



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**DOĞAL VE SENTETİK BİYOUYUMLU POLİMERİK
NANOPARTİKÜLER GEN TAŞIYICI SİSTEMLERİN ELDE
EDİLMESİ VE TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

**Kim.Yük.Müh. M.Koray GÖK
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Kimyasal Teknolojiler Programı**

Danışman

Prof.Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU

İkinci Danışman

Doç.Dr. Erdal CEVHER

Ekim, 2012

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**DOĞAL VE SENTETİK BİYOUYUMLU POLİMERİK
NANOPARTİKÜLER GEN TAŞIYICI SİSTEMLERİN ELDE
EDİLMESİ VE TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

**Kim.Yük.Müh. M.Koray GÖK
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Kimyasal Teknolojiler Programı**

Danışman

Prof.Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU

İkinci Danışman

Doç.Dr. Erdal CEVHER

Ekim, 2012

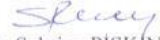
İSTANBUL

2602070084 Öğrenci numaralı M. Koray GÖK tarafından hazırlanan bu çalışma 18/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Kimyasal Teknolojiler programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof.Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Sabriye PIŞKIN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



Prof.Dr. Gamze GÜÇLÜ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr.M.Ali GÜRKAYNAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof.Dr. Ferdane KARAMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 7383 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öğrenci asistanlığımdan bugüne kadar her zaman her konuda her türlü desteğini, ilgisini esirgemeyen, beni yetiştiren, bilime bakış açımı değiştiren çok Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU'na teşekkür ederim

Yine bu çalışmayı hazırlamamda yardımlarını esirgemeyen, bana her zaman her konuda düşünmeden arka çıkan çok Değerli Hocam İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknolojiler Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Erdal Cevher'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamda en az diğer hocalarım kadar yardımlarını, yönlendirmelerini esirgemeyen, transfeksiyon çalışmaları için Anabilim Dalı imkanlarını sonuna kadar kullanmamı sağlayan çok Değerli Hocam İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU'na teşekkür ederim.

Sayın Dr. Kamber DEMİR'e ayrı özel bir sayfa açmam gerekir, gecesini gündüzüne katıp bu çalışmayı daha başarılı kılmak için benimle birlikte koşan, en sıkıntılı anlarımda yanımda desteğini esirgemeyen bana ağabeylik eden İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sayın Dr. Kamber DEMİR'e çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar yurtdışında ve yurtiçinde edindiği tecrübelerini bana anlatan ve uygulatan, aynı zamanda çalışmada plasmit genin üretilme yöntemini uygulamamı ve HEK293 hücrelerini çoğaltmayı öğreten Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Öğretim Üyesi Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Kadir TURAN'a teşekkür ederim.

Tez izleme komitemde yer alan ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sabriye PİŞKİN Hocam ve Sayın Prof. Dr. Gamze GÜÇLÜ Hocam'a teşekkür ederim.

Başka projelerde de beraber yer aldığımız, zeta potansiyeli, boyut ve dağılım analizlerini yaptığım Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknolojiler Anabilim Dalı araştırma grubundan Sayın Araş.Gör. Melike DURAN SESSEVMEZ'e, Sayın Deniz MORİNA'ya ve Sayın Genada SİNANİ'ye desteklerini esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Sitotoksisite testlerini gerçekleştirmemi sağlayan İ.Ü.DTEAE Müdürü Sayın Prof.Dr. Uğur ÖZBEK, Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Duran ÜSTEK Hocam ve Sayın Araş.Gör. Aris ÇAKİRİS'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Sitotoksosite testlerinde alınan sonuçların istatistiksel analizlerinde yardımcı olan Endüstri Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yard.Doç.Dr. Funda Hatice SEZGİN'e teşekkür ederim.

SEM analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Sayın Doç.Dr. Faruk ÖKSÜZÖMER Hocam başta olmak üzere Sayın Araş.Gör. Hasan ÖZDEMİR ve Sayın Kimya Yük. Müh. Vedat SARIBOĞA'ya teşekkür ederim.

Jel elektroforez çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen İ.Ü.Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sayın Eda ALTAN'a teşekkür ederim.

Bu multidisipliner tez çalışmasının kabulü ve uygulanmasında desteklerini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Müdürü Sayın Prof. Dr. M.Ali GÜRKAYNAK Hocam'a, yönetim kurulu üyelerine ve Prof.Dr. İsmail KIRBAŞLAR Hocam'a teşekkür ederim

Bu tez çalışmasında, farklı Fakültelerdeki deneyleri gerçekleştirdiğim sürelerde göstermiş olduğu anlayış için Kimya Mühendisliği Bölüm Başkanı ve Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet KAŞGÖZ Hocam'a teşekkür ederim.

Desteklerini esirgemeyen Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Arkadaşlarıma, en zor anlarımda yardımına koşan dostlarıma, aileme ve ailemizin en küçük ferdi olan ve yanında her zaman bulunduğumda bana bütün imkanlarını (oyuncaklarını) seferber ederek bu dünyayı unutturan yeğenim Orkun Berke ŞİMŞEK'e çok teşekkür ederim.

Hayatıma adım attığı günden beri desteğini esirgemeyen, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan eşim Araş.Gör.Dr. Aslı GÖK'e sonsuz teşekkür ederim.

Ekim, 2012

Mehmet Koray GÖK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvi
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1 GEN VE GENOM YAPISI	2
2.1.1 Nükleik Asitler ve Deoksiribonükleik Asit (DNA)	2
2.1.1.1 Plasmid DNA (p-DNA)	3
2.1.1.2 Yeşil Floresans Protein (Green Floresans Protein) (GFP)	4
2.2 GEN TERAPİ	5
2.2.1 Viral Vektörler	6
2.2.2 Viral Olmayan (Non-Viral) Taşıyıcılar	9
2.3 VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARDA GEN TRANSFERİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	11
2.3.1 Yüzey Yükü ve Zeta Potansiyeli	11
2.3.2 Nanopartikül ve Partikül Boyutu	14
2.3.2.1 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	16
2.4 POLİMERİK TAŞIYICILARLA GEN TRANSFERİ	19
2.4.1 Gen Paketleme	19
2.4.1.1 Elektrostatik Etkileşim	20
2.4.1.2 Enkapsülasyon	21
2.4.1.3 Adsorbsiyon	22

2.4.2 Hücre Girişi	22
2.4.2.1 Hedeflendirilmiş Alım	23
2.4.2.2 Spesifik Olmayan Alım	24
2.4.2.3 Hücreye Nüfuz Edici Peptid-Ortamlı Alım.....	24
2.4.3 Endo-Lizozomal Kaçış	24
2.4.4 Sitosolik Taşıma ve Çekirdek İçine Aktarım	25
2.4.5 Gen İfadesi	25
2.4.6 DNA/Vektör Ayrışması.....	26
2.4.6.1 Isıya duyarlı polimerler	26
2.4.6.2 Disülfid Bağları	27
2.4.6.3 Ester Bağları.....	28
2.4.6.4 Yük İndirgenmesi veya Modifikasyonu.....	28
2.4.7 Biyouyumluluk	29
2.4.7.1 Sistemin Kandaki Stabilitesi.....	29
2.4.7.2 Sitotoksite	31
2.5 GEN TRANSFERİ İÇİN UYGUN POLİMERİK TAŞIYICI SİSTEMİN SEÇİLMESİ.....	31
2.5.1. Tez Çalışmasında Gen Transferi İçin Kullanılan Doğal ve Sentetik Polimerler	33
2.5.1.1 Poli(β -amino esterler).....	33
2.5.1.2 Kitosan	34
2.5.1.3 İndirgenebilen-Duyarlı Polimerler	37
2.6 KAYNAKLARDA DOĞAL VE SENTETİK BİYOUYUMLU GEN TAŞIYICI NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN ELDE EDİLMESİNE VE UYGULAMASINA AİT YAPILAN ÇALIŞMALAR	38
2.7 ÇALIŞMANIN ÖZGÜN YÖNÜ.....	43
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	44
3.1 KİMYASAL MADDELER.....	44
3.2 CİHAZLAR VE YÖNTEM.....	45
3.2.1 PBAE Bileşiklerinin Elde Edilmesi Yöntemi ve Reaksiyon Sistemi.....	45
3.2.2 Modifiye Kitosan (MK) ve İndirgenebilir Modifiye Kitosan (İMK) Bileşiklerinin Elde Edilmesi Yöntemi ve Reaksiyon Sistemi	45
3.2.3 PBAE ve Modifiye Kitosan Esaslı Ürünlerin Karakterizasyonu.....	45

3.2.4 PBAE ve Modifiye Kitosan Esaslı Ürünlerden Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması	46
3.2.4.1 PBAE Ürünlerinden Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması.....	46
3.2.4.2 MK ve İMK Bileşiklerinden Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması	46
3.2.5 GFP Taşıyan pDNA Eldesi	47
3.2.5.1 Lizojeni Besiyeri Hazırlanması (Bakteriler İçin) (LB Besiyeri).....	47
3.2.6 pDNA Genini Taşıyan Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması	49
3.2.7 nPBAE, ignPBAE, egnPBAE, nMK, nİMK, gnMK ve gnİMK Ürünlerine Uygulanan Testler ve Kullanılan Cihazlar	49
3.2.7.1 Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi (Partikül Boyutu Dağılımı) (PDI) Analizleri	49
3.2.7.2 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi	50
3.2.7.3 pDNA Genini Taşıyan Nanopartiküler Sistemlerin Jel Elektroforez Analizleri	50
3.3 NPBAE ÜRÜNLERİNİN HÜCRE İÇİNE ALIM, NPBAE, NMK VE NİMK ÜRÜNLERİNİN SİTOTOKSİSİTE VE İGNPBAE, EGNPBAE, GNMK VE GNİMK ÜRÜNLERİNİN <i>İN VİTRO</i> TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARI	50
3.3.1 Hücre İçine Alım ve Transfeksiyon Çalışmaları İçin Solüsyon Hazırlanması [117]	50
3.3.1.1 DMEM-Stok;	50
3.3.1.2 FCS İçeren DMEM (DMEM+FCS);	51
3.3.1.3 FCS İçermeyen DMEM (DMEM-FCS);	51
3.3.1.4 Hücre Dondurma Medyumı;	51
3.3.2 Primer Koyun Fibroblast (POF), Primer Koyun Embryonik Fibroblast (POEF), İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) Hücrelerinin Hazırlanması	51
3.3.2.1 Hücrelerin Eritilmesi ve Kullanımı;	51
3.3.2.2 Hücrelerin Dondurulması;	53
3.3.3 nPBAE Ürününün Hücre içine Alımı ve Dağılımı Çalışması	53
3.3.4 Gerçek Zamanlı Hücre Analizöründe (RTCA) Sitotoksosite Çalışmaları	53
3.3.4.1 Sitotoksosite Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	55
3.3.5 Nanopartiküler Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliğinin İncelenmesi	55

4. BULGULAR	57
4.1 PBAE POLİMERLERİNİN ELDE EDİLMESİNDEKİ OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARINA AİT DENEMELER.....	57
4.1.1 PBAE_{1A} Polimeri ile Nanopartikül (nPBAE) Hazırlama Yönteminin Optimizasyonu Çalışmaları.....	57
4.1.1.1 PBAE _{1A} ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının (nPBAE) Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	59
4.1.2 PBAE_{1A}-PBAE_{1F} Polimerlerinden Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması.....	59
4.1.2.1 PBAE _{1A} -PBAE _{1F} Polimerlerinden Elde Edilen Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	60
4.2 PBAE POLİMERLERİNİN FARKLI DİAKRİLAT BİLEŞİĞİ KULLANILARAK ELDE EDİLMESİNE AİT DENEMELER	61
4.2.1 Farklı Diakrilat Bileşikleri Kullanılarak Elde Edilen PBAE Polimerlerinin FTIR Analiz Sonuçları.....	61
4.2.2 Farklı Diakrilat Bileşikleri Kullanılarak Elde Edilen PBAE Polimerlerinden (PBAE₂-PBAE₈) Nanopartikül (nPBAE) Formülasyonlarının Hazırlanması	61
4.2.2.1 PBAE ₁ -PBAE ₈ Polimerleri ile Hazırlanmış Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	63
4.2.3 PBAE₆ Polimeri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Optimizasyonu.....	64
4.2.3.1 PBAE ₆ Polimeri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	65
4.2.4 PBAE₁-PBAE₈ Polimerleri ile Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması.....	65
4.2.4.1 PBAE ₁ -PBAE ₈ Polimerleri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	66
4.2.5 PBAE₅-PBAE₆ Polimerleri ile Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasında Çözücünün, Ortamda Bulunan İyonların ve Yüksek Karıştırma Hızının Etkisinin İncelenmesi.....	67
4.2.5.1 PBAE ₅ -PBAE ₆ Polimerleri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	68

4.2.6 PBAE ₆ Polimeri Kullanılarak Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilitelerinin İncelenmesi.....	72
4.3 MK VE İMK ÜRÜNLERİNİN ELDE EDİLMESİNE AİT DENEMELER.....	72
4.3.1 MK ve İMK Ürünlerinin FTIR Analiz Sonuçları.....	72
4.3.2 MK ve İMK Polimerleri ile nMK ve nİMK Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	73
4.3.2.1 nMK ve nİMK Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular.....	74
4.4 PDNA TAŞIYAN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ (GNPBAE) HAZIRLANMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ.....	76
4.4.1 pDNA Taşıyan Nanopartikül Formülasyonlarının (gnPBAE) İyonik Etkileşim Mekanizmasına Göre Hazırlanması (ignPBAE).....	76
4.4.1.1 nPBAE ₃₅ -nPBAE ₃₈ Formülasyonları ile Hazırlanmış pDNA Yüklü Nanopartiküllerin (ignPBAE) Zeta Potansiyeli Değerleri.....	77
4.4.2 pDNA Taşıyan Nanopartikül Formülasyonlarının (gnPBAE) Enkapsülasyon Yöntemi ile Hazırlanması (egnPBAE).....	79
4.4.2.1 nPBAE ₃₈ Formülasyonu Kullanılarak Hazırlanmış egnPBAE Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyeli, Partikül Boyutu ve Dağılımına Ait Bulgular.....	80
4.4.2.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Görüntüleri.....	80
4.4.2.3 ignPBAE ₃₅ , ignPBAE ₃₈ , egnPBAE, gnMK ve gnİMK Formülasyonlarına Ait Jel Elektrophoretik Sonuçları	83
4.5 NPBAE FORMÜLASYONLARININ HÜCRE İÇİNE ALIMI, NPBAE, NMK VE NİMK FORMÜLASYONLARININ SİTOTOKSİSİTE VE <i>İN VİTRO</i> TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARINA AİT DENEMELER.....	86
4.5.1 nPBAE Formülasyonlarının Hücre İçine Alım Çalışması	86
4.5.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazında (RTCA) Sitotoksiste Çalışmaları	89
4.5.2.1 Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksiste Hücre İndeksi Sonuçlarının İstatistiksel Analizine Ait Bulgular	94
4.5.3 Nanopartikül Formülasyonlarının Transfeksiyon Etkinliğine Ait Bulgular.....	97
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	118

5.1 PBAE ÜRÜNLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BUNLARDAN ELDE EDİLEN NPBAE NANOPARTİKÜLLERİNİN ZETA POTANSİYELİ, PARTİKÜL BOYUTU VE DAĞILIMI.....	119
5.2 MK VE İMK POLİMERLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BUNLARDAN ELDE EDİLEN NMK VE NİMK NANOPARTİKÜLLERİNİN ZETA POTANSİYELİ, POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ (PDI) VE BOYUT ANALİZİ.....	124
5.3 PDNA TAŞIYAN NPBAE (İGNPBAE₃₅, İGNPBAE₃₈ VE EGNPBAE) NANOPARTİKÜLLERİNİN ZETA POTANSİYELİ VE BU ÜRÜNLERLE BİRLİKTE KİTOSAN, GNMK VE GNİMK NANOPARTİKÜLLERİNİN JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARI.....	126
5.4 PBAE, MK VE İMK POLİMERLERİNDEN ELDE EDİLEN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ SİTOTOKSİSİTESİ	127
5.4.1 PBAE, MK ve İMK Polimerlerinden Elde Edilen Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksiste Analizi Hücre İndeksi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	129
5.5 NPBAE NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ SONUÇLARI.....	130
5.6 SONUÇLAR VE İLERİYE YÖNELİK ÖNERİLER	133
KAYNAKLAR	135
ÖZGEÇMİŞ.....	147

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Nükleotit şematik görünümü	2
Şekil 2.2 : GFP moleküler yapısı	5
Şekil 2.3 : Viral taşıyıcılardan adenovirüs ile gerçekleştirilen gen terapi işleminin şematik görünümü	7
Şekil 2.4 : Viral olmayan taşıyıcılardan polipleksin şematik görünümü	10
Şekil 2.5 : Zeta potansiyeli gösterimi	13
Şekil 2.6 : Kolloidal sistemlerin kararlılığını ifade eden pH değerlerine karşılık zeta potansiyeli değerleri	13
Şekil 2.7 : Nanoteknolojinin günümüzdeki bazı uygulama alanları	15
Şekil 2.8 : Gen terapi işleminde kullanılan viral-olmayan polimerik taşıyıcıların şematik görünümleri	15
Şekil 2.9 : Nanopartikül hazırlama metotları	17
Şekil 2.10 : Nanoçöktürme yöntemi şematik görünümü	18
Şekil 2.11 : Viral olmayan taşıyıcılarla gen transferi şematik görünümü	19
Şekil 2.12 : Endo/Lizozomal kaçış	25
Şekil 2.13 : Transkripsiyon ve Translasyon işlemlerinin şematik görünümü	26
Şekil 2.14 : a) Elektrostatik ile disülfid bağlarının bağlanması, b) Disülfid bağlarının çapraz bağlanması, c) Polimer zinciri içerisinde doğrudan disülfid bağlarının yer alması	28
Şekil 2.15 : PEG/pHPMA zincirlerinin polipleks ile reaksiyonları	30
Şekil 2.16 : Poli(β -amino ester) sentezi	33
Şekil 2.17 : Kitosan-DNA komplekslerinin transfeskiyon verimliliğine etki eden faktörler	36
Şekil 2.18 : İndirgenabilir-Duyarlı polimerlerin gen transferi	38
Şekil 3.1 : A: Thoma Lam iç görünümü, B: Thoma Lam hücre görünümü	52
Şekil 3.2 : Gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) şematik görünümü	54
Şekil 3.3 : RTCA'dan alınan zamana bağlı hücre indeksi grafiği	55

Şekil 4.1 : nPBAE ₃₇ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği	69
Şekil 4.2 : nPBAE ₃₇ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği	69
Şekil 4.3 : nPBAE ₃₈ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği	70
Şekil 4.4 : nPBAE ₃₈ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği	70
Şekil 4.5 : nPBAE ₃₉ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği	70
Şekil 4.6 : nPBAE ₄₀ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği	71
Şekil 4.7 : nPBAE ₄₀ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği	71
Şekil 4.8 : nPBAE ₄₁ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği	71
Şekil 4.9 : nPBAE ₃₅ formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x240.000)	81
Şekil 4.10 : nPBAE ₃₈ formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x120.000)	81
Şekil 4.11 : nPBAE ₂₇ formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x240.000)	82
Şekil 4.12 : nMK formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x240.000)	82
Şekil 4.13 : nİMK formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x250.000)	83
Şekil 4.14 : ignPBAE ₃₅ , ignPBAE ₃₈ ve egnPBAE formülasyonlarına ait jel elektroforez görüntüleri	84
Şekil 4.15 : gnMK ve gnİMK formülasyonlarına ait jel elektroforez görüntüleri	85
Şekil 4.16 : Hücre içerisine ve çekirdeğine yönelmeye çalışan boya yüklü nanopartiküllerin görüntüsü	87
Şekil 4.17 : A, C, E: Fibroblast hücre kesit görüntüsü, B: Non-iyonik surfaktan içeren grup boyama denemesi, D: Non-iyonik surfaktan içermeyen grup boyama denemesi, F: boyanın su fazında olduğu non-iyonik surfaktan içermeyen grup boyama denemesi, G : tek başına boya uygulaması	87
Şekil 4.18 : Polietileniminden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi	89
Şekil 4.19 : PBAE ₆ polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi	90
Şekil 4.20 : Kitosandan hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi	90
Şekil 4.21 : MK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi	91
Şekil 4.22 : İMK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi	91

Şekil 4.23 : Polietileniminden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi	92
Şekil 4.24 : PBAE ₆ polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi	92
Şekil 4.25 : Kitosandan hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi	93
Şekil 4.26 : MK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi	93
Şekil 4.27 : İMK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi	94
Şekil 4.28 : ignPBAE ₃₅ formülasyonu; polimer:gen oranı 1,2:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri	99
Şekil 4.29 : ignPBAE ₃₅ formülasyonu; polimer:gen oranı 1,2:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri	99
Şekil 4.30 : ignPBAE ₃₈ formülasyonu; polimer:gen oranı 68,1:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri	102
Şekil 4.31 : ignPBAE ₃₈ formülasyonu; polimer:gen oranı 68,1:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri	102
Şekil 4.32 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 5:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	104
Şekil 4.33 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 10:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	104
Şekil 4.34 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 40:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	105
Şekil 4.35 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 60:1 (a/a) toksik HEK293 hücreleri	105
Şekil 4.36 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen Oranı 5:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri	107
Şekil 4.37 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen Oranı 5:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri	107
Şekil 4.38 : egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 40:1 (a/a), POF hücrelerine toksisitesi	108

Şekil 4.39 : Kitosan; polimer-gen oranı 3:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	110
Şekil 4.40 : Kitosan; polimer-gen Oranı 3:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	110
Şekil 4.41 : gnMK formülasyonu; polimer:gen oranı 7:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	114
Şekil 4.42 : gnMK formülasyonu; polimer:gen oranı 7:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	114
Şekil 4.43 : gnMK formülasyonu; polimer:gen oranı 7:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri	117

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Gen transferinde kullanılan viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları	8
Tablo 2.2 : Gen transferinde en çok kullanılan polimer taşıyıcılar	21
Tablo 2.3 : Gen transferinde kullanılan ligandlar	23
Tablo 4.1 : PBAE ₁ polimeri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri	59
Tablo 4.2 : PBAE _{1A} -PBAE _{1F} polimerlerinden elde edilen nanopartikül formülasyonlarına ait partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri	61
Tablo 4.3 : PBAE ₁ -PBAE ₈ polimerleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri	63
Tablo 4.4 : PBAE ₆ polimeri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri	65
Tablo 4.5 : PBAE ₁ -PBAE ₈ polimerleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri	67
Tablo 4.6 : PBAE ₅ -PBAE ₆ polimerleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri	69
Tablo 4.7 : PBAE ₆ polimeri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının stabiliteeri	72
Tablo 4.8 : nMK nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan formülasyon parametreleri	73
Tablo 4.9 : nİMK nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan formülasyon parametreleri	74

Tablo 4.10 : nMK nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri	75
Tablo 4.11 : nİMK nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri	75
Tablo 4.12 : nPBAE ₃₅ nanopartikülü ile pDNA birleşme oranları.....	76
Tablo 4.13 : nPBAE ₃₈ nanopartikülü ile pDNA birleşme oranları.....	77
Tablo 4.14 : nPBAE ₃₅ nanopartikülü ile hazırlanan pDNA yüklü formülasyonlara (ignPBAE) ait zeta potansiyeli değerleri	78
Tablo 4.15 : nPBAE ₃₈ nanopartikülü ile hazırlanan pDNA yüklü formülasyonlara (ignPBAE) ait zeta potansiyeli değerleri	79
Tablo 4.16 : nPBAE ₃₈ nanopartikül formülasyonuna pDNA yükleme oranları.....	80
Tablo 4.17 : nPBAE ₃₈ formülasyonu kullanılarak hazırlanmış nanopartiküllerin (egnPBAE) zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı değerleri	80
Tablo 4.18 : nPBAE nanopartiküllerinin hücre içine alımı ve dağılımı çalışması.....	88
Tablo 4.19 : Nanopartikül formülasyonlarının HEK293 hücrelerine toksisite sonuçlarının istatistiksel analizi	95
Tablo 4.20 : PEI, MK ve İMK polimerlerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının POF8 hücrelerine toksisite sonuçlarının istatistiksel analizi.....	96
Tablo 4.21 : PEI, PBAE ₆ polimerlerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının POF8 hücrelerine toksisite sonuçlarının istatistiksel analizi.....	96
Tablo 4.22 : Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan derecelendirmeler	97
Tablo 4.23 : ignPBAE ₃₅ nanopartikül formülasyonunun POF hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları.....	98
Tablo 4.24 : ignPBAE ₃₈ nanopartikül formülasyonunun POF hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları.....	100
Tablo 4.25 : egnPBAE nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları.....	103
Tablo 4.26 : egnPBAE nanopartikül formülasyonunun POF hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları	106
Tablo 4.27 : Kitosan sitotoksitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları	109

Tablo 4.28 : gnMK formülasyonunun sitotoksitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçlar	111
Tablo 4.29 : gnMK nanopartikül formülasyonunun sitotoksitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları	115

ÖZET

DOĞAL VE SENTETİK BİYOUYUMLU POLİMERİK NANOPARTİKÜLER GEN TAŞIYICI SİSTEMLERİN ELDE EDİLMESİ VE TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Bu tezle sunulan çalışmanın başlıca amacı, bilhassa son yıllarda nanoteknolojinin biyoteknoloji alanındaki önemli bir uygulaması olan gen transferinde kullanılabilecek biyolojik olarak uyumlu (biyoyumlu) yapıdaki nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin sentezlenmesi, yapılarının aydınlatılarak, transfeksiyon etkinliğinin incelenmesidir.

Gen transferinde iki yaklaşım ortaya koyulmuştur. Bunlardan birincisi gen transferinde oldukça yüksek etkiye sahip viral taşıyıcıların kullanılmasıdır, fakat bu alanda kullanılan virüslerin yan etkilerinin oldukça fazla olmasından dolayı ikinci bir yaklaşım olan viral olmayan taşıyıcı sistemler (polimer, lipid veya lipozomlar vb.) geliştirilmiştir. Bu tez kapsamında sentezlenen viral olmayan biyoyumlu polimer taşıyıcı sistemlere “transjenik polimerler” denilmektedir. Bu tip polimerik taşıyıcı sistemlerin bir kısmı doğal polimer esaslı oldukları gibi bir kısmı da sentetik polimer esaslıdır. Bu çalışmada, ilk defa sentetik grupta biyobozunabilen yeni transjenik polimerler olan poli(β -aminoesterler) (PBAE), modifiye doğal polimer grubunda ise kitosan esaslı modifiye polimerler sentezlendi.

Bütün sentetik ve modifiye doğal polimerlerin karakterizasyonu Fourier Infrared Spektroskopisi ile gerçekleştirildi. Bununla beraber PBAE’in ve kitosan esaslı polimerlerin nanopartikülleri sırasıyla nanoçöktürme ve iyonik jelasyon yöntemi ile elde edildi. Tüm nanopartiküler sistemlerin zeta potansiyeli, polidisperslik indeksi ve partikül boyutu analizleri gerçekleştirildi. PBAE’in ve kitosan esaslı modifiye polimerlerin plasmid DNA (pDNA) ile nanopartiküler sistemleri, PBAE’de iyonik etkileşim ve enkapsülasyon yöntemi kitosan bazlı modifiye polimerlerde ise iyonik etkileşim yöntemi metodu ile hazırlandı. Bu katyonik polimerlerin pDNA bağlama kabiliyeti jel elektroforez ile incelendi. PBAE’in hücre içine alımı ve dağılım çalışmaları, primer koyun embriyonik fibroblast hücrelerinde (POEF), bir model boyarmadde olarak Rodamin-B kullanılarak gerçekleştirildi. PBAE ve modifiye kitosan polimerlerin sitotoksitesi insan embriyonik hücrelerinde (HEK293) ve primer koyun fibroblast (POF) hücrelerinde xCELLigence RTCA cihazında incelendi. Negatif ve pozitif kontrol grupları olarak sırasıyla polietilenimin (PEI) ve kitosan kullanıldı. PBAE ve modifiye kitosan polimerlerin transfeksiyon etkinliği HEK293, POF ve POEF hücrelerinde floresans mikroskopta incelendi.

Sonuç olarak, bu tezde sentezlenen PBAE ve modifiye kitosan polimerleri esaslı nanopartiküllerin HEK293, POF ve POEF hücrelerinde yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip, toksik olmayan ve viral olmayan gen taşıyıcı polimerik nanopartiküler sistemler olduğu saptandı.

SUMMARY

PREPARATION OF NATURAL AND SYNTHETIC BIOCOMPATIBLE POLYMERIC NANOPARTICULAR GENE DELIVERY SYSTEMS AND INVESTIGATION OF TRANSFECTION EFFECT

The main aim of the study presented in this thesis is the synthesis, characterization and the investigation of the transfection efficiency of the biocompatible nanoparticular carrier systems to be used gene transfer which is the important application of the nanotechnology on the biotechnology field, especially in the recent years.

In gene transfer, two approaches are put forward. The first approach is the use of the viral vectors which have a high effect in gene transfer, but the second approach which is non-viral vectors (polymer, lipid and liposome etc.), are improved because of the side effects of these viruses used in this area are rather than others. The non-viral biocompatible polymer vector systems which are synthesized in content of this thesis are called as “transgenic polymers”. As the one part of these polymeric vector systems are based on natural polymers, the other part is based on synthetic polymers. In this study, first time, poly(β -aminoester)s (PBAEs) which are the biodegradable novel transgenic polymers in the synthetic group, chitosan based modified polymers in the modified natural group are synthesized.

All synthetic and modified natural polymers were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Moreover, the nanoparticles of PBAEs and chitosan based polymers are prepared by the nanoprecipitation method and ionic gelation method, respectively. Zeta potential, polydispersity index and particle size analysis of the all nanoparticle systems were carried out. The nanoparticle systems of PBAEs and modified chitosan polymers were combined with plasmid DNA via ionic interaction and encapsulation method for PBAEs and ionic interaction method for modified chitosan polymers. The pDNA combining ability of these cationic polymers were examined by using gel electrophoresis. For the cell uptake and distribution studies of PBAEs nanoparticles in primary ovine embryonic fibroblast (POEF) were carried out using Rhodamine-B as a model dyestuff. The cytotoxicity of PBAEs and modified chitosan polymers were investigated in human embryonic kidney (HEK293) and primary ovine fibroblast (POF) using xCELLigence RTCA system. Polyethyleneimine (PEI) and chitosan were used as the negative and positive control groups, respectively. The transfection efficiency of PBAEs and modified chitosan polymers were investigated in HEK293, POF and POEF with fluorescent microscopy.

Consequently, it was determined that PBAEs and modified chitosan polymers based nanoparticles which are synthesized in this thesis, have high transfection efficiency, nontoxic and non-viral gene carrier polymeric nanoparticular vectors in HEK293, POF and POEF.

1. GİRİŞ

Transfeksiyon (gen transferi) bir genin plazmit aracılığı ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşıyıp DNA'sına yerleştirilmesi olayıdır. Bu konuda 20. yüzyılın sonlarına doğru iki yaklaşım ortaya konulmuştur. Bunlardan birincisi gen transferinde oldukça yüksek etkiye sahip viral taşıyıcıların kullanılmasıdır, fakat bu alanda kullanılan virüslerin yan etkilerinin oldukça fazla olmasından dolayı ikinci bir yaklaşım olan viral olmayan taşıyıcı sistemler (polimer, lipid veya lipozomlar vb.) geliştirilmiştir. Bu alanda kullanılan viral olmayan biyoyumlu polimer taşıyıcı sistemlere “transjenik polimerler” denilmektedir ve bu taşıyıcıların nükleik asitlerle oluşturdukları yapılara da “polipleks” denilmektedir. Bu tip polimerik taşıyıcı sistemlerin bir kısmı doğal polimer esaslı oldukları gibi bir kısmı da sentetik polimer esaslıdır (kondenzasyon ve katılma polimerleri) ve genelde dört gruba ayrılırlar. Bunlardan birincisi biyolojik olarak bozunmayan transjenik polimerler (poli-L-lizin, polietilen imin, polietilen glikol konjugatları ve siklodekstrinler vb.), ikincisi biyobozunabilen yeni transjenik polimerler poli(β -aminoesterler), poli(amidoaminler), polimidazoller, çeşitli polisakkaritler ve kitosan vb.), üçüncüsü polietilen oksit/polipropilen oksit kopolimerleri, poli(N-vinilpirolidon) ve hidroksipropil metakrilat kopolimerleri, dördüncü grup ise polimerik poli(etilen oksid) ve polialkilsiyanoakrilat nano-/mikroküreleridir [1].

Yaklaşık son 25 yılda yapılan kaynak araştırmaları ışığında, tez kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, kaynaklarda rastlanmayan kitosan esaslı doğal ve poli(β -aminoester) esaslı sentetik biyoyumlu gen taşıyıcı polimerik nanopartiküler sistemlerin sentezi gerçekleştirildi, bu transjenik polimerik taşıyıcıların yapıları aydınlatıldıktan sonra, gen transferinde kullanılabilmeleri için transfeksiyon etkinliği incelendi.

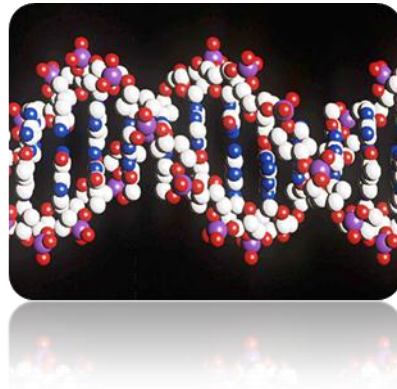
2. GENEL KISIMLAR

2.1 GEN VE GENOM YAPISI

2.1.1 Nükleik Asitler ve Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Canlının yapısal ve işlevsel özelliklerini barındıran ve en küçük yapıtaşı olan hücrede bulunan daha küçük organik moleküller dört ana gruba ayrılmaktadır; nükleotitler, aminoasitler, şekerler ve yağ asitleridir. Hücre içerisinde yer alan bu küçük organik moleküllerin yani monomerlerin bir araya gelerek kimyasal bağlarla oluşturduğu polimerik makromoleküller ise nükleik asitler, polisakkaritler ve proteinlerdir [2].

Nükleotitler yapısında şeker, baz ve fosfat grubu içermekle beraber yapıda bulunan 5 karbonlu şekerin riboz veya deoksiriboz olmasına göre ribonükleik asit (RNA) veya deoksiribonükleik asit (DNA) şeklinde isimlendirilmektedir. DNA; canlıların ve bazı virüslerin canlılık işlevlerini ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik bilgileri taşıyan nükleik asitlerdir. DNA polimeri, RNA'ya oranla daha sağlam ve kendine benzeyen yeni bir molekülü kendiliğinden şekillendirebildiğinden kalıtım materyali olmaya daha uygundur (Şekil 2.1) [2].



Şekil 2.1 Nükleotit şematik görünümü

DNA kimyasal olarak incelendiğinde, iki uzun nükleik asit polimeri arasındaki ester bağlarını içeren şeker ve fosfat gruplarından oluşmaktadır. Yapıdaki şeker gruplarına ise dört tip bazdan (adenin, timin, guanin, sitozin) biri bağlıdır ve genetik bilgi bu bazlar sayesinde kodlanır. Bu genetik kod iki şekilde taşınmaktadır. Birincisi kalıtımla ilgilidir ve bölünen hücrelerin yeni çekirdek materyalini oluşturmak için bilgi DNA'dan DNA'ya geçirilir. Diğerinde ise protein sentezi sırasında kodların çekirdekte okunmasıyla proteinlere ait aminoasit dizilimi belirlenmektedir. DNA'da yer alan bu bilgi RNA'ya kopyalanır ve bu işleme transkripsiyon denir. Her iki durumda da bilginin nakledilmesi baz eşleşme kuralıyla yeni bir zincir yapısının oluşmasıyla gerçekleşmektedir.

2.1.1.1 Plasmid DNA (*p*-DNA)

İnsanları ve hayvanları içeren gen terapi ve gen transfer denemelerinin başlarında özellikle hücresel uygulamalarda terapötik gen taşıyıcı olarak viral vektörler kullanılmaktaydı. Aslında, viral vektörlerin, endojen virüslerle etkileşimi, rekombinasyonu ve entegre olma kabiliyeti, ilk uygulamalarda güvenli bulunmuştur. Fakat zaman ilerledikçe yapılan denemelerle birlikte bu taşıyıcıların güvenli olmadığı birçok yönden saptanmıştır.

Plasmidler; Martin Cline tarafından yapılan talasemi çalışmaları gibi ilk insan denemelerinde, rekombinant DNA teknoloji uygulamaları bakımından oldukça başarılı sonuçlar vermiştir [3].

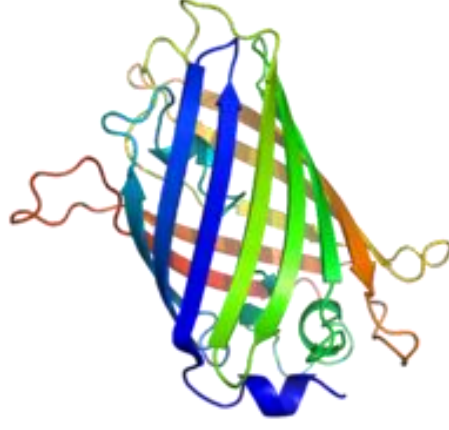
Prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda çift iplikli halkasal şekilde bulunan boyut olarak 1-200 kilobaz (kb) arasında ve $4-60 \times 10^6$ dalton molekül ağırlığında bulunabilen DNA molekülleridir. Plasmidler hücre için hayati bir önem taşımalarında eşeyli üremede hücre içine girerek genetik materyalin bir bakteriden diğerine taşınmasını sağlayarak varlıklarını ortaya koymaktadırlar [4,5].

2.1.1.2 Yeşil Floresans Protein (Green Floresans Protein) (GFP)

Aequoera victoria deniz anasından (kristal deniz anası) elde edilen Yeşil Floresans Proteini (GFP) hücre biyolojisi ve biyokimya da proteinlerin kullanıldığı çalışmalarda son derece yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle, hücreler ve organizmalarda gen ifadesi ve protein hedeflendirme çalışmalarında bir işaretleyici (marker) olarak kullanımı yaygındır [6].

1955 yılında Davenport ve Nicol kristal deniz anasının ultraviyole ışın altında yeşil floresans renk verdiğini bulmuşlardır. 1962 yılında ise, Shimomura ve arkadaşları yeşil floresansı içeren proteinin deniz anasından ekstraktını başarmıştır. Bu çalışmalardan bağımsız olarak Morin ve Hastings, 1971 yılında benzer bir proteini bulmuşlardır. 1992 yılında Prasher ve arkadaşları ilk olarak GFP'nin cDNA ve genomik klonlarının dizisini ilk olarak ortaya çıkarmışlardır. 1994 yılında ise, Chalfie ve arkadaşları GFP'nin bakterilerde fonksiyonel olarak eksprese edilmesini sağlamışlardır. Bu sayede 1998 yılında 500 e yakın çalışma bu proteinle gerçekleştirilirken günümüzde yüzlerce bilim adamı bu işaretleyiciyi proteinleri, hücreleri ve organizmaları işaretlemek üzere kullanmaktadırlar [7,8].

GFP 238 aminoasit molekülünden meydana gelmektedir. 238 molekülün bir araya gelerek oluşturduğu silindire benzeyen bu sarmal yapının (Şekil 2.2) ortasında oksijen molekülünün yardımıyla yardımcı moleküllerin veya proteinlerin yardımına gerek kalmadan yeşil ışık verilmesini sağlayan moleküler yapı bulunmaktadır. Bu protein üzerinde pek çok çalışma yapılarak sadece yeşil değil sarı [sarı floresans protein (YFP)], mavi [mavi floresans protein (BFP)] gibi birçok başka protein sentezleri de gerçekleştirilmiştir [9].



Şekil 2.2 GFP moleküler yapısı

Genetik çalışmalarda da oldukça yaygın bir şekilde kullanılan bu proteine ait olan genetik kodun, transfeksiyon işleminin gerçekleştirilmek istendiği hücreye aktarımı sağlanarak hücrenin kendisinin veya çekirdeğinin mor ötesi ışıpta yeşil floresans göstermesini sağlamaktadır.

2.2 GEN TERAPİ

Gen terapi işlemi, genetik malzemenin hastaya transfer edilmesi ve bunun sonucunda hastada meydana gelmiş genetik anormalliklerin önlenmesini sağlamaktır [1]. Gen terapi yaklaşımı ile hastalıkların tedavisi moleküler boyutlara indirilmiş olup kusurlu biyolojik fonksiyonların yenilenmesi veya vücut içerisinde homeostasisin (fizyolojik denge durumu) yeniden oluşması sağlanmıştır. Ön klinik ve klinik gen terapi araştırmalarının her ikisi de 15 yıl öncesinden günümüze kadar oldukça hızlı bir gelişme göstermiştir [10].

Gen terapi ile sadece hastalıkların tedavisi amaç edinilmemiştir. Ayrıca hücre çekirdeğine rekombinant genetik materyalin (DNA ve RNA) taşınması sağlanarak, protein üretimini aktive veya deaktive eden kontrollü gen ifadesi de (ekspresyon) gerçekleştirilebilmektedir.

Günümüzde gen terapi, sayısız beşeri hastalığın tedavisinde kullanılan klinik açıdan gerçeklik taşıyan ve gelişim gösteren bir yaklaşım olarak görülmektedir. Özellikle

çeşitli genetik hastalıkların ve kanserin, viral enfeksiyon ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde büyük bir umut olarak karşımıza çıkmaktadır [11].

Transfeksiyon (gen transferi) bir genin çeşitli yöntemler ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşınıp DNA'sına yerleştirilmesi olayıdır. Bu konu üzerinde yapılan araştırmalar ve çalışmalar genellikle verilecek genin güvenli ve etkili bir şekilde ulaşmasını sağlamaya yönelik olup, asıl amaç hedeflenen bölgeye terapötik genlerin etkili salımını önleyen biyolojik engellerin üstesinden gelmektir [12,13].

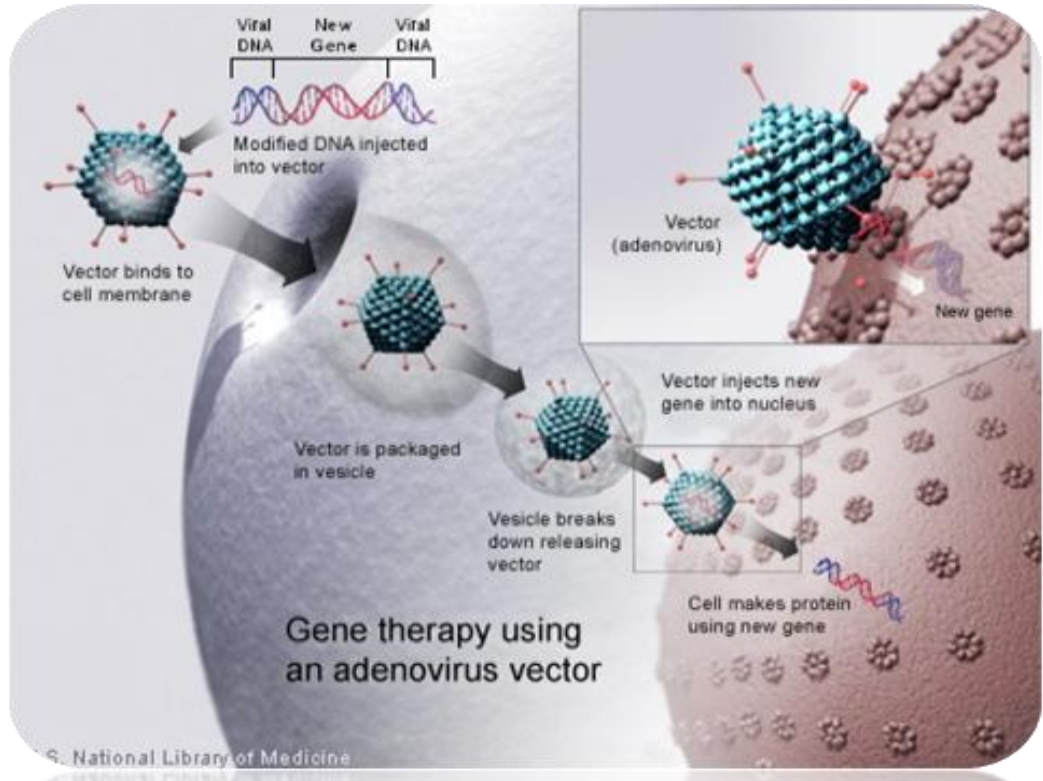
Gen ifadesini sağlamak için gen salımını gerçekleştiren taşıyıcı sistemlere “vektör” denilmektedir. Vektörler yapılarına göre viral olmayan (non-viral) ve viral olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

2.2.1 Viral Vektörler

Terapötik genlerin verimli bir şekilde transfeksiyonu ve uygun gen ekspresyonu, klinik açıdan ilgili gen terapi için oldukça önemli bir konudur. Virüsler, kendi yapılarından dolayı hücre içerisine genlerin etkili bir şekilde transferini sağlayabilmektedirler. Viral taşıyıcıların bu özelliği sayesinde terapötik genlerin aktarımı için istenen taşıyıcı tipi geliştirilebilmektedir.

Retrovirüsler, adenovirüs, adeno-ortak virüs, herpesvirüs ve poksivirüsler gibi farklı genomik özelliklere sahip viral taşıyıcılar son yıllarda gen taşıma kapasiteleri ve etkili gen ekspresyonu sağlama özelliklerinden dolayı sıkça kullanılmaktadırlar. Bu vektörler arasında retroviral taşıyıcılar en gözde taşıyıcı sistemlerdir, çünkü bu taşıyıcılar yüksek gen transfeksiyon etkinliğine sahiptirler ve terapötik genlerin yüksek ekspresyonunu sağlamaktadırlar.

İlk klinik çalışmalar viral vektörlerin uygunluğu ve güvenilirliği üzerine olmuştur. Sayısız viral taşıyıcı sistem *ex vivo* ve *in vivo* çalışmalarda denenmiştir (Şekil 2.3). Son yıllarda elde edilmiş olan mevcut etkiyi geliştirme amacıyla çalışmalarda enfektivite, viral hedeflendirme, hücre tipi spesifik ekspresyon ve ekspresyon süresi gibi konular üzerine odaklanılmıştır [14].



Şekil 2.3 Viral taşıyıcılardan adenovirüs ile gerçekleştirilen gen terapi işleminin şematik görünümü [15]

Yukarıda belirtilen özellikler yüksek verimlilikte ve güvenli RNA ve DNA virüs taşıyıcıların önemini vurgulasa da bazı araştırmalar viral vektörlerin klinik kullanımı ile ilgili sıkıntıları göz önüne getirmektedir.

Tablo 2.1 Gen transferinde kullanılan viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları [14]

<u>Viral Vektörler</u>	<u>Avantajları</u>	<u>Dezavantajları</u>
Retroviral taşıyıcılar	Gen transferi için yükleme kapasitesi <7-8 kb, viral genomun kolay manipülasyonu, DNA ile birleşme kolaylığı,	Zor hedeflenme, genom içerisinde karışık birleşme, taşıyıcıların kararsızlığı.
Lentiviral taşıyıcılar	Bölünen ve bölünmeyen hücrelerde stabil gen ekspresyonu, yükleme kapasitesi 10 kb civarı	Potansiyel yerleşmede mutasyona yol açma, yapı içerisinde tat, rev gibi peptidlerin sıralanması
Adenovirüs taşıyıcılar	Yüksek seviyede gen ekspresyonu, bölünen ve bölünmeyen hücrelere enfekte olabilme, geniş yükleme kapasitesi (7-8 kb)	Viral proteinlere immün duyarlılık, konak genom içerisinde birleşmeme, geçici gen ekspresyonu
AAV taşıyıcılar	Bölünen ve bölünmeyen hücrelere enfekte olabilme, genel hücre yönelimi, hedeflendirilmiş birleşme, düşük immungenosite ve patojenik değil	Gen taşıma kapasitesi sınırlı, AAV replikasyonu için adenovirüs veya herpesvirüs gerekliliği, üretim için yüksek miktarlarda hücre ihtiyacı ve zor üretim
Herpesvirüs taşıyıcılar	Birçok hücre tipine enfekte olabilme, yüksek yükleme kapasitesi (50 kb), nöral hücrelere doğal yönelim ve yüksek virüs miktarlarında üretim	Toksisite, rekombinasyon riski, konak DNA ile herhangi bir viral birleşme olmama
Poksvirüs taşıyıcılar	Yüksek yükleme kapasitesi, yüksek gen ekspresyonu sağlayan geniş DNA iplikçiklerinin yüklenebilmesi, rekombinant aşı için uyumlu	Potansiyel olarak hücreyi öldürmeden ona zarar verici etki
Epstein-Barr virüs taşıyıcılar	Bölünen ve bölünmeyen hücrelere B-hücrelerin varlığı ile enfekte olabilme, yüksek yükleme kapasitesi	Hücre zarından zor geçiş

Araştırmacılar viral vektörlerin çoğunun transfekeyon çalışmalarında oldukça etkili olduklarını düşünse de, Tablo 2.1’de görüldüğü üzere [14] sitotoksisite, viral antijenler

boyunca immüdüyarlılık veya potansiyel viral birleşme gibi problemlere neden olamsından dolayı bu tip taşıyıcıların kullanımını sınırlamaktadır.

2.2.2 Viral Olmayan (Non-Viral) Taşıyıcılar

Daha öncede belirtildiği gibi günümüzde gen terapi, sayısız hastalığın tedavisinde kullanılan, klinik açıdan etkin ve gelişmekte olan bir yaklaşımdır. 1989'dan bu yana yani ilk gen terapinin uygulamasından bu yana 600'e yakın yöntem ve 3000'den fazla hastaya da bu yaklaşım uygulanmıştır. Ancak, güvenlik endişelerinden dolayı tedavi amaçlı herhangi bir gen terapi ürünü bulunmamaktadır. Buna ek olarak, viral taşıyıcılarla viral olmayan sistemler arasında büyük bir uygulama farkı bulunmaktadır. Viral vektörler klinik tedavilerin %75'ni oluştururken viral olmayan sistemler %25'den daha az oranda uygulanmaktadır [10].

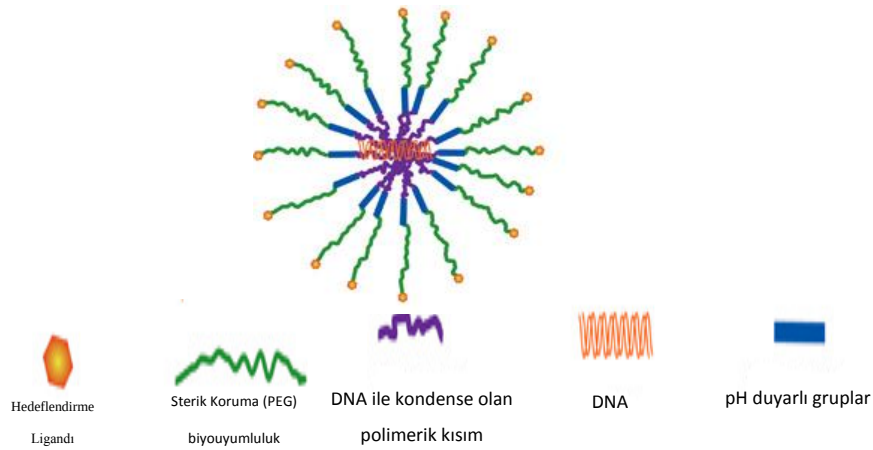
Bu büyük dengesizlikler sonucunda araştırmacılar sadece viral olmayan vektörler ile viral vektörleri karşılaştırmakla kalmayıp bunun yanında viral olmayan sistemlerin potansiyelleri ve sınırlamaları konusunda yenilik getirmeye çalışmışlardır. Gen terapi araştırmacıları ve farmosötik teknoloji alanındaki bilim adamları, viral vektörlerin birçok hastalığın tedavisinde mükemmel sonuçlar verdiğine dair denemeler yapmışlardır, fakat bir viral vektör taşıyıcının genom ile kendiliğinden birleşmesi ile hücrenin mutasyona uğradığı ve bunun neticesinde de kansere sebep olduğu yine araştırmaların bir başka sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna ek olarak taşıyıcı içindeki viral vektörler, zararlı olan immun cevabı ortaya çıkarmaktadır bunun sonucunda tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır [10].

Özellikle son 20 yılda çok sayıda viral olmayan taşıyıcı sistem geliştirilmesine rağmen, bu sistemlerin yeterli güvenlik ve etkinlik kriterlerine ulaşmaması nedeniyle henüz bir ticari preparatı bulunmamaktadır. Viral olmayan taşıyıcılar günümüzde 2'ye ayrılmaktadır, **1-) Lipofilik Taşıyıcılar, 2) Polimerik Taşıyıcılar.**

Katyonik lipozomları içeren viral olmayan taşıyıcılar, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır, fakat yapılan çalışmalarda viral

olmayan lipofilik taşıyıcıların önemli bir kısmının transfeksiyonda etkili olan viral taşıyıcılarla benzer toksisiteye sahip olduğu görülmüştür.

Özellikle klinik öncesi ve klinik sorunlarından ötürü geniş kullanıma sahip olmayan diğer viral olmayan taşıyıcı sistemler ise polimerler ve polipeptidlerdir. Günümüzde tek bir maddeden oluşan klinik deneme yok denecek kadar az olduğu için polimer esaslı gen terapinin potansiyeli henüz yeterli anlamda incelenmemiştir. Polimerik gen terapiye olan ilgi, katyonik lipozomlarda karşılaşılan sorunlardan dolayı viral olmayan taşıyıcılara olan ilgiyi azaltsa da, polimerlerin en büyük avantajı etkinliklerinin artırılabilmesi için yapılarında çeşitli modifikasyonların yapılmasına imkan tanınmasıdır. Böylece, plazmid DNA salımı kontrol edilebilir, kanda ki nükleaz gibi enzimlere karşı stabilitesi artırılabilir, spesifik olmayan emilim azaltılabilir, hücre ve plasma molekülleri ile etkileşim düzenlenebilir ve aynı zamanda immün sistem bertaraf edilebilir. Uygulanan bu modifikasyonlar polimerlerin üstün salım özelliklerini geliştirerek genetik malzemenin kontrollü olarak hedeflenen bölge de salımının gerçekleşmesini sağlayacaktır [16]. Şekil 2.4’de bir polimerik taşıyıcının DNA ile oluşturduğu komplekse (poliplekse) ait şema görülmektedir.



Şekil 2.4 Viral olmayan taşıyıcılardan polipleksin şematik görünümü [17]

Diğer taraftan, farklı yapılarıdaki polimerik bileşiklerin sentezi ile hazırlanan viral olmayan gen taşıyıcılar, güvenli ve ekonomik gen transfer sistemlerini ortaya çıkarmıştır. Birçok sentetik vektör geliştirilmiştir ve bunların bazılarının günümüzde ticari uygulamaları mevcuttur. Bununla beraber, birçok problem henüz çözüm

beklemektedir, çünkü transfeksiyon etkinliği bakımından viral olmayan vektörler viral vektörler kadar etkili değildir ve genellikle iyon kompleksi oluşturmak amacıyla anyonik genlerle kullanılan katyonik taşıyıcıların bir kısmı toksik etki gösterebilmektedir [18,19]. Bu alanda yapılan çalışmaların ortak hedefi; viral vektörler kadar etkin, düşük toksisiteye sahip polimerik taşıyıcıların üretilmesidir.

2.3 VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARDA GEN TRANSFERİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Bölüm 2.2.2’de belirtildiği gibi viral vektörlere alternatif olarak istenilen özelliklerde viral olmayan vektörlerin geliştirilebilmesi için, viral olmayan taşıyıcıların fizikokimyasal özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu özelliklerden bir tanesi olan boyut ve yük dağılımı polimerik salım sistemlerinin *in vitro* ve *in vivo* performansı için oldukça önemlidir. Birçok çalışmada görüldüğü üzere kullanılan polimerik gen taşıyıcılar çoğunlukla pozitif yüklüdür. Pozitif yükleri sayesinde eksi yüklü DNA ile kompleks oluşturur ve enkapsülasyonunu artırır, negatif yüklü hücre membranı ile etkileşerek DNA’nın hücre içine alımını geliştirir [19,20,21].

2.3.1 Yüzey Yükü ve Zeta Potansiyeli

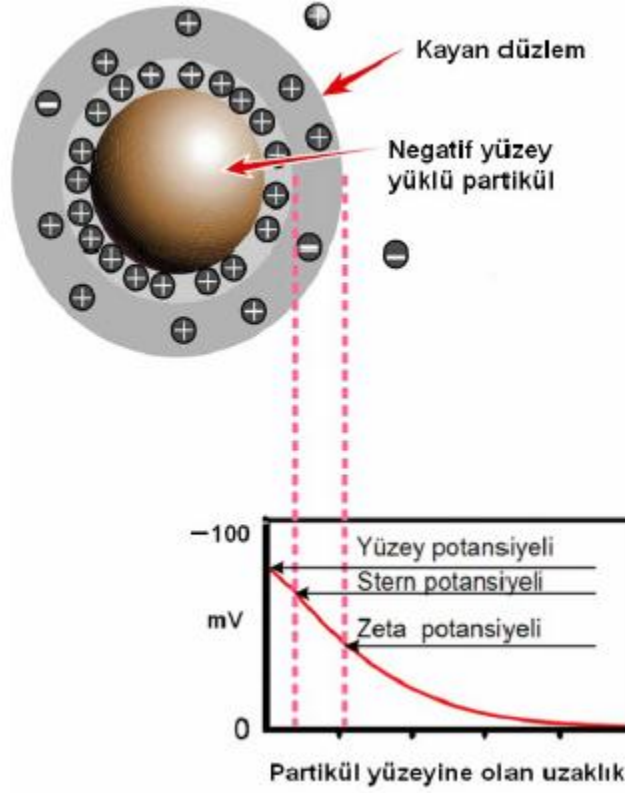
Yukarıda belirtildiği gibi polimerik taşıyıcıların DNA ile oluşturduğu komplekse polipleks denilmektedir. Katyonik polimerlerin yükü DNA enkapsülasyonunu ve stabilitesini artırırken, bu yükün çok artışı immün yanıtı geliştirmektedir. Sitotoksisiteden ve mononükleer fagositik sistem organelleri ile istenmeyen etkileşimden sakınmak için yüzey yükü fazla olan polimerik parçacıklar üretilmektedir. Yük dengesinin ise parçacıkların, polietilen glikol (PEG) veya benzeri başka bileşiklerin kompleks olması ile sağlanabildiği ve bu sayede parçacığın güvenli bir hal aldığı birçok çalışmada söylenmektedir [22,23]

Yük ayrıca hücreye giriş için (penetrasyon) oldukça önemlidir. Katyonik nanopartiküller hücre içerisine endositoz ile girerler. Pozitif yüklü partiküller hücre membranının dışında negatif yüklü glikokaliks (hücre zarının yüzeyinde özellikle şekerlerle zengin özel bir yapı) ile reaksiyona girer ve sonrasında çeşitli endositoz

mekanizmaları ile hücre içine alınırlar. Partikül endositoz (hücre zarından basit difüzyonla veya aktif taşımayla geçemeyecek moleküllerin hücre içerisine alınışı) ile hücre içine alındığında, düşük pKa değerlerine sahip çoklu asit grupların varlığı endozomal destabilizasyonu sağlar ve proton sünger etkisi denilen kaçışı gerçekleştirir, protonlar endozom içerisine iletilir ve iyonik yükün artmasından dolayı endozom kararsız hale gelene kadar polimer tarafından korunur [24].

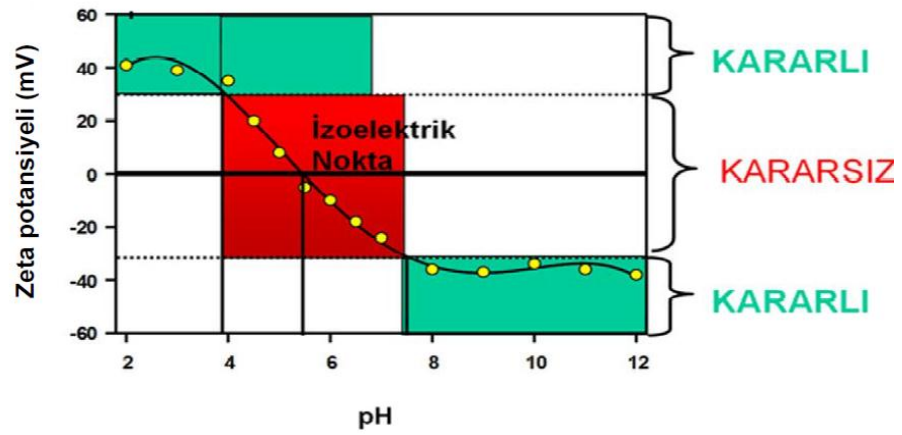
Polimerik taşıyıcıların DNA ile kondanse olmasından, hücre içine giriş ve genin çekirdeğe iletilmesine kadar olan süreçte gerekli olan yüzey yükü, zeta potansiyeli ile ifade edilmektedir. Zeta potansiyeli, kolloidal sistemlerin kararlılığını ifade eden bir özellik olup bir sıvı (genellikle su) içerisinde dağılmış olan partiküllerin sıvı içerisine bir elektriksel alan uygulandığında yüzey yük oranına göre pozitif veya negatif kutuba doğru hareket etmesi ile belirlenmektedir [25].

Kolloidal sistemlerde net yüzey yükünün oluşması ile birlikte dış katmanlarda yüzey yüküne göre zıt yükler oluşmaya başlar ve bu sayede elektriksel çift tabaka meydana gelir. Bu katmanlardan içte bulunan ve partikül yüzey yüküne göre ters iyonlarla kuvvetli bir şekilde çevrilmiş olan tabakaya Stern tabakası denilmektedir. Bu çift tabakanın dışındaki pozitif iyonların negatif iyonlara eşit olduğu yani her bir partikülün tek bir varlık gibi davrandığı bir alan bulunmaktadır. Bu alan ile partikül yüzeyi arasındaki yük farkı sonucunda meydana gelen potansiyel farka “zeta” potansiyeli” (ζ) denilmektedir (Şekil 2.5). Zetametre ile ölçülen bu değer birimi milivolttur (mV) [26,27,28].



Şekil 2.5 Zeta potansiyeli gösterimi [26]

Viral olmayan polimerik taşıyıcıların yapılarında bulunan uç grupların iyonize olması yük iyonizasyon derecesine bağlıdır ve bu da dispersiyon ortamının pH'sı ile orantılıdır. Zwitteriyonik bir taşıyıcı düşünüldüğünde düşük pH'larda pozitif yükle yüklenirken yüksek pH'larda ise negatif yükle yüklenecektir. Bu yüklerin dengede olduğu yani sıfır olduğu noktaya ise izoelektrik nokta denilmektedir (Şekil 2.6) [27].



Şekil 2.6 Kolloidal sistemlerin kararlılığını ifade eden pH değerlerine karşılık zeta potansiyeli değerleri [26]

Şekil 2.6’da görüldüğü üzere partiküllerin kararlılığı -30 mV’un altı ve +30 mV’un üstü olarak kabul edilmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda da ζ ölçümlerinde bu değerler dikkate alınarak hangi malzemenin transfeksiyon uygulamalarında kullanılacağına karar verildi.

2.3.2 Nanopartikül ve Partikül Boyutu

İlk adımları 1860’lı yıllarda atılan nanopartikül teknolojisi, nano büyüklük veya nano metre kavramının anlaşılması ile ortaya çıkmıştır. Nano büyüklük kavramı günümüzde malzemenin 1-1000 nm arasında partikül büyüklüğüne sahip olduğu durum olarak açıklanmaktadır. Bu boyutta çeşitli özelliklere sahip malzemelerin üretilmesi veya nano boyuttaki malzemelerin özelliklerinin incelenmesi nanoteknolojinin kapsamı içindedir. Nanoteknoloji ile ilgilenen bilim dalları kimya, fizik, moleküler biyoloji ve malzeme bilimi olsa da gelişen teknolojik yöntemlerle birlikte artık birçok bilim dalı bu konuda kendilerine pay çıkarabilmektedirler. Nanoteknoloji ise en kısa ve net olarak “atomsal düzeyde mühendisliktir ve mikroskobik yapılarla ilgili bir bilim dalıdır” şeklinde tanımlanabilir [29].

20. yüzyılın en önemli Amerikan fizikçilerinden ve 1965 yılında arkadaşları ile birlikte Nobel ödülü alan Richard Phillips Feynman; 1959 yılında University of California’da yapmış olduğu bir sınavda “Atomları istediğimiz yönde birer birer dizebilirsek ne olur?” sorusunu sormuştur. Bu soru modern nanoteknoloji ve nanobilimin ortaya çıkması için teorik başlangıç noktası olarak düşünülmektedir. Bu düşüncenin hayata geçişi 1980 yılında IBM tarafından atomik güç mikroskobunun (AFM) ve taramalı tünel mikroskobunun (STM) geliştirilmesi ile gerçekleşmiştir [30].

Nanoteknolojinin gelişimi sadece malzeme yapısındaki atomların yerinin bir yerden bir başka yere taşınması olarak kalmamıştır. Yüksek yüzey alanına sahip nanoboyut ile birlikte bu boyutların kontrol edilerek daha üstün özelliklere sahip nanomalzemelerin üretimi de gerçekleştirilmiştir. Bu sayede nanomateryaller başlıca elektronik alanında, otomotiv sanayi, askeri sanayi, tıp alanında, iletken ve yarı iletken malzemelerin

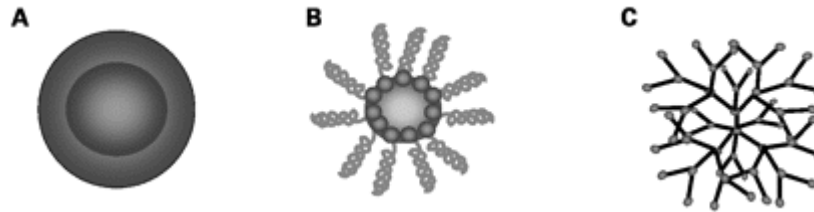
üretiminde, seramik, yüzey örtü maddeleri, mürekkep olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.7)



Şekil 2.7 Nanoteknolojinin günümüzdeki bazı uygulama alanları

Günümüzde oldukça ilgi çeken ve boya sektöründen kanser tedavisine kadar birçok konuda artık hayatımıza yerleşen bu teknolojik devrimin özellikle gelecek 10-15 yıl içerisinde daha büyük buluşlara ve olaylara imza atacağı bilim dünyasında kabul görmüş durumdadır.

Gen terapide ise nanoteknoloji kavramı 1930'lu yıllarda bilim adamlarının hücre içi özellikleri ve fonksiyonları ile ilgilenerek hücre içinde nano ölçekli yapıların olduğunu saptamaları ile oluşmuştur. Günümüzde gen terapi işleminde nanoteknoloji yaklaşımı ise 200 nm den küçük nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesini kapsamaktadır (Şekil 2.8) [31].



Şekil 2.8 Gen terapi işleminde kullanılan viral-olmayan polimerik taşıyıcıların şematik görünümleri;

A-) Polimerik nanopartiküller, B-) Polimerik miseller, C-) Dendrimerler [31]

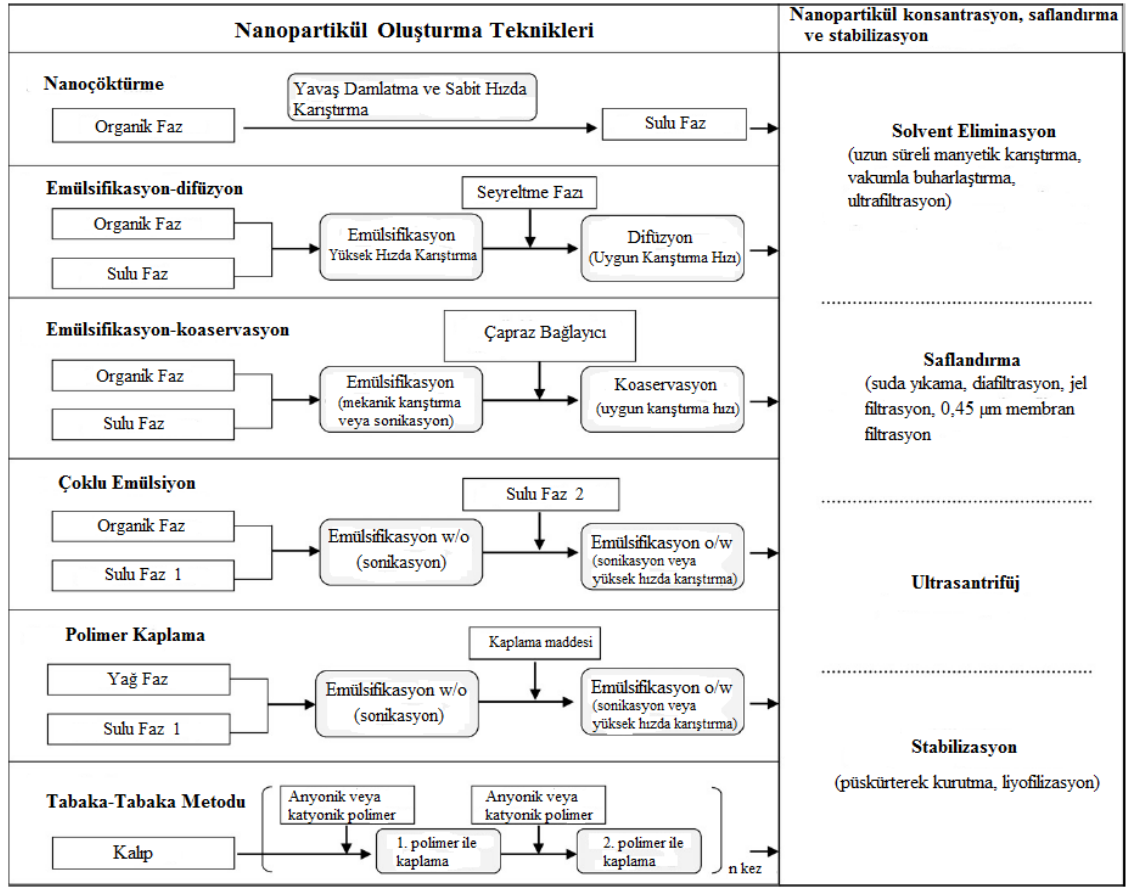
Polipleksin boyutu fonksiyonu açısından oldukça önemlidir. Karaciğerde ilk-geçiş emilimi için eşik çap değeri yaklaşık 10 nm'dir ve bu da nanopartiküller için kabaca en

düşük boyuta sahip limit değerdir. Üst boyut limitinin belirlenmesinde ise, hücreler arası boşluklar, tümör dokusu arasında bulunan boşluklardaki difüzyon hızı, ve kapiler endotelyumun penetrasyonunu içeren tümörlerden doğan çeşitli faktörlerin tesbit edilmesi oldukça zor olsa da genellikle 200 nm'nin altında olması gerektiği belirtilmektedir. Polipleksin boyutu, DNA ile polimer oranının değiştirilmesi ile modifiye edilebilmektedir [32,33,34]

2.3.2.1 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Genel anlamda nanopartikül dendiğinde katı kolloidal parçacıkları içeren nanoküreler veya nanokapsüller anlaşılmaktadır. Çeşitli polimerizasyon yöntemleri ile hazırlanan malzemelerden elde edilen nanopartiküllerin boyutları 5-10 nm'den 1000 nm'ye kadar değişebilmektedir, genellikle 100-500 nm arasında olanlar tercih edilmektedir [35].

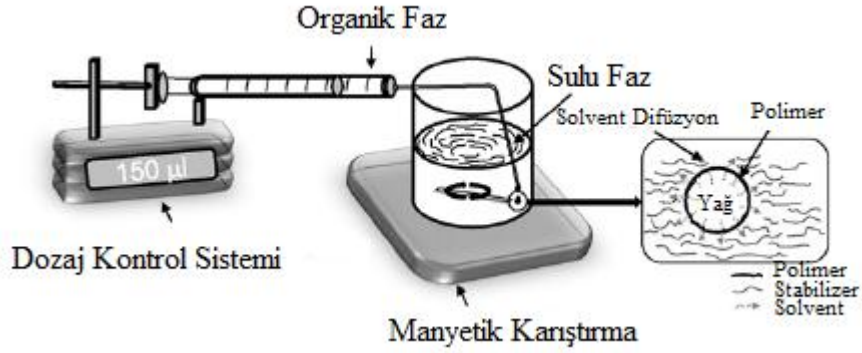
Nanopartikül hazırlama teknikleri, misel polimerizasyonu, emülsiyon-difüzyon, emülsiyon-koaservasyon, nanoçöktürme, yüzeylerarası polimerizasyon, çoklu emülsiyon, iyonotropik jelleşme, püskürterek kurutma (spray-drying) yöntemleri olarak sınıflandırılabilir. Şekil 2.9'da nanopartikül hazırlama teknikleri görülmektedir. Bu tezle sunulan çalışmalarda nanopartiküller, PBAE esaslı ürünlerden nanoçöktürme metodu kullanılarak, modifiye kitosan esaslı ürünlerden ise iyonik jelasyon tekniği kullanılarak elde edildi [4,35]. Bu nedenle aşağıda bu yöntemlere ait bilgiler sunulmuştur.



Şekil 2.9 Nanopartikül hazırlama metotları [35]

Nanoçöktürme Metodu;

Nanoçöktürme metodu aynı zamanda çözücü yer değiştirme metodu veya yüzeyler arası çöktürme metodu olarak da anılmaktadır. Bu yöntem biri organik ve diğeri su fazı olmak üzere iki faz arasında gerçekleşmektedir. Organik faz; polimer, yüzey aktif madde (gerekli ise) ve polimer ve yüzey aktif maddeye uygun çözücünden oluşurken su fazı su veya sulu çözeltiden oluşmaktadır. Etkin madde, çözündüğü ortama göre, su veya organik faz içerisinde olabilmektedir. Şekil 2.10'da bu teknik ile nanopartiküler sistemlerin eldesi görülmektedir [35].



Şekil 2.10 Nanoçöktürme yöntemi şematik görünümü

Bu teknikte özellikle polikaprolakton, poli(laktid) (PLA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli(alkilsiyano akrilat) (PACA) ve poli(β -aminoester) (PBAE) gibi sentetik biyobozunabilir polyesterler kullanılmaktadır. Bu teknikte partikül oluşumunu etkileyen en önemli parametreler ise; organik fazı damlatma hızı ve oranı, sulu fazı karıştırma hızı, organik faz katılma metodu ve organik faz/sulu faz oranıdır [35].

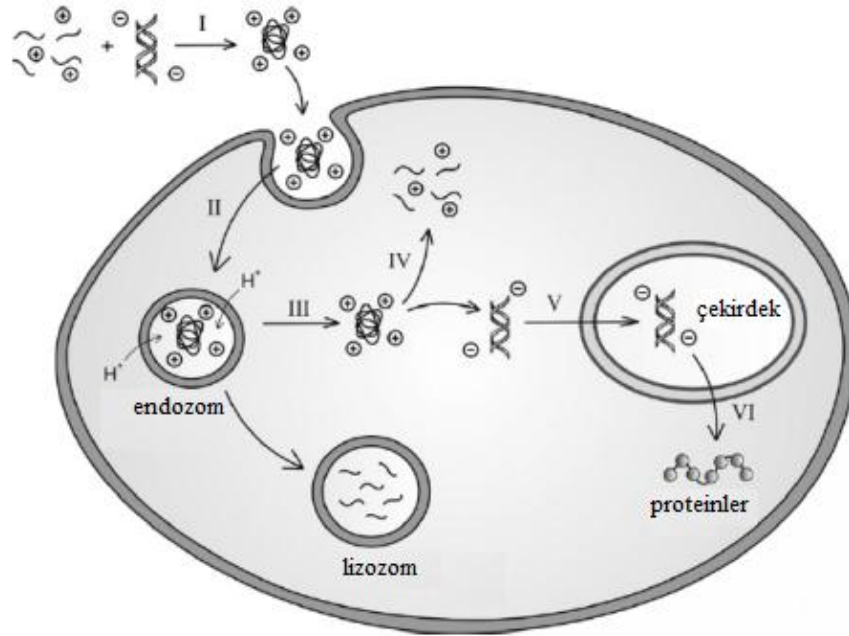
İyonotropik Jelasyon

Kitosan esaslı polimerik ürünlerden nanopartikül eldesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biri de iyonotropik jelasyon yöntemidir. Bu yöntemde kitosan esaslı polimer malzemeler asidik çözelti içerisinde çözülerek çapraz bağlayıcı içeren polianyonik çözelti içerisine damla damla damlatılır. Zıt yükler arasındaki etkileşim sonucunda kitosan molekülü jelleşir ve küre şeklini alır. Kullanılan çapraz bağlayıcı da asidik çözeltiyi nötralize eder ve dış faza difüze olmasını sağlar. İyonotropik jelleşme yönteminde genel anlamda en çok tripolifosfat (TPP) çapraz bağlayıcısı kullanılmaktadır. Bunun haricinde aljinat, oktil sülfat, lauril sülfat gibi çapraz bağlayıcılarda kullanılmaktadır [36].

Bu nano boyuttaki taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için öncelikle gen terapi işleminin oldukça iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir.

2.4 POLİMERİK TAŞIYICILARLA GEN TRANSFERİ

Yukarıda bahsi geçen özellikler göz önüne alındığında öncelikle genin salım yöntemini anlamak gerekir ve tabi ki bu yöntemi anlarken de karşılaşılabilecek engelleride beraber değerlendirerek en uygun nanopartiküler DNA taşıyıcı sistemi elde etmek gerekmektedir. Bu kapsamda genin çekirdek içerisine iletilmesi yedi ana adımda meydana gelmektedir. (Şekil 2.11); **I)** Terapötik genlerin paketlenmesi, **II)** Hücreye giriş, **III)** Endo-lizozomal yoldan kaçış, **IV)** DNA/taşıyıcı sistem salım etkisi, **V)** Sitoplazma boyunca ilerleme ve çekirdek içerisine doğru geçiş, **VI)** gen ifadesi **VII)** Biyouyumluluk [12].



Şekil 2.11 Viral olmayan taşıyıcılarla gen transferi şematik görünümü [12]

2.4.1 Gen Paketleme

Herhangi bir polimerik gen salım sistemi için temel tasarım kriterleri, a) anyonik hücre yüzeyine karşı aynı yük etkisini önlemek için DNA'nın negatif yüklü fosfat zincirini nötralize etmek, b) hücrenin transfer edilecek geni içine alması için DNA'nın büyük yapısını kondanse ederek gereken uygun boyutu ayarlamak (örneğin reseptör-aracılı

endositoz için nano boyutta, makropinositoz veya fagositoz için mikrobeyutta olması), c) hücre içi ve hücre dışı çekirdek bozunmasından DNA'yı korunmaktır.

Yukarıda bahsedilen gerekliliklerden dolayı araştırmacılar 3 temel paketleme stratejisi geliştirmişlerdir; **1)** Elektrostatik etkileşim, **2)** Enkapsülasyon ve **3)** Adsorbsiyon [37,38].

2.4.1.1 Elektrostatik Etkileşim

Günümüze kadar gelen birçok araştırmada görüldüğü üzere birçok polimerik taşıyıcı, anyonik yapıdaki DNA ile elektrostatik etkileşim yoluyla kompleks oluşturmaktadır. Katyonik yapıda olan sık kullanılan polimerik taşıyıcılar Tablo 2.2 de görülmektedir. Bütün bu polimerler, nötral pH da protonlanabilen ve kendiliğinden DNA ile elektrostatik olarak etkileşime girebilen amino gruplar içermektedir. Eğer yeterli azot fosfat (N:P) yük dengesi kurulursa polimer DNA'yı çekirdek bozunmasından koruyarak hücrenin içeri alabileceği boyutta kondense edebilir. DNA'nın paketlenmesi için bu yöntem her ne kadar gerekli pozitif yükü taşımasını sağlasa da bu tip polikasyonların yüksek sitotoksosite gösterdiği açıktır [12].

Tablo 2.2 Gen transferinde en çok kullanılan polimer taşıyıcılar

VEKTÖR	ÖZELLİK	KAYNAK
Dendrimerler	Belirlenen boyut ve yükte elde edilebilen yüksek dallanmış polimerler	39,40
Poli-L-lizin	Birçok amino grubu içeren bir aminoasit polimeridir. Sitotoksitesi azaltılabilmektedir.	41,42
Poli(etilen imin)	Lineer veya dallanmış formda ve genellikle kopolimer birleşeni olarak kullanılmaktadır. Katyonik yoğunluğu ayarlanabilmektedir.	43,44
Doğal Biyobozunabilir Polimerler		
Kollajen	Genetik malzemenin devamlı salımı için modifiye edilebilir.	45
Kitosan	Kitinin deasetilasyonu ile üretilen bir amino polisakkaritidir. Oral ve nazal uygulamalar için biyoadezifliği oldukça yüksektir.	46,47
Poli(laktid-ko-glikolid)	İnsanlarda kullanımı için oldukça güvenli bir malzemedir.	48

2.4.1.2 Enkapsülasyon

Elektrostatik kondenzasyona alternatif bir yöntem olan bu yöntem özellikle biyobozunabilen küresel taşıyıcıların oluşturulması için kullanılmaktadır. Polimerin biyobozunurluğunda ester bağları önemli bir rol oynamaktadır ve biyobozunurluk, formülasyondan DNA salımının kontrol edilebilmesini sağlar. Aynı zamanda polimerik yapılar genlerin enzimatik olarak bozunmasını engeller [49,50]. Bu yöntemdeki en önemli kısıtlamalar ise polimerik taşıyıcının organik çözücülere ve genetik yapıyı bozacak yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmasıdır. Diğer kısıtlamalar ise, düşük enkapsülasyon verimliliği, düşük pH'larda ortamda poliester hidrolizi ile birlikte DNA'nın bozunması, polimerden yetersiz salım sonucunda düşük DNA biyoyumumluluğudur [51-53].

2.4.1.3 Adsorbsiyon

Gen terapide taşıyıcı polipleks üretimi için enkapsülasyon yöntemindeki bu sınırlamalar göz önünde bulundurularak adsorbsiyon yöntemi geliştirilmiştir. DNA adsorbsiyon yöntemi, yukarıda bahsedilen 2 yöntemin bir arada olduğu, DNA'nın elektrostatik olarak bağlanabildiği biyobozunabilir parçacıkların yüzeyine katyonik grupların (katyonik surfaktanlar, PDMAEMA, PEI) konjuge veya adsorbe olmasıyla gerçekleşmektedir [54,55].

Yukarıda bahsedilen 3 yöntem ile de araştırmacılar, yeterli düzeyde etkili ve güvenli gen transferinin gerçekleşmesini sağlamak için çalışmaktadırlar. Aşağıda ise bu üretilen polimer taşıyıcıların hücre içerisine girişte karşılaşılabilecek problemler ve önleme yöntemleri ele alınmıştır.

2.4.2 Hücre Girişi

Polimer/DNA kompleksinin yani polipleksin hücrede karşılaşacağı ilk engel plasma membranıdır. Polipleksler hücre içerisine pasif difüzyon ile geçemez çünkü geçiş membranının gözenekleri ve kanalları boyut olarak oldukça sınırlıdır. Bu fiziksel bariyerlerin üstesinden gelmek için çeşitli metodlar geliştirilmektedir. Endositik alım, başka deyişle hücre zarından basit difüzyonla veya aktif taşımayla geçmesi mümkün olmayan moleküllerin hücre içerisine girişi temel olarak fagositoz, pinositoz ve reseptör-aracılı endositoz olmak üzere başlıca 3 şekilde gerçekleşmektedir. Fagositoz: daha çok büyük katı partiküllerin retiküloendotelyal sistem (RES) hücreleri yardımıyla hücre içerisine girişini, pinositoz: sıvı haldeki moleküllerin hücre duvarından kesecik oluşumu ile girişini belirtmektedir; reseptör aracılı endositoz tipleri ise, klatrin aracılı endositoz veya kaveolin aracılı endositoz olup, burada spesifik moleküllerin hücre içerisine girişi, bu moleküllere özgü reseptör bölgelere sahip proteinleri (kaveolin veya klatrin) içeren hücre zarı keseciklerinin içeriye kıvrılmasıyla gerçekleşmektedir. Genelde 250 nm den büyük partiküllerin fagositozla daha küçük partiküllerin ise endositozla hücre içerisine girişinin olduğu bildirilmektedir [56].

2.4.2.1 Hedeflendirilmiş Alım

Reseptör-vasıtası ile hedeflendirme ve endositoz

Polipleksler hücre içerisine reseptör-aracılı endositoz yoluyla alınmaktadır. Hedeflendirilmiş ligand taşıyan taşıyıcı sistemler, hücrenin spesifik şekilde geni içine alımını sağlayan yani endositozu gerçekleştiren ajan olarak kullanılmaktadır. Tablo 2.3’de uygun reseptör proteinin açığa çıkmasını sağlayan çeşitli hücre tipleri için hedeflendirmeyi sağlayan ligandlar görülmektedir. Folat ve transferrin gibi endojen ligandlar, biyouyumlulukları ve transfer etkinliğini arttırmaları bakımından oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadırlar. Buna karşılık, ekzojen ligandların yabancı yapılarından dolayı bazen immün cevap oluşturmaları nedeniyle, kullanımları sınırlı kalmıştır [12,57].

Tablo 2.3 Gen transferinde kullanılan ligandlar [12]

LİGAND	KAYNAK
Endojen Ligandlar	
Folat	58
Transferrin	59
Eksojen Ligandlar	
Karbonhidratlar	60
Hücreye penetre edebilen peptidler	61
Antikor	62

Boyut eleme ve Fagositoz

Hedeflendirme ve ardından hücre alımı boyut eleme yoluyla da gerçekleştirilebilmektedir. Çapı 1-10 µm arasında olan DNA-enkapsüle edilmiş mikrokürecikler, immün sistemin antijen sunan hücreleri (APCs) gibi fagositik hücreler tarafından elimine edilmektedir. Bu yöntem genelde DNA aşı uygulamaları için denenmektedir [63].

2.4.2.2 Spesifik Olmayan Alım

Membrana Bağlı Proteoglikanlar ile İyonik Etkileşim ve Endositoz

Poliplekslerin bir kısmının, hücre yüzeyi üzerinde yer alan proteoglikanlar ile yük etkileşimleri nedeniyle, hücre alımı gerçekleşmektedir. Proteoglikanlar, ana çekirdeği protein olan ve yüzeyinde sülfat veya karboksilat glikozaminoglikanları (GAGs) bulunduran bileşimlerdir. Bu yüksek anyonik GAG birimleri, hücre yüzeyi ile hücre dışı makromoleküller arasında etkileşimi sağlayan ve plasma membranının bütün negatif yükünden sorumlu olan kısımdır. Varolan emilim mekanizmaları her ne kadar tamamen anlaşılır olmasa da bir hücre tipinden diğerine değişen çeşitli derecelerde emilimler gerçekleşmektedir [64].

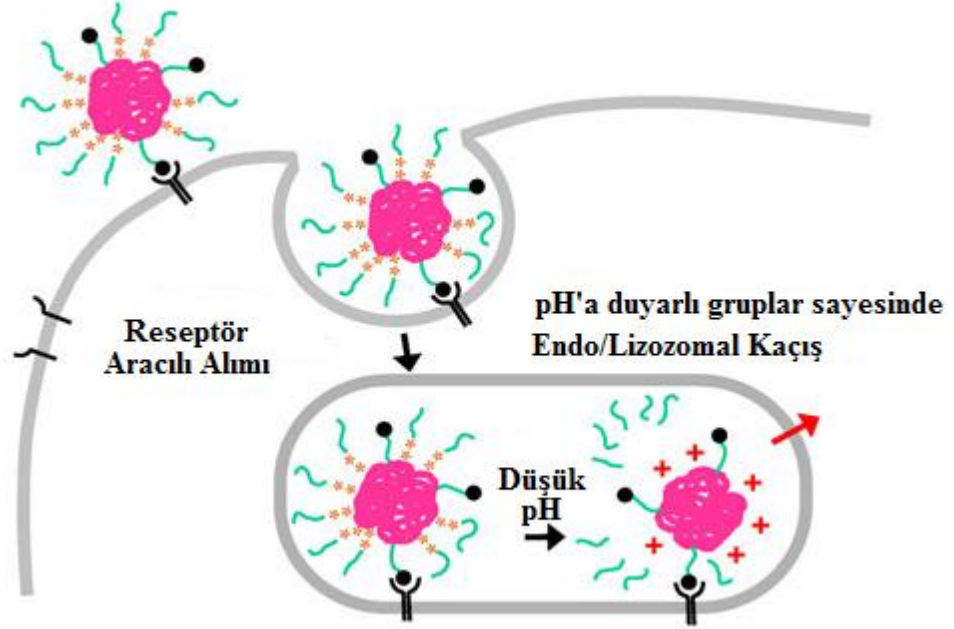
2.4.2.3 Hücreye Nüfuz Edici Peptid-Ortamlı Alım

Son yıllarda, hücreye nüfuz eden peptidler (CPP), uzunluğu 5-40 aminoasitten oluşan, pozitif yüklü ve amfifilik özelliktedir, hücre içine alım 4 aşamada gerçekleşmektedir; **1)** Membranda peptid-çizgili porların oluşumu, **2)** Membran boyunca ve sitoplazma içerisine doğrudan penetrasyon, **3)** Sitosol içerisinde genetik taşıyıcının ve CPP'nin salımı için ters düz edilen membrana bağlı misel yapının geçici alımı, **4)** Endositozun başlaması [12].

2.4.3 Endo-Lizozomal Kaçış

Endo-lizozomal kaçış (Şekil 2.12) [65]; polipleksler, hücre içerisine endositoz yoluyla alındıklarında keseciklerle kuşatılan bu malzemelerin hücre içi rotasında hücre yüzeyine doğru bir geri dönüşü olabilmektedir. Bu geri dönüş, asidik ortam, lizozomlar veya hücre içi organelle (golgi parçacığı, endoplasmik retikulum) salım gibi sorunlardan dolayı gerçekleşebilmektedir. Bu kavram, polikasyonların pKa değerine bağlı tampon kapasitesindeki değişikliklerin etkisi olarak ifade edilmektedir. pKa, polikasyonların asidik gücü hakkında bilgi verir bu yüzden pKa değerleri transfeksiyon için hazırlanan polikasyonların yeterli olup olmaması konusunda önceden bilgi sahibi olmamızı sağlar. Diğer taraftan polikasyonların pKa değerleri, genlerin artan endosomal kaçışından dolayı daha iyi bir gen transfeksiyonu sağlanmasında önemli bir rol oynarlar. Sonuç olarak farklı pKa değerlerinde polikasyonlar sentezlenmektedir. pH-duyarlı gruplar içeren malzemeler, yani PAMAM gibi protonlanabilir aminler [66], KALA gibi

endozomal salım yapan peptidler [67] veya alkile olmuş karboksilik asid grupları kullanılarak endo-lizozomal kaçış sağlanabilir [12].



Şekil 2.12 Endo/Lizozomal kaçış

[65]

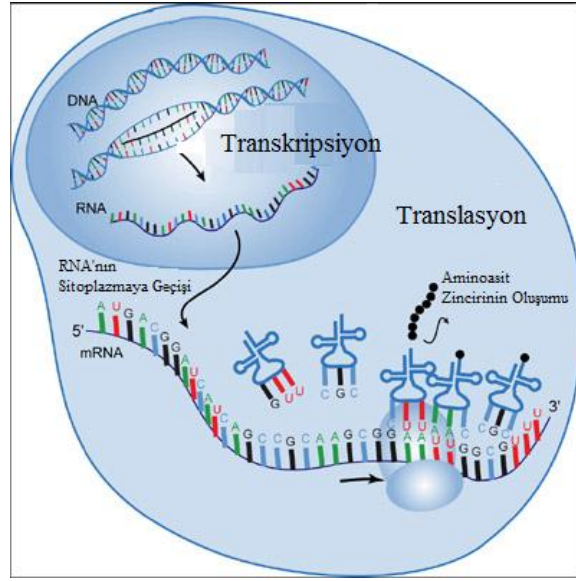
2.4.4 Sitosolik Taşıma ve Çekirdek İçine Aktarım

Polipeksler sitosol içersine girdiklerinde fiziksel ve metabolik bir çevreyle karşılaşılır. Burada DNA yı yok etmeye çalışan çekirdek enzimleri bulunmaktadır. Bu yüzden polipeksin herhangi bir bozunmaya uğramadan direk çekirdeğe yönelmesi için bu yönelmeyi sağlayacak olan karbohidratlar (laktoz, mannoz gibi) veya proteinler (protamin gibi) polipeksin sentezinde yapıya katılabilir. Burada asıl amaç sitosol içersinde polipeksin mümkün olduğunca az süre kalarak çekirdeğe yönelmesidir [12].

2.4.5 Gen İfadesi

Gen ifadesi; DNA dizisi olan genlerin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşme süreci için kullanılan bir terimdir. Ancak, DNA, bu iş için tek başına bir başlangıç oluşturmaz. Önce DNA'daki baz çiftlerinin dizileri, RNA nın bilgi aktaran haberci moleküllerine geçirilir (transkripsiyon). Bunlar sonra, gen ürünleri için bir başlangıç

oluştururlar (translasyon). Son aşamada oluşan polipeptidlerin amino asit dizileri, DNA'daki kodon dizilerine karşılık gelir. Bu olay polipekslerin çekirdek içerisinde geni transfer etmesinden yani DNA/vektör ayrışmasının (dissosiyasyon) çekirdek içerisinde (sitosol içerisinde de olabilir) gerçekleşmesinden hemen sonra başlar. Bu yüzden DNA/vektör ayrışması oldukça önemlidir (Şekil 2.13) [12, 68-70].



Şekil 2.13 Transkripsiyon ve Translasyon işlemlerinin şematik görünümü [71]

2.4.6 DNA/Vektör Ayrışması

Verimli bir gen ifadesinin gerçekleşmesi için taşıyıcıdan DNA ayrışması gereklidir. Bir başka ifade ile korunmasız olan DNA'nın hücre içerisindeki sitosolde alıkonma süresinin minimize olması gerekmektedir. Bu yüzden araştırmacılar DNA'nın hücre içi salım etkinliğini arttırmak için çeşitli stratejiler geliştirdiler; bunlar ana yapıya; ısıya duyarlı özellik, hidrolitik bozunabilirlik veya indirgenebilir bağların (-S-S-) katılması olarak sıralanabilir.

2.4.6.1 Isıya duyarlı polimerler

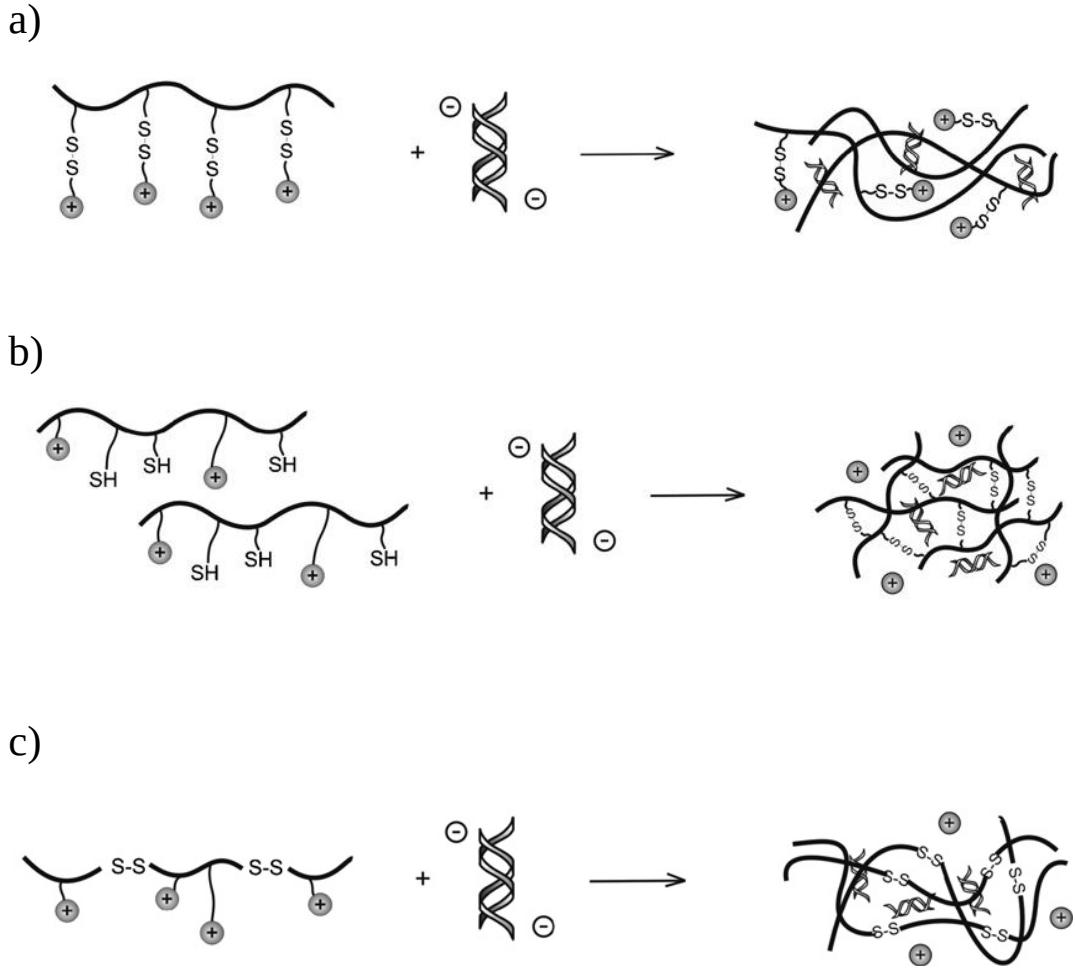
Bu tip polimerler değişen sıcaklık derecelerine göre geri döndürülebilir bukle-yuvarlak hale dönüşebilmektedir. Bu sayede sıcaklık değişimleri ile DNA'nın kondenzasyon derecesi belirlenmektedir. Bukle faz; esnek, hidrofilik, uzun-geniş zincir konformasyonunu belirtirken, yuvarlak faz; kollaps halde, hidrofobik, dar-gergin bukle konformasyonu olarak karakterize edilmektedir. Geçiş sıcaklığı yüksek olduğunda

taşıyıcı sistem yuvarlak halde, aşağısında ise buklet formunda oluyorsa buna düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) denilmektedir [72].

Esas itibarıyla vücut sıcaklığından aşağıda LCST değerine sahip sıcaklığa duyarlı polimerler, hücre içerisine DNA'nın gergin bir şekilde kondanase olması için kullanılmaktadır. Bu konuda en yaygın kullanılan polimerlerden biri 32°C LCST değerine sahip poli(N-izopropil akrilamid) (p-NIPAM)'dır. Transfeksiyon etkinliğinin artması, endosomal kaçış, katyonik karakter ve hidrofobisite gibi etkenlerden dolayı çalışmalarda NIPAM'in birçok malzeme ile çeşitli modifikasyonları görülmektedir [73,74].

2.4.6.2 Disülfid Bağları

Disülfid bağları gen transfer sistemlerine çeşitli yollarla katılabilmektedir. Disülfid bağları ile polimer zincirin etrafına sarılan katyonik ligandlar, DNA'nın elektrostatik yolla bağlanmasını sağlar, disülfid-indirgeyici ajanların yardımı ile bağların ayrılması sonucunda ise sitosol içerisinde DNA salımı gerçekleşir [Şekil 2.14 (a)]. Alternatif olarak tiol pendant grupları lineer polikatyonlara bağlanarak DNA'nın katyonik ligandlarla elektrostatik etkileşimi ile paketlenmesi sağlanmaktadır ve aynı zamanda tiol gruplar diğer tiol gruplarla etkileşime girerek çapraz bağ oluşturmaktadır [Şekil 2.14 (b)]. Bir diğer yöntemde disülfid bağlarının polimer zinciri boyunca girmesini sağlamak bu da sistein gibi tiol aktif ajanlar sayesinde olmaktadır [Şekil 2.14 (c)]. Bu bağların zincir yapısı içerisinde yer alması sadece DNA'nın salımı için değil aynı zamanda daha küçük moleküler ağırlıktaki bileşenlere ayrılması ile sitotoksisite de azaltılmaktadır [12,75].



Şekil 2.14 a) Elektrostatik ile disülfid bağlarının bağlanması, b) Disülfid bağlarının çapraz bağlanması, c) Polimer zinciri içerisinde doğrudan disülfid bağlarının yer alması [12]

2.4.6.3 Ester Bağları

Ester bağları da, dallanmış katyonik pendant grupların bağlanması, çapraz bağlanma ve düşük molekül ağırlıklı polimer eldesi için yapıya katılmaktadır. Disülfid bağlardan farkı ise su moleküllerinin, hidrolize sebep olması nedeniyle, bozunduruca ajan olarak görev yapmasıdır ve fizyolojik ortama maruz kaldığında hidroliz görülebilir [12].

2.4.6.4 Yük İndirgenmesi veya Modifikasyonu

Etkili bir DNA transferi için diğer bir yaklaşım ise taşıyıcı üzerindeki katyonik yükün indirgenmesi veya modifikasyonu sağlanarak polimer/DNA etkileşiminin zayıflatılması ve anyonik biyolojik makromoleküllere (mRNA, heparin, proteoglikanlar gibi) daha

abuk dissosiye olmasını sağlamaktır. Bu durumda genelde hidroksil ve kuaterner amonyum grupları ile asetil grupları yapıya katılmaktadır [12].

2.4.7 Biyouyumluluk

Polimerik gen transfer sistemlerindeki en önemli kriter biyouyumluluktur, terapötik transfeksiyon verimliliği ise ikinci sırada gelmektedir.

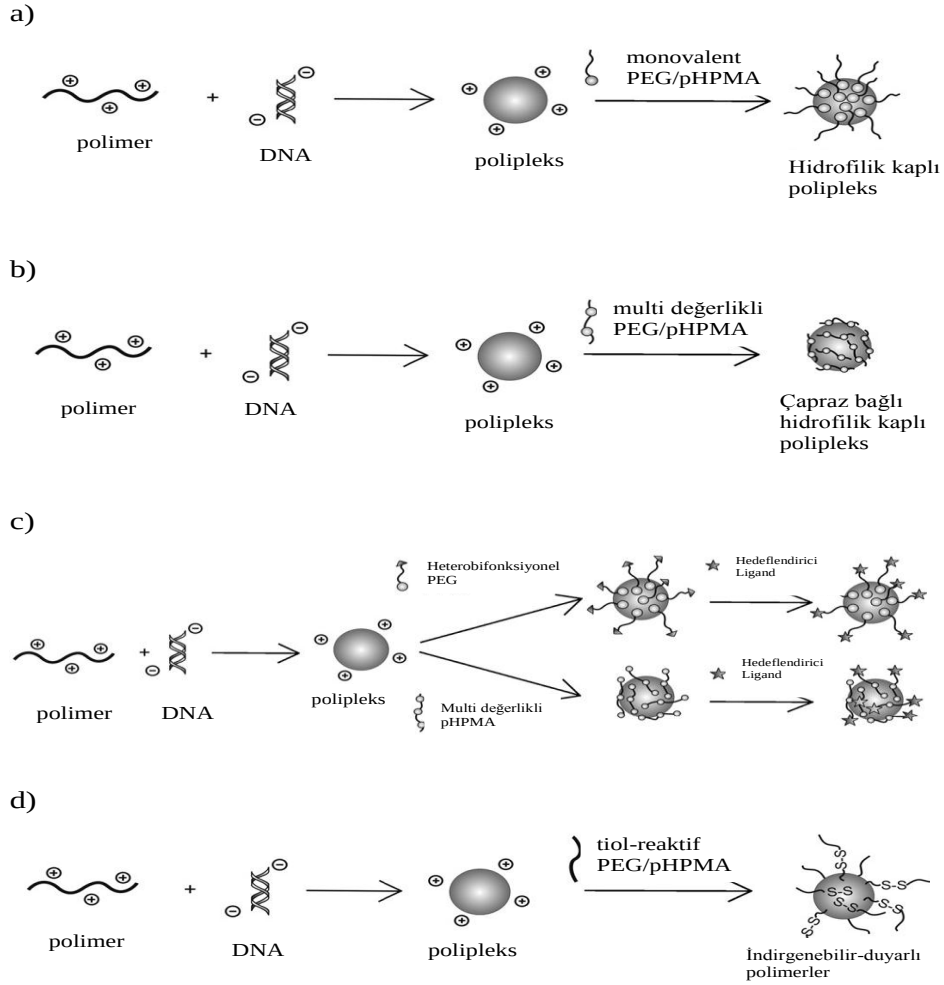
Gen transfer sistemlerinde biyouyumluluk iki başlıkta incelenmektedir; **1)** Sistemin kandaki stabilitesi, **2)** Sitotoksosite

2.4.7.1 Sistemin Kandaki Stabilitesi

Vektör tasarımlarında poli[N-(2-hidroksipropil metakrilamid)] (pHPMA), poli(etilen glikol) (PEG) ve çeşitli oligosakkaridler kullanılarak kan içerisindeki stabilitenin artırılması, serum bileşenleri ile etkileşimin azaltılması, polileks çözünürlüğünün artırılması gibi DNA salım etkinliğini artırıcı özellikler bu malzemelerin hidrofilik ve iyonik olmayan yapılarından ileri gelmektedir [12].

PEG ve pHPMA malzemeleri serumun destabilize etme özelliklerini (iyonik, hidrofobik kalıntılar gibi) oldukça etkili bir şekilde maskeleyerek polileksin etrafında bir hidrofilik tabaka oluşturup polileksi stabilize etmektedir. PEG ve pHPMA grupları polikasyonla graft veya kopolimerize edildiklerinde serumca zengin ortamda polileksi stabilize ederken zayıf kondense olabilen polilekslerin DNA ile kompleksine müdahale ederek transfeksiyon etkisini de azaltabilir. Bu problemin giderilmesi için araştırmacılar çeşitli yöntemler geliştirmişlerdir. Örneğin mono veya çok değerlikli PEG veya pHPMA zincirleri, polileksden uzanan amino gruplarına bağlanarak polileks yüzeyinin kaplanmasını sağlamaktır[Şekil 2.15(a)]. Kovalent çapraz bağlı kaplama hazırlamak için çok değerlikli zincirler hidrofilik zincir başına çoklu amino grupları ile beraber bağlanırlar [Şekil 2.15(b)]. Bunlara ek olarak gen transferinde hedeflendirme gibi fonksiyonlar arttırılmak isteniyorsa, heterobifonksiyonel (heterotelekellik) PEG veya çok değerlikli HPMA zincirleri polileksin amino zincir gruplarına tek bir reaktif yerden ve aynı zincir boyunca bağlanabilir [Şekil 2.15(c)]. Alternatif olarak da serum stabilizasyonunu sağlayan zincirler, taşıyıcıya bozunabilir bağlarla (asidik eğilimli hidrazon veya asetal bağları veya disülfid bağlar) sarılabilir ve bu sayede temelinde

endosomal kaçış sağlayan gruplarla birlikte hidrofilik kaplanmada sağlanmış olmaktadır [Şekil 2.15(d)] [12,75,76]



Şekil 2.15 PEG/pHPMA zincirlerinin polieleks ile reaksiyonları [12]

İyonize olmayan (non-iyonik) hidrofilik polimerlere alternatif olarak çözünürlüğe, biyouyumluluğa, ve potansiyel hedeflendirme kapasitesine katkılarından dolayı oligosakkaridler kullanılabilmektedir. Bunların içerisinde en sık kullanılanı ise siklodekstrinlerdir.

Serum-stabilizasyon ajanları, polieleks agregasyonunu azaltma, yüzey yükünü düşürme, kan içerisinde uzun süreli kalabilme ve çözünürlüğü artırma özellikleri bakımından oldukça önemlidir. Polieleksin stabilizasyonunu sadece ilave edilen hidrofilik gruplar sağlamamaktadır aynı zamanda hidrofilik grubun uzunluğu, polikasyon tipi, graft yoğunluğu, ilave edilen ligandlarda etkilemektedir .

2.4.7.2 Sitotoksosite

Her ne kadar polipleks veya taşıyıcı sistemin sitotoksik etkisine sebep olan mekanizmalar yeterli şekilde açıklanamamış olsa da, birçok hipotez sitotoksitenin hücre yüzeyindeki anyonik gruplar ile taşıyıcı üzerindeki katyonik gruplar arasındaki iyonik etkileşimden ileri geldiğini göstermektedir. Membran fonksiyonuna zarar veren ve sonucunda hücre ölümüne sebep olan, hücre yüzeyindeki birikme ve polipleks agregasyonu gibi olaylar iyonik etkileşim nedeniyle gerçekleşmektedir. Dahası, bazı etkileşimlerin katkısı ile oluşan yapısal farklılıklar sitotoksik etkiyi ileri derecede arttırmaktadır. Bu farklılıklar, taşıyıcı ve polipleks özelliklerini içermektedir; molekül ağırlığı, yapısı (zincirsel veya dallanmış), dallanma derecesi, katyonik yük yoğunluğu, katyonik fonksiyonalitenin tipi, polipleks boyutu, polipleks yüzey yükü, üç boyutlu konformasyonu ve polipleks esnekliğidir [12].

Araştırmacılar özellikle gen transfer sistemlerinde iki temel tasarım kriterine dikkat etmektedir, düşük toksisite ve yüksek transfeksiyon etkinliğidir. Birçok çalışmada, ortalama molekül ağırlığı 2 kDa'dan küçük olanların düşük toksisite gösterdiği, 25 kDa'dan büyük molekül ağırlığına sahip olanların ise daha yüksek transfeksiyon etkinliği gösterdiği bildirilmiştir. Yine düşük molekül ağırlıklı bileşenlerine parçalanabilen yüksek molekül ağırlığına sahip polimerik taşıyıcıyı oluşturmak için, disülfid veya ester bağları, zincirsel veya çapraz olarak bağlanmış ve DNA salımının etkinliği arttırılmıştır. Bozunma sonucu oluşan bu düşük molekül ağırlıklı bileşenler ya böbreklerden (30 kDa dan düşük olmalı örneğin 1,8 kDA PEI) veya doğal metabolik yollarla [örneğin poli-(4-hidroksi-L-pirolin ester)] elimine edilmektedir [12].

2.5 GEN TRANSFERİ İÇİN UYGUN POLİMERİK TAŞIYICI SİSTEMİN SEÇİLMESİ

Yukarıda belirtildiği gibi, transfeksiyon (gen transferi) bir genin plazmit aracılığı ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşınıp DNA'sına yerleştirilmesi olayıdır ve genetik anomali sonucu oluşan hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Bu konuda 20. yüzyılın sonlarına doğru iki yaklaşım ortaya koyulmuştur. Bunlardan birincisi gen transferinde oldukça yüksek etkiye sahip viral taşıyıcıların kullanılmasıdır, fakat bu

alanda kullanılan virüslerin yan etkilerinin oldukça fazla olmasından dolayı ikinci bir yaklaşım olan viral olmayan taşıyıcı sistemler (polimer, lipid veya lipozomlar vb.) geliştirilmiştir.

Bu alanda kullanılan viral olmayan biyouyumlu polimerik taşıyıcı sistemlere “transjenik polimerler” denilmektedir. Polimerik taşıyıcıların nükleik asitlerle oluşturdukları yapılara “polipleks” denilmektedir. Poli iyon kompleks (PIC) miseller ve miselle benzer polipleksler, vücut içerisinde yüklü malzemenin güvenli salımını sağladıkları için viral vektörlere alternatif olarak oldukça ilgi çekmektedir [10]. Özellikle PIC miseller, genlerin boyutuna göre hazırlanabilmektedir. Çünkü gen taşıyıcının üretimi için büyük bir avantaj olan ve gen-misel etkileşiminde itici kuvvet olan elektrostatik etkileşim bu yapılarda gerçekleşmektedir. Dahası PIC miseller, fonksiyonel ve boyut bakımından yapısal olarak virüslere benzerlik göstermektedir. Virüs boyutu 20-300 nm arasındadır ve lipidik yapısı genin dış çevreye karşı korunmasını sağlar. Biyouyumlu hidrofilik PEG üniteleri ile sarılı miseller ise, çekirdeğindeki yüklü malzemenin yapısına bağlı olarak partikül boyutu bakımından 20-200 nm değişmektedir.

DNA’nın yüzeyinde negatif yükler bulunduğu için PIC misellerin hazırlanmasında polikasyonlar kullanılmaktadır. Bu tip taşıyıcı sistemler hem doğal hem de sentetik polimer esaslıdır (adım veya katılma polimerleri) ve genelde dört grupta incelenmektedir. Bunlardan birincisi bozunmayan transjenik polimerler (poli-L-lizin, polietilen imin, polietilen glikol konjugatları, siklodekstrinler v.b.), ikincisi bozunabilen yeni transjenik polimerler (poli(β -amino esterler), polimidazoller, çeşitli polisakkaritler, kitosan vb.), üçüncüsü polietilen oksit/polipropilen oksit kopolimerleri, poli(N-vinilpirolidon), ve hidroksipropil metakrilat kopolimerleri, dördüncü grup ise polimerik poli(etilen oksid) ve polialkilsiyanoakrilat nano-/mikroküreleridir. Son yıllarda, poli(etilen glikol)-poli(dimetilaminoetil metakrilat) [PEG-PAMA], ve poli(etilen glikol)-poli(etilenimin) [PEG-PEI], genlerle birleştirilmiş PIC misellerini oluşturan etkili polikasyonlardandır [1].

Yaklaşık son 25 yılda yapılan kaynak araştırmaları ışığında, tezin kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, transfeksiyon etkinliğini araştırmak için doğal polimer olarak, kaynaklarda rastlanmayan, modifiye kitosan esaslı polimerlerin sentezi,

sentetik biyouyumlu polimer olarak da, kaynaklarda rastlanmayan poli (β -aminoester) esaslı polimerlerin sentezi, karakterizasyonu ve bu polimerlerden hazırlanan nanopartiküler sistemlerin gen transferinde kullanılabilmelerinin incelenmesi olarak belirlenmiştir. Bu nedenle aşağıda poli (β -aminoester)'lere, kitosana ve uygulanan modifikasyon reaksiyonlarına ait bilgiler sunulmuştur.

2.5.1. Tez Çalışmasında Gen Transferi İçin Kullanılan Doğal ve Sentetik Polimerler

Tez kapsamındaki çalışmalarda başlıca 2 ana gruptan oluşan doğal ve sentetik polimerler sentezlenmiş ve karakterize edildikten sonra nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu polimerler, i) Bozunabilen transjenik polimerler: poli(β -amino esterler) ii) Kitosan esaslı polimerler

2.5.1.1 Poli(β -amino esterler)

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerde dikkat çeken en önemli polimer gruplarından biri olan poli(β -amino esterler) (PBAE), Şekil 2.16'da görüldüğü gibi primer amin veya bis sekonder aminin diakrilatlarla Michael katılma reaksiyonu ile elde edilmektedir. Bu sayede sentezlenen polimer, yapısında bozunabilen ester bağları ve tersiyer amin grupları içermektedir [77-79].



Şekil 2.16 Poli(β -amino ester) sentezi

PBAE'ler ile benzer yapıdaki poli(amido aminler) (PAMAM), su ve alkol gibi sulu (protik) çözücülerde sentezlenmesine rağmen, PBAE'ler, tetrahidofuran (THF) veya diklormetan (DCM) gibi susuz (aprotik) çözücülerde elde edilmektedir. Susuz çözücülerin kullanılması ile ester bağlarının hidrolizi de engellenmiş olmaktadır. Polimerlerin sayısal/ağırlık dağılımına göre molekül ağırlıkları, çözücü veya monomer oranına bağlı olarak 2.000 ile 50.000 arasında değişmektedir. DCM'de elde edilen

PBAE'ler genellikle THF'de elde edilenlere nazaran daha yüksek molekül ağırlığına sahiptir. Bunun transfeksiyon etkinliğini arttıracak düşünülse de sitotoksikite ve partikül boyutu oluşumlarında dikkat edilmesi gerektiği gözlerden kaçmamalıdır [80]

PBAE'lerin gen transferinde kullanılmalarının tercihi edilmesinin başlıca sebepleri;

- Fizyolojik ortamda (pH 7,4) amin grupları protonlanabilmektedir
- Çeşitli monomerler ile hazırlanabilmekte ve çok özel bir saflandırma metodu gerektirmemektedir. Anderson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, toksik olmayan bir çözücü olan dimetilsulfoksit (DMSO) içerisinde sentezledikleri 2350 polimerden 33 tanesinin transfeksiyon etkinliğinin oldukça başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Bu malzemeler arasından en iyi sonuç verenin ise hidrofobik gruplar içeren PBAE'ler olduğunu söylemişlerdir [81].
- Üçüncü ve en önemli özelliklerinden bir tanesi de PBAE'ler *in vivo* uygulamalarda önemsenebilir bir sitotoksikite göstermezken, iyi bir transfeksiyon ajanı olan PEI oldukça yüksek toksisite göstermektedir [80].

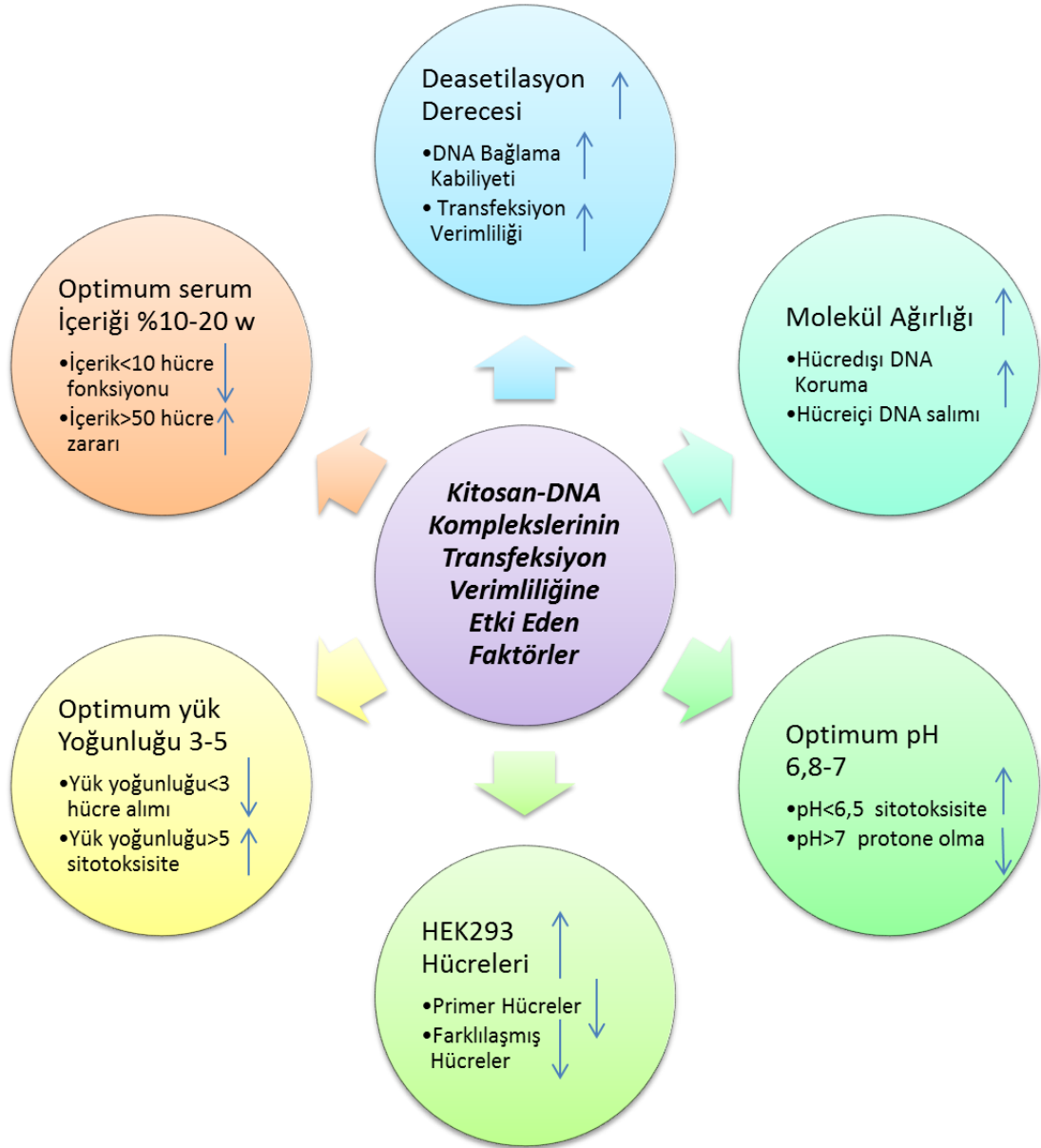
Tez çalışması kapsamında bu grupta; çeşitli başlangıç maddeleri kullanılarak farklı tipte PBAE yapısında polimerler sentezlendi.

2.5.1.2 Kitosan

Katyonik polimerler diğer bir adıyla polikasyonlar moleküler gen transfer sistemlerinin en başında gelmektedir. DNA ve polikasyonların etkileşimi sonucunda oluşan polielektrolit kompleksler (PEK), DNA'yı sıkıca paketleyerek DNase gibi DNA'yı parçalayan enzimlerden korur. Bununla birlikte gen transferinde kullanılan polikasyonlar, fizyolojik pH'da katyonik özellik gösterdiği için, DNA ile fizyolojik ortamda elektrostatik etkileşime girebilmektedirler. PEK sistemlerin viral vektörlere nazaran kolay üretim ve düşük immün cevap oluşturma gibi avantajlarına rağmen biyobozunabilme problemi ve en önemlisi düşük transfeksiyon etkinliği gibi negatif özellikleri de araştırmacıları yeni araştırmalar yapmaya yönlendirmiştir. Gen transferinde kullanılan en önemli polikasyonlar; PEI, poli(L-lisin), dendrimerler, jelatin ve katyonik polisakkaritlerden kitosandır. Bu polikasyonlardan kitosan, PEK sisteminde genel olarak yukarıda bahsedilen negatif özelliklerden bazılarını içermemesi, doğal, biyobozunabilir ve biyouyumlu olması ve toksik olmaması gibi sebeplerden dolayı transfeksiyon çalışmalarında araştırmacıların yoğun ilgisini çekmiştir [1].

Kitosan biyobozunabilir polisakkarit olup (1,4) glikosidik bağlarla birbirine bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin gibi iki alt ünitelerden meydana gelmektedir. Yengeç, istakoz gibi kabukluların, eklem bacaklıların dış iskeletinin ve ahtapotla mürekkep balığının dahil olduğu kafadan bacaklıların ağız kısmının ana bileşeni olan kitinin alkali deasetilasyonu sonucunda elde edilmektedir. 19. yüzyılda kitosan ile ilgili araştırmalara başlanmış olup günümüzde biyomedikal ve ilaç salım sistemleri arasında önemli bir yere sahip olmuştur [1,82].

Kitosan, yapısındaki D-glukozamin üniteleri sayesinde yüksek pozitif yük yoğunluğuna sahip olmakla birlikte kendine özgü pKa'sı (6,5) sayesinde asidik ve nötral pH'da polikasyon özelliği göstermekte ve alkali pH'larda ise çözünmemektedir. Kitosan asetik asit, laktik asit, hidroklorik asit, aspartik asit gibi asidik ortamda çözünabilir karakterdedir. Bu sayede kitosan üzerindeki amin grupları protone olabilmekte ve negatif yüklü DNA ile etkileşime girebilmektedir. DNA ile kitosanın oluşturacağı formülasyonun transfeksiyonunu kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi, kitosan ile DNA kompleksindeki N/P oranı, transfeksiyon ortamının pH'sı ve viskozite gibi faktörler önemli derecede etkilemektedir. [1,83]. Şekil 2.17'de kitosan-DNA formülasyonlarında transfeksiyon verimliliğine etki eden faktörleri ve sonuçları gösterilmiştir [84].



Şekil 2.17 Kitosan-DNA komplekslerinin transfeksiyon verimliliğine etki eden faktörler [84]

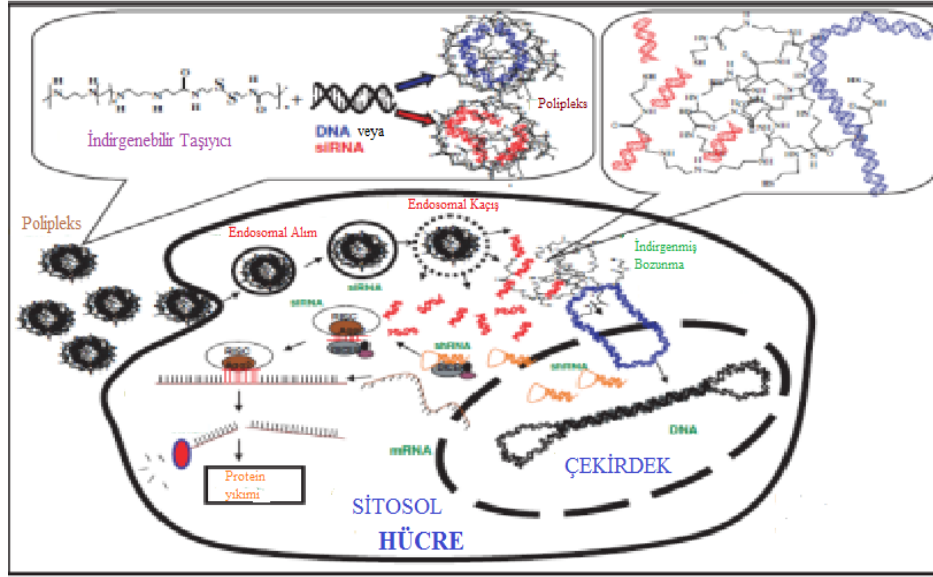
Kitosanın fizyolojik pH'da zor çözünmesi ve düşük transfeksiyon etkinliği göstermesi modifikasyon çalışmalarını da beraberinde getirmiştir. PEG veya glikol ile modifikasyon [85], kuaternize kitosan sentezi [86], düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanımı veya eldesi [87], indirgenmiş veya tiyollenmiş kitosanlar [88], transferrin gibi proteinlerle konjugasyon [89] gibi modifikasyonlar bu problemleri gidermek için yapılan modifikasyonlardan bazılarıdır.

Tez çalışmasında kitosana, molekül yapısındaki amin gruplarını arttırmak için klasik aminasyon reaksiyonu, indirgenebilen-duyarlı polimer yapısı sağlayabilmek için de tiyolleme modifikasyon reaksiyonları uygulandı. İndirgenebilen-duyarlı polimerler bu alanda yer alan oldukça yeni polimer grubu olduğundan aşağıda bunlar hakkında temel bilgilere yer verilmiştir.

2.5.1.3 İndirgenebilen-Duyarlı Polimerler

İndirgenebilen-duyarlı biyobozunabilen polimerlerin ve konjugatlarının hücre içi gen ve ilaç salım sistemlerinde kullanımında son yıllarda önemli artışlar görülmektedir. İndirgenebilen-duyarlı polimerlerin sentezi genel itibariyle disülfid bağlarının (-S-S-) ana zincirde, yan zincirde veya çapraz bağlayıcı olarak kullanılması ile sağlanmaktadır. Bu polimer taşıyıcılar hücre dışı sıvılarda mükemmel kararlılık gösterirken hücre içi bileşenlerde sitoplazma veya çekirdek gibi, indirgenmiş ortamda hızlı bozunma göstermektedir. Bu özelliği sayesinde DNA, siRNA veya proteinler gibi bioaktif moleküllerin kontrollü sitoplazmik salımı oldukça mükemmel bir şekilde olmaktadır [90].

Polimer zinciri üzerindeki disülfid bağları hücre içi ortamda küçük redoks molekülleri sayesinde indirgenebilmektedir. Bunlar glutatyon (GSH) ve tiyoredoksindir. GSH; protein ve polinükleotid sentezi, amino asid taşınımı, enzim aktivitesi ve metabolizması gibi önemli hücresel proseslerin düzenlenmesinde hayati önem taşıyan bir hücresel komponenttir (Şekil 2.18) [91].



Şekil 2.18 İndirgenebilir-Duyarlı polimerlerin gen transferi [91]

Son yıllarda yapılan çalışmalarda biyoindirgenabilir poli(amido amin)ler, poli(amido etilenimin)ler ve biyobozunabilir poli(disülfid amin)lerin transfeksiyon etkinliği bakımından PEI'e nazaran daha yüksek etki ve daha düşük toksisite göstermesi disülfid bağlarını içeren polimerlere ilgiyi oldukça fazla arttırmıştır [80,92].

2.6 KAYNAKLARDA DOĞAL VE SENTETİK BİYOUYUMLU GEN TAŞIYICI NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN ELDE EDİLMESİNE VE UYGULAMASINA AİT YAPILAN ÇALIŞMALAR

Bu tezle sunulan çalışma konusu ile ilgili olarak yapılan kaynak araştırması kapsamında, kaynaklarda 1990 yılından günümüze kadar, doğal ve sentetik polimer esaslı biyoyumlu nanopartiküler sistemlerin elde edilmesine ait çalışmaların olup olmadığı/bunların neler olduğu ve transfeksiyon amaçlı kullanılabilirliğine ve verimliliğine ait uygulamaların bulunup bulunmadığı/bunların neler olduğu araştırılmıştır. Bunlara ait rastlanan çalışmalar aşağıda özetler halinde belirtilmiştir.

Guo K. ve Chu C.C. ve arkadaşları, 2005, yaptıkları çalışmada yeni biyobozunabilen doymamış polyester amid/PEG diakrilat hidrojelere üreterek karakterizasyonunu ve morfolojisini incelemişlerdir [93],

Zhong Z., Song Y. ve arkadaşları, 2005, çalışmalarında bozunabilen viral olmayan çok dallı polyester aminlerin üretimini gerçekleştirmiş ve bu polimerler ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutları, zeta potansiyelleri, sitotoksisite ve *in vitro* transfeksiyon etkinlikleri incelenmiştir [94],

Midoux P., Pichon C. ve arkadaşları, 2009, histidin veya imidazol içeren polimer, peptid veya lipidlerden sitotoksitesi düşük ve nükleik asit salımına etki eden endolizozomal kaçışı önleyecek kimyasal taşıyıcı sentezlerini incelemişlerdir [95],

Anderson D.G., Akinc A. ve arkadaşları, 2004, çalışmaları kapsamında sentezledikleri 486 adet PBAE'in yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin gen transferine etkilerini incelemişlerdir. Molekül ağırlığı, DNA ile birleşim sonucunda partikül boyutu, DNA ile kompleks oluşumu sonucu yüzey yükü, optimum polimer/DNA oranı ve bu özelliklerin transfeksiyon verimliliğine etkisini araştırmışlardır [96].

Kim T., Ou M. ve arkadaşları, 2009, gen transfer sistemleri için 200 nm den küçük arjinin graft edilmiş biyoindirgenebilir polidisülfid amin viral olmayan taşıyıcı sistemi sentezlemişlerdir. Yeni sentezlenen taşıyıcı sistemin polietilen-iminden daha yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu ve PEI gibi toksisiteye de sahip olmadığı bildirilmiştir [97].

Veiseh O., Kievit F.M. ve arkadaşları, 2009, ise kanser hücrelerinde hedeflendirilmiş gen transfeksiyonunu sağlamak için yüksek toksisiteye sahip polietilen imini PEG ile muamele ettikten sonra, klorotoksin adı verilen peptidi ligand katılması yöntemiyle yapıya modifiye etmiş ve böylece kanser hücrelerine hedeflendirilebilen bir nanotaşıyıcı sistem hazırlamışlardır [98].

Ko T.Y., Kale A. ve arkadaşları, 2009, sistemik gen salımı için, kendiliğinden misel nanoparçacık oluşumu sağlayabilen fosfolipid-polietilenimin konjugatlarının sentezlenmesini gerçekleştirmişlerdir [99].

Green J.J., Shi J. ve arkadaşları, 2006, endotelial hücrelerde (HUVEC) gen salımını sağlayacak biyobozunabilir polimerik taşıyıcılardan olan PBAE'lerin sentezini

gerçekleştirmişlerdir. Kardiyovasküler rahatsızlıklar ve kanser için oldukça önemli olan bu hücre tiplerinde *in vivo* uygulama esnasında kanda bulunan serum proteinlerinin transfeksiyon verimliliğini düşürmesinden dolayı bunu arttıracak yönde bir taşıyıcı polimer sentezlemişlerdir [100].

Wieland J.A., Houchin T.L. ve Shea D.L., 2009, ise polietilen glikol ile modifiye edilmiş hyaluronik asit ile hidrojel formülasyonları hazırlayarak, karakterizasyonunu ve floresans mikroskopta *in vitro* transfeksiyon etkinliğini incelemişlerdir [101].

Ou M., Wang X.L. ve arkadaşları, 2007, gen salımı için yüksek transfeksiyon etkinliğine ve düşük toksisteye sahip biyobozunabilir polidisülfid amin sentezini gerçekleştirerek, HeLa, 293T, C2C12 ve NIH3T3 hücrelerinde *in vitro* transfeksiyon etkinliğini incelemişlerdir [102].

Xu F.J., Li H. ve arkadaşları, 2008, PEG, poli(2-dimetilamino etil metakrilat) ve poli(2-hidroksietil metakrilat) ile atom transfer radikal polimerizasyonu ile pentablok kopolimerin sentezini gerçekleştirmişlerdir. HEK293 ve COS7 hücrelerindeki gen transfeksiyon çalışmalarında PEI'e göre daha etkin transfeksiyon verimliliğine sahip bu kopolimer aynı zamanda polietilen glikol sayesinde de düşük toksisteye sahip gen taşıyıcı madde sentezini gerçekleştirmişlerdir [103].

Liang B., He M.L. ve arkadaşları, 2008, tümör-hedefli gen salımı için hiperdallı PEI-graft-folat-PEG taşıyıcı sistemi sentezlemişlerdir. Bu sayede, HEK293T gibi folat reseptörü içeren hücrelerde, transfeksiyon etkinliğini yalnız PEI içeren taşıyıcılara nazaran önemli oranda arttırdığı görülmüştür. Fakat HepG2 hücreleri gibi folat reseptörü içermeyen hücrelerde ise herhangi bir artış görülmemiştir [104].

Yang C., Li H. ve arkadaşları, 2007, viral olmayan gen taşıyıcı sistem hazırlamaya amacıyla oligoetilenimin dalları içeren α -siklodekstrin merkezli katyonik yıldız polimerleri sentezlemişlerdir. HEK293 ve COS7 hücrelerinde yapılan çalışmalarda sentezlenen vektörlerin plazmid DNA'nın transfeksiyon etkinliğini önemli derecede arttırdığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra α -siklodekstrin üzerindeki oligoetilenimin dallanma sayısının artmasıyla transfeksiyon etkinliğinin arttığı da bildirilmiştir [105].

Huang M., Khor E. ve Lim L.Y., 2003, asetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının, kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksitesine ve hücre alımına etkisini incelemişlerdir [106].

Paz L.E.C., Resin A. ve arkadaşları, 2010, kitosan nanopartiküllerinin *Streptococcus mutans* biyofilmlerine karşı antimikrobial etkilerini incelemişlerdir. Konfokal mikroskopta hücrelerin yaşam/ölüm dengesi ile incelenen bu çalışmada yüksek molekül ağırlığına sahip kitosan molekülünün düşük antimikrobiyal etki gösterdiği, düşük molekül ağırlığındaki kitosanın ise yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir [107].

Wang J., Gao S-J ve arkadaşları, 2004, aynı molekül ağırlığında fakat farklı yan zincir gruplarına sahip viral olmayan gen taşıyıcı polifosfoamidatları sentezlemişlerdir. Özellikle primer amino grubuna sahip polifosfoamidatlar, sekonder, tersiyer ve kuaterner amin grup içeren polifosfoamidat taşıyıcılara nazaran transfeksiyon etkinliği bakımından daha etkin bulunmuştur [108].

Luten J., Steenis J.H. ve arkadaşları, 2003, gen transferinde kullanılabilecek suda çözünebilen biyobozunabilir katyonik polifosfazenleri sentezlemişlerdir. Poli(dimetilamino metilmetakrilat)ın gen transfer sistemlerinde kullanılmasını engelleyen toksik etkisini fosfazenlerle azaltarak oldukça düşük toksisiteye sahip taşıyıcı sistemlerin üretilmesini sağlamalarına karşılık transfeksiyon etkisini 3 kat düşürmesi fosfazenlerin kullanımını kısıtlamıştır [109].

Zelikin A.N., Putnam D. ve arkadaşları, 2002, gen transfer sistemlerinde kullanılabilecek alifatik iyonlenleri sentezlemişlerdir. İyonlen polimerlerin düşük toksisite göstermesinin yanında yük yoğunluğuna ve molekül ağırlığına bağlı olarak in vitro DNA transfeksiyon etkinliği incelenmiştir [110].

Ihm J.E., Han K.O. ve arkadaşları, 2003, poli(4-vinilimidazol)den üretilen yeni bir viral olmayan gen taşıyıcı sistem sentezlemişlerdir. Toksisite açısından poli(dimetilaminoetil

metakrilat)’tan daha az toksik olan bu taşıyıcıların farklı hücre tiplerindeki (HeLa, 293T, MC3T3E1 hücreleri) gen transfeksiyon etkinliği incelenmiştir [111].

Csaba N., Höggard M.K., Alonso M.J., 2009, iyonik çapraz bağlı kitosan tripolifosfat (TPP) nanopartiküllerinin oligonükleotid ve plasmid DNA salımı için kullanımını incelemişlerdir. Kitosan-TPP nanopartiküllerinin fizikokimyasal özelliklerinin yanında *in vitro* transfeksiyon etkinliği, hücresel alım ve *in vivo* gen ekspresyonu incelenmiştir [112].

Gan Q., Wang T. ve arkadaşları, 2005, Kitosan-TPP nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerinin, partikül boyutunun ve yüzey yükünün gen salımına etkilerini incelemişlerdir. Bununla beraber kitosan molekül ağırlığı, konsantrasyonu, kitosan TPP ağırlık oranı ve çözelti pH’sının nanopartikül boyutuna, yüzey yüküne ve agregasyona etkilerini araştırmışlardır [113].

Turan K., Nagata K., 2006, kitosan hidrolizinin ve hücre tipinin *in vitro* DNA transfeksiyonuna etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada kitosanın hidrolizi sağlanarak viskozite ortalama molekül ağırlığı 450 kDa’dan 14 kDa düşürülmüş ve bu doğal biyoyumlu polimerden elde edilen kitosan-DNA nanopartiküllerinin HEK293, Swiss3T3, HeLa ve MDCK hücrelerindeki *in vitro* transfeksiyon etkinliği incelenmiştir [114].

Yapılan kaynak araştırmalarında son 10-15 yılda gen transferinde birçok doğal, sentetik veya yarı-sentetik polimer taşıyıcının kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışmalar içerisinde, tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan, sentetik olarak çeşitli tipte başlangıç maddeleri ile Michael katılma reaksiyonu ile elde edilen PBAE’lerin eldesi ile ilgili, doğal polimerlerden kitosan esaslı polimerlerin sentezi ile ilgili ve bu maddelerin başarılı bulunanlarının gen transferinde *in vitro* ortamda HEK293 ve koyun fibroblast (POF) ve koyun embriyonik fibroblast (POEF) hücreleri kullanılarak incelenmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2.7 ÇALIŞMANIN ÖZGÜN YÖNÜ

Yapılan kaynak araştırmalarında son 10-15 yılda gen transferinde kullanılabilen birçok doğal, sentetik veya yarı-sentetik polimer taşıyıcı sistemin sentezlendiği görülmüştür. Bu çalışmalar içerisinde, tez kapsamında gerçekleştirilmiş olan, sentetik olarak çeşitli tipte başlangıç maddeleri ile Michael katılma reaksiyonu ile elde edilen PBAE'lerin eldesi ile ilgili, doğal polimerlerden kitosana uyguladığımız modifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen kitosan esaslı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu ile ilgili, bu polimerlerden nanopartiküler sistemlerin elde edilmesi ve bunlardan uygun özellikte olanların *in vitro* ortamda insan embriyonik böbrek hücresi (HEK293), primer koyun fibroblast (POF) ve primer koyun embriyonik fibroblast (POEF) hücreleri kullanılarak gen transferindeki (transfeksiyon) etkinliğinin incelenmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmanın özgün yönü ana hatlarıyla:

- Gen transferi sistemlerinde viral taşıyıcıların yerini alabilecek, yani sentetik polimer PBAE esaslı ve doğal polimer kitosan esaslı polimerik taşıyıcı sistemlerin sentezi ve karakterizasyonu,
- Kaynaklarda bu alanda yapılan çalışmalarda rastlanmayan ve bu konudaki bir boşluğu doldurması amacıyla; ürünlerin gen transfer uygulamalarında önemli olan zeta potansiyeli, partikül boyutu ve polidispersite gibi özelliklerinin incelenerek, etkinliklerinin değerlendirilmesi,
- Bunların yanında başarılı bulunan ürün veya ürünlerin sitotoksosite özelliklerinin saptanması ve mevcut kullanılan viral olmayan sistemlerle *in vitro* transfeksiyon özelliklerinin karşılaştırılmalı olarak incelenmesi,
- Dolayısıyla ürünlerin biyouyumluluklarının ve transfeksiyon etkinliklerinin bilinmesiyle *in vivo* kullanımına uygunluğunun saptanması.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen PBAE esaslı ve modifiye kitosan esaslı ürünlerin ve transfeksiyon etkinliklerinin patentlenmesi için başvuruda bulunulacağından 551 sayılı “Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararname” ye göre ürünlerin sentezlenmesine ait deneyler ayrıntılı olarak sunulamamış, bu ürünlerin yapı aydınlatılmasına ilişkin FTIR spektra da sunulamadığından Bulgular, Tartışma ve Sonuç kısımlarında değerlendirmelerinden de bahsedilememiştir.

3.1 KİMYASAL MADDELER

PBAE’den elde edilecek nanopartiküler taşıyıcı sistem sentezi için çözücü olarak %99 saflıkta etanol (Merck), dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma), ve deiyonize su kullanılmıştır. MK ve İMK ürünlerinden nanopartiküler sistemlerin eldesi için ise asetik asit (Merck) ve tripolifosfat (TPP) (Sigma) kullanılmıştır.

Lisojeni besiyeri hazırlanması için Maya Ekstraktı (Nitrojen Bazlı, (-) Aminoasit içermeyen) (Difco), Triptone (Bacto) ve Sodyum klorür (moleküler biyoloji için) (Sigma), kompetant hücre hazırlanması için kalsiyum klorür (CaCl_2) (hücre kültür testler için) (Sigma) ve gliserol (moleküler biyoloji için) (Sigma) kullanıldı. Jel elektroforez denemeleri için Agaroz (Sigma), Tris-Asetat-EDTA (TAE, pH 8.0) tamponu hazırlanışı için tris baz (Sigma), %99 saflıkta glasiyal asetik asit (Merck) ve EDTA (Sigma), etidyum bromür (moleküler biyoloji için) (Sigma) ve bromfenol mavisi (Sigma) kullanıldı. Dulbecco’nun modifiye eagle besiyeri (DMEM-Stok) için L-glutamat (Sigma) ve sodyum piruvat (Sigma), sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Sigma), penisilin (Sigma) ve streptomisin (Sigma) kullanıldı. Fötal buzağı serumu (FCS) içeren DMEM çözeltisi için Sigma ürünü FCS kullanıldı. Hücre sayımı için tripan mavisi ve nanopartiküllerin hücre alım çalışmaları için model boyarmadde olarak rodamin-B (Sigma) kullanıldı.

3.2 CİHAZLAR VE YÖNTEM

3.2.1 PBAE Bileşiklerinin Elde Edilmesi Yöntemi ve Reaksiyon Sistemi

Tüm PBAE'lerin üretimi, monomerler olarak, aynı diamin bileşiğine karşılık farklı diakrilat bileşikleri kullanılarak, Michael katılma reaksiyonu mekanizmasına göre [96] gerçekleştirildi. Sentezde kullanılacak reaksiyon şartları (sıcaklık, süre, monomer molar oranları, monomer ilave şekli vb.) yapılan optimizasyon denemelerine göre saptandı.

3.2.2 Modifiye Kitosan (MK) ve İndirgenebilir Modifiye Kitosan (İMK) Bileşiklerinin Elde Edilmesi Yöntemi ve Reaksiyon Sistemi

MK bileşiğinin sentezi, kitosanın moleküler yapısı üzerinde amin miktarını arttırmaya yönelik olarak amin bileşiği ile modifikasyonu ile gerçekleştirildi.

İMK bileşiklerinin üretimi ise yukarıda sentez yöntemi anlatılan MK bileşiğinin farklı tipte disülfür bileşikleri ile modifikasyonu ile azot gazı akımı altında gerçekleştirildi. İMK bileşiklerinin (İMK₁ ve İMK₂) üretimi $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen kontakt termometreli manyetik karıştırıcı sistemi üzerine yerleştirilmiş su banyosu içinde bulunan 5 boyunlu 500 ml'lik cam reaksiyon sisteminde gerçekleştirildi. Reaksiyon sisteminde orta boyunda ayarlanabilir hızda karıştırma sağlayabilen mekanik karıştırıcı, diğer boyunlarda termometre, gaz geçirme sistemi, monomer ve başlatıcı besleme sistemleri bulunmaktadır.

3.2.3 PBAE ve Modifiye Kitosan Esaslı Ürünlerin Karakterizasyonu

3.2.3.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Tüm ürünlerin yapılarının aydınlatılması için, FTIR analizleri Digilab Excalibur-FTS 3000 MX model FT-IR cihazında, örnek/KBr oranı 1/200 olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmış tabletler kullanılarak, 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında kaydedilmek suretiyle gerçekleştirildi.

3.2.4 PBAE ve Modifiye Kitosan Esaslı Ürünlerden Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

3.2.4.1 PBAE Ürünlerinden Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

İstenilen ve tekrarlanabilen özelliklerdeki nanopartiküler sistemlerin elde edilebilmesi için bir seri ön deneme yapıldı.

PBAE ürünlerinden nanopartiküler taşıyıcı sistemler, yukarıda Bölüm 2.3.2.1’de belirtildiği gibi nanoçöktürme veya çözücü yer değiştirme yöntemi (etanol-su veya DMSO-su sistemi) kullanılarak hazırlandı. Bu yöntemle göre; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen kontakt termometreli manyetik karıştırıcıda sabit bir hızda karıştırılırken farklı miktarlarda noniyonik surfaktan içeren veya içermeyen suya PBAE polimerinin belirli miktarlardaki etanoldeki veya DMSO’daki çözeltisi oda sıcaklığında damla damla ilave edildi. Takiben bu şekilde 1-5 saat daha karıştırmaya devam edildi. Süre sonunda elde edilen PBAE nanopartiküllerinin (nPBAE) bir bölümü uygulamalar için doğrudan kullanılırken bir bölümü de 10.000 rpm’de santrifüj edilerek distile su ile yıkandı. Yıkama ve santrifüj işlemi 3 defa tekrarlandı. Karıştırma hızının partikül özelliklerine etkisini incelemek amacıyla farklı karıştırma hızlarında da (160, 360, 560, 650 rpm) denemeler gerçekleştirildi.

Burada elde edilen nPBAE ürünlerine yapılan testler sonucunda hangi yöntemin daha iyi olduğuna karar verilerek farklı başlangıç maddeleri ile hazırlanan PBAE ürünleri kullanıldı.

3.2.4.2 MK ve İMK Bileşiklerinden Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

MK ve İMK bileşiklerinden nanopartiküler taşıyıcı sistemleri (nMK ve nİMK), yukarıda Bölüm 2.3.2.1’de belirtildiği gibi iyonik jelasyon tekniğine göre hazırlandı. MK ve İMK bileşikleri %1’lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözüldü ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmak üzere distile su ile seyreltildi. Benzer şekilde TPP ise % 0,1 (a/h) olacak şekilde distile su içerisinde çözündürüldü ve kitosan çözeltisi manyetik karıştırıcıda 250 rpm hızla karıştırılırken üzerine damla damla TPP çözeltisi ilave edildi. Takiben bu şekilde 1 saat daha karıştırıldı. Disülfür bağı içeren örnekler için

partikül hazırlama ortamına %3'lük hidrojen peroksit çözeltisinden 6µl katıldı. Örnekler +4 °C'de saklandı [112,113]

3.2.5 GFP Taşıyan pDNA Eldesi

3.2.5.1 Lizojeni Besiyeri Hazırlanması (Bakteriler İçin) (LB Besiyeri)

Maya ekstraktından 5 g, kazeinin enzimatik parçalanması için Triptone'dan 10 g ve sodyum klorürden 10 g alınarak 1000 ml distile suda çözöldü. Elde edilen çözöltiden 200-250 ml alınarak 4 ayrı erlene koyuldu, 1 atm 120 °C'de 20 dakika otoklavlandı. Eğer içine %1,5 (a/h) oranında agar katılırsa besi yeri katı hale gelir ve petrilere tabana sürölerek bakterilere hazır besi yeri oluşturabilir [115].

3.2.5.2 Kompetant Hücre Hazırlanması

37 °C'de 1 gece boyunca üretilmiş bakteri kolonilerinden tek koloni seçildi ve 100 ml'lik besiyeri içeren çözölti içersine koyuldu. 37 °C'de 3 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde hücreler üretildi ve 600 nm'de optik dansite (OD.) değersine göre işlem sonlandırıldı. Hücreler soğuk, steril tüplere aktarıldı ve 10 dakika boyunca buzda bekletildi. 4000 rpm'de 10 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Alt faz soğukta 2 ml 0,1 M CaCl₂ içersinde çözöldü ve tekrar 4000 rpm'de 10 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edildi. Yeniden üst faz atıldı. Alt pellet faz 10 ml'lik kültür ortamı için 1,2 ml olacak şekilde 0,1 M CaCl₂ ve %15 gliserolde çözöldü. Eppendorf tüpler içersine 100 µl pasajlar halinde koyularak transformasyonda kullanılmak üzere -80°C dondurucuya kaldırıldı [115].

3.2.5.3 Gen Transformasyonu

Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetant bakteri denilmektedir. Gen transformasyonu ve izolasyonu denemelerinde bakteri tipi olarak *Escherichia Coli* (*E-Coli*) bakterisi kullanıldı. Bu bakteri türleri laboratuvarıda, yukarıda anlatılmış olan özel işlemler uygulanmadan kompetant özellik kazanmamaktadırlar.

Gerekli miktarda plasmid gelişmiş yeşil floresans proteinden (pEGFP) (1-50 ng arası) alındı ve buz banyosunda 100 µl hacimdeki hücre süspansiyonu üzerine koyuldu. Burada 15-25 dak. arasında bekletildikten sonra 41°C'de su banyosu içersinde şoklama

için inkübe edildi. Burada 75 sn. bekletildikten sonra oda sıcaklığında 5 dak. bekletildi. Gen-hücre solüsyonu üzerine 600 µl LB besiyeri eklenerek 37°C su banyosunda 30-45 dak. arası inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre-gen süspansiyonundan 150 µl alınarak plazmidin dirençlilik genini taşıdığı antibiyotikli besiyerine öze ile ekildi. Plazmid olarak GFP kullanıldığı için besiyerinde antibiyotik olarak kanamisin kullanıldı. 1 gece 37°C’de inkübe edilen GFP proteinini içeren plazmid genini çekirdeğine alan bakteriler, koloniler oluşturdu. Kolonilerden tek bir tanesi alınarak 5 ml’lik kanamisinli LB besiyerlerine alındı ve çalkalıyıcı su banyosunda 37°C’de 7 saat çalkalandı. Sonrasında 200 ml’lik besiyerlerine transfer edilerek yeniden 37°C’lik su banyosunda 1 gece boyunca çalkalandı. 200 ml’lik besiyerlerinde oluşan bakteriler 8000 rpm’de (6010 RCF) 10 dak. 20°C’de santrifüj edilerek üst faz atıldı. Altta kalan agregatların açılması için hafifçe vortekslendi ve 4 ml Tris-asetat tamponu ve glikoz içeren karışım içerisinde kitlerin kullanımlarına uygun şekilde dağıtıldı [115].

Bu aşamadan sonra piyasada mevcut DNA izolasyon kitleri kullanıldı ve buradaki işlemler gerçekleştirildi. Bu çalışmada Qiagen ve Macherey-Nagel firmalarının kitleri kullanıldı.

Kitlerin kullanımı soncunda izole edilen pDNA, 1:50 oranında seyreltilerek, UV spektrometrede 260 ve 280 nm’de OD. değerleri okunarak miktar hesabı ve saflık belirlemeleri yapıldı. Bu çalışmada kullanılan pDNA miktarı ve saflığı aşağıdaki şekilde hesaplandı;

Miktar Hesabı;

<u>Deneme Sayısı</u>	<u>260 nm</u>	<u>280 nm</u>
1	0,239	0,135
2	0,259	0,145

1 OD. 50 ng/µl olduğundan

<u>Deneme Sayısı</u>	<u>pDNA Miktarı</u>	<u>Ortalama</u>
1	$0,239 \times 50 = 11,95 \times 50$ (seyreltme faktörü) = 597,5 ng/µl	622,5 ng/µl
2	$0,259 \times 50 = 12,95 \times 50$ (seyreltme faktörü) = 647,5 ng/µl	

Saflık Hesabı:

260 nm’de ölçülen değerin 280 nm’ye oranının 1,8’e yakınlığına bakılmaktadır. Buna göre;

<u>Deneme Sayısı</u>	<u>Saflık Derecesi</u>	<u>Ortalama</u>
1	$0,239/0,135 = 1,77$	1,778
2	$0,259/0,145 = 1,786$	

Bu sonuca göre bu çalışmada kullanmış olduğumuz pDNA’nın saflık derecesinin oldukça yüksek olduğu görüldü.

3.2.6 pDNA Genini Taşıyan Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması

Bölüm 3.2.4.1’de anlatılan yöntem ve Bölüm 3.2.7’de anlatılan analiz sonuçlarına göre en uygun özelliklerde bulunan nPBAE ürünleri, Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı şekilde izole edilmiş olan pDNA ile değişen oranlarda (a/a) muamele edildi (ignPBAE). İkinci bir yöntem olarak Bölüm 3.2.4.1’de anlatılan nanopartikül hazırlama tekniğine göre nanopartikülü hazırlama esnasında PBAE₆ ürünü değişen oranlarda (a/a) pDNA ile muamele edilerek nanopartiküler sistemler enkapsülasyon metoduna göre hazırlandı (egnPBAE).

nMK ve nİMK ürünlerinde de benzer şekilde değişen oranlarda (a/a) pDNA ile muamele edilerek analizleri yapıldı (sırasıyla gnMK, gnİMK)

.

3.2.7 nPBAE, ignPBAE, egnPBAE, nMK, nİMK, gnMK ve gnİMK Ürünlerine Uygulanan Testler ve Kullanılan Cihazlar

3.2.7.1 Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi (Partikül Boyutu Dağılımı) (PDI) Analizleri

nPBAE, ignPBAE, egnPBAE, nMK ve nİMK ürünlerine ait zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve PDI analizleri, Zetasizer Nano series (Malvern Instruments, İngiltere) cihazında deiyonize suda 25 °C de yapıldı.

3.2.7.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

nPBAE, nMK ve nİMK ürünlerinin morfolojik yapıları SEM analizi ile, FEI Quanta FEG 450 cihazında yüzeyi altın ile kaplanarak incelendi. Fotoğraflar x120000-x240000 büyütme ile çekildi.

3.2.7.3 pDNA Genini Taşıyan Nanopartiküler Sistemlerin Jel Elektroforez Analizleri

Bölüm 3.2.6'da anlatılan yöntem ile değişik oranlarda elde edilen pDNA taşıyan nanopartiküler sistemlerin ortamdaki mevcut genin tamamının Bölüm 3.2.7'de belirtilen analiz sonuçlarında başarılı bulunan PBAE ve MK ürünleri ile kompleks oluşturma kabiliyetlerinin incelenmesi için ürünler jel elektroforezde (Cleaver Scientific Ltd., İngiltere) yürütüldü. Agaroz % 1 (a/h) derişimde Tris-asetat-EDTA (TAE, pH 8.0) tamponu içerisinde berrak çözelti oluşuncaya kadar kaynatılarak çözündürüldü. Takiben oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 0.5 µg/ml derişimde etidyum bromür ilave edildi. Yatay agaroz jel haznesine dökülen çözelti üzerine hazırlanan polimer-gen komplekslerin yüklenebilmesi için, taraklar yerleştirildi ve jelin donması sağlandı. Daha sonra jel içerisinde pH 8.0 TAE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Analiz için 9:1 (örnek:elektroforez yükleme tamponu) oranında 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırılarak (bromfenol mavisi) ve karıştırılmadan jele uygulandı ve elektroforez işlemi sabit 100 volt akımda 1 saatte tamamlandı. Elektroforez işlemi sonrası, UV transilüminatör üzerinde incelenen jeller fotoğrafları çekilerek değerlendirildi [116].

3.3 nPBAE ÜRÜNLERİNİN HÜCRE İÇİNE ALIM, nPBAE, nMK VE nİMK ÜRÜNLERİNİN SİTOTOKSİSİTE VE ignPBAE, egnPBAE, gnMK VE gnİMK ÜRÜNLERİNİN *IN VİTRO* TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARI

3.3.1 Hücre İçine Alım ve Transfeksiyon Çalışmaları İçin Solüsyon Hazırlanması [117]

3.3.1.1 DMEM-Stok;

DMEM-Stok çözeltisinin hazırlanmasında L-glutamat ve sodyum piruvat içeren toz DMEM kullanıldı. 13,38 g toz DMEM ve 3,7 g NaHCO₃, 60 mg penisilin ve 100 mg streptomisin 1 L su içerisinde çözündürülerek stok çözelti hazırlandı. Koyun hücreleri için antibiyotik ve amtimikotik madde ilavesine gerek yoktur.

3.3.1.2 FCS İçeren DMEM (DMEM+FCS);

174 ml DMEM-Stok medyumuna üzerine 20 ml FCS, 2 ml Na-piruvat, 2 ml L-glutamin ve 2 ml non-esansiyel aminoasit katılarak 200 ml DMEM+FCS medyumuna hazırlandı. Aminoasitlerin ve L-glutaminin +4°C’de stabilitesi düşük olduğu için hazırlanan medyum en fazla 1 hafta içerisinde tüketilmiştir.

3.3.1.3 FCS İçermeyen DMEM (DMEM-FCS);

194 ml DMEM-Stok medyumuna üzerine 2 ml Na-piruvat, 2 ml L-glutamin ve 2 ml non-esansiyel aminoasit katılarak 200 ml DMEM-FCS medyumuna hazırlandı. Aminoasitlerin ve L-glutaminin +4 °C’de stabilitesi düşük olduğu için hazırlanan medyum en fazla 1 hafta içerisinde tüketilmiştir.

3.3.1.4 Hücre Dondurma Medyumuna;

20 ml’lik dondurma medyumuna hazırlamak için 14 ml DMEM-Stok üzerine 2 ml DMSO ve 2 ml L-glutamin içeren FCS konuldu.

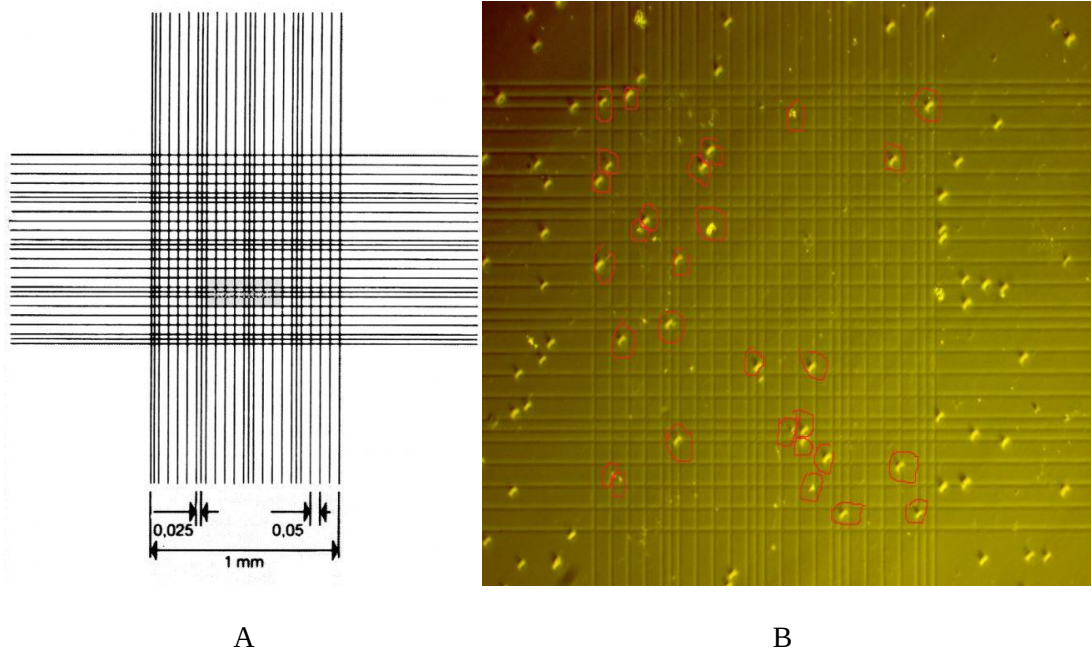
3.3.2 Primer Koyun Fibroblast (POF), Primer Koyun Embryonik Fibroblast (POEF), İnsan Embryonik Böbrek (HEK293) Hücrelerinin Hazırlanması

3.3.2.1 Hücrelerin Eritilmesi ve Kullanımı;

Çalışmalarda kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında koyun kulak derisinden elde edilen 2. ve 10. pasajlar arasında bulunan POF, POEF ve Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümünden sağlanan HEK293 hücreleri çoğaltılarak kullanıldı.

Hücrelerin bulunduğu kriyotüp sıvı azottan çıkarılarak içeriği, 37°C’de su banyosu içerisinde çözündürüldü. Kriyotüp içerisindeki hücreleri DMSO’dan arındırmak için 5 ml DMEM ile yıkanarak 5 dak. boyunca 2.000 rpm’de santrifüj edildi. Takiben üst faz dekanete edildi ve hücreler 1 ml DMEM içerisinde dağıtıldı. Elde edilen POF, POEF ve

HEK293 hücrelerinin konsantrasyonu hemasitometrik yöntemle Thoma lamda sayıldı (Şekil 3.1A). Hemasitometrik yöntem ile sayım sırasında %0,4 tripan mavisi kullanılarak hücrelerin canlılığı da tespit edildi. Bu işlemden sonra hücreler kültür kaplarına uygun oranda hücre/cm² olacak şekilde ekildi ve 1 gün boyunca üremeleri beklendi.



Şekil 3.1 A: Thoma Lam iç görünümü, B: Thoma Lam hücre görünümü

Şekil 3.1A’da görüldüğü üzere Thoma Lam içerisinde 1/10 mm³ içerisinde olacak şekilde hücreler sayılarak aşağıda verilen formülasyona göre toplam hücre derişimi hesaplandı. Sayım sırasında %0,4’lük tripan mavisi ile boyanan hücrelerin sayısına göre hücrelerin canlılık oranının belirlenmesi ile canlı hücre derişimi bulundu. Buna bir örnek verilecek olursa, Şekil 3.1B’de görüldüğü üzere, 1 ml DMEM içerisinde dağıtılan hücre süspansiyonundan 1 µl alınarak Thoma lama eklendiğinde 1/10 mm³’lük hacim içerisine düşen hücre sayısı 29’dur. Buna göre; 1/10 mm³ hacim içerisinde 29 adet hücre var ise 1 mm³’te 290 adet vardır. 1 µl hacimde 290 adet hücre var ise 1000 µl (1 ml) içerisinde 290000 hücre vardır.

Yukarıda anlatılan teknikle çoğaltılan ve hesaplama yöntemiyle hesaplanan hücreler denemelerde kullanılacak petrilere uygun konsantrasyonda olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.2.2 Hücrelerin Dondurulması;

Bölüm 3.3.2’de anlatılarak eritilen hücrelerin fazlasının ileride tekrar kullanımı için çoğaltma işlemine devam edildi. Petrilere yeterli miktarda çoğalan hücreler üzerindeki medyum dekante edilerek 5 ml PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi sonunda üzerine 1 ml %0,25’lik Trypsin EDTA konularak kaldırılan hücreler 37°C’de etüvde 2-3 dak. tutularak stabilizasyonu sağlandı. Bu süre sonunda etüvden çıkarılan hücreler tekrar 2.000 rpm’de 5 dak. santrifüj edildi. Üzerindeki medyum dekante edilerek, 1 ml hücre dondurma medyumunda 1 milyon hücre olacak şekilde sulandırıldı ve kriyotüplere konularak üzerine tarihi, hücre sayısı ve pasaj numarası yazıldı. Kriyotüpler kademeli soğutma için Mr. Frosty’e konularak -80 °C’de buzdolabına kaldırıldı ve bir gün burada bekletildikten sonra sıvı azota konularak tekrar kullanılacağı güne kadar saklandı.

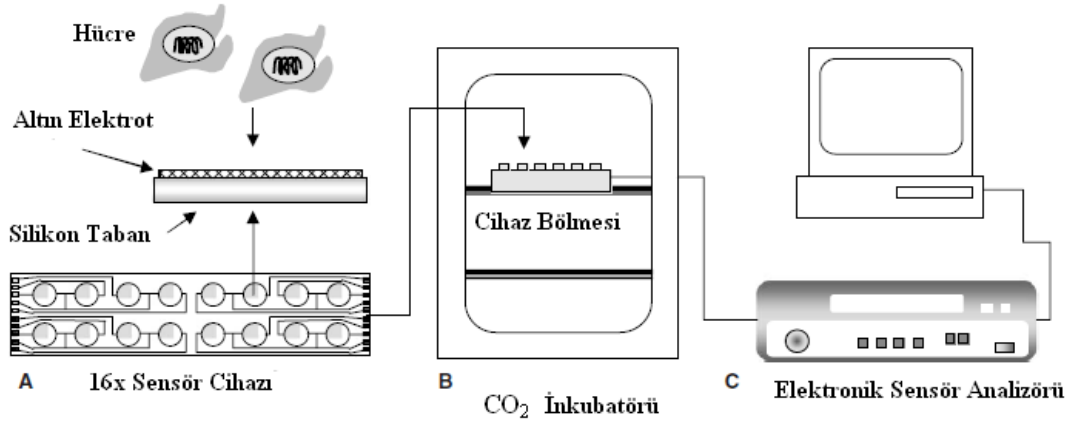
3.3.3 nPBAE Ürününün Hücre içine Alımı ve Dağılımı Çalışması

Bölüm 3.2.5.1, 3.2.5.3 ve 3.2.5.4 testlerinde başarılı bulunan PBAE₆ polimeri ile Bölüm 3.2.4.1’de anlatılan nanopartiküler hazırlama yöntemi (etanol-su sistemi) kullanılarak rodamin-B boyar maddesi içeren nanopartiküller elde edildi. Nanopartiküller boyar maddenin bulunduğu ortama göre ve stabilizör içerip içermemesine göre 3 ayrı şekilde hazırlandı. Dördüncü grup kontrol grubu olarak seçildi ve sadece boyar madde hücrelere uygulandı. Hücre içine alım çalışmasında hücre olarak POEF-5 (5.pasaj) hücreleri kullanıldı ve bu 4 grupta da hücre içine alım ve belirli sürelerde floresans mikroskopta incelenerek görüntülendi ve karşılaştırmalı olarak yorumlandı.

3.3.4 Gerçek Zamanlı Hücre Analizöründe (RTCA) Sitotoksosite Çalışmaları

nPBAE, nMK ve nİMK ürünlerine ait sitotoksosite çalışmaları, xCELLigence RTCA (Roche, Almanya) cihazında yapıldı. Aletin çalışma prensibi; E-Plate 96 ismi verilen 96 kuyucuktan oluşan altın plakanın içerisine ekilen mevcut hücrelerin elektriksel empedanslarının altın elektrodlar vasıtası ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Dolayısıyla özel kültür kaplarına ekilen hücrelerin sayısal değişikliklerinin oluşturduğu

elektriksel empedans değişimlerini kaydederek, gerçek zamanlı olarak hücrelerin çoğalmalarını (hücre proliferasyonu) ve yaşıyabilirliklerini kayıt edebilmektedir (Şekil 3.2).

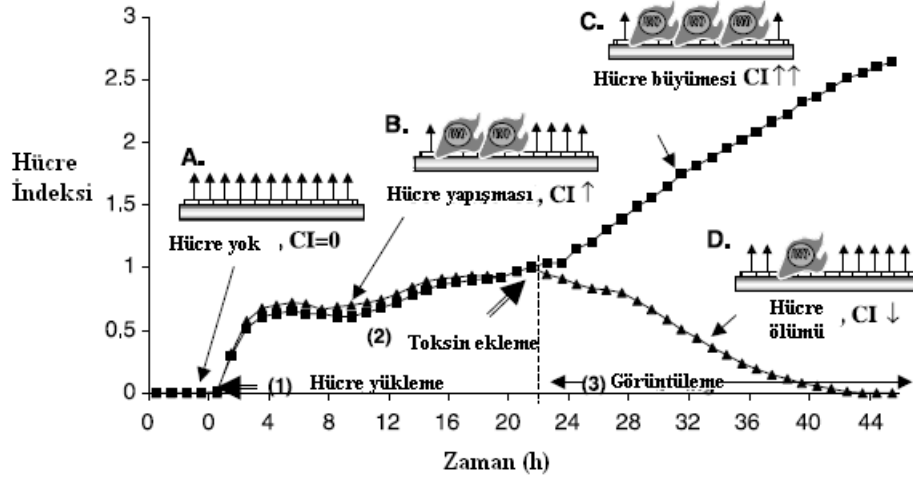


Şekil 3.2 Gerçek zamanlı hücre analizörü (RTCA) şematik görünümü

E-Plate 96 daki 96 kuyucuğun her birine 100 µl hücre kültür medyumunu eklendi. Optimal sonuçlar için, 30 dakika boyunca E-Plate 96 oda sıcaklığında bırakıldı. Bu kültür medyum ile E-Plate 96'nın dengeye gelmesini sağlayacaktır. Süre sonunda dengeye gelen E-Plate, xCELLigence cihazına yerleştirilerek background alındı.

Sitotoksisite çalışmalarında iki hücre tipi, insan embryonik böbrek hücre (HEK293) ve primer ovine fibroblast (POF) 8. pasajındaki (POF-8) hceler kullanıldı. Herbir kuyucuğa 30000 hücre gelecek şekilde hücreler ekildi ve oda sıcaklığında 30 dak. beklendi. Sonrasında E-plate cihaza yerleştirildi ve hücrelerin kuyucukların tabanına yayılması için 1 gün beklendi.

1 gün sonra yayılan hücreler kontrol edildi ve üzerlerindeki FCS'li hücre kültür medyumunu alınarak toplamı 200 µl olacak şekilde FCS'siz hücre kültürü medyumunu ve değişen derişimlerde nPBAE, nMK ve nİMK ürünleri eklendi. 4 saat boyunca hücre ile malzemelerin teması sağlandı, cihazda ölçümler alındı. 4 saat sonunda hücrelerin zerindeki FCS'siz medyum ve malzeme karışımı alınarak FCS'li hücre kültürü medyumunu eklendi ve 72 saat boyunca hücre proliferasyonu takip edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 RTCA'dan alınan zamana bağlı hücre indeksi grafiği

3.3.4.1 Sitotoksosite Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Bölüm 3.3.4'de gerçekleştirilen sitotoksosite analizi hücre indeksi sonuçlarının istatistiksel analizi "SPSS 13.0 For Windows" istatistik programında "Mann-Whitney U" testi uygulanarak gerçekleştirildi. Sonuçlar 4'er kez tekrarlı alınmıştır (n=4).

3.3.5 Nanopartiküler Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliğinin İncelenmesi

Yukarıda anlatılan tüm analiz sonuçlarından başarılı bulunan ignPBAE, egnPBAE, gnMK ve gnİMK ürünlerinin transfeksiyon etkinliği HEK293, POF ve POEF hücrelerinde denendi. 4'lü, 12'li ve 24'lü kuyucuklara 10.000-200.000 arasında değişen miktarlarda Bölüm 3.3.2'de belirtildiği şekilde eritilen hücreler ekildi ve 1 gün boyunca yayılmaları için 37°C'de CO₂ etüvünde inkübe edildi. 1 gün sonunda hücreler mikroskopta incelenerek yayılımları kontrol edildi ve üstündeki FCS+DMEM medyumı alındı. Bölüm 3.2.6'da verilen yöntem ile hazırlanan nanopartiküller FCS-DMEM (150 µl) ile birlikte hücreler üzerine ekilerek 4 saat 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. 4 saat sonunda hücre üzerindeki medyum atılarak yerine tekrar FCS+DMEM medyumı eklendi ve 3 gün boyunca 37°C'de CO₂ etüvünde inkübe edildi. 3. gün sonunda pDNA'nın hücre içine transfeksiyonu yani nanopartiküler taşıyıcıların transfeksiyon etkinliği Olympus IX71 ters mikroskopta 460-480 nm floresans ışık altında incelendi. Hücrelerin göstermiş oldukları yeşil ışıma göre

(zayıfndan kuvvetli ışıma gösterenlere kadar olan hücrelerin tamamı) transfekte olarak değerlendirildi ve sayısal değerler görüntüleme sisteminde belirli bölgelerin alanlarının fotoğraflarının çekilmesi ile tesbit edildi.

4. BULGULAR

4.1 PBAE POLİMERLERİNİN ELDE EDİLMESİNDEKİ OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARINA AİT DENEMELER

PBAE ürünlerinin elde edilmesindeki optimizasyon çalışmalarına ait 6 deneme (PBAE_{1A}-PBAE_{1F}) gerçekleştirilmiş olup bunlardan bir tanesi ile öncelikle nPBAE ürünlerin eldesindeki optimizasyon çalışmaları için kullanıldı.

4.1.1 PBAE_{1A} Polimeri ile Nanopartikül (nPBAE) Hazırlama Yönteminin Optimizasyonu Çalışmaları

Bölüm 3.2.1’de belirtilen yöntem ve Bölüm 4.1’de gerçekleştirilen denemelere göre hazırlanan PBAE_{1A} ürününden nanopartikül eldesi Bölüm 3.2.4’de anlatılan yönteme göre yapıldı.

Nanopartikül Deneme 1

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (560 rpm) 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₁) kullanılabileceği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 2

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (560 rpm) 25 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₂) kullanılabileceği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 3

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (560 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₃) kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 4

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (560 rpm) 75 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₄) kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 5

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (560 rpm) 100 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₅) kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 6

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (160 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₆) kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 7

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (360 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₇) kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 8

125 mg PBAE_{1A} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine

mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu (nPBAE₈) kullanılabildiği kadar buzdolabında +4 °C’de saklandı.

4.1.1.1 PBAE_{1A} ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının (nPBAE) Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.4’de anlatılan yöntemle göre ve Bölüm 4.1.1’de belirtilen denemelerle elde edilen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 PBAE₁ polimeri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Kullanılan Polimer	Surfaktan Miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₁	PBAE _{1A}	0	560	1767,0	0,923	-0,4
nPBAE ₂	PBAE _{1A}	25	560	79,9	0,263	- 4,8
nPBAE ₃	PBAE _{1A}	50	560	55,3	0,227	- 5,3
nPBAE ₄	PBAE _{1A}	75	560	17,5	0,318	- 7,6
nPBAE ₅	PBAE _{1A}	100	560	13,8	0,241	- 4,5
nPBAE ₆	PBAE _{1A}	50	160	383,5	0,445	- 3,3
nPBAE ₇	PBAE _{1A}	50	360	148,8	0,296	- 2,5
nPBAE ₈	PBAE _{1A}	50	650	41,9	0,116	-6,38

4.1.2 PBAE_{1A}-PBAE_{1F} Polimerlerinden Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Bölüm 3.2.1’de belirtilen yöntemle göre ve Bölüm 4.1’de anlatılan denemelere göre hazırlanan PBAE_{1A}-PBAE_{1F} ürünlerinden nanopartikül hazırlanması, Bölüm 3.2.4’de anlatılan yöntem ve Bölüm 4.1.1.1’de Tablo 4.1’deki sonuçlardan en uygun bulunan Nanopartikül Deneme 8’e (nPBAE₈) göre gerçekleştirildi.

Nanopartikül Deneme 9

125 mg PBAE_{1B} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine

mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen ürün (nPBAE₉) buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 10

125 mg PBAE_{1C} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen ürün (nPBAE₁₀) buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 11

125 mg PBAE_{1D} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen ürün (nPBAE₁₁) buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 12

125 mg PBAE_{1E} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen ürün (nPBAE₁₂) buzdolabında +4 °C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 13

125 mg PBAE_{1F} polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Elde edilen ürün (nPBAE₁₃) buzdolabında +4 °C’de saklandı.

4.1.2.1 PBAE_{1A}-PBAE_{1F} Polimerlerinden Elde Edilen Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.4’de anlatılan yöntemle göre ve Bölüm 4.1.2’de belirtilen denemelerle elde edilen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve poldispersitesine ait bulgular Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 PBAE_{1A}-PBAE_{1F} polimerlerinden elde edilen nanopartikül formülasyonlarına ait partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Kullanılan Polimer	Surfaktan Miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₈	PBAE _{1A}	50	650	41,9	0,116	- 6,38
nPBAE ₉	PBAE _{1B}	50	650	17,89	0,430	- 0,668
nPBAE ₁₀	PBAE _{1C}	50	650	53,88	0,184	-2,85
nPBAE ₁₁	PBAE _{1D}	50	650	14,16	0,287	-2,67
nPBAE ₁₂	PBAE _{1E}	50	650	14,51	0,270	- 5,59
nPBAE ₁₃	PBAE _{1F}	50	650	12,18	0,303	- 4,46

4.2 PBAE POLİMERLERİNİN FARKLI DİAKRİLAT BİLEŞİĞİ KULLANILARAK ELDE EDİLMESİNE AİT DENEMELER

Bölüm 3.2.1’de belirtildiği gibi PBAE polimerlerinin sentezlenmesinde diamin bileşiği aynı kalmak suretiyle, diakrilat bileşikleri kullanıldı. Farklı diakrilat bileşikleri kullanılarak PBAE ürünlerin sentezlenmesi denemelerinde reaksiyon şartlarının, Tablo 4.1 ve 4.2’de belirtilen sonuçlar esas alınarak PBAE_{1C} ile aynı olmasına karar verildi. Buna göre 7 adet deneme gerçekleştirildi (Deneme 7-13) (PBAE₂-PBAE₈).

4.2.1 Farklı Diakrilat Bileşikleri Kullanılarak Elde Edilen PBAE Polimerlerinin FTIR Analiz Sonuçları

Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde aynı diamin ve farklı diakrilat bileşikleri kullanılarak elde edilen PBAE ürünlerinin Bölüm 3.2.3.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen FTIR spektrası Bölüm 3 Malzeme ve Yöntem’de belirtilen sebeplerden ötürü verilememektedir.

4.2.2 Farklı Diakrilat Bileşikleri Kullanılarak Elde Edilen PBAE Polimerlerinden (PBAE₂-PBAE₈) Nanopartikül (nPBAE) Formülasyonlarının Hazırlanması

Bölüm 3.2.4’de belirtilen yöntem ve Bölüm 4.1.2’de anlatılan denemelere göre ve Tablo 4.2’de yer alan sonuçlara göre en uygun özelliklerde bulunan PBAE_{1C} ürününü elde

etme tekniği esas alınarak farklı diakrilat bileşikleri kullanılarak elde edilen PBAE polimerleri ile aşağıda Nanopartikül Deneme 14-20’de belirtildiği şekilde nanopartiküllerin eldesi gerçekleştirildi

Nanopartikül Deneme 14

125 mg PBAE₂ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₁₄) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 15

125 mg PBAE₃ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₁₅) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 16

125 mg PBAE₄ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₁₆) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 17

125 mg PBAE₅ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₁₇) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 18

125 mg PBAE₆ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₁₈) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 19

125 mg PBAE₇ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₁₉) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

Nanopartikül Deneme 20

125 mg PBAE₈ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve 5 saat karıştırıldı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonu (nPBAE₂₀) kullanılıncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

4.2.2.1 PBAE₁-PBAE₈ Polimerleri ile Hazırlanmış Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.4’de anlatılan yöntem ve Bölüm 4.1.2’de belirtilen denemelerle elde edilen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3 PBAE₁-PBAE₈ polimerleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Kullanılan Polimer	Surfaktan Miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₁₀	PBAE ₁	50	650	53,88	0,184	-2,9
nPBAE ₁₄	PBAE ₂	50	650	275,5	0,405	+ 4,2
nPBAE ₁₅	PBAE ₃	50	650	269,3	0,322	- 0,2
nPBAE ₁₆	PBAE ₄	50	650	29,7	0,196	- 10,8
nPBAE ₁₇	PBAE ₅	50	650	66,9	0,231	+ 6,3
nPBAE ₁₈	PBAE ₆	50	650	51,4	0,232	+ 1,6
nPBAE ₁₉	PBAE ₇	50	650	*Partikül Hazırlanamadı		
nPBAE ₂₀	PBAE ₈	50	650	34,4	0,151	-0,8

4.2.3 PBAE₆ Polimeri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları kapsamında Tablo 4.3’de görüldüğü gibi en uygun özelliklere sahip PBAE₆ polimeri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonunun (nPBAE₁₈) hazırlama tekniği kullanılarak ve surfaktan kullanımı, santrifüjleme işlemi, yeniden dağıtma gibi bazı parametreler değiştirilerek aşağıda Nanopartikül Deneme 21-29’de belirtilen çalışmalar yapıldı ve en uygun nanopartikül hazırlama yöntemi saptandı.

Nanopartikül Deneme 21-24

125 mg PBAE₆ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve bir gece boyunca karışması sağlandı (nPBAE₂₁). Takiben +4°C’de 10.000 rpm’de santrifüj edildi. Üst faz ayrılarak (nPBAE₂₂) çöken partiküller tekrar deiyonize su içerisinde dağıtıldı (nPBAE₂₃). Tekrar dağıtılan faz ayrıca 0,22 µm’lik membrandan geçirildi (nPBAE₂₄).

Nanopartikül Deneme 25-28

125 mg PBAE₆ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren ve 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve bir gece boyunca karışması sağlandı (nPBAE₂₅). Takiben +4°C’de 10.000 rpm’de santrifüj edildi. Üst faz ayrılarak (nPBAE₂₆) çöken partiküller tekrar deiyonize su içerisinde dağıtıldı (nPBAE₂₇). Tekrar dağıtılan faz ayrıca bir de 0,22 µm’lik membrandan geçirildi (nPBAE₂₈).

Nanopartikül Deneme 29

Kontrol grubu olarak poli(β-aminoester) ürünü içermeyen 7,5 mL mutlak etanol çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 50 mg noniyonik surfaktan içeren ve 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve bir gece boyunca karışması sağlandı (nPBAE_{29-Kontrol}).

4.2.3.1 PBAE₆ Polimeri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.4’de anlatılan yöntemle göre ve Bölüm 4.1.2’de belirtilen denemelerle elde edilen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4 PBAE₆ polimeri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyel değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Kullanılan Polimer	Surfaktan Miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₂₁	PBAE ₆	0	650	108,9	0,152	38,9±5,33
nPBAE ₂₂	PBAE ₆	0	650	79,44	0,086	25,3±13,8
nPBAE ₂₃	PBAE ₆	0	650	872,6	1,000	51±4,6
nPBAE ₂₄	PBAE ₆	0	650	147,5	0,356	21,7±12,2
nPBAE ₂₅	PBAE ₆	50	650	157,5	0,834	-1,3±3,9
nPBAE ₂₆	PBAE ₆	50	650	262,2	0,442	-0,31±4,2
nPBAE ₂₇	PBAE ₆	50	650	3230	0,695	22,6±6,0
nPBAE ₂₈	PBAE ₆	50	650	182,4	1,000	1,6±3,5
nPBAE ₂₉ -Kontrol	-	50	650	400	0,358	-13,2±10,1

4.2.4 PBAE₁-PBAE₈ Polimerleri ile Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Bölüm 4.2.3’de belirtilen optimizasyon çalışmaları sonucunda Tablo 4.4’de görüldüğü gibi en uygun özelliklere sahip nPBAE₂₁ kodlu nanopartikül formülasyonunun hazırlama tekniği kullanılarak farklı diakrilat bileşikleri ile hazırlanmış PBAE polimerlerinden nanopartikül formülasyonları aşağıda Nanopartikül Deneme 30-36’da belirtildiği şekilde elde edildi.

Nanopartikül Deneme 30

PBAE₁ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₀) elde edildi.

Nanopartikül Deneme 31

PBAE₂ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₁) elde edildi.

Nanopartikül Deneme 32

PBAE₃ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₂) elde edildi.

Nanopartikül Deneme 33

PBAE₄ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₃) elde edildi.

Nanopartikül Deneme 34

PBAE₅ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₄) elde edildi.

Nanopartikül Deneme 35

PBAE₆ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₅) elde edildi.

Nanopartikül Deneme 36

PBAE₈ polimeri kullanılarak, Bölüm 4.2.3’de anlatılan nPBAE₂₁ kodlu formülasyonun hazırlanma tekniği ile nanopartiküller (nPBAE₃₆) elde edildi.

4.2.4.1 PBAE₁-PBAE₈ Polimerleri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.4’de anlatılan yönteme göre ve Bölüm 4.2.4’de belirtilen denemelerle elde edilen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5 PBAE₁-PBAE₈ polimerleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Kullanılan Polimer	Surfaktan Miktarı (mg)	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₃₀	PBAE ₁	0	650	549,0	0,477	19,1±3,9
nPBAE ₃₁	PBAE ₂	0	650	425,2	0,362	12,2±3,5
nPBAE ₃₂	PBAE ₃	0	650	886,5	0,828	4,1±4,2
nPBAE ₃₃	PBAE ₄	0	650	1006	0,450	11,3±3,4
nPBAE ₃₄	PBAE ₅	0	650	183,2	0,370	9,6±3,4
nPBAE ₃₅	PBAE ₆	0	650	123,5	0,114	33,1±6,8
nPBAE ₃₆	PBAE ₈	0	650	299,6	0,248	10,2±3,5

4.2.5 PBAE₅-PBAE₆ Polimerleri ile Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasında Çözücünün, Ortamda Bulunan İyonların ve Yüksek Karıştırma Hızının Etkisinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.4’de belirtilen yöntem ve Bölüm 4.2.2-Bölüm 4.2.4’de anlatılan denemelere ve Tablo 4.3-Tablo 4.5’de yer alan sonuçlara göre en uygun özelliklerde olan PBAE₅ ve PBAE₆ polimerlerinden farklı tekniklerle nanopartikül formülasyonları hazırlandı. Bölüm 2.3.2.1’de yer alan çözücü yer değiştirme yönteminde çözücü etkisini görebilmek için nanopartiküllerin hazırlanmasında etanolün yanında farklı çözücü olarak DMSO’da kullanıldı. Homojenizatör yardımıyla yüksek devirli karıştırma hızının etkisi için, hem etanol hem de DMSO ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları daha yüksek devirde (8000 rpm) hazırlandı. Ortamdaki iyon etkisini incelemek için çöktürme ortamı olarak sodyum asetat kullanıldı.

Nanopartikül Deneme 37

125 mg PBAE₅ polimerinin 1 mL DMSO’daki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 49 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve bir saat karışması sağlandı (nPBAE₃₇).

Nanopartikül Deneme 38

125 mg PBAE₆ polimerinin 1 mL DMSO'daki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 49 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve bir saat karışması sağlandı (nPBAE₃₈).

Nanopartikül Deneme 39

125 mg PBAE₆ polimerinin 7,5 mL mutlak etanoldeki berrak çözeltisi homojenizatör yardımıyla 8000 rpm sabit hızla karışan 42,5 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi, bu hızda 3 dakika daha karıştırıldıktan sonra manyetik karıştırıcıda bir gece boyunca karışması sağlandı (nPBAE₃₉).

Nanopartikül Deneme 40

125 mg PBAE₆ polimerinin 1 mL DMSO'daki berrak çözeltisi homojenizatör yardımıyla 8000 rpm sabit hızla karışan 49 mL deiyonize su içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi, bu hızda 3 dakika daha karıştırıldıktan sonra bir saat 650 rpm'de karışması sağlandı (nPBAE₄₀).

Nanopartikül Deneme 41

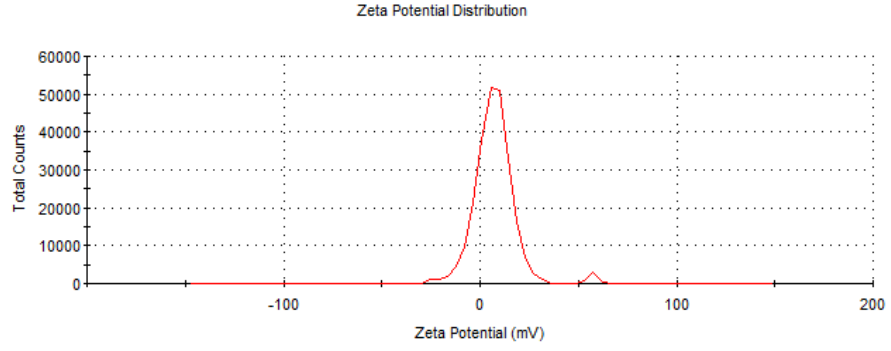
125 mg PBAE₆ polimerinin 1 mL DMSO'daki berrak çözeltisi sabit bir hızla karıştırılan (650 rpm) 49 mL pH 5 sodyum asetat çözeltisi içerisine mikropipet ile damla damla ilave edildi ve bir saat karışması sağlandı (nPBAE₄₁).

4.2.5.1 PBAE₅-PBAE₆ Polimerleri ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

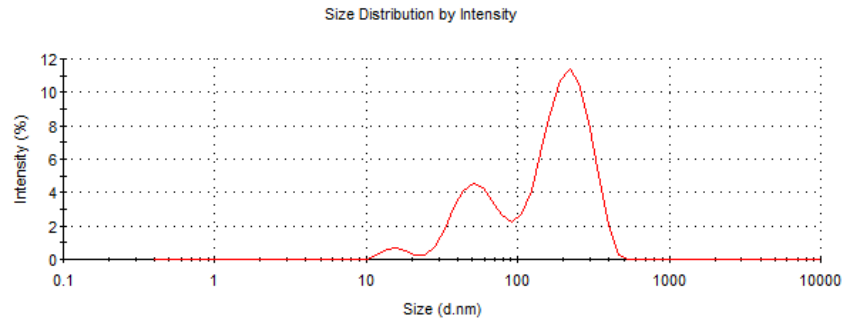
Bölüm 3.2.4'de anlatılan yönteme göre ve Bölüm 4.2.5'de belirtilen denemelerle elde edilen nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 4.6'da ve Şekil 4.1-Şekil 4.8'de verilmiştir. Sonuçlar 3'er kez tekrarlı alınmıştır ve ortalamaları verilmiştir (n=3).

Tablo 4.6 PBAE₅-PBAE₆ polimerleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri

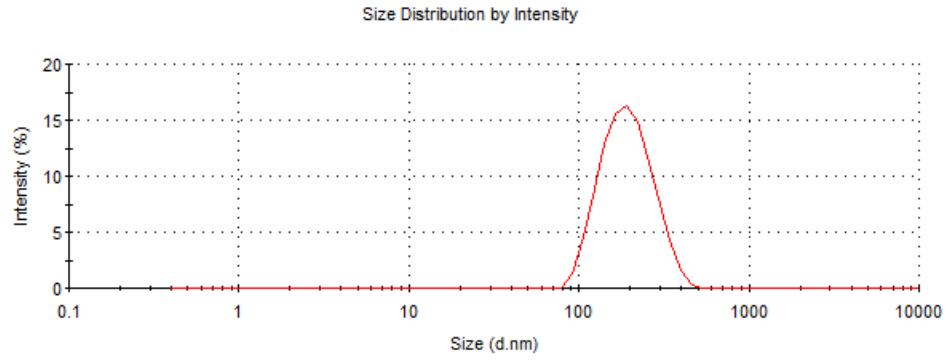
Nanopartikül Formülasyon	Kullanılan Polimer	Çözücü ve iyon	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₃₇	PBAE ₅	DMSO	650	173	0,308	7,39±10,8
nPBAE ₃₈	PBAE ₆	DMSO	650	179,4	0,100	54,5±8,64
nPBAE ₃₉	PBAE ₆	ETANOL	8000	155,7	0,222	30,7±4,51
nPBAE ₄₀	PBAE ₆	DMSO	8000	236,9	0,103	39,9±5,66
nPBAE ₄₁	PBAE ₆	DMSO NaAc	650	100,8	0,238	59,4±13,4



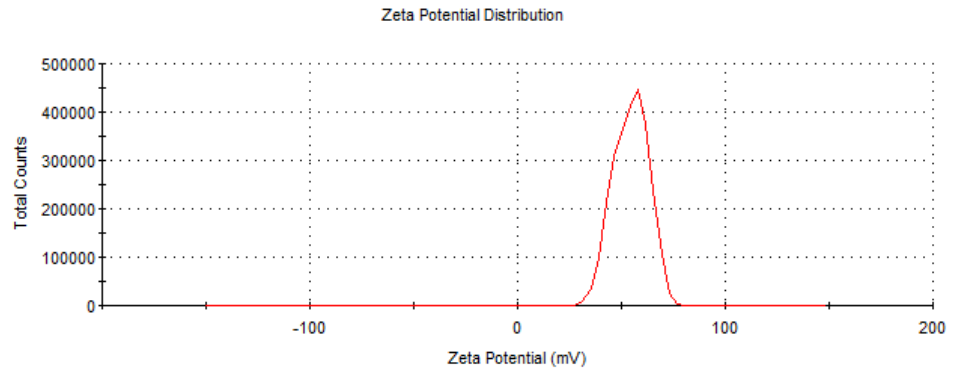
Şekil 4.1 nPBAE₃₇ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği



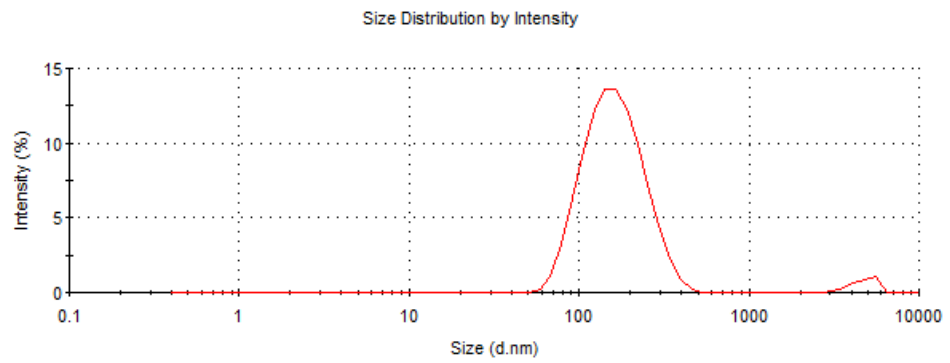
Şekil 4.2 nPBAE₃₇ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği



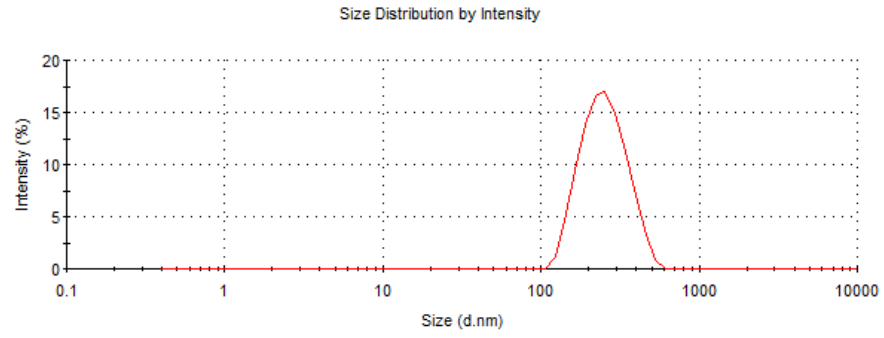
Şekil 4.3 nPBAE₃₈ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği



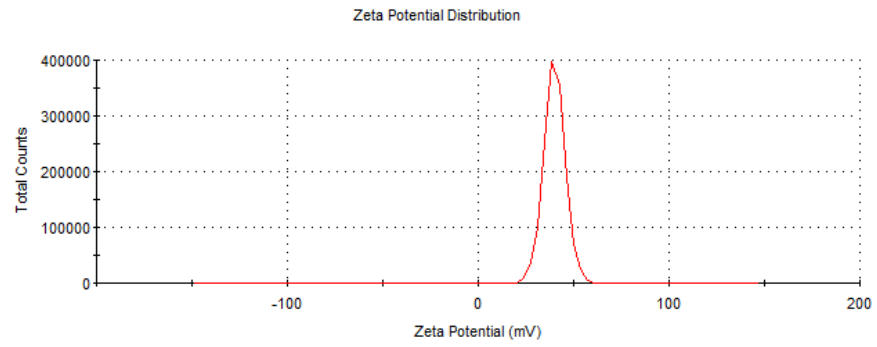
Şekil 4.4 nPBAE₃₈ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği



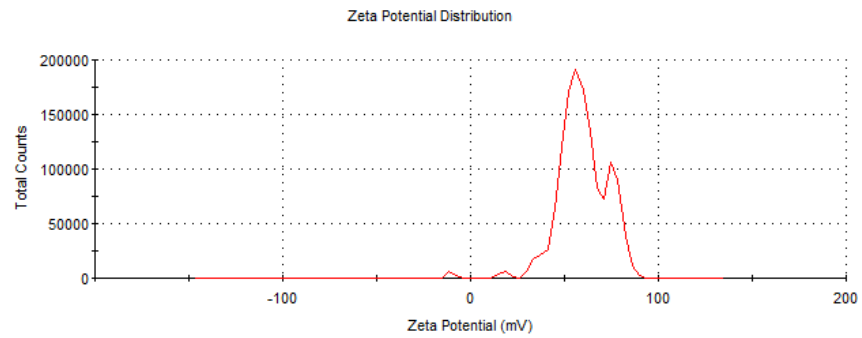
Şekil 4.5 nPBAE₃₉ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği



Şekil 4.6 nPBAE₄₀ nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği



Şekil 4.7 nPBAE₄₀ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği



Şekil 4.8 nPBAE₄₁ nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği

4.2.6 PBAE₆ Polimeri Kullanılarak Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilitelerinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.4’de belirtilen yöntem, Bölüm 4.2.4-Bölüm 4.2.5’de anlatılan denemeler ve Tablo 4.5-Tablo 4.6’da verilen sonuçlara göre en uygun özelliklere sahip nPBAE₃₅ ve nPBAE₃₈ formülasyonlarının 1 ay boyunca +4°C’deki koloidal stabiliteleri partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli sonuçları değerlendirilerek incelendi.

Tablo 4.7 PBAE₆ polimeri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının stabiliteleri

Nanopartikül Formülasyonu	Süre (hafta)	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nPBAE ₃₅	0	123,5	0,114	33,1±6,8
nPBAE ₃₅	1	136,0	0,167	29,7±4,39
nPBAE ₃₅	2	204,7	0,241	26,7±6,56
nPBAE ₃₅	3	353,7	0,367	-0,92±7,90
nPBAE ₃₅	4	634,8	0,595	-9,77±4,56
nPBAE ₃₈	0	179,4	0,100	54,5±8,64
nPBAE ₃₈	1	179,5	0,073	52,5±7,72
nPBAE ₃₈	2	175,0	0,125	46,4±5,68
nPBAE ₃₈	3	169,7	0,070	36,7±5,71
nPBAE ₃₈	4	170,9	0,076	30,1±6,9

4.3 MK VE İMK ÜRÜNLERİNİN ELDE EDİLMESİNE AİT DENEMELER

Bölüm 3.2.2’de belirtilen yöntemle göre MK ve İMK bileşiklerinin sentezi için 5 adet deneme gerçekleştirildi (Deneme 14-Deneme 18). Bölüm 3’de Malzeme ve Yöntemde bahsedildiği üzere 551 sayılı yasa gereği bu denemelerde kullanılan malzemeler ve yöntem hakkında bilgi verilmemiştir.

4.3.1 MK ve İMK Ürünlerinin FTIR Analiz Sonuçları

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde elde edilen MK, İMK₁, İMK₂, İMK₃ ve İMK₄ ürünlerinin ve kitosanın Bölüm 3.2.3’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen FTIR spektrasına göre moleküler yapı üzerindeki modifikasyonlar aydınlatılarak ürünler karakterize edildi.

4.3.2 MK ve İMK Polimerleri ile nMK ve nİMK Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Bölüm 3.2.2’de belirtilen yöntemle göre sentezlenen MK ve İMK ürünlerinden nMK ve nİMK nanopartiküllerin hazırlanması Tablo 4.8 - Tablo 4.9’da belirtilen şartlarda gerçekleştirildi. MK ve İMK ürünleri 450 mg/150mL derişimde olacak şekilde %1’lik asetik asit içerisinde çözüldü. TPP çözeltisi ise 100 mg/100mL derişimde olacak şekilde deiyonize su içerisinde hazırlandı. İMK₃ ürünü %1’lik asetik asit içerisinde yeterli derecede çözünemediğinden bu ürün ile nanopartikül hazırlanamadı.

Tablo 4.8 nMK nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan formülasyon parametreleri

Nanopartikül Formülasyonu	MK (%)	MK Çözeltisi Hacmi (mL)	MK:TPP Oran	TPP Miktarı (mL)
nMK ₁	0,05	3,33	3:1	3,3
nMK ₂			4:1	2,5
nMK ₃			5:1	2,0
nMK ₄	0,10	6,67	3:1	6,7
nMK ₅			4:1	5,0
nMK ₆			5:1	4,0
nMK ₇	0,15	10,00	3:1	10,0
nMK ₈			4:1	7,5
nMK ₉			5:1	6,0
nMK ₁₀	0,20	13,33	3:1	13,3
nMK ₁₁			4:1	10,0
nMK ₁₂			5:1	8,0
nMK ₁₃	0,25	16,67	3:1	16,7
nMK ₁₄			4:1	12,5
nMK ₁₅			5:1	10,0

Tablo 4.9 nİMK nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan formülasyon parametreleri

Nanopartikül Formülasyonu	İMK (%)	MK Çözelti (mL)	MK:TPP Oran	TPP Miktarı (mL)
nİMK ₁	0,05	3,33	3:1	3,3
nİMK ₂			4:1	2,5
nİMK ₃			5:1	2,0
nİMK ₄	0,10	6,67	3:1	6,7
nİMK ₅			4:1	5,0
nİMK ₆			5:1	4,0
nİMK ₇	0,15	10,00	3:1	10,0
nİMK ₈			4:1	7,5
nİMK ₉			5:1	6,0

4.3.2.1 nMK ve nİMK Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyeli, Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Bölüm 3.2.4’de anlatılan yönteme göre ve Bölüm 4.3.2’de belirtilen denemelerle elde edilen nMK ve nİMK nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımına ait bulgular Tablo 4.10-Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.10 nMK nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nMK ₁	125,2	0,497	29,8±4,23
nMK ₂	104,4	0,402	43,9±4,43
nMK ₃	132,0	0,753	40,9±3,56
nMK ₄	108,9	0,405	32,2±5,41
nMK ₅	102,9	0,404	41,9±5,63
nMK ₆	118,7	0,420	5,31±3,62
nMK ₇	104,8	0,366	28,8±4,47
nMK ₈	114,8	0,326	43,7±8,89
nMK ₉	203,9	0,302	35,9±3,82
nMK ₁₀	126,4	0,464	30,5±4,41
nMK ₁₁	181,3	0,431	38,1±4,12
nMK ₁₂	140,9	0,418	44,4±5,05
nMK ₁₃	136,8	0,307	26,7±3,98
nMK ₁₄	113,3	0,390	40,6±4,81
nMK ₁₅	146,0	0,645	32,7±4,57

Tablo 4.11 nİMK nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
nİMK ₁	176,9	0,463	44,1±3,45
nİMK ₂	177,4	0,432	45,5±4,57
nİMK ₃	202,3	0,477	51,1±3,84
nİMK ₄	144,6	0,412	42,1±5,31
nİMK ₅	110,8	0,221	42,7±6,63
nİMK ₆	148,7	0,418	45,7±4,38
nİMK ₇	160,2	0,474	45,2±4,01
nİMK ₈	156,6	0,445	40,8±6,79
nİMK ₉	114,9	0,281	40,8±6,79

4.4 pDNA TAŞIYAN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ (gnPBAE) HAZIRLANMASI VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

4.4.1 pDNA Taşıyan Nanopartikül Formülasyonlarının (gnPBAE) İyonik Etkileşim Mekanizmasına Göre Hazırlanması (ignPBAE)

Bölüm 3.2.6'ya göre ignPBAE nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için birinci yöntem olarak; Bölüm 4.2.4- Bölüm 4.2.5'e göre hazırlanan ve Tablo 4.5 ve Tablo 4.6 sonuçlarına göre en uygun özelliklere sahip nPBAE₃₅ ve nPBAE₃₈ nanopartikül formülasyonları ile pDNA, sırasıyla Tablo 4.12 ve Tablo 4.13'de belirtilen oranlarda iyonik kompleks oluşturmak üzere karıştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dak. bekletilerek hazırlandı.

Tablo 4.12 nPBAE₃₅ nanopartikülü ile pDNA birleşme oranları

nPBAE-pDNA Oranı	nPBAE Miktarı (µg)	pDNA Miktarı (µg)	nPBAE Miktarı (µl)	pDNA Miktarı (µl)
0:1	0	1,06	0	2
1,73	1,83	1,06	1,00	2
3,46	3,67	1,06	2,00	2
6,92	7,33	1,06	4,00	2
10,38	11,00	1,06	6,00	2
13,83	14,66	1,06	8,00	2
17,29	18,33	1,06	10,00	2
20,75	22,00	1,06	12,00	2
24,21	25,66	1,06	14,00	2
27,67	29,33	1,06	16,00	2
31,13	32,99	1,06	18,00	2
34,58	36,66	1,06	20,00	2
38,04	40,33	1,06	22,00	2
41,43	43,92	1,06	24,00	2
44,89	47,58	1,06	26,00	2
48,34	51,24	1,06	28,00	2
51,79	54,9	1,06	30,00	2
55,24	58,56	1,06	32,00	2
58,7	62,22	1,06	34,00	2
62,15	65,88	1,06	36,00	2
65,60	69,54	1,06	38,00	2
69,06	73,2	1,06	40,00	2

72,51	76,86	1,06	42,00	2
75,96	80,52	1,06	44,00	2
79,42	84,18	1,06	46,00	2
82,87	87,84	1,06	48,00	2
85,9	91,5	1,06	50,00	2
89,77	95,16	1,06	52,00	2
93,23	98,82	1,06	54,00	2
96,68	102,48	1,06	56,00	2
100,13	106,14	1,06	58,00	2
258,96	274,5	1,06	150,00	2

Tablo 4.13 nPBAE₃₈ nanopartikülü ile pDNA birleşme oranları

nPBAE-pDNA Oranı	nPBAE Miktarı (µg)	pDNA Miktarı (µg)	nPBAE Miktarı (µl)	pDNA Miktarı (µl)
0:1	0	1,06	0	2
0,85	0,90	1,06	1,00	2
1,70	1,80	1,06	2,00	2
3,40	3,60	1,06	4,00	2
5,09	5,40	1,06	6,00	2
6,79	7,20	1,06	8,00	2
8,49	9,00	1,06	10,00	2
10,19	10,80	1,06	12,00	2
11,89	12,60	1,06	14,00	2
13,58	14,40	1,06	16,00	2
15,28	16,20	1,06	18,00	2
16,98	18,00	1,06	20,00	2
18,68	19,80	1,06	22,00	2

4.4.1.1 nPBAE₃₅-nPBAE₃₈ Formülasyonları ile Hazırlanmış pDNA Yüklü Nanopartiküllerin (ignPBAE) Zeta Potansiyeli Değerleri

Bölüm 3.2.4.1'e göre hazırlanan nPBAE₃₅ ve nPBAE₃₈ nanopartiküllerinin Tablo 4.12 ve Tablo 4.13'de belirtilen oranlarda pDNA ile birleştirilmesi ile elde edilen ignPBAE formülasyonlarına ait zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.14 ve Tablo 4.15'de verilmiştir.

Tablo 4.14 nPBAE₃₅ nanopartikülü ile hazırlanan pDNA yüklü formülasyonlara (ignPBAE) ait zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	nPBAE:pDNA Oranı	Zeta Potansiyeli (mV)
ignPBAE ₀	0:1	-33,2 ± 7,49
ignPBAE ₁	1,73	-31,7 ± 6,99
ignPBAE ₂	3,46	-29,3 ± 6,14
ignPBAE ₃	6,92	-24,7 ± 5,24
ignPBAE ₄	10,38	-21,7 ± 9,01
ignPBAE ₅	13,83	-20,0 ± 10,8
ignPBAE ₆	17,29	-16,0± 9,13
ignPBAE ₇	20,75	-15,1 ± 10,00
ignPBAE ₈	24,21	-14,8 ± 7,74
ignPBAE ₉	27,67	-14,6 ± 3,44
ignPBAE ₁₀	31,13	-14,5 ± 4,63
ignPBAE ₁₁	34,58	-6,9 ± 7,98
ignPBAE ₁₂	38,04	-8,0 ± 4,48
ignPBAE ₁₃	41,43	-12,8 ± 7,02
ignPBAE ₁₄	44,89	-12,7 ± 4,55
ignPBAE ₁₅	48,34	-12,6 ± 3,44
ignPBAE ₁₆	51,79	-10,1 ± 6,31
ignPBAE ₁₇	55,24	-8,2 ± 5,66
ignPBAE ₁₈	58,70	-7,9 ± 6,02
ignPBAE ₁₉	62,15	-10,0 ± 4,65
ignPBAE ₂₀	65,60	-12,3 ± 4,61
ignPBAE ₂₁	69,06	-12,0 ± 3,55
ignPBAE ₂₂	72,51	-4,4 ± 4,38
ignPBAE ₂₃	75,96	-5,9 ± 4,06
ignPBAE ₂₄	79,42	-9,9 ± 4,26
ignPBAE ₂₅	82,87	-7,6 ± 4,71
ignPBAE ₂₆	85,90	-4,5 ± 4,89
ignPBAE ₂₇	89,77	-4,6 ± 4,13
ignPBAE ₂₈	93,23	-0,7 ± 3,43
ignPBAE ₂₉	96,68	30,9 ± 10,60
ignPBAE ₃₀	100,13	40,4 ± 11,10
ignPBAE ₃₁	258,96	44,0± 7,15

Tablo 4.15 nPBAE₃₈ nanopartikülü ile hazırlanan pDNA yüklü formülasyonlara (ignPBAE) Ait zeta potansiyeli değerleri

Nanopartikül Formülasyonu	nPBAE:pDNA Oranı	Zeta Potansiyeli (mV)
ignPBAE ₃₂	0:1	-33,2 ± 7,49
ignPBAE ₃₃	0,85	-16,4 ± 4,36
ignPBAE ₃₄	1,70	-10,7 ± 6,06
ignPBAE ₃₅	3,40	-7,8 ± 4,48
ignPBAE ₃₆	5,09	16,3 ± 5,40
ignPBAE ₃₇	6,79	28,2 ± 3,09
ignPBAE ₃₈	8,49	29,9 ± 6,08
ignPBAE ₃₉	10,19	29,1 ± 7,87
ignPBAE ₄₀	11,89	29,7 ± 9,17
ignPBAE ₄₁	13,58	36,2 ± 5,80
ignPBAE ₄₂ *	15,28	36,5 ± 6,03
ignPBAE ₄₃	16,98	39,4 ± 8,11
ignPBAE ₄₄	18,68	45,3 ± 8,05

*Formülasyonun partikül boyutu 171,4 nm. ve PDI değeri 0,139'dur.

4.4.2 pDNA Taşıyan Nanopartikül Formülasyonlarının (gnPBAE) Enkapsülasyon Yöntemi ile Hazırlanması (egnPBAE)

Bölüm 3.2.6'ya göre egnPBAE formülasyonlarının hazırlanması için ikinci yöntem olarak enkapsülasyon yöntemi kullanıldı. Bölüm 4.2.5'e göre hazırlanan ve Tablo 4.6'daki sonuçlara göre en uygun özelliklere sahip nPBAE₃₈ nanopartiküllerinin hazırlanma tekniği kullanılarak PBAE₆ polimeri ile pDNA taşıyan nanopartikül formülasyonları enkapsülasyon yöntemi ile hazırlandı. Buna göre; Bölüm 4.2.5'de anlatılan nPBAE formülasyonlarının hazırlanmasında 125 mg PBAE₆ polimerinin 1 mL DMSO'daki berrak çözeltisi ile Tablo 4.16'da belirtilen oranlarda pDNA'nın 200 µL DMSO'daki çözeltisi karıştırılarak 30 dak. oda sıcaklığında bekletildi. DMSO içerisindeki polimer-gen karışımı 650 rpm sabit hızla karışan 5 mL su içerisine damla damla damlatılarak oda sıcaklığında 30 dak.-1 saat arası karışması sağlandı.

Tablo 4.16 nPBAE₃₈ nanopartikül formülasyonuna pDNA yükleme oranları

nPBAE-pDNA Oranı	nPBAE Miktarı (µg)	pDNA Miktarı (µg)	nPBAE Miktarı (µl)	pDNA Miktarı (µl)
0:1	0	1,06	0	2
10	10,6	1,06	1,00	2
30	31,8	1,06	4,00	2
50	53,0	1,06	8,00	2
60	63,6	1,06	10,00	2

4.4.2.1 nPBAE₃₈ Formülasyonu Kullanılarak Hazırlanmış egnPBAE Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyeli, Partikül Boyutu ve Dağılımına Ait Bulgular

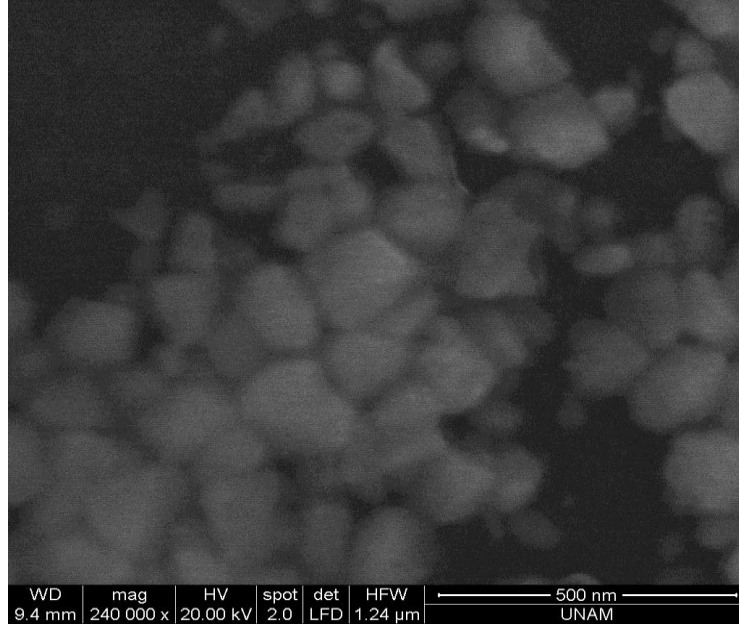
Bölüm 3.2.6'ya göre nPBAE₃₈ formülasyonuna Tablo 4.16'da belirtilen oranlarda pDNA yüklenmesi sonucu elde edilen nanopartikül formülasyonlarına (egnPBAE) ait zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17 nPBAE₃₈ formülasyonu kullanılarak hazırlanmış nanopartiküllerin (egnPBAE) zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı değerleri

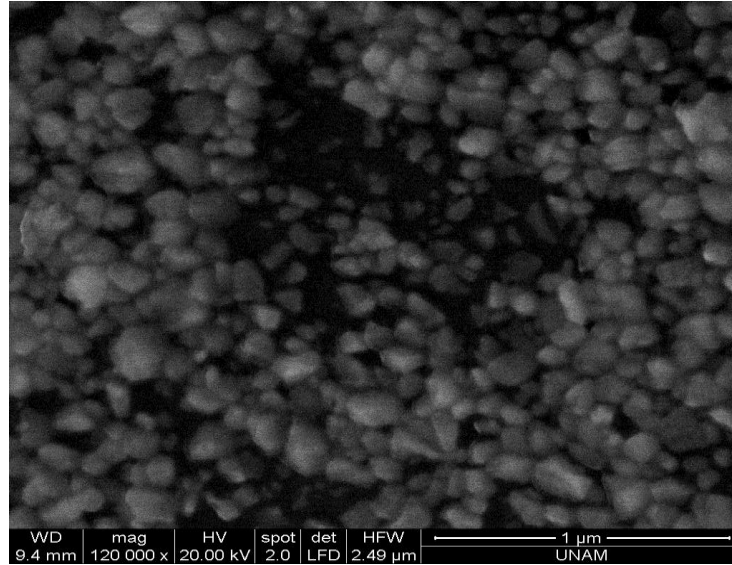
Nanopartikül Formülasyonu	nPBAE:pDNA Oranı	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite	Zeta Potansiyeli (mV)
egnPBAE ₀	0:1	-	-	-47,7 ± 5,95
egnPBAE ₁	10	167,6	0,044	13,6 ± 5,05
egnPBAE ₂	30	111,7	0,110	19,1 ± 6,33
egnPBAE ₃	50	174,9	0,084	35,6 ± 7,14
egnPBAE ₄	60	113,0	0,339	40,9 ± 4,95

4.4.2.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Görüntüleri

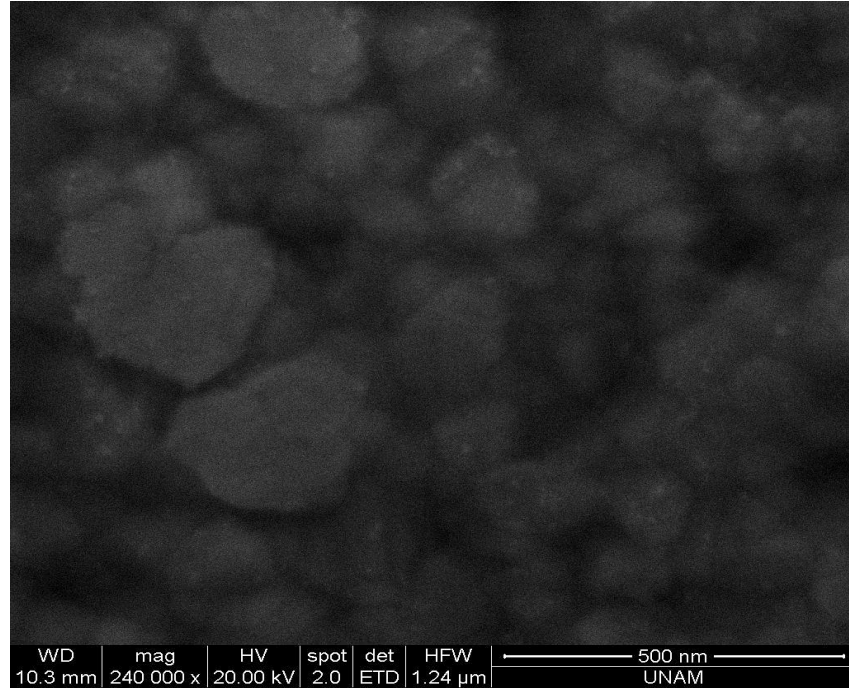
nPBAE, nMK ve nİMK nanopartikül formülasyonlarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile çekilen fotoğrafları, Şekil 4.9 – Şekil 4.13 verildi. Fotoğraflar x120.000- x240.000- x250.000 büyütme ile çekildi.



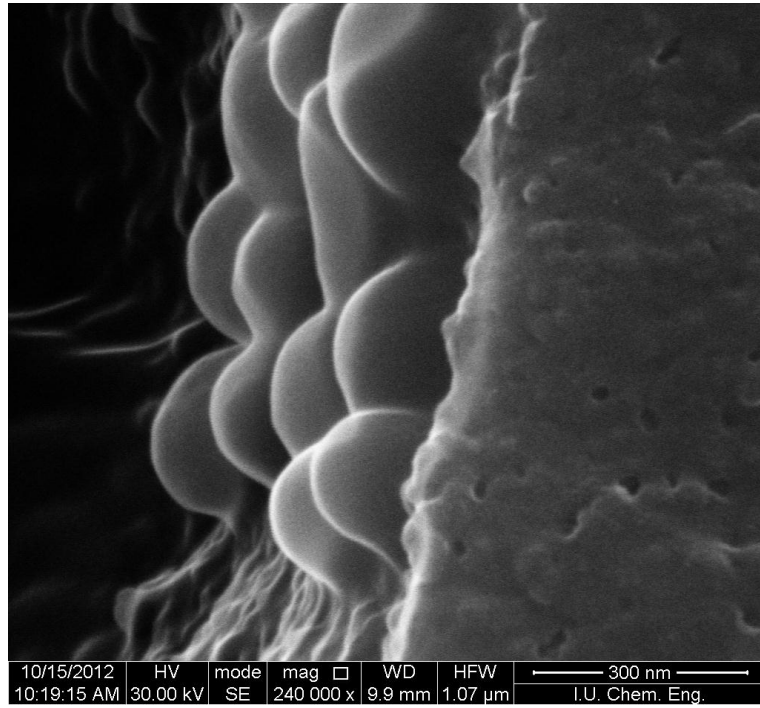
Şekil 4.9 nPBAE₃₅ formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x240.000)



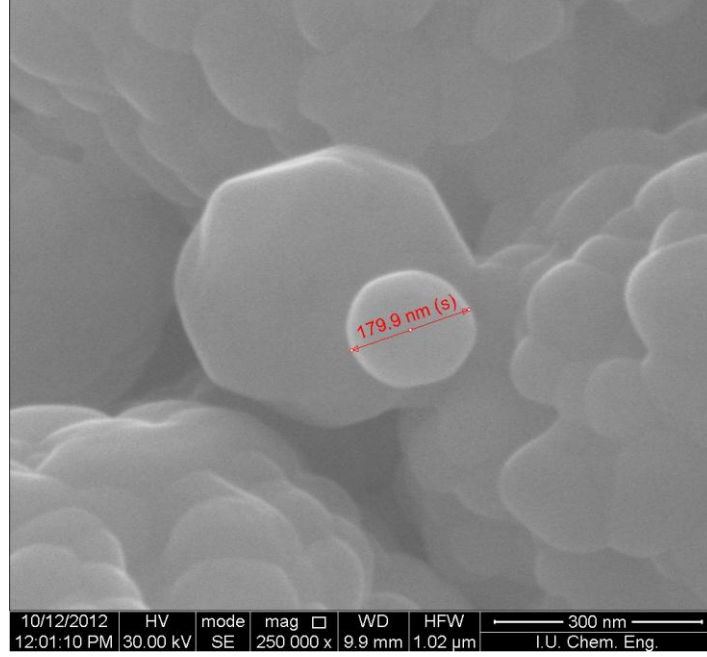
Şekil 4.10 nPBAE₃₈ formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x120.000)



Şekil 4.11 nPBAE₂₇ formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x240.000)



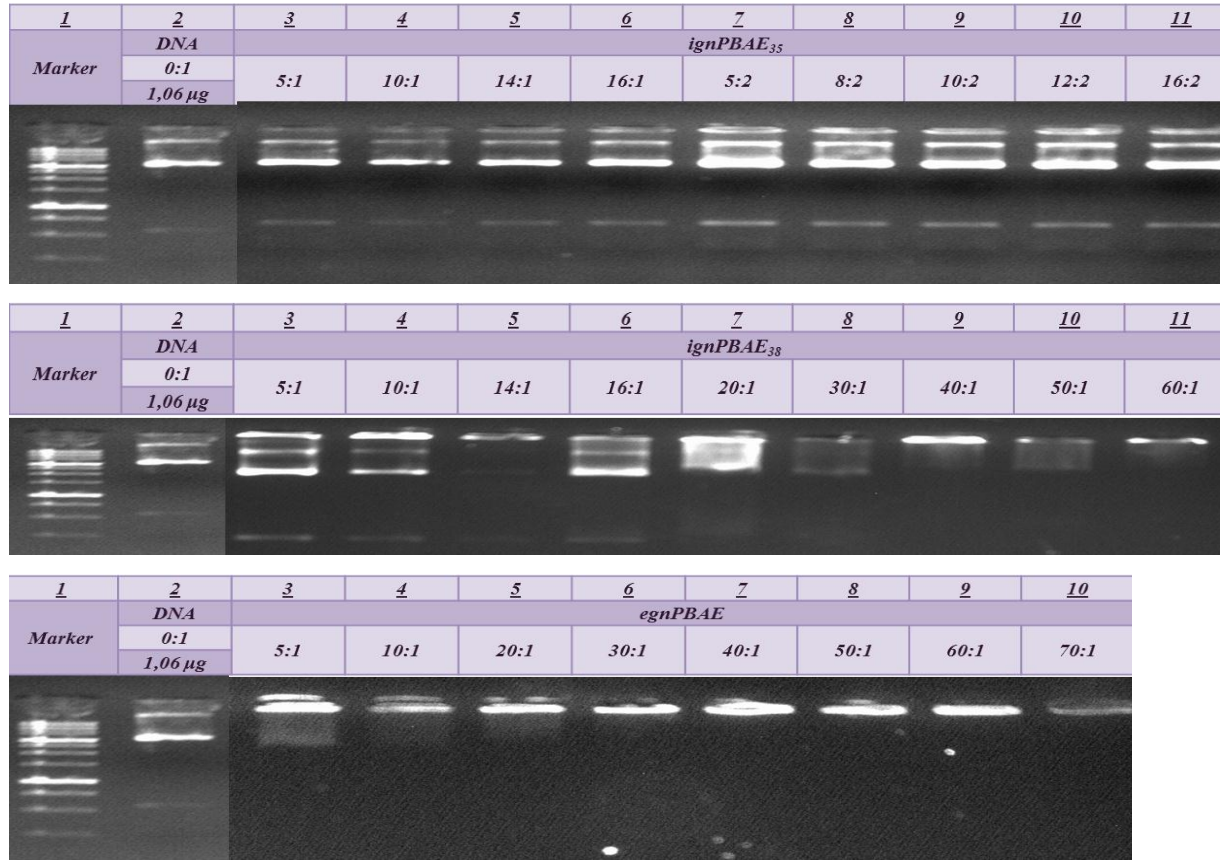
Şekil 4.12 nMK formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x240.000)



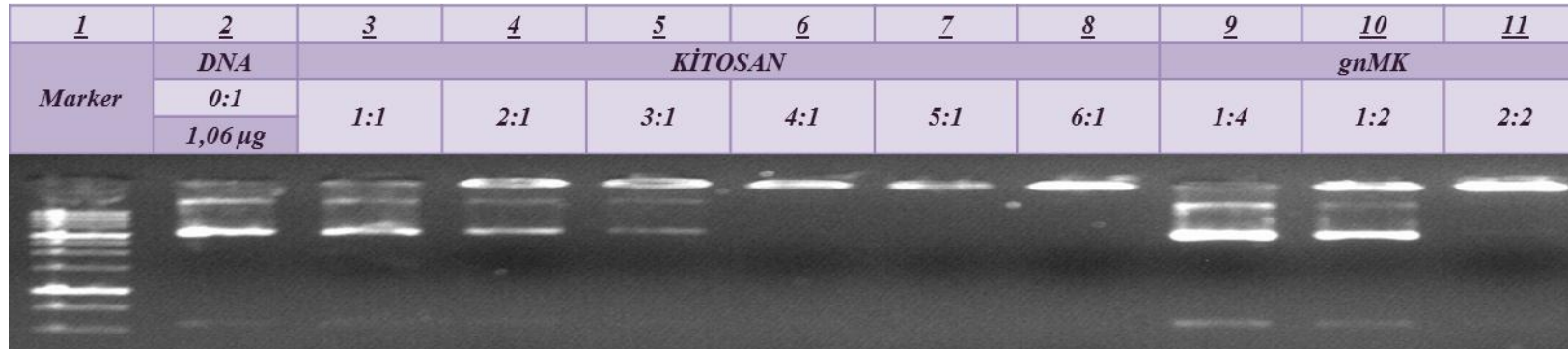
Şekil 4.13 nİMK formülasyonuna ait SEM görüntüsü (Büyütme: x250.000)

4.4.2.3 *ignPBAE₃₅, ignPBAE₃₈, egnPBAE, gnMK ve gnİMK Formülasyonlarına Ait Jel Elektroforez Sonuçları*

Bölüm 3.2.6'ya göre polimer/gen (a/a) oranına göre elde edilen ignPBAE₃₅, ignPBAE₃₈, egnPBAE, gnMK ve gnİMK formülasyonlarına ait jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.14 – Şekil 4.15'de sunulmuştur.



Şekil 4.14 ignPBAE₃₅, ignPBAE₃₈ ve egnPBAE formülasyonlarına ait jel elektroforez görüntüleri



Şekil 4.15 gnMK ve gnİMK formülasyonlarına ait jel elektroforez görüntüleri

4.5 nPBAE FORMÜLASYONLARININ HÜCRE İÇİNE ALIMI, nPBAE, nMK VE nİMK FORMÜLASYONLARININ SİTOTOKSİSİTE VE *İN VİTRO* TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARINA AİT DENEMELER

4.5.1 nPBAE Formülasyonlarının Hücre İçine Alım Çalışması

Bölüm 4.2.3’de belirtilen ve Tablo 4.4’de sonuçları yer alan nPBAE formülasyonlarının hücre içine alımı ve dağılımını incelemek için rodamin-B boyarmaddesi içeren nanopartiküller hazırlanarak Bölüm 3.3.3’de belirtilen yöntemle göre POEF-5 hücrelerine uygulandı. Hücreler 30 adet 35 mm’lik petrilere, herbirinde 75000 hücre olacak şekilde ekildi ve sonuçlar floresans mikroskopta belirli sürelerde (1’er saat aralıklarla) bakılarak incelendi ve sonuçlar Tablo 4.18 ile Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verildi.

Deneme 55

Bölüm 4.2.3’de anlatılan yöntemle göre boyarmadde içeren nanopartikül formülasyonları, nPBAE₂₁, nPBAE₂₂ ve nPBAE₂₄ nanopartiküllerini elde etme tekniği ile mutlak etanol içerisinde %5’lik (a/h) rodamin-B boyarmaddesi ilavesi ile hazırlandı ve hücrelere uygulandı (Noniyonik surfaktan içermeyen grup).

Deneme 56

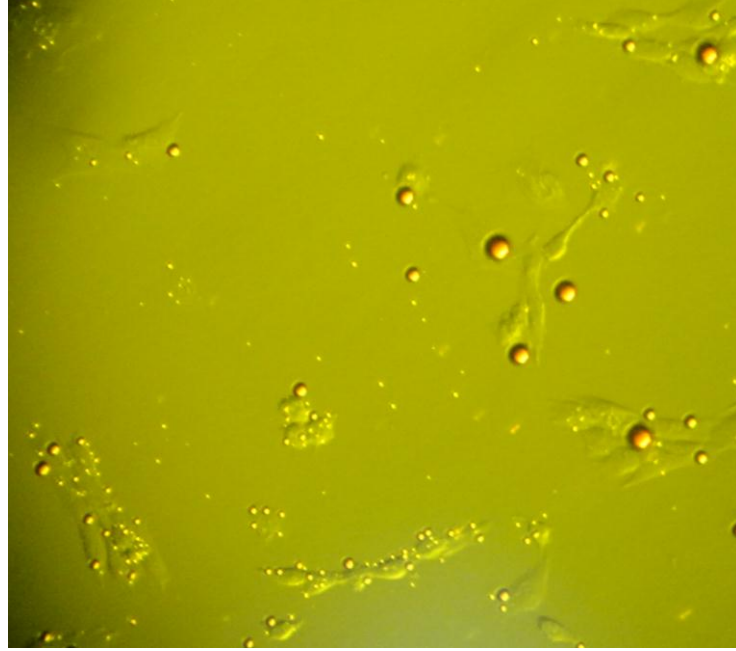
Bölüm 4.2.3’de anlatılan yöntemle göre boyarmadde içeren nanopartikül formülasyonları, nPBAE₂₅, nPBAE₂₆ ve nPBAE₂₈ nanopartiküllerini elde etme tekniği ile mutlak etanol içerisinde %5’lik (a/h) rodamin-B boyarmaddesi ilavesi ile hazırlandı ve hücrelere uygulandı (Noniyonik surfaktan içeren grup).

Deneme 57

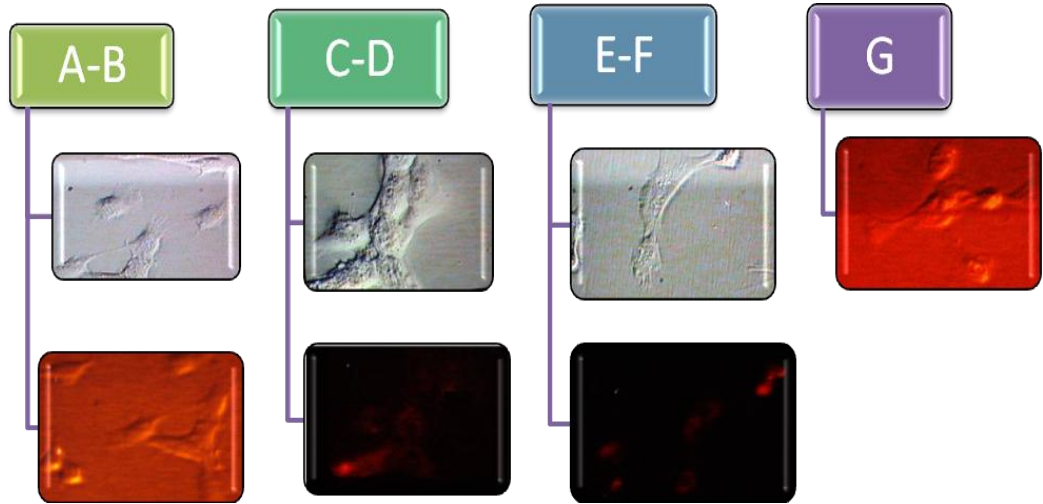
Bölüm 4.2.3’de anlatılan yöntemle göre boyarmadde içeren nanopartikül formülasyonlarını, nPBAE₂₁, nPBAE₂₂ ve nPBAE₂₄ nanopartiküllerini elde etme tekniği ile deiyonize su içerisinde %5’lik (a/h) rodamin-B boyarmaddesi ilavesi ile hazırlandı ve hücrelere uygulandı (Boya su fazında grup).

Deneme 58

Kontrol grubu olarak boyarmaddenin kendisi DMEM-FCS içerisinde %5 (w/v) oranını içerecek şekilde hücrelere uygulandı.



Şekil 4.16 Hücre içerisine ve çekirdeğine yönelmeye çalışan boya yüklü nanopartiküllerin görüntüsü, x200 büyütme ile bakıldı ***Görüntünün çekilmesi için karıştırma hızı düşük tutularak partiküllerin boyutunun büyütülmesi sağlandı.***



Şekil 4.17 A, C, E: Fibroblast hücre kesit görüntüsü, B: Non-iyonik surfaktan içeren grup boyama denemesi, D: Non-iyonik surfaktan içermeyen grup boyama denemesi, F: Boyanın su fazında olduğu non-iyonik surfaktan içermeyen grup boyama denemesi, G : Tek başına boya uygulaması

Tablo 4.18 nPBAE nanopartiküllerinin hücre içine alımı ve dağılımı çalışması

ÜRÜN	SURFAKTAN İÇEREN GRUP				SURFAKTAN İÇERMEYEN GRUP				BOYA SU FAZINDA	BOYANIN KENDİSİ	BOŞ
	1	2	3	4	1	2	3	4	4	Tek Uygulama	
A GRUBU	0	0	0	0	0	*	***	*****	*****	0	0
B GRUBU	0	0	0	0	0	*	***	*****	*****		
C GRUBU	0	0	0	0	0	*	***	*****	*****		

0 = Boyanmamış

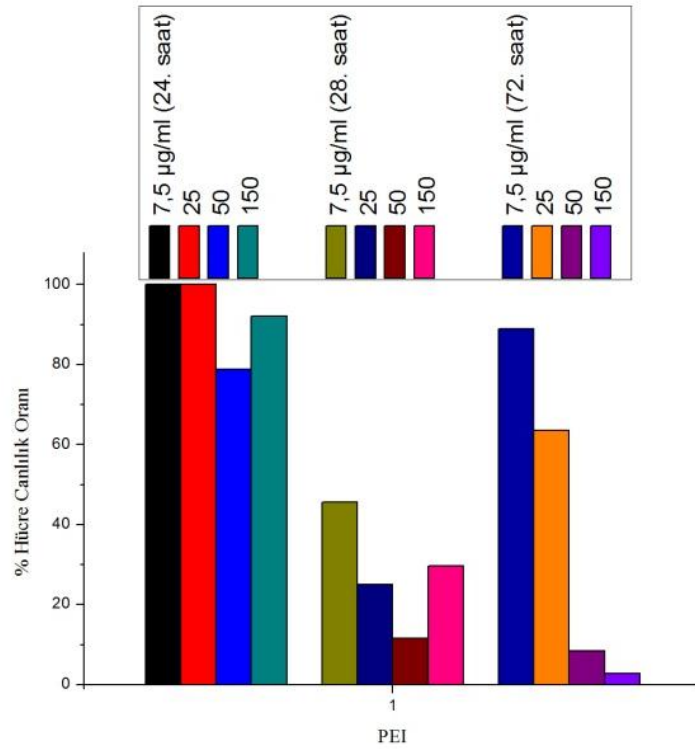
* = Işıma Başlangıcı

*** = Orta Derecede Işıma var

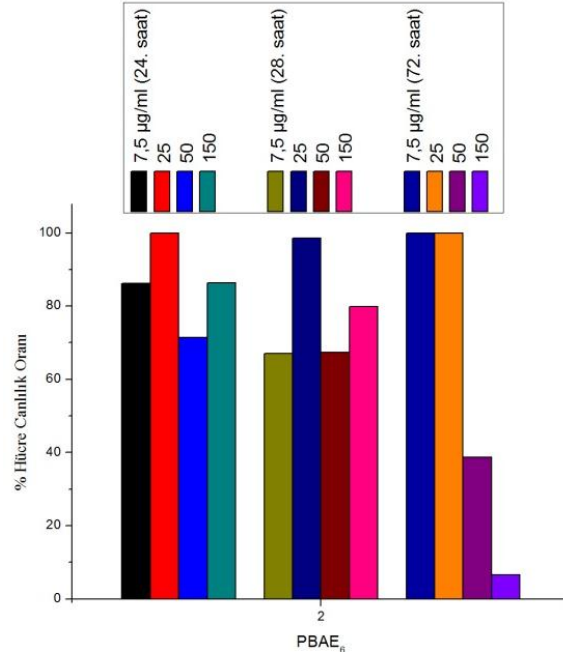
***** = İyi Derecede Işıma var

4.5.2 Nanopartikül Formülasyonlarının Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazında (RTCA) Sitotoksosite Çalışmaları

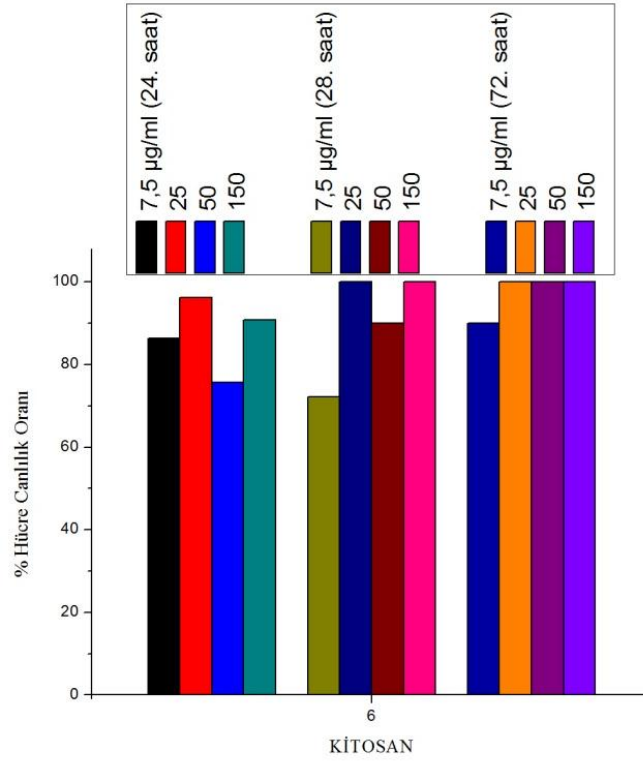
nPBAE, nMK ve nİMK formülasyonlarına ait sitotoksosite çalışmaları, xCELLigence RTCA (Roche, Almanya) cihazında Bölüm 3.3.4’de belirtilen yönteme göre yapıldı. Pozitif kontrol grubu olarak kitosan nanopartikül formülasyonu ve negatif kontrol grubu olarak polietilenimin (PEI) kullanıldı. Sitotoksosite çalışmalarında iki hücre tipi, insan embriyonik böbrek hücresi (HEK293) ve primer koyun fibroblast (POF) 8. pasajındaki (POF8) hüceleri her bir kuyucuğa 30000 hücre gelecek şekilde kullanıldı. Çalışma Bölüm 4.5.3’de belirtilen nanopartiküllerin transfeksiyon etkinliği incelemesi denemesinde anlatılan aşamalara göre gerçekleştirildi. Sonuçlar Şekil 4.18 - Şekil 4.27’de verildi.



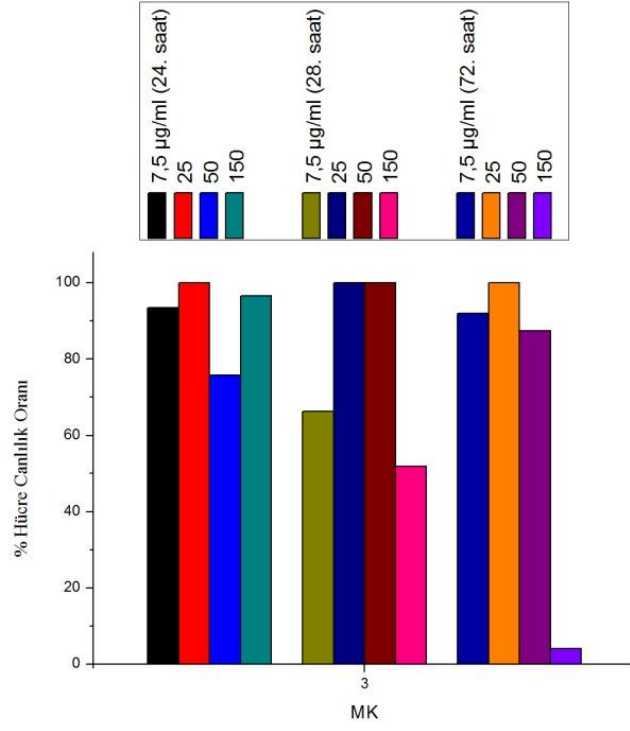
Şekil 4.18 Polietileniminden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi



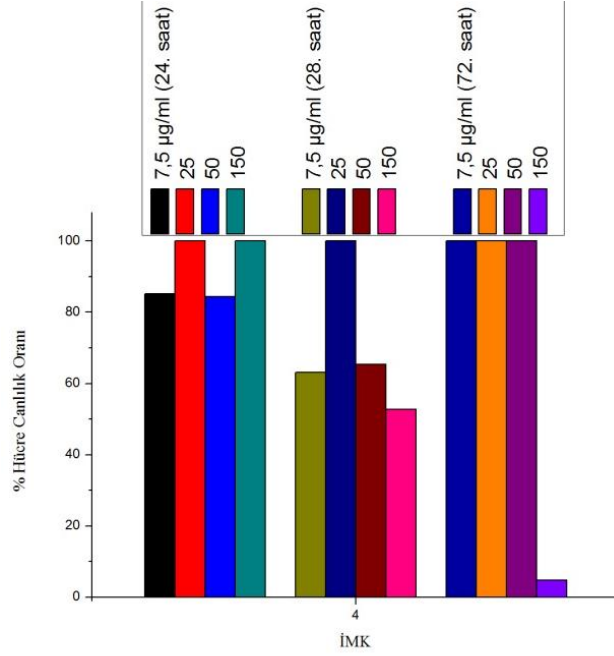
Şekil 4.19 PBAE₆ polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi



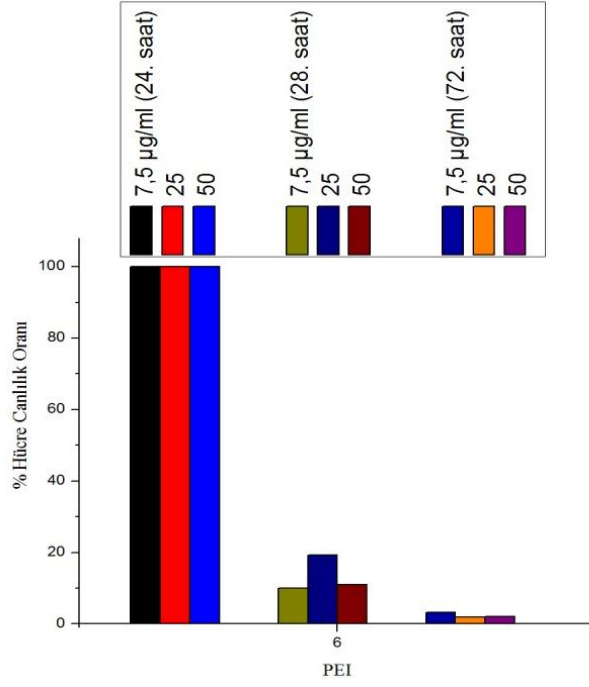
Şekil 4.20 Kitosandan hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi



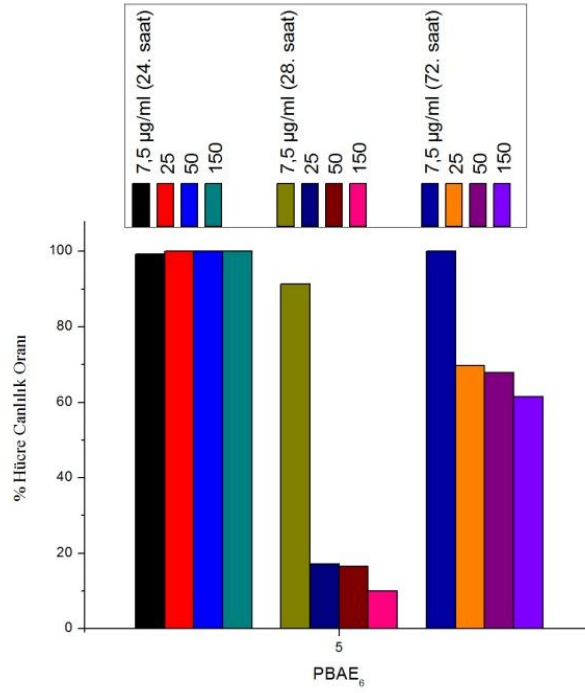
Şekil 4.21 MK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi



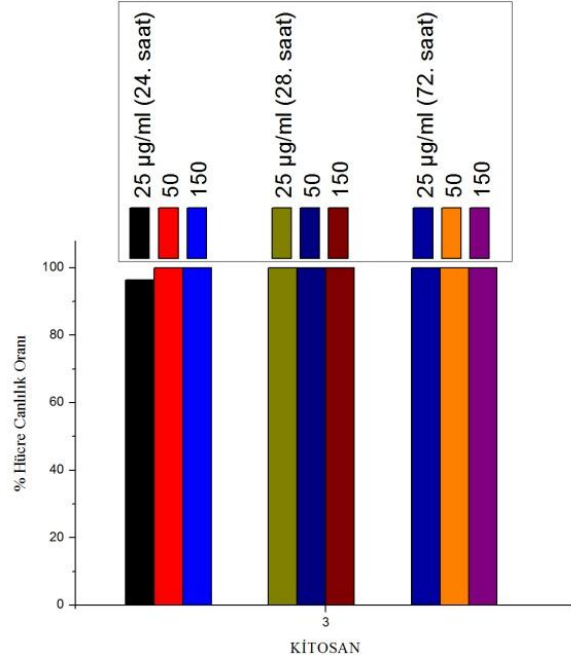
Şekil 4.22 İMK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi



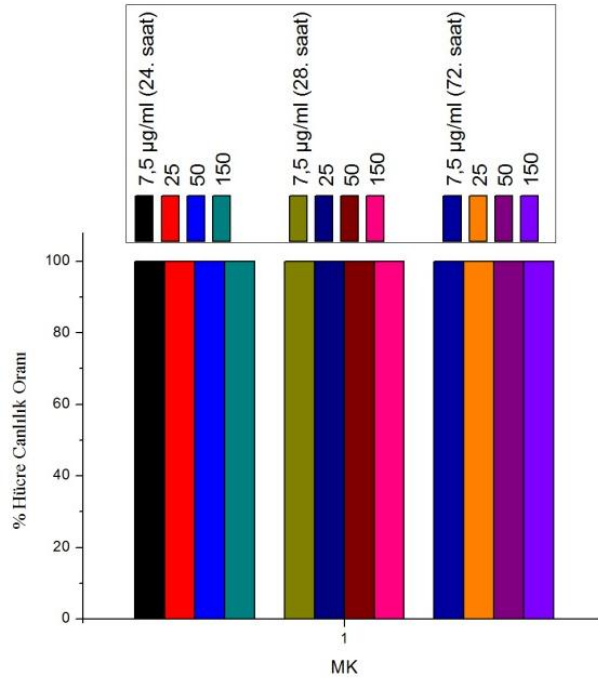
Şekil 4.23 Polietileniminden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi



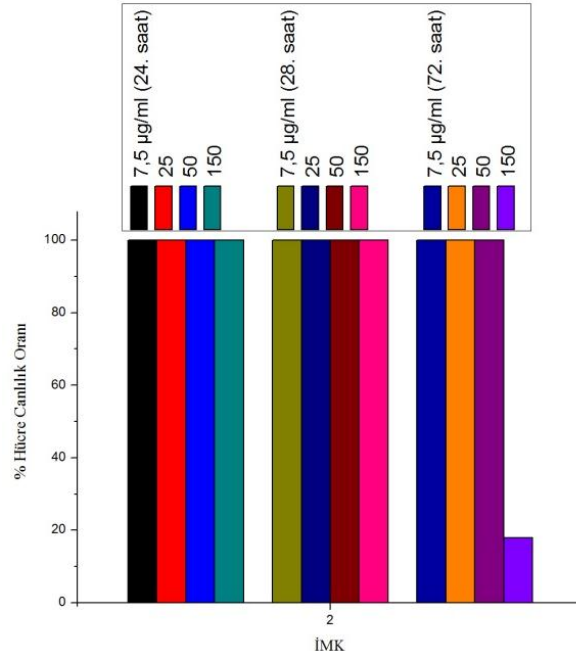
Şekil 4.24 PBAE₆ polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi



Şekil 4.25 Kitosandan hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi



Şekil 4.26 MK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi



Şekil 4.27 İMK polimerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonunun POF8 hücrelerine toksisitesi

4.5.2.1 Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksikite Hücre İndeksi Sonuçlarının İstatistiksel Analizine Ait Bulgular

Çalışmada geliştirilen nanopartiküler formülasyonların sitotoksikite sonuçları SPSS 13.0 for Windows programı ile Mann-Whitney U test uygulanarak analize edilmiştir. Cihazda okunmuş olan hücre indeksi değerlerindeki düşüşün istatistik önem taşıyıp taşımadığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). Sonuçlar Tablo 4.19-Tablo 4.21’de verildi.

Tablo 4.19 Nanopartikül formülasyonlarının HEK293 hücrelerine toksisite sonuçlarının istatistiksel analizi

GRUP BİLGİSİ			ORTALAMA HÜCRE İNDEKSİ	TOKSİK ETKİSİ VAR / YOK
NO	POLİMER	KONSANTRASYON		
1	(NEGATİF KONTROL)	0	2,7477	YOK
2	(POZİTİF KONTROL (PEI))	7,5 µg/mL	2,2232	YOK
3	(POZİTİF KONTROL (PEI))	25 µg/mL	1,5913	VAR
4	(POZİTİF KONTROL (PEI))	50 µg/mL	0,2109	VAR
5	(POZİTİF KONTROL (PEI))	150 µg/mL	0,0671	VAR
6	(DENEME 2 (MK))	7,5 µg/mL	2,3024	YOK
7	(DENEME 2 (MK))	25 µg/mL	2,7743	YOK
8	(DENEME 2 (MK))	50 µg/mL	2,1872	YOK
9	(DENEME 2 (MK))	150 µg/mL	0,1008	VAR
10	(DENEME 3 (İMK))	7,5 µg/mL	2,5859	YOK
11	(DENEME 3 (İMK))	25 µg/mL	3,3253	YOK
12	(DENEME 3 (İMK))	50 µg/mL	2,8401	YOK
13	(DENEME 3 (İMK))	150 µg/mL	0,1213	VAR
14	(DENEME 4 (KİTOSAN))	7,5 µg/mL	2,2491	YOK
15	(DENEME 4 (KİTOSAN))	25 µg/mL	2,6294	YOK
16	(DENEME 4 (KİTOSAN))	50 µg/mL	2,6289	YOK
17	(DENEME 4 (KİTOSAN))	150 µg/mL	3,5583	YOK
18	(DENEME 5 (PBAE ₆))	7,5 µg/mL	2,8116	YOK
19	(DENEME 5 (PBAE ₆))	25 µg/mL	2,7359	YOK
20	(DENEME 5 (PBAE ₆))	50 µg/mL	0,9674	VAR
21	(DENEME 5 (PBAE ₆))	150 µg/mL	0,1631	VAR

Tablo 4.20 PEI, MK ve İMK polimerlerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının POF8 hücrelerine toksisite sonuçlarının istatistiksel analizi

GRUP BİLGİSİ			ORTALAMA HÜCRE İNDEKSİ	TOKSİK ETKİSİ VAR / YOK
NO	POLİMER	KONSANTRASYON		
1	(NEGATİF KONTROL)	-	3,4452	YOK
2	(POZİTİF KONOTROL (PEI))	7,5 µg/mL	0,1540	VAR
3	(POZİTİF KONOTROL (PEI))	25 µg/mL	0,0922	VAR
4	(POZİTİF KONOTROL (PEI))	50 µg/mL	0,0929	VAR
5	(DENEME 2 (MK))	7,5 µg/mL	3,9909	YOK
6	(DENEME 2 (MK))	25 µg/mL	3,7118	YOK
7	(DENEME 2 (MK))	50 µg/mL	4,4408	YOK
8	(DENEME 2 (MK))	150 µg/mL	3,5907	YOK
9	(DENEME 3 (İMK))	7,5 µg/mL	4,5269	YOK
10	(DENEME 3 (İMK))	25 µg/mL	4,3545	YOK
11	(DENEME 3 (İMK))	50 µg/mL	4,2540	YOK
12	(DENEME 3 (İMK))	150 µg/mL	0,6162	VAR
13	(DENEME 4 (KİTOSAN))	25 µg/mL	3,8819	YOK
14	(DENEME 4 (KİTOSAN))	50 µg/mL	4,4242	YOK
15	(DENEME 4 (KİTOSAN))	150 µg/mL	4,2710	YOK

Tablo 4.21 PEI, PBAE₆ polimerlerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının POF8 hücrelerine toksisite sonuçlarının istatistiksel analizi

GRUP BİLGİSİ			ORTALAMA HÜCRE İNDEKSİ	TOKSİK ETKİSİ VAR / YOK
NO	POLİMER	KONSANTRASYON		
1	(NEGATİF KONTROL)	-	4,5114	YOK
2	(POZİTİF KONOTROL (PEI))	7,5 µg/mL	0,1540	VAR
3	(POZİTİF KONOTROL (PEI))	25 µg/mL	0,0922	VAR
4	(POZİTİF KONOTROL (PEI))	50 µg/mL	0,0929	VAR
9	(DENEME 5 (PBAE ₆))	7,5 µg/mL	4,7836	YOK
10	(DENEME 5 (PBAE ₆))	25 µg/mL	3,2787	VAR
11	(DENEME 5 (PBAE ₆))	50 µg/mL	3,1891	VAR
12	(DENEME 5 (PBAE ₆))	150 µg/mL	2,8856	VAR

4.5.3 Nanopartikül Formülasyonlarının Transfeksiyon Etkinliğine Ait Bulgular

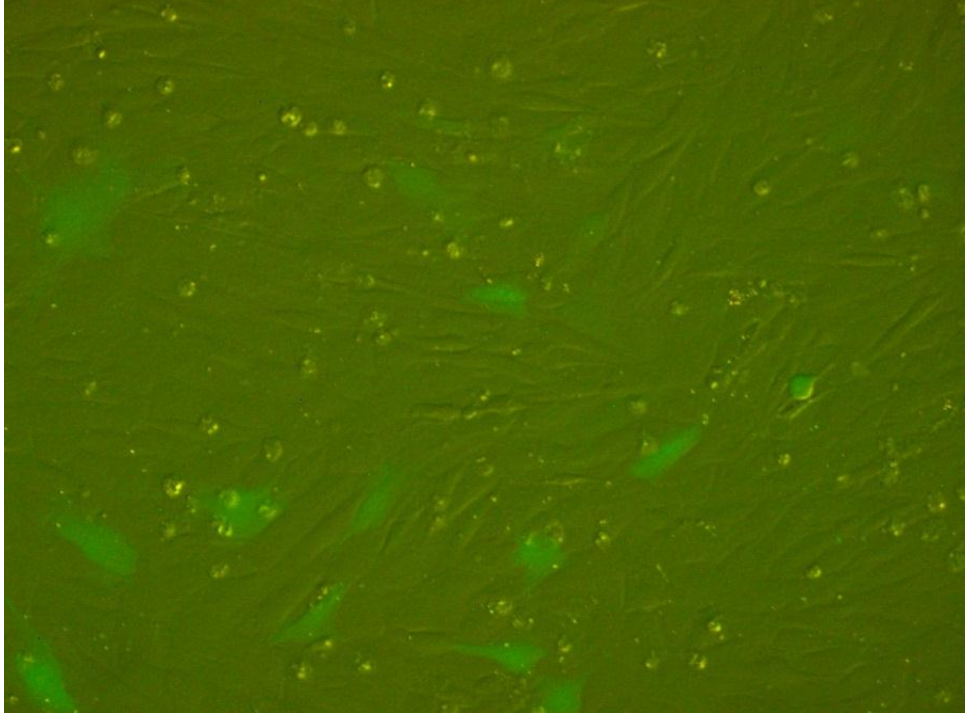
Yukarıda anlatılan tüm uygulama ve analiz sonuçlarına göre uygun özelliklere sahip olan ignPBAE, egnPBAE, gnMK ve gnİMK formülasyonlarının transfeksiyon etkinliği HEK 293, POF ve POEF hücrelerinde Bölüm 3.3.5’de belirtilen yöntemle göre incelendi. Bunun yanında formülasyonların sitotoksiteleri Bölüm 4.5.2 ‘de belirtilen yöntemin dışında floresans mikroskopta izlemek suretiyle de değerlendirildi. Değerlendirmelerde Tablo 4.22’deki derecelendirme kullanıldı. Tüm sonuçlar Tablo 4.23 - Tablo 4.29 ile Şekil 4.28 - Şekil 4.43’de verildi.

Tablo 4.22 Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan derecelendirmeler

TOKSİSİTE DERECEŚİ	ÜRÜNÜN ETKİŚİ	TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ
5	Biyouyumlu	Çok İyi
4	Düşük Toksisite	İyi
3	Orta Toksisite	Orta
2	Yüksek Toksisite	Düşük
1	Toksik Madde	Yok

Tablo 4.23 ignPBAE₃₅ nanopartikül formülasyonunun POF hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları

<u>Nanopartikül Formülasyonu</u>	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Toplam</u>				
ignPBAE ₃₅	20	1	60	3	70,58	3,29	73,87	POF7	60.000	5	2
	20	1	60	3	70,58	3,29	73,87			1	1
	55	1	164,5	3	193,5	3,29	196,79			5	2
	55	1	164,5	3	193,5	3,29	196,79			1	1
	15	1	187,89	12,5	75	13,75	88,75	POEF7	200.000	2	2
	1,2	1	12	10	6,55	18,87	25,42	POF7	40.000	5	2
	0,6	1	6	10	3,27	18,87	22,14			5	2
	80	1	80	1	44	2	46			4	1
	92	1	92	1	50	2	52			5	1
	1,2	1	12	10	3,27	18,87	22,14	POF9	20.000	5	3
	0,6	1	6	10	6,55	18,87	25,42			5	1
	80	1	80	1	44	2	46			5	2
	92	1	92	1	50	2	52			5	1
	102,5	1	102,5	1	56	2	58			5	1
	2,50	1	10,60	4,24	5,30	8	13,30	POF9	20.000	5	1
	4,00	1	16,96	4,24	8,48	8	16,48			5	2
	5,00	1	21,20	4,24	10,60	8	18,60			5	1
	6,00	1	25,44	4,24	12,72	8	20,72			5	2
	7,00	1	29,68	4,24	14,84	8	22,84			5	1
	8,00	1	33,92	4,24	16,96	8	24,96			5	1



Şekil 4.28 ignPBAE₃₅ formülasyonu; polimer:gen oranı 1,2:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri

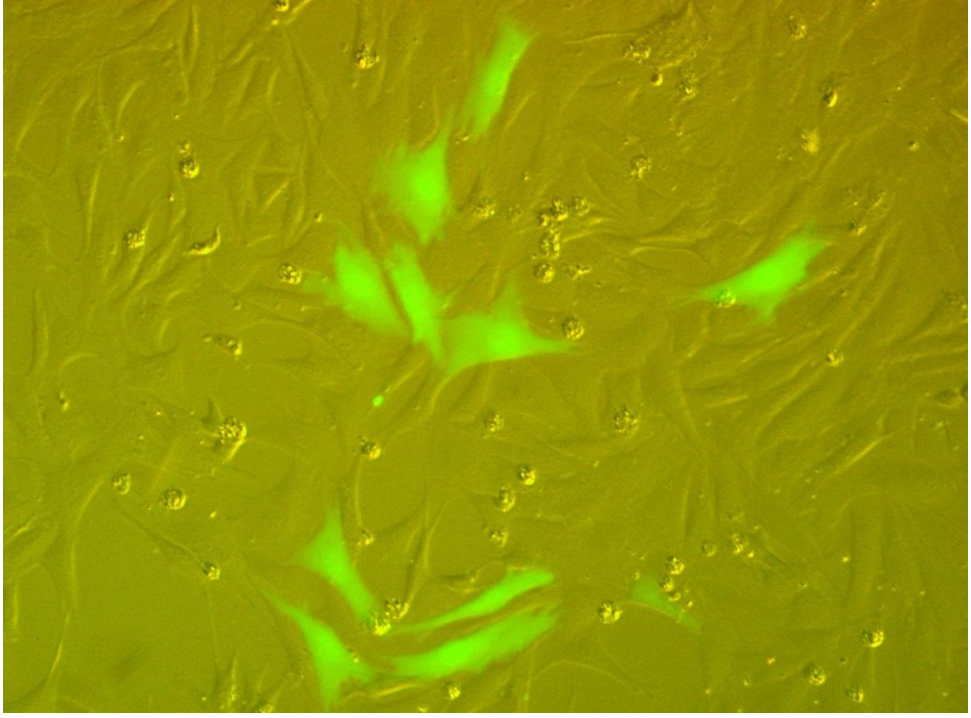


Şekil 4.29 ignPBAE₃₅ formülasyonu; polimer:gen oranı 1,2:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri

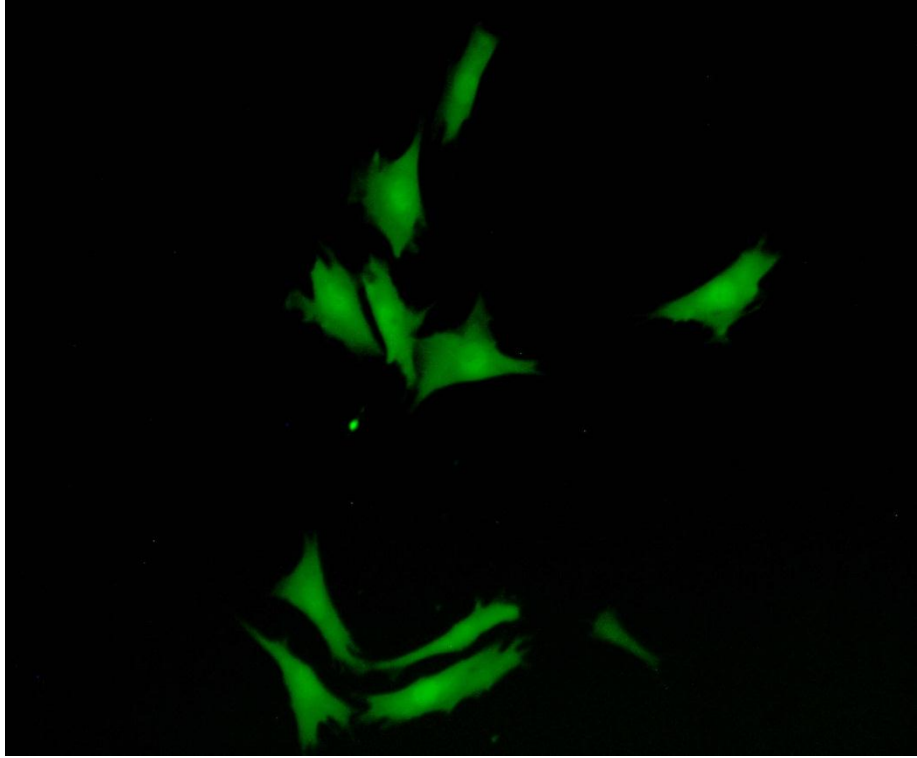
Tablo 4.24 ignPBAE₃₈ nanopartikül formülasyonunun POF hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları

<u>Nanopartikül Formülasyonu</u>	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Toplam</u>				
ignPBAE ₃₈	20,9	1	22,2	1,06	20	2	22	POF3	25.000	5	2
	26,2	1	27,75	1,06	25	2	27			5	2
	31,4	1	33,3	1,06	30	2	32			5	2
	41,9	1	44,4	1,06	40	2	42			5	2
	47,1	1	49,95	1,06	45	2	47			5	2
	52,4	1	55,5	1,06	50	2	52			5	1
	57,6	1	61,05	1,06	55	2	57			5	2
	62,8	1	66,6	1,06	60	2	62			5	1
	68,1	1	72,15	1,06	65	2	67			5	4
	73,3	1	77,7	1,06	70	2	72			5	2
	78,5	1	83,25	1,06	75	2	77			5	2
	83,8	1	88,8	1,06	80	2	82			5	2
	1,2	1	12	10	7,134	18,87	26,004			5	2
	5,0	1	5,3	1,06	2,65	2	4,65	POF5	20.000	5	1
	10,0	1	10,6	1,06	5,3	2	7,3			5	2
	15,0	1	15,9	1,06	7,95	2	9,95			5	2
	20,0	1	21,2	1,06	10,6	2	12,6			4	2
	30,0	1	31,8	1,06	15,9	2	17,9			4	2
	40,0	1	42,4	1,06	21,2	2	23,2			2	1
	45,0	1	47,7	1,06	23,85	2	25,85			1	1
	5,0	1	5,3	1,06	2,65	2	4,65	POF12	20.000	5	2
	10,0	1	10,6	1,06	5,3	2	7,3			4	1

ignPBAE ₃₈	15,0	1	15,9	1,06	7,95	2	9,95	POF12	20.000	3	1
	20,0	1	21,2	1,06	10,6	2	12,6			3	1
	30,0	1	31,8	1,06	15,9	2	17,9			2	1
	40,0	1	42,4	1,06	21,2	2	23,2			2	1
	5,0	1	5,3	1,06	2,65	2	4,65	POF9	20.000	5	2
	8,0	1	8,48	1,06	4,24	2	6,24			5	1
	12,0	1	12,72	1,06	6,36	2	8,36			5	2
	14,0	1	14,84	1,06	7,42	2	9,42			5	3
	16,0	1	16,96	1,06	8,48	2	10,48			5	3
	2,5	1	5,3	2,12	2,65	4	6,65			5	3
	4,0	1	8,48	2,12	4,24	4	8,24			5	2
	5,0	1	10,6	2,12	5,3	4	9,3			5	2
	6,0	1	12,72	2,12	6,36	4	10,36			5	3
	7,0	1	14,84	2,12	7,42	4	11,42			5	3
	8,0	1	16,96	2,12	8,48	4	12,48			5	3
	8	1	15,90	2,12	7,95	4	11,95	POF8	25.000	5	2
	10	1	21,20	2,12	10,60	4	14,60			5	2
	15	1	31,80	2,12	15,90	4	19,90			4	2
	18	1	37,10	2,12	18,55	4	22,55			4	2
	20	1	42,40	2,12	21,20	4	25,20			3	1
	1,25	1	5,30	4,24	2,65	8	10,65	POF9	20.000	5	2
	2,00	1	8,48	4,24	4,24	8	12,24			5	2
	2,50	1	10,60	4,24	5,30	8	13,30			5	1
	3,00	1	12,72	4,24	6,36	8	14,36			5	2
	3,50	1	14,84	4,24	7,42	8	15,42			5	3
	4,00	1	16,96	4,24	8,48	8	16,48			5	2



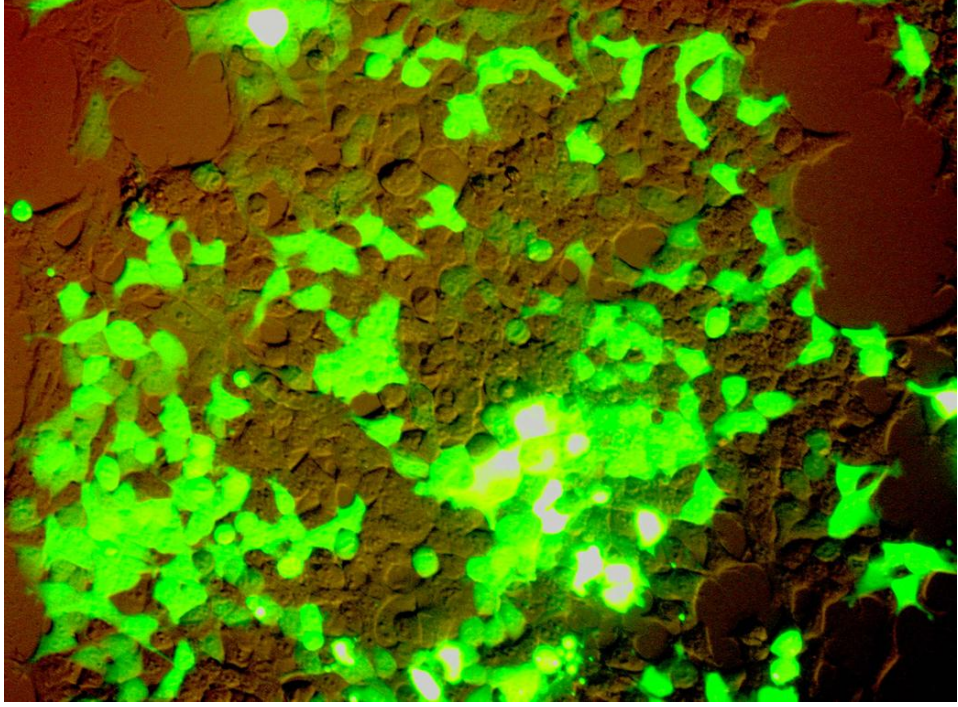
Şekil 4.30 ignPBAE₃₈ formülasyonu; polimer:gen oranı 68,1:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri



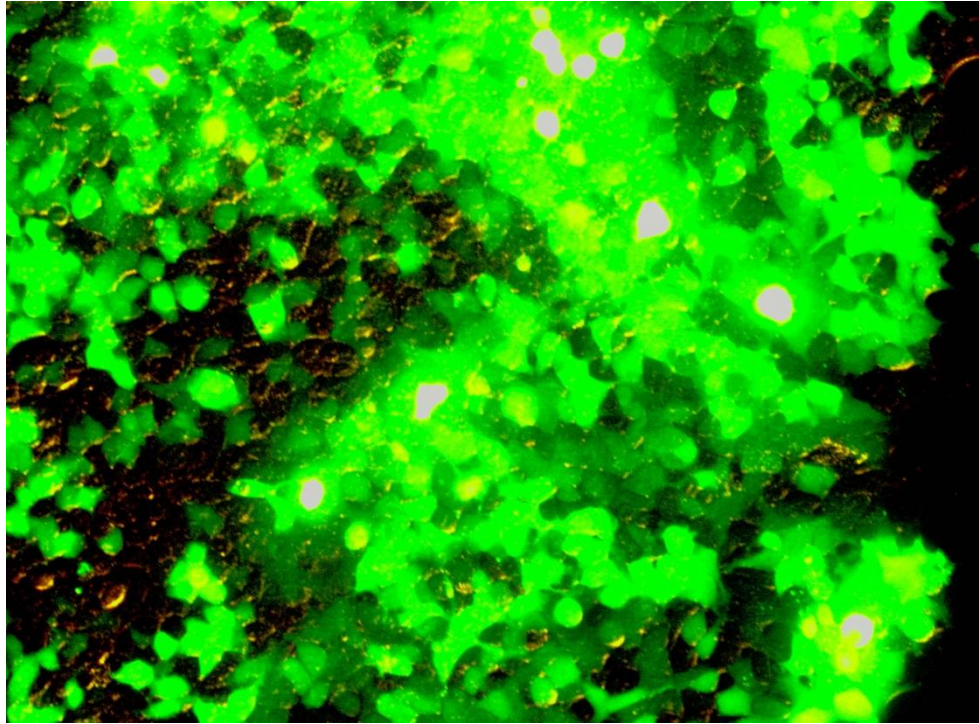
Şekil 4.31 ignPBAE₃₈ formülasyonu; polimer:gen oranı 68,1:1 (a/a) transfekte olan POF hücreleri

Tablo 4.25 egnPBAE nanopartikül formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları

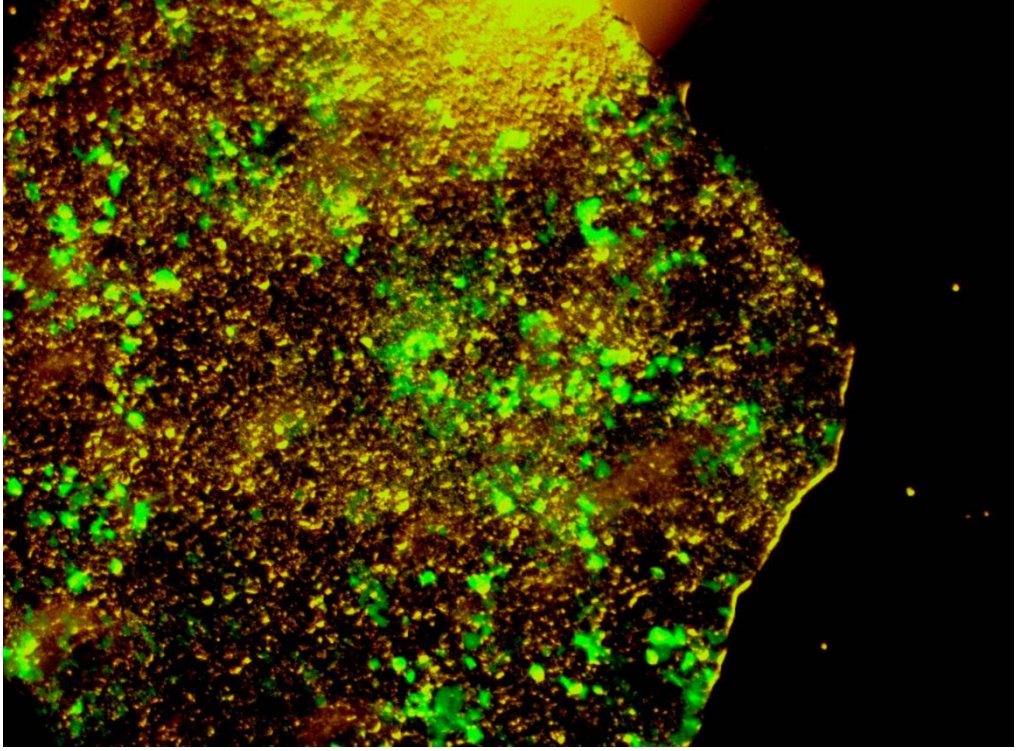
<u>Nanopartikül Formülasyonu</u>	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Toplam</u>				
egnPBAE	5,0	1	2,5	0,5	2,5	0,9434	3,4434	HEK293	20.000	5	5
	10,0	1	5	0,5	5	0,9434	5,9434			5	5
	20,0	1	10	0,5	10	0,9434	10,943			5	5
	40,0	1	20	0,5	20	0,9434	20,943			4	2
	60,0	1	30	0,5	30	0,9434	30,943			3	5
	80,0	1	40	0,5	40	0,9434	40,943			1	1
	5,0	1	5	1	40	1,88679	41,887			5	5
	10,0	1	10	1	40	1,88679	41,887			5	5
	20,0	1	20	1	40	1,88679	41,887			4	5
	40,0	1	40	1	40	1,88679	41,887			2	5
	60,0	1	60	1	40	1,88679	41,887			1	1
	80,0	1	80	1	40	1,88679	41,887			1	1
	5,0	1	7,5	1,5	40	2,83019	42,83			5	5
	10,0	1	15	1,5	40	2,83019	42,83			5	5
	20,0	1	30	1,5	40	2,83019	42,83			3	5
	40,0	1	60	1,5	40	2,83019	42,83			1	1
	60,0	1	90	1,5	40	2,83019	42,83			1	1
	5,0	1	10	2	40	3,77358	43,774			5	5
	10,0	1	20	2	40	3,77358	43,774			5	5
	20,0	1	40	2	40	3,77358	43,774			1	1
	40,0	1	80	2	40	3,77358	43,774			1	1
	60,0	1	120	2	40	3,77358	43,774			1	1



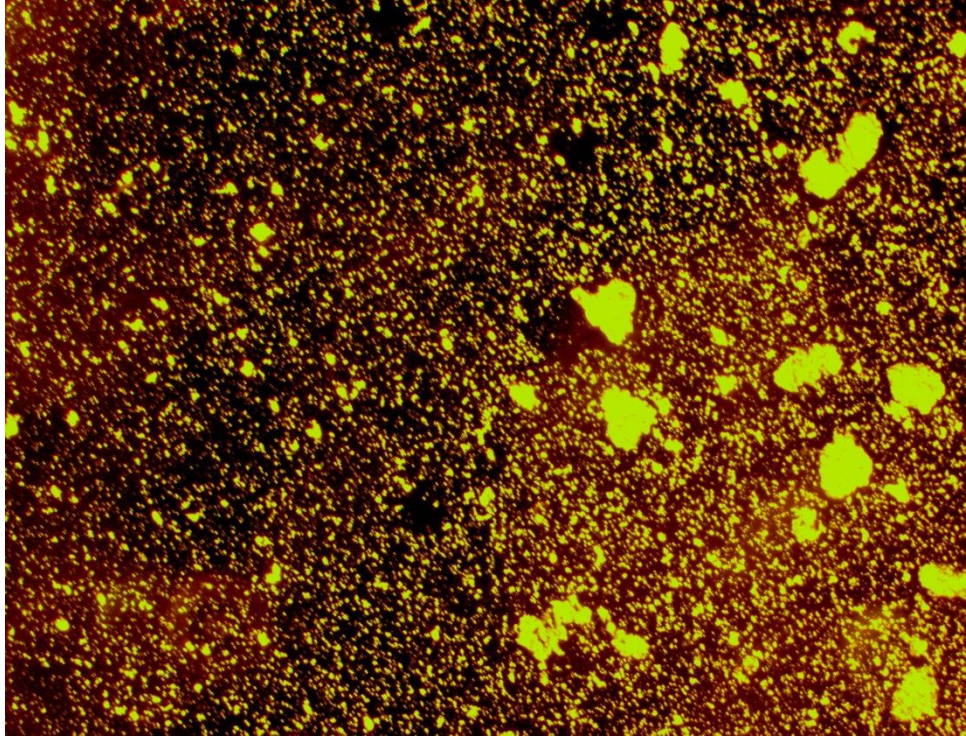
Şekil 4.32 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 5:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri



Şekil 4.33 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 10:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri



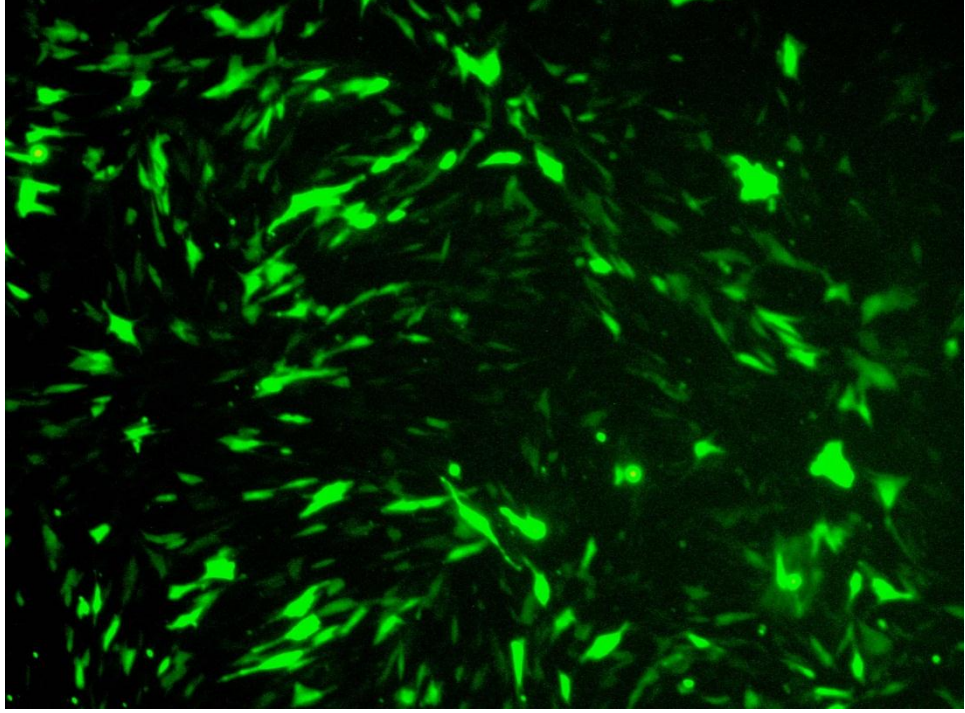
Şekil 4.34 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 40:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri



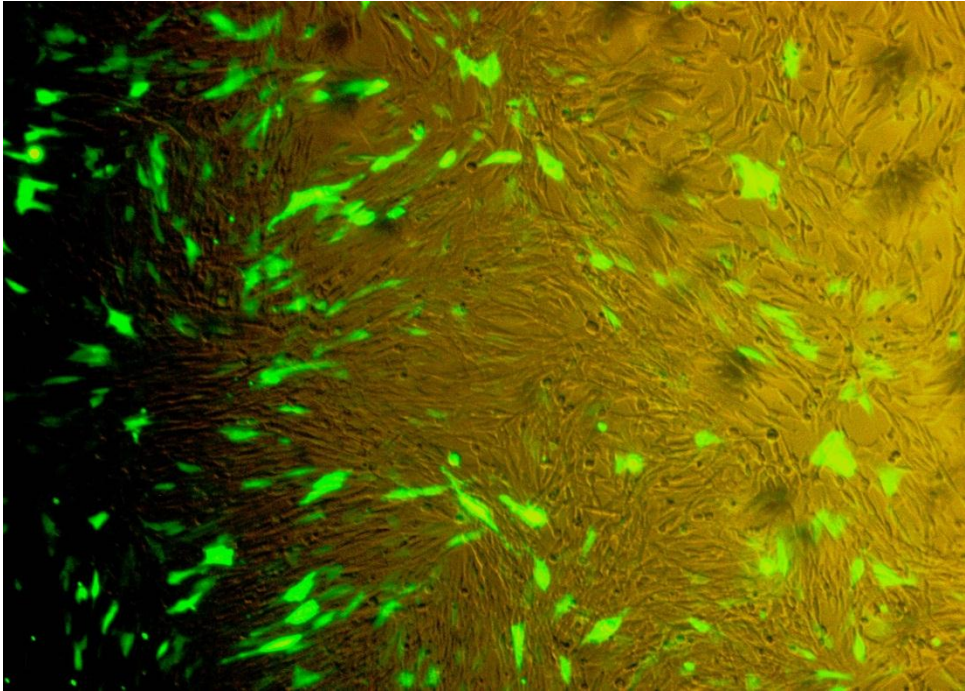
Şekil 4.35 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 60:1 (a/a) toksik HEK293 hücreleri

Tablo 4.26 egnPBAE nanopartikül formülasyonunun POF hücrelerine toksisitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları

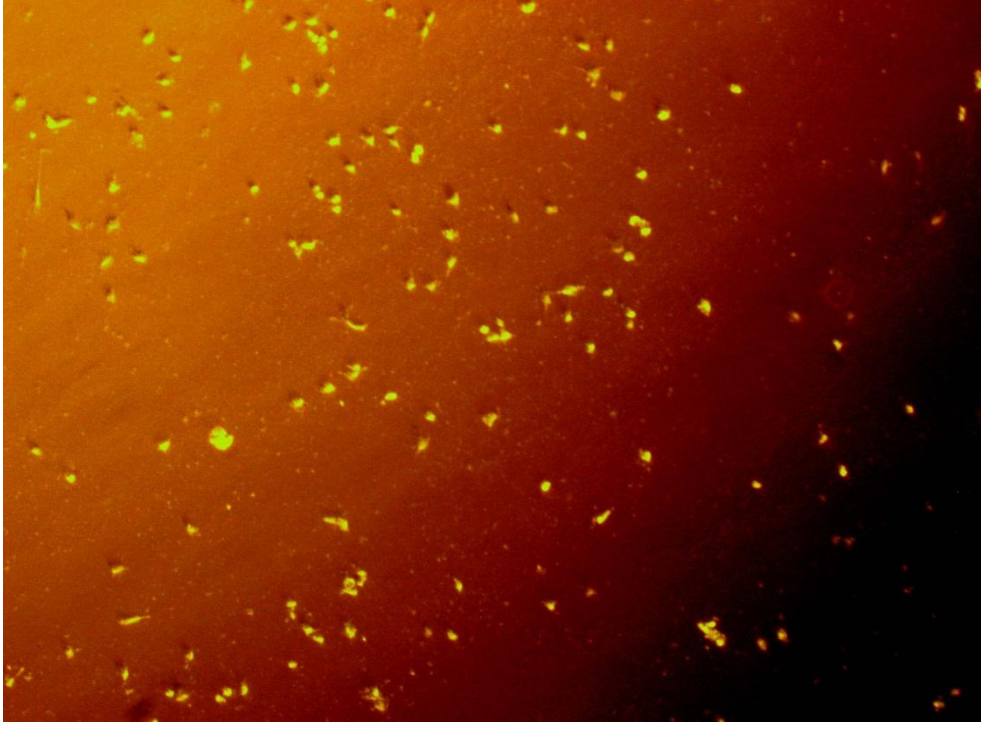
<u>Nanopartikül Formülasyonu</u>	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µl)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Toplam				
egnPBAE	5,0	1	2,5	0,5	2,5	0,9434	3,4434	POF9	20.000	5	5
	10,0	1	5	0,5	5	0,9434	5,9434			5	5
	20,0	1	10	0,5	10	0,9434	10,9434			3	5
	40,0	1	20	0,5	20	0,9434	20,9434			3	5
	60,0	1	30	0,5	30	0,9434	30,9434			1	1
	80,0	1	40	0,5	40	0,9434	40,9434			1	1
	5,0	1	5	1	40	1,88679	41,8868			5	5
	10,0	1	10	1	40	1,88679	41,8868			5	5
	20,0	1	20	1	40	1,88679	41,8868			1	1
	40,0	1	40	1	40	1,88679	41,8868			1	1
	60,0	1	60	1	40	1,88679	41,8868			1	1
	80,0	1	80	1	40	1,88679	41,8868			1	1
	5,0	1	7,5	1,5	40	2,83019	42,8302			5	5
	10,0	1	15	1,5	40	2,83019	42,8302			1	1
	20,0	1	30	1,5	40	2,83019	42,8302			1	1
	40,0	1	60	1,5	40	2,83019	42,8302			1	1
	60,0	1	90	1,5	40	2,83019	42,8302			1	1
	80,0	1	120	1,5	40	2,83019	42,8302			1	1
	5,0	1	10	2	40	3,77358	43,7736			5	5
	10,0	1	20	2	40	3,77358	43,7736			1	1
	20,0	1	40	2	40	3,77358	43,7736			1	1



Şekil 4.36 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 5:1 (a/a) transfecte olan POF hücreleri



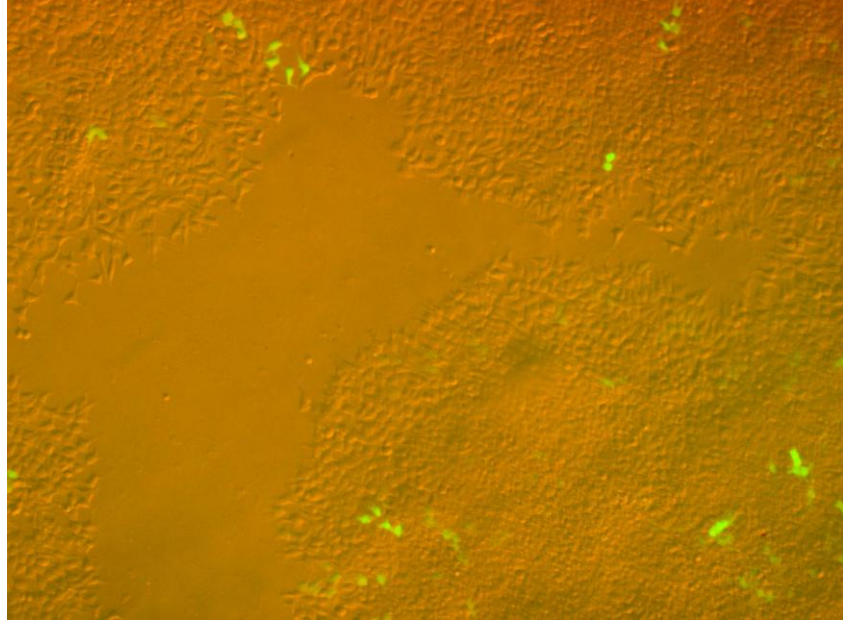
Şekil 4.37 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 5:1 (a/a) transfecte olan POF hücreleri



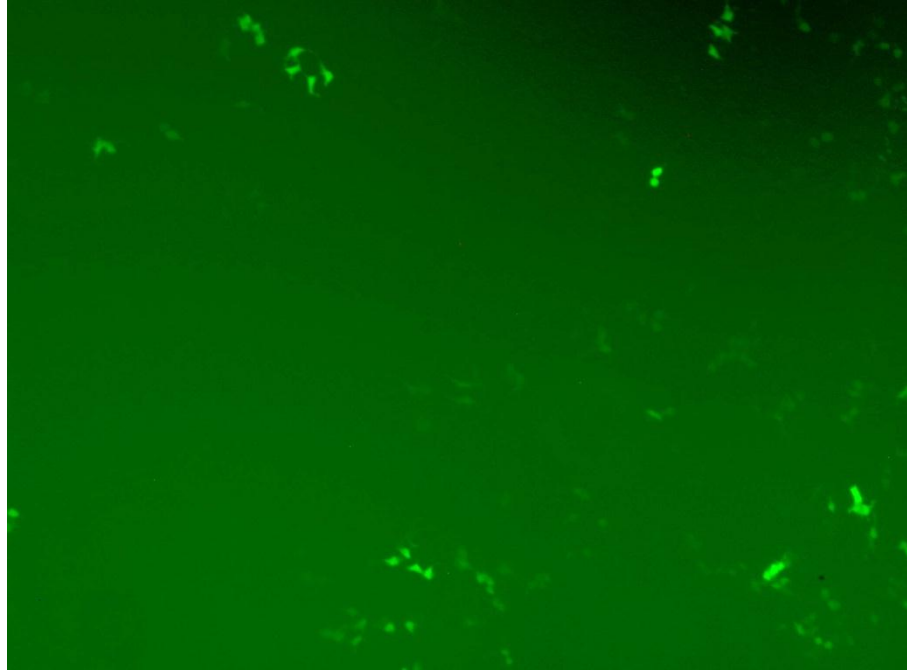
Şekil 4.38 egnPBAE formülasyonu; polimer:gen oranı 40:1 (a/a), POF hücrelerine toksisitesi

Tablo 4.27 Kitosan sitotoksitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları

Nanopartikül Formülasyonu	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Toplam				
Kitosan	2	1	4,00	2,12	4	4	8	HEK293	20.000	5	4
	3	1	6,00	2,12	6	4	10			5	4
	4	1	8,00	2,12	8	4	12			5	4
	5	1	10,00	2,12	10	4	14			5	4
	6	1	12,00	2,12	12	4	16			5	4
	7	1	14,00	2,12	14	4	18			5	4
	2	1	4,00	2,12	4	4	8	POF9	20.000	5	1
	3	1	6,00	2,12	6	4	10			5	1
	4	1	8,00	2,12	8	4	12			5	1
	5	1	10,00	2,12	10	4	14			5	1
	6	1	12,00	2,12	12	4	16			5	1
	7	1	14,00	2,12	14	4	18			5	1



Şekil 4.39 Kitosan; polimer-gen oranı 3:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri



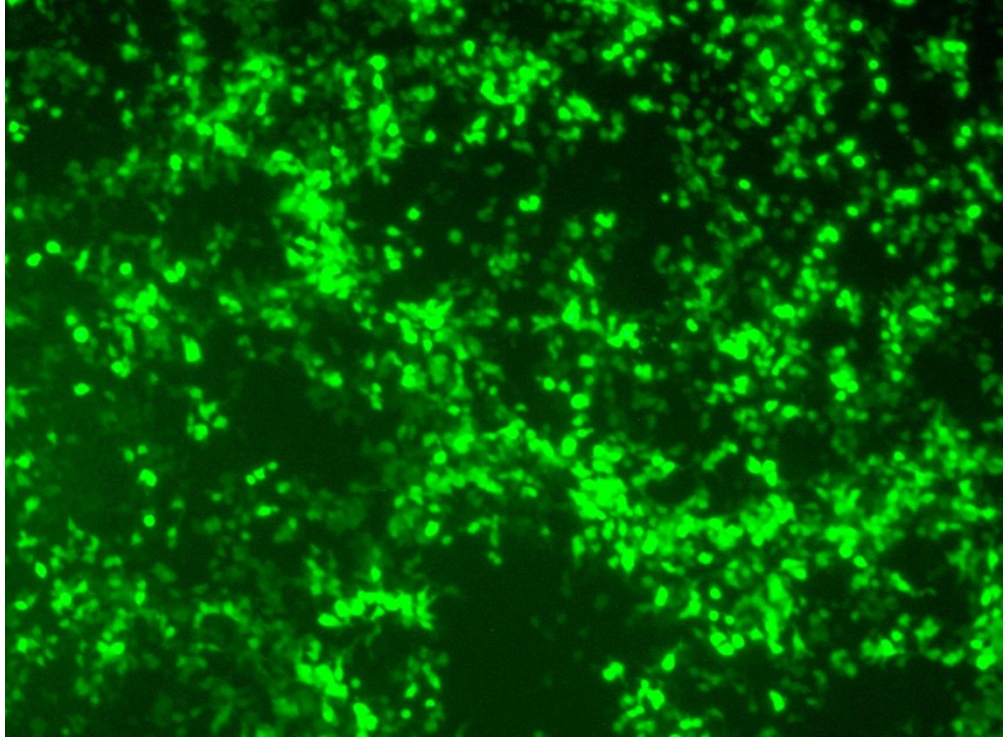
Şekil 4.40 Kitosan; polimer-gen oranı 3:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri

Tablo 4.28 gnMK formülasyonunun sitotoksitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçlar

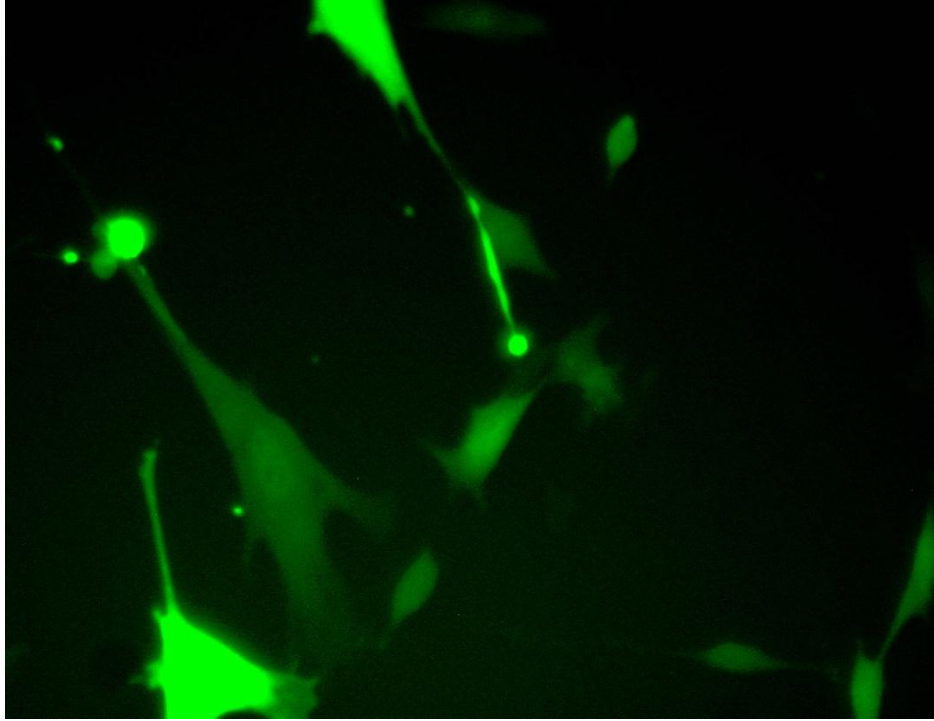
<u>Nanopartikül Formülasyonu</u>	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Toplam</u>				
gnMK	1	1	1,06	1,06	1,06	2	3,06	POF5	20.000	5	2
	2	1	2,12	1,06	2,12	2	4,12			5	1
	4	1	4,24	1,06	4,24	2	6,24			5	1
	5	1	5,30	1,06	5,3	2	7,3			5	2
	6	1	6,36	1,06	6,36	2	8,36			5	1
	8	1	8,48	1,06	8,48	2	10,48			5	1
	10	1	10,60	1,06	10,6	2	12,6			5	1
	12	1	12,72	1,06	12,72	2	14,72			5	1
	20	1	21,20	1,06	21,2	2	23,2			4	1
	40	1	42,40	1,06	42,4	2	44,4			1	1
	1	1	1,06	1,06	1,06	2	3,06	POF12	20.000	5	2
	2	1	2,12	1,06	2,12	2	4,12			5	2
	4	1	4,24	1,06	4,24	2	6,24			5	1
	5	1	5,30	1,06	5,3	2	7,3			5	2
	6	1	6,36	1,06	6,36	2	8,36			5	2
	8	1	8,48	1,06	8,48	2	10,48			5	2
	10	1	10,60	1,06	10,6	2	12,6			5	2
	12	1	12,72	1,06	12,72	2	14,72			5	2
	20	1	21,20	1,06	21,2	2	23,2			2	1
	40	1	42,40	1,06	42,4	2	44,4			1	1
	0,5	1	1,06	2,12	1,06	4	5,06	POF9	20.000	5	2
	1	1	2,12	2,12	2,12	4	6,12			5	2

gnMK	1,5	1	3,18	2,12	3,18	4	7,18	POF 9	20.000	5	2
	2	1	4,24	2,12	4,24	4	8,24			5	1
	2,5	1	5,30	2,12	5,3	4	9,3			5	3
	3	1	6,36	2,12	6,36	4	10,36			5	1
	2	1	4	2,12	4	4	8		25000	5	1
	3	1	6	2,12	6	4	10			5	2
	4	1	8	2,12	8	4	12			5	2
	5	1	10	2,12	10	4	14			5	3
	6	1	12	2,12	12	4	16			5	2
	7	1	14	2,12	14	4	18			5	2
	2	1	4	2,12	4	4	8		20000	5	1
	3	1	6	2,12	6	4	10			5	1
	4	1	8	2,12	8	4	12			5	1
	5	1	10	2,12	10	4	14			5	2
	6	1	12	2,12	12	4	16			5	2
	7	1	14	2,12	14	4	18			5	2
	2	1	4	2,12	4	4	8	HEK293	20000	5	2
	3	1	6	2,12	6	4	10			5	3
	4	1	8	2,12	8	4	12			5	4
	5	1	10	2,12	10	4	14			5	5
	6	1	12	2,12	12	4	16			5	5
	7	1	14	2,12	14	4	18			5	5
	2	1	4	2,12	4	4	8		20000	5	4
	3	1	6	2,12	6	4	10			5	4
	4	1	8	2,12	8	4	12			5	4
	5	1	10	2,12	10	4	14			5	4

gnMK	6	1	12	2,12	12	4	16	HEK293	20.000	5	5
	7	1	14	2,12	14	4	18			5	5
	2	1	4	2,12	4	4	8	POF9	20.000	5	1
	3	1	6	2,12	6	4	10			5	2
	4	1	8	2,12	8	4	12			5	1
	5	1	10	2,12	10	4	14			5	1
	6	1	12	2,12	12	4	16			5	1
	7	1	14	2,12	14	4	18			5	4



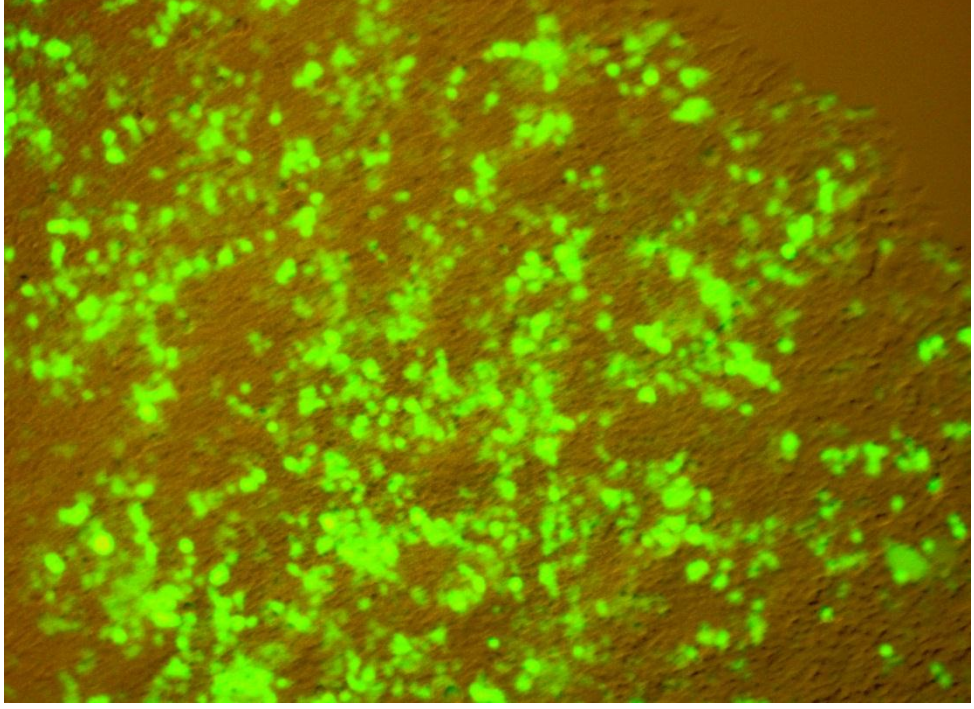
Şekil 4.41 gnMK formülasyonu; polimer:gen oranı 7:1 (a/a) transfecte olan HEK293 hücreleri



Şekil 4.42 gnMK formülasyonu; polimer:gen oranı 7:1 (a/a) transfecte olan HEK293 hücreleri

Tablo 4.29 gnİMK nanopartikül formülasyonunun sitotoksitesine ve transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları

<u>Nanopartikül Formülasyonu</u>	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Toksisite Derecesi</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Polimer</u>	<u>Gen</u>	<u>Toplam</u>				
gnİMK	2	1	4,00	2,12	4	4	8	POF9	20.000	5	1
	3	1	6,00	2,12	6	4	10			5	1
	4	1	8,00	2,12	8	4	12			5	2
	5	1	10,00	2,12	10	4	14			5	2
	6	1	12,00	2,12	12	4	16			5	1
	7	1	14,00	2,12	14	4	18			5	1
	2	1	4,00	2,12	4	4	8			5	1
	3	1	6,00	2,12	6	4	10			5	1
	4	1	8,00	2,12	8	4	12			5	2
	5	1	10,00	2,12	10	4	14			5	2
	6	1	12,00	2,12	12	4	16			5	2
	7	1	14,00	2,12	14	4	18			5	1
	2	1	4,00	2,12	4	4	8	HEK293	20.000	5	4
	3	1	6,00	2,12	6	4	10			5	3
	4	1	8,00	2,12	8	4	12			5	3
	5	1	10,00	2,12	10	4	14			5	2
	6	1	12,00	2,12	12	4	16			5	1
	7	1	14,00	2,12	14	4	18			5	1
	2	1	4,00	2,12	4	4	8	POF9	20.000	5	1
	3	1	6,00	2,12	6	4	10			5	2
	4	1	8,00	2,12	8	4	12			5	2



Şekil 4.43 gnİMK formülasyonu; polimer:gen oranı 7:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücreleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezle sunulan çalışmanın amacı, bilhassa son yıllarda nanoteknolojinin biyoteknoloji alanındaki önemli bir uygulaması olan gen transferinde kullanılabilecek biyouyumlu, sentetik ve doğal yapıdaki polimerlerin sentezlenmesi, bu polimerler ile nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, yapılarının aydınlatılması, partikül boyutu ve dağılımı, yük dengesi gibi özellikleri ile transfeksiyon etkinliklerinin incelenmesidir.

Bu amaçla, gen transferinde kullanılan polimerik nanopartiküler sistemlerin hangi polimer esaslı olabileceği, bunların hangi özelliklere sahip olması gerektiği ve uygulama koşulları ile ilgili yaklaşık son 25 yılı kapsayan kaynak araştırması yapılmıştır. Kaynak araştırması detaylandırılırken, transfeksiyon işleminde hangi tip taşıyıcının kullanıldığı, viral olmayan sistemlerin viral sistemlere göre avantajları ve dezavantajları, sentez yöntemleri, karakterizasyonları ve nanopartikül hazırlanması, transfeksiyon işleminde uygulanan hücre tipleri ve geliştirilen formülasyonların bu hücrelere toksisiteyi araştırılmıştır.

Kaynak araştırması sonucunda, viral olmayan sistemlerin, transfeksiyon açısından viral sistemler kadar etkinliği olmasa da biyouyumluluk ve ekonomik açıdan viral sistemlere göre avantajlarının olduğu belirlenmiş ve tez kapsamındaki çalışmalarda uygun özelliklere sahip polimerik nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesinin yanında transfeksiyon etkinliğinin artırılması da çalışmanın hedeflerinden birisi olarak tanımlanmıştır.

Bu amaçla, tez kapsamındaki çalışmalarda, ilk defa, biyobozunabilir transjenik polimerlerden sentetik polimer grubu olarak çeşitli yapılarda PBAE ürünleri, doğal veya modifiye doğal polimerik grup olarak ise, ilk defa, modifiye kitosan esaslı MK, İMK ürünleri sentezlendi. Sentezlenen tüm ürünlerin yapıları FTIR spektroskopisi analizi ile aydınlatıldı. PBAE ürünlerinden nanoçöktürme yöntemi ile, MK, İMK ürünlerinden ise iyonotropik jelasyon yöntemi ile nanopartikül formülasyonları hazırlandı.

Formülasyonların zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı ile morfolojik özellikleri incelendi. Nanoçöktürme yönteminde, surfaktan miktarının, karıştırma hızının, organik fazın ve ortama katılan iyonların nanopartikül özelliklerine etkisi incelendi. PBAE polimerleri ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının raf ömrüne yönelik stabilite çalışmaları yapıldı. Özellikleri uygun bulunan formülasyonlar kullanılarak GFP geni taşıyan pDNA ile hem iyonik etkileşim yöntemi (polipleks) hem de enkapsülasyon yöntemi ile nanopartikül formülasyonları hazırlandı. pDNA yüklenmiş nanopartiküllerin zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı incelendi. Değişen polimer-pDNA oranlarında (a/a) hazırlanan nanopartiküller jel elektroforezde yürütüldü ve formülasyonların gen stabilitesine etkisi incelendi. Ayrıca kitosan esaslı ve PBAE esaslı nanopartiküler sistemlerin sitotoksiteleri incelendi. Rodamin-B boyarmaddesi yüklenmiş PBAE nanopartiküllerinin hücre içine alım çalışmaları gerçekleştirildi. pDNA yüklenmiş hem kitosan esaslı hem de PBAE esaslı nanopartiküllerin transfeksiyon etkinliği HEK293, POF ve POEF hücreleri kullanılarak incelendi. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

5.1 PBAE ÜRÜNLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BUNLARDAN ELDE EDİLEN nPBAE NANOPARTİKÜLLERİNİN ZETA POTANSİYELİ, PARTİKÜL BOYUTU VE DAĞILIMI

Daha önce Malzeme ve Yöntem Bölümünde de belirtildiği gibi, tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen PBAE esaslı ve modifiye kitosan esaslı nanopartikül formülasyonlarının ve transfeksiyon etkinliklerinin patentlenmesi için başvuruda bulunulacağından 551 sayılı “Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararname” ye göre ürünlerin sentezlenmesine ait deneyler ayrıntılı olarak sunulmamıştır. Bu ürünlerin yapı aydınlatılmasına ilişkin FTIR spektrumları da sunulamadığından değerlendirmelerinden de bahsedilememiştir.

Çalışmada PBAE polimerlerinin sentezinin optimizasyonu kapsamında farklı diakrilat:amin bileşiği oranı ve farklı sıcaklıklarda monomer ilavesinin ürün eldesine etkilerini görebilmek için aynı diakrilat ve amin monomerleri ile 6 adet ön deneme gerçekleştirildi. Yapısal analizleri Bölüm 3.2.3’de belirtilen yöntemle göre

gerçekleştirildi ve FTIR spektrumlarında başlangıç bileşiklerine bağlı olarak ester yapısının oluşumunun ve polimerizasyonun gerçekleştiği, ilgili absorpsiyon bantlarının ortaya çıkması, şiddetlerinin azalması, kayması veya yok olması ile doğrulandı.

PBAE polimerleri kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması Bölüm 3.2.4’de belirtilen yöntemle nanoçöktürme yöntemine göre gerçekleştirildi. Nanoçöktürme yönteminde organik fazda çözünen polimer, su fazı içerisine belirli bir karıştırma hızında damla damla ilave edilerek uygun nanoboyutta ürün elde edilmektedir. Nanopartikül optimizasyon çalışmalarında, öncelikle Bölüm 3.2.1’e göre sentezlenen PBAE ürünlerinden bir tanesi seçildi, etanol içerisinde çözdürüldü, farklı devirlerde (160, 360, 560 ve 650 rpm) karıştırılan 0-100 mg arasında noniyonik surfaktan içeren su fazı içerisine damla damla ilave edildi ve hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı analizi gerçekleştirildi.

Tablo 4.1’de verilen sonuçlara göre; partikül boyutu 41,9 nm, polidispersitesi 0,116 ve zeta potansiyeli -6,38 mV olan nanopartikül formülasyonlarının en uygun özelliklere sahip olduğu saptandı. Bu nedenle, sentezlenen diğer PBAE polimerlerinden nanopartikül hazırlanmasında, noniyonik surfaktan miktarı 50 mg ve karıştırma hızı 650 rpm olan yöntem kullanıldı.

PBAE polimerlerinin sentezlenmesinde öncelikle, aynı monomerler kullanılarak farklı reaksiyon şartlarında (diakrilat:amin mol oranı ve monomer ilave sıcaklığı) çalışıldı. Bu PBAE polimerleri kullanılarak nanopartikül formülasyonları yukarıda belirtilen yöntemle göre hazırlandı ve özellikleri saptandı. Tablo 4.2’de belirtilen sonuçlara göre; uygun özellikteki nPBAE₁₀ nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan PBAE_{1C} polimerinin sentez şartları farklı diakrilat bileşiklerinden hazırlanan PBAE polimerlerinin sentezinde kullanılmasına karar verildi. Her ne kadar PBAE_{1B} ve PBAE_{1D} polimerleri ile hazırlanan, nPBAE₉ ve nPBAE₁₁ nanopartiküllerinin boyutları nPBAE₁₀ ürününe göre daha küçükse de PDI değerlerinin yüksek olması nedeniyle, PBAE_{1B} ve PBAE_{1D} polimerlerinin sentezlenmesinde kullanılan reaksiyon şartları elimine edildi. Ayrıca, PBAE_{1A}, PBAE_{1E} ve PBAE_{1F} polimerleri ile hazırlanan, nPBAE₈, nPBAE₁₂ ve nPBAE₁₃ nanopartiküllerinin zeta potansiyeli değerlerinin de

düşük olması nedeniyle, bu nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan PBAE polimerlerinin sentez şartları da kullanılmadı.

İlk defa bu çalışmada, PBAE_{1C} sentezindeki reaksiyon şartları kullanılarak, aynı amin monomeri ve farklı diakrilat bileşikleri ile yeni PBAE yapısındaki polimerler sentezlendi. Bu ürünlerin yapıları Bölüm 3.2.3’de belirtildiği gibi FTIR spektroskopi analizi ile aydınlatıldı. Yine sentezlenen PBAE ürünlerinden nPBAE eldesi Bölüm 3.2.4’de belirtilen yöntemle göre gerçekleştirildi ve zeta potansiyeli, PDI ve boyut analizi Bölüm 3.2.7’de belirtilen yöntemle göre gerçekleştirildi.

Tablo 4.3’deki sonuçlara göre PBAE₇ polimerinin etanol içerisinde çözünmemesinden dolayı, bu polimer kullanılarak nanopartiküller hazırlanamadı. PBAE₃, PBAE₄ ve PBAE₈ polimerleri ile hazırlanmış, sırasıyla nPBAE₁₅, nPBAE₁₆ ve nPBAE₂₀ nanopartikülleri, negatif zeta potansiyeli değerlerine sahip olduğu için, transfeksiyon çalışmalarında kullanımlarının uygun olmadığı sonucuna varıldı. Yine, PBAE₂ polimeri ile hazırlanan nPBAE₁₄ nanopartikül formülasyonunun zeta potansiyeli +4.2 mV olmasına rağmen geniş aralıkta partikül boyutu dağılımı (PDI:0,450) göstermesi nedeniyle transfeksiyon çalışmalarında kullanılması uygun bulunmamıştır. PBAE₅ ve PBAE₆ polimerleri ile hazırlanan nPBAE₁₇ ve PBAE₁₈ nanopartikülleri, sırasıyla, 66,9 nm ve 51,4 nm partikül boyutuna, 0,231 ve 0,232 PDI değerlerine, 6,3 mV ve 1,6 mV zeta potansiyeli değerlerine sahip olduklarından dolayı transfeksiyon çalışmalarında kullanılmalarının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu iki nanopartiküler sistemin de partikül boyutu ve PDI değerleri kaynaklarda belirtilen değerlerle uyumlu olmasına rağmen [117] zeta potansiyeli değerlerinin, kararlı kolloidal sistemlerin eşik zeta potansiyeli değeri olan 30 mV’dan [27] düşük olması, nanopartikül hazırlama yönteminin bir kez daha optimize edilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için yapılan ikinci optimizasyon çalışmalarında ise; Tablo 4.3’de görüldüğü gibi daha uygun özelliklere sahip PBAE₆ polimerinin kullanılması tercih edilmiştir. Bölüm 3.2.4’de belirtilen yöntem ve Bölüm 4.2.3’de belirtilen denemelere göre PBAE₆ polimeri kullanılarak noniyonik surfaktan içermeyen ve Tablo 4.1’deki sonuçlara göre 50 mg noniyonik surfaktan içeren grup olmak üzere 2 grup nanopartiküler sistem elde edildi. Noniyonik surfaktan içeren

nanopartiküler sistemlerde ortamda kalan noniyonik surfaktanı uzaklaştırmak için 10.000 rpm'de 1 saat santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve takiben partiküller deiyonize suda tekrar dağıtılarak, dispersiyon 0,22 μm gözenekli membrandan geçirildi. Aynı işlemler noniyonik surfaktan içermeyen grup içinde yapıldı ve ayrıca kontrol grubu olarak da sadece noniyonik surfaktan içeren çözelti hazırlandı. Herbir örneğin zeta potansiyeli, PDI ve partikül boyutu ölçümleri alındı.

Tablo 4.4'deki sonuçlara göre noniyonik surfaktan içeren nPBAE₂₅ nanopartikülleri şimdiye kadar verilen sonuçlarla paralellik gösterirken, santrifüj işlemi sonrası üst faz olarak elde edilen nPBAE₂₆ nanopartikülünün -1,3 $\pm$ 3,9 mV zeta potansiyeli değeri göstermesi, bunların yanında sadece noniyonik surfaktan içeren dispersiyonun -13,2 $\pm$ 10,1 mV zeta potansiyeli değerine sahip olması ve santrifüj işlemi ile noniyonik surfaktandan arındırılmış nPBAE₂₇ nanopartiküllerinin 22,6 $\pm$ 6,03 mV zeta potansiyeli değerine sahip olması, noniyonik surfaktan kullanılmamış nPBAE₂₁ formülasyonunun 108,9 nm partikül boyutuna, 0,152 gibi dar aralıkta partikül boyutu dağılımına ve 38,9 $\pm$ 5,33 gibi ideal zeta potansiyeli değerine sahip olmasından dolayı, nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında noniyonik surfaktan kullanımının gerekli olmadığı görülmüştür. Bunun dışında noniyonik surfaktan içermeyen nanopartiküler sistemlerde santrifüj sonrası üst faz olarak elde edilen nPBAE₂₂ nanopartikülünün zeta potansiyeli değerinin 30 mV değerinden düşük ve standart sapma değerinin yüksek olması, santrifüj sonrası çöken ve tekrar deiyonize su içerisinde dağıtılarak elde edilen nPBAE₂₃ formülasyonunun partikül boyutu değerinin 872 nm ve PDI değerinin 1,000 gibi oldukça yüksek değerler olması ve 0,22 μm 'lik membrandan geçirilerek elde edilen nPBAE₂₄ ürününün 21,7 $\pm$ 12,2 mV zeta potansiyeli değerine sahip olmasıyla 30 mV'un altında kalması ve $\pm$ 12,2 gibi geniş bir dağılım göstermesi sonucunda, PBAE ürünlerinden nanopartikül elde ederken, nPBAE₂₁ nanopartikülleri için verilen yöntemin kullanılmasına karar verildi.

PBAE₆ ürününden elde edilen nPBAE₂₇, nPBAE₃₅ ve nPBAE₃₈ ürünlerinin SEM görüntüleri Bölüm 4.4.2.2'de Şekil 4.9-Şekil 4.12'de verilmiştir. Buna göre nPBAE₃₅ ve nPBAE₃₈ nanopartiküllerinin küresel, homojen dağılım gösteren, ideal boyutlarda olduğu ve kaynaklarda verilen bulgular ile uyumlu olduğu görülmüştür [117]. Noniyonik surfaktan kullanılarak elde edilen nPBAE₂₇ nanopartiküllerinde ise santrifüj

ve liyofilizasyon işlemlerine bağlı olarak partiküllerin bir kısmının birbirlerine yapıştığı ve yapıda aglomerasyon meydana gelerek partikül boyutunda büyümelerin olduğu görüldü.

Farklı başlangıç maddeleri ile elde edilen PBAE ürünlerinden nanopartikül hazırlanması Tablo 4.4'deki sonuçlara göre en uygun partikül özelliklerine sahip olduğu saptanan nPBAE₂₁ nanopartikülerinin hazırlanması için kullanılan yöntem ile Bölüm 4.2.4'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve hazırlanan nanopartikülerin zeta potansiyeli, PDI ve partikül boyutu analizleri yapıldı. Tablo 4.5'de belirtilen sonuçlara göre PBAE₁, PBAE₂, PBAE₃, PBAE₄ ve PBAE₈ polimerleri ile hazırlanan nPBAE₃₀, nPBAE₃₁, PBAE₃₂, PBAE₃₃ ve PBAE₃₅ nanopartiküllerinin boyutları, transfeksiyon uygulamaları için hücre içine girebilme boyutu olan 200 nm'nin oldukça üstünde olduğu için, bu ürünler transfeksiyon uygulamalarında kullanılmamıştır. PBAE₆ polimeri ile hazırlanan nPBAE₃₅ formülasyonu, 123,5 nm partikül boyutu, 0,114 PDI ve 33,1±6,8 mV zeta potansiyeli değerine sahip olduğundan transfeksiyon uygulamaları için en uygun nanopartiküler taşıyıcı sistem olarak belirlenmiştir. Bunun yanında, PBAE₅ ürününden elde edilen nPBAE₃₄ ürünü, partikül boyutu 183,2 nm olduğundan partikül boyutu olarak transfeksiyon çalışmaları için uygunluk göstermektedir. Ancak 0,370 PDI değerine ve 9,58±3,36 mV gibi düşük zeta potansiyeline sahip olduğundan transfeksiyon uygulamalarında kullanılmamıştır.

Nanopartiküllerin özelliklerine, hazırlanmalarında kullanılan çözücünün, yüksek karıştırma hızının ve ortamdaki iyon etkisinin incelenmesi amacıyla Bölüm 4.2.5'de belirtilen denemeler gerçekleştirildi. Çözücü etkisini incelemek amacıyla etanol yerine DMSO kullanıldı. Yüksek karıştırma hızı sağlamak için homojenizatör kullanılarak, 8.000 rpm karıştırma hızında çalışıldı. İyon etkisini incelemek için ise DMSO'da çözülen PBAE₆ polimeri deiyonize su yerine sodyum asetat çözeltisi içerisine damlatıldı. Tablo 4.6'da da görüldüğü gibi, yüksek karıştırma hızı, nanopartiküllerin (nPBAE₃₉, nPBAE₄₀) aglomerasyonuna ve buna bağlı olarak, partikül boyutunda artışa neden olmuştur. Ortamda bulunan iyonlardan dolayı, çözelti pH'nın 5 civarında olması nedeniyle biraz daha küçük boyutta nanopartikül (100,8 nm) elde edilmiştir ancak bu partiküllerin boyut dağılımı daha geniş aralıktadır (PDI:0,238). Tüm bu sonuçların yanında PBAE₆ polimeri kullanılarak DMSO ile hazırlanan nanopartiküllerin

(nPBAE₃₈) 0,179 nm partikül boyutu, 0,100 PDI değeri ve 54,5±8,64 mV gibi oldukça yüksek bir zeta potansiyeline sahip olması, bu formülasyonun transfeksiyon işlemi için ideal özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. PBAE₅ polimeri ile etanol kullanılarak hazırlanan nPBAE₃₇ formülasyonu için uygun partikül boyutuna sahip olmasına rağmen (173 nm), geniş partikül boyutu dağılımına sahip olması (PDI:0,308) transfeksiyon açısından dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca formülasyonun zeta potansiyelinin düşük (7,39±10,8 mV) olması transfeksiyon amacıyla kullanımını kısıtlamaktadır.

PBAE₆ polimeri ile hazırlanan nPBAE₃₅ ve nPBAE₃₈ nanopartiküllerinin Bölüm 4.2.6'da belirtildiği şekilde, 4 hafta boyunca kolloidal stabilitesi incelendi. Etanol ile hazırlanan nPBAE₃₅ nanopartiküllerinin özellikle 2. haftadan itibaren partikül boyutu ve dağılımında artış, kolloidal sistemin kararsızlığına bağlı olarak ise zeta potansiyelinde azalma görülmüştür. 4. haftada 634,8 nm gibi çok yüksek bir partikül boyutu ve 0,595 gibi geniş bir dağılım göstermesinin yanında zeta potansiyeli değerinin -9,77±4,56 mV olduğu, bu durumun muhtemelen PBAE ürünlerinin moleküler yapısındaki bozunma dolayısıyla partikülün yüzey yükünün tamamen değişmesinden ileri geldiği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu metot ile hazırlanan nanopartiküllerin sadece 1 haftalık raf ömrü olabileceği sonucuna varıldı. Buna karşın DMSO ile hazırlanan nPBAE₃₈ formülasyonu 4 hafta boyunca hemen hemen aynı boyut ve dağılımda kalmaktadır. Bunun yanı sıra, zeta potansiyeli 54,5±8,64 mV'dan 30,1±6,9 mV'a düşse de, bu değerde kolloidal sistemlerin kararlılığını ifade eden 30 mV değerinin üzerindedir. Bu formülasyon ticari bir transfeksiyon kit ürünü olarak düşünüldüğünde, 1 aylık raf ömrüne sahip bir ürün olarak pazarlanabilmesinin mümkün olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

5.2 MK VE İMK POLİMERLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BUNLARDAN ELDE EDİLEN nMK VE nİMK NANOPARTİKÜLLERİNİN ZETA POTANSİYELİ, POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ (PDI) VE BOYUT ANALİZİ

İlk defa bu çalışmada, transfeksiyon uygulamalarında kullanmak üzere kitosanın moleküler yapısındaki amin gruplarının miktarını arttırmak için MK polimeri, bu amin

modifikasyonunun üzerine indirgenebilir grupların ilavesi amacıyla da İMK polimeri sentezlendi. Bölüm 5.1’de de belirtildiği gibi, bu ürünlerin de hem primer hücreler hem de HEK293 hücrelerinde yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesi nedeniyle, sentezlerine ait detaylar sunulamamıştır. Ayrıca bu ürünlerin yapısının aydınlatılmasına ilişkin FTIR spektra da sunulamadığından değerlendirmelerinden de bahsedilmemiştir.

Ürünlerin yapısal analizleri Bölüm 3.2.3’de belirtilen yöntemle göre gerçekleştirildi ve FTIR spektrada, uygulanan modifikasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği, kitosanın moleküler yapısına ait karakteristik absorpsiyon bantlarının yanında, yapılan modifikasyon reaksiyonlarına bağlı olarak ilgili absorpsiyon bantlarının ortaya çıkması, kitosana ait bazı absorpsiyon piklerinin şiddetlerinin azalması, kayması veya yok olması ile doğrulandı.

MK ve İMK polimerleri kullanılarak nMK ve nİMK nanopartikülleri Bölüm 4.3.2’de belirtilen denemelerle hazırlandı ve zeta potansiyeli, partikül boyutu ve dağılımı incelendi. Bölüm 4.3.2.1’de belirtilen ve Tablo 4.10’daki sonuçlara göre hazırlanan nMK nanopartiküllerinin tümünün transfeksiyon çalışmaları için uygun olduğu görülse de, bunlardan nMK₅ formülasyonunun 102,9 nm partikül boyutu, 0,404 PDI değeri ve 41,9±5,63 mV zeta potansiyeli değeri ile en uygun nanopartikül formülasyonu olduğu saptandı. nİMK formülasyonlarında ise, İMK₃ polimeri %1’lik asetik asit içerisinde yeterince iyi çözünmediği için bu polimer kullanılarak nanopartikül hazırlanamadı. nMK nanoaprtiküllerinde olduğu gibi, İMK₄ polimeri ile hazırlanmış olan tüm nanopartikül formülasyonları uygun özelliklere sahip olsa da, nİMK₅ formülasyonunun 110,8 nm partikül boyutu, 0,221 PDI ve 42,7±6,63 mV zeta potansiyeli değeri ile en uygun nanopartiküler sistem olduğu görüldü. Bunların dışında, kitosan esaslı modifiye polimerler ile hazırlanmış hemen hemen tüm nanopartikül formülasyonlarının PDI değerlerinin 0,400 civarında olmasının, piyasada satılan kitosan ürünlerinin molekül ağırlığı dağılımının oldukça geniş aralıkta olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

MK ve İMK ürünlerinden hazırlanan nMK ve nİMK nanopartikül formülasyonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.12-Şekil 4.13’de verilmiştir. Buna göre nanopartiküllerin oluştuğu ancak SEM görüntülerini almak için örnek hazırlama aşamasında

liyofilizasyon işlemi esnasında yüksek vakum uygulandığından ağırlıklı olarak partiküllerin birbirlerine yapışmış olduğu görülmektedir.

5.3 pDNA TAŞIYAN nPBAE (ignPBAE₃₅, ignPBAE₃₈ VE egnPBAE) NANOPARTİKÜLLERİNİN ZETA POTANSİYELİ VE BU ÜRÜNLERLE BİRLİKTE KİTOSAN, gnMK VE gnİMK NANOPARTİKÜLLERİNİN JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARI

Bölüm 3.2.6’da belirtilen yönteme göre hem iyonik etkileşim ile hem de enkapsülasyon yöntemi kullanılarak pDNA taşıyan nPBAE nanopartikülleri hazırlanmıştır. Buna göre, tüm özellikleri bakımından uygun bulunan ve etanol ile hazırlanan nPBAE₃₅ formülasyonu pDNA ile iyonik etkileşim mekanizmasına göre (ignPBAE₃₅), DMSO ile hazırlanan nPBAE₃₈ formülasyonu ise pDNA ile iyonik etkileşim mekanizması (ignPBAE₃₈) ve enkapsülasyon metoduna (egnPBAE) göre belirli polimer/pDNA (a/a) oranında hazırlanmış ve zeta potansiyelleri incelenmiştir. Buna bağlı jel elektroforez sonuçları da Bölüm 4.4.2.3’de Şekil 4.14-Şekil 4.15’de verilmiştir.

Etanol içerisinde iyonik etkileşim mekanizmasına göre hazırlanan farklı ignPBAE₃₅:pDNA oranına (a/a) sahip nanopartiküllerin zeta potansiyeli sonuçları Tablo 4.14’de verilmiştir. Buna göre sadece DNA içeren sistem $-33,2 \pm 7,49$ mV değeri gösterirken ignPBAE₃₅ formülasyonunun pDNA ile iyonik etkileşimine bağlı olarak zeta potansiyeli pozitif değerlere yükselmiştir. ignPBAE₃₅ formülasyonunda yaklaşık 96,68:1 oranında kararlı kolloidal sistem zeta potansiyeli eşik değeri 30 mV’un üstüne çıkmıştır. ignPBAE₃₈ formülasyonunda ise 5,09:1 polimer:pDNA oranında zeta potansiyelin pozitif değerlere ulaştığı görülmüştür. egnPBAE formülasyonunda ise 10:1 oranında poitif zeta potansiyeli değerleri elde edilmiştir.

Elde edilen bulgular, jel elektroforez sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde birbiriyle uyumlu oldukları görülmektedir. ignPBAE₃₅ formülasyonunda nanopartiküller tarafından pDNA’nın sadece bir kısmının tutulduğu görülmüştür. Buna karşılık ignPBAE₃₈ formülasyonunda ise 20:1 polimer:DNA oranında pDNA’nın tamamının etkileşime girdiği görülmektedir. egnPBAE formülasyonunda ise enkapsülasyona bağlı

olarak 5:1 polimer:DNA oranında pDNA'nın tamamının enkapsüle edildiği görülmüştür. (Şekil 4.14-Şekil 4.15)

Kaynaklarda kitosan ve kitosan esaslı ürünlerin transfeksiyon amacıyla birçok çalışmada kullanıldığı, bu ürünlerin çok düşük miktarlarda bile pDNA ile birleşebildiği, bundan dolayı da zeta potansiyeli değerlerinin takibine gerek olmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle çalışmada Bölüm 4.4.2.3'de belirtildiği gibi ürün-DNA kompleksleri jel elektroforezde yürütülerek pDNA'nın tamamının kompleks oluşturup oluşturmadığına veya hangi oranda oluşturduğuna bakıldı ve sonuçlar Şekil 4.14-Şekil 4.15'de verildi. Buna göre kitosanın polimer:pDNA (a/a) 4:1 oranında DNA molekülünün tamamını tutabildiği görülürken, gnMK formülasyonunun ise, modifikasyon sonucu kitosanın yapısındaki amin gruplarının artışına bağlı olarak 1:1 oranı gibi düşük bir oranda bile pDNA'nın tamamı ile kompleks yapabildiği görülmüştür. Yine, gnMK formülasyonunda bu oranın 1:2'ye kadar düştüğü görülmektedir.

5.4 PBAE, MK VE İMK POLİMERLERİNDEN ELDE EDİLEN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ SİTOTOKSİSİTESİ

PBAE, MK ve İMK polimerlerinin sitotoksiste analizleri gerçek zamanlı hücre analizöründe (RTCA), Bölüm 4.5.2'de belirtildiği şekilde, 2 farklı hücre tipi olarak HEK293 ve POF hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Negatif kontrol grubu olarak PEI kullanılırken pozitif kontrol grubu olarak kitosan kullanıldı. Sitotoksiste çalışmalarında, hem Bölüm 3.3.2'de belirtilen transfeksiyon çalışmalarında kullanılan derişimde (7,5 µg/mL) hem de polimerlerin en toksik olduğu derişim aralıklarını bulabilmek için bu derişimin oldukça üstündeki derişimlerde (25 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL) polimer çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 3.3'de görüldüğü gibi, RTCA'nın verdiği zamana bağlı hücre indeksi değerlerinden % hücre canlılık oranları hesaplandı. Polimer çözeltisinin ilavesinden sonra hücrelerdeki yaşama oranına göre grafik yukarı doğru yönelirken ölüm oranının artışına bağlı olarak grafik aşağıya doğru yönelmektedir.

Şekil 4.18'de negatif kontrol grubu PEI'n HEK293 hücreleri ile yapılmış sitotoksiste çalışmasına ait bulgular görülmektedir. Örneklerin 24. saatte hücrelerin üzerine ilave

edilmesi ile birlikte, özellikle 28. saatte en düşük derişim olan 7,5 µg/mL’de bile canlılık oranının %40-50 aralığına düştüğü, genel olarak ise, çalışma şartlarında kullanılan tüm derişimlerde hücre canlılığında %50 oranında bir azalmanın meydana geldiği görülmüştür. 72. saat sonunda ise 7,5 µg/mL ve 25 µg/mL derişimlerde, sırasıyla %90 ve %60 canlılık oranları görülse de sentezlenmiş modifiye polimerler ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir toksisite gösterdiği görülmüştür. Buna karşın PBAE₆ polimerinde ise, % hücre canlılığında 28. saat sonunda tüm derişimlerde ortalama %15 oranında bir azalma görülse de, 72. saat sonunda özellikle 7,5 µg/mL ve 25 µg/mL derişimlerde hiçbir toksik etki görülmemesi bu derişimlerin transfeksiyon uygulamaları için uygun olduğunu göstermiştir. Uygulamada kullanılan çok daha yüksek derişimlerde ise (50 µg/mL ve 150 µg/mL) ürünün toksik etki gösterdiği görülmüştür.

Kitosan ve kitosan esaslı MK ve İMK ürünlerinin HEK293 hücreleri üzerindeki sitotoksikite sonuçları ise Şekil 4.20-Şekil 4.22’de görülmektedir. Pozitif kontrol grubu olarak kullanılan kitosanın, doğal bir polisakkarit olmasından dolayı söz konusu hücrelere herhangi bir toksik etkisi olmadığı görülmüştür. Bunun yanında 24-28. saat uygulamasında FCS-DMEM kullanılmasına karşılık hücre sayısındaki artış (proliferasyonu), bu polisakkaritin hücreler tarafından besin maddesi olarak kullanıldığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. MK polimerinde ise, kitosanın yapısındaki amin miktarı arttırılarak modifikasyon yapılmış, 150 µg/mL konsantrasyon hariç, diğer tüm konsantrasyonlarda hem 28. saat hem de 72. saat sonuçlarında kitosana göre hücre canlılığında belirgin bir azalma görülmemiştir. İMK polimeri, MK polimerine ikinci bir modifikasyon yapılarak elde edilmiştir. Bu modifikasyona rağmen 7,5 µg/mL ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda hücrelerde belirgin bir toksik etki görülmemiştir. Buna karşılık, İMK polimerinin 50 µg/mL ve 150 µg/mL gibi daha yüksek konsantrasyonlarında ise kitosan ve MK polimerlerindeki gibi biyoyumluluk görülmüştür.

POF hücrelerinde PEI ve PBAE ürünlerinin sitotoksikite sonuçları Şekil 4.23-Şekil 4.24’de görülmektedir. PEI maddesinin toksik etkisi POF hücrelerinde daha açık bir şekilde görülmektedir. 24. saatte PEI ilavesinden sonra 28. saat ve 72. saat sonuçlarındaki hücre canlılık oranları çok düşük bulunmuştur. Buna karşılık, PBAE₆

polimeri 7,5 µg/mL konsantrasyonda neredeyse hiçbir toksisite göstermezken diğer konsantrasyonlarda 28. saatte bir düşme görülse de polimerlerin konsantrasyonlarının yüksekliğine bağlı olarak 72. saat sonunda uygun sitotoksosite değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Kitosan, MK ve İMK polimerlerinin POF hücrelerindeki sitotoksosite sonuçları ise Şekil 4.25-Şekil 4.27’de sunulmuştur. Burada polimerlerin denenen tüm konsantrasyonlarda hiçbir toksik etki göstermediği görülmektedir.

5.4.1 PBAE, MK ve İMK Polimerlerinden Elde Edilen Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksosite Analizi Hücre İndeksi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

PBAE, MK ve İMK polimerlerinden elde edilen nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel analizi Bölüm 3.3.4’e göre belirtilen program ve test yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 4.19-Tablo 4.21’de verilmiştir.

HEK293 hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite testleri sonucunda negatif kontrol (polimer katılmamış) grup sonuçları ile yapılan karşılaştırmalarda toksik etkisi bilinen PEI’nin 25 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL konsantrasyonlarda katıldığında toksik etki gösterdiği, 7,5 µg/mL konsantrasyonda katıldığında ise toksik etkinin önemli olmadığı negatif kontrole benzer sonuçların elde edildiği belirlenmiştir. Tez çalışmalarında geliştirilmiş olan polimerlerden ise MK 150 µg/mL, İMK 150 µg/mL, PBAE₆ 50 µg/mL ve 150 µg/mL konsantrasyonlarda hücre indekslerinde önemli düşüslere neden olduğu ve kısmen toksik olduğu belirlenmiştir (Mann-Withney U test; p<0,05), bu dozlar PEI’nin 7,5 µg/mL dozunda elde edilen hücre indeksleri ile karşılaştırıldığında PBAE₆’in çok daha yoğun kullanılmış olmasına rağmen (6,66 katı) PEI’ne göre çok daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir(p<0,002). Çalışmada İMK’nın 50 µg/mL, MK’nın 50 µg/mL, PBAE₆’nın da 25 µg/mL konsantrasyonlara kadar HEK hücrelerinde kullanılabileceği belirlenmiştir

POF hücreleri ile yapılan denemelerde ise PEI'nin 7,5 µg/mL konsantrasyondan itibaren toksik etki gösterdiği, İMK'nın 150 µg/mL konsantrasyonda benzer şekilde hücre indeksinin olumsuz şekilde etkilendiği belirlenmiştir. Ancak bu konsantrasyonla elde edilen hücre indeksi toksik olduğu belirlenmiş olan PEI'nin 7,5 µg/mL konsantrasyonunda elde edilen hücre indeksi ile karşılaştırıldığında İMK'nın PEI'ne göre önemli ölçüde hücre gelişiminde daha az zarar oluşturduğu söylenebilir ($p<0,002$). Denemesi yapılan diğer dozlar ve kitosanın tüm konsantrasyonlarının toksik etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Mann-Whitney U test; $p<0,05$).

POF hücrelerinde PBAE₆ polimeriyle yapılan denemelerde 7,5 µg/mL konsantrasyonun toksik etkiye sahip olmadığı ancak 25 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL konsantrasyonlarda gerçekleşen hücre indeksi düşüşlerinin istatistik açıdan önemli olduğu ve kısmen toksik etkinin olduğu söylenebilir (Mann-Whitney U test; $p<0,05$). Ancak PBAE₆ polimerlerinin tüm konsantrasyonları PEI'nin en düşük konsantrasyonu olan 7,5 µg/mL konsantrasyonu ile elde edilen değerlere göre önemli derecede iyi sonuç verdiği ve hücre indeksindeki düşüşlerin önemli derecede daha az olduğu yani bu maddelerin PEI'ne göre toksik etkilerinin önemli derecede zayıf olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Çalışmada MK'nın 150 µg/mL, İMK'nın 50 µg/mL, PBAE₆'nın da 7,5 µg/mL konsantrasyonlara kadar POF hücrelerinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

5.5 nPBAE NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ SONUÇLARI

nPBAE ürünlerinin POEF5 hücreleri içerisine alımı çalışmaları Bölüm 3.3.1'de belirtilen yöntem ve Bölüm 4.5.1'de belirtilen denemelerle gerçekleştirildi. Nanopartiküller rodamin-B boyar maddesinin bulunduğu ortama göre ve noniyonik surfaktan içerip içermemesine göre 3 ayrı şekilde hazırlandı. Dördüncü grup olan kontrol grubunda ise nanopartikülün bulunmadığı bir ortamda sadece boyar madde hücrelere uygulandı. Sonuçlar Şekil 4.16-Şekil 4.17'de ve Tablo 4.18'de sunulmuştur.

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi floresans mikroskop ile yapılan çalışmada boyar madde içeren nanopartiküllerin hücre membranına tutunduğu belirlenmiştir. Partikül boyutu 200 nm’nin altında olan boyar madde içeren nanopartiküllerin hücre içine geçerek içerdiği boyar maddeyi hücre sitoplazmasında serbestlediği ve sadece hücrenin iç yapısını boyadığı, 200 nm’nin üzerindeki partiküllerin ise hücre dışında kaldığı ve hücre membranında akümüle olduğu görülmüştür.

Noniyonik surfaktan içeren nPBAE nanopartikül formülasyonları, hücre içine alımdan önce boyayı serbestlediğinden dolayı, bu formülasyonlar incelendiğinde hem hücre içi hem de hücre dışında kırmızı floresans ışına tespit edildi. Buna karşılık, noniyonik surfaktan içermeyen nPBAE nanopartiküllerinin ise Şekil 4.17-CD-Şekil 4.17-EF’de görüldüğü ve Tablo 4.18’de belirtildiği gibi hücre membranından geçerek boyar maddeyi sadece hücre sitoplazmasında serbestlediği ve bu sebeple sadece hücre içi yapıları boyadığı görülmüştür.

Çalışmada hazırlanan nanopartiküler sistemlerin transfeksiyon etkinliği HEK293, POEF ve POF hücrelerinde Bölüm 3.3.5’de belirtilen yöntem ve Bölüm 4.5.3’de yapılan denemelerle incelendi. ignPBAE₃₅ nanopartiküllerinin transfeksiyon çalışmaları sonuçları Tablo 4.23 ve Şekil 4.28-Şekil 4.29’da sunulmuştur. Transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre tipi POF3’de, 25.000 hücre ile çalışılmıştır. Polimer:pDNA oranının 1,2:1 olmasına rağmen, literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında [100], 10 µg gibi yüksek gen miktarı kullanılmasına rağmen transfeksiyon etkinlik derecesinin 4’de kalmasının başlıca nedeni, zeta potansiyeli ve jel elektroforez bulgularından da anlaşılacağı gibi ignPBAE₃₅ formülasyonunun kullanılan tüm pDNA ile kompleks oluşturamamasıdır.

ignPBAE₃₈ nanopartiküllerinin transfeksiyon çalışmalarına ait bulgular ise Tablo 4.24 ve Şekil 4.30-Şekil 4.31’de verilmiştir. Transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre tipi POF3, hücre sayısı ise 25.000’dir. ignPBAE₃₅ formülasyonunda kullanılan gen miktarının 1/10’u kadar gen içermesine rağmen, polimer:pDNA oranı 68,1:1 olan ignPBAE₃₈ nanopartiküllerinin transfeksiyon etkinlik derecesinin 4 olduğu görülmektedir. Bunun sebebi zeta potansiyeli değeri ve jel elektroforez sonuçlarından

da görüldüğü gibi, ignPBAE₃₈ formülasyonunun polimer:pDNA oranı 5,09:1 olduğunda pDNA'nın hepsi ile kompleks oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır.

egnPBAE formülasyonu ile yapılan transfeksiyon çalışmalarına ait bulgular Tablo 4.25-Tablo 4.26 ve Şekil 4.32-Şekil 4.38'de verilmiştir. Burada, HEK293 hücrelerinde transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısının 20.000, polimer:pDNA oranlarının 5:1 ile 10:1 olduğu ve 0,5-2 µg aralığındaki gen miktarları ile transfeksiyon etkinlik derecesinin 5 olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan diğer bir hücre tipi olan POF hücrelerinde ise, transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısının 20.000, polimer:pDNA oranının 5:1 ile 10:1 olduğu ve 0,5-2 µg aralığındaki gen miktarları ile transfeksiyon etkinlik derecesinin 5 olduğu saptanmıştır. Bu nanopartiküler sistemlerin iyonik etkileşim mekanizmasına göre pDNA ile hazırlanan komplekslerden daha etkin olduğu da görülmektedir. Bunun başlıca sebebi ise, egnPBAE nanopartikülerinin zeta potansiyeli değeri ve jel elektroforez sonuçlarından da görüldüğü gibi polimer:pDNA oranı 10:1 olduğunda, kullanılan pDNA'nın hepsi ile kompleks oluşturabilmesi ve ignPBAE ürünlerinde olduğu gibi yalnızca yüzeye adsorbsiyon ile değil polileksin merkezinde de pDNA'yı enkapsüle etmesidir.

Modifiye kitosan esaslı nanopartikül formülasyonlarının transfeksiyon etkinliklerini karşılaştırmak amacıyla, kontrol grubu olarak modifiye edilmemiş kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.27'de ve Şekil 4.39-Şekil 4.40'de sunulmuştur. Buna göre, HEK293 hücrelerinde transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısının 20.000, polimer:pDNA oranının 2:1 ile 3:1 ve 2,12 µg gen miktarı ile transfeksiyon etkinlik derecesinin de 4 olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan diğer bir hücre tipi olan POF9 hücrelerinde ise, hücre sayısı 20.000 olup, herhangi bir transfeksiyonun gerçekleşmediği görülmüştür.

MK polimeri ile hazırlanan nMK nanopartiküllerinin transfeksiyon etkinliği sonuçları Tablo 4.28'de ve Şekil 4.41-Şekil 4.42'de görülmektedir. Buna göre, çalışmada kullanılan her iki hücre tipi olan HEK293 ve POF9 hücrelerinde de transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısı 20.000, polimer:pDNA oranının 7:1 ve 2,12 µg gen miktarı ile transfeksiyon etkinlik derecesinin HEK293 hücrelerinde 5, POF9 hücrelerinde ise 4 olduğu görülmektedir. Modifiye edilmemiş kitosan nanopartikülleri ile

karşılaştırıldığında, MK polimerinde kitosanın moleküler yapısındaki amin grubu miktarının artışı, jel elektroforez çalışmalarında da görüldüğü gibi, aynı miktarda genin daha az miktarda polimerik nanopartikül ile kompleks oluşumunu sağlamıştır. Bu şekilde, hücre içerisine aynı polimer miktarı ile daha fazla gen salınabilmektedir. Çekirdeğe yönelen gen miktarı arttığı için genom diziliminde yer alan (entegre olan) gen miktarı artarak üretilen GFP proteini ile hem transfekte hücre sayısında artış hem de transfeksiyonun etkinliğinde artış görülmektedir. Kim ve diğ. (2007) tarafından yazılan bir derlemede [84] kitosan bileşiklerinin HEK293 hücrelerinde oldukça yüksek transfeksiyon etkinliğini gösterdiği bununla birlikte primer hücrelerde transfeksiyon etkinliğinin düşük olduğu bildirilmiştir. Bu tezle sunulan çalışmada sentezlenmiş olan nMK nanopartiküllerinin yukarıda belirtilen kaynaktan bildirilenin tersine primer hücrelerde de transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu ispatlanmıştır.

İMK polimeri ile hazırlanan nİMK nanopartiküllerinin transfeksiyon etkinliği sonuçları Tablo 4.29’da ve Şekil 4.43’de sunulmuştur. Buna göre, çalışmada kullanılan her iki hücre tipi olan HEK293 ve POF9 hücrelerinde transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısı 20000, polimer:pDNA oranının sırasıyla 7:1 ile 5:1 ve 2,12 µg gen miktarı ile transfeksiyon etkinlik derecesinin HEK293 hücrelerinde 5, POF9 hücrelerinde ise ancak 2 olduğu görülmektedir. Kontrol grubu olan kitosan ile karşılaştırıldığında, İMK polimerinde yapılan modifikasyon reaksiyonlarına bağlı olarak, kitosanın moleküler yapısındaki amin grubu miktarının artışı ile birlikte indirgenabilir grupların da yer almasının, jel elektroforez denemelerinde de görüldüğü gibi aynı miktarda genin, hem kitosana göre, hem de MK ürününe göre daha az polimerik nanopartiküler sistem ile kompleks oluşturabilmesini sağladığı görülmüştür. nİMK nanopartiküllerinin transfeksiyon sonuçları modifiye edilmemiş kitosan nanopartikülleri ile karşılaştırıldığında, kitosan molekülüne uygulanan modifikasyonun her iki hücre tipinde de transfeksiyonu etkin bir şekilde arttırdığı görülmüştür. Yine MK formülasyonu ile karşılaştırıldığında, hem nMK nanopartikülleri hem de nİMK nanopartikülleri HEK293 hücrelerinde yüksek transfeksiyon etkinliği sağlanırken, POF9 hücrelerinde nİMK nanopartikülleri ile daha düşük transfeksiyon sağlanmıştır. Bunun başlıca sebebi, İMK polimerinin pDNA ile iyonik etkileşiminin MK ürünün pDNA ile iyonik etkileşimine nazaran daha kuvvetli olması ve hücre içerisine bu kuvvetli kompleks girdiğinde pDNA’yı hücre çekirdeğine yönlendirememesidir.

5.6 SONUÇLAR VE İLERİYE YÖNELİK ÖNERİLER

Bu tez ile sunulan çalışmada gerçekleştirilen tüm deneylerin sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, ilk defa bu tezle sunulan çalışmada sentezlenen ve toksik olmayan PBAE ürünlerinden hazırlanan ve yine ilk defa bu çalışmada kitosana uygulanmış olan modifikasyon reaksiyonları ile elde edilen toksik olmayan ürünlerden hazırlanan ve uygun özelliklerdeki nanopartiküler sistemlerin HEK293 ve POF hücrelerinde transfeksiyon etkinliği yüksek viral olmayan gen transfer sistemleri olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Günümüzde yapılan transgenik çalışmalar sonucunda viral vektörlerle elde edilen transgenik hayvan üretim başarı oranları %80'lere kadar çıkmaktadır. Ancak viral vektörlerin kullanımında uygulanabilirlik açısından zor ve özel ortamlara ihtiyaç vardır. Transgenik teknolojisinde transfeksiyon etkinliği yüksek, ucuza maledilebilen vektörlere ihtiyaç vardır. Dolayısı ile tez çalışmasından üretilmiş başarılı olan taşıyıcı polimerlerin gerek *in vitro* şartlarda kullanılabilirliğinin gösterilmesi ile uygulamaya yönelik ticari bir kite dönüşebilme potansiyelinin görülmesinin yanı sıra, yapılacak *in vivo* çalışmalar ile etkinliği ispatlandığında gen terapi açısından da yeni bir kapı açabilme potansiyeline sahiptir.

KAYNAKLAR

- 1) AMIJI, M.M., 2005, *Polymeric Gene Delivery*, CRC Press, London, 0-8493-1934-X.
- 2) YILDIRIM, A., BARDAKÇI, F., KARATAŞ, M., TANYOLAÇ, B., 2007, *Moleküler Biyoloji: Protein Sentezi ve Yıkımı*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 978-9944-77184-9.
- 3) PRAZERES, D.M.F., 2011, *Plasmid Biopharmaceuticals: Basics, Applications and Manufacturing*, John Wiley & Sons, New Jersey, 978-0-470-93987-1.
- 4) TURAN-ÖZBAŞ, S., 2006, *Kitozan Esaslı Taşıyıcı Sistemler İle Deriden Gen Transferinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi.
- 5) GÜVEN, G., 2005, *Eş Boyutlu, Katyonik, Fonksiyonel Grup İçeren/İçermeyen, Manyetik Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Nükleik Asit Uygulamaları*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi.
- 6) TSIEN, Y.R., 1998, The Green Fluorescent Protein, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 509-544.
- 7) KARABOZ, İ., SUKATAR, A., PARLAKAY, A., 2004, Denizsel Organizmadan Elde Edilen Yeşil Floresans Protein (GFP) ve Kullanım Alanları, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 21 (3-4), 383-388.
- 8) CHALFIE, M., KAIN, S.R., 2006, *Green Fluorescent Protein*, John Wiley & Sons, New Jersey, ISBN-13 978-0-471-73682-0.
- 9) SERBEST-KOBANER, S., *Hıyar Bitkisinde (Cucumis Sativus L.) Rejenerasyonun Optimizasyonu ve Agrobacterium Aracılığıyla GFP (Yeşil Floresans Protein) Geninin Aktarılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- 10) KWON, G.S., 2005, *Polymeric Drug Delivery*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 978-0-8247-2532-7.
- 11) XU, F.J., LI, H., LI, J., ZHANG, Z., KANG, E.T., NEOH, K.G., Pentablock copolymers of poly(ethylene glycol), poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate)

and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery, *Biometaterials*, 29, 3023-3033.

- 12) WONG, S.Y., PELET, J.M., PUTNAM, D., 2007, Polymer Systems For Gene Delivery-Past, Present And Future, *Progress In Polymer Science*, 32, 799-837.
- 13) TAIRA, K., KATAOKA, K., NIIDOME, T., 2005, *Non-Viral Gene Therapy*, Springer, 4-431-25122-7.
- 14) WALTHER, W., STEIN, U., 2000, Viral Vectors For Gene Transfer, *Drugs*, 60 (2), 249-271.
- 15) U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2012, *Gene Therapy Using an Adenovirus Vector*, <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/therapyvector>, [Ziyaret Tarihi: 08.10.2012].
- 16) THOMAS, M., KLIBANOV, A.M., 2003, Non-Viral Gene Therapy: Polycation-Mediated Dna Delivery, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 62, 27-34.
- 17) HEATH, F., HARÍA, P., ALEXANDER, C., 2007, Varying Polymer Architecture to Deliver Drugs, *AAPS Journal*, 9(2), 235-240.
- 18) LUO, D., SALTMAN, W.M., 2003, *Synthetic DNA Delivery Systems*, Landes Bioscience, Eurekah.Com And Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, 0-306-47701-7.
- 19) VORHIES, J.S., NEMUNAITIS, J.J., 2009, Synthetic Vs. Natural/Biodegradable Polymers For Delivery Of Shrna-Based Cancer Therapies. Methods In Molecular Biology, *Macromolecular Drug Delivery*, 480, 11-29.
- 20) PARK, T.G., JEONG, J.H., KIM, S.W., 2006, Current Status Of Polymeric Gene Delivery Systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 467-486.
- 21) SCHWARTZ, B., IVANOV, M.A., PITARD, B., ESCRIOU, V., RANGARA, R., BYK, G., WILS, P., CROUZET, J., SCHERMAN, D., 1999, Synthetic DNA-Compacting Peptides Derived From Human Sequence Enhance Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer In Vitro And In Vivo, *Gene Therapy*, 6, 282-292.
- 22) PLANK, C., MECHTLER, K., SZOKA, Jr.F.C., WAGNER, E., 1996, Activation Of The Complement System By Synthetic DNA Complexes: A Potential Barrier For Intravenous Gene Delivery, *Human Gene Therapy*, 7, 1437-1446.
- 23) BARRON, L.G., GAGNE, L., SZOKA, Jr.F.C., 1999, Lipoplex-Mediated Gene Delivery To The Lung Occurs Within 60 Minutes Of Intravenous Administration, *Human Gene Therapy*, 10, 1683-1694.

- 24) BOUSSIF, O., LEZOULAC'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 Of The United States Of America*, 92, 7297–7301.
- 25) YAZICI, Ö., 2012, *Poli(Sülfonik Difenil Anilin)'in ve Poli(Etilen Glikol) ile Diblok Kopolimerlerinin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi ve Diblok Kopolimerin Organik/İnorganik Hibrit Partiküllerinin Hazırlanması*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.
- 26) GÜRBÜZ, A.A., 2007, *Magnetik Nanopartiküller İle Sulu Çözeltilerden Krom Giderilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.
- 27) KOÇ-GENÇOĞLU, R., 2011, *Farklı Değerlikli Tuzların Vinil Asetat-Bütül Akrilat Kopolimerlerinin Özellikleri Üzerine Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.
- 28) KORKMAZ, E., 2008, *Eskişehir Yöresi Sepiyoliti'nin Zeta Potansiyellerinin Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi.
- 29) LUNDIN, E.K., SIMONSON, O.E., MORENO, P.M.D., ZAGHLOUL, E.M., OPREA, I.I., SVAHN, M.G., SMITH, C.I.E., 2009, Nanotechnology Approaches for Gene Transfer, *Genetica*, 137, 47-56.
- 30) AMIJI, M.M., 2007, *Nanotechnology for Cancer Therapy*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 978-0-8493-7194-3
- 31) CHO, K., WANG, X., NIE, S., 2008, Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clin. Cancer Res.*, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.
- 32) VENTUROLI, D., RIPPE, B., 2005, Ficoll And Dextran vs. Globular Proteins As Probes For Testing Glomerular Permselectivity: Effects Of Molecular Size, Shape, Charge, And Deformability, *American Journal Of Physiology Renal Physiology*, 288, F605–F613.
- 33) DREHER, M.R., LIU, W., MICHELICH, C.R., DEWHIRST, M.W., YUAN, F., CHILKOTI, A., 2006, Tumor Vascular Permeability, Accumulation and Penetration Of Macro Macromolecular Drug Carrier, *Journal Of The National Cancer Institute*, 98, 335–344.
- 34) SCHATZLEIN, A.G., ZINSELMAYER, B.H., ELOUZI, A., DUFES, C., CHIM, Y.T., ROBERTS, C.J., DAVIES, M.C., MUNRO, A., GRAY, A.I., UCHGBU, I.F.,

- 2004, Preferential Liver Gene Expression With Polypropylenimine Dendrimers, *Journal Of Controlled Release*, 101, 247–258.
- 35) HUERTAS, C.E.M., FESSI, H., ELAISSARI, A., 2010, Polymer-based Nanocapsules for Drug Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.
- 36) ESİRGİN, S., 2007, *Kitozan Mikrokürelerden Etkin Madde Salımını Etkileyen Parametrelerin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.
- 37) ABDELHADY, H.G., ALLEN, S., DAVIES, M.C., ROBERTS, C.J., TENDLER, S.J., WILLIAMS, P.M., 2003, Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I, *Nucleic Acids Res*, 31(14), 4001–4005.
- 38) SCHAFFER, D.V., LAUFFENBURGER, D.A., 1998, Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery, *Journal of Biological Chemistry*; 273(43), 28004–28009
- 39) SANTOS, J.L., ORAMAS, E., PEGO, A.P., GRANJA, P.L., TOMAS, H., 2009, Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using PAMAM dendrimers as gene delivery vectors, *Journal of Controlled Release*, 134, 141-148.
- 40) SHCHARBIN, D.G., KLAJNERT, B., BYRSZEWSKA, M., 2009, Dendrimers in Gene Transfection, *Biochemistry*, 74, 1070-1079.
- 41) ROQUES, C., FROMES, Y., FATTAL, E., 2009, Hydrosoluble polymers for muscular gene delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 378-390.
- 42) LUTEN, J., NOSTRUM, C.F., SMEDT, S.C., HENNINK, W.E., 2008, Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery, *Journal of Controlled Release*, 126, 97-110.
- 43) DENG, R., YUE, Y., JIN, F., CHEN, Y., KUNG, H., LIN, M.C.M., WU, C., 2009, Revisit the complexation of PEI and DNA — How to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure?, *Journal of Controlled Release*, 140, 40-46.
- 44) WANG, C.F., LIN, Y.X., JIANG, T., HE, F., ZHUO, R.X., 2009, Polyethylenimine-grafted polycarbonates as biodegradable polycations for gene delivery, *Biomaterials*, 30, 4824-4832.

- 45) HOLLADAY, C., KEENEY, M., GREISER, U., MURPHY, M., O'BRIEN, T., PANDIT, A., 2009, A matrix reservoir for improved control of non-viral gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 136, 220-225.
- 46) LAI, W.F., LIN, M.C.M., 2009, Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives, *Journal of Controlled Release*, 134, 158-168.
- 47) OSORIO, D.T., LÓPEZ, C.R., ALONSO, M.J., 2009, Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 257-263
- 48) INTRA, J., SALEM, A.K., 2009, Fabrication, Characterization and In Vitro Evaluation of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Microparticles Loaded With Polyamidoamine-Plasmid DNA Dendriplexes for Applications in Nonviral Gene Delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, DOI 10.1002/jps.21840, 1-17
- 49) JANG, J.H., SHEA, L.D., 2006, Intramuscular delivery of DNA, releasing microspheres: microsphere properties and transgene expression, *Journal of Controlled Release*, 112, 120–128.
- 50) PANYAM, J., LABHASETWAR, V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 329–347
- 51) ANDO, S., PUTNAM D., PACK, D.W., LANGER, R., 1999, PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization, *Journal of Pharmaceutical Science*, 88, 126–130
- 52) WALTER, E., MOELLING, K., PAVLOVIC, J., MERKLE, H.P., 1999, Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide) stability issues and release characteristics, *Journal of Controlled Release*, 61, 361–374.
- 53) WANG D., ROBINSON, D.R., KWON, G.S., SAMUEL, J., 1997, Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D, L-lactic-coglycolicacid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery, *Journal of Controlled Release*, 57, 9–18
- 54) KASTURI, S.P., SACHAPHIBULKIJ, K., ROY, K., 2005, Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines, *Biomaterials*, 26, 6375–6385
- 55) MUNIER, S., MESSAI, I., DELAIR, T., VERRIER, B., ATAMAN-ONAL, Y., 2005, Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface

- polycations for DNA binding, protection and transfection properties, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 43, 163–173
- 56) CONNER, S., SCHMID, S., 2003, Regulated portals of entry into the cell, *Nature*, 422, 37–44
 - 57) GANTA, S., DEVALAPALLY, H., SHAHIWALA, A., AMIJI, M., 2008, A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 126, 187–204.
 - 58) VEISEH, O., KIEVIT, F.M., GUNN, J.W., RATNER, B.D., ZHANG, M., 2009, A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells, *Biomaterials*, 30, 649–657.
 - 59) MARTIMPREY, H., VAUTHIER, C., MALVY, C., COUVREUR, P., 2009, Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 490–504.
 - 60) ZHANG, H., MA, Y., SUN, X.L., 2010, Recent Developments in Carbohydrate-Decorated Targeted Drug/Gene Delivery, *Medicinal Research Reviews*, 30 (2), 270–289.
 - 61) OPANASOPIT, P., ROJANARATAA, T., APIRAKARAMWONG, A., NGAWHIRUNPAT, T., RUKTANONCHAI, U., 2009, Nuclear localization signal peptides enhance transfection efficiency of chitosan/DNA complexes, *International Journal of Pharmaceutics*, 382, 291–295.
 - 62) HU, W.W., LANG, M.W., KREBSBACH, P.H., 2009, Digoxigenin modification of adenovirus to spatially control gene delivery from chitosan surfaces, *Journal of Controlled Release*, 135, 250–258.
 - 63) TABATA, Y., IKADA, Y., 1990, Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages, *Advanced Polymer Science*, 94, 107–141.
 - 64) MISLICK, K.A., BALDESCHWIELER, J.D., 1996, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer, *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 93, 12349–12354.
 - 65) BOECKLE, S., WAGNER, E., 2006, Optimizing Targeted Gene Delivery: Chemical Modification of Viral Vectors and Synthesis Artificial Virus Vector Systems, *AAPS Journal*, 8 (4), DOI: 10.1208/aapsj080483.

- 66) PIEST, M., LIN, C., TIMONEDA, M.A.M., LOK, C.M., HENNINK, W.E., FEIJEN, J., ENGBERSEN, J.F.J., 2008, Novel poly(amido amine)s with bio-reducible disulfide linkages in their diamino-units: Structure effects and in vitro gene transfer properties, *Journal of Controlled Release*, 130, 38–45.
- 67) BREUNIG, M., BAUER, S., GOEPFERICH, A., 2008, Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting?, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 112–128.
- 68) INTRA, J., SALEM, A.K., 2008, Characterization of the transgene expression generated by branched and linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles in vitro and after intraperitoneal injection in vivo, *Journal of Controlled Release*, 130, 129–138.
- 69) CANINE, B.F., WANG, Y., HATEFI, A., 2008, Evaluation of the effect of vector architecture on DNA condensation and gene transfer efficiency, *Journal of Controlled Release*, 129, 117–123.
- 70) NAMGUNG, R., NAM, S., KIM, S.K., SON, S., SINGHA, K., KWON, J.S., AHN, Y., JEONG, M.H., PARK, I.K., GARRIPELLI, V.K., JO, S., KIM, W.J., 2009, An acid-labile temperature-responsive sol–gel reversible polymer for enhanced gene delivery to the myocardium and skeletal muscle cells, *Biomaterials*, 30, 5225–5233.
- 71) http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/transcription_translation/index.htm, [Ziyaret Tarihi: 24.08.2012]
- 72) ALARCON, C.D.L.H., ALEXANDER, C., PENNADAM, S., 2005, *Stimuli responsive polymers for biomedical applications*, Chemical Society Reviews, 34, 276–285.
- 73) MOSELHY, J., VIRA, T., LIU, F.F., WU, X.Y., 2009, Characterization of complexation of poly(N-isopropylacrylamide-co-2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) thermoresponsive cationic nanogels with salmon sperm DNA, *International Journal of Nanomedicine*, 4, 153–164.
- 74) YOKOYAMA M., 2002, Gene delivery using temperature-responsive polymeric carriers, *Drug Discovery Today*, 7, 426.
- 75) OSADA, K., CHRISTIE, R.J., KATAOKA, K., 2009, Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery, *Journal of the Royal Society Interface*, 6, 325–339.

- 76) LIN, S., DU, F., WANG, Y., JI, S., LIANG, D., YU, L., LI, Z., 2008, An Acid-Labile Block Copolymer of PDMAEMA and PEG as Potential Carrier for Intelligent Gene Delivery Systems, *Biomacromolecules*, 9, 109–115.
- 77) SHEN, Y., TANG, H., ZHAN, Y., KIRK, E.A.V., MURDOCH, W.J., 2009, Degradable Poly(β -aminoester) Nanoparticles for Cancer Cytoplasmic Drug Delivery, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, 192-201.
- 78) ZUGATES, G.T., ANDERSON, D.G., LITTLE, S.R., LAWHORN, I.E.B., LANGER, R., 2006, Synthesis of Poly(β -aminoester)s with Thiol-Reactive Side Chains for DNA Delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 12726-12734.
- 79) KIM, T., SEO, H.J., CHOI, J.S., YOON, J.K., BAEK, J., KIM, K., PARK, J.S., 2005, Synthesis of Biodegradable Cross-linked Poly(β -aminoester) for Gene Delivery and Its Modification, Inducing Enhanced Transfection Efficiency and Stepwise Degradation, *Bioconjugate Chem.*, 16, 1140-1148.
- 80) JEONG, J.H., KIM, S.W., PARK, T.G., 2007, Molecular Design of Functional Polymers for Gene Therapy, *Prog. Polym. Sci.*, 32, 1239-1274.
- 81) ANDERSON, D.G., LYNN, D.M., LANGER, R., 2003, Semi-Automated Synthesis And Screening Of A Large Library Of Degradable Cationic Polymers For Gene Delivery, *Angewandte Chemie*, 115, 3261 – 3266.
- 82) CHO, Y.W., HAN, S.S., KO, S.W., 2000, PVA Containing Chito-Oligosaccharide Side Chain, *Polymer*, 41, 2033-2039.
- 83) OPANASOPIT, P., SAJOMSANG, W., RUKTANONCHAI, U., MAYEN, V., ROJANARATA, T., NGAWHIRUNPAT, T., 2008, Methylated N-(4-pyridylmethyl) Chitosan as a Novel Effective Safe Gene Carrier, *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 127-134.
- 84) KIM, T.H., JIANG, H.L., JERE, D., PARK, I.K., CHO, M.H., NAH, J.W., CHOI, Y.J., AKAIKE T., CHO, C.S., 2007, Chemical Modification of Chitosan as a Gene Carrier In Vitro and In Vivo, *Prog. Polym. Sci.*, 32, 726-753.
- 85) VLERKEN, L.E., VYAS, T.K., AMIJI, M.M., 2007, Poly(ethylene glycol)-Modified Nanocarriers for Tumor Targeted and Intracellular Delivery, *Pharmaceutical Research*, 24 (8), 1405-1414.
- 86) LI, T., SHI, X.W., DU, Y.M., TANG, Y.F., 2007, Quaternized Chitosan/Alginate Nanoparticles for Protein Delivery, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, DOI 10.1002/jbm.a.

- 87) XU, Y., DU, Y., 2002, Effect of Molecular Structure of Chitosan on Protein Delivery Properties of Chitosan Nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 215-226.
- 88) LI, Z.T., GUO, J., ZHANG, J.S., ZHAO, Y.P., LV, L., DING, C., ZHANG, X.Z., 2010, Chitosan-Graft-Poly(ethylene imine) with improved Properties as a Potential Gene Vector, *Carbohydrate Polymers*, 80, 254-259.
- 89) MAO, H.Q., ROY, K., TROUNG-LE, V.L., JANES, K.A., LIN, K.Y., WANG, Y., AUGUST, J.T., LEONG, K.W., 2001, Chitosan-DNA Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency, *Journal of Controlled Release*, 70, 399-421.
- 90) MENG, F., HENNINK, W.E., ZHONG Z., 2009, Reduction-Sensitive Polymers And Bioconjugates For Biomedical Applications, *Biomaterials*. 30, 2180–2198.
- 91) JERE, D., AROTE, R., JIANG, H.L., KIM, Y.K., CHO, M.H., CHO, C.S., 2009, Bio reducible Polymers for Efficient Gene and siRNA Delivery, *Biomed. Mater.*, DOI: 10.1088/1748-6041/09/025020
- 92) DAI, F., SUN, P., LIU, Y., LIU, W., 2010, Redox Cleavable Star Cationic PDMAEMA By Arm-First Approach of ATRP as a Nonviral Vector for Gene Delivery, *Biomaterials*, 31, 559-569.
- 93) GUO, K., CHU, C.C., CHKHAIDE, E., KATSARAVA, R., 2005, Synthesis and Characterization of Novel Biodegradable Unsaturated Poly(ester amide)s, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 43, 1463–1477
- 94) ZHONG, Z., SONG, Y., ENGBERSEN, J.F.J., LOK M.C., HENNINK, W.E., FEIJEN, J., 2005, A versatile family of degradable non-viral gene carriers based on hyperbranched poly(ester amine)s, *Journal of Controlled Release*, 109, 317-329.
- 95) MIDOUX, P., PICHON, C., YAOUANC, J.J., JAFFRES, P.A., 2009, Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers, *British Journal of Pharmacology*, 157, 166-178.
- 96) ANDERSON, D., AKINC, A., HOSSAIN, N., LANGER, R., 2004, Structure/Property Studies of Polymeric Gene Delivery Using a Library of Poly(β -aminoester)s, *Molecular Therapy*, 11 (3), 426-434.
- 97) KIM, T., OU, M., LEE, M., KIM, S.W., 2009, Arginine-grafted bio reducible poly(disulfide amine) for gene delivery systems, *Biomaterials*, 30, 658-664.

- 98) VEISEH, O., KIEVIT, F.M., GUNN, J.W., RATNER, B.D., ZHANG, M., 2009, A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells. *Biomaterials*, 30, 649-657.
- 99) KO, Y.T., KALE, A., HARTNER, W.C., STERNBERG, B.P., TORCHILIN, V.P., 2009, Self-assembling micelle-like nanoparticles based on phospholipid-polyethyleneimine conjugates for systemic gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 133, 132-138.
- 100) GREEN, J.J., SHI, J., CHIU, E., LESHCHINER, E.S., LANGER, R., ANDERSON, D.G., 2006, Biodegradable Polymeric Vectors for Gene Delivery to Human Endothelial Cells, *Bioconjugate Chem.*, 17, 1162-1169.
- 101) WIELAND, J.A., HOUCHIN-RAY, T.L., SHEA, L.D., 2009, Non-viral vector delivery from PEG-hyaluronic acid hydrogels, *Journal of Controlled Release*, 120, 233-241.
- 102) OU, M., WANG, X.L., XU, R., CHANG, C.W., BULL, D.A., KIM, S.W., 2007 Novel Biodegradable Poly(disulfide amine)s for Gene Delivery with High Efficiency and Low Cytotoxicity, *Bioconjugate Chem.*, 19, 626-633
- 103) XU, F.J., LI, H., LI, J., ZHANG, Z., KANG, E.T., NEOH, K.G., 2008, Pentablock copolymers of poly(ethylene glycol), poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery, *Biomaterials*, 29, 3023-3033
- 104) LIANG, B., HE, M.L., XIAO, Z.P., LI, Y., CHAN, C., KUNG, H.F., SHUAI, X.T., PENG, Y., 2008, Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367, 874-880.
- 105) YANG, C., LI, H., GOH, S.H., LI J.: Cationic star polymers consisting of a-cyclodextrin core and oligoethylenimine arms as nonviral gene delivery vectors. *Biomaterials*. 2007 Mar; 28, 3245-3254
- 106) HUANG, M., KHOR, E., LIM, L.Y., 2004, Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation, *Pharmaceutical Research*, 21 (2), 344-353.
- 107) PAZ L.E.C., RESIN, A., HOWARD, K.H., SUTHERLAND, D.S., WEJSE, P.L., 2011, Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus Mutans Biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (11), 3892-3895.

- 108) WANG, J., GAO, S.J., ZHANG, P.C., WANG, S., MAO, H.Q., LEONG, K.W., 2004, Polyphosphoramidate gene carriers: effect of charge group on gene transfer efficiency, *Gene Therapy*, 11, 1001–1010.
- 109) LUTEN, J. , STEENIS, J.H., SOMEREN, R., KEMMINK, J., NIEUWENBROEK, N.M.E.S. , KONING, G.A., CROMMELIN, D.J.A., NOSTRUMA, C.F., HENNINK, W.E., 2003, Water-soluble biodegradable cationic polyphosphazenes for gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 89, 483–497
- 110) ZELIKIN, A.N., PUTNAM, D., SHASTRI, P., LANGER, R., IZUMRUDOV, V.A., 2002, Aliphatic Ionenenes as Gene Delivery Agents: Elucidation of Structure-Function Relationship through Modification of Charge Density and Polymer Length, *Bioconjugate Chem.*, 2002 Mar; 13, 548-553
- 111) IHM, J.E., HAN, K.O., HAN, I.K., AHN, K.D., HAN, D.K., CHO, C.S., 2003, High Transfection Efficiency of Poly(4-vinylimidazole) as a New Gene Carrier, *Bioconjugate Chem.*, 14, 707-708.
- 112) NASTI, A., ZAKI, N.M., LEONARDIS, P., UNGPHAIBOON, S., SANSONGSAK, P., RIMOLI, M.G., TIRELLI, N., 2009, Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-Hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation, *Pharmaceutical Research*, 26 (8), 1918-1930.
- 113) GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C., MCCARRON P., 2005, Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan-TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44, 65-73.
- 114) TURAN, K., NAGATA, K., 2006, Chitosan-DNA Nanoparticles: The Effect of Cell Type and Hydrolysis of Chitosan on In Vitro DNA Transfection, *Pharmaceutical Development and Technology*, 11:503–512
- 115) SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 3*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, ISBN: 0-87969-576-5
- 116) REUL, R., NGUYEN, J., BIELA, A., MARXER, E., BAKOWSKY, U., KLEBE, G., KISSEL, T., 2012, Biophysical and Biological Investigation of DNA Nano-Complexes with a Non-Toxic, Biodegradable Amine-Modified Hyperbranched Polyester, *Pharmaceutical Nanotechnology*, 436, 97-105.

- 117) POTINENI, A., LYNN, D.M., LANGER, R., AMIJI, M.M., 2003, Poly(ethylene oxide) Modified Poly(β -amino ester) Nanoparticles as a pH-Sensitive Biodegradable System for Paclitaxel Delivery, *Journal of Controlled Release*, 86, 223-234.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : MEHMET KORAY GÖK
Doğum Tarihi ve Yeri : 1983 / İSTANBUL
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mkgok@istanbul.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y.Lisans	Kimya Müh.	İ.Ü. Fen Bilimleri Enst.	2008
Lisans	Kimya Müh.	İstanbul Üniversitesi	2005
Lise	Fen Bilimleri	Adnan Menderes And.Lisesi	2000

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2006 Aralık-Devam Ediyor	İstanbul Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2005 Haziran-2006 Aralık	Mehmetoğlu Gıda Tic.Ltd.	Sorumlu Müdür

Yüksek Lisans Tezi

M.K. Gök, S. Pabuccuoğlu (Danışman) “*Nişasta Esaslı Biyouyumlu Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu*”, İ.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü, tamamlanmıştır, Ocak 2008.

Tez, aşağıda belirtilen patent kapsamındaki çalışmaların bir kısmını içerdiğinden, “551 sayılı Patent Haklarının Korunması Hakkında Kanun Hükmünde Kararname”ye göre patent başvurusunun yapıldığı 20.03.2012 tarihine kadar yayınlanmamıştır. YÖK dökümantasyon merkezine de 12.02.2014 tarihine kadar sınırlama için bildirilmiştir.

Patent

Buluş başlığı:

“Nişasta esaslı biyoyapışabilen polimerlerin sentezi ve ilaç taşıyıcı sistemlerde uygulamaları” Başvuru tarihi: 20.03.2012; Başvuru numarası: 2012/03191 ve Evrak No: 2012-G-91259 ile TPE’ne başvuru yapılmıştır. TPE’nin 08.05.2012 tarihli ve 2012/03191 sayılı yazısı ile uygun bulunmuştur. EPO’ne başvuru süreci devam etmektedir.

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlar

1-S. Özgümüş, **M. K. Gök**, A.Bal, G. Güçlü, “*Study on a novel exfoliated polyampholyte nanocomposite hydrogels based on acrylic monomers and Mg-Al-Cl layered double hydroxide: Synthesis and characterization*”, Chemical Engineering Journal, yayınlanmak üzere gönderilmiştir, revizyon aşamasındadır, Ekim 2012.

Ulusal Bildiriler

- 1- **M. K. Gök**, S. Pabuccuoğlu “Gen Transferinde Nanoteknoloji” Nanoteknoloji Günleri Kitaplığı sayfa 55-61, Kocaeli Üniversitesi ve KMO Kocaeli Şubesi, 7-8 Mayıs 2011, İzmit. (Davetli Konuşmacı)
- 2- B. Özkahraman, I. Acar, **M. K. Gök**, G. Güçlü, “Sıcaklığa Duyarlı N-Vinilkaprolaktam Mikrojellerinin Sentezi ve Karakterizasyonu" XXVI. Ulusal Kimya Kongresi, 1-6 Ekim 2012, Muğla Üniversitesi, Muğla.
- 3- A. Bal, B. Özkahraman, **M. K. Gök**, I. Acar, “Sodyum Akrilat Esaslı Hidrojel ve Krijojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu" XXVI. Ulusal Kimya Kongresi, 1-6 Ekim 2012, Muğla Üniversitesi, Muğla.
- 4- A. Bal, **M. K. Gök**, G. Güçlü, S. Pabuccuoğlu, “Mg-Al-LDH İçeren Akrilik Monomer Esaslı Yeni Nanokompozit Hidrojellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Davranışlarının İncelenmesi” 4. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 5-8 Eylül 2012 Çanakkale.
- 5- G. Çöle, **M. K. Gök**, G. Güçlü, “N-Vinil Prolidon-İtakonik Asit /Organo Kil Nanokompozit Hidrojelleri İle Sulu Çözeltilerden Safranin-T Katyonik Boyar Maddesinin Uzaklaştırılması” 4. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi 5-8 Eylül 2012 Çanakkale.

6- G. Çöle, **M. K. Gök**, G. Güçlü, “N-Vinil Pirolidon-İtakonik Asit /Organo Kil Nanokompozit Hidrojelleri İle Sulu Çözeltilerden Brilliant Cresyl Blue Uzaklaştırılması” 4. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi 5-8 Eylül 2012 Çanakkale.

Projeler

Yürütücü Olarak Görev Aldığı Proje

1- **M. K. Gök**, S. Pabuccuoğlu (Danışman), Proje No:7383, Doktora Tez Projesi, “Doğal ve Sentetik Biyouyumlu Polimerik Nanopartiküler Gen Taşıyıcı Sistemlerin Elde Edilmesi ve Transfeksiyon Etkinliğinin İncelenmesi” Başlama Tarihi: Mayıs 2010 devam etmektedir.

Yardımcı Araştırmacı Olarak Görev Aldığı Projeler

Devam Eden Projeler

Uluslararası

1. M. Simionescu (Project Consortium Coordinator) “Nanoparticles designed to target chemokine-related inflammatory processes in vascular diseases and cancer metastasis and implementation of a biosensor to diagnose these disorders, Nanodiater”, European Innovative Research & Technological Development Projects in Nanomedicine within the framework of the ERA-NET, EuroNanoMed, Call 2 for European Innovative RTD Projects in Nanomedicine, Kabul tarihi:18 November, 2010, Başlama tarihi: Mayıs 2011 devam etmektedir.

Ulusal

1-E. Cevher, A. Araman, S. Pabuccuoğlu, S. Güngör, A. Yıldız, A. Açma, **M. K. Gök**,”Kan dolaşımında uzun süre kalabilen polimerik yapıdaki nanopartiküllerin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve hedeflendirilmesi”, Proje no: 111S001, SBAG-ERANET-6, TUBİTAK, Mart 2011.

2- S. Pabuccuoğlu, **M. K. Gök**, K. Demir, Ü.Cirit, E.Cevher, Y.Ö. Erginer, S. Bacinoğlu, S. Pabuccuoğlu, Patent Proje No: 8585, “Nişasta Esaslı Biyoadesif Polimerlerin Sentezi ve İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanımı, İ.Ü.Rektörlüğü Bilimsel

Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başlama tarihi: Kasım 2010, devam etmektedir.

Tamamlanan Projeler

Ulusal

1- S. Pabuccuoğlu, **M. K.Gök**, S. Pabuccuoğlu, S. Bacınoğlu, Ü.Cirit, Y.Ö., Erginer, E.Cevher, Proje No: 594/15122006, Normal Kapsamlı Proje, “Nişasta Esaslı Mukozoya Yapışabilir Polimerler: Sentezi, Karakterizasyonu ve Koyunlarda Östrus Senkronizasyonu Amaçlı Vajinal Yolla Kontrollü Progesteron Salımında Kullanılabilirliğinin İncelenmesi”, İ.Ü.Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri, tamamlanmıştır, Şubat 2010.

2- S. Pabuccuoğlu, G.Güçlü, **M. K. Gök**, Proje No: 6940, YÖP (Yayın Ödül Projesi) “Sentetik veya Doğal Polimer Esaslı Yeni Jellerin Üretimi, Isıl, Mekanik, Biyoyapışabilme Davranışlarının İncelenmesi ve Uygulamaları” İ.Ü.Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, tamamlanmıştır, Mayıs 2012.