method. The size and charge analyses of the obtained nanoparticles were performed using a Zetasizer device, revealing an average size of 484.6 ± 211.8 nm, a Polydispersity Index (Pdl) of 0.153, and a charge of 31.8 ± 5.40 mV. The

cytotoxicity of the nanoparticles was determined through MTT analysis. A complex of nanoparticles and plasmid encoding BMP-2 was formed, and the stability of these complexes was evaluated through agarose gel electrophoresis. MSCs were transfected with the nanoparticle-pBMP-2 complex, with a transfection efficiency of $88.2\pm0.5\%$. Following transfection, BMP-2 was detected at the mRNA level through real-time PCR and at the protein level through ELISA. Senescence of the MSCs was assessed using SA- β -gal staining throughout the course of transfection studies.

Keywords: Mesenchymal stem cell, gene delivery, BMP-2, solid lipid nanoparticle, transfection



1.1 Literatür Özeti

Klonojenik özellikleri, kendini yenileyebilme kabiliyeti ve özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilme yeteneği, kök hücreleri rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında önemli kılan temel özelliklerdir. Büyüme faktörleri, sinyaller ve hücre iskeleleri veya ekstraselüler matrikslerle birlikte uygulandığında, kök hücreler bu özellikleri sayesinde belirli koşullar altında özel fonksiyonlu hücrelere farklılaşabilmektedirler. Bu özellikleri nedeniyle kök hücreler, doku onarımı ve hücre tedavilerde potansiyel bir anahtar rol oynamaktadırlar (Moraleda vd., 2006). Embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreleri olmak üzere iki ana sınıfa ayrılan kök hücreler, farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadırlar (Ding vd., 2011). Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan mezenkimal kök hücreler, multipotent özelliğe sahip yetişkin kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler); adipoz doku, göbek kordonu kanı, periferik kan, dental pulpa, amniyotik sıvı ve kemik iliği gibi birçok kaynaktan izole edilebilirler (Uccelli vd., 2008).

MKH'ler, rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğinde önemli bir potansiyele sahip olsa da MKH'lerin klinikteki kullanımı kısıtlıdır. Çünkü MKH'lerin davranışlarının *in vivo*'da kontrol edilmesi ve istenilen hücre türüne farklılaşmasının sağlanması oldukça güçtür (Halloran vd., 2020). Genetik modifikasyon hücrelerin aktif bir şekilde kontrol edilmesi için fırsat sağlayabilir. MKH aracılı gen tedavisi ve hücre tedavisi önemli bir potansiyel barındırmaktadır. İnsan MKH'lerin genetik manipülasyonunun önündeki en büyük engellerden biri, verimli ve güvenli bir taşıma sisteminin olmamasıdır.

Hücrelere gen aktarımı yapmak için viral ve non-viral temelli çeşitli vektörler kullanılmaktadır. Viral vektörlerin kullanımını sınırlandıran unsurlar; düşük yükleme kapasitesi, bağışıklık yanıt oluşturmaması, büyük ölçekli üretimin sınırlı olması vb. şekilde sıralanabilir. Non-viral vektörlerin, gen aktarım verimliliği viral vektörlerle karşılaştırıldığında daha düşük olmasına karşılık, viral olmayan

vektörlerin -özellikle katı lipid nanopartiküllerin (KLN'ler)- sentezlenmesi daha kolay, daha ucuz ve hedeflenme olanağının bulunması avantajları arasındadır. Ayrıca, kimyasal tasarım esnekliği avantajları ile KLN'lerin hücre/doku hedeflenmesinde uygun modifikasyonların yapılmasına olanak vermektedir (Türkoğlu, 2020).

Literatürde; mezenkimal kök hücrelere *BMP-2* genini eksprese eden plazmidler ticari transfeksiyon ajanları (F. Li vd., 2022) ile, viral vektörler aracılığıyla (Fong vd., 2010; Guan vd., 2015; Yang vd., 2009), kalsiyum fosfat nanopartikülleriyle (Lee vd., 2019) ve kitosan nanopartikülleri (Y. Hu vd., 2021) ile aktarımı yapılmış ve osteojenik potansiyeli raporlanmıştır. Mezenkimal kök hücrelerden türetilmiş eksozomlarla, *BMP-2* plazmidinin transfeksiyon etkinliği ve *in vivo* fare deneylerinde kortikal ve trabeküler kemik defekti üzerindeki rejenerasyon etkinliğini arttırdığını micro-CT analizi ile raporlanmıştır (F. Li vd., 2022).

Sunulan bu tezde, ilk kez oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülleri *BMP-2* plazmidinin mezenkimal kök hücrelere gönderilmesinde kullanıldı ve transfeksiyon verimliliği ilk kez raporlandı. Oktadesilamin bazlı KLN'ler ile *BMP-2* plazmidinin mezenkimal kök hücrelere transfeksiyonu ve *BMP-2* geninin ekspresyonu ilk kez değerlendirildi.

1.2 Tezin Amacı

Sunulan bu tezin amacı, *BMP-2* kodlayan plazmidi taşıyan oktadesilamin bazlı KLN'ler sentezlemektir. Oktadesilamin bazlı KLN'ler amin grupları sebebiyle nükleik asitlerle elektrostatik etkileşime girebilen, biyouyumlu özelliklere sahiptir. Elde edilen nanopartikül/p*BMP-2* kompleksi MKH'lere aktararak transfeksiyon verimliliği belirlendi. Sentezlenen KLN'ler ile verimli bir transfeksiyonun gerçekleşmesi bu tezin amaçları arasındadır. Bu nedenle; *BMP-2* kodlayan plazmidin çoğaltılması ve saflaştırılması, oktadesilamin bazlı KLN'lerin hazırlanması, nanopartiküllerin karakterizasyonunun yapılması, oktadesilamin bazlı KLN'lere *BMP-2* plazmidlerinin yüklenmesi, hazırlanan plazmid-nanopartikül kompleksleri ile MKH'lerin transfeksiyonu ve transfeksiyon etkinliğinin tespit edilmesi sunulan tezin amaçlarıdır.

1.3 Tezin Hipotezi

Sunulan tezin hipotezi şudur: oktadesilamin bazı KLN'ler ile *BMP-2* geni mezenkimal kök hücrelere aktarıldığında, MKH'lerde transfeksiyon etkinliğinin artması beklenmektedir. MKH'lerin kemik rejenerasyonundaki potansiyeli bilinmektedir. Fakat, fizyolojik koşullarda farklılaşmanın kontrol altına alınabilmesi uygulamada bir kısıtlamaya neden olmaktadır. Gen aktarımı yoluyla hücre tipine farklılaşmanın kontrol edilebilmesi mümkün olabilir. Buradan hareketle, literatürde *BMP-2* geni çeşitli yöntemlerle MKH'lere aktarıldığı ve osteojenik farklılaşma üzerindeki potansiyeli ortaya koyulmuştur. Fakat literatürde MKH'lere oktadesilamin bazı KLN taşıyıcı sistem olarak kullanılması sonucu *BMP-2*'nin transfeksiyon verimliliği henüz raporlanmamıştır.

Diğer bir ifadeyle, sunulan tezin özgün değeri şu şekilde vurgulanmaktadır: sunulan tez kapsamında, ilk kez MKH'ler *BMP-2* plazmidleri ile oktadesilamin bazı KLN'ler kullanılarak transfekte edildi. Transfeksiyon etkinliği ilk kez raporlandı.

2.1 Mezenkimal Kök Hücreler

2.1.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Keşfi

Mezenkimal Kök Hücre (MKH) biyolojisinin tarihi, 1909 yılında Alexander A. Maximov tarafından kemik iliğine yerleşik bulunan hematopoietik kök hücrenin (HKH) keşfedilmesi ile doğduğu ve oluştuğu söylenilmektedir (Jones vd., 2013). 1960'lara gelindiğinde, HKH'ler ile ilgili bilgiler genişledikçe kemik iliği transplantasyon stratejilerinin uygulanmasında büyük bir ilgi ortaya çıkmıştır. *In vitro* hücre kültürü deneyimleri ve *in vivo* hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar, taze izole edilmiş HKH'lerin birincil ve ikincil alıcılara nakledilme potansiyelini göstermiştir (Doulatov vd., 2012).

HKH'lerin keşfinden hemen sonra, Friedenstein ve çalışma arkadaşları (1966) farede gerçekleştirdiği heterotopik transplantasyondan sonra kemik iliği stromasının kemik, yağ, kıkırdak ve retiküler hücreleri oluşturabildiğini raporlamıştır. Bu veri, hematopoietik olmayan kemik iliği öncül hücrelerinin varlığını ve skeletal potansiyelini göstermektedir (Friedenstein vd., 1966; Tavassoli & Crosby, 1968).

Dr. Alexander Friedenstein ve grubu tarafından Sovyetler Birliğinde, Moskova'daki Gamaleya Enstitüsü'nde yürütülen çalışmada, kemik iliği mikroçevresi ve bu mikroçevredeki hücrelerin transplantasyon prosedürü esnasında kullanılan radyasyon ışınına maruziyeti ve maruziyete karşı geliştirdiği direnci incelemiştir (Friedenstein vd., 1968). Çalışmalarının ilerleyen süreçlerinde, Friedenstein vd. (1976) kemik iliği ekilmiş cam kültür kaplarında oldukça basit kültür ortamında hematopoietik olmayan tutunabilen ve transplante olabilen bir hücre popülasyonu üretmişlerdir. Ayrıca, nakledilen tek koloniler kendilerini yenileyebilme ve kemik, kıkırdak ve fibröz dokular gibi olgun hematopoietik olmayan dokular oluşturduğu raporlanmıştır. Böylece, tek kolonilerin gerçek kök hücre doğası gösterme potansiyeli ortaya konmuştur (Friedenstein, 1976).

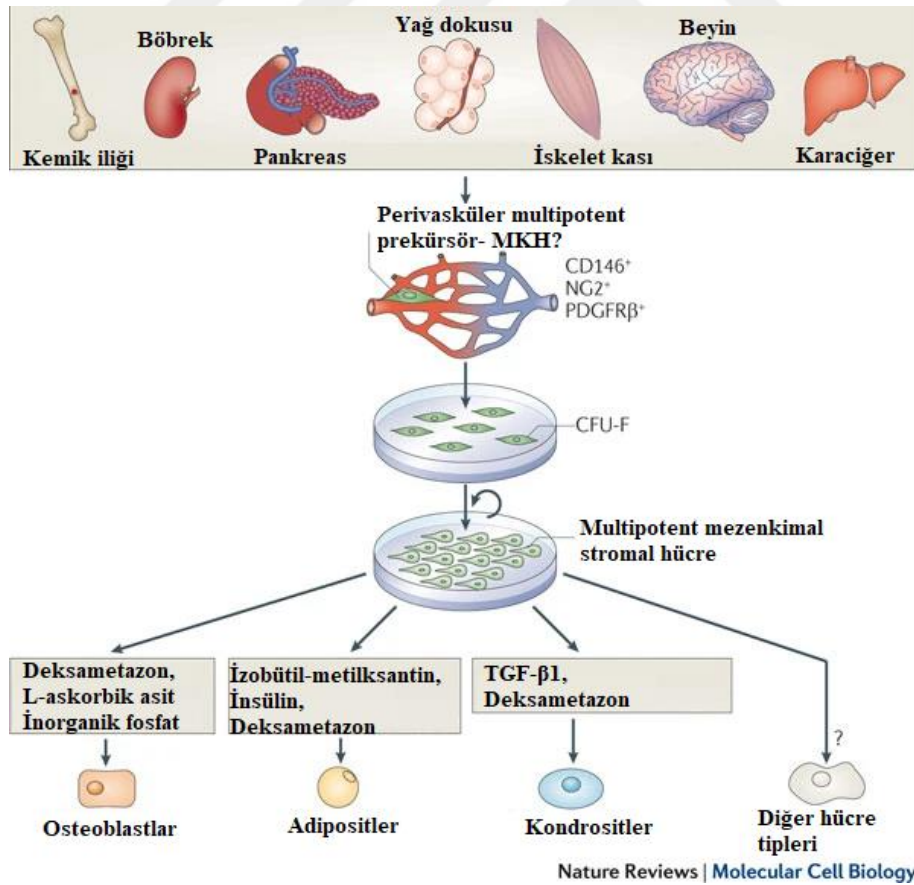
Koloni oluşturan birim fibroblastları (CFU-F) olarak adlandırılan fibroblasta benzer öncül hücreler olduğu gösterilmiştir (Friedenstein vd., 1970). CFU-F'ler plastik yüzeye tutuma özelliği ile seçilebilmekte ve *in vitro*'da çalışılabilmektedir. Tek bir CFU-F'lerden köken alan kültürlenmiş hücrelerin çoğalabildiği ve aynı zamanda da osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşma yetkinliğini koruyabildiği saptanmıştır (Pittenger vd., 1999). O zamanlarda, *in vitro*'da çok yönlülük kapasitesi ve çoğalması *in vivo*'daki kök hücrenin en belirgin özellikleri olan multipotens ve kendini yenileme indikatörü olarak yorumlanmıştır (Meirelles vd., 2006; Prockop, 1997). Orijinal tanımlamalarından bu yana, *in vitro* trilineage (osteoblast, adiposit ve kondrosit) potansiyele dayalı olarak MKH'ler olarak kategorize edilen stromal hücreler, birçok yetişkin ve embriyonik dokudan izole edilmiştir (Javazon vd., 2004; Kuznetsov vd., 2001; Meirelles vd., 2006; Mendes vd., 2005).

Hematopoietik kök hücrelerin oluşumunu açıklayan hematopoez kavramı gibi hem “mezenkimal” kök hücre terimi hem de MKH'lerin oluşumunu açıklayan “mesengenesis” kavramı Arnold Caplan ve Darwin Prockop tarafından önerilmiştir (Caplan, 1991; Prockop, 1997). Caplan, bu ata kök hücre altına farklılaşma potansiyeli giderek azalan olgun ‘öncül’ hücreleri yerleştirdiği bir hiyerarşi modeli oluşturmuştur. Örneğin, osteo- öncül hücre ve kondro- öncül hücre sırasıyla kemik ve kıkırdak dokusuna farklılaştığı için hiyerarşik olarak MKH'lerin altında yer almaktadır (Caplan, 1994). 1991 yılında ilk klonojenik iliğimsi stromal hücre belirteci Stro-1 tanımlanmıştır (Simmons & Torok-Storb, 1991). Kemik iliğindeki MKH'lerin hücre topografisi Paulo Bianco ve Pamela Robey (2000) tarafından önerilmiştir.

2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımı

Doku gelişiminin ve korunmasının sürdürülmesine olanak tanıyan, ‘multipotens’ olarak tanımlanan birden fazla olgun hücre tipine farklılaşma kabiliyeti ve kendi kendini yenileyerek kök hücre havuzunu genişletme yeteneği kök hücrelerin klonojenik karakterinin en önemli iki özelliğini oluşturmaktadır (Nombela-Arrieta vd., 2011; Weissman, 2000). Ayrıca bu özellikler, kök hücreleri diğer hücre gruplarından ayırarak tanımlanmasını sağlamaktadır.

Kök hücreleri tanımlamak için ilk kriter multipotensliktir. Kök hücreler, fonksiyonel ve özelleşmiş olgun hücelere farklılaşabilme yetkinliğine sahiptir. Nötrofiller, lenfositler, doğal katil hücreler, dentritik hücreler, makrofaj ve monositler gibi tüm kan bileşenlerine farklılaşabilen hücreler hematopoietik kök hücre (HKH) olarak tanımlanmaktadır. Kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere ve stroma hücrelerine farklılaşabilirler. İkinci bir kriter ise kendini yenileyebilmedir. Kendini yenileyebilme kapasitesi, hücrelerin sayısızca hücre bölünmesi ve bunun sonucunda kök hücre kimliğini korumasıdır. Radyasyona maruz bırakılmış farelere transplante edilen HKH'lerin hematopoetik sistemleri yeniden oluşturabildiği ve tekrar transplante edilebilecek kadar HKH popülasyonuna ulaşabildiği, kök hücrelerin kendini yenilemedeki yetkinliğini ortaya koyan bir çalışma olmuştur. Kemik iliğinde bulunan MKH'lerde de benzer bir sonuç gözlemlenmiştir. Nakledildiklerinde kemik, osiküller ve kıkırdak oluştururken aynı zamanda tekrar nakledilebilecek kadar MKH'ler üretilebilmiştir (Weissman, 2000).



Şekil 2.1 Mezenkimal kök hücrelerin kökenleri ve farklılaşma kapasiteleri (Nombela-Arrieta vd., 2011)

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi hem laboratuvar temelli bilimsel araştırmalar hem de ön klinik çalışmalar için insan MKH'lerini tanımlamak için bir dizi standart önermektedir. Bu tanımlayıcı kriterler, klinik çalışmalar için etik kriterler ile karıştırılmamalıdır; çünkü mevcut öneri yalnızca araştırma amaçları için tanımlayıcı kriterler olarak amaçlanmıştır (Dominici vd., 2006). Dominici ve çalışma grubu (2006), bir bildiri yayınlarak MKH'leri tanımlamak için mevcut en iyi verilere dayalı standart bir kriter seti sağlamıştır. Ek olarak, yeni veriler ortaya çıktıkça bu kriterlerin gözden geçirilmesi gerektiğini kabul etmektedir. MKH'leri tanımlamak için kriterleri üç grup altında toplamışlardır:

- Kültür kaplarına tutunma
- Spesifik yüzey antijeni (Ag) eksprese etme
- Multipotens farklılaşma potansiyeli (Dominici vd., 2006).

Birinci olarak, MKH'ler standart kültür koşulları altında kültür plastiklerine tutunma özelliği göstermelidir. İkincisi, MKH'ler CD105, CD73 ve CD90 yüzey belirteçlerine sahip olurken CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA sınıf II yüzey belirteçleri bakımından ekspresyon eksikliği göstermelidir. Son olarak, MKH'ler *in vitro* farklılaşma koşulları altında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşabilme yeteneğine sahip olmalıdır (Dominici vd., 2006).

2.1.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Kökenleri

İlk olarak kemik iliğinde keşfedilen MKH'ler, zaman içinde çeşitli araştırmalar sonucunda farklı olgun insan hücre gruplarından ve neonatal hücrelerden kökenlenerek izole edilebileceği ortaya konmuştur (Hass vd., 2011). Yapılan yeni çalışmalar, çeşitli yetişkin dokularındaki kök hücre popülasyonları hakkında önemli yeni bakış açıları sağlarken dokuya özgü nişler, kök hücre mobilizasyonu ve farklılaşma işaretleri hakkında yeni sorular doğurmuştur (Barry & Murphy, 2004). Kemik iliğinden kökenlenen MKH'ler (Bhat vd., 2021; K. Yu vd., 2022) dışında mezenkimal potansiyele sahip kök hücrelerin diğer kaynakları da bulunmaktadır. Bunlar;

- Yetişkin hücre gruplarından,
 - trabeküler kemik (Nöth vd., 2002; Sottile vd., 2002; Tuli vd., 2003)

- periosteum (Barry & Murphy, 2004; Fukumoto vd., 2003; Wu vd., 2023)
- adipoz doku (Gou vd., 2024; Kang vd., 2024; C.-Y. Lee vd., 2023)
- sinoviyum (Jeyaraman vd., 2022)
- iskelet kası (Testa vd., 2020)
- dental pulpa (Y. Chen vd., 2022; Ledesma-Martínez vd., 2016; Tsai vd., 2017)
- akciğer (Hoffman vd., 2011; Sveiven & Nordgren, 2020)
- Neonatal hücre gruplarından,
 - göbek kordonu (Nakao vd., 2023; Shang vd., 2021)
 - Wharton jeli (Saleh vd., 2022)
 - plasental (Valiukevičius vd., 2023) şeklinde örneklendirilebilir.

Tüm bu örneklerde, MKH'lerin birkaç belirlenmiş yolak boyunca farklılaşabildiği gösterilmiş ve raporlanmıştır. Çoğunlukla, çeşitli yetişkin hücre ve neonatal hücre kaynaklarından izole edilen tutunmuş MKH hücre popülasyonu kondrosit, osteosit ve adipositlere farklılaşabilme kapasitesine sahip olduğu değerlendirilmiştir.

2.1.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasitesi

Mezenkimal kök hücrelerin transplantasyon için potansiyel bir kaynak olmasından dolayı çeşitli kimyasal tetikleyicilerin, sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin MKH'lerin farklılaşması üzerindeki rolünü anlamak için hücresel ve moleküler sinyal yollarına ek olarak mikroçevredeki değişiklikler üzerine çalışmalar yapılmıştır. MKH'ler yalnızca kültür ortamlarına verilen kimyasal ajanlarla değil, ayrıca belirli hücre hattı ile ilişkilendirilen belirli transkripsiyon faktörleri tarafından genetik olarak manipüle edilebilir ve indüklenebilmektedir. Örneğin; Runx2, Sox9, PPAR γ , MyoD, GATA4 ve GATA6 gibi transkripsiyon faktörleri MKH'lerin farklılaşması ile interaksyonu yapılan araştırmalar sonucunda değerlendirilmiştir (Almalki & Agrawal, 2016).

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması oldukça fazla çalışılmıştır, bu nedenle *in vitro* kültür koşullarında MKH'lerin davranışları test edilebilmiştir. Özellikle 'trilineage' olarak kavramlaştırılan MKH'lerin osteblast, adiposit ve kondrosit olarak üç farklı tipteki hücreye farklılaşabildiği çok çeşitli çalışmalar ışığında ortaya konmuştur (Bhat vd., 2021; Solchaga vd., 2011; Sordi vd., 2021; Tang vd.,

2021; K. Yu vd., 2022). Tablo 2.1’de *in vitro* koşullarda çeşitli indükleyici ajanlarla MKH’leri çeşitli hücre tiplerine farklılaşması ile ilgili özet bir bilgi halinde sunulmuştur.

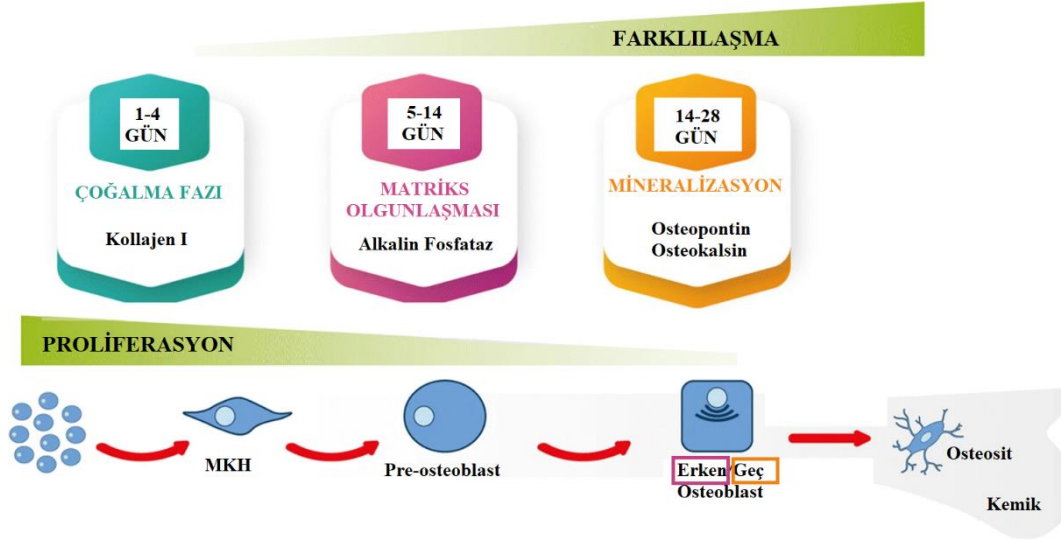
Tablo 2.1 Mezenkimal kök hücreleri belirli bir hücre hattına farklılaşmasını tetikleyen faktörler

İndükleyici Ajan	Kültür Ortamındaki Konsantrasyonu	Etkisi	Farklılaştırdığı Hücre Hattı	Referans
L-askorbik asit	50 µM	Alkalın fosfataz aktivitesini artırma	Osteosit	(Sordi vd., 2021)
β-Gliserofosfat	10 mM			
Deksametazon	0.1 µM			
İnsülin	100 µg/ml	Sitoplazmadaki yağ depozisyonunu artırma	Adiposit	(Tang vd., 2021)
3-İzobutil-1-metilksantin	1.15 mg/ml			
Deksametazon	1 µM			
Deksametazon	10 ⁻⁷ M		Kondrosit	(Solchaga vd., 2011)
Askorbat-2-fosfat	1 µM			
TGF-β1	10 ng/ml	SMC-spesifik genlerin ekspresyonunu uyarma	Düz kas hücresi	(Floren vd., 2016)
hTGF-β1	10 ng/ml			
5-azacytidine	10 µM	DNA metiltransferazı engelleme	Kardiyomiyosit	(Qian vd., 2012)
VEGF-A	50 ng/ml	VEGF reseptörünü fosforillayarak aktivitesini artırma	Endotel	(Khaki vd., 2018)

2.1.4.1 Osteojenik Farklılaşma

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle osteojenik farklılaşma potansiyelleri diğer kök hücre tiplerine göre daha üstündür ve bu nedenle kemik rejenerasyonunu geliştirmek için kullanılmaktadır (Ding vd., 2011; Krampera vd., 2006). Şekil 2.2’de gösterilmekte olduğu gibi MKH’lerin osteojenik farklılaşması birkaç adımda gerçekleşmektedir. MKH’ler, osteogenezin ilk aşamalarında aktif olarak çoğalmaktadır ve kolajen üretmektedir (Quarles vd., 1992). Takriben 5-14. günlerde erken hücre farklılaşması gerçekleşmektedir. Bu aşamada MKH’ler, iğ şeklinde bir görünüm kazanmaktadır ve düşük çoğalma hızı göstermektedirler. Matriks olgunlaşma fazı olarak adlandırılan aşamada, osteojenik belirteçlerden olan

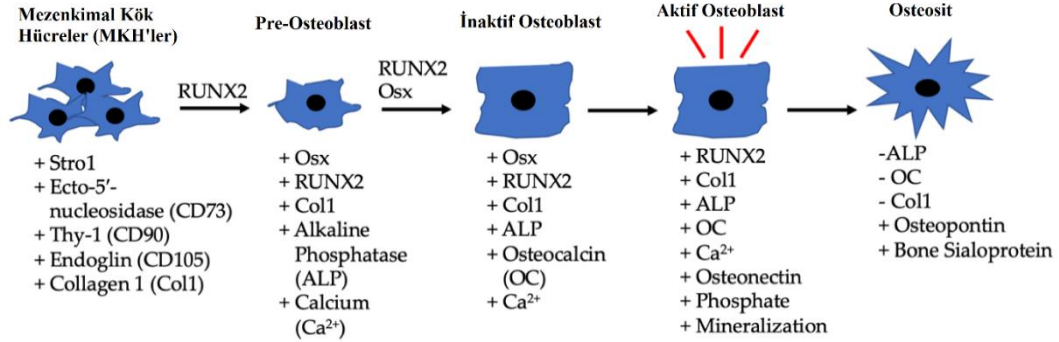
erken osteoblastlar alkalın fosfataz (ALP) salgılamaya başlamaktadır (Carluccio vd., 2020) ALP seviyesi ilk zirve pikten sonra düşmeye başladıktan sonra 14-28. günlerde son aşamaya geçilmektedir. Osteokalsin ve osteopontin olgun osteoblastlar tarafından yüksek düzeyde eksprese olmaktadır. Kalsiyum ve fosfat depozisyonu mineralizasyon fazında gözlemlenmeye başlanmaktadır (Hoemann vd., 2009; Huang vd., 2007). Farklılaşma kemik oluşumu fazı ile osteoblastların osteositlere dönüşümü ile sonuçlanmaktadır.



Şekil 2.2 Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma adımları (Carluccio vd., 2020)

Her bir hücre tipine farklılaşma çeşitli sitokinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin aktive olmasına bağlıdır. Sitokinler de dahil olmak üzere çeşitli düzenleyiciler, mezenkimal progenitör hücrelerde osteojenik farklılaşmayı tetiklemektedir (J. E. Lee vd., 2019). Bunlar arasında kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler); embriyogenez (R. N. Wang vd., 2014), organogenez (Danesh vd., 2009; Goldman vd., 2009), hücre proliferasyonu (Kim vd., 2013) ve kök hücre farklılaşmasında (J. Zhang & Li, 2005) önemli bir rol oynadığı raporlanmıştır. Özellikle, BMP-2, mezenkimal öncül hücrelerin osteojenik farklılaşması için erken aşama sinyali sağlamaktadır (Beederman vd., 2013; Fong vd., 2010). MKH'lerin BMP-2 ve diğer listelenen faktörler ile osteoblastlara farklılaşmasının indüklenmesi ve bu süreçte rol oynayan çeşitli transkripsiyon faktörleri Şekil 2.3'te gösterilmektedir. MKH'ler RUNX2 ve BMP-2'nin indüklemesi ile pre-osteoblastlara farklılaşmaktadırlar (Halloran vd., 2020). RUNX2, BMP-2 ve OSX varlığında pre-osteoblastlar inaktif

osteoblastlara farklılaşmaktadır. Fizyolojik faktörlerin etkisiyle de inaktif osteoblastlar aktifleşerek hücre dışı kalsifikasyona sebep olmaktadır.



Şekil 2.3 Mezenkimal kök hücrelerin osteositlere farklılaşmasında rol oynayan faktörler (Halloran vd., 2020)

2.2 Rejeneratif Tıp ve Hücresel Tedavi Uygulamalarında Mezenkimal Kök Hücreler

Kendi kendini yenileme, bağışıklık düzenleme ve multipotenslik gibi güçlü içsel özelliklere sahip olan mezenkimal kök hücreler, tedavi yaklaşımları kapsamında yoğun ilgi çekmektedir. Bu güçlü içsel özelliklere ek olarak, kolayca elde edilebilmeleri, izole edilebilmeleri ve kültür ortamında çoğaltılabilmeleri tedavi yaklaşımlarını destekleyici niteliktedir (Margiana vd., 2022; Ocansey vd., 2020).

Plastik kültür kaplarında ve basit kültür koşullarında çoğalan MKH'ler; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme yeteneği olan klonojenik hücrelerdir. MKH'ler, immün düzenleyici özellikleri yanı sıra düşük immünojeniklik göstermektedirler. Çeşitli kaynaklardan izole edilebilen MKH'ler, hedef bölgeye yerleşme yetenekleri dahil olmak üzere rejenerasyonu tetikleyici ve doku homeostazını koruyucu gibi ortak karakteristik fonksiyonlara sahiptir (Z. Li vd., 2019). Artan kanıtlar, MKH'lerin farklılaşma yetenekleri, kendini yenileme kapasitesi, uzun süreli *ex vivo* çoğalma, parakrin potansiyelleri ve immüno-regülatör etkileri nedeniyle insan dokularının hücresel tedavisi ve yeniden yapılanmasında umut verici bir seçenek sunabileceğini göstermektedir (Abbaszadeh vd., 2020). Dahası, MKH'ler, diğer kök hücrelerin ilerlemesini ve farklılaşmasını destekleme yeteneğine sahiptir. Dokuların yenilenmesinde önemli bir fayda olan biyoaktif molekülleri salgılayabilirler (Patel vd., 2013; Saeedi vd., 2019). Tüm bu özellikler,

yara iyileşmesi, sinir, karaciğer, kalp ve kemikte meydana gelen bazı hastalıkların tedavisinde MKH'lerin kullanımını önemli bir terapi potansiyeli sunmaktadır.

2.2.1 Yara Rejenerasyonu

Deri; iç organları destekleme ve çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirme amacıyla bir araya gelmiş farklı bileşenlerden oluşan katmanlara sahip bir yapıdır. Derinin üç ana katmanı vardır: epidermis, dermis ve deri altı tabakası (Hsu vd., 2014).

Deri yara iyileşme prosesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma olmak üzere dört aşamada gerçekleşmektedir. MKH'ler yara iyileşme prosesine yardımcı olabilmektedir. MKH'lerin cilt hasarı tedavisinde uygulanması, deri rejenerasyonunu artırarak yara izlerini azaltabilmektedir. Deri hasar bölgesine göç etmek, inflamasyonu bastırmak ve fibroblastların, epitel hücrelerin ve endotel hücrelerin büyüme ve farklılaşma yeteneğini arttırmak suretiyle MKH'ler işlevini gerçekleştirmektedir (M. S. Hu vd., 2018; Marfia vd., 2015).

Klinik öncesi çalışmalarda, MKH'lerin yara iyileşmesini sergilemesi kronik yaraların tedavisinde MKH'lerin uygulanmasını ve klinik denemelere doğru ilerleme yönünde ışık tutmaktadır. Bir çalışmada, otolog kemik iliği kökenli MKH'lerin uygulanmasının etkileyici ve güvenli bir yara iyileşme tedavi yöntemi olduğu ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda, ülser boyutunda azalma eğilimi gösterirken 4-5 ay içinde tam yara kapanması gözlemlendiği raporlanmıştır. Araştırmacılar, herhangi bir olumsuz olay raporlamamıştır (Falanga vd., 2007).

Açık etiketli bir faz I/II çalışmasında, ses tellerinde skarı olan 16 katılımcıya tek doz olarak $0.5-2 \times 10^6$ sayıda otojen MKH'ler verildi. Katılımcıların %62-75'inde ses tellerinin; titreşimleri videolu değerlendirmelerde, yüksek hızlı laringoskopi ve fonasyon basınç eşiği analizinde belirgin bir şekilde iyileştiği gözlemlenmiştir. Sekiz katılımcının Ses Engellilik İndeksi anlamlı bir şekilde iyileşirken, geri kalanlarda dikkate değer bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Çalışmada, ciddi yan etki veya ufak tefek yan etkiler bildirilmemiştir (Hertegård vd., 2020). Son zamanlarda, J. Huang ve çalışma grubu (2022), intrauterin yapışma problemi olan 6 ve sezaryen skar divertikülü olan 4 hastanın dahil olduğu bir klinik çalışma yürütmüştür. Göbek kordonundan izole edilmiş MKH'lerin intrauterin enjeksiyonu

sonucunda; endometrial kalınlığın, sezaryen yara izinin ve uterus hacminin iyileştiğini bulmuşlardır (J. Huang vd., 2022).

2.2.2 Nöral Rejenerasyon

Nörolojik hastalıkların tedavisinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin kullanımı umut verici terapötik sonuçlar göstermiştir. Felce ve kas zayıflığına neden olan motor nöronların dejenerasyonuna yol açan amiyotrofik lateral skleroz (ALS), motor nöron hastalığı olarak da bilinen bir nörodejeneratif bozukluktur (Hardiman vd., 2017; van Es vd., 2017). Syková ve arkadaşları (2017), $15 \pm 4.5 \times 10^6$ sayıda kemik iliği kaynaklı MKH'leri 26 ALS hastasına transplante ettiği bir çalışma yürütmüşlerdir. ALS işlevsel derecelendirme ölçeği (ALSFRS) önemli ölçüde azaldığı, zorunlu vital kapasite (FVC) stabil kaldığı ve güçsüzlük ölçekleri hastaların %75'inde stabil olduğu raporlanmıştır. Ek olarak, ALS hastalarına kemik iliği kaynaklı MKH'lerin uygulanmasının güvenli olduğunu ve hastalığın seyrini yavaşlattığı bildirilmiştir.

Omurilik yaralanması, genellikle yıkıcı sonuçlarla ilişkilidir. Omuriliğe gelen zarar, omuriliğin motor, duyu ve otonom fonksiyonlarına zarar vermektedir. Bu durum, hastaların yalnızca fiziksel durumlarını değil aynı zamanda psikolojik durumlarını da etkilemektedir (Eli vd., 2021; McDonald & Sadowsky, 2002). Yapılan bir çalışmada, omurilik hasarı olan hastalarda MKH'lerin transplantasyonun duyu duyarlılığını, motor gücünü, spazmları, spastisiteyi, nöropatik ağrıyı, cinsel fonksiyonu ve sfinter disfonksiyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (Vaquero vd., 2018). Çalışma sonucunda, hastaların iyileşme kat ettiği raporlanmıştır.

2.2.3 Karaciğer Rejenerasyonu

Kemik iliği kökenli MKH'lerin hepatosit benzeri hücrelere dönüşebilme potansiyeli, onları karaciğer hastalıklarının tedavisi için çekici bir alternatif haline getirmektedir (C. Hu vd., 2020). Yapılan bazı klinik çalışmalar kemik iliği kaynaklı MKH'lerin karaciğer hastalıklarında etkinliği ve uygulanabilirliğini göstermiştir. Karaciğer siroz hastalarında yapılan bir çalışma örneklendirilebilir. Çalışmada 72 siroz hastası dahil edilmiş ve üç gruba ayrılmıştır: kontrol grubu, bir doz 50 milyon MKH uygulananlar ve iki doz 50 milyon MKH uygulananlar. Uygulamadan 30 gün sonra, fibröz miktarları ölçülmüş ve tek doz uygulanan grupta kolajen oranı %25'lik bir azalma gözlemlenirken çift doz uygulanan grupta %37'lik azalma

gözlemlenmiştir. On iki aylık takip süresinde MKH enjeksiyonuyla ilişkili yan etki gözlemlenmediği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Suk vd., 2016).

2.2.4 Kalp Rejenerasyonu

Kalp hastalığı, en çok teşhis edilen ve hastalık kaynaklı ölüm nedenlerinden biridir (Virani vd., 2021). Kardiyomiyositler iskemik ve diğer faktörlerle zarar gördüğünde, kalan canlı kardiyomiyositlerin çoğalma yeteneği sınırlıdır, bu nedenle ölen kardiyomiyositler, işlevsiz hale gelerek kasılmayan fibröz doku ile değişerek kalp yetmezliğinin ilerlemesine sebep olmaktadır. Hasta sayılarının her geçen gün artmasıyla, yenilikçi tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine duyulan ihtiyaç da artmaktadır. Rejeneratif tıp ve hücresel tedavi, kalp hastalıkları için önemli bir terapi potansiyeli taşımaktadır. Literatüre göre, kemik iliği kökenli MKH'lerin ve kalp kök hücrelerinin kötüleşen kalplere nakledilmesinin fonksiyonel faydalar sağladığı gözlemlenmiştir (Chien vd., 2019; Murry & MacLellan, 2020).

Gao ve çalışma grubu (2015), 116 akut miyokard enfarktüsü hastasına rasgele olarak Wharton jeli kaynaklı MKH'leri enjeksiyonu uygulamıştır. Çalışmada MKH tedavi uygulamasının, miyokardın canlılığını artırdığını ve enfarktüs bölgesinde perfüzyonu yükselttiğini bildirmişlerdir.

2.2.5 Kemik Rejenerasyonu

Kemik rejenerasyonu, klinik çalışmalarda araştırılan önemli bir konudur. Kemik kırığı, defekti, osteoartrit ve osteoporoz gibi birçok vakada kemik rejenerasyonu çözülmesi gereken önemli bir problemdir (Çamernik vd., 2020; Oryan & Alidadi, 2018; Qaseem vd., 2017).

Yapılan bir çalışmada, osteoporotik omurga kompresyon kırıkları olan bireylerin tedavisinde teriparatid ile kombine olarak Wharton jeli kaynaklı MKH'ler infüzyonun olumlu sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir. İlgili çalışmada, MKH'lerin teriparatid ile birleştirilmesinin, kemik yapısını uyararak kırık iyileşmesi için faydalı ve uygun olduğunu raporlanmıştır (Shim vd., 2021).

Jayankura ve meslektaşlarının yaptığı bir pilot çalışmada (2021), kemik iliği kökenli MKH'ler kemik kırığı olan 22 hastanın tedavisinde kullanılmıştır. $5-10 \times 10^7$ sayıda MKH'ler hastaların kırık bölgelerine transplante edilmiştir. Çalışma sonucunda, müdahaleden sonra Tomografik Birleşme Skoru (TUS) ve

Global Hastalık Değerlendirmesi (GDE) skorları iyileşirken kırık bölgesindeki palpe edilme ağrısı azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, müdahilden 6 ay sonra donör spesifik anti-HLA antikorları içeren kan örneklerinin oranı arttığı tespit edilmiştir. Üç ciddi hücreyle ilişkili advers olay raporlanmıştır.

Buradan hareketle, etkin bir MKH hücre sel tedavi yaklaşımı ve rejeneratif uygulamalar için daha fazla çalışma ve değerlendirilmeler yapılması gereklidir. Olumsuz sonuçların nedenleri ile ilişkilendirilen ve bunlara çözüm arayan yeni yaklaşımlar geliştirilmesi, MKH'lerin gelecekteki potansiyel kullanımını ve etkinliğini artırma noktasında oldukça elzemdir.

2.2.5.1 Kemik Rejenerasyonunda Mezenkimal Kök Hücrelerin Uygulamaları

Klinik uygulamalarda ve hayvan modelleri üzerinde kemik rejenerasyonu için MKH tedavisi uygulandığı çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu tedavi yaklaşımlarından en çok bilineni direkt enjeksiyon yoluyla MKH'lerin defektin bulunduğu uygun transplantasyon noktasına verilmesidir. Literatüre bakıldığında bazı çalışmalar, MKH'lerin biyo-iskeleler üzerine tutundurulmuş bir şekilde verilmesinin kemik oluşumunda efektif olduğunu göstermiştir. Doku mühendisliği uygulama alanlarından olan sentetik iskele tasarımı üzerine ekilmiş MKH'ler çeşitli hayvan deneylerinde kullanılmıştır. Üçüncü bir yaklaşım olarak, genle modifiye edilmiş MKH'lerin kullanımı değerlendirilmektedir.

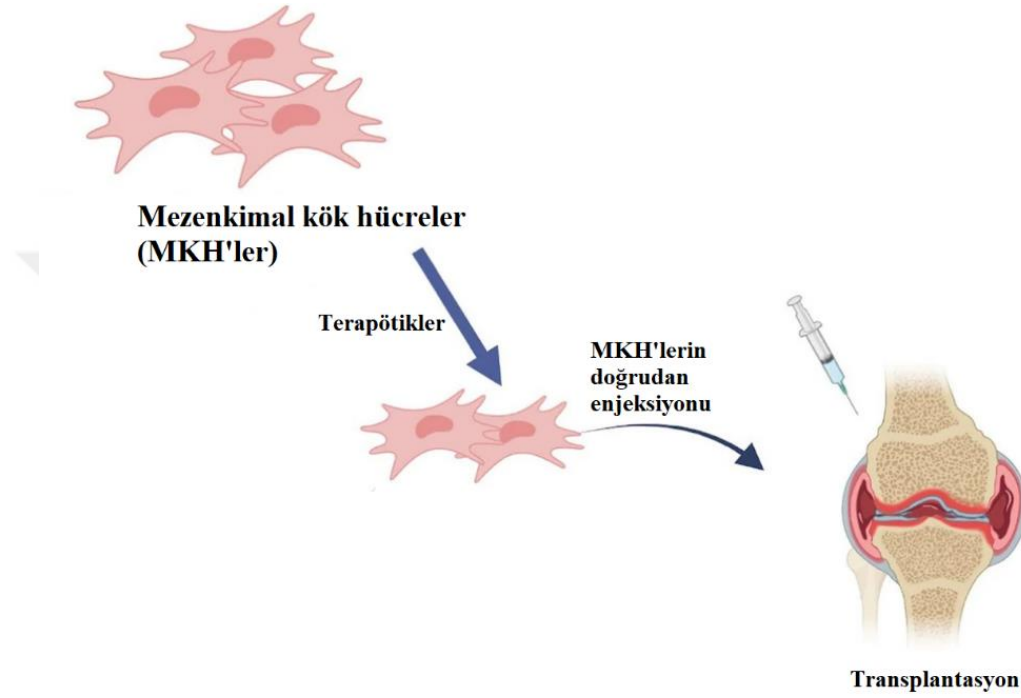
• Direkt Enjeksiyon

Direkt enjeksiyon ile uygulanan MKH'lerin etkinliği çeşitli hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin; Lee ve çalışma grubu (K. B. L. Lee vd., 2007) hyaluronik asit içinde resüspanse ettikleri MKH'leri uyluk kemiği medial kondilinde defekte sahip 27 domuza direkt enjekte eden bir çalışma yürütmüşlerdir. Hayvanlar 6 ve 12 hafta sonra öldürüp inceleyen araştırmacılar, deneysel grupların kırıkta rejenerasyonu gösterirken kontrol grubunun lifli rejenerasyon sergilediğini gösterdiğini raporlamışlardır.

Doğrudan enjeksiyonun kemik rejenerasyonunu açıkça teşvik ettiği görülse de bu tekniğin bazı dezavantajları hayvan çalışmalarında bildirilmiştir. Bunlar, artere doğrudan enjeksiyonun ardından lokal iskemi gelişimi ve intravenöz enjeksiyon sonrası akciğerlerde mikroembolizasyonu içermektedir. İlgili bir deneysel çalışmada, sıçanların karotid arterine MKH'lerin doğrudan enjekte edilmesini

gerçekleştirmiş ve 0.2 ml/dakikadan daha yüksek bir enjeksiyon hızının yerel iskemiğe neden olabileceğini bulmuşlardır; ancak 1×10^6 'dan az MKH kullanıldığında, enjeksiyon yerel iskemiğe sebep olmadığı raporlanmıştır (Janowski vd., 2013).

Doğrudan enjeksiyon yaklaşımının insanlara uygulanmasındaki etkinliği ve güvenliği halen daha fazla araştırmaya ve değerlendirmeye ihtiyaç duymaktadır.



Şekil 2.4 Mezenkimal kök hücrelerin doğrudan enjeksiyonla uygulanması (S. Shah vd., 2023)

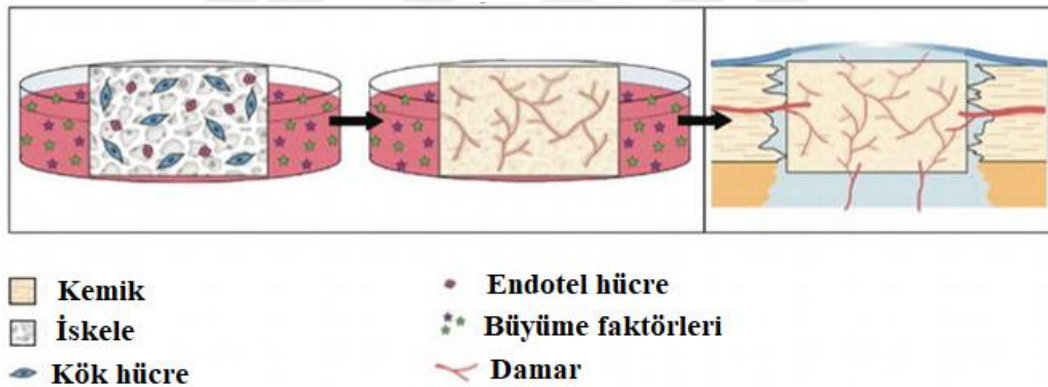
- **Biyo-İskeleler ve Mezenkimal Kök Hücreler**

Büyük boyuttaki kemik defektlerinde ve kaynamayan kemiklerde direkt enjeksiyon yöntemi ile MKH'lerin uygulanmasının etkisiz olduğu saptanmıştır (Qin vd., 2014). Bunu tür vakalarda, biyomateryal iskeleler üzerine ekilmiş MKH'ler kullanılabilir. İdeal bir iskele; biyobozunur, biyouyumlu, koloni oluşumunu destekleyen ve iyi bir kemik indikatörü olmalıdır. Hidroksiapatit (HA) (Liu & Song, 2013) ve trikalsiyum fosfat (TCP) temelli iskeleler kemik rejenerasyonunu teşvik etmek için sıklıkla kullanılan biyomateryaller arasında en popüler olanlarındandır.

Morishita ve çalışma arkadaşları (Morishita vd., 2006), distal kaval kemiğinde tümörün çıkarılmasıyla oluşan defekti HA temelli bir iskele ve otolog verilen MKH'lerle kemik rejenerasyonunu indüklemeyi amaçlamışlardır. Sonuçlara göre

üç hastadan ikisi, nakilden iki hafta sonra ağırlığa dayanabilecek düzeye gelebilirken hastalardan birisi ise, transplantasyondan üç hafta sonra ağırlığa dayanabilecek bir ilerleme kaydettiği gözlemlenmiştir. Bilgisayarlı tomografi sonuçlarına bakıldığında, üç haftalık süreçte transplantasyon bölgesindeki yoğunluğun kademeli olarak arttığı raporlanmıştır. Faz I deneylerinde olan başka bir araştırmacının *ex vivo* sonuçları da HA temelli iskele ile verilen MKH'lerin kemik rejenerasyonunda başarılı olduğu saptanmıştır (Quarto vd., 2001). Laboratuvar ölçekli bir çalışmada ise, agaroz ile enkapsüle edilmiş MKH'lerin fluorokarbon ile desteklenen üç boyutlu iskele hücre kültürü düzeyinde olumlu sonuçları olduğu raporlanmıştır (Duarte Campos vd., 2012).

Biyomalzemeler üzerine tutundurulan MKH'ler yönteminin etkinliği, güvenilirliği ve yan etkilerini araştırmak için daha fazla klinik deneye ihtiyaç vardır. Bu yöntemin geniş çapta klinik uygulamada kullanılabilmesi için yeni materyallerin, geleneksel olanlardan üstün olduğu gösterilmelidir.



Şekil 2.5 Biyo-iskeleler üzerine ekilmiş mezenkimal kök hücrelerin uygulanması (Hutton & Grayson, 2014)

• Genle Modifiye Edilmiş Mezenkimal Kök Hücreler

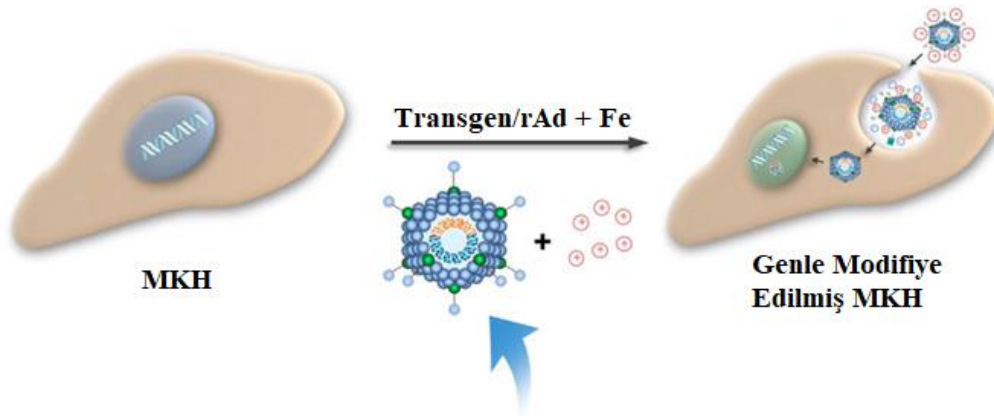
Birçok araştırmacı tarafından, MKH'lerin fonksiyonlarını arttırmak amacıyla hücrelere gen iletimi yapılmıştır. Kemik morfogenetik protein (BMP) genleri, MKH'lerin kemik oluşum aktivitesini arttırmak üzere en yaygın kullanılan genler olmuştur (Dwivedi vd., 2012; Gamradt vd., 2006; Yuan vd., 2007; Y. Zhang vd., 2012).

Gamradt ve arkadaşları (2006), 24 fare üzerinde bir çalışma gerçekleştirmiştir. Deney gruplarını ikiye ayırmışlardır: 12'sine adenovirüs ile BMP-2 geninin transfeke edildiği MKH'ler verilirken kalan 12'ye normal modifiye edilmemiş

MKH'ler verilmiştir. Sol ön ayaklarında 3mm'lik bir defekt meydana getirilen farelere MKH'ler transplante edilmiştir. 3,7,14 ve 21. günlerde her iki gruptan fareler öldürülerek incelemeler yapılmıştır. Normal MKH'ler verilen farelere göre, genle modifiye edilmiş MKH'lerin verildiği farelerde kemik oluşumu 7 günde X-ray sonuçlarına göre kıyaslandığında daha fazla olduğu raporlanmıştır. Kemik oluşumu 21 günde genle modifiye edilmiş MKH'lerin verildiği farelerde daha stabil olduğu gözlemlenmiştir.

Hücreleri genle modifiye ederek, hücre davranışını etkilemek mümkündür. Hücre göçü, tutunması, sağkalımı gibi hücresel davranışları genetik müdahale ile attirabilirken erken senesensi azaltmaya yönelik bir yaklaşım gen modifikasyonu ile olanaklı hale getirilebilmektedir (Ocansey vd., 2020). Tüm bu hücresel davranışlar, MKH'lerin tedavide etkin bir şekilde kullanılabilmesi açısından oldukça önemli parametrelerdir.

Hayvan modellerinde umut verici sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen, gen modifiye edilmiş MKH'lerin insan klinik denemelerine ulaştırılması uzun, maliyetli ve zorlayıcı bir süreçtir. Farmakoloji, toksikoloji ve genom dağılım analizleri gerektiren güvenlik testleri, gen terapisi yaklaşımlarının güvenliği açısından önceliklidir (Qin vd., 2014). Klinik seviyede vektörler geliştirilmesi karmaşık ve maliyetlidir. Kemik kalitesi ve mekanik mukavemeti değerlendirmek için invaziv olmayan teknikler geliştirilmesi elzemdir.



Şekil 2.6 Genle modifiye edilmiş mezenkimal kök hücrelerin uygulanması (Yeom vd., 2015)

2.3 Gen Aktarım Sistemleri

Gen terapisi yaklaşımı, genleri ya da gen ekspresyonunu modifiye ederek bir hastalığı tedavi etmek ya da önlemek için geliştirilen deneysel bir tekniktir. Gen terapisi, ilaç tedavisi yerine genleri düzenleyerek, yerlerini değiştirerek veya ekspresyonunu azaltarak/arttırarak yapılmaktadır. Genetik modifikasyonlar, monojenik bozukluklarda hücre fonksiyonunu geri kazanmayı ya da hücrelere tamamen yeni işlevler kazandırmayı amaçlamaktadır (Mirón-Barroso vd., 2021).

Gen terapötikleri, ilgili bölgeye ulaşabilmek üzere çeşitli biyolojik bariyerleri aşmalıdır (Blanco vd., 2015). Terapötiklerin en yaygın uygulama yollarından biri intravenöz tekniktir. Dolaşıma girdikleri itibaren gen terapötikleri, hedeflerine ulaşabilmek için endotel tabakasını aşmak zorundadır. Endotel tabakalar doku ve organlara göre farklılık göstermektedir. Gözenekli damar yapısına sahip olan organlara hedeflendiğinde endotel tabakasını geçmeleri daha kolaydır (LaFountaine vd., 2015). Birçok gen terapisi yaklaşımı nörolojik hastalıkları tedavi etmek noktasında kullanılmaktadır. Bu noktada, kan beyin bariyerini geçmek zorundadırlar (Sudhakar & Richardson, 2019). Hedeflendikleri organ, doku veya hücreye degrade olmadan ulaşmaları gerekmektedir. Örneğin, oligonükleotitler fizyolojik ortamdaki ekso- ve endo-nükleazlar nedeniyle çok kısa yarı ömüre sahiplerdir (Tsui vd., 2002). Nükleik asitler oldukça yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Omurgalarındaki fosfat grupları nedeniyle negatif yüklü olan nükleik asitler, suda çok iyi çözünürler. Bu karakteristik özellikler nedeniyle, nükleik asitler biyolojik bariyerleri atlatamamaktadır (Redpath vd., 2020).

Gen tabancası, magnetoporasyon, elektroporasyon, sonoporasyon, jet tabancası, mikroenjeksiyon, iğne enjeksiyonu vb. birçok fiziksel metot kullanılarak gen aktarımı yapılması mümkündür (H. Zhou vd., 2023). Tablo 2.2'de fiziksel metotların, diğer metotlara göre avantajları ve dezavantajları açıklanmıştır.

Gen terapötikleri, hücre membranından geçmelidir. Terapötiklerin, hücreye girişi nükleik asitleri degrade edebilecek bir sürü sindirim enzimi içeren intrasellüler veziküllerden endozomlar aracılığıyla başlamaktadır. Erken ve geç endozomlardan sonunda lizozomlara dönüşen endozomlar, bu aşamalardan geçerken pH'ları gittikçe asitleşmektedir. Nükleik asitler, özellikle de DNA, düşük pH'da stabil değildir (Dinis vd., 2020). Bu nedenle, oligonükleotitler düşük pH ve katalitik

enzimlere maruz kalmamak için endozomal yoldan erken aşamada kaçmalıdır (Smith vd., 2019).

Tablo 2.2 Gen aktarım sistemlerinin avantajları ve dezavantajları

Gen Sistemleri	Aktarım	Avantajları	Dezavantajları
<i>Viral Vektörler</i> Adenovirüsler Adeno-ilişkili virüsler Herpes simplex virüsü Lentivirüsler Retrovirüsler		- Yüksek enfekte etkinliği - Aktarılan genlerin uzun vadeli stabil ekspresyonu - Uzun fragmentli eksojen DNA'ları taşıma - Örtüşen açık okuma çerçevelerinin transkripsiyonu	- Düşük transdüksiyon etkinliği - İmmünojenite - Gen entegrasyon ve mutasyona sebep olma riski - Kontrolsüz eksojen genin ekspresyonu - Öldürücü ve karsinojenik riski
<i>Fiziksel Metotlar</i> Elektroporasyon Sonoporasyon Gen tabancası Magnetoporasyon Jet tabancası Mikroenjeksiyon İğne enjeksiyonu		- Yüksek transfeksiyon etkinliği - Kontrollü gen ekspresyonu	- Yüksek sitotoksosite - Hedeflemenin eksikliği - Nükleazlara karşı korumanın sınırlılığı <i>In vivo</i> uygulama zorluğu
<i>Non-viral Vektörler</i> Lipid bazlı: lipozomlar, katyonik lipozomlar Polimer bazlı: protein bazlı, poliüretanlar, poliesterler, polikarbonatlar, polisakkaritler İnorganik materyal bazlı: metal nanopartikülleri, karbon nanotüpleri, silika bazlı, kuantum "dot"lar		- Daha fazla çok yönlülük ve kontrol edilebilirlik - Düşük sitotoksosite - Biyoyumluluk, biyobozunurluk, biyogüvenlilik <i>In vivo</i> uygulanabilirlik	- Hücre tiplerine göre değişken transfeksiyon etkinliği - Düşük transfeksiyon etkinliği - Geçici gen ekspresyonunu tetikleyici

Genleri aktarmak üzere uygun taşıyıcı sistemler oluşturmak oldukça önemlidir. Gen taşıyıcı vektörlerin etkili olabilmesi için aşağıdaki kriterleri karşılayabilmesi gerekmektedir (Butt vd., 2022):

- Transgenin ve genetik kargonun sistemik ve endonükleazların degradasyonuna karşı koruma,

- Hücre sitoplazması ya da nükleus gibi hedef bölgelere genetik materyalin taşınması,
- Genotoksik olmaması,
- İmmün yanıtı uyarmama ya da minimumda tutma,
- Hastalar için ekonomik ve erişilebilir olma,
- Kolay, büyük ölçekte üretilebilme ve stabil kalabilme yeteneği.

Gen terapisindeki ana adım, hedef dokuya veya hücrelere etkili bir şekilde gen aktarımı yapmaktır. Bu, vektörler adı verilen gen aktarım araçlarıyla gerçekleştirilmektedir. Viral ve viral olmayan olmak üzere iki tür vektör bulunmaktadır.

2.3.1 Viral Vektörler

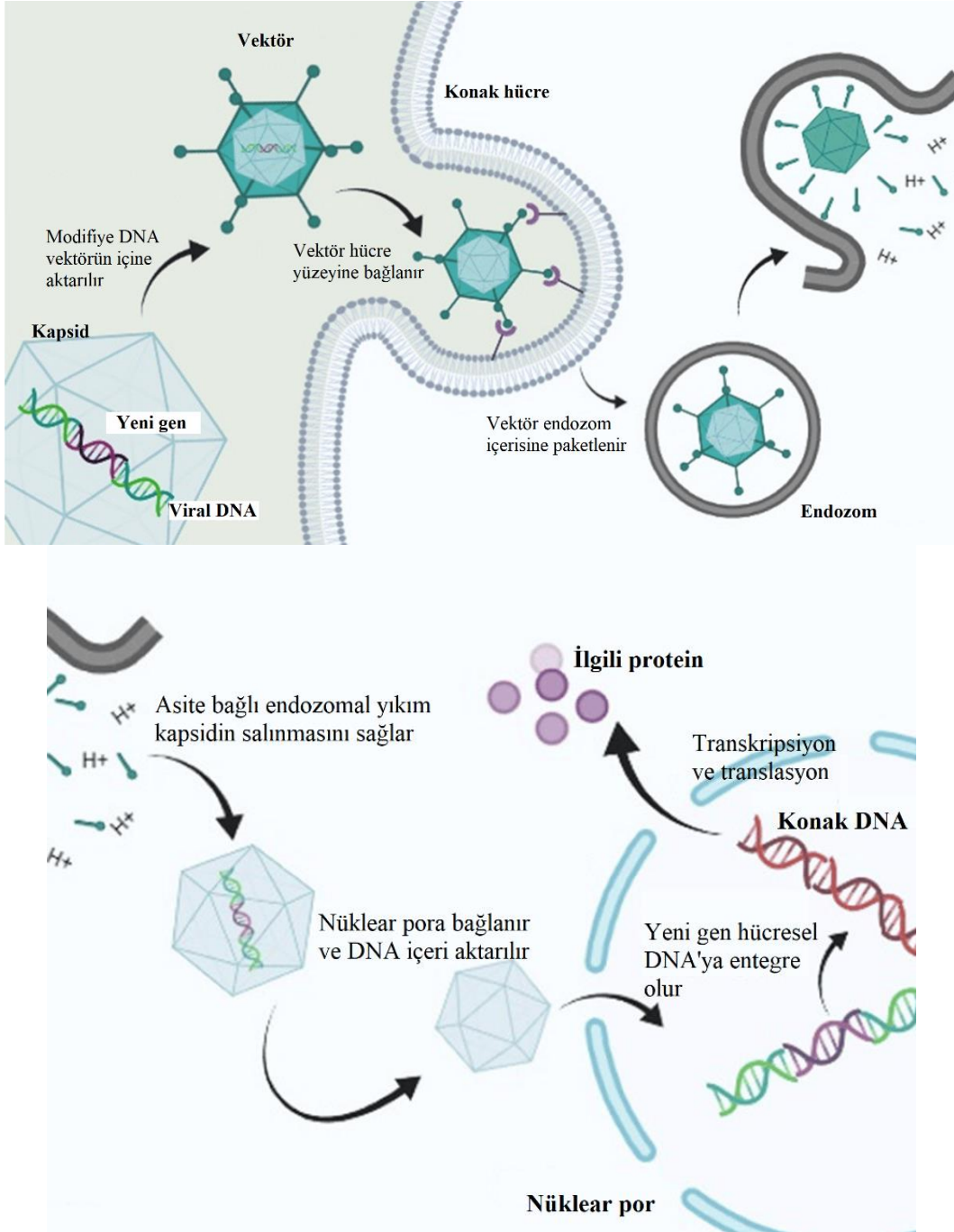
Viral vektörler, genellikle viral olmayan vektörlere kıyasla üstün gen aktarım kapasiteleri sebebiyle gen tedavisi yaklaşımında merkezi bir rol oynamaktadır. Virüs tabanlı transgen ekspresyonu, ihtiyaca bağlı olarak hem kısa vadeli hem de uzun vadeli elde edilebilmektedir. Örneğin, hemofili gibi kronik hastalıklarda uzun vadeli transgen ekspresyonu gerekirken tam aksine kanser gen tedavisinde kısa vadeli transgen ekspresyonu daha avantajlıdır. Viral vektörlerin kullanımı, özellikle replikatif ve onkolitik virüsler, viral genin yayılma riski nedeniyle viral olmayan vektörlere kıyasla daha yüksek biyogüvenlik seviyesi gerektirmektedir (Lundstrom, 2023). Hem DNA hem de RNA virüslerine dayalı farklı türlerde viral vektörler, gen terapisi uygulamaları için mühendislikle geliştirilmiştir.

Gen tedavisinde vektör seçimi, hastalık göstergesinin akut veya kronik olmasıyla derinden ilişkilidir. Akut hastalıklara karşı kısa vadeli gen ekspresyonu yeterli iken kronik hastalıklarda gen ekspresyonunun uzun vadeli olması tercih edilmektedir. Akut hastalıklarda, replikatif olmayan viral vektörler ile yüksek düzeyde geçici gen ifadesi tedavi potansiyelinde etkinlik sağlayabilmektedir (Bulcha vd., 2021).

2.3.1.1 Adenovirüs Vektörler

Adenovirüsler, 252 kapsomerden oluşan ikosahedron şeklinde düzenlenmiş bir protein kapsidi içinde lineer çift iplikli bir DNA molekülü bulunduran 70 ila 90 nm boyutunda zarfsız parçacıklardır. Adenoviral vektörlerin gen transferi için ana avantajları arasında, patojenite veya mutajenez riskinin düşük olması ve yüksek DNA taşıma kapasitesi yer almaktadır (H. Zhou vd., 2023). Özellikle memelilerde,

gen transferinin ortaya çıkmasından beri, adenovirüs vektörler viral aktarım yöntemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Tatsis & Ertl, 2004). Paketleme kapasitesi olarak 7.5 kb'lık yabancı DNA'yı taşıyabilmektedirler. Fakat, adenovirüs mekik vektörleri mühendislikle geliştirilerek taşıma kapasiteleri 35 kb'lık yabancı DNA'ya çıkarılmıştır (Ehrke-Schulz vd., 2016).



Şekil 2.7 Viral vektörlerin transjeni hücre içerisine aktarımı (Butt vd., 2022)

İlk jenerasyon adenovirüs vektörlerin *E1/E3* genleri genomlarından çıkarılmış olsa da güçlü bir immünojenite yaratmışlardır. Replikatif olmayan ikinci ve üçüncü

jenerasyon adenovirüs vektörlerde immünojenite önemli derecede azaltılabilmektedir (Crystal, 2014; Lundstrom, 2023). Adenoviral vektörler, konakçı genomuna entegrasyon olmamasına rağmen en az bir yıl süren kalıcı ekstrakromozomal transgen ifadesi sağlamaktadır (Ehrhardt vd., 2003).

Adenoviral vektörler, MKH'lere gen transferi için birkaç doğal avantaja sahip olmalarına rağmen, aynı parçacık konsantrasyonunda lentiviral vektörlere kıyasla transdüksiyon verimlilikleri daha düşüktür (Shakhbazov vd., 2008).

2.3.1.2 Adeno-ilişkili Vektörler

Küçük, zarfsız, tek iplikli DNA (ssDNA) adeno-ilişkili virüs (AAV), yalnızca 4 kb yabancı DNA'yı barındırabilmektedir (Samulski & Muzyczka, 2014). Paketleme kapasitesi, genetik mühendislikle geliştirilen AAV vektörleri oluşturarak artırılmış olsa da bu durumdan sonra hala ancak 4 kb yabancı DNA taşınabilmektedir (McClements & MacLaren, 2017).

AAV vektörler genellikle toksik veya patojenik yanıtı neden olmaz. Fakat, AAV vektörlerinin tekrarlı uygulanması güçlü bağışıklık yanıtına yol açarak transgenin aktarımının etkinliğini ve ekspresyonunu azaltabilmektedir (Park, 2008). Bu sorunun, her AAV yeniden uygulaması için farklı AAV serotiplerinin kullanılmasıyla üstesinden gelinmiştir. Alternatif bir yaklaşım olarak azaltılmış AAV dozlarının kullanımını destekleyen, AAV kapsid proteine karşı azalmış immün yanıtı sağlayan eksozom-ilişkili AAV kullanmaktır (Mingozzi & High, 2013).

Birkaç ön klinik çalışmalarda, AAV vektör aracılı gen aktarımı yapılan MKH'lerde faydalı etkiler gözlemlenmiştir. Çöpçü reseptör sınıf A, membran 3 proteinini kodlayan transgeni aşırı eksprese eden kemik iliği kaynaklı MKH'lerde, osteogenez uyarılırken adipogenez baskılandığı bildirilmiştir (P. Chen vd., 2021).

2.3.1.3 Retrovirüs ve Lentivirüs Vektörler

Zarflı, tek iplikli RNA (ssRNA) retrovirüsleri, 8 kb'lık yabancı DNA'yı aktarmak üzere taşıyabilmektedir (Schambach & Morgan, 2016). Retrovirüsler, RNA virüsleri olup RNA'larını ters transkriptazla DNA'ya çevirip konakçının genomuna entegre olmaktadır. Retroviral vektörlerin sunduğu bu başlıca avantaj, ssRNA genomunu çift iplikli DNA'ya dönüştürme kapasiteleridir. Bu özellik, retroviral vektörlerin konak hücrelerin nükleer genomunu değiştirmesini ve ilgili genin ekspresyonunu sağlamaktadır (Ghosh vd., 2020; Vogt, 2012).

Günümüzde, retroviral vektör aracılı gen terapisi, Lentivirüsler adı verilen yeni bir retroviral vektör sınıfının geliştirilmesiyle yeniden canlandırılmıştır. Lentiviral vektörler gen düzenleme ve gen transferi açısından önemli bir sıçrama sağlayarak *in vivo* gen aktarımına ışık tutacak yeni yaklaşımlar sunmaktadır. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) bir lentivirüstür. Lentiviral vektörler, diğer retrovirüs vektörlere göre çok daha düşük mutajenez oranına sahip olmalarına rağmen, gen transferinde taşıyıcı olarak kullanım için güvenlik seviyeleri hala büyük bir endişe yaratmaktadır (Montini vd., 2006; Ramezani & Hawley, 2002).

Retroviral vektörlerin gen terapisi yaklaşımında kullanılmalarını kısıtlayan en önemli nedenlerden biri yalnızca bölünen hücreleri transdükte etmeleridir. Retrovirüs vektörler, bölünemeyen hücreleri transdükte etme kapasitesine sahip değildirler. Bunun aksine, lentivirüs vektörler ise hem bölünen hem de bölünemeyen memeli hücrelerini transdükte edebilmektedirler (Kay vd., 2001).

2.3.1.4 Herpes Simplex Virüs Vektörler

Büyük herpes simpleks virüsleri (HSV), zarflı dsDNA virüsleri olup sinir ganglionlarında latent enfeksiyona sebep olmaktadır (Singh & Tschärke, 2020). Uzun vadeli transgen ekspresyonu için modifiye edilmiş HSV vektörleri kullanılmaktadır (Epstein vd., 2005). Lineer HSV, nükleusta dairesel bir viral episom oluşturup entegrasyon olmadan ekstrakromozomal olarak kalmaktadır (Morissette & Flamand, 2010). HSV vektörleri, 30 kb'dan fazla yabancı DNA'yı barındırma kapasitesine sahiptir (Holmes vd., 2000). Mühendislikle oluşturulan HSV amplikonlar, 150 kb'ye kadar yabancı genetik materyali paketleyebilmektedir (Kasai & Saeki, 2006). Ancak, HSV vektörleri nispeten güçlü sitopatojenite ile ilişkilendirilmiştir, bu durum HSV genomundaki esansiyel olmayan genlerin silinmesiyle ele alınmıştır (Lundstrom, 2023).

2.3.1.5 Diğer Virüs Vektörler

Bakulovirüsler, zarflı dairesel çift iplikli DNA virüsleridir ve iki farklı fenotipe sahiptir: tomurcuklanmış virüs ve polihedron kökenli virüs. Nükleokapsid içindeki viral genom, büyük yabancı DNA parçalarını barındırabilir; bu özellik, bakulovirüs tabanlı vektörleri büyük genlerin ekspresyonu için ideal kılmaktadır (Airenne vd., 2013). Alfavirüsler, zarflı virüslerdir ve pozitif polaritede tek iplikli ssRNA genomuna sahiptirler. Bunların paketleme kapasitesi 8 kb yabancı genetik

materyaldır (Ehrenguber vd., 2011). Alfavirüsler gibi, flavivirüsler de zarflı pozitif polaritede tek iplikli ssRNA virüslerdir. Flavivirüs vektörler, kendinden replike olan RNA özelliğine sahiptirler. Bu özellik, yüksek düzeyde geçici gen ekspresyonu ve rekombinant viral partiküllerin, RNA replikonlarının ve DNA replikonlarının esnek bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır (Pijlman vd., 2006). *Poxviridae* virüs ailesine ait olan virüsler, insanları enfekte eden ve hastalıklara neden olan tüm virüsler arasında en karmaşık ve en büyük olanlarıdır. Genomları çift ipliklidir ve yaklaşık olarak 180 ila 220 kb boyutundadır. Çiçek virüsü bu ailenin en popüler üyesidir. Çiçek hastalığı aşısının geliştirilmesinde çiçek virüsü kullanılmıştır. Hücre sitoplazmasında yaşam döngüsünü sağlayabildiğinden konak hücre genomuna entegre olmaması ve iki farklı enfeksiyon tipini gerçekleştirebilmesi çiçek virüsünün iki eşsiz özelliğidir (Conrad & Liu, 2019).

2.3.2 Viral Olmayan Vektörler

Viral olmayan gen aktarımı, transgenin (örneğin plazmid DNA) hücre çekirdeğine kimyasal veya fiziksel uyaranlar aracılığı ile aktarımını tanımlamaktadır. Plazmid DNA (pDNA)'nın hücre çekirdeğine ulaşması ve etkin bir biçimde transkripte olabilmesi için üç engelin üstesinden gelmesi gerekmektedir:

- (i) Konak hücrenin DNazlarının degradasyonuna karşı korunmalıdır.
- (ii) Hücre zarını, sitoplazmayı ve nüklear membrandan geçebilmelidir.
- (iii) pDNA ve non-viral vektör komplekslerinin, endositoz yoluyla hücreye girdikten sonra endozomdan serbest kalmalı ve kompleks çözülmelidir (Butt vd., 2022; H. Zhou vd., 2023).

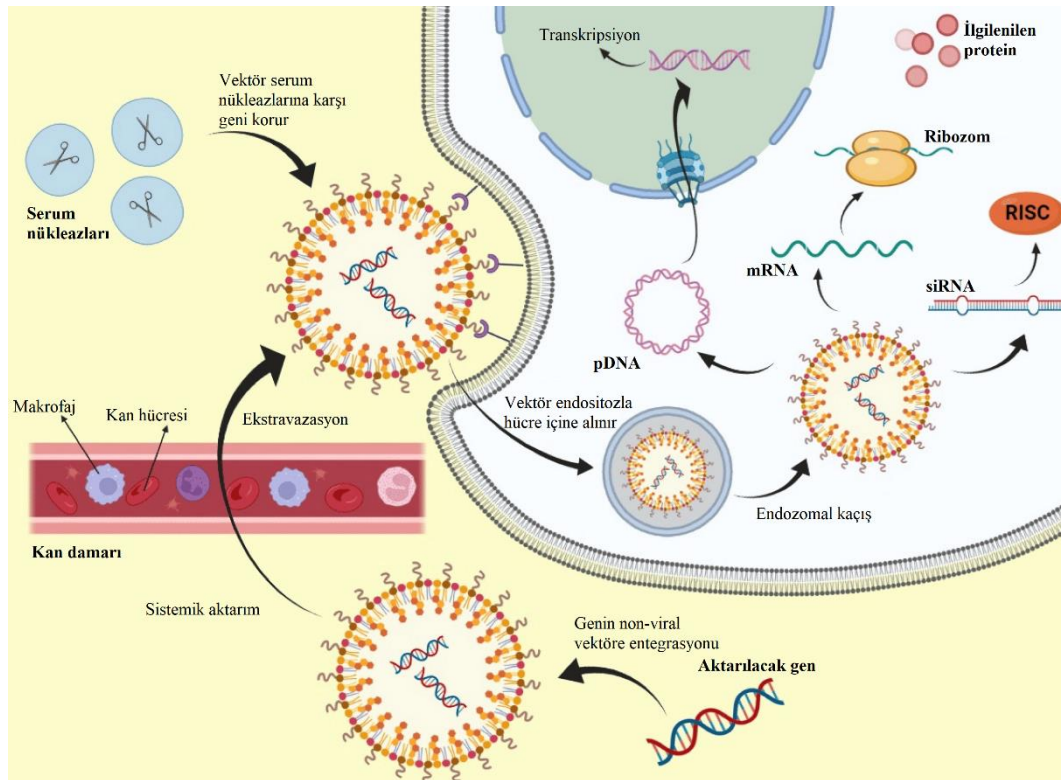
Viral olmayan gen aktarım yöntemleri, viral vektör transdüksiyonuna kıyasla birçok avantaj sunmaktadır. Bunlar arasında düşük immünojenite veya bağışıklık yanıtının gözlemlenmemesi, çoklu uygulamaların mümkünlüğü, enjeksiyon hastalığı bulaştırma riskinin olmaması, taşınan DNA'nın moleküler boyutundaki esneklik ve düşük maliyet bulunmaktadır. Dahası, bazı kimyasal olarak sentezlenmiş nanomalzemelerin, MKH'ler için büyümeyi teşvik etme, farklılaşmayı destekleme, oksidatif stresi ortadan kaldırma ve apoptoza direnç gösterme gibi benzersiz biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (H. Zhou vd., 2023).

DNA ve RNA negatif yükler taşıyan biyolojik makromoleküllerdir. Gen transfeksiyonu sırasında gen ekspresyonunun verimliliğini etkileyen çeşitli hücre içi ve hücre dışı engeller bulunmaktadır (Şekil 2.8). Verimli bir gen transfeksiyonu sağlanabilmesi için viral olmayan vektör tasarımı bu engeller göz önünde bulundurulmalıdır. Bu engelleri özetlemek gerekirse, şu şekilde sıralanabilir:

- (i) DNA ve RNA, kan veya hücrelerde çeşitli nükleazlar tarafından kolayca ve hızla parçalanabilir. Ayrıca, makrofajlar ve retikuloendotelyal sistem tarafından da hızla eliminasyona uğrayabilirler. DNA ve RNA'nın *in vivo*'daki yarı ömrü genellikle birkaç dakika ile birkaç dakika arasındadır (Kumar vd., 2021).
- (ii) DNA veya RNA ile negatif yüklü fosfolipid çift tabaka arasında güçlü elektrostatik iticilik bulunmaktadır, bu durum hücrelerin geni alımı için oldukça zorlu hale getirmektedir (Pack vd., 2005).
- (iii) Endozomlardaki düşük pH ortamı gen transfeksiyonu için en önemli hücresel engellerden biri haline gelmiştir (Mitchell vd., 2021). DNA ve RNA aktarımı için etkili vektörler geliştirmek için birçok çaba harcanmasına rağmen, genellikle bunların endozomal kaçış verimliliği %4'ü aşmamaktadır.
- (iv) Sitoplazmadaki mikrofilamentler ve mikrotübüller, DNA ve RNA'nın taşınımını önemli ölçüde etkileyebilmektedir.
- (v) Nükleer membrandaki gözenekler küçük boyutta olup küçük moleküller kolaylıkla ve serbestçe çekirdeğe difüze olabilir; ancak, bu gözenekler DNA ve RNA gibi makromoleküller için oldukça seçicidir (Mintzer & Simanek, 2009).

2.3.2.1 Lipid Bazlı Vektörler

Lipozom-aracılı gen aktarımı eksojen genetik materyali konak hücrelere transferde kullanılan en eski stratejilerden biridir. 1970'lerin ortalarında, çeşitli çalışmalar lipozomların hücre zarlarıyla füzyon potansiyelini göstermiş ve 1980'e gelindiğinde, birkaç yayın dışsal globin mRNA'nın, kromozomların ve DNA'nın konak hücrelere aktarımında lipozomların yeteneğini göstermiştir (Mintzer & Simanek, 2009).



2.3.2.2 Polimer Bazlı Vektörler

Polimerler, transfeksiyon için gen taşıyıcıları olarak da tasarlanabilen çok yönlü moleküllerdir. Katyonik polimerler gen transferi için geniş ölçüde kullanılmıştır. DNA ile karıştırıldığında, bu polimerler nanometre boyutunda kompleksler oluşturur, genellikle polipleks olarak adlandırılırlar. Tipik olarak, polipleksler lipoplekslere kıyasla daha stabil olmaktadır (Al-Dosari & Gao, 2009).

İlk başarılı polietilenimin aracılı oligonükleotid transferi 1995 yılında gerçekleştirildiğinden beri polietilenimin (PEI); gen transfeksiyonunun altın standart olarak sıkça kabul edilen, gen transfeksiyonu yapabilen katyonik polimerlerin en önemli örneklerinden biridir (Boussif vd., 1995). PEI, poliplekslerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirmek için türevlendirilmiştir. Polietilenimin hem dallandırılmış hem de lineer bir yapıda vardır (Mintzer & Simanek, 2009). Ticari PEI tabanlı reaktifler, ExGen500 ve jetPEI™ gibi, MKH'lere gen transferi için kullanılmıştır (Wightman vd., 2001).

PEI dışında; katyonik akrilik polimer, poli-l-lizin, poliornitin, poliarjinin, histonlar, protaminler, kitosan ve dekstran gibi polimerler de polimer bazlı gen aktarım vektörü olarak kullanılmışlardır (Al-Dosari & Gao, 2009).

2.3.2.3 Nanopartiküller

Nanopartiküllerin tıpta kullanımı, nanobiyoteknolojinin yükselen bir alanıdır. Küçük boyutlarından dolayı, nanopartiküller hücre duvarını penetrasyon sağlayabilir ve genellikle terapötik amaçlar için ilaçları veya biyomolekülleri yaşayan sistemlere ulaştırabilmektedir (Patra vd., 2018). Kuantum “dot”lar, altın, demir ve gümüş nanopartikülleri, silika nanopartiküller ve karbon nanotüpler inorganik nanopartiküller olarak sınıflandırılmaktadır. Tüm bunlar, gen aktarım sistemleri olarak kullanılmaktadır. Lipid-bazlı nanopartiküller, viral olmayan gen aktarım sistemlerinde önemli bir yeri kaplamaktadır.

Metal iyon tabanlı tuzlar, tipik olarak 10 ila 100 nm çapında kompleksler oluşturur. Bu nanopartiküllerin yüzeyi DNA bağlanmasını kolaylaştırmak veya hedeflenmiş gen aktarımını desteklemek için kaplanabilir. Küçük parçacık boyutu, genellikle çoğu fizyolojik ve hücresel bariyeri atlamalarına ve daha yüksek gen ifadesini sağlaması gibi avantajlar sunmaktadır (Cai vd., 2008).

Membran reseptörleri veya nükleolin gibi nanopartikül yüzeyine takılan ligandlar, nanopartiküllerin endozomal-lizozomal degradasyona takılmadan doğrudan çekirdeğe ulaşmayı sağlayabilmektedir (Davis & Cooper, 2007). Nanopartiküller hem *in vivo* hem de *in vitro* postmitotik hücreleri etkili bir şekilde transfekte etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca genellikle bağışıklık tepkilerine karşı inerttirler. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller, manyetik bir alan içinde manyetik tepki sağlayabilir ve manyetik alan rehberli hedefli gen aktarımı sağlayabilmektedirler (Dong, 2008).

2.4 Katı Lipid Nanopartikül

Katı lipid nanopartikülleri (KLN'ler), biyouyumlu ve biyobozunur lipidlerden üretilen hem genetik materyalin aktarımında hem de ilaç aktarım sistemleri olarak ortaya çıkmışlardır. KLN'ler, 10 ila 1000 nm boyutları arasında değişen kolloidal partiküllerdir (Mehnert, 2001). KLN'ler; emülsiyonlar, lipozomlar ve polimerik nanopartiküller gibi diğer kolloidal ilaç/gen aktarım sistemlerine bir alternatif yaratmaktadır. KLN'ler, yüksek basınçlı homojenizasyon veya yüksek hızda karıştırma gibi teknikler kullanılarak toksik organik çözücüler olmadan da sentezlenebilmektedir (Duong vd., 2020). Trigliseridler, parsiyel gliseridler, mumlar, steroidler ve yağ asitleri gibi biyobozunur lipidlerden ve güvenli olarak kabul edilen materyallerden üretilen KLN'ler, nano-güvenli gen taşıyıcı sistemlerdir (Bhaskar vd., 2009; Pardeike vd., 2009).

Nanoyapıdaki lipid taşıyıcılar sıvı lipidlerden üretilirken KLN'lerin farkı katı lipidlerden sentezlenmektedir (H. A. Fathi vd., 2018; Taratula vd., 2013). KLN'ler, oda sıcaklığında ve fizyolojik koşullardaki 37°C'de katı halde bulunan yağlardan sentezlenmektedir (Zhu vd., 2012).

KLN'lerin sunduğu avantajlar (Zhu vd., 2012):

- Lipid matriksten kontrollü ilaç salınımı
- Aktif ve pasif hedefleme
- Genetik materyali degradasyondan koruma
- İlaç/transgen biyo-yararlılığını artırma
- Düşük seviyede toksisite
- Biyolojik bariyerlere affinitesi

- Farmakokinetik parametrelerin değiştirilmesi ve ilacın organlardaki dağılımının düzenlenmesi
- Büyük ölçekte üretim

Yukarıda belirtilen avantajlara karşın, KLN'lerin uzun dönem saklanmasıda agregasyon ve jel oluşumu gibi bazı problemler de oluşmaktadır (Zhu vd., 2012).

Genellikle su ile lipid arasındaki arayüzeyi stabilize etmek için kullanılan sürfektanlar, emülsiyonların uzun dönemli stabilizasyonu açısından temel bileşenlerdir. Birbirlerine karışmayan iki molekül arasındaki yüzey gerilimini azaltarak termodinamik kararlılığı sağlanması için sürfektanlar kullanılmaktadır. Sürfektanlar amfifilik moleküllerdir; molekülün polar kısmı su fazında bulunurken apolar kısmı yağ fazında bulunmaktadır. Yüzey aktif molekülün hidrofilik-lipofilik dengesi (HLB) değerine bağlı olarak, dağılmış fazın konsantrasyonundan bağımsız olarak yağ-içinde-su (y/s) veya su-içinde yağ (s/y) emülsiyonunu teşvik edebilir. Stabil bir emülsiyon oluşturulabilmesi için sürfektan HLB değeri organik fazın HLB değerine eşit olmalıdır. Düşük HLB değeri (1.8-8.6) olan sürfektanlar, lipofilik karakterdedir. Yüksek HLB değeri (9.6-16.7) olan sürfektanlar, hidrofilik karakterdedir. Y/s emülsiyonu için HLB değerinin 3-6 arasında olması gerekirken s/y emülsiyonu için 8-16 arasında olması beklenilmektedir (Ng & Rogers, 2019).

2.4.1 Katı Lipid Nanopartikül Sentez Yöntemleri

2.4.1.1 Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH), KLN'lerin sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır. Teknik, damla ve parçacık boyutunun aşırı basınç koşullarında azaltılmasına dayanmaktadır (Amasya vd., 2019; Calva-Estrada vd., 2018; Galvão vd., 2018). İşlem ilk olarak iri yapıda lipid partiküllerin hazırlanmasıyla başlar. Daha sonra mikron boyutunda dar gözeneklere sahip homojenizatörden yüksek basınçta geçirilir (Esposito vd., 2017). 100-2000 bar arasında olan basınç, sıvı karışımları >1000 km/s hızlarda hızlandırır. Bu durum, yüksek kesme gerilmeleri ve kavitasyon kuvvetleri oluşturarak damlacık boyutlarını nano boyutlara indirgemektedir (Mehnert, 2001). Bu homojenizasyon süreci istenilen nano boyut ve homojenlik elde edilene kadar tekrarlanmaktadır. HPH'nin avantajları arasında kısa üretim süreleri, üretimin kolaylığı, organik çözücü içermemesi ve ölçeklendirilebilir olması bulunmaktadır (C. Hu vd., 2016; Mehnert, 2001).

KLN'lerin sentezinde sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere iki tip HPH tekniği uygulanmaktadır.

Sıcak HPH için, ilaçlar ve erimiş lipidler genellikle katı lipidin erime noktasından 5-10 °C daha yüksek sıcaklıklarda karıştırılır; ilaçlar ya eritilmiş lipidler içinde çözünür ya da homojen bir şekilde dağıtılır. Homojenizasyondan sonra, nanoemülsiyonlar soğutulur ve bu da lipidin kristallenmesine KLN'lerin oluşmasına yol açmaktadır (Suter vd., 2016). Sıcaklıktan kaynaklı etkin maddenin bozunması, homojenizasyon sırasında etkin maddenin sulu faza geçmesi ve lipid kristalizasyonunun güçlüğü gibi bazı problemleri aşmak için soğuk HPH geliştirilmiştir (Mehnert, 2001).

Soğuk HPH için, ilaçlar erimiş lipidler içinde çözüldükten sonra, karışımlar sıvı azot veya kuru buz kullanılarak hızla soğutulur. Bu yüksek soğutma hızı, ilaçların lipid matrislerinde homojen dağılımını sağlamaktadır (Mehnert, 2001). Lipit-ilac karışımları 50-100 µm'lik parçacık boyutuna öğütülür. Lipit mikropartikülleri, genellikle 0-4°C gibi soğuk koşullarda sürfektan içeren soğuk sulu çözeltilerde askıda kalır ve genellikle 500 bar basınçta 5-10 döngü boyunca homojenleştirilir (Duan vd., 2020).

2.4.1.2 Yüksek Hızda Karıştırma ve Ultrasonikasyon Yöntemleri

Yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon, yaygın olarak kullanılan dispersiyon tekniklerindendir. KLN üretiminde, yüksek hızlı karıştırma en basit ve maliyeti düşük yöntemlerden biridir (Das & Chaudhury, 2011). Bu yöntemle göre, ilk olarak katı lipidler erime noktalarının 5-10°C üzerinde eritilerek etken maddeler erimiş lipid içerisinde çözdürülür veya dağıtılır. Aynı sıcaklıkta sürfektan içeren sulu bir faz, etken madde-lipid karışımına eklenir ve karışım yüksek hızlı karıştırıcı kullanılarak homojen bir şekilde dağıtılır. Sıcak y/s emülsiyonu oluşur. Bu emülsiyon soğutularak KLN'ler oluşturulmaktadır (Severino vd., 2012; Souto vd., 2019). İşlemden sonra, genellikle ultrasonikasyon uygulanır. Kabarcıkların oluşumu, büyümesi ve çökmesini esas alarak mikro-damlacıkların parçalanmasını sağlar (Xie vd., 2011). Şayet yüksek hızda karıştırma basamağı atlanarak ultrasonikasyon uygulanırsa KLN'lerin büyüklüklerinin dağılım aralığı geniş olmaktadır (Tamjidi vd., 2014). Her iki yöntem birlikte kullanıldığında ise, dar partikül boyut dağılımına sahip KLN'ler elde edilmektedir (Duong vd., 2020).

2.4.1.3 Mikroemülsiyon Yöntemi

Nanoemülsiyonların oluşması ve lipid presipitasyonun ardından KLN'lerin üretilmesini sağlayan bu yöntem, mikroemülsiyonun soğuk bir sulu çözeltide seyreltilmesini içermektedir. Erime noktasının üzerindeki bir sıcaklıkta eritilen lipid içerisinde etken madde/ilâç çözündürülür. Aynı dereceye ısıtılmış sulu sürfektan çözeltisi hazırlanır. Lipid-etken madde karışımına transparan ve termodinamik olarak kararlı stabil bir mikroemülsiyon oluşturulana kadar sürfektan faz hafif bir hızda karışırken eklenmektedir (Masiwa & Gadaga, 2018). Daha sonra mikroemülsiyon, soğuk sulu solüsyona (2–10°C) mekanik karıştırıcı altında eklenir. Soğuk solüsyon, sıcak mikroemülsiyonun yaklaşık 25-50 kat hacminde daha fazladır. Dilüsyon sırasında nanoemülsiyon oluşur ve hızlıca kristalize olarak KLN'leri oluşturmaktadır (Duong vd., 2020; Mehnert, 2001).

2.4.1.4 Çözücü Emülsifikasyon-Difüzyon Yöntemi

Çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi genellikle polimerik nano-taşıyıcıları üretmek için kullanılmaktadır. Ancak, Trotta ve arkadaşları (2003), bu tekniği ilk kez KLN hazırlamak üzere kullanmıştır. Metil asetat, etil asetat, izopropil asetat, benzil alkol ve bütillaktat gibi su içerisinde kısmi olarak çözünen organik çözücülerin kullanıldığı bir tekniktir. İlk olarak, her iki fazın termodinamik dengesi oluşana kadar organik çözücü ve su birbirleri içerisinde doyurulur. Lipidler ve ilâçlar su ile doyurulmuş çözücüde çözündürülür. Sürfektan/stabilizatör ise organik çözücü ile doyurulmuş su içerisinde çözündürülür. Daha sonra karıştırılarak y/s emülsiyonu oluşturulur. Emülsiyon su ile dilüe edilerek çözücünün sürekli faz(su) içine difüzyonu gerçekleştirilmektedir. KLN'ler, lipid presipitasyonu ile kendiliğinden oluşmaktadır. Çözücü daha sonra liyofilizasyon veya vakum distilasyonu ile uzaklaştırılmaktadır (Trotta vd., 2003).

2.4.1.5 Çözücü Enjeksiyon Yöntemi

Çözücü enjeksiyon yöntemi Schubert ve arkadaşları (2003) tarafından 2003'te raporlanmıştır. Metanol, etanol, izopropanol ve aseton gibi su ile karışabilen veya kısmi olarak su içerisinde karışabilen organik çözücü içerisinde ilâç ve lipidin çözünmesini içeren bir tekniktir. Sulu faz, genellikle bir sürfektan eklenerek veya sürfektan karışımı içeren bir su ya da tampon solüsyonu olarak hazırlanır. Organik

faz (lipid ve etken madde) mekanik karıştırıcı altında sulu faza hızlı bir şekilde enjekte edilmektedir (Duong vd., 2020).

Çözücü enjeksiyon yöntemi ile çözücü emülsifikasyon-difüzyon yönteminin temel prensipleri benzerdir. Enjeksiyonu takiben iki temel mekanizme gerçekleşerek KLN'ler oluşmaktadır. Birincisi, organik çözücü damlacıklar içerisinde sulu faza difüze olur ve damlacık boyutu küçülür. Bunun sonucunda, damlacıklar içindeki lipid konsantrasyonu artarak sürfektan tarafından stabilize edilmektedir. İkincisi, sürfektan su ve çözücü arasındaki arayüzey gerilimini azaltarak enjeksiyon bölgesinde küçük lipid parçacıklarının oluşumuna olanak vermektedir. Çözücünün difüzyonu sırasında arayüzeydeki titreşim ve türbülans sebebiyle, bu parçacıklar aynı esas lipid konsantrasyonlarına sahip daha küçük damlacıklara bölünmektedir. Bu nedenle, çözücü enjeksiyon yönteminde çözücü difüzyonu, minik damlacıkların ve lipid presipitasyonuna yol açmaktadır (Duong vd., 2020).

2.4.1.6 Çözücü Emülsifikasyon-Uçurma Yöntemi

Emülsifikasyon-difüzyon metodunun aksine, çözücü emülsifikasyon-uçurma yönteminde kloroform, sikloheksan, diklorometan ve tolüen gibi suda çözünemeyen organik çözücüler KLN'lerin sentezinde kullanılmaktadır (Pooja vd., 2015).

Özetle, lipidler ve etken maddeler organik çözücü veya organik çözücü kompleksi içerisinde çözdürülür. Daha sonra sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek nano boyutta dispersiyon oluşumu sağlanır. Organik çözücü mekanik karıştırıcı veya döner evaporatör kullanılarak uçurulur. Çözücü uçurulduğunda KLN'ler lipid presipitasyonu ile oluşur (Duong vd., 2020). Oluşan partiküllerin boyutu organik fazdaki lipid miktarı ile ilişkilidir (Mehnert, 2001).

Bu teknikteki sınırlayıcı problem ise bazen toksik organik çözücünün arındırılması için ileri evaporasyon uygulamaları ya da ultrafiltrasyon gerektirmesidir. Sentezlenen KLN'lerin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılabilmesi için çözücü kalıntı seviyeleri, herhangi bir olumsuz etki görülmediği belirtilen değerlerin altında olmalıdır (Zielińska vd., 2020).

2.5 Senesens

Senesens, yani yaşlanma, hücre döngüsünde tutuklama meydana gelmesiyle hücrelerin çoğalma potansiyelini sınırlayan hücrel bir yanıttır. Replikatif senesens, onkogenle indüklenmiş senesens, stres kaynaklı erken senesens ve gelişimsel senesens olmak üzere dört tip senesens tanımlanmıştır (Iwasaki vd., 2019; Martínez-Zamudio vd., 2020; McHugh & Gil, 2018; X. Zhou vd., 2020).

Replikatif stresin tetiklenmesiyle, hücre çoğalması telomer kısalmasına yol açmaktadır. Bu durum, DNA kopyalanmasını engeller ve DNA hasarını tetikleyebilmektedir. Tüm bu proses, replikatif senesense neden olmaktadır. Onkogen aktivasyonu doğrudan DNA hasarını indüklemektedir veya bazı sinyal yollarını aktive ederek hücrel senesense sebep verebilmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin kaybı, Akt-mTOR-p53 sinyal transdüksiyon yolağının aktive olmasıyla hücrel senesens oluşmasını sağlamaktadır. Senesens belirteçleri (örneğin gelişimle ilişkili sensenste role sahip olan p21); uzuvlarda, sinir sisteminde, bağırsak endodermine ve mezonefroзда gözlemlenebilmektedir. Histonların epigenetik modifikasyonları da senesense neden olabilmektedir. Mitokondriyal işlev bozukluğu, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine sebebiyet vererek DNA hasarının oluşmasını sağlayacak sinyal yollarının uyarımına neden olabilmektedir. Kemoterapötik ilaçlar veya iyonize radyasyon, DNA hasar yanıtını indükleyerek hücrel senesense neden olabilmektedir (W. Huang vd., 2022).

Literatürde, ‘Hayflick limiti’ olarak bilinen kavram, fibroblastların kültürde sınırlı bir çoğalma kapasitesi sergilediği ve replikatif tutuklanmaya geçtiği Hayflick tarafından 1965 yılında ortaya konmuştur. MKH’ler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda çoğalan bulgular, kültürdeki MKH’ler için de böyle bir durumun olduğuna işaret etmektedir (Weng vd., 2022). Genel olarak, MKH’lerin in vitro yaşam süresi 30 ila 40 pasaj arasında değişmektedir (Hwang, 2014). Bunun yanı sıra, eğer MKH kaynağı yaşlı bir donör ise genç donörlere kıyasla MKH’lerin çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri kısıtlanmaktadır (Childs vd., 2015). *In vitro*’da yapılan çalışmalarda, MKH’lerin kök hücre özelliklerini giderek kaybettikleri gösterilmiştir. MKH’lerin fonksiyonu ve bölünme kapasiteleri göz önünde bulundurulduğunda bu kayıp bir zıtlık yaratmaktadır (Y. Li vd., 2017).

MKH'lerin senesensi, morfolojik ve biyolojik değişiklikler dahil olmak üzere belirgin fenotipik değişimlerle ilişkilidir. Bu değişiklikler; büyümüş ve yayılmış hücre morfolojisi, çoğalma ve farklılaşma kaybı gibi hücre davranışları olarak örneklendirilebilmektedir. Biyobelirteçlerdeki farklılıklar, sekretomdaki nitel ve nicel değişiklikler de MKH senesensinde gözlemlenebilmektedir (Herranz & Gil, 2018). Uzun süreli kültür sırasında MKH'lerin büyüme sürecini analiz etmek üzere görüntüleme sistemi kullanan araştırmacılar; MKH'lerin 1-3 pasajları sırasında standart boyutlarda olduğunu gözlemlerken 5. Pasaj sonrasında büyümeye başladığını ve 6-9 pasajları esnasında 1. pasaja göre hücre boyutunun 4.8 kat daha fazla büyüdüğünü belirtmişlerdir (Weng vd., 2022).

Hücrenel yaşlanmanın değerlendirilmesi için altın standart olarak kabul edilen bir belirteç olarak senesens-ilişkili beta-galaktosidaz (SA- β -gal) en yaygın kabul gören belirteçtir. SA- β -gal aktivitesi, hücre ve dokularda senesensi değerlendirmek üzere belirteç olarak kullanılmaktadır. Senesenste olan hücrelerin intra-lizozomal pH'sı 6'da SA- β -gal aktivitesi kalitatif olarak tespit edilebilmektedir. Buna karşın, senesente olmayan hücrelerin intra-lizozomal pH'sı 4'te asidik β -galaktosidaz aktivitesi tespit edilebilmektedir (W. Huang vd., 2022).

Gen aktarım stratejileri ile MKH'lerin erken senesense girmeleri engellenebilmektedir. Sox2 ve Oct4 genlerinin aşırı ekspresyonunu içeren genetik modifikasyonlar, transplante edilen MKH'lerin farklılaşma ve çoğalma kapasitelerini etkili bir şekilde arttırabilmektedir (Han vd., 2014).

3

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Hücre Hatları

Adipoz doku kaynaklı MKH (ATCC PCS-500-011)

L929 (ATCC CCL-1™)

XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent 200315)

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

0.2 ml beyaz PCR 8-Strip tüpler (NEST 404001)

0.2 ml PCR tüpleri (NEST 401001)

1.5 ml şeffaf mikro santrifüj tüpü (NEST 615601)

15 ml'lik steril falkon tüpler (CORNING 352095)

24 kuyucuklu plaka (NEST 702011)

50 ml'lik steril falkon tüpler (CORNING 352070)

96 kuyucuklu plaka (NEST 701011)

Hücre kryo (dondurma) tüpler (NEST 606952)

Hücre kültür flaskları (T25) (NEST 707003)

Hücre kültür flaskları (T75) (NEST 708003)

PCR 8-Strip tüp düz kapaklar (NEST 406012)

Pipet ucu 10 µL (NEST 301016)

Pipet ucu 1000 µL (NEST 303216)

Pipet ucu 200 µL (NEST 302116)

Steril öze (ISOLAB 08201001)

Steril petri kabı (ISOLAB 08102061)

Steril tek kullanımlık pipetler (10 ml) (NEST 327003)

Steril tek kullanımlık pipetler (2 ml) (NEST 325003)

Steril tek kullanımlık pipetler (5 ml) (NEST 326003)

Thoma Lamı (ISOLAB 075.03.002)

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Agarose (Biobasic Canada AB0014)

Dimetil Sülfoksit (DMSO-ChemCruz sc358801/Carlo Erba 508001)

Dimetilformamid (Merck 103053)

DMEM/Ham's F-12 (DMEM/F-12) (Capricorn DMEM-12-A)

DNA Green viewer (Nepenthe NP041111510)

DNA yükleme boyası (6x) (Thermo Fisher R0611)

Domuz derisinden elde edilen jelatin (Sigma Aldrich G2500-500G)

Etidyum Bromür (Sigma Aldrich E1510)

Feta Bovine Serum (Capricorn FBS-HI-12B)

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Diagnovum D408-500ML)

Kalsiyum klorür (Sigma Aldrich C4901)

Kanamisin (Duchefa Biochemie K0216.0010)

Kloroform (Merck 102445)

Lambda DNA/HindIII Plus DNA markerı (Biobasic Canada M105R-2)

Luria Agar (LA) Lennox (Biobasic Canada SD7006)

Luria Broth (LB) Lennox (Biobasic Canada SD7005)

Magnezyum klorür heksahidrat (Sigma Aldrich M2670)

Mezenkimal kök hücre besiyeri (Sartorius MSC NutriStem® XF Media 05-200-1A)

MKH besiyeri ilavesi (Sartorius MSC NutriStem® XF Supplement Mix 05-201-1U)

Oktadesilamin (Sigma Aldrich 305391-25G)

Opti-MEM (Gibco™ 31985070)

Paraformaldehit (Merck 104005)

PBS tablet (Biobasic Canada PD0435)

Penisilin-Streptomisin (Biological Industries 03-031-1B)

Plazmid (Sino Biological HG10426-ACG)

Polivinil alkol (Sigma Aldrich P8136-250G)

Potasyum ferrisiyanür (Rokim K119039.0100)

Potasyum ferrosiyanür (Rokim K119018.0100)

RPMI 1640(Sartorius RPMI 1640 Medium, HEPES 01-106-1A)

Sitrik asit (Biobasic Canada C2123)

SOC medyum (New England Biolabs B9020S)

Sodyum fosfat monobasic (Biobasic Canada SB0878)

Sodyum klorür (Biobasic Canada SB0476)

TAE Tamponu (Biobasic Canada A0033)

Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich M5655)

Tripan mavisi (Sigma T8154)

Tripsin edta (Diagnovum D706-100ML)

Tripsin-EDTA (Biological Industries 03-052-1A)

TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Scientific R0534)

X-gal (Biobasic Canada BB0083)

3.1.4 Kullanılan Kitler

BMP-2 ELISA kit (Elabscience E-EL-H0011)

cDNA sentez kiti (Nepenthe NP041011610)

Dnaz I enzim kiti (Thermo Scientific EN0525)

Plazmid izolasyon kiti (Biobasic Canada BS413)

RNA izolasyon kiti (Nepenthe NP041012310)

SYBR GREEN gerçek zamanlı PCR kiti (Nepenthe NP041010210)

XbaI enzim kiti (Thermo Scientific FD0684)

3.1.5 Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik kabini (Mikrotest MLF-120)

Buzdolabı (Arçelik +4 °C, -20°C)

Çalkalamalı inkübatör (Mikrotest MCI55)

ELISA reader (Biotek PowerWave XS2)

Eppendorf Research® Plus Standart Otomatik Pipet Seti

Floresan mikroskop (Zeiss Axio Observer.Z1 ve HXP 120V floresan ünitesi)

FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 100)

Gerçek Zamanlı PCR (Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems StepOnePlus™)

Hassas terazi (Ohaus PA224C)

Homojenizatör (IKA T 25 digital ULTRA-TURRAX®)

Hücre kültürü santrifüj cihazı (Nuve NF 400/400R)

Invert mikroskop (Zeiss Axio Observer.Z1 ve HXP 120V floresan ünitesi),

Jel görüntüleme cihazı (Invitrogen iBright™)

Karbondioksit İnkübatörü (Mikrotest MCO)

Liyafilizatör (Christ ALPHA 1-4 LD)

Manyetik karıştırıcı (Witeg MSH-20D)

Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers)

Otoklav (Hirayama HICLAVE HVE-50)

pH metre (Mettler Toledo)

Saf su cihazı (Sartorius Arium Pro)

Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra X-30 R)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeiss EVO® LS 10)

Termal cycler (Peqlab peqSTAR)

Ultra derin dondurucu (Thermo Scientific Forma 700 Series)

UV transillüminatör (Witeg UV-Transilluminator WiseUV WUV-M10)

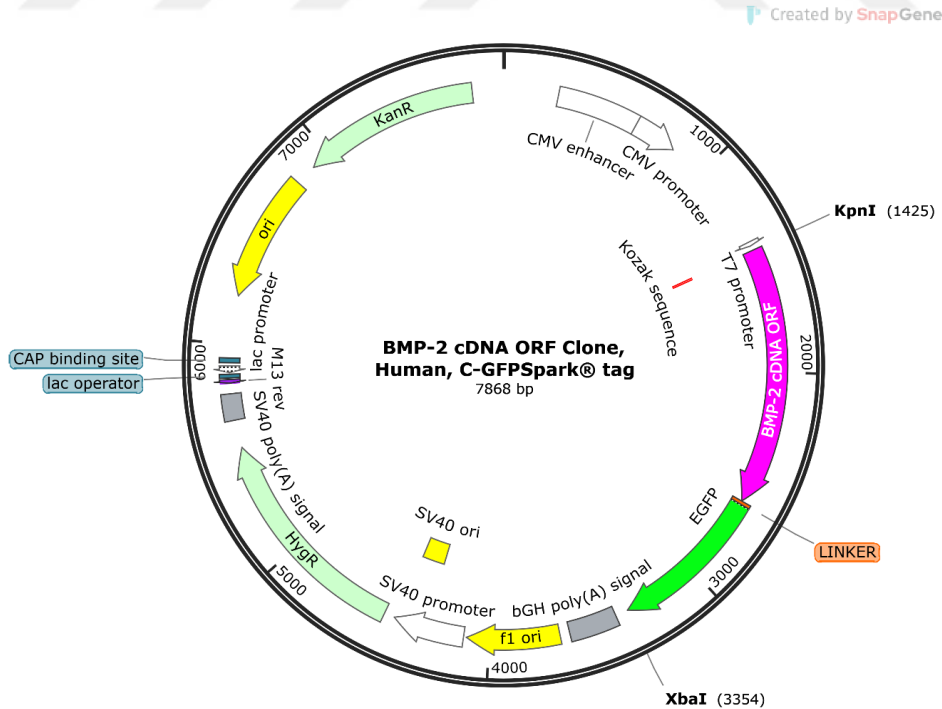
UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

ZetaSizer (Malvern ZEN 3600 Nano ZS)

3.2 Metot

3.2.1 BMP-2 Kodlayan Ekspresyon Plazmidinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

BMP-2 cDNA açık okuma çerçevesi (ORF) ve C-terminalinde geliştirilmiş GFP kodlayan, memeli ekspresyon plazmidini Sino Biological firmasından temin edildi. Liyofilize plazmid firma yönergesine uyularak $5000 \times g$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. 100 μ l nükleaz içermeyen su ile plazmid DNA yavaşça çözündürüldü. Sulandırılmış plazmid içeren tüp 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Dikkatlice vortekslenen tüp, spinlenerek plazmid DNA'nın tüpün dibinde toplanması sağlandı. Ardından Nanodrop cihazında absorbans ve konsantrasyon değerleri belirlendi. İlgili plazmidin konsantrasyonu 130.7 ng/ μ l, $A_{260/280}$ 1.90 ve $A_{260/230}$ 2.11 olarak ölçüldü. Plazmid -20°C 'de saklandı.



Şekil 3.1 BMP-2 cDNA ORF ve GFP kodlayan plazmidin haritası

Plazmidin çoğaltılması için transformasyon çalışmaları yürütüldü. Transformasyon için *Escherichia coli* XL10-Gold bakterileri kullanıldı. Bakteri hali hazırda kompetent olmalarına rağmen, transformasyon verimliliğini arttırmak üzere CaCl_2 (Chang vd., 2017) kullanılarak ultrakompetent hale getirildi. Bunun için, gliserol stokta dondurulmuş *E. coli* XL10-Gold LB Agar'a çizgi ekimi yapıldı ve bir gece 37°C 'de inkübe edildi. Tek koloni *E. coli* seçildi ve 10 ml'lik LB Broth'a inoküle edildi ve bir gece 37°C 'de inkübe edildi. 100 ml'lik LB besiyerine 1 ml başlangıç kültürü inoküle edilerek 225 rpm 37°C 'de çalkalayıcı inkübatörde büyütüldü. Her saat OD_{600} 'de ölçüm alınarak takibi yapıldı. OD_{600} 0.2'nin üzerine çıktığında takip sıklığı 20-25 dakikaya düşürüldü. OD_{600} 0.35-0.4'e ulaştığında kültür erleni direkt buz üzerine koyularak 30 dakika inkübe edildi. Aynı zamanda kullanılarak sarf malzemeler ve solüsyonlar $+4^\circ\text{C}$ 'ye kaldırılarak soğutuldu. 100 ml'lik kültür, 25 ml olacak şekilde dört adet 50 ml'lik falkona bölündü. Bakteriler, $3000 \times g$ 'de 15 dakika 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, 10 ml'lik buz soğukluğunda 100 mM MgCl_2 ile çökelti çözdürüldü. Tüm falkonlardaki bakteri solüsyonları tek bir falkonda toplandı. $2000 \times g$ 'de 15 dakika 4°C 'de santrifüj edildi. Buz soğukluğunda 20 ml 100 mM CaCl_2 ile çökelti resüspense edildi ve en az 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi. $2000 \times g$ 'de 15 dakika 4°C 'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Yaklaşık 50 ml 85 mM CaCl_2 , %15 gliserol ile çökelti çözdürüldü ve $1000 \times g$ 'de 15 dakika 4°C 'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak çökelti 1 ml 85 mM CaCl_2 , %15 gliserol ile çözdürüldü. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 μl 'lik sıvı alikotlandı ve sıvı azotla hızlıca dondurulan ultrakompetent hücreler -80°C 'de saklandı.

3.2.1.1 BMP-2 Kodlayan Plazmidin *E. coli* XL10-Gold'a Transformasyonu

Plazmidin direnç geni olan kanamisin antibiyotiği içeren (Kan+) önceden hazırlanmış ve 4°C 'de muhafaza edilen LB Agar petriler, 37°C 'deki inkübatöre kaldırıldı. SOC besi ortamı $+4^\circ\text{C}$ 'den çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi beklenildi. -80°C 'deki ultrakompetent hücreler buz üzerine çıkarıldı. -20°C 'deki plazmid stoğu buz üzerine çıkarıldı. Çözünmeleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Steril bir mikrosantrifüj tüp alındı ve 100 ng plazmid koyuldu. Ardından üzerine 50 μl ultrakompetent *E. coli* XL10-Gold eklendi. Parmak ucuyla mikrosantrifüj tüpün aşağısına hafifçe 6-7 kere vurularak karıştırıldı. Buz üzerinde 30 dakika inkübe edildikten sonra 42°C 'de 90 saniye ısı şoku uygulandı. Hemen buz üzerine alınarak

2 dakika inkübe edildi. Mikrosantrifüj tüpe 950 µl SOC besi ortamı eklendi ve steril 50 ml'lik falkona alındı. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C, 225 rpm ve 90 dk süreyle inkübe edildi. 3000 × g'de 5 dk santrifüj ile bakteriler çöktürüldü. 800 µl'lik süpernatant atıldı. Kalan 200 µl süpernatant parmak ucu ile falkona hafifçe vurularak karıştırıldı. Kabin içerisinde 75 µl solüsyon drigalski ile LB Kan+ Agar'lara yayma ekim yapıldı. Petrilere iyice emdirilirken yüzeyin kurumamasına da dikkat edildi. Petriler alüminyum folyoya sarılarak 37°C'de 12-16 saat inkübe edildi. Transformasyon etkinliği belirlendi. Plazmid saflaştırma çalışmalarına geçmek üzere mini kültür kuruldu. Bunun için, 37°C'de inkübe edilen LB Agar petrilere tek koloni seçilerek 3 ml LB Kan+ Broth'a inoküle edildi. 37°C'de, 225 rpm çalkalayıcı inkübatörde 12-16 saat inkübe edildi.

3.2.1.2 BMP-2 Kodlayan Plazmidlerin Saflaştırılması

BMP-2 kodlayan plazmidlerin saflaştırması için plazmid izolasyon kiti kullanıldı. Kit bakterileri parçalamak için lizis solüsyonu, parçalama işlemi görünür kılmak için VisualLyse solüsyonu, yıkama solüsyonu ve kolonlara takılan plazmid DNA'ları elüt etmek için elüsyon solüsyonu içermektedir. Özetle, 3 ml'lik mini kültür mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 12000 rpm, 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek 100 µl solüsyon I eklendi ve çökelti iyice karıştırıldı. 1 dk bekletildikten sonra 1 µl VisualLyse eklendi ve 200 µl solüsyon II eklenerek 4-6 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Tüp tamamen mavi olana kadar karıştırılma işlemine devam edildi. 350 µl solüsyon III eklendi ve yine alt-üst edilerek karıştırıldı. Beyaz bulutumsu bir görüntü elde edilene kadar karıştırılmaya devam edildi. Ardından, 12000 rpm 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kolona aktarıldı ve 10000 rpm 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve ardından yıkama adımlarına geçildi. 750 µl yıkama solüsyonu kolona eklenerek 10000 rpm 2 dk santrifüj edildi, toplama tüpünde biriken yıkama solüsyonu döküldü ve işlem bir kere daha tekrar edildi. Kalan yıkama solüsyonundan arınmak için boş kolon 10000 rpm 1 dk santrifüjlendi ve kalan sıvı uzaklaştırıldı. Kolon temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pürifiye DNA mikrosantrifüj tüplerinde toplandı. Pürifiye pBMP-2'nin Nanodrop cihazında ölçümü gerçekleştirildikten sonra -20°C'de saklandı.

3.2.1.3 BMP-2 Plazmidinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Pürifiye pBMP-2'nin saflığı, Nanodrop ölçümü dışında, agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin boyuta ve şekle bağlı olarak ayrımını gösteren bir tekniktir. %0.8'lik agaroz 1X TAE tamponu içerisinde hazırlandı ve mikrodalga kullanılarak iyice çözündürüldü. Hazırlanan agaroz solüsyonu 50°C'ye soğutulduktan sonra 0.2-0.5 µg/ml konsantrasyon aralığında olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Jel tepsisine taraklar takılarak hazırlanan agaroz köşeden yavaşça döküldü. Agarozun donması için bir süre beklenildi. Agaroz iyice donduktan sonra jel tepsisi, elektroforez tankına yerleştirildi ve 1X TAE tamponu ile dolduruldu. 500 ng pBMP-2 yükleme boyasıyla beraber kuyucuk 3'e eklendi. Kuyucuk 2'ye marker eklendi. Kuyucuk 1'e ise tek noktadan kesim yapılarak pBMP-2 lineer hale getirildi. Tek nokta kesimi için endonükleazlardan *XbaI* enzimi üretici firmanın talimatına uygun bir şekilde kullanıldı. Elektroforez güç kaynağı 55V 30 dk'ya ayarlanarak çalıştırıldı. Ardından jel UV transillüminatörde görüntülenerek fotoğraflandı.

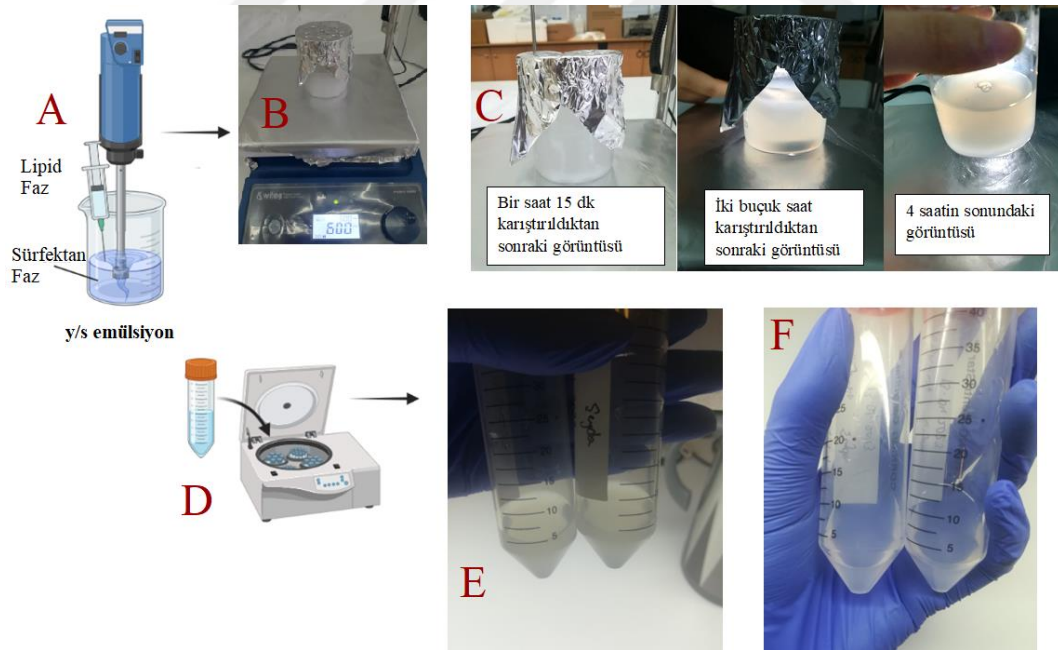
3.2.2 Katı Lipid Nanopartikül Sentezi

Katı lipid nanopartikül, temelde yağ içinde su (y/s) tekli emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile sentezlendi. Ek olarak, yüksek hızda karıştırma tekniğinden de yararlanıldı. Tablo 3.1'de belirtilen miktarlarda PVA tartılarak sürfektan faz hazırlanmaya başlandı. 25 ml ddH₂O eklenen behere belirtilen miktarda PVA eklendi, üzerine 25 ml daha eklenerek 50 ml'ye tamamlandı. İçerisine manyetik balık atıldı. Toplam hacim bir çizgi ile beherin üzerine işaretlendi. Manyetik karıştırıcı 100°C'ye ısıtıldı ve sürfektan faz 1000 rpm'de tamamen çözündürülmek üzere manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Buharlaştan ddH₂O'yu tamamlamak üzere işaretlenen toplam hacim çizgisine kadar ddH₂O eklendi.

Her bir oktadesilamin bazlı nanopartikül (ODA-NP) fraksiyonu için 10 mg oktadesilamin 4 ml kloroform içinde çözündürüldü. Çözdürülen lipid faz enjektörle çekildi. Buz dolu bir kabın içine sürfektan fazı içeren beher yerleştirildi. Yüksek hızlı karıştırıcı/homojenizatör (IKA T 25 digital ULTRA-TURRAX®) cihazında buz dolu kabın içinde PVA'lı sürfektan faz 15.000 rpm'de homojenize edilirken lipid faz enjektörle damla damla 500 µl/dk olacak şekilde yavaşça eklendi (Şekil 3.2 A).

Tablo 3.1 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülün sentez içeriği

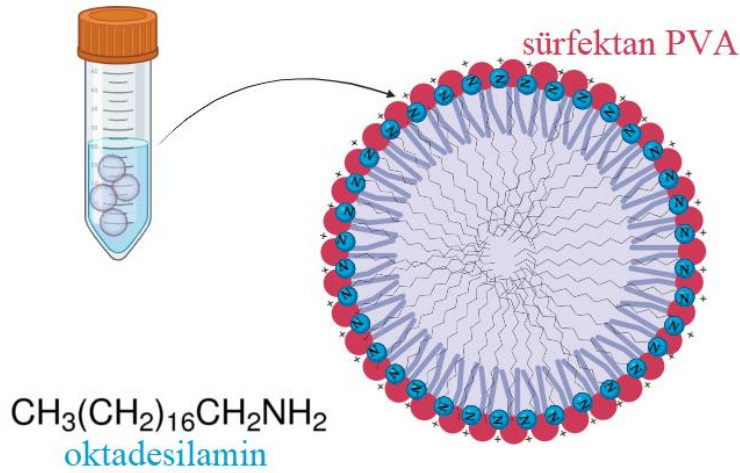
Nanopartikül Künyesi	Lipid Faz	Süpfektan Faz
<i>ODA-NP-1</i>	10 mg oktadesilamin 4 mL kloroform	50 mg PVA 50 mL ddH ₂ O
<i>ODA-NP-2</i>	10 mg oktadesilamin 4 mL kloroform	100 mg PVA 50 mL ddH ₂ O
<i>ODA-NP-3</i>	10 mg oktadesilamin 4 mL kloroform	150 mg PVA 50 mL ddH ₂ O
<i>ODA-NP-4</i>	10 mg oktadesilamin 4 mL kloroform	200 mg PVA 50 mL ddH ₂ O
<i>ODA-NP-5</i>	10 mg oktadesilamin 4 mL kloroform	250 mg PVA 50 mL ddH ₂ O



Şekil 3.2 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülünün sentezi

Enjektörün içindeki lipid faz tamamen bitince, homojenizasyon işlemi durduruldu. Emülsiyonları içeren bu karışım, kloroformun lipid içerisinden difüze olup uçuşması için oda sıcaklığındaki manyetik karıştırıcıda 600 rpm'de 4 saat karıştırıldı (Şekil 3.2 B,C). Lipid nanopartikülleri kloroformun uzaklaşmasıyla presipite olarak solüsyon içerisinde askıda bir şekilde oluşmuştur. 4 saatin sonunda nanopartikül

karışımı 2 adet 50 ml'lik falkona bölüştürüldü. Santrifüj cihazında birinci çöktürme, büyük partiküllerden kurtulmak üzere 5500 rpm'de 30 dk santrifüj edildi (Şekil 3.2 D). Süpernatant atıldı ve çökelti 6 ml ddH₂O ile resüspense edildi (Şekil 3.2 E). Resüspansiyon sırasında oksidasyon oluşmaması için ddH₂O çökeltinin tam üzerine eklendi. İkinci çöktürme nanopartikülleri elde etmek üzere 10.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve çökelti 6 ml ddH₂O'da resüspense edildi (Şekil 3.2 F). Nanopartikül oluşumuna katılmayan fazla sürfektanın uzaklaştırılması için bir yıkama işlemi yapıldı. 10.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Nanopartikül içeren falkonlara 2'şer ml ddH₂O eklendi, çöktüler resüspense edildi ve tek bir falkonda toplanıp toplam 5 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı. Sterilizasyonu için bir saat UV altında bekletildi. Her bir ODA-NP fraksiyonu için 1'er ml nanopartikül solüsyonu -20°C'de dondurulup 40 mPa'da -0.512°C'de liyofilize edildi ve elde edilen kuru nanopartikül ağırlığı ölçüldü. Bunun sonucunda, her bir ODA-NP'lerin 1 ml'deki mg cinsinden konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.3 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülünün yapısı

3.2.3 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Karakterizasyonu

3.2.3.1 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Boyutunun ve Şeklinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin boyut, dağılım, şekil ve yerleşim özelliklerinin belirlenmesi için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden yararlanmaktadır. SEM, numune yüzeyinin odaklanmış bir elektron

demeti ile taranarak görüntü elde edilmesini sağlayan bir elektron mikroskop tipidir. Elektron kaynağından çıkartılan elektronlar, yüksek voltaj ile hızlandırılır ve ardından numune üzerine odaklanmak üzere salınır. Bu elektron demeti, numune yüzeyini tarayarak geçer. Elektronlar ile numune atomları arasındaki etkileşimler, uygun detektörler tarafından toplanır. Toplanan bu bilgiler, sinyal güçlendiricilerinden geçirilerek bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılır ve bu sayede bir görüntü elde edilir. SEM ile 1 nanometreden daha yüksek çözünürlüğe ulaşılabilmektedir (Vladár & Hodoroaba, 2020).

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülün yüzey morfoloji analizi, Zeiss EVO® LS 10 taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. SEM cihazında numunelerin üzerine yerleştirildiği stablardan biri alınarak yüzeyi %100 etanol ile temizlendi. Daha sonra stabın üzerine 30 µl ODA-NP damlatıldı ve oda sıcaklığında kuruması için 24 saat bekletildi. Kuruyan numunedeki nanopartiküller karakterize edildi. “Spotter coater” cihazıyla yalıtkan nanopartiküllerin yüzeyi 10 mA akım ve 1kV potansiyel uygulanarak ~2 nm kalınlığında altın ile kaplandı. Nanopartiküllerin boyutları, dağılımı, yüzey morfolojisi ve şekilleri, ikincil elektron saptayan dedektör kullanılarak 30000x büyütme altında yüksek vakum koşullarında analiz edildi.

3.2.3.2 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Ortalama Büyüklüğü, Yüğü ve Boyut Dağılımının Belirlenmesi

Dinamik ışık saçılımı (DLS) yönteminin ilkesi, seyreltilmiş çözelti içindeki küçük parçacıklardan zaman içerisinde saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesine dayanmaktadır. Saçılan ışığın şiddeti; saçılan parçacığın hareketi yani parçacığın büyüklüğü, ortam viskozitesi ve sıcaklığı ile ilişkilidir. Genellikle, ışık saçılımı deneylerinde, monokromatik bir ışın örnek üzerine yönlendirmekte ve ardından bir dedektör belirli bir açıda saçılan ışığı kaydetmektedir. Bu teknik, özellikle de kolloidal süspansiyonları, örneğin nanopartikül emülsiyonları gibi, karakterize etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (Carvalho vd., 2018).

Nanopartikül dispersiyonlarının ortalama parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi (PDI) ZetaSizer Nano ZS cihazında dinamik ışık saçılımı yöntemini kullanılarak karakterize edildi. 100 µl ODA-NP dispersiyonu çift distile su ile 1 ml'ye tamamlanarak dilüe edildi. Numuneden yaklaşık 800 µl'si tek

kullanımlık kapiller hücreye (ZetaSizer küveti) koyuldu. Viskozite değeri 0.89 cP'ye, kırılma indeksi 78.54'ye, derecesi 25°C'ye, tekrar sayısı üçe ve çözücüsü suya ayarlanarak ölçüm yapıldı.

3.2.3.3 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Kimyasal Bağlarının Belirlenmesi

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) yöntemi, biyomoleküllerin toplam bileşiminde meydana gelen değişiklikleri belirleyerek fonksiyonel gruplardaki değişiklikleri tespit edebilen bir spektroskopi türüdür. Belli bir dalga boyundaki kızılötesi radyasyon tarafından etkilenen moleküllerin titreşimi ve rotasyonu, FTIR kullanılarak ölçülmektedir. Bu yöntem, numunelerin gösterdikleri etkileşimlere dair ayrıntılar ortaya koyabilen numuneler arasındaki moleküler bağlanma yapısındaki farkları tanımlamaktadır. Transmittans FTIR, zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) FTIR ve mikro-spektroskopi FTIR, karakterizasyon için en popüler FTIR tabanlı yöntemlerdir (Eid, 2022).

Nanopartiküllerin yapısındaki fonksiyonel gruplar ve kimyasal bağlar, ATR-FTIR cihazı ile tayin edildi. Liyofilize nanopartikül ve oktadesilamin ayrı iki numune olarak FTIR ölçümü yapıldı.

3.2.4 Hücre Kültürü Çalışmaları

Temel hücre kültürü çalışmaları; dondurulmuş hücrelerin yeniden canlandırılması, hücrelerin pasajlanması, ileri hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere canlı hücrelerin sayımı ve hücrelerin dondurularak stok yapılması süreçlerini içermektedir.

Sunulan bu tezde, nanopartiküllerin *in vitro* deneyleri fare fibroblast hücre hattı L929 (ATCC CCL-1™) ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ATCC PCS-500-011) kullanılarak yapıldı.

3.2.4.1 Hücrelerin Canlandırılması

Ultra derin soğutucuda (-80°C) kryo tüplerde stoklanan hücrelerden, çalışma için kullanılacak hücre hattı alınıp hızlıca 37°C %5 CO₂'lik inkübatöre koyuldu. Kryo tüpteki hücre süspansiyonunun hızlıca çözülmesi sağlandı ve 15 ml'lik falkona aktarıldı. L929 için tamamlanmış besiyeri (RPMI 1640 + %1 penisilin-streptomisin + %10 fetal sıgır serumu (FBS)) veya MKH için tamamlanmış besiyerinden ("MSC XF Media" + %1 penisilin-streptomisin + "MSC XF

Supplement”) 2 ml alınarak hücrelerin ozmotik şoka uğramaması için damla damla 15 ml’lik falkondaki hücre süspansiyonuna eklendi ve karıştırıldı. L929 için 1500 rpm veya MKH için 400 rcf’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak çökelti halindeki hücreler uygun besiyerlerinde pipetaj yapılarak resüspanse edildi. Daha sonra hücreler falkondan, hücre kültürü flasklarına alındı. 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi.

Hücre kültür flaskları ve plakaları polistiren yapıdadır. Genellikle çoğu hücre hattı, uygun FBS oranı ile kültür kaplarına tutunurlar. L929 bu hatlardan biridir. Ancak MKH besiyeri, özel bir besiyeridir ve FBS içermemektedir. Bu nedenle, hücreleri kültür kaplarına tutundurmak için ekstra yüzey kaplayıcılarına ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan bu tezde, hücre kültür flaskları ve plakalar %0.2’lik jelatin ile kaplandı. Bunun için %0.2 jelatin ddH₂O içinde çözündürmek ve steril edilmek üzere 121°C’de 15 dk otoklavlandı. 37 °C’ye geldiğinde T75’lik flask için 10 ml %0.2 jelatin flaska eklendi ve en az bir saat 37 °C’de inkübe edildi. Daha sonra jelatin solüsyonu çekildi ve besiyerindeki hücreler flaska aktarıldı. 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi.

Hücrelerin flaskın yüzeyine tutunmaları, çoğalmaları, yoğunlukları ve doluluk oranı faz kontrast mikroskopu ile takip edildi. Hücre kültürü biyolojisinde, konfluens, tutunan hücreler tarafından kaplanan kültür flaskının yüzeyinin yüzde kaçının dolu olduğunu ifade etmektedir. Konfluenslik %80’nin üzerine gelindiğinde hücreler pasajlama yapılarak yeni kültür kaplarına aktarıldı.

3.2.4.2 Hücrelerin Pasajlanması

Konfluenslik %80’nin üzerine gelindiğinde hücreler pasajlama işlemine geçildi. Hem L929 hem de MKH hücre kültür flasklarına tutunarak prolifer olmaktadır. Pankreas serin proteazı olan tripsin, pozitif yüklü lizin ve arjinin zincirlerini hedef almaktadır. Tripsin, hücre kültürüne eklendiğinde kültürdeki hücrelerin kültür flasklarına yapışmasını sağlayan proteinleri parçalamaktadır. Flasktaki besiyeri serolojik pipetör ile çekilip atıldı. Flask 1X PBS ile yavaşça yıkandı ve PBS çekilerek atıldı. Ardından 1X tripsin-edta eklendi ve 5 dk 37°C %5 CO₂’de inkübe edildi. Kalkan hücreler faz kontrast mikroskopunda gözlemlendikten sonra flask tabanına avuç içi ile hafifçe vurularak hücrelerin tamamı kaldırılmaya çalışıldı. Uygun tamamlanmış besiyeri kullanılan tripsin-edta miktarının iki katı hacminde

olacak şekilde flaska koyuldu ve iyice pipetaj yapılarak hücreler toplandı. 15 ml'lik falkona aktarılan hücreler, belirtilen uygun rpm'de ve/veya rcf'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve hücre çökeltisi, uygun taze tamamlanmış besiyerinde resüspanse edildi. Uygun flaslara (MKH'ler için %0.2 jelatinle kaplanmış flask) ekilen hücreler 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. Hücrelerin tutunmaları, çoğalmaları ve dolulukları mikroskopta takip edildi. Dolulukları %80'i aştığında tekrar pasajlandılar.

3.2.4.3 Canlı Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı, hücre kültürü deneylerinin yürütülmesi için oldukça önemlidir. *In vitro* deneyler belirli sayıdaki hücreler ile gerçekleştirilmektedir. Canlı hücreleri, ölü hücrelerden ayırmak üzere %0.4'lük tripan mavisi kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin membranları sağlamdır ve tripan mavisine geçirgen değildir. Ancak ölü hücreler tripan mavisi boyasına karşı geçirgendir ve bu nedenle boyayı içine alırlar. Mikroskopta bakıldığında canlı hücreler parlak-beyaz gözükürken, ölü hücreler mavi gözükmektedir. Tripsine edilip çöktürüldükten sonra tekrar resüspanse edilen hücre süspansiyonundan bir mikrosantrifüj tüpüne 100 µl alınıp üzerine 100 µl %0.4'lük tripan mavisi eklendi. 60 ila 90 saniye beklenildi. Daha sonra bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamininin hem üst hem de alt bölgesine hücreler yayıldı. Mikroskobun objektifi 10x'e alındı ve sayım yapıldı. Toplam canlı hücre sayısı, (3.1) formülü ile hesaplandı.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı} = \frac{\text{thoma lamininin üst ve alt karelerinde sayılan canlı hücre sayısı ortalaması}}{2} \times (\text{dilüsyün faktörü}) \times 10^4 \times \text{toplam hacim} \quad (3.1)$$

3.2.4.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler daha sonra kullanılmak amacıyla dondurularak stoklanmaktadır. Dondurma işlemine kriyopreservasyon adı verilmektedir. Hücreler yavaş yavaş soğutulduğunda dehidre olduklarından canlılıkları düşmektedir. Bu nedenle hücreler ani bir şekilde dondurulmalıdır. Ancak ani soğutulma esnasında oluşan kristalizasyon problemi hücrelerin mekanik olarak parçalanmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle kriyopreservasyon için kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. DMSO en yaygın olarak kullanılan kriyoprotektandır (Kaiser vd., 2021).

L929 hücre hattının dondurulması için %90 FBS ve %10 DMSO kullanılırken, MKH için ise %90 tamamlanmış besiyeri ve %10 DMSO kullanıldı. Hücreler kademeli bir şekilde donduruldu. -20°C’de yaklaşık 30 dk muhafaza edilen ve donan hücreler, -80°C’ye kaldırılarak muhafaza edildi.

3.2.5 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Sitotoksitesisi

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksitesisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) analizi ile tespit edildi. MTT boyası canlı hücrelerde aktif olarak absorbe olmaktadır. Mitokondrial dehidrogenaz sarı renkteki MTT boyasını suda çözünmeyen mor formazan kristallerine dönüştürmektedir. Formazan oluşumu yalnızca canlı hücrelerde gözlemlenirken, ölü hücrelerde mitokondrial aktivite olmayacağı için mor formazan oluşmamaktadır (Abe & Matsuki, 2000). Nanopartiküllerin sitotoksitesisi canlılığı ile ilişkilidir. Bu nedenle, sitotoksitenin belirlenmesi için bu teknik tercih edildi.

Stok MTT 5 mg/ml konsantrasyonda PBS içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Stok solüsyonu vortekslenerek 0.22 µm’lik filtreden geçirildi ve -20°C’de muhafaza edildi. Analiz hem L929 hücre hattında hem de MKH’lerde gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu kültür plakasına 1×10^5 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. Plaka, 37°C %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübasyona bırakıldı. ODA-NP-2 tamamlanmış besiyeri içerisinde son konsantrasyonu sırasıyla 14 µg/ml, 28 µg/ml, 42 µg/ml, 56 µg/ml ve 70 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi. Dilüe edilen nanopartikül konsantrasyonları 6 tekrarlı olacak şekilde 24 saat inkübasyonun ardından kuyucuklara eklendi. Pozitif kontrol olarak 100 µl DMSO ve negatif kontrol olarak tamamlanmış besiyeri kuyucuklara 6 tekrarlı olacak şekilde eklendi. 96 kuyucuklu plaka 37°C %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, tamamlanmış besiyeri içerisinde 1:10 oranında dilüe edilen MTT stoğu (5 mg/ml) 100’er µl kuyucuklara eklendi. 4 saat 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyonun ardından MTT kuyucuklardan uzaklaştırılarak 100 µl DMSO eklendi ve mor formazan kristalleri DMSO ile çözdürüldü. 96 kuyucuklu kültür plaka ELISA okuyucuda 570 nm absorbans değerinde ölçüldü. Her bir konsantrasyon için negatif ve pozitif kontrol gruplarının OD’lerine göre normalize edilerek % canlılık değerleri (3.2) eşitliği ile hesaplandı.

$$\text{Normalize \% Canlılık} = \frac{OD_{\text{tekrar (n)}} - OD_{\text{pozitif kontrol ortalaması}}}{OD_{\text{pozitif kontrol ortalaması}} - OD_{\text{negatif kontrol ortalaması}}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.6 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikül-Plazmid Kompleksinin Stabilitesi

Oktadesilamin, 18 karbonlu bir primer alifatik amindir (Octadecylamine-PubChem). KLN'lerin sentezinde kullanılan amin grupları içeren lipidler, negatif yüklü nükleik asitlerle etkileşime girmektedir. Pozitif yüklü amin (N) gruplarının, negatif yüklü nükleik asit fosfat (P) gruplarına oranı (N/P), gen taşıyıcı araçların en önemli fizikokimyasal özelliklerinden biridir (Gary vd., 2013). Etkili bir gen transfeksiyonunun sağlanması için taşıyıcı-nükleik asit komplekslerinin optimum N/P oranının belirlenmesi önem taşımaktadır (Cárdenas vd., 2023; Dai vd., 2011). Plazmid DNA gibi nükleik asitler, katyonik gen aktarım aracına taşıyıcının N grupları ile DNA'nın P grupları arasındaki elektrostatik etkileşim yoluyla yüklenmektedir. N/P oranı, katyonik polimer taşıyıcının yükleme verimliliğini belirlemektedir. En etkili kompleksleşmenin gerçekleştiği noktanın (N/P oranının) belirlenmesi, bir jel gecikme deneyi ile elektrik alanına maruz bırakılarak açıklanmaktadır (Aydin vd., 2022).

ODA-NP-2 ve pBMP-2'nin kompleksleştirilmesiyle optimum N/P oranının tespit edilebilmesi için Aydin ve arkadaşlarının (2022) jel gecikme yöntemi kullanıldı. %1'lik agaroz hazırlanarak eritildi ve 50°C'ye düştüğünde içerisine DNA green viewer boyası (100 ml için 10 µl) eklendi. Ardından jel yavaşça jel küvetine döküldü ve donması için beklenildi. Bu esnada, nanopartiküller ve plazmid DNA etkileştirildi. Sırasıyla N/P oranı 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapılarak ODA-NP-2/pBMP-2 kompleksleri oluşturuldu. Sırasıyla verilen N/P oranları ODA-NP (µl):pBMP-2 (µg) şeklinde ifade edilirse sırasıyla şu şekildedir: 0.58:1, 1.46:1, 2.92:1, 5.85:1, 11.7:1, 17.54:1, 23.38:1, 29.23:1, 35.1:1, 40.92:1, 46.77:1 ve 52.62:1. Donan agaroz elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1X TAE tamponu ile dolduruldu. Yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilen nanopartikül-pDNA kompleksleri jel yükleme boyası ile etkileştirilerek sırasıyla kuyucuklara eklendi. 80V 90 dk ayarlanan elektroforez gücü çalıştırıldı. Yürütmenin ardından Invitrogen iBright jel görüntüleme cihazında

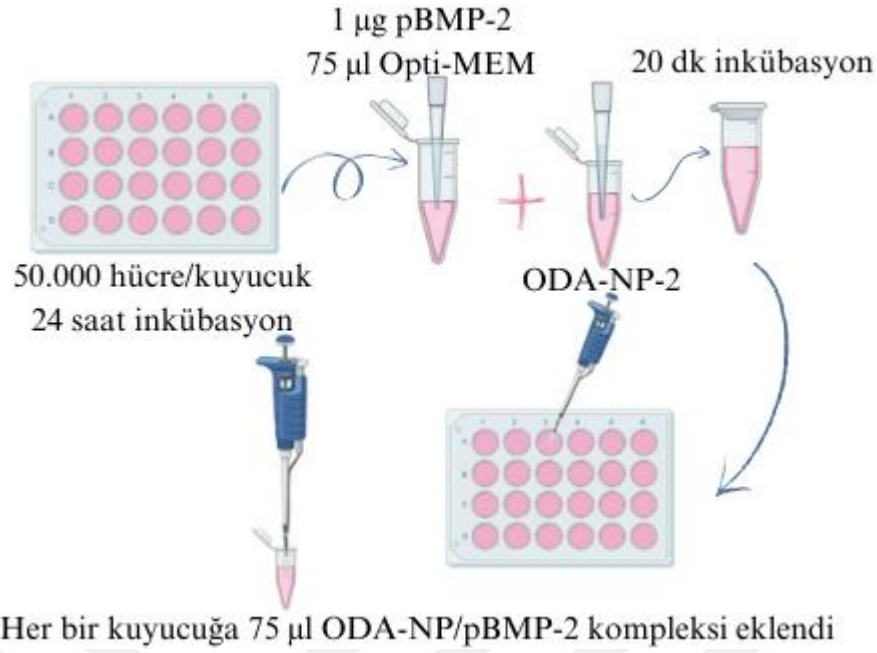
görüntüleme yapıldı. N/P 70 kompleksinin yükü ve boyutu ZetaSizer cihazında ölçüldü.

Kompleks stabilitesinin ölçütlerinden bir diğeri ise DNaz enzimine karşı nanopartikülün plazmid DNA'yı koruma kabiliyetidir. Serbest pBMP-2 ve ODA-NP-2/pBMP-2 kompleksleri 37°C'de 15 dk 1 unit DNaz I ile inkübe edildi. Reaksiyon 1 µl 50 mM EDTA solüsyonunun eklenmesi ile durduruldu ve 65°C'de 10 dk inkübe edildi. Ayrıca N/P 70 oranında hazırlanan kompleks stabiliteyi 37°C %5CO₂ koşullarında PBS ve DMEM/F12 + %10 FBS 24, 48 ve 72'şer saat inkübe edilerek değerlendirilmek üzere jele yüklendi. Daha sonra 80V 90 dk ayarlanan agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü.

Gen aktarım için DNA moleküllerinin hücre içerisine aktarılana kadar nükleazlardan korunabilmesi için nanopartiküllerle yeterli bir şekilde konjuge olmaları gerekmektedir (Butt vd., 2022). ODA-NP-2/pBMP-2 kompleksleri OPTI-MEM içerisinde N/P 70 olacak şekilde oluşturuldu. Sırasıyla 0 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk, 180 dk ve 240 dk 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi ve agaroz jel elektroforezinde (80V 90 dk) yürütüldü.

3.2.7 BMP-2 Plazmidinin Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülü Aracılığıyla Transfeksiyonu

Flaskta çoğalan MKH'ler (pasaj numarası 4) tripsinize edilerek kaldırıldı ve çöktürülerek hücreler antibiyotik içermeyen tamamlanmış besiyerinde resüspanse edildi. 24 kuyucuklu plakasına 8 kuyucuğunun her birine 50 bin hücre ekildi. MKH'ler 24 saat 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakıldı. Sekiz tane 0.2 ml'lik PCR tüpü çıkarıldı. Bunlardan biri, negatif kontroldür yani sadece 75 µl Opti-MEM içermektedir. İkincisi 1 µg plazmid DNA'nın taşıyıcısı olmadan 75 µl Opti-MEM içerisinde dilüe edildi. Diğer 6 tüp için 1'er µg pBMP-2 75 µl Opti-MEM içerisinde dilüe edildi. Tüplere sırasıyla 2 µl Turbofect™, 10 µl (7 µg), 20 µl (14 µg), 30 µl (21 µg), 40 µl (28 µg) ve 50 µl (35 µg) ODA-NP-2 eklendi ve iyice karıştırılıp 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından, her bir tüpteki 75 µl solüsyon damla damla 24 kuyucuklu plakada çoğaltılan MKH'lere verildi. 4 saat 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakıldı. 4 saatin ardından besiyeri çekildi ve tamamlanmış besiyeriyle değiştirildi. 24, 48 ve 72 saat boyunca floresan atmaçlı invert mikroskopta ve faz kontrast objektifinde incelendi.



Şekil 3.4 BMP-2 plazmidinin oktadesilamin bazlı KLN ile transfeksiyonu

3.2.7.1 Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Yeşil floresan proteini (GFP) geni, genellikle hücre ve moleküler biyolojide bir raportör gen olarak kullanılmaktadır. Bu genin ekspresyonu sonucunda üretilen protein, floresan ışık altında yeşil bir ışığa yaymaktadır. pCMV3-BMP2-GFP plazmid C-terminal ucunda yeşil floresan proteini füzyonu barındırmaktadır. Böylelikle transfekte edilen kemik morfogenetik protein-2 geni içeren plazmidin ekspresyonu GFP sinyali ile izlenilebilmektedir. pCMV3-BMP2-GFP plazmidinin yeşil floresan proteini ekspresyonu floresan atmaçlı invert mikroskop ile 24, 48 ve 72 saat takip edildi. Transfeksiyon verimi; plazmidi alan ve GFP eksprese eden hücrelerin transfekte olmamış hücrelere oranı ile hesaplandı. 24, 48 ve 72 saat boyunca fotoğraflanan hücrelerden, 40 µl ODA-NP-2 ve 1 µg pBMP-2 etkileştirilerek transfekte edilen hücrelerin 48. saatteki görüntüsünden 3 bölge seçilerek transfekte olan ve olmayan hücreler sayıldı. Daha sonrasında bu değerlerin ortalaması alınarak transfeksiyon verimliliği hesaplandı. Transfeksiyon etkinliği (3.3) formülü kullanılarak belirlendi.

$$\text{Transfeksiyon Verimliliği (\%)} = \frac{\text{Transfekte olan hücrelerin sayısı}}{\text{Transfekte olan ve olmayan hücrelerin sayısı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.8 Gerçek Zamanlı PCR ile Transfeksiyonun mRNA Düzeyinde Değerlendirilmesi

Ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), retrovirüslerden elde edilmiş ters transkriptaz enzimi aracılığıyla herhangi bir kaynaktan izole edilmiş RNA moleküllerini komplementer DNA'ya (cDNA) çeviren ve sentezini gerçekleştiren bir yöntemdir. Bu sayede, gen ekspresyon analizleri hızlı ve hassas bir şekilde yapılabilir. Hücre içerisinde çok az miktarlarda sentezlenen mesajcı RNA'lar bu yöntemle saptanıp gen ifadesi miktarları tespit edilebilmektedir. Floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı bir çoğaltma yöntemi olan kantitatif PCR, DNA'nın artışıyla doğru orantılı olarak oluşan floresansı görünür hale getirebilen ve izleyebilen bir tekniktir. "SYBR Green I" tekniği, spesifik olmayan çift zincirli DNA çoğaltımında kullanılır. Bu yöntemde kullanılan SYBR Green I floresan boyası, sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığı için çoğalan DNA miktarındaki artışla paralel olarak "gerçek zamanlı" PCR cihazında ölçülen floresan miktarı da aynı anda artmaktadır (Adams, 2020).

24 kuyucuklu kültür plakasına pasaj 4'teki MKH'ler kuyucuk başına 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 37°C %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra 40 µl ODA-NP-2 ve 1 µg pBMP-2 etkileştirilerek hücreler transfekte edildi. Transfekte edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Genellikle gen ekspresyon seviyesi en yüksek 18-24 saatler arasında olmaktadır. Bu nedenle, hücreler 37°C %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildikten sonra RNA izolasyonu işlemine geçildi. RNA izolasyonu Nepenthe firmasının kiti ile gerçekleştirildi. 24 kuyucuklu kültür plakasındaki hücreler tripsinle muamele edilerek kaldırıldı ve 15 ml'lik falkona alınarak 400 rcf'te santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve çökelti 750 µl RL solüsyonu (trizol reaktifi içeren) eklenerek resüspanse edildi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek 15 s alt üst edilerek karıştırıldı ve 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Mikrosantrifüj tüpü +4°C, 13000 rpm ve 12 dk santrifüj edildi. Solüsyon 3 faz şeklinde ayrılmış olarak gözlemlendi ve üst fazdan 400 µl alınıp yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 400 µl %70'lik etanol eklendi ve karıştırıldı. Karışım spin kolonuna aktarıldı. 13000 rpm, +4°C, 1 dk santrifüj edilen spin kolonunun toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı. Spin kolona 700 µl PW yıkama solüsyonu eklendi ve

tekrar santrifüjlendi. İkinci bir yıkama olarak 500 µl PW kullanıldı. Spin kolonu yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 50 µl DEPC'li su eklenerek 3 dk 57°C inkübe edildi ve aynı santrifüj ayarlarında çöktürüldü. Elüe edilen RNA'lar -80°C'de muhafaza edildi.

Transfekte edilmiş MKH'lerden elde edilen RNA ile transfekte olmamış MKH'lerden izole edilen RNA'lar cDNA sentez kiti ile komplementer DNA'larına çevrildi. 100 ng RNA örneği, 10 µl tampon karışımı, 2 µl enzim karışımı ve kalan hacmi 20 µl'ye tamamlayan miktarda DEPC'li su 0.2 ml'lik PCR tüpüne aktarıldı. Hızlıca vortekslene karışıma spin atıldı. Termal döngü cihazına yerleştirilen örnekler 10 dk 25°C, 60 dk 47°C ve 5 dk 85°C'de inkübe edildi. Reaksiyon sonucunda oluşan cDNA'lar Nanodropta ölçüldü. cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

Gerçek zamanlı kantitatif PCR, SYBR Green PCR kiti ile gerçekleştirildi. GAPDH housekeeping gen olduğu ve konstitüf olarak hücrelerde ifade edilmektedir. Sıklıkla endojen kontrol olarak GAPDH kullanılmaktadır. Kalıp DNA içermeyen grup, gerçek zamanlı PCR negatif kontrol grubu olarak kullanılmaktadır. Bu, primer-dimer oluşumu nedeniyle üretilecek yanlış pozitif sonuçların kontaminasyonunu belirlemek için kullanılmaktadır. Sunulan bu tezde, 10 ng/µl cDNA kullanıldı. Reaksiyon opak beyaz 0.2 PCR tüplerinde gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılan primerler tablo 3.2'de belirtilmiştir. Reaksiyon içeriği; 10 µl 2x master mix, 0.4 µl 50x Rox boyası, 1 µl ileri primer, 1 µl geri primer, 1 µl kalıp cDNA ve 6.6 µl DEPC'li sudur. Reaksiyon; 10 dk 94°C, 40 döngü (15 s 95°C, 30 s 61°C, 45 s 72°C) ve 5 dk 72°C olacak şekilde ayarlandı. Referans gen GAPDH alınarak göreceli mRNA seviyesi $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandı.

Tablo 3.2 Kullanılan ileri ve geri primer dizileri

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Referans
BMP-2 İleri	GCGTGAAAAGAGAGACTGCG	(Ingwersen vd., 2022)
BMP-2 Geri	ACCATGGTCGACCTTTAGGAG	(Ingwersen vd., 2022)
GAPDH İleri	TCCCTGAGCTGAACGGGAAG	(Fatimah vd., 2013)
GAPDH Geri	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT	(Fatimah vd., 2013)

3.2.9 ELISA ile Transfeksiyonun Protein Düzeyinde Değerlendirilmesi

Transfekte olmuş MKH'lerde ve transfekte olmayan MKH'lerdeki BMP-2 proteininin miktarı sandviç ELISA tekniği ile belirlendi. Analiz için Elabscience firmasının kiti kullanıldı. Kit içerisindeki referans örnek 4000 pg/ml olarak hazırlandı ve bir seri halinde dilüe edildi. Her bir kuyucuğa 100 µl örnek yüklenerek ELISA okuyucuda 450 nm'de okuma yapıldı ve standart eğri grafiği oluşturuldu.

24 kuyucuklu kültür plakasına pasaj 4'teki MKH'ler kuyucuk başına 50.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 37°C %5 CO₂ koşullarında 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra 40 µl ODA-NP-2 ve 1 µg pBMP-2 etkileştirilerek hücreler transfekte edildi. Transfekte edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. GFP sinyalinin 48. saatte maksimum olduğu transfeksiyon etkinliğinin değerlendirilmesi çalışmalarında saptandı. Bu nedenle, 48 saat 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi ve 48 saat sonunda BMP-2 proteini saptanmak üzere ELISA yöntemi kullanıldı. Buz soğukluğundaki PBS ile hücreler yıkandı, ardından tripsinize edilerek kaldırıldı ve 5 dk 1000 rcf'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Mikrosantrifüj tüpündeki hücreler en az 3 tekrar olmak üzere buz soğukluğundaki 250 µl PBS ile yıkandı. Dondur-çöz işlemi ile hücreler iyice parçalandı. 4°C 1500 ×g 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kitle gelen 96 kuyucuklu test haznesinden çalışma kadarı için olan kuyucuklara 100 µl örneklerden yüklendi. 90 dk 37°C'de inkübe edildi. Her bir kuyucuktaki solüsyon çekildi ve 100 µl biyotinli deteksiyon antikoru eklendi. 60 dk 37°C'de inkübe edildi. Solüsyon çekildi ve 3 kere 350 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı. Ardından 100 µl HRP konjugatı eklendi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Solüsyon çekilerek 5 kere 350 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı. 90 µl substrat reaktifi eklendi ve karanlıkta 15 dk 37°C'de inkübe edildi. İşlem sonucunda mavi renk gözlemlendi (Enzim-substrat nedeniyle oluşmuştur). Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek önceden ısıtılmış ELISA okuyucuda 450 nm'de okuma yapıldı. Standart eğri grafiği üzerinden BMP-2 protein miktarı hesaplandı.

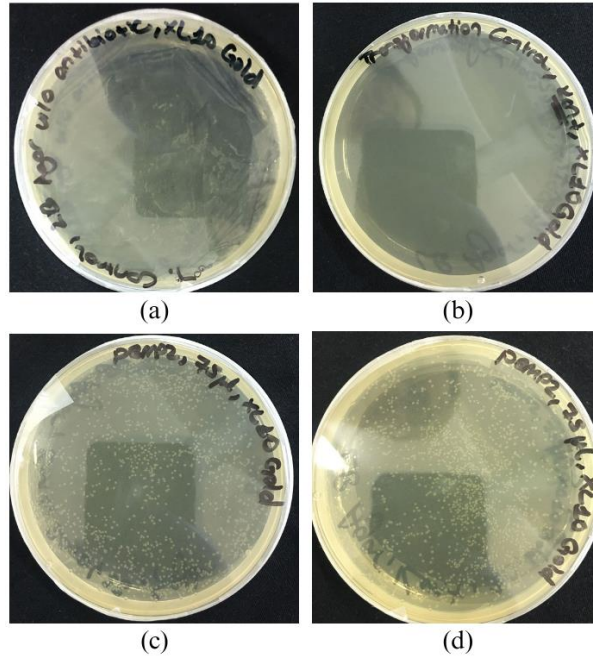
3.2.10 Senesens-ilişkili Beta Galaktosidaz Boyaması ile Senesensin Belirlenmesi

Debacq-Chainiaux ve arkadaşlarının (2009) önerdiği β -gal boyaması gerçekleştirilerek deney çalışmaları suresince MKH'lerin herhangi bir sebepten senesense girip girmedikleri belirlendi. onerilen protokole uygun bir şekilde boyama solüsyonu taze bir şekilde hazırlandı. 40 mM sitrik asit/sodyum fosfat tamponu (pH 6), 5 mM potasyum ferrosiyanür, 5 mM potasyum ferrisiyanür, 150 mM sodyum klorür, 2 mM magnezyum klorür ve 1 mg/ml X-gal ile β -gal boyama solüsyonu olarak hazırlandı. β -gal boyaması transfeksiyon için pasaj 5'teki ekilen hücrelere ve 72 saatin sonunda transfeksiyon deneyinde kullanılan tüm gruplar için uygulandı. Prosedür, 24 kuyucuktaki hücrelerin 500 μ l PBS ile iki kere yıkanması ile başladı. Ardından hücreler 500 μ l paraformaldehit ile fikse edildi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her bir kuyucuk iki kere 500 μ l PBS ile 30 s bekletilerek yıkandı. Yıkama işleminden sonra, her bir kuyucuğa 500 μ l β -gal boyama solüsyonu eklendi ve karbondioksitsiz 37°C'de bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında, her bir kuyucuk önce 500 μ l PBS sonrasında 250 μ l metanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Aydınlık alan mikroskopunda fotoğraflama yapıldı. Alüminyum folyoya sarılarak 24 kuyucuklu plaka oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4.1 BMP-2 Kodlayan Ekspresyon Plazmidinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

4.1.1 BMP-2 Kodlayan Plazmidin *E. coli* XL10-Gold'a Transformasyonu

BMP-2 kodlayan ekspresyon plazmidinin (pBMP-2) çoğaltılması transformasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Şekil 4.1 (a)'da görüldüğü gibi kanamisin antibiyotiği içermeyen LB Agar'da *E. coli* XL10-Gold sağlıklı bir şekilde büyüyerek tüm yüzeyi kaplamışlardır. Bu durum, bakterilerin büyümesi ve çoğalmasında herhangi bir sorun olmadığını göstermektedir. Ek olarak, transformasyon deneyinin kontrolü açısından önemlidir. Diğer bir kontrol grubu ise pBMP-2 ile transforme edilmemiş bakterilerin, transformasyon prosedüründeki birebir aynı adımların izlenmesi ile oluşan negatif kontrol grubudur. Negatif kontrol grubunda bakteriler kanamisin antibiyotiğine karşı direnç geni içermediği için seçici besiyerinde koloni oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.1 (b)). LB Agar petrilere ekilen pBMP-2 ile transforme olmuş bakteriler kanamisin seçici besiyerinde koloni oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.1 (c), (d)).



Şekil 4.1 LB Agar petrilere pBMP-2 transformasyonunun değerlendirilmesi

Transformasyon verimliliği, 1 µg plazmidin belirli bir hacmindeki kompotent hücreye transforme edilmesi sonucu oluşan koloni oluşturma birimleri (cfu) olarak tanımlanmaktadır (Green & Goldman, 2021). Şekil 4.1 (c)'de 1242 koloni, Şekil 4.1 (d)'de ise 1312 koloni sayıldı. Ortalaması 1277 koloni, yani transformantların sayısı 1277'dir. Transformasyonda 100 ng pBMP-2 kullanıldı. Son hacim 1000 µl iken LB Agar petrilere ekilen hacim 75 µl'dir. Transformasyon etkinliğinin 1.7×10^5 cfu/µg olduğu (4.1) eşitliği kullanılarak hesaplandı.

$$\begin{aligned} \text{Transformasyon etkinliği} &= \\ \frac{\text{transformantların sayısı}}{\mu\text{g DNA}} \times \frac{\text{son hacim (ml)}}{\text{petriye ekilen hacim (ml)}} & \quad (4.1) \\ &= \mu\text{g başına düşen transformant sayısı (cfu/}\mu\text{g)} \end{aligned}$$

Bir araştırma grubu tarafından, CaCl₂ kompotent *E. coli* DH5α suşuna pUC18 DNA transforme edildiğinde transformasyon etkinliğinin $0.98\text{-}2.6 \times 10^5$ cfu/µg olduğu raporlanmıştır (Woegerbauer vd., 2002). Başka bir çalışma grubu *E. coli* BL21 suşunda yaptığı transformasyon deneyleri sonucunda transformasyon verimliliğinin 4×10^5 cfu/µg'dan fazla olduğunu bildirmiştir (Rahimzadeh vd., 2016). Motohashi yaptığı çalışmada (Motohashi, 2019), *E. coli* DH5α ve *E. coli* XL10-Gold suşlarının transformasyon etkinliğinin $\sim 1 \times 10^7$ cfu/µg olduğunu raporlamıştır.

4.1.2 BMP-2 Kodlayan Plazmidlerin Saflaştırılması

Analitik tekniklerde DNA örneklerini kullanmadan önce, DNA'nın saflığı, miktarı ve bütünlüğü gibi DNA kalite göstergeleri aracılığıyla DNA'nın kullanılabilirliği belirlenmelidir. DNA'nın saflığı, DNA numunesindeki protein, RNA ve fenol gibi kontaminantlarının derecesidir. DNA'nın saflığı ve miktarı Nanodrop cihazında ölçülebilmektedir. 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı, DNA saflığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Absorbans oranı, 1.8-2.0 aralığında DNA'nın saf olduğu kabul edilmektedir. 260 ve 230 nm'deki absorbans oranı, ikincil bir saflık değerlendirmesi için kullanılır. Saf DNA için A_{260/230} oranı, 2.0-2.22 aralığında olmalıdır. DNA bütünlüğü ise agaroz jel elektroforezi ile belirlenmektedir (Lucena-Aguilar vd., 2016).

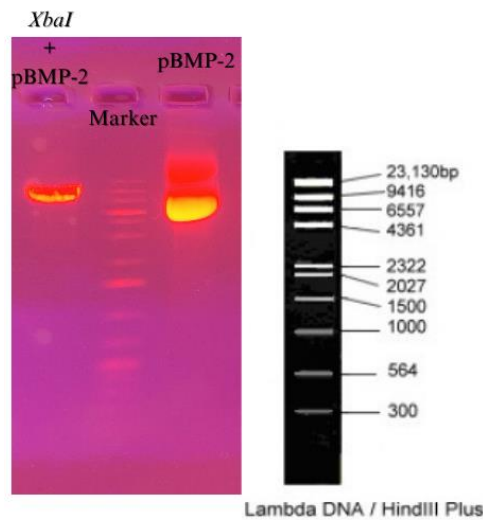
DNA saflığı, PEI ve TurboFect gibi katyonik polimerlerle yapılan transfeksiyon yöntemleri için oldukça elzem bir parametredir (Kachkin vd., 2020). Diğer bir ifadeyle, DNA'nın saflığı doğrudan transfeksiyon etkinliği ile ilişkilidir (Oliynyk

& Church, 2022). Tablo 4.1’de BMP-2 kodlayan plazmid DNA’nın miktarı ve absorbans oranlarının değerleri verilmiştir. pBMP-2’nin saflığı değerlendirildiğinde $A_{260/280}$ oranının literatürde kabul edilen aralıkta olduğu raporlandı. Ek olarak plazmid DNA’nın $A_{260/280}$ değerinin 2.0-2.22 aralığında olduğu saptandı.

Tablo 4.1 pBMP-2 izolasyon değeri

	Konsantrasyon ng/μl	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
pBMP-2	441.7	1.88	2.16

Şekil 4.2’de DNA’nın bütünlüğünü gösteren jel görüntüsü bulunmaktadır. pBMP-2’nin boyutu 7868 baz çiftidir. Agaroz jel elektroforezi her ne kadar boyut bazlı bir ayrımın göstergesi olsa da DNA’nın şekli elektroforetik mobilizasyonu etkilemektedir. Kuyucuk 1’de pBMP-2 *XbaI* ile kesilerek linearize edildi. Boyut bazında DNA markerı ile kıyaslandığında 7868 baz çiftlik pBMP-2’nin baştan üçüncü ve ikinci bant arasında, yani 6557-9416 baz çifti arasında bant verdiği gözlemlendi. Şekil olarak değerlendirildiğinde de lineer DNA molekülü olduğu (Bjornsti & Megonigal, 1999) literatür ile kıyaslandığında doğrulandı. Kuyucuk 3’te pBMP-2 herhangi bir enzimle kesilmediği için elektroforez de bulutumsu (‘smear’) bir bant bıraktığı gözlemlendi. Ayrıca bandın üst kısmında az miktarda açık halkalı plazmid DNA şekli (Limanskaya & Limanskii, 2008) bulunurken, alt kısmında yoğun bir şekilde supercoil plazmid (Bjornsti & Megonigal, 1999; Limanskaya & Limanskii, 2008) yapısı tespit edildi.



Şekil 4.2 Agaroz jel elektroforezinde pBMP-2’nin yürüme görüntüsü

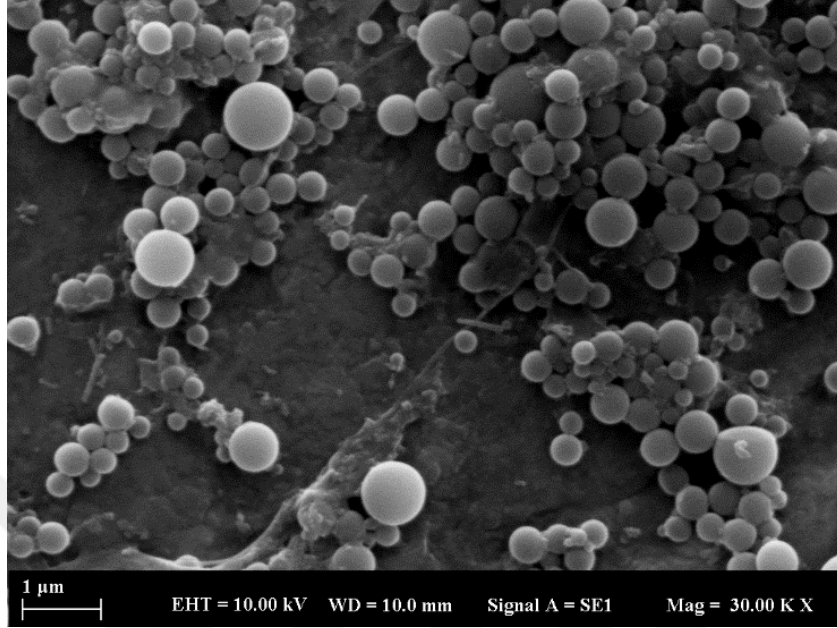
E. coli plazmid DNA'yı sentezlerken çoğunlukla supercoil yapıda ekstrakte etmektedir. Ancak ekstraksiyon, izolasyon ve pürifikasyon aşamalarının kompleksliği nedeniyle plazmid DNA yapısal strese maruz kalarak farklı ve/veya hatalı formlara bürünmektedir (Sousa vd., 2009). *In vitro* plazmid DNA transfeksiyon çalışmalarında, kompakt yapıdaki supercoil plazmid DNA formunun lineer formdaki plazmid DNA'ya göre transfeksiyon etkinliğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Maucksch vd., 2013). Sousa ve arkadaşları (Sousa vd., 2009), supercoil formdaki plazmid DNA'yı pürifiye ederek transfeksiyon etkinliğini arttırmıştır. Benzer bir çalışmada, sirküler DNA formunun transfeksiyon etkinliğinin linear forma göre daha yüksek olduğunu ortaya koyan araştırmacılar, sirküler yapıda DNA üretmek ve pürifiye etmek için yöntemler geliştirmişlerdir (Oliynyk & Church, 2022).

4.2 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Karakterizasyonu

4.2.1 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Boyutunun ve Şeklinin Belirlenmesi

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülün yüzey morfoloji, boyut, dağılım, şekil ve yerleşim özelliklerinin belirlenmesi için SEM (Zeiss, EVO® LS 10) kullanıldı. Taramalı elektron mikroskopunda 30000x büyütmede alınan görüntü Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Nanopartiküller, küresel şekilde ve 200-450 nm arasında boyut dağılımına sahiptir. Çift emülsiyon (s/y/s) çözücü uçurma yöntemi ile sentezlenen penisillamin yüklü PLGA nanopartikülü ile yapılan bir çalışmada (Mohamed, 2013), SEM görüntüsü sunulan bu tezdeki SEM görüntüsü ile benzerlik taşımaktadır. Ancak belirtilen çalışma ile kıyaslandığında, Şekil X'teki SEM görüntüsü daha az agregasyon göstermektedir ve küresel biçim daha keskindir. Kemik rejenerasyonu için BMP-2 proteini yüklü PLGA nanopartiküllerini içeren bir çalışmadaki SEM analizinden yola çıkılarak partiküllerin küresel şekli, düşük polidispersitesi ve nanoskaladaki boyutu ile hücrelere aktarım için uygun fizyolojik dağılım gösterdiği raporlanmıştır (Ortega-Oller vd., 2015). İlgili çalışma ile sunulan tezdeki SEM görseli örtüşmektedir. Ampisillin yüklü KLN ile yapılan çalışmada (Alihosseini vd., 2015) 62-214 nm arasında boyut dağılımı gösteren Şekil 4.3'teki görüntü ile paralellik taşıyan nanopartiküller elde edildiği görülmektedir. Sunulan

bu tezdeki gibi sürfektan olarak PVA'nın kullanıldığı KLN'lerin sentezlendiği diğer bir çalışmadaki (Gathirwa vd., 2014) SEM görüntüsü Şekil 4.3 ile benzerlik taşımaktadır.



Şekil 4.3 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin SEM görüntüsü

4.2.2 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Ortalama Büyüklüğü, Yükü ve Boyut Dağılımının Belirlenmesi

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikül dispersiyonlarının ortalama parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli ve Polidispersite İndeksi (PDI) ZetaSizer Nano ZS cihazında dinamik ışık saçılımı yöntemini kullanılarak karakterize edildi. Tablo 4.2’de sürfektan oranlarının değiştirildiği ODA-NP’lerin boyutu, yükü ve boyut dağılımına ait bilgiler verilmiştir. Diğerlerine kıyasla boyut dağılımı daha dar, konsantrasyonu yüksek ve daha küçük nanopartiküller içeren ODA-NP-2 fraksiyonu *in vitro* deneylerde kullanılmak üzere belirlenmiştir. Elektrostatik itme, agregasyonu önleme ve sedimentasyonun azaltılması gibi fiziksel stabilitenin sağlanması için zeta potansiyeli oldukça önemlidir. Elektrostatik kuvvetler birbirlerini ittiğinde partiküllerin agregasyonunu veya flokülasyonunu önlemektedir. Yüksek zeta potansiyeli partiküllerin birbirine yaklaşmasını engellemek için yeterince güçlü hale gelerek agregasyon riskini en aza indirmektedir. Ek olarak, yüksek zeta potansiyeline sahip partiküller ve aralarındaki itme kuvveti, onları aşağı çekmeye çalışan yerçekimi kuvvetlerine

karşı koyduğu için daha az sedimentasyon yaşanmaktadır (Jose Chirayil vd., 2017). Tüm bu parametreler fiziksel stabilitenin sağlanması açısından önemlidir. Bu nedenle, katı lipid nanopartikül dispersiyonlarını stabilize etme bağlamında, ± 30 mV veya daha yüksek zeta potansiyeli genellikle yeterli olarak kabul edilmektedir (Kovačević vd., 2014; Scioli Montoto vd., 2020). ODA-NP-2 bu açıdan en uygun zeta potansiyeline sahip olduğu değerlendirilebilir.

Tablo 4.2 Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyon değerleri

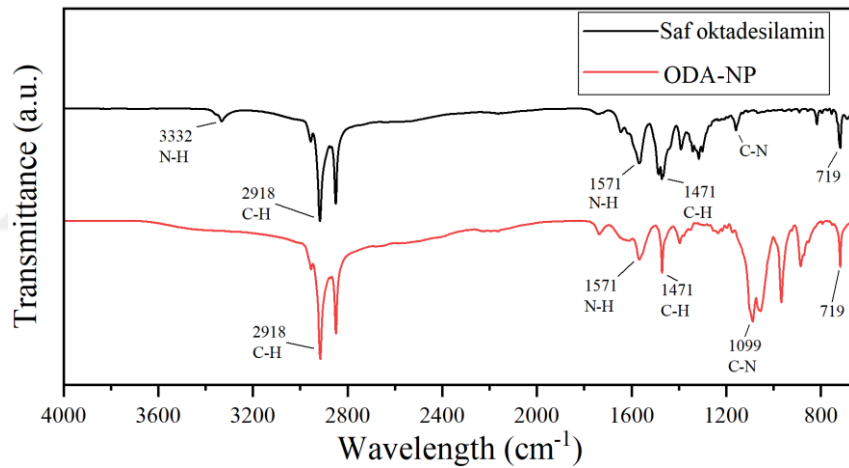
Nanopartikül Künyesi	Nanopartikül Boyutu (d.nm)	Nanopartikül Yükü (mV)	Nanopartikülün Polidispersite İndeksi (PdI)
ODA-NP-1	644 $\pm$ 240.8	16.9 $\pm$ 8.05	0.237
ODA-NP-2	484.6 $\pm$ 211.8	31.8 $\pm$ 5.40	0.153
ODA-NP-3	465 $\pm$ 160.3	23.5 $\pm$ 6.57	0.354
ODA-NP-4	750 $\pm$ 448.4	23.8 $\pm$ 4.33	0.589
ODA-NP-5	687.6 $\pm$ 512.9	20.9 $\pm$ 5.73	0.679

Dağılımın kalitesini yansıtan PdI değeri genellikle 0 ila 1 arasında değişir. PdI değerleri ≤ 0.1 , dağılımın en yüksek kalitesini gösterir. Çoğu araştırmacı, PdI değerlerini ≤ 0.3 'ü optimum değerler olarak kabul eder; ancak, ≤ 0.5 değerleri de kabul edilebilir olarak görülmektedir (R. Shah vd., 2014). PdI nanopartikülün kalitesinin bir ölçütü iken *in vitro* gen aktarım vektörü olarak kullanıldığında transfeksiyon için optimum PdI değerinin belirlenmesi oldukça çelişkilidir (Wong & Putnam, 2018). Buna karşın, dar boyut dağılımına sahip kitosan nanopartiküllerinin transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğunu gösteren çalışma da mevcuttur (Duceppe & Tabrizian, 2009). Buradan hareketle, en düşük PdI değerine sahip olan ODA-NP-2 nanopartikülü ile kalan deneyler yürütüldü.

Literatürdeki bir çalışma, *in vitro* gen aktarım araçlarının boyutlarının transfeksiyon verimliliği açısından önemini ortaya koymuştur (Pezzoli vd., 2017). İlgili çalışmada boyut büyüklüğü arttıkça sedimentasyon probleminin doğduğu ve buna bağlı olarak fizikokimyasal stabilitenin azaldığı bildirilmiştir. Buradan hareketle, genetik materyal ile kompleks oluşturduğunda daha küçük partiküller oluşturacağı düşünülen ODA-NP-2 ile *in vitro* deneyler gerçekleştirildi.

4.2.3 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Kimyasal Bağlarının Belirlenmesi

Oktadesilamin bazlı KLN'lerin yapısında barındırdığı fonksiyonel gruplar ve kimyasal bağlar FTIR spektrum analizi ile değerlendirildi. Şekil 4.4'te saf oktadesilamin ve ODA-NP-2'nin neredeyse aynı pikleri barındıran FTIR spektrumu 4000-650 cm^{-1} dalga boyu skalasında gösterilmektedir. Saf oktadesilamine (ODA) ait FTIR spektrumu literatürdeki; oktadesilamin ile fonksiyonelleştirilmiş grafen nano levhalar ile kaplanmış hidrofobik kumaşın yüzey modifikasyonu (Achagri vd., 2020), elastikiyet kazandırmak üzere molibden disülfid nano levhalarına birlikte montajlanmış altın ve demiroksit nanopartikülleri (Pan vd., 2015) ve kendi içinde dağılmış nano-jel partikülleri içeren foto-polimer ağlarda amin fonksiyonu grafen levhaların kullanımı (Habibpour vd., 2018) ile ilgili çalışmalarda oktadesilamin FTIR spektrumu ile benzerlik taşımaktadır.



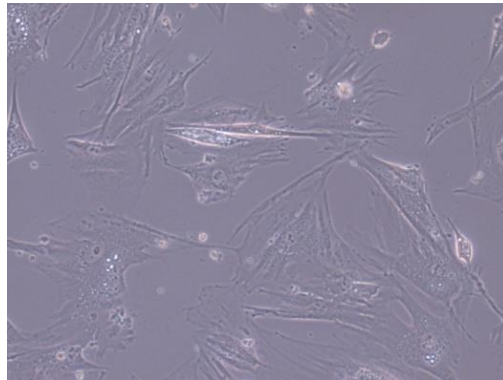
Şekil 4.4 Saf oktadesilamine ve oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülüne ait FTIR spektrumu

Oktadesilamin bir primer alifatik amindir (*Octadecylamine-PubChem*), bu nedenle bazı karakteristik piklere sahiptir. Şekil 4.4'te 2918 ve 2848 cm^{-1} (yan yana iki pik) absorban pikleri, C-H bağının simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri (Hou vd., 2018; Yao vd., 2013) ve 719 cm^{-1} alifatik hidrokarbonlara özgü sarsıntılı titreşim (Yao vd., 2013) görülmektedir. Alifatik aminlere özgü N-H bağının oluşturduğu burulma titreşimi (Lin vd., 2019; Pedrosa vd., 2020; Yao vd., 2013) 1571 cm^{-1} 'de karakterizedir. C-H ve C-N bağlarının karakteristik burulma titreşimine (Lin vd., 2019; Yao vd., 2013) ait pik IR spektrumunda sırasıyla 1471 cm^{-1} ve 1099 cm^{-1} 'dedir. Hidrojen bağları nedeniyle oluşmuş olabileceği düşünülen (P. Chen vd., 2020; X.

Yu vd., 2013) N-H gerilim titreşimine ait geniş emilim bandı (Hou vd., 2018; Lin vd., 2019; X. Yu vd., 2013) 3332 cm^{-1} 'de gözlemlenmektedir. N-H gerilim titreşimi haricindeki tüm pikler ODA-NP ile neredeyse örtüşmektedir. Dondurup kurutma yöntemlerinin (liyofilizasyon) dehidrasyona neden olduğu bilinmektedir (Stegner vd., 2022). ODA-NP dondurulup kurutulduktan sonra FTIR analizi gerçekleştirilmiştir ve dehidrasyon problemi nedeniyle hidrojen bağlarının kaybolmasıyla ODA-NP'de $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ 'de titreşim pikinin gözlemlenmediği düşünülmektedir. Benzer bir bulgu, PVA ile yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur. Bir kriyoprotektan olan dekstran miktarı arttıkça PVA'nın FTIR spektrumunda $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ aralığında sinyal yoğunluğunun arttığı belirlenirken dekstran yokluğunda dondurup kurutulmuş PVA'nın bu dalga boylarında titreşim göstermemesinin nedeni araştırmacılar tarafından PVA'nın olası dehidrasyonu şeklinde yorumlanmıştır (E. Fathi vd., 2011).

4.3 Hücre Çalışmaları

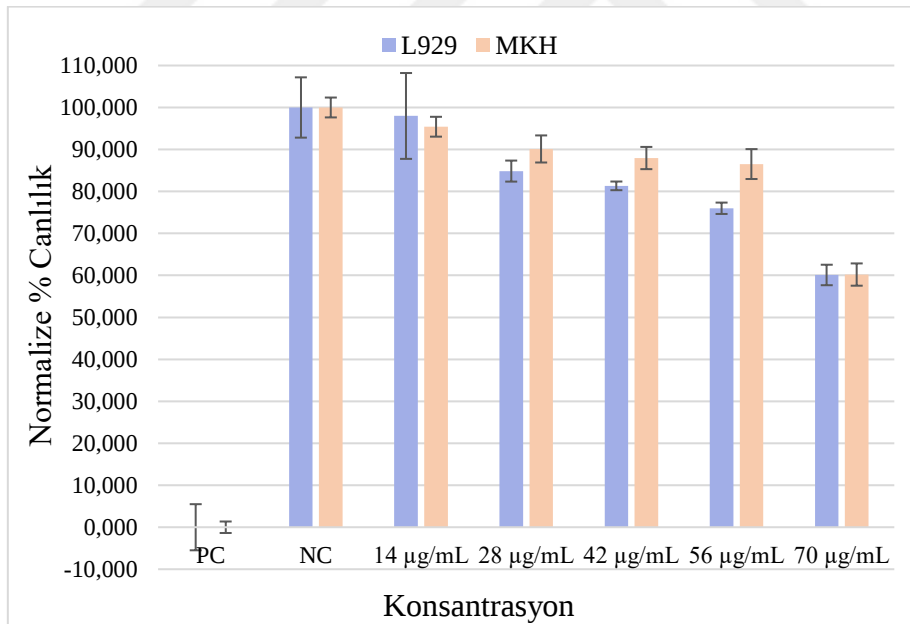
Sunulan bu tezde, oktadesilamin bazlı KLN'lerin *in vitro* transfeksiyon deneylerinde adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ATCC PCS-500-011) kullanıldı. MKH'lerin tamamlanmış besiyeri MSC XF Media, %1 penisilin-streptomisin ve MSC XF Supplement içermektedir. Ayrıca, tamamlanmış besiyerinde FBS bulunmadığından hücrelerin tutunmasını desteklemek amacıyla hücre kültürü kapları %0.2'lik jelatin solüsyonu ile kaplandı. 24 kuyucuklu plakalara ekilen 20.000 hücrenin 24 saat sonraki görüntüsü 20x objektifte faz kontrast mikroskobu ile kaydedildi. Şekil 4.5'te tutunan ve proliferasyon gösteren MKH'lere ait görsel bulunmaktadır.



Şekil 4.5 Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler

4.4 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülün Sitotoksitesi

Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksitesi MTT analizi ile L929 ve MKH hücrelerinde tespit edildi. ODA-NP-2 tamamlanmış besiyeri içerisinde son konsantrasyonu sırasıyla 14 µg/ml, 28 µg/ml, 42 µg/ml, 56 µg/ml ve 70 µg/ml olacak şekilde dilüe edilerek hücrelere verildi. Her bir konsantrasyon için negatif ve pozitif kontrol gruplarına göre normalize edilerek yüzde canlılık değerleri hesaplandı. Şekil 4.6'da L929 hücre hattında ve MKH hücrelerinde her bir konsantrasyon için normalize % canlılık grafik halinde gösterilmiştir. Her iki hücre tipinde de ODA-NP-2 14 µg/ml konsantrasyonunda canlılığı %90'nın üzerindedir. ODA-NP-2 28 µg/ml ve 42 µg/ml konsantrasyonunda her iki hücrede de canlılığı %80'in üzerinde olduğu görülmektedir. 56 µg/ml konsantrasyonunda nanopartikül uygulanan L929 ve MKH hücrelerinde %70'in üzerinde canlılık saptanmıştır. Grafiğe bakıldığında, 70 µg/ml konsantrasyonunda ODA-NP-2 ile muamele edilen her iki hücre tipinde de canlılık yaklaşık %60 seviyelerinde görülmektedir.



Şekil 4.6 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikülün L929 ve MKH hücrelerindeki toksisitesi

Kotmakçı ve çalışma grubunun sunduğu bir araştırmada (2017), iki farklı metotla sentezlediği Precirol ATO5 ve Compritol 888ATO bazlı KLN'lerin L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini incelediklerinde her iki tip KLN için de 50 µg/ml konsantrasyonundaki canlılığı yaklaşık %80 civarındadır. Bu veri, sunulan tezdeki

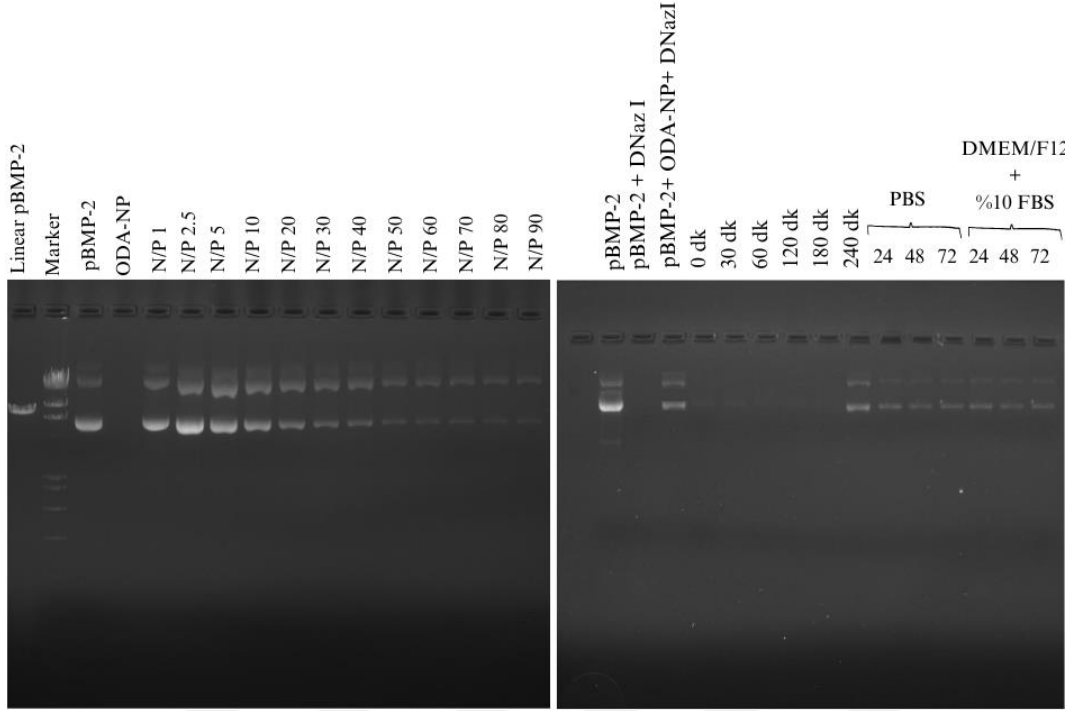
42-56 µg/ml konsantrasyon değeri aralığı dikkate alındığında ilgili çalışma sunulan tezle paralellik taşımaktadır. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise tek başına KLN uygulandığında 50 µg konsantrasyona kadar canlılığın %90'nın üzerinde olduğu bildirilmiştir (Rompicharla vd., 2017). Sunulan tezdeki canlılık profili ile ilgili çalışmadakiler örtüşmektedir. Setil palmitat bazlı KLN sentezlenen bir çalışmada 3T3 fibroblast ve HaCat keratinosit hücre hattında gerçekleştirilen MTT deneyinde 50 µg/ml konsantrasyonda arasında canlılık %70 civarındadır (Ridolfi vd., 2011). Sunulan tezdeki canlılık profili ile ilgili çalışmadakiler örtüşmektedir.

4.5 Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikül-Plazmid Kompleksinin Stabilitesi

KLN'lerin sentezinde kullanılan pozitif amin grupları içeren lipidler, negatif yüklü nükleik asitlerle etkileşime girmektedir. Pozitif yüklü amin (N) gruplarının, negatif yüklü nükleik asit fosfat (P) gruplarına oranı (N/P), gen taşıyıcı araçların en önemli fizikokimyasal özelliklerinden biridir (Gary vd., 2013). ODA-NP-2 ve pBMP-2'nin kompleksleştirilmesiyle optimum N/P oranının tespit edilebilmesi için Aydın ve arkadaşlarının (2022) jel gecikme yöntemi kullanıldı. Sırasıyla N/P oranı 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapılarak ODA-NP-2/pBMP-2 kompleksleri oluşturuldu (Şekil 4.7 sağdaki). N/P 70 içerisinde 56 µg/ml ODA-NP-2 bulundurmaktadır. Nanopartikülün toksisitesi ile ilişkilendirildiğinde bu oranın kullanımı uygun bulunmuştur. Diğer stabilizasyon çalışmalarında da N/P 70 olarak hesaplanarak deneyler kurgulanmıştır. N/P 70 oranında ODA-NP-2:pBMP-2 kompleksi oluşturuldu ve ZetaSizer'da ölçüldü. Boyutu 1101 nm ±302.6, PDI 0.054 ve yükü 1.69 mV ±4.28 ölçülmüştür.

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi N/P oranı arttıkça ODA-NP-2'nin plazmidi tutma kabiliyeti artmıştır. Bu nedenle jelde yürüyen DNA yoğunluğu giderek düşmüştür. Ancak, N/P 70,80 ve 90 oranlarında yürüyen DNA yoğunluğunda bantlarda herhangi bir keskinlik değişimi gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, N/P 70 oranının sitotoksikite sonucuyla birleştirildiğinde en optimum oran olduğu yorumu yapılabilir. Benzer bir sonuç gemini katyonik lipid nanovektörlerinde gerçekleştirilen bir çalışmadaki (Sánchez-Arribas vd., 2021) jel gecikme deneyinde de elde edilmiştir. İlgili çalışmada da N/P oranı arttıkça yürüyen DNA azalmıştır.

Çeşitli KLN formülasyonlarının N/P oranlarının jel gecikme deneyi ile yorumlandığı bir diğer çalışmadaki jel görseli (Büyükköroğlu, t.y.) ile sunulan bu tezdeki görsel arasında paralellik bulunmaktadır.



Şekil 4.7 Oktadesilamin bazlı katı lipid nanopartikül-plazmid kompleksinin stabilitesi

Kompleks stabilitesinin ölçütlerinden bir diğeri ise DNaz enzimine karşı nanopartikülün plazmid DNA'yı koruma kabiliyetidir. Serbest pBMP-2 ve ODA-NP-2/pBMP-2 kompleksleri DNaz I ile muamele edilerek agaroz jel elektroforezinde analiz edildi (Şekil 4.7 soldaki). ODA-NP-2/pBMP-2 kompleksleri OPTI-MEM içerisinde N/P 70 olacak şekilde oluşturuldu. Sırasıyla 0 dk, 30 dk, 60 dk, 120 dk, 180 dk ve 240 dk 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi ve jelde yürütüldü. Ayrıca N/P 70 oranında hazırlanan kompleks stabiliteyi 37°C %5CO₂ koşullarında PBS ve DMEM/F12 + %10 FBS 24, 48 ve 72'şer saat inkübe edilerek jelde yürütüldü.

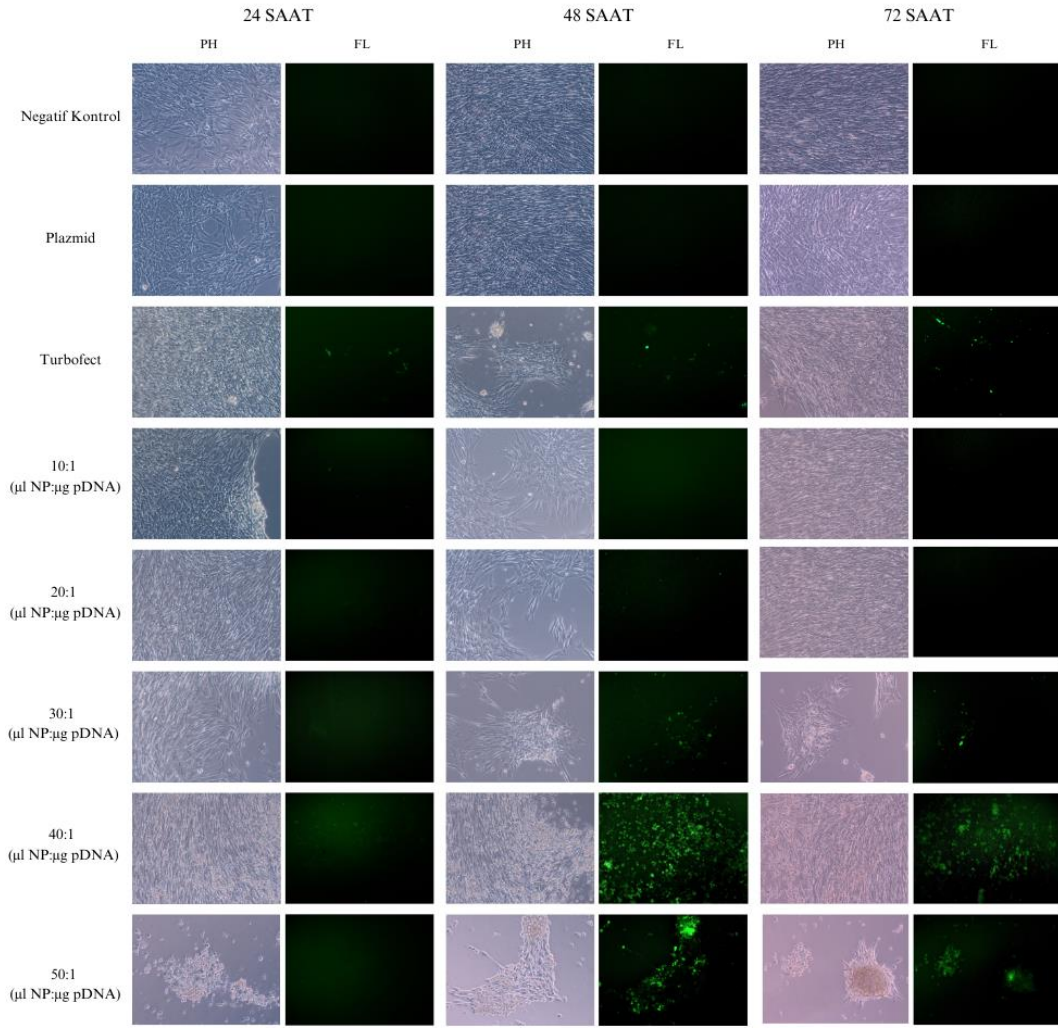
Şekil 4.7'de görüldüğü gibi DNaz I enzimi serbest pBMP-2'ye uygulandığında plazmid DNA parçalandığından jelde herhangi bir bant gözlenmemiştir. Ancak ODA-NP-2 ile kompleks halindeki pBMP-2 enzim parçalanmasına karşı taşıyıcı vektör ile korunmuştur. Bu nedenle, enzim aktivitesi inhibe edildiğinde ve sıcaklık 65°C'ye çıkarıldığında (oktadesilaminin erime sıcaklığı 52.9 °C'dir) ODA-NP-2 ile korunan plazmid DNA açığa çıkması ile jelde ilgili bantlar görülmektedir.

Literatürdeki benzer bir çalışmadaki görsel ile uyumludur (de Jesus vd., 2013). Sırasıyla 0, 30, 60, 120, 180 ve 240 dk inkübe edilen komplekslerde yalnızca 240 dk'da pBMP-2'ye ait bantlar görülmektedir. Yani, ODA-NP-2:pBMP-2 kompleksi 4 saat içerisinde ayrılmaktadır. Transfeksiyon için yeterli olduğu söylenilebilir. PBS ve DMEM/F12 içerisinde komplekslerin 24, 48 ve 72 saat stabilitesi neredeyse aynı olduğu görülmektedir. PBS ve DMEM/F12 içerisindeki stabilitesi literatürdeki çalışma (Oliveira vd., 2014) ile örtüşmemektedir. PBS ve DMEM/F12 içerisindeki iyonlar ODA-NP-2'nin agregasyona neden olabilmektedir. Bu nedenle pBMP-2 ile kompleks oluşturması etkilenmiş olabilir. Ayrıca ticari tüm transfeksiyon ajanları serumsuz besiyerinin kullanımını önermektedir, çünkü serum komponentleri ajanlarla etkileşime girebilmektedir.

4.6 BMP-2 Plazmidinin Oktadesilamin Bazlı Katı Lipid Nanopartikülü Aracılığıyla Transfeksiyonu

BMP-2 kodlayan plazmidin ODA-NP-2 ile MKH'lere aktarımı transfeksiyon deneyi ile gerçekleştirildi. Transfeksiyon için T75 flaskta çoğaltılan pasaj numarası 4 olan MKH'ler tripsinize edip kaldırılarak 24 kuyucuklu plakanın 8 kuyucuğuna her bir kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübasyon sonrasında, hücreler logaritmik büyüme evresindeyken transfeksiyon gerçekleştirildi. 8 kuyucuk sırasıyla; negatif kontrol, taşıyıcısız BMP-2 plazmidi, Turbofect ile etkileştirilmiş pBMP-2 ve sırasıyla 10 µl (7 µg), 20 µl (14 µg), 30 µl (21 µg), 40 µl (28 µg) ve 50 µl (35 µg) ODA-NP-2 ile kompleks oluşturulmuş BMP-2 plazmidi verildi. 24, 48 ve 72 saat GFP ışıması takip edildi ve fotoğraflandı (Şekil 4.8). GFP ekspresyonu en fazla 48. saatte gözlemlendi. Maksimum hücre canlılığı ve transfeksiyon etkinliği 48. saatteki 40 µl (28 µg) ODA-NP-2:1 µg pBMP-2 kompleksinde olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, transfeksiyon etkinliğini hesaplamak üzere bu kuyucuk kullanıldı.

Sunulan bu tezde, 24. saatte Turbofect pozitif kontrolünde GFP eksprese olurken ODA-NP-2 taşıyıcısıyla yapılan transfeksiyon sonucu 24. Saatte verimli bir GFP sinyaline rastlanamamıştır.



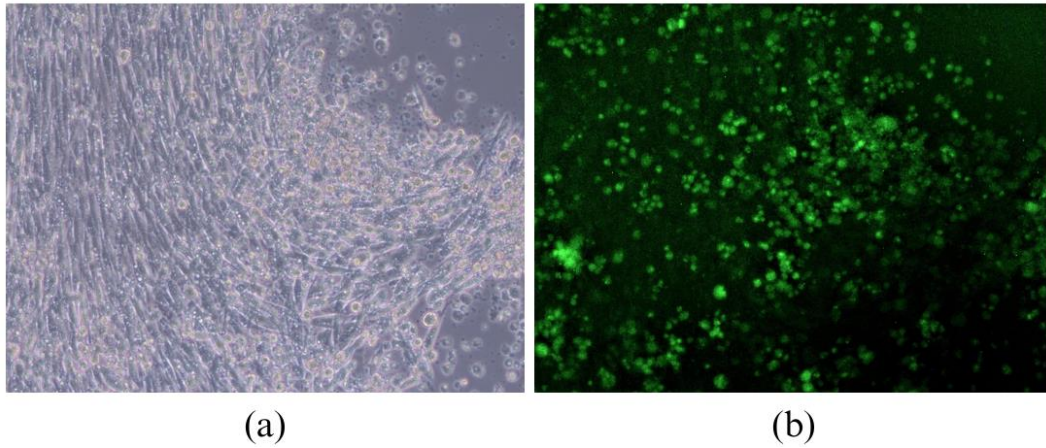
Şekil 4.8 Transfeksiyon sonrası 24, 48 ve 72 saatin 10x objektifteki faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüsü

24 saat sonraki transfeksiyon sonuçları, 48 saat sonraki sonuçlardan çok farklı olabildiği bir çalışmada bildirilmiştir (Sandbichler vd., 2013). Bu durum kullanılan taşıyıcı ile ilişkilendirilmiştir. İlgili çalışmada kullanılan JetPrime transfeksiyon ajanı 24 saatte GFP eksprese ederken, X-tremeGene HP ajanı ile ise 48 saatin sonunda GFP sinyali yakalanabilmiştir. Bir taşıyıcının bir hedef hücrede ifade edilecek plazmid vektörü ne kadar iyi teslim edebileceğinin objektif bir ölçüsü için uygun saatin taşıyıcıya göre seçimi yapılmasının daha uygun olacağı yorumu yapılabilir. 3 kb'lık bir vektörün transfekte edildiği bir diğer çalışmada da 24. saatte (Søndergaard vd., 2020) sunulan bu tezdeki görüntüyle örtüşen bir floresan fotoğrafı bulunmaktadır. İnsan periodontal ligament kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada 24 saatte Lipofectamine 2000, PEI, GBfectene-Elite ve X-tremeGENE taşıyıcılarıyla yapılan transfeksiyon sonucu GFP ekspresyonunun neredeyse yok

iken ve Şekil 4.8'in 24 saati ile paralelken, 48 saatte GFP ekspresyonu gözlemlenebilmektedir (Y. Wang vd., 2015).

4.6.1 Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Yeşil floresan proteini (GFP) geni, genellikle hücre ve moleküler biyolojide bir raportör gen olarak kullanılmaktadır. Bu genin ekspresyonu sonucunda üretilen protein, floresan ışık altında yeşil bir ışımaya yaymaktadır. BMP-2 kodlayan plazmidin C-terminalinde GFP raportörü vardır. Bu sayede, GFP ekspresyonu floresan atmaçlı invert mikroskop altında takip edilebilmektedir. Maksimum hücre canlılığı ve transfeksiyon etkinliği 48. saatteki 40 µl (28 µg) ODA-NP-2:1 µg pBMP-2 kompleksinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8). 40 µl ODA-NP-2 ve 1 µg pBMP-2 etkileştirilerek transfekte edilen hücrelerin 48. saatteki görüntüsünden (Şekil 4.9) 3 bölge seçilerek transfekte olan ve olmayan hücreler sayıldı. Daha sonrasında bu değerlerin ortalaması alınarak transfeksiyon verimliliği hesaplandı. Hesaplama sonucu transfeksiyon etkinliği 88.2 ± 0.5 olduğu belirlendi.



Şekil 4.9 Transfeksiyonun 48. Saatine 10x objektifte faz kontrast (a) ve floresan (b) görüntüsü

Farklı hücre hatlarında transfeksiyon etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada % transfeksiyon etkinliğinin 48. saatte tüm hücre hatları için %50'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir (Maurisse vd., 2010). Sunulan bu tezdeki oran çok daha yüksektir. Gómez-Aguado ve çalışma grubunu (2020), ARPE-19 hücre hattına DOTAP içeren katyonik KLN aracılığıyla mRNA aktarımı yapmışlardır. Çalışmada 48. saatte sentezledikleri KLN fraksiyonları içinde %80 ve üzeri transfeksiyon etkinliği sağlandığı görülmektedir. Sunulan bu tez ile ilgili çalışma arasında benzer transfeksiyon verimliliği yüzdesi vardır. Wharton jeli kaynaklı MKH'lerin PEI

aracılığıyla transfekte edildiği bir diğer çalışmada ise, 48. saatte maksimum transfeksiyon etkinliği %63 olduğu saptanırken canlılığın oldukça düşük olduğu raporlanmıştır (Ramos-Murillo vd., 2020). Sunulan bu tez ilgili çalışma ile karşılaştırıldığında 48. saatteki transfeksiyon etkinliği daha fazla iken hücre canlılığı korunmuştur.

4.7 Gerçek Zamanlı PCR ile Transfeksiyonun mRNA Düzeyinde Değerlendirilmesi

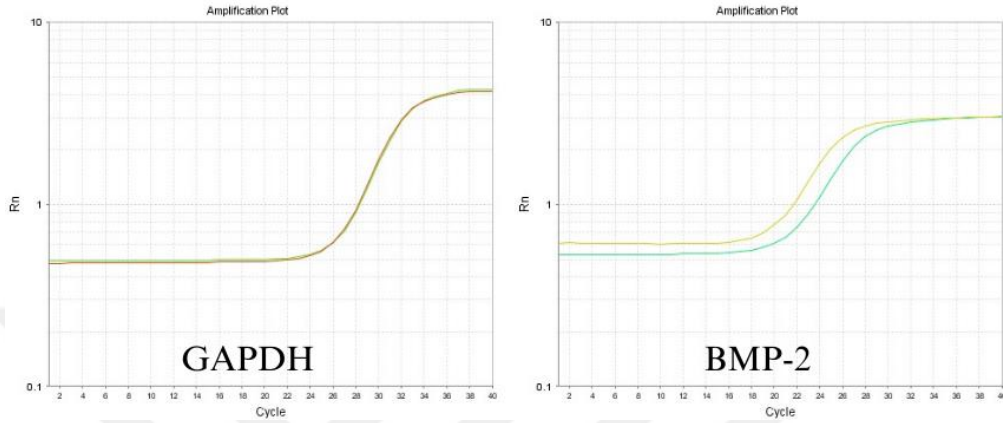
Transfeksiyon çalışmalarından sonra BMP-2'nin mRNA seviyesinde tespit edilebilmesi için gerçek zamanlı PCR tekniği kullanıldı. 24 kuyucuklu plakalara ekilen MKH'ler, transfeksiyondan 24 saat sonra RNA'ları izole edildi. İzole edilen RNA'lar cDNA'ya çevrildi. Transfekte edilmiş MKH'lerden izole edilen RNA, transfekte edilmemiş MKH'lerden izole edilen RNA, transfekte edilmiş MKH'lerden izole edilen RNA'dan sentezlenen cDNA ve transfekte edilmemiş MKH'lerden izole edilen RNA'dan sentezlenen cDNA'nın Nanodrop ölçüm sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 RNA izolasyon ve cDNA değerleri

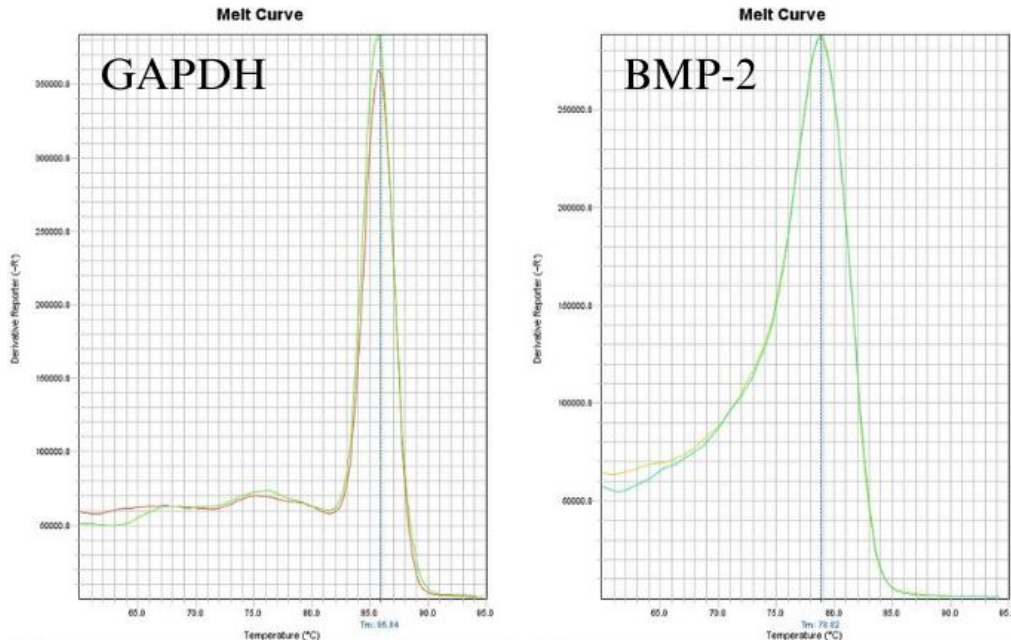
	Konsantrasyon ng/ μ L	A _{260/280}	A _{260/230}
MKH RNA	57.06	2.00	1.59
Transfekte MKH RNA	43.5	1.93	1.23
MKH cDNA	1501.7	1.81	2.12
Transfekte MKH cDNA	1339.2	1.81	2.14

cDNA'ların kalıp olarak kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirildi. RT-PCR ile oluşan GAPDH ve BMP-2 amplifikasyon grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir. GAPDH için hem transfekte olan grup hem de olmayan grup için eksponansiyel faza geçiş yaklaşık olarak aynıdır. GAPDH her iki grup için de aynı döngüde ekspres olmaya başlamıştır. BMP-2 için ise transfekte olan grup ortalama C_T yaklaşık 22 ve transfekte olmayan grup için ise ortalama C_T 24'tür. BMP-2 için transfekte olan grup daha erken amplifikasyona olmaya başlamıştır. Şekil 4.11'de ise GAPDH ve BMP-2 "melt curve" grafiği verilmiştir. GAPDH'e spesifik T_m 85.84°C'te tek pik

şeklinde oluşmuştur ve literatürle örtüşmektedir (Kochanowska vd., 2007; Nazari vd., 2015). BMP-2'ye spesifik T_m 78.82°C'te tek pik şeklinde oluşmuştur ve literatürle örtüşmektedir (Kochanowska vd., 2007). “Melt curve” grafiklerinde tek pik olarak görülmesi, spesifik olmayan bağlanmanın gerçekleşmediğini doğrulayan önemli bir ölçüt olarak değerlendirilmektedir.



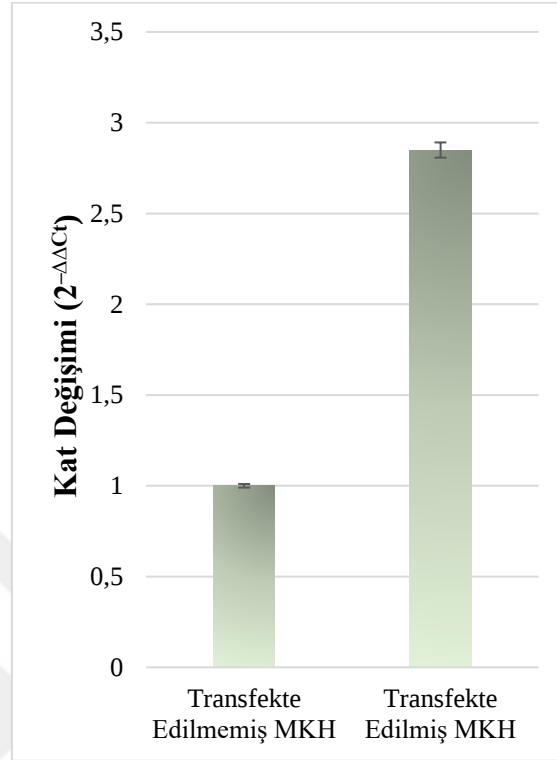
Şekil 4.10 GAPDH ve BMP-2'nin amplifikasyon grafiği



Şekil 4.11 GAPDH ve BMP-2'nin “melt curve” grafiği

BMP-2'nin göreceli ekspresyon seviyesi GAPDH geni referans alınarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanarak Şekil 4.12'deki grafik elde edilmiştir. Transfekte edilmemiş MKH'lere kıyasla transfekte edilmiş MKH'lerde BMP-2 mRNA ekspresyon seviyesi yaklaşık 3 kat daha fazladır. Bu, pBMP-2'nin başarılı bir

şekilde transfekte olduğunu ve plazmidin transkriptte olarak mRNA eksprese ettiğini göstermektedir.



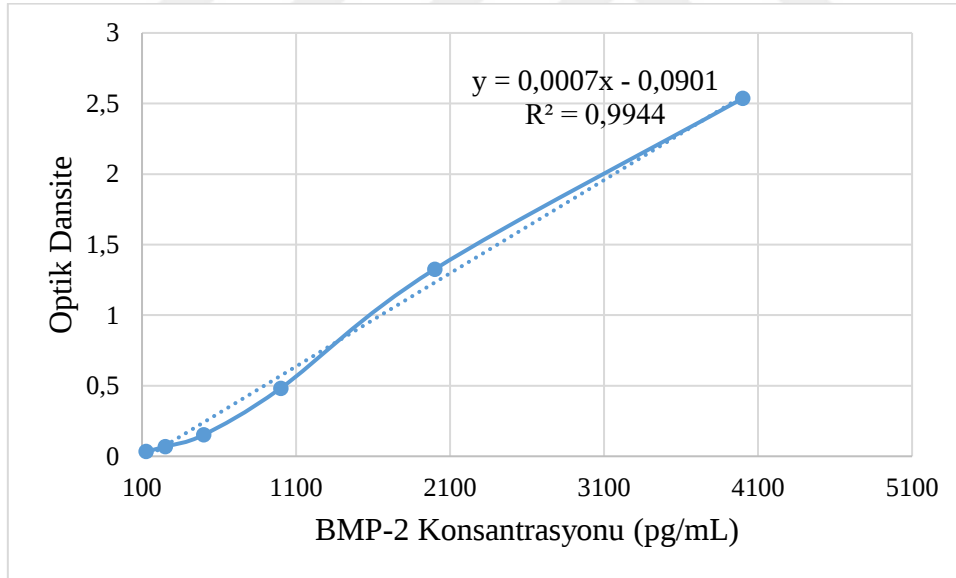
Şekil 4.12 BMP-2'nin göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri

Kitosan nanopartiküllerle *BMP-2* geninin insan adipoz kaynaklı MKH'lere transfekte edildiği bir çalışmada, göreceli mRNA ekspresyon seviyesi RT-PCR ile analiz edildiğinde Şekil 4.12'deki ile neredeyse aynı grafik elde edildiği bildirilmiştir (Y. Hu vd., 2021). İlgili çalışmada transfekte edilmemiş MKH'lerin göreceli mRNA ekspresyonunun kat değişimi 1 iken transfekte edilmiş MKH'ın ise neredeyse 3 olduğu ve sunulan bu tezdeki sonuçlar ile benzerlik taşıdığı yorumu yapılabilmektedir. Göbek kordonu kaynaklı MKH'lere TAT peptiti ile modifiye edilmiş PEI ile BMP-2 plazmidi aktarımın yapıldığı bir diğer çalışmada da mRNA ekspresyon seviyesi analiz edildiğinde Şekil 4.12'deki ile neredeyse aynı göreceli kat değişimi sonucuna ulaşıldığı raporlanmıştır (Y. Wang vd., 2017). Saos-2 (insan osteoblastik bir hücre hattı) hücre hattında yapılan transfeksiyon çalışmasında ise GAPDH referans genine göre transfekte edilen grup transfekte edilmeyen gruba göre 3 kat daha fazla seviyede BMP-2 mRNA eksprese edildiği bildirilen çalışma Rodrigues vd. (2017) tarafından gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmadan elde edilen

bulgu ile sunulan tez kapsamındaki BMP-2 mRNA göreceli ekspresyon seviyesi birbiriyle paralel olduğu düşünülmektedir.

4.8 ELISA ile Transfeksiyonun Protein Düzeyinde Değerlendirilmesi

Transfekte edilen ve transfekte edilmeyen MKH'lerdeki 48 saatin sonundaki BMP-2 protein miktarının analizi ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntem ile transfeksiyonun, ilgili plazmidin BMP-2 proteini eksprese etme kabiliyetinin değerlendirilmesi amaçlandı. 4000 pg/ml konsantrasyonunda referans örnek hazırlandı ve seri dilüsyonu gerçekleştirildi. Elde edilen veriler grafik ile görselleştirildi. Konsantrasyon ve optik dansiteyi ölçek alan standart eğri grafiğinin lineer eğilim çizgisi oluşturularak R^2 değeri ve grafiğin denklemi hesaplandı. Grafiğin denkleminde 24 kuyucuklu plakadaki transfekte edilmeyen MKH'lerin BMP-2 konsantrasyonu 123 ± 1.43 pg/ml ölçülürken, transfekte edilen MKH'lerin BMP-2 protein konsantrasyonu 180.86 ± 0.71 pg/ml hesaplandı.



Şekil 4.13 Referans örneğin seri dilüsyonu sonucu elde edilen standart eğri grafiği

pBMP-2 plazmid ekspresyon vektörü Sino Biological firmasından temin edilmiştir. Firmanın katalogunda da belirttiği gibi plazmid vektörün dizisinin doğruluğu garanti edilirken protein ifadesini garanti etmemektedir. Protein ifadesi birçok farklı etmenden etkilenmektedir. Bu nedenle, yalnızca GFP ışımasının gözlemlenmesi BMP-2 proteinin eksprese olduğunu kanıtlamamaktadır. Ancak,

ELISA analizi sonucunda elde edilen konsantrasyon farkı BMP-2'nin başarılı bir şekilde eksprese olduğunu doğrulamaktadır. Sunulan bu tezle benzerlik taşıyan Sarı ve çalışma grubunun (2021) gerçekleştirdiği deneyde, transfeksiyon sonucu BMP-2 proteinin 4. gündeki ifade seviyesinin 23.4 ± 2 pg/ml olduğunu ve negatif kontrol insan MKH'lerinde ise ≤ 5.85 pg/ml olduğu raporlanmıştır. Bu konsantrasyonlar sunulan tezdekine göre düşük olsa da anlamlı derecede bir fark içermektedir. Farklı hücre gruplarında ve farklı plazmid vektörler tasarlanarak yapılan bir diğer çalışmada, adipoz kaynaklı MKH kullanılmıştır (Hacobian vd., 2016). Sunulan tezdeki gibi CMV promoterlı bir ekspresyon plazmidi transfeksiyon için kullanıldığında adipoz kaynaklı MKH'de sunulan tezdeki konsantrasyonlara yakın seviyeler raporlanmıştır. Bir başka çalışmada insan adipoz kaynaklı MKH'lere BMP-2 geni transfekte edildiğinde kontrol grubunda saptanan BMP-2 ekspresyonu yaklaşık 200 pg/ml iken transfekte gruptaki BMP-2 protein seviyesi yaklaşık 600 pg/ml olduğu bildirilmiştir (Y. Hu vd., 2021). İlgili çalışmada hücre süpernatantından izole edilen BMP-2 analiz edilirken sunulan tez kapsamında hücre çökeltisinden BMP-2 proteinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Farkın buradan kaynaklandığı düşünülmektedir.

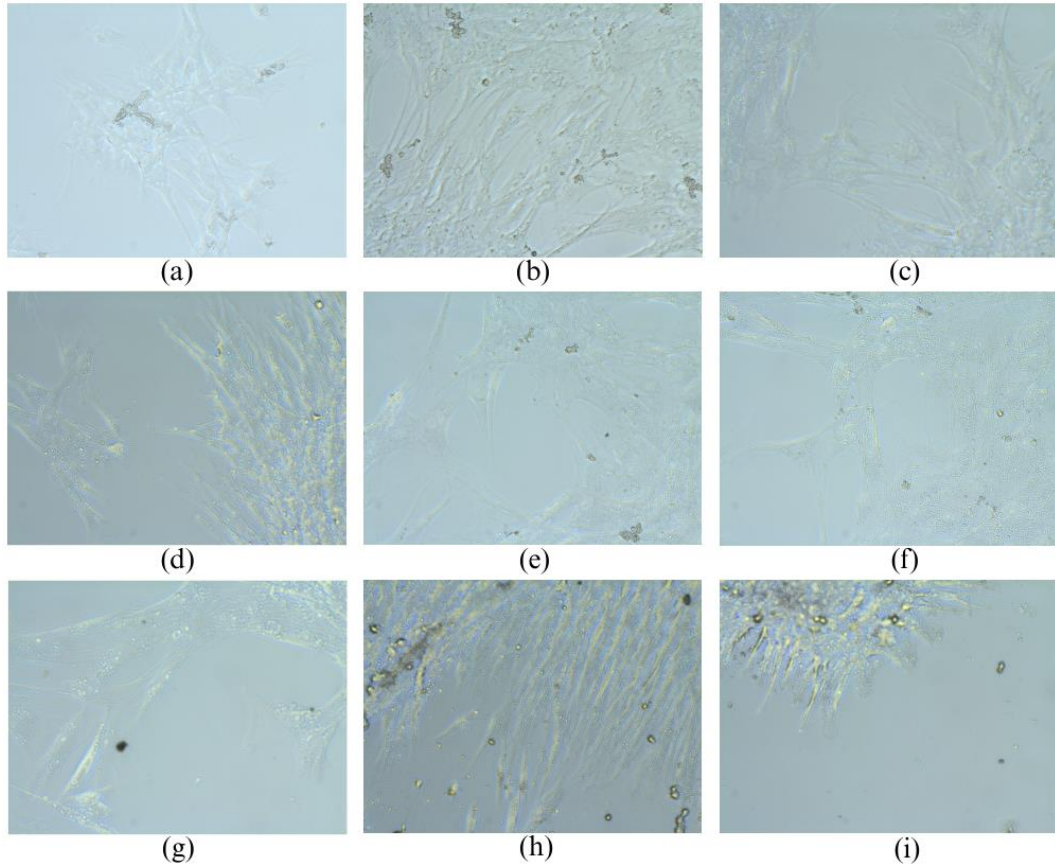
4.9 Senesens-ilişkili Beta Galaktosidaz Boyaması ile Senesensin Belirlenmesi

Senesens, uzun süreli geri dönüşümsüz hücre döngüsü tutuklanması ile karakterize edilen bir süreçtir (Muniz vd., 2017). Kök hücre senesensi, kök hücrelerin yaşlanması veya işlev kaybına yol açarak fizyolojik ve patolojik yaşlanmaya neden olmaktadır (F. Chen vd., 2023). Normal somatik hücrelere benzer şekilde, yetişkin MKH'ler ömür boyunca stres faktörlerine maruz kalırlar ve bu durum, sayılarında yaşa bağlı bir azalmaya neden olarak doku homeostazı, yenilenme ve onarımın bozulmasına yol açmaktadır. MKH nişinin yaşlanması, spontan olarak inflamatuvar tepkilere neden olmakta ve MKH tabanlı tedavinin etkisiyle interferansa sebep olmaktadır (F. Chen vd., 2023; López-Seijas vd., 2023).

Lopez-Seijas ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışmada, senesense olan ve senesense olmayan göbek kordonu MKH'ler Lipofectamine, DOTMA ve niozom aracılığıyla transfekte edilmiştir. Transfeksiyon etkinliği üç farklı gen aktarım

yönteminde de senesente olan hücrelerde, senesente olmayan hücrelere göre daha düşük olduğu raporlanmıştır.

Sunulan bu tezde, MKH'lerin senesente olup olmadığı SA- β -gal boyaması ile tespit edildi. Böylelikle, transfeksiyon etkinliğine senesensin etkisi olup olmadığı değerlendirildi. Şekil 4.14'te 20x objektifinde aydınlık alan görüntüsü bulunmaktadır. SA- β -gal boyaması sonucunda hücreler senesente ise mavi renkte gözükmekte eğer senesente değilse boyanmamaktadır. Literatürdeki SA- β -gal aktivitesi pozitif olan örneklerle; IMR-90 hücrelerinde gerçekleştirilen SA- β -gal boyaması görüntüsü (Neri vd., 2021), A549 akciğer kanseri hücre hattında gerçekleştirilen SA- β -gal boyaması (Dutta vd., 2020) ve insan düz kas hücrelerinde gerçekleştirilen boyama analizi sonucu (Krzystyniak vd., 2023) karşılaştırıldığında Şekil 14.4'te görünen hücrelerin hiçbirinin maviye boyanmadığı ve senesens- ilişkili beta galaktosidaz aktivitesi göstermediği görülmektedir.



Şekil 4.14 Transfeksiyon deneyleri süresince yapılan SA- β -gal boyaması

Hücreler transfekte edilmek üzere 24 kuyucuklu plakaya geçirildiğinde uygulanan, yani birinci gün, SA- β -gal boyamasının sonucu Şekil 4.14 (a)'da görülmektedir.

Şekil 4.14 (b)-(i) transfeksiyon çalışmalarının yürütüldüğü kuyucukların 72 saat sonunda, yani üçüncü gün, boyanması ile elde edilmiştir. Transfeksiyonun negatif kontrolü Şekil 4.14 (b)'de, plazmidin taşıyıcısız aktarımı Şekil 4.14 (c)'de, Turbofect ile transfeksiyon Şekil 4.14 (c)'de ve 10-50 µl ODA-NP-2 ile aktarılan pBMP-2'nin sırasıyla Şekil 4.14 (d)-(i)'de gösterilmektedir. Şeklin bütününde mavi boyaya rastlanmamaktadır. Bu, hücrelerin senesens-ilişkili beta galaktosidaz aktivitesi göstermediğini belirtmektedir. Ek olarak, transfeksiyonun da senesensi tetiklemediği yönünde yorumlanabilir.



- Abbaszadeh, H., Ghorbani, F., Derakhshani, M., Movassaghpour, A. A., Yousefi, M., Talebi, M., & Shamsasenjan, K. (2020). Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 9230-9240.
- Abe, K., & Matsuki, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, 38(4), 325-329.
- Achagri, G., Essamlali, Y., Amadine, O., Majdoub, M., Chakir, A., & Zahouily, M. (2020). Surface modification of highly hydrophobic polyester fabric coated with octadecylamine-functionalized graphene nanosheets. *RSC Advances*, 10(42), 24941-24950.
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.
- Airenne, K. J., Hu, Y.-C., Kost, T. A., Smith, R. H., Kotin, R. M., Ono, C., Matsuura, Y., Wang, S., & Ylä-Herttuala, S. (2013). Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. *Molecular Therapy*, 21(4), 739-749.
- Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal*, 11(4), 671.
- Alihosseini, F., Ghaffari, S., Dabirsiaghi, A. R., & Haghighat, S. (2015). Freeze-drying of ampicillin solid lipid nanoparticles using mannitol as cryoprotectant. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(4), 797-802.
- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 92(1-2), 41-51.
- Amasya, G., Aksu, B., Badilli, U., Onay-Besikci, A., & Tarimci, N. (2019). QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 563, 110-121.

- Aydin, O., Kanarya, D., Yilmaz, U., & Tunç, C. Ü. (2022). *Determination of Optimum Ratio of Cationic Polymers and Small Interfering RNA with Agarose Gel Retardation Assay* (ss. 117-128).
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 568-584.
- Beederman, M., Lamplot, J. D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S. H., Zhang, W., Zhang, J., Kong, Y., Denduluri, S., Rogers, M. R., Pratt, A., Haydon, R. C., Luu, H. H., Angeles, J., ... He, T.-C. (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 06(08), 32-52.
- Bhaskar, K., Anbu, J., Ravichandiran, V., Venkateswarlu, V., & Rao, Y. (2009). Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies. *Lipids in Health and Disease*, 8(1), 6.
- Bhat, S., Viswanathan, P., Chandanala, S., Prasanna, S. J., & Seetharam, R. N. (2021). Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Scientific Reports*, 11(1), 3403.
- Bianco, P., & Gehron Robey, P. (2000). Marrow stromal stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 105(12), 1663-1668.
- Bjornsti, M.-A., & Magonigal, M. D. (1999). Resolution of DNA Molecules by One-Dimensional Agarose-Gel Electrophoresis. İçinde *DNA Topoisomerase Protocols* (C. 94, ss. 9-18). Humana Press.
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941-951.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7297-7301.

- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 53.
- Butt, M., Zaman, M., Ahmad, A., Khan, R., Mallhi, T., Hasan, M., Khan, Y., Hafeez, S., Massoud, E., Rahman, Md., & Cavalu, S. (2022). Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy: A Review. *Genes*, 13(8), 1370.
- Büyükköroğlu, G. (t.y.). *DEVELOPMENT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AS GENE DELIVERY SYSTEM* Details of The Corresponding Author.
- Cai, X., Conley, S., & Naash, M. (2008). Nanoparticle applications in ocular gene therapy. *Vision Research*, 48(3), 319-324.
- Calva-Estrada, S. de J., García, O., Mendoza, M. R., & Jiménez, M. (2018). Characterization of O/W emulsions of carotenes in blackberry juice performed by ultrasound and high-pressure homogenization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 39(2), 181-189.
- Čamernik, K., Mihelič, A., Mihalič, R., Haring, G., Herman, S., Marolt Presen, D., Janež, A., Trebše, R., Marc, J., & Zupan, J. (2020). Comprehensive analysis of skeletal muscle- and bone-derived mesenchymal stem/stromal cells in patients with osteoarthritis and femoral neck fracture. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 146.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641-650.
- Caplan, A. I. (1994). The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*, 21(3), 429-435.
- Cárdenas, M., Campbell, R. A., Yanez Arteta, M., Lawrence, M. J., & Sebastiani, F. (2023). Review of structural design guiding the development of lipid nanoparticles for nucleic acid delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 66, 101705. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2023.101705>
- Carluccio, M., Ziberi, S., Zuccarini, M., Giuliani, P., Caciagli, F., Di Iorio, P., & Ciccarelli, R. (2020). Adult mesenchymal stem cells: is there a role for purine

- receptors in their osteogenic differentiation? *Purinergic signalling*, 16(3), 263-287.
- Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Frontiers in Chemistry*, 6.
- Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Yvonne. (2017). *Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. 1.*
- Chen, F., Wang, S., Zeng, C., Tang, S., Gu, H., Wang, Z., Li, J., Feng, P., Zhang, Y., Wang, P., Wu, Y., & Shen, H. (2023). Silencing circSERPINE2 restrains mesenchymal stem cell senescence via the YBX3/PCNA/p21 axis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(11), 325.
- Chen, P., Hu, B., Xie, L., Jiang, T., Xia, Z., & Peng, H. (2021). Scara3 regulates bone marrow mesenchymal stem cell fate switch between osteoblasts and adipocytes by promoting Foxo1. *Cell Proliferation*, 54(8).
- Chen, P., Liang, Y., Yang, B., Jia, F., & Song, S. (2020). In Situ Reduction of Au(I) for Efficient Recovery of Gold from Thiosulfate Solution by the 3D MoS₂/Chitosan Aerogel. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3673-3680.
- Chen, Y., Huang, H., Li, G., Yu, J., Fang, F., & Qiu, W. (2022). Dental-derived mesenchymal stem cell sheets: a prospective tissue engineering for regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 38.
- Chien, K. R., Frisén, J., Fritsche-Danielson, R., Melton, D. A., Murry, C. E., & Weissman, I. L. (2019). Regenerating the field of cardiovascular cell therapy. *Nature Biotechnology*, 37(3), 232-237.
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424-1435.
- Conrad, S. J., & Liu, J. (2019). *Poxviruses as Gene Therapy Vectors: Generating Poxviral Vectors Expressing Therapeutic Transgenes* (ss. 189-209).
- Crystal, R. G. (2014). Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Human Gene Therapy*, 25(1), 3-11.

- Dai, Z., Gjetting, T., Matthebjerg, M. A., Wu, C., & Andresen, T. L. (2011). Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI. *Biomaterials*, 32(33), 8626-8634.
- Danesh, S. M., Villasenor, A., Chong, D., Soukup, C., & Cleaver, O. (2009). BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene Expression Patterns*, 9(5), 255-265.
- Das, S., & Chaudhury, A. (2011). Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 62-76.
- Davis, P. B., & Cooper, M. J. (2007). Vectors for airway gene delivery. *The AAPS Journal*, 9(1), E11-E17.
- de Jesus, M. B., Radaic, A., Zuhorn, I. S., & de Paula, E. (2013). Microemulsion extrusion technique: a new method to produce lipid nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(10), 1960.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798-1806.
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5-14.
- Dinis, T. B. V., Sousa, F., & Freire, M. G. (2020). Insights on the DNA Stability in Aqueous Solutions of Ionic Liquids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Dong, S. (2008). Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 311.

- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell*, 10(2), 120-136.
- Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., Siva Kumar, N., & Vekariya, R. L. (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Advances*, 10(45), 26777-26791.
- Duarte Campos, D. F., Blaeser, A., Weber, M., Jäkel, J., Neuss, S., Jahnke-Dechent, W., & Fischer, H. (2012). Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication*, 5(1), 015003.
- Duceppe, N., & Tabrizian, M. (2009). Factors influencing the transfection efficiency of ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. *Biomaterials*, 30(13), 2625-2631.
- Duong, V.-A., Nguyen, T.-T.-L., & Maeng, H.-J. (2020). Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*, 25(20), 4781.
- Dutta, P., Zhang, L., Zhang, H., Peng, Q., Montgrain, P. R., Wang, Y., Song, Y., Li, J., & Li, W. X. (2020). Unphosphorylated STAT3 in heterochromatin formation and tumor suppression in lung cancer. *BMC Cancer*, 20(1), 145.
- Dwivedi, P. P., Anderson, P. J., & Powell, B. C. (2012). Development of an efficient, non-viral transfection method for studying gene function and bone growth in human primary cranial suture mesenchymal cells reveals that the cells respond to BMP2 and BMP3. *BMC Biotechnology*, 12(1), 45.
- Ehrengruber, M. U., Schlesinger, S., & Lundstrom, K. (2011). Alphaviruses: Semliki Forest Virus and Sindbis Virus Vectors for Gene Transfer into Neurons. *Current Protocols in Neuroscience*, 57(1).
- Ehrhardt, A., Xu, H., & Kay, M. A. (2003). Episomal Persistence of Recombinant Adenoviral Vector Genomes during the Cell Cycle In Vivo. *Journal of Virology*, 77(13), 7689-7695.

- Ehrke-Schulz, E., Zhang, W., Schiwon, M., Bergmann, T., Solanki, M., Liu, J., Boehme, P., Leitner, T., & Ehrhardt, A. (2016). Cloning and Large-Scale Production of High-Capacity Adenoviral Vectors Based on the Human Adenovirus Type 5. *Journal of Visualized Experiments*, 107.
- Eid, M. M. (2022). Characterization of Nanoparticles by FTIR and FTIR-Microscopy. İçinde *Handbook of Consumer Nanoproducts* (ss. 645-673). Springer Nature Singapore.
- Eli, I., Lerner, D. P., & Ghogawala, Z. (2021). Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurologic Clinics*, 39(2), 471-488.
- Epstein, A., Marconi, P., Argnani, R., & Manservigi, R. (2005). HSV-1-Derived Recombinant and Amplicon Vectors for Gene Transfer and Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 5(5), 445-457.
- Esposito, E., Sguizzato, M., Drechsler, M., Mariani, P., Carducci, F., Nastruzzi, C., & Cortesi, R. (2017). Progesterone lipid nanoparticles: Scaling up and in vivo human study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 437-446.
- Falanga, V., Iwamoto, S., Chartier, M., Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shraye, D., & Carson, P. (2007). Autologous Bone Marrow-Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds. *Tissue Engineering*, 13(6), 1299-1312.
- Fathi, E., Atyabi, N., Imani, M., & Alinejad, Z. (2011). Physically crosslinked polyvinyl alcohol–dextran blend xerogels: Morphology and thermal behavior. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 145-152.
- Fathi, H. A., Allam, A., Elsabahy, M., Fetih, G., & El-Badry, M. (2018). Nanostructured lipid carriers for improved oral delivery and prolonged antihyperlipidemic effect of simvastatin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 236-245.
- Fatimah, S. S., Tan, G. C., Chua, K., Fariha, M. M. N., Tan, A. E., & Hayati, A. R. (2013). Stemness and angiogenic gene expression changes of serial-passage human amnion mesenchymal cells. *Microvascular Research*, 86, 21-29.

- Floren, M., Bonani, W., Dharmarajan, A., Motta, A., Migliaresi, C., & Tan, W. (2016). Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype. *Acta Biomaterialia*, 31, 156-166.
- Fong, S., Chan, M.-K., Fong, A., Bowers, W. J., & Kelly, K. J. (2010). Viral vector-induced expression of bone morphogenetic protein 2 produces inhibition of tumor growth and bone differentiation of stem cells. *Cancer Gene Therapy*, 17(2), 80-85.
- Friedenstein, A. J. (1976). *Precursor Cells of Mechanocytes* (ss. 327-359).
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, 3(4), 393-403.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5), 267-274.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381-390.
- Fukumoto, T., Sperling, J. W., Sanyal, A., Fitzsimmons, J. S., Reinholz, G. G., Conover, C. A., & O'Driscoll, S. W. (2003). Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(1), 55-64.
- Galvão, K. C. S., Vicente, A. A., & Sobral, P. J. A. (2018). Development, Characterization, and Stability of O/W Pepper Nanoemulsions Produced by High-Pressure Homogenization. *Food and Bioprocess Technology*, 11(2), 355-367.

- Gamradt, S. C., Abe, N., Bahamonde, M. E., Lee, Y.-P., Nelson, S. D., Lyons, K. M., & Lieberman, J. R. (2006). Tracking Expression of Virally Mediated BMP-2 in Gene Therapy for Bone Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 450, 238-245.
- Gao, L. R., Chen, Y., Zhang, N. K., Yang, X. L., Liu, H. L., Wang, Z. G., Yan, X. Y., Wang, Y., Zhu, Z. M., Li, T. C., Wang, L. H., Chen, H. Y., Chen, Y. D., Huang, C. L., Qu, P., Yao, C., Wang, B., Chen, G. H., Wang, Z. M., ... Hu, X. (2015). Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *BMC Medicine*, 13(1), 162.
- Gary, D. J., Min, J., Kim, Y., Park, K., & Won, Y. (2013). The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-Based siRNA Complexes. *Macromolecular Bioscience*, 13(8), 1059-1071.
- Gathirwa, J. W., Omwoyo, W., Ogutu, B., Oloo, F., Swai, H., Kalombo, L., Melariri, P., & Maroa, G. (2014). Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 3865.
- Ghosh, S., Brown, A. M., Jenkins, C., & Campbell, K. (2020). Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Applied Biosafety*, 25(1), 7-18.
- Goldman, D. C., Donley, N., & Christian, J. L. (2009). Genetic interaction between Bmp2 and Bmp4 reveals shared functions during multiple aspects of mouse organogenesis. *Mechanisms of Development*, 126(3-4), 117-127.
- Gómez-Aguado, I., Rodríguez-Castejón, J., Vicente-Pascual, M., Rodríguez-Gascón, A., del Pozo-Rodríguez, A., & Solinís Aspiazu, M. Á. (2020). Nucleic Acid Delivery by Solid Lipid Nanoparticles Containing Switchable Lipids: Plasmid DNA vs. Messenger RNA. *Molecules*, 25(24), 5995.
- Gou, Y., Huang, Y., Luo, W., Li, Y., Zhao, P., Zhong, J., Dong, X., Guo, M., Li, A., Hao, A., Zhao, G., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, H., Shi, Y., Wagstaff, W., Luu, H. H., Shi, L. L., Reid, R. R., ... Fan, J. (2024). Adipose-derived

- mesenchymal stem cells (MSCs) are a superior cell source for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 34, 51-63.
- Green, L. H., & Goldman, E. (2021). *Practical Handbook of Microbiology* (L. H. Green & E. Goldman, Ed.). CRC Press.
- Guan, J., Zhang, J., Zhu, Z., Niu, X., Guo, S., Wang, Y., & Zhang, C. (2015). Bone morphogenetic protein 2 gene transduction enhances the osteogenic potential of human urine-derived stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 5.
- Habibpour, S., Yazdani-Ahmadabadi, H., & Faramarzzi Jolfaei, A. (2018). Amine-functionalized graphene sheet-induced highly dissipative interfacial regions in photo-polymeric networks containing self-dispersed nano-gel particles. *Polymer Bulletin*, 75(12), 5843-5858.
- Hacopian, A., Posa-Markaryan, K., Sperger, S., Stainer, M., Hercher, D., Feichtinger, G., Schuh, C., & Redl, H. (2016). Improved osteogenic vector for non-viral gene therapy. *European Cells and Materials*, 31, 191-204.
- Halloran, D., Durbano, H. W., & Nohe, A. (2020). Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *Journal of Developmental Biology*, 8(3), 19.
- Han, S.-M., Han, S.-H., Coh, Y.-R., Jang, G., Chan Ra, J., Kang, S.-K., Lee, H.-W., & Youn, H.-Y. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 46(6), e101-e101.
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17071.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12.
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238-1246.
- Hertegård, S., Nagubothu, S. R., Malmström, E., & LeBlanc, K. (2020). Treatment of vocal fold scarring with autologous bone marrow-derived human

- mesenchymal stromal cells—first phase I/II human clinical study. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 128.
- Hoemann, C. D., El-Gabalawy, H., & McKee, M. D. (2009). In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathologie Biologie*, 57(4), 318-323.
- Hoffman, A. M., Paxson, J. A., Mazan, M. R., Davis, A. M., Tyagi, S., Murthy, S., & Ingenito, E. P. (2011). Lung-Derived Mesenchymal Stromal Cell Post-Transplantation Survival, Persistence, Paracrine Expression, and Repair of Elastase-Injured Lung. *Stem Cells and Development*, 20(10), 1779-1792.
- Holmes, K. D., Cassam, A. K., Chan, B., Peters, A. A., Weaver, L. C., & Dekaban, G. A. (2000). A multi-mutant herpes simplex virus vector has minimal cytotoxic effects on the distribution of filamentous actin, α -actinin 2 and a glutamate receptor in differentiated PC12 cells. *Journal of Neurovirology*, 6(1), 33-45.
- Hou, D., Han, M., Muhammad, Y., Liu, Y., Zhang, F., Yin, Y., Duan, S., & Li, J. (2018). Performance evaluation of modified asphalt based trackless tack coat materials. *Construction and Building Materials*, 165, 385-394.
- Hsu, Y.-C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine*, 20(8), 847-856.
- Hu, C., Qian, A., Wang, Q., Xu, F., He, Y., Xu, J., Xia, Y., & Xia, Q. (2016). Industrialization of lipid nanoparticles: From laboratory-scale to large-scale production line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109, 206-213.
- Hu, C., Zhao, L., Zhang, L., Bao, Q., & Li, L. (2020). Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 377.
- Hu, M. S., Borrelli, M. R., Lorenz, H. P., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2018). Mesenchymal Stromal Cells and Cutaneous Wound Healing: A Comprehensive Review of the Background, Role, and Therapeutic Potential. *Stem Cells International*, 2018, 1-13.

- Hu, Y., Zhao, Q.-W., Wang, Z.-C., Fang, Q.-Q., Zhu, H., Hong, D.-S., Liang, X.-G., Lou, D., & Tan, W.-Q. (2021). Co-transfection with BMP2 and FGF2 via chitosan nanoparticles potentiates osteogenesis in human adipose-derived stromal cells in vitro. *Journal of International Medical Research*, 49(3), 030006052199767.
- Huang, J., Li, Q., Yuan, X., Liu, Q., Zhang, W., & Li, P. (2022). Intrauterine infusion of clinically graded human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for the treatment of poor healing after uterine injury: a phase I clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 85.
- Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., & Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology*, 18(10), 611-627.
- Huang, Z., Nelson, E. R., Smith, R. L., & Goodman, S. B. (2007). The Sequential Expression Profiles of Growth Factors from Osteroprogenitors to Osteoblasts In Vitro. *Tissue Engineering*, 13(9), 2311-2320.
- Hutton, D. L., & Grayson, W. L. (2014). Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 3, 75-82.
- Hwang, E. S. (2014). Senescence suppressors: their practical importance in replicative lifespan extension in stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(21), 4207-4219.
- Ingwersen, L.-C., Frank, M., Naujokat, H., Loger, K., Bader, R., & Jonitz-Heincke, A. (2022). BMP-2 Long-Term Stimulation of Human Pre-Osteoblasts Induces Osteogenic Differentiation and Promotes Transdifferentiation and Bone Remodeling Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3077.
- Iwasaki, O., Tanizawa, H., Kim, K.-D., Kossenkova, A., Nacarelli, T., Tashiro, S., Majumdar, S., Showe, L. C., Zhang, R., & Noma, K. (2019). Involvement of condensin in cellular senescence through gene regulation and compartmental reorganization. *Nature Communications*, 10(1), 5688.
- Janowski, M., Lyczek, A., Engels, C., Xu, J., Lukomska, B., Bulte, J. W., & Walczak, P. (2013). Cell Size and Velocity of Injection are Major

- Determinants of the Safety of Intracarotid Stem Cell Transplantation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(6), 921-927.
- Javazon, E. H., Beggs, K. J., & Flake, A. W. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology*, 32(5), 414-425.
- Jayankura, M., Schulz, A. P., Delahaut, O., Witvrouw, R., Seefried, L., Berg, B. Vande, Heynen, G., & Sonnet, W. (2021). Percutaneous administration of allogeneic bone-forming cells for the treatment of delayed unions of fractures: a pilot study. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 363.
- Jeyaraman, M., Muthu, S., Jeyaraman, N., Ranjan, R., Jha, S. K., & Mishra, P. (2022). Synovium Derived Mesenchymal Stromal Cells (Sy-MSCs): A Promising Therapeutic Paradigm in the Management of Knee Osteoarthritis. *Indian Journal of Orthopaedics*, 56(1), 1-15.
- Jones, E. A., Yang, X., Giannoudis, P., & McGonagle, D. (2013). Mesenchymal Stem Cells and Skeletal Regeneration. İçinde *Mesenchymal Stem Cells and Skeletal Regeneration* (ss. 7-13). Elsevier.
- Jose Chirayil, C., Abraham, J., Kumar Mishra, R., George, S. C., & Thomas, S. (2017). Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles. İçinde *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (ss. 1-36). Elsevier.
- Kachkin, D. V., Khorolskaya, J. I., Ivanova, J. S., & Rubel, A. A. (2020). An Efficient Method for Isolation of Plasmid DNA for Transfection of Mammalian Cell Cultures. *Methods and protocols*, 3(4).
- Kaiser, D., Otto, N. M., McCallion, O., Hoffmann, H., Zarrinrad, G., Stein, M., Beier, C., Matz, I., Herschel, M., Hester, J., Moll, G., Issa, F., Reinke, P., & Roemhild, A. (2021). Freezing Medium Containing 5% DMSO Enhances the Cell Viability and Recovery Rate After Cryopreservation of Regulatory T Cell Products ex vivo and in vivo. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Kang, Y., Yeo, M., Derman, I. D., Ravnic, D. J., Singh, Y. P., Alioglu, M. A., Wu, Y., Makkar, J., Driskell, R. R., & Ozbolat, I. T. (2024). Intraoperative bioprinting of human adipose-derived stem cells and extra-cellular matrix induces hair follicle-like downgrowths and adipose tissue formation during

- full-thickness craniomaxillofacial skin reconstruction. *Bioactive Materials*, 33, 114-128.
- Kasai, K., & Saeki, Y. (2006). DNA-Based Methods to Prepare Helper Virus-Free Herpes Amplicon Vectors and Versatile Design of Amplicon Vector Plasmids. *Current Gene Therapy*, 6(3), 303-314.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C., & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*, 7(1), 33-40.
- Khaki, M., Salmanian, A. H., Abtahi, H., Ganji, A., & Mosayebi, G. (2018). Mesenchymal Stem Cells Differentiate to Endothelial Cells Using Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor -A. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 6(2), 144-150.
- Kim, H. K. W., Oxendine, I., & Kamiya, N. (2013). High-concentration of BMP2 reduces cell proliferation and increases apoptosis via DKK1 and SOST in human primary periosteal cells. *Bone*, 54(1), 141-150.
- Kochanowska, I., Chaberek, S., Wojtowicz, A., Marczyński, B., Włodarski, K., Dytko, M., & Ostrowski, K. (2007). Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8(1), 128.
- Kotmakçı, M., Akbaba, H., Erel, G., Ertan, G., & Kantarcı, G. (2017). Improved Method for Solid Lipid Nanoparticle Preparation Based on Hot Microemulsions: Preparation, Characterization, Cytotoxicity, and Hemocompatibility Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 18(4), 1355-1365.
- Kovačević, A. B., Müller, R. H., Savić, S. D., Vuleta, G. M., & Keck, C. M. (2014). Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444, 15-25.
- Krampera, M., Pizzolo, G., Aprili, G., & Franchini, M. (2006). Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*, 39(4), 678-683.

- Krzystyniak, A., Gluchowska, A., Mosieniak, G., & Sikora, E. (2023). Fiji-Based Tool for Rapid and Unbiased Analysis of SA- β -Gal Activity in Cultured Cells. *Biomolecules*, 13(2), 362.
- Kumar, R., Santa Chalarca, C. F., Bockman, M. R., Bruggen, C. Van, Grimme, C. J., Dalal, R. J., Hanson, M. G., Hexum, J. K., & Reineke, T. M. (2021). Polymeric Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. *Chemical Reviews*, 121(18), 11527-11652.
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., & Robey, P. G. (2001). Circulating Skeletal Stem Cells. *The Journal of Cell Biology*, 153(5), 1133-1140.
- LaFountaine, J. S., Fathe, K., & Smyth, H. D. C. (2015). Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 180-194.
- Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V. M., & Santiago-Osorio, E. (2016). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells International*, 2016, 1-12.
- Lee, C.-Y., Nedunchezian, S., Lin, S.-Y., Su, Y.-F., Wu, C.-W., Wu, S.-C., Chen, C.-H., & Wang, C.-K. (2023). Bilayer osteochondral graft in rabbit xenogeneic transplantation model comprising sintered 3D-printed bioceramic and human adipose-derived stem cells laden biohydrogel. *Journal of Biological Engineering*, 17(1), 74.
- Lee, J. E., Yin, Y., Lim, S. Y., Kim, E. S., Jung, J., Kim, D., Park, J. W., Lee, M. S., & Jeong, J. H. (2019). Enhanced Transfection of Human Mesenchymal Stem Cells Using a Hyaluronic Acid/Calcium Phosphate Hybrid Gene Delivery System. *Polymers*, 11(5), 798.
- Lee, K. B. L., Hui, J. H. P., Song, I. C., Ardany, L., & Lee, E. H. (2007). Injectable Mesenchymal Stem Cell Therapy for Large Cartilage Defects—A Porcine Model. *Stem Cells*, 25(11), 2964-2971.
- Li, F., Wu, J., Li, D., Hao, L., Li, Y., Yi, D., Yeung, K. W. K., Chen, D., Lu, W. W., Pan, H., Wong, T. M., & Zhao, X. (2022). Engineering stem cells to

- produce exosomes with enhanced bone regeneration effects: an alternative strategy for gene therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 135.
- Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., & Bao, J. (2017). Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 39(4), 775-782.
- Li, Z., Hu, X., & Zhong, J. F. (2019). Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. *Stem cells international*, 2019, 8106818.
- Limanskaya, O. Y., & Limanskii, A. P. (2008). Imaging compaction of single supercoiled DNA molecules by atomic force microscopy. *General physiology and biophysics*, 27(4), 322-337.
- Lin, H.-C., Ko, B.-T., & Wu, T.-M. (2019). Thermal and Mechanical Properties of CO₂-Based Biodegradable Poly(cyclohexene carbonate)/Organically Modified Layered Zinc Phenylphosphonate Nanocomposites. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), 1065-1070.
- Liu, P., & Song, J. (2013). Sulfobetaine as a zwitterionic mediator for 3D hydroxyapatite mineralization. *Biomaterials*, 34(10), 2442-2454.
- López-Seijas, J., Miranda-Balbuena, D., Iglesias-Fente, A., Sacristán-Santos, M., Carballo-Pedrares, N., Arufe, M. C., Rey-Rico, A., & Fafián-Labora, J. (2023). Development of new non-viral systems for genetic modification of senescent cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 32, 302-317.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270.
- Lundstrom, K. (2023). Viral Vectors in Gene Therapy: Where Do We Stand in 2023? *Viruses*, 15(3), 698.
- Marfia, G., Navone, S. E., Di Vito, C., Ughi, N., Tabano, S., Miozzo, M., Tremolada, C., Bolla, G., Crotti, C., Ingegnoli, F., Rampini, P., Riboni, L., Gualtierotti, R., & Campanella, R. (2015). Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis*, 11(4), 183-206.

- Margiana, R., Markov, A., Zekiy, A. O., Hamza, M. U., Al-Dabbagh, K. A., Al-Zubaidi, S. H., Hameed, N. M., Ahmad, I., Sivaraman, R., Kzar, H. H., Al-Gazally, M. E., Mustafa, Y. F., & Siahmansouri, H. (2022). Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 366.
- Martínez-Zamudio, R. I., Roux, P.-F., de Freitas, J. A. N. L. F., Robinson, L., Doré, G., Sun, B., Belenki, D., Milanovic, M., Herbig, U., Schmitt, C. A., Gil, J., & Bischof, O. (2020). AP-1 imprints a reversible transcriptional programme of senescent cells. *Nature Cell Biology*, 22(7), 842-855.
- Masiwa, W. L., & Gadaga, L. L. (2018). Intestinal Permeability of Artesunate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Using the Everted Gut Method. *Journal of Drug Delivery*, 2018, 1-9.
- Masotti, A., Mossa, G., Cametti, C., Ortaggi, G., Bianco, A., Grosso, N. Del, Malizia, D., & Esposito, C. (2009). Comparison of different commercially available cationic liposome–DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(2), 136-144.
- Maucksch, C., Connor, B., & Rudolph, C. (2013). Plasmid DNA Concatemers: Influence of Plasmid Structure on Transfection Efficiency. İçinde *Minicircle and Miniplasmid DNA Vectors* (ss. 59-69). Wiley.
- Maurisse, R., De Semir, D., Enamekhoo, H., Bedayat, B., Abdolmohammadi, A., Parsi, H., & Gruenert, D. C. (2010). Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnology*, 10(1), 9.
- McClements, M. E., & MacLaren, R. E. (2017). Adeno-associated Virus (AAV) Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(4), 611-623.
- McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *The Lancet*, 359(9304), 417-425.
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65-77.

- Mehnert, W. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 165-196.
- Meirelles, L. da S., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2204-2213.
- Mendes, S. C., Robin, C., & Dzierzak, E. (2005). Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, 132(5), 1127-1136.
- Mingozi, F., & High, K. A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*, 122(1), 23-36.
- Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2009). Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Chemical Reviews*, 109(2), 259-302.
- Mirón-Barroso, S., Domènech, E. B., & Trigueros, S. (2021). Nanotechnology-Based Strategies to Overcome Current Barriers in Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8537.
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101-124.
- Mohamed, A. (2013). Role of PLGA-Nanoparticles Formulation to Improve Drug Radioprotective Activity in Gamma-Irradiated Mice. *Chemistry Journal, ISSN 2049-954X*, 97-104.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L. S., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., von Kalle, C., & Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature Biotechnology*, 24(6), 687-696.
- Moraleda, J. M., Blanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Ruiz, F., Bonilla, S., Cabanes, C., Tabares, L., & Martinez, S. (2006). Adult stem cell therapy: Dream or reality? *Transplant Immunology*, 17(1), 74-77.
- Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A., & Takakura, Y. (2006). Tissue Engineering Approach to the Treatment of Bone Tumors:

- Three Cases of Cultured Bone Grafts Derived From Patients' Mesenchymal Stem Cells. *Artificial Organs*, 30(2), 115-118
- Morissette, G., & Flamand, L. (2010). Herpesviruses and Chromosomal Integration. *Journal of Virology*, 84(23), 12100-12109.
- Motohashi, K. (2019). A novel series of high-efficiency vectors for TA cloning and blunt-end cloning of PCR products. *Scientific Reports*, 9(1), 6417.
- Muniz, L., Deb, M. K., Aguirrebengoa, M., Lazorthes, S., Trouche, D., & Nicolas, E. (2017). Control of Gene Expression in Senescence through Transcriptional Read-Through of Convergent Protein-Coding Genes. *Cell Reports*, 21(9), 2433-2446.
- Murry, C. E., & MacLellan, W. R. (2020). Stem cells and the heart—the road ahead. *Science*, 367(6480), 854-855.
- Nakao, M., Matsui, M., Kim, K., Nishiyama, N., Grainger, D. W., Okano, T., Kanazawa, H., & Nagase, K. (2023). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell sheets transplanted subcutaneously enhance cell retention and survival more than dissociated stem cell injections. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), 352.
- Nazari, F., Parham, A., & Maleki, A. F. (2015). GAPDH, β -actin and β 2-microglobulin, as three common reference genes, are not reliable for gene expression studies in equine adipose- and marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1), 18.
- Neri, F., Basisty, N., Desprez, P., Campisi, J., & Schilling, B. (2021). Quantitative Proteomic Analysis of the Senescence-Associated Secretory Phenotype by Data-Independent Acquisition. *Current Protocols*, 1(2).
- Ng, N., & Rogers, M. A. (2019). Surfactants. İçinde *Encyclopedia of Food Chemistry* (ss. 276-282). Elsevier.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., & Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(2), 126-131.
- Nöth, U., Osyczka, A. M., Tuli, R., Hickok, N. J., Danielson, K. G., & Tuan, R. S. (2002). Multilineage mesenchymal differentiation potential of human

- trabecular bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 20(5), 1060-1069.
- Ocansey, D. K. W., Pei, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., Xu, W., & Mao, F. (2020). Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: an update. *Journal of Translational Medicine*, 18(1), 42.
- Octadecylamine-PubChem. (t.y.). 13 Ocak 2024 tarihinde <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Octadecylamine> adresinden erişildi.
- Oliveira, A. V., Bitoque, D. B., & Silva, G. A. (2014). Combining Hyaluronic Acid with Chitosan Enhances Gene Delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1-9.
- Oliynyk, R. T., & Church, G. M. (2022a). Efficient modification and preparation of circular DNA for expression in cell culture. *Communications Biology*, 5(1), 1393.
- Oliynyk, R. T., & Church, G. M. (2022b). Efficient modification and preparation of circular DNA for expression in cell culture. *Communications Biology*, 5(1), 1393.
- Ortega-Oller, I., Padial-Molina, M., Galindo-Moreno, P., O'Valle, F., Jódar-Reyes, A. B., & Peula-García, J. M. (2015). Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *BioMed Research International*, 2015, 1-18.
- Oryan, A., & Alidadi, S. (2018). Reconstruction of radial bone defect in rat by calcium silicate biomaterials. *Life Sciences*, 201, 45-53.
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), 581-593.
- Pan, L., Zhu, X.-D., Xie, X.-M., & Liu, Y.-T. (2015). Delicate ternary heterostructures achieved by hierarchical co-assembly of Ag and Fe₃O₄ nanoparticles on MoS₂ nanosheets: morphological and compositional synergy in reversible lithium storage. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(6), 2726-2733.

- Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), 170-184.
- Park, K. (2008). Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 2653.
- Patel, D. M., Shah, J., & Srivastava, A. S. (2013). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells International*, 2013, 1-15.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 71.
- Pedrosa, M. C. G., Dutra Filho, J. C., Menezes, L. R. de, & Silva, E. O. da. (2020). Chemical Surface Modification and Characterization of Carbon Nanostructures Without Shape Damage. *Materials Research*, 23(2).
- Pezzoli, D., Giupponi, E., Mantovani, D., & Candiani, G. (2017). Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Scientific Reports*, 7(1), 44134.
- Pijlman, G. P., Suhrbier, A., & Khromykh, A. A. (2006). Kunjin virus replicons: an RNA-based, non-cytopathic viral vector system for protein production, vaccine and gene therapy applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 6(2), 135-145.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Pooja, D., Tunki, L., Kulhari, H., Reddy, B. B., & Sistla, R. (2015). Characterization, biorecognitive activity and stability of WGA grafted lipid

- nanostructures for the controlled delivery of Rifampicin. *Chemistry and Physics of Lipids*, 193, 11-17.
- Prockop, D. J. (1997). Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science*, 276(5309), 71-74.
- Qaseem, A., Forciea, M. A., McLean, R. M., & Denberg, T. D. (2017). Treatment of Low Bone Density or Osteoporosis to Prevent Fractures in Men and Women: A Clinical Practice Guideline Update From the American College of Physicians. *Annals of Internal Medicine*, 166(11), 818.
- Qian, Q., Qian, H., Zhang, X., Zhu, W., Yan, Y., Ye, S., Peng, X., Li, W., Xu, Z., Sun, L., & Xu, W. (2012). 5-Azacytidine Induces Cardiac Differentiation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells by Activating Extracellular Regulated Kinase. *Stem Cells and Development*, 21(1), 67-75.
- Qin, Y., Guan, J., & Zhang, C. (2014). Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgraduate Medical Journal*, 90(1069), 643-647.
- Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683-692.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001). Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *New England Journal of Medicine*, 344(5), 385-386.
- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., & Mobasheri, H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular biology research communications*, 5(4), 257-261.
- Ramezani, A., & Hawley, R. G. (2002). Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Current Protocols in Molecular Biology*, 60(1).
- Ramos-Murillo, A. I., Rodríguez, E., Beltrán, K., Ricaurte, C., Camacho, B., Salguero, G., & Godoy-Silva, R. D. (2020). Efficient Non-Viral Gene Modification of Mesenchymal Stromal Cells from Umbilical Cord Wharton's Jelly with Polyethylenimine. *Pharmaceutics*, 12(9), 896.

- Redpath, G. M. I., Betzler, V. M., Rossatti, P., & Rossy, J. (2020). Membrane Heterogeneity Controls Cellular Endocytic Trafficking. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- Rejman, J., Conese, M., & Hoekstra, D. (2006). Gene Transfer by Means of Lipo- and Polyplexes: Role of Clathrin and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Journal of Liposome Research*, 16(3), 237-247.
- Ridolfi, D. M., Marcato, P. D., Machado, D., Silva, R. A., Justo, G. Z., & Durán, N. (2011). In vitro cytotoxicity assays of solid lipid nanoparticles in epithelial and dermal cells. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, 012032.
- Rodrigues, E. M., Gomes-Cornélio, A. L., Soares-Costa, A., Salles, L. P., Velayutham, M., Rossa-Junior, C., Guerreiro-Tanomaru, J. M., & Tanomaru-Filho, M. (2017). An assessment of the overexpression of BMP-2 in transfected human osteoblast cells stimulated by mineral trioxide aggregate and Biodentine. *International Endodontic Journal*, 50(S2).
- Rompicharla, S. V. K., Bhatt, H., Shah, A., Komanduri, N., Vijayasarathy, D., Ghosh, B., & Biswas, S. (2017). Formulation optimization, characterization, and evaluation of in vitro cytotoxic potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles for improved anticancer activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, 208, 10-18.
- Saeedi, P., Halabian, R., & Imani Fooladi, A. A. (2019). A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investigation*, 6, 34-34.
- Saleh, M., Fotook Kiaei, S. Z., & Kavianpour, M. (2022). Application of Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells in patients with pulmonary fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 71.
- Samulski, R. J., & Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annual Review of Virology*, 1(1), 427-451.
- Sánchez-Arribas, N., Martínez-Negro, M., Aicart-Ramos, C., Tros de Ilarduya, C., Aicart, E., Guerrero-Martínez, A., & Junquera, E. (2021). Gemini Cationic Lipid-Type Nanovectors Suitable for the Transfection of Therapeutic Plasmid

- DNA Encoding for Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin-12. *Pharmaceutics*, 13(5), 729.
- SARI, A. S., DEMİRÇAY, E., ÖZTÜRK, A., TERZİ, A., & KARAÖZ, E. (2021). The promising effects of BMP2 transfected mesenchymal stem cells on human osteosarcoma. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 45(3), 301-313.
- Schambach, A., & Morgan, M. (2016). *Retroviral Vectors for Cancer Gene Therapy* (ss. 17-35).
- Schubert, M. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(1), 125-131.
- Scioli Montoto, S., Muraca, G., & Ruiz, M. E. (2020). Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7.
- Severino, P., Santana, M. H. A., & Souto, E. B. (2012). Optimizing SLN and NLC by 22 full factorial design: Effect of homogenization technique. *Materials Science and Engineering: C*, 32(6), 1375-1379.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. *Journal of Physical Science*, 25(1), 59-75.
- Shah, S., Ghosh, D., Otsuka, T., & Laurencin, C. T. (2023). Classes of Stem Cells: From Biology to Engineering. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*.
- Shakhbazau, A. V., Sevyaryn, I. N., Goncharova, N. V., Grinev, V. V., Kosmacheva, S. M., & Potapnev, M. P. (2008). Viral Vectors for Stable Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells: Systems Based on Adeno-Associated Viruses and Lentiviruses. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 146(4), 531-533.
- Shang, Y., Guan, H., & Zhou, F. (2021). Biological Characteristics of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Its Therapeutic Potential for Hematological Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.

- Shim, J., Kim, K.-T., Kim, K. G., Choi, U.-Y., Kyung, J. W., Sohn, S., Lim, S. H., Choi, H., Ahn, T.-K., Choi, H. J., Shin, D.-E., & Han, I. (2021). Safety and efficacy of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells with teriparatide for osteoporotic vertebral fractures: A phase I/IIa study. *Stem Cells Translational Medicine*, 10(4), 554-567
- Simmons, P. J., & Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78(1), 55-62.
- Singh, N., & Tschärke, D. C. (2020). Herpes Simplex Virus Latency Is Noisier the Closer We Look. *Journal of Virology*, 94(4).
- Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R., & Such, G. K. (2019). The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 30(2), 263-272.
- Solchaga, L. A., Penick, K. J., & Welter, J. F. (2011). *Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks* (ss. 253-278).
- Sordi, M. B., Curtarelli, R. B., da Silva, I. T., Fongaro, G., Benfatti, C. A. M., de Souza Magini, R., & Cabral da Cruz, A. C. (2021). Effect of dexamethasone as osteogenic supplementation in in vitro osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32(1), 1.
- Sottile, V., Halleux, C., Bassilana, F., Keller, H., & Seuwen, K. (2002). Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*, 30(5), 699-704.
- Sousa, F., Prazeres, D. M. F., & Queiroz, J. A. (2009). Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *The Journal of Gene Medicine*, 11(1), 79-88.
- Souto, E. B., Doktorovova, S., Zielinska, A., & Silva, A. M. (2019). Key production parameters for the development of solid lipid nanoparticles by high shear homogenization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 24(9), 1181-1185.

- Stegner, M., Flörl, A., Lindner, J., Plangger, S., Schaefermolte, T., Strasser, A., Thoma, V., Walde, J., & Neuner, G. (2022). Freeze dehydration vs. supercooling of mesophyll cells: Impact of cell wall, cellular and tissue traits on the extent of water displacement. *Physiologia Plantarum*, 174(6).
- Sudhakar, V., & Richardson, R. M. (2019). Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics*, 16(1), 166-175.
- Suk, K. T., Yoon, J., Kim, M. Y., Kim, C. W., Kim, J. K., Park, H., Hwang, S. G., Kim, D. J., Lee, B. S., Lee, S. H., Kim, H. S., Jang, J. Y., Lee, C., Kim, B. S., Jang, Y. O., Cho, M. Y., Jung, E. S., Kim, Y. M., Bae, S. H., & Baik, S. K. (2016). Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology*, 64(6), 2185-2197.
- Suter, F., Schmid, D., Wandrey, F., & Züllig, F. (2016). Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 108, 304-309.
- Sveiven, S. N., & Nordgren, T. M. (2020). Lung-resident mesenchymal stromal cells are tissue-specific regulators of lung homeostasis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 319(2), L197-L210.
- Syková, E., Rychmach, P., Drahorádová, I., Konrádová, Š., Růžicková, K., Voříšek, I., Forostyak, S., Homola, A., & Bojar, M. (2017). Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplantation*, 26(4), 647-658.
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2014). Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 366-374.
- Tang, P., Virtue, S., Goie, J. Y. G., Png, C. W., Guo, J., Li, Y., Jiao, H., Chua, Y. L., Campbell, M., Moreno-Navarrete, J. M., Shabbir, A., Fernández-Real, J.-M., Gasser, S., Kemeny, D. M., Yang, H., Vidal-Puig, A., & Zhang, Y. (2021). Regulation of adipogenic differentiation and adipose tissue inflammation by interferon regulatory factor 3. *Cell Death & Differentiation*, 28(11), 3022-3035.

- Taratula, O., Kuzmov, A., Shah, M., Garbuzenko, O. B., & Minko, T. (2013). Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *Journal of Controlled Release*, 171(3), 349-357.
- Tatsis, N., & Ertl, H. C. J. (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Molecular Therapy*, 10(4), 616-629.
- Tavassoli, M., & Crosby, W. H. (1968). Transplantation of Marrow to Extramedullary Sites. *Science*, 161(3836), 54-56.
- Testa, S., Riera, C. S., Fornetti, E., Riccio, F., Fuoco, C., Bernardini, S., Baldi, J., Costantini, M., Foddai, M. L., Cannata, S., & Gargioli, C. (2020). Skeletal Muscle-Derived Human Mesenchymal Stem Cells: Influence of Different Culture Conditions on Proliferative and Myogenic Capabilities. *Frontiers in Physiology*, 11.
- Trotta, M., Debernardi, F., & Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1-2), 153-160.
- Tsai, A. I., Hong, H.-H., Lin, W.-R., Fu, J.-F., Chang, C.-C., Wang, I.-K., Huang, W.-H., Weng, C.-H., Hsu, C.-W., & Yen, T.-H. (2017). Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp. *BioMed Research International*, 2017, 1-9.
- Tsui, N. B. Y., Ng, E. K. O., & Lo, Y. M. D. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical chemistry*, 48(10), 1647-1653.
- Tuli, R., Seghatoleslami, M. R., Tuli, S., Wang, M. L., Hozack, W. J., Manner, P. A., Danielson, K. G., & Tuan, R. S. (2003). A Simple, High-Yield Method for Obtaining Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells from Trabecular Bone. *Molecular Biotechnology*, 23(1), 37-50.
- Türkoğlu, N. (2020). Kanser İmmünoterapisinde Kullanılmak Üzere Phbhhx Bazlı Katı Lipid Nanopartikül Dizaynı. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi - C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji*, 9(2), 239-248.

- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726-736.
- Valiukevičius, P., Mačiulaitis, J., Pangonytė, D., Siratavičiūtė, V., Kluszczyńska, K., Kuzaitytė, U., Insodaitė, R., Čiapienė, I., Grigalevičiūtė, R., Zigmantaitė, V., Vitkauskienė, A., & Mačiulaitis, R. (2023). Human Placental Mesenchymal Stem Cells and Derived Extracellular Vesicles Ameliorate Lung Injury in Acute Respiratory Distress Syndrome Murine Model. *Cells*, 12(23), 2729.
- van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 390(10107), 2084-2098.
- Vaquero, J., Zurita, M., Rico, M. A., Aguayo, C., Bonilla, C., Marin, E., Tapiador, N., Sevilla, M., Vazquez, D., Carballido, J., Fernandez, C., Rodriguez-Boto, G., Ovejero, M., Vaquero, J., Zurita, M., Bonilla, C., Rico, M. A., Aguayo, C., Rodríguez, A., ... Rodríguez, B. (2018). Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline. *Cytotherapy*, 20(6), 806-819.
- Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., ... Tsao, C. W. (2021). Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 143(8).
- Vladár, A. E., & Hodoroaba, V.-D. (2020). Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. În: *Characterization of Nanoparticles* (ss. 7-27). Elsevier.
- Vogt, P. K. (2012). Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nature reviews. Cancer*, 12(9), 639-648.
- Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu, O., Li, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R. C., Kang, R., Mok, J., Lee, M. J., Luu, H. L., & Shi, L. L. (2014). Bone

- Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases*, 1(1), 87-105.
- Wang, Y., You, C., Wei, R., Zu, J., Song, C., Li, J., & Yan, J. (2017). Modification of Human Umbilical Cord Blood Stem Cells Using Polyethylenimine Combined with Modified TAT Peptide to Enhance BMP-2 Production. *BioMed Research International*, 2017, 1-9.
- Weissman, I. L. (2000). Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell*, 100(1), 157-168.
- Weng, Z., Wang, Y., Ouchi, T., Liu, H., Qiao, X., Wu, C., Zhao, Z., Li, L., & Li, B. (2022). Mesenchymal Stem/Stromal Cell Senescence: Hallmarks, Mechanisms, and Combating Strategies. *Stem Cells Translational Medicine*, 11(4), 356-371.
- Wightman, L., Kircheis, R., Rossiler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., & Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *The Journal of Gene Medicine*, 3(4), 362-372.
- Woegerbauer, M., Jenni, B., Thalhammer, F., Graninger, W., & Burgmann, H. (2002). Natural Genetic Transformation of Clinical Isolates of Escherichia coli in Urine and Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 440-443.
- Wong, S. Y., & Putnam, D. (2018). The stochastic effect of polydispersity on polymeric DNA delivery vectors. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(24).
- Wu, H., Tan, J., Sun, D., Wang, X., Shen, J., Wang, S., Dai, Q., Wei, Z., Li, G., Lin, S., Luo, F., & Xie, Z. (2023). Discovery of multipotent progenitor cells from human induced membrane: Equivalent to periosteum-derived stem cells in bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*, 42, 82-93.
- Xie, S., Zhu, L., Dong, Z., Wang, X., Wang, Y., Li, X., & Zhou, W. (2011). Preparation, characterization and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: Influences of fatty acids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(2), 382-387.

- Yang, X., van der Kraan, P. M., Bian, Z., Fan, M., Walboomers, X. F., & Jansen, J. A. (2009). Mineralized Tissue Formation by BMP2-transfected Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 88(11), 1020-1025.
- Yao, H., Chu, C.-C., Sue, H.-J., & Nishimura, R. (2013). Electrically conductive superhydrophobic octadecylamine-functionalized multiwall carbon nanotube films. *Carbon*, 53, 366-373.
- Yeom, J., Kim, S. J., Jung, H., Namkoong, H., Yang, J., Hwang, B. W., Oh, K., Kim, K., Sung, Y. C., & Hahn, S. K. (2015). Supramolecular Hydrogels for Long-Term Bioengineered Stem Cell Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 4(2), 237-244.
- Yu, K., Huangfu, H., Qin, Q., Zhang, Y., Gu, X., Liu, X., Zhang, Y., & Zhou, Y. (2022). Application of Bone Marrow-Derived Macrophages Combined with Bone Mesenchymal Stem Cells in Dual-Channel Three-Dimensional Bioprinting Scaffolds for Early Immune Regulation and Osteogenic Induction in Rat Calvarial Defects. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(41), 47052-47065.
- Yu, X., Wang, Y., & Wei, T. (2013). The viscosity-reducing mechanism of organic wax additive on CRMA. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 28(4), 726-732.
- Yuan, J., Cui, L., Zhang, W. J., Liu, W., & Cao, Y. (2007). Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 28(6), 1005-1013.
- Zhang, J., & Li, L. (2005). BMP signaling and stem cell regulation. *Developmental Biology*, 284(1), 1-11.
- Zhang, Y., Cheng, N., Miron, R., Shi, B., & Cheng, X. (2012). Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials*, 33(28), 6698-6708.
- Zhou, H., He, Y., Xiong, W., Jing, S., Duan, X., Huang, Z., Nahal, G. S., Peng, Y., Li, M., Zhu, Y., & Ye, Q. (2023). MSC based gene delivery methods and strategies improve the therapeutic efficacy of neurological diseases. *Bioactive Materials*, 23, 409-437.

- Zhou, X., Hong, Y., Zhang, H., & Li, X. (2020). Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8.
- Zhu, Y., Inada, H., Hartschuh, A., Shi, L., Della Pia, A., Costantini, G., Vázquez de Parga, A. L., Miranda, R., Barbier, A., Mocuta, C., Belkhou, R., Bhushan, B., Hoo, J. H., Park, K. S., Baskaran, R., Böhringer, K. F., Lu, W., Nosonovsky, M., Ham, M.-H., ... Tsuda, S. (2012). Solid Lipid Nanoparticles - SLN. İçinde *Encyclopedia of Nanotechnology* (ss. 2471-2487). Springer Netherlands.
- Zielińska, A., Costa, B., Ferreira, M. V., Miguéis, D., Louros, J. M. S., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., V. Chaud, M., Morsink, M., Willemen, N., Severino, P., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-by-Design and Testing at a Glance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4657.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Aydın, Ş., & Türkoğlu, N. (2023). Kemik Morfogenetik Protein-2 Geninin Lipid Bazlı Nanopartikül ile Mezenkimal Kök Hücrelere Transfeksiyonu. *11th International Congress of Academic Research (ICAR)* (s. 249-250). Ankara, Türkiye: Asos Yayınevi.

Projeler

1. BAP, Yüksek Lisans Tez Projesi, Proje No: FYL-2023-5486, Türkoğlu N. (Yürütücü), Aydın Ş. (Araştırmacı), Kemik Morfogenetik Protein-2 Geninin Lipid Bazlı Nanopartikül ile Mezenkimal Kök Hücrelere Transfeksiyonu. 18.01.2023-Süresi: 12 Ay.