

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STEARAMİD BAZLI NANOPARTİKÜL SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE
FİBROBLAST HÜCRELERİNE IN VITRO GEN TRANSFEKSİYONUNDA
KULLANILMASI**

FUNDA ALKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. NELİSA TÜRKOĞLU**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STEARAMİD BAZLI NANOPARTİKÜL SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE
FİBROBLAST HÜCRELERİNE IN VITRO GEN TRANSFEKSİYONUNDA
KULLANILMASI**

Funda ALKAN tarafından hazırlanan tez çalışması 11.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK
Hacettepe Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, her konuda yardımını ve ilgisini benden esirgemeyen değerli hocam tez danışmanım Doç. Dr. Nelisa LAÇIN TÜRKOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca ihtiyacım olan her anımda yanımda olan, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, ilgi ve alakasıyla desteğini her koşulda hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana karşı sabırlı olan ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Alican ZAMAN'a

Bu süreçte desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, her zorluğu beraber aştığımız değerli laboratuvar arkadaşlarım Sevgi VARLI ve Volkan YALMAN'a;

Sonsuz sabrı, ilgisi ve sevgisiyle beni hiç yalnız bırakmayan, karşılaştığım her zorluk karşısında beni cesaretlendiren ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim canım arkadaşım Esat ÇANDIR'a

Hayatımın her anında maddi ve manevi olarak yanımda olan, her kararımda beni destekleyen, bana güvenen ve benimle gurur duyan, sevgilerini benden eksik etmeyen başta ikizim Filiz ALKAN olmak üzere tüm aileme;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2018

Funda ALKAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Gen Aktarımı	6
2.1.1 Viral Vektörler.....	6
2.1.1.1 Retrovirüsler.....	7
2.1.1.2 Lentivirüsler.....	7
2.1.1.3 Adenovirüsler	7
2.1.1.4 Adeno ilişkili Viral Vektörler	8
2.1.1.5 Herpes Virüsleri (HSV-1).....	8
2.1.2 Non Viral Vektörler	9
2.2 Gen Taşıyıcısı Olarak Nanopartiküler Sistemler	10
2.2.1 Polimerik Nanopartiküller	11
2.2.1.1 Biyobozunur Polimerler	12
2.2.1.2 Biyobozunur Olmayan Polimerler	13
2.2.1.3 Polimer Degradasyonu	14

2.2.2	Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)	15
2.3	Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	16
2.3.1	Emülsiyon-Çözücü Evaporasyon Yöntemi	16
2.3.2	Çift Emülsiyon ve Evaporasyon Yöntemi	17
2.3.3	Salting-Out Yöntemi	17
2.3.4	Emülsiyon-Difüzyon Yöntemi	17
2.3.5	Çözücü Yer Değişimi / Çöktürme Yöntemi	18
2.4	Nanopartikül Karakterizasyonu	19
2.4.1	Parçaçık Boyutu	19
2.4.1.1	Dinamik ışık saçılması (DLS)	20
2.4.1.2	Tarama Elektron mikroskopisi (SEM)	20
2.4.1.3	İletim elektron mikroskopu (TEM)	21
2.4.1.4	Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)	21
2.4.2	Yüzey Yükü	22
2.4.3	Yüzey Hidrofobikliği	23
2.5	Nanopartikül Yüzey Modifikasyonları	23
2.6	Kök Hücreler	24
2.6.1	Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök Hücreler	25
2.6.1.1	Totipotent Kök Hücreler	25
2.6.1.2	Pluripotent Kök Hücreler	25
2.6.1.3	Multipotent Kök Hücreler	26
2.6.1.4	Oligopotent Kök Hücreler	26
2.6.1.5	Unipotent Kök Hücreler	26
2.6.2	Elde edildiği Kaynağa Göre Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	27
2.6.2.1	Embriyonik Kök Hücreler	27
2.6.2.2	Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	27

BÖLÜM 3

MATERYAL METOD	29
3.1 Kullanılan Sarf Malzemeler	29
3.2 Kullanılan Kitler	31
3.3 Kullanılan Cihazlar	31
3.4 Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc Gen Bölgelerinin İçeren Plazmidin Çoğaltılması Saflaştırılması	36
3.5 Nanopartikül Sentezi.....	37
3.6 Nanopartikül Karakterizasyonu	39
3.7 Nanopartikül/Plazmit Konjugatının Zeta Potansiyel Yükünün ve Partikül Boyutunun Ölçülmesi	40
3.8 Plazmid DNA'nın Nanopartikül Konjugatı ile L929 Hücrelerine Transfeksiyonu	41
3.9 Nanopartikül-Plazmid Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	42
3.9.1 Floresan mikroskop ile GFP ekspresyonunun takibi.....	42
3.9.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi.....	43
3.10 Transfekte Olmuş Hücrelerin Matrijele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi	44

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	45
4.1 Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc Gen Bölgelerinin İçeren Plazmidin Çoğaltılması Saflaştırılması	45
4.2 Nanopartikül Karakterizasyonu	47
4.3 Nanopartikül/Plazmit Konjugatının Zeta Potansiyel Yükünün ve Partikül Boyutunun Ölçülmesi	51
4.3.1 SSLN'nin in vitro sitotoksitesinin değerlendirilmesi	52
4.4 Saflaştırılan Plazmidlerin Nanopartikül Konjugatı ile L929 Fibroblast Hücre Hattına Transfeksiyonu	53
4.5 Nanopartikül-Plazmid Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	54
4.5.1 GFP Işımasının Takip Edilmesiyle Transfeksiyon Verimliliğinin Değerlendirilmesi	54
4.5.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi.....	55
4.5.3 cDNA eldesi ve RT-qPCR	56
4.6 Transfekte Olmuş Hücrelerin Matrijele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi	58
4.7 Tartışma	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	67

SİMGE LİSTESİ

ϵ	Dielektrik sabiti
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santrigrat derece
η	Viskozite
ζ	Zeta potansiyel

KISALTMA LİSTESİ

AAV	Adeno-assosiye virüs
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi
c-DNA	Tamamlayıcı DNA
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medyum
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	Di ThioThreitol
EKH	Erişkin Kök Hücreler
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GFP	Yeşil Floresan Protein
HKH	Hematopoietik Kök Hücre
HSV	Herpes Virüsü
KLN	Katı Lipid Nanopartikül
KKLN	Katyonik Katı Lipid Nanopartikül
LB	Luria- Bertani
LBG	Luria- Bertani + %2 Gliserol
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MPS	Mononuclear phagocyte system
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MTT	Metil Tiazolil Difeniltetrazolium Bromid

m-RNA	Mesajcı RNA
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Buffered Saline
PCS	Photon
PEG	Polietilen Glikol
PEO	Polietilen Oksit
PHB	Poli (β -hidroksibutirat)
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit)
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPM	Revolutions per Minute
SAS	Supercritical Anti-Solvent
SEM	Scanning Electron Microscopy
TEM	Transmission Electron Microscopy
UPKH	Uyarılmış Pluripoten Kök Hücre

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Gen taşıma amaçlı kullanılan fiziksel yöntemler	9
Şekil 2.2 Kimyasal taşıyıcıların şematik gösterimi	10
Şekil 2.3 Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi	12
Şekil 2.4 Kök hücre bölünme şekilleri.....	25
Şekil 3.1 Plazmid haritası	36
Şekil 3.2 Stearamide kimyasal yapısı	37
Şekil 3.3 Setil piridinyum klorid kimyasal yapısı	38
Şekil 3.4 Nanopartikül sentez aşamaları	38
Şekil 3.5 Zetasizer’da zeta potansiyeli ölçüm yönteminin şematik görüntüsü	41
Şekil 4.1 Amfisilinli besiyerinde çoğalan bakteri kolonileri	46
Şekil 4.2 Plazmid DNA Agaroz jel görüntüsü	47
Şekil 4.3 Katyonik nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü	48
Şekil 4.4 Stearamid: Setil piridinyum bazlı nanopartiküllerin in vitro sitotoksikite sonuçları	52
Şekil 4.5 Transfekte olmuş L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri	54
Şekil 4.6 mRNA jel görüntüsü	56
Şekil 4.7 Klf4(Kırmızı) , Sox2(Mor), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri amplifikasyon grafiği ..	57
Şekil 4.8 Klf4(Kırmızı) , Sox2(Mor), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri erime eğrisi.....	57
Şekil 4.9 Oct4, Sox2, Klf4, v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan plazmid DNA/SSLN konjugatı ile ile transfekte edilmiş L929 fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüleri	59

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 4.1 Stearamid bazlı nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri	49
Çizelge 4.2 Nanopartikül/plazmid DNA konjugatlarının partikül büyüklükleri ve zeta potansiyeli	51

**STEARAMİD BAZLI NANOPARTİKÜL SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE
FİBROBLAST HÜCRELERİNE IN VITRO GEN TRANSFEKSİYONUNDA
KULLANILMASI**

Funda ALKAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Eş Danışman: Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH); hastalık modellemesi, ilaç taraması gibi amaçlarla rejeneratif tıpta kullanılmak üzere diğer kök hücrelere alternatif olarak tercih edilmektedir. Otolog somatik hücrelerden UPK hücreleri elde edilirken önceki literatür çalışmaları incelendiğinde daha çok viral vektörlerin kullanıldığı gözlemlenmektedir. Viral vektörlerin kullanımıyla elde edilen UPK hücrelerinin klinikte kullanımı immün cevap problemleri ve tümör oluşma riskleri sebebi ile sınırlı kalmaktadır. Yeniden programlama teknolojisindeki gelişmeler sayesinde viral vektörler yerine kullanılabilen non viral vektör sistemleri geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bizim bu çalışmada amacımız UPK hücrelerinin elde edilmesi için viral olmayan bir vektör sisteminin geliştirilmesi ve transfeksiyon çalışmalarında verimli bir şekilde kullanılması amacıyla özelliklerinin optimize edilmesidir.

Bu çalışmada katı lipid nanopartikül sınıfına dahil katyonik stearamid setilpridinyum klorid lipid nanopartiküller (SSLN) çözücü difüzyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Sentezlenen nanopartikül sistemi; yeşil floresan proteini (GFP), Oct3/4, Sox2, Klf4 ve v-Myc genlerini kodlayan plazmidin fibroblast hücrelerine aktarılması için kullanılacaktır. Plazmid-stearamid nanopartikül kompleksinin düşük sitotoksosite göstermesi ve makrofaj alımını engelleyecek boyutta olabilmesi için zeta potansiyeli ve partikül boyutu üzerine optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Plazmid stearamid nanopartikül

kompleksinin sitotoksosite alışmaları L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde yapılmıştır. Daha sonra plazmid stearamid nanopartikül kompleksi kullanılarak fibroblast hücrelerinin transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve transfeksiyon verimi floresan ataçmanlı inverted mikroskopu ile 4 gün boyunca GFP ekspresyonunun takip edilmesiyle belirlenmiştir.

UPK hücre belirteçleri arasında yer alan Oct3/4, Sox2, Klf4 ve v-Myc genlerinin ekspresyonu RT-qPCR ile belirlenmiştir. Elde edilen kök hücreler diyabette yara iyileşmesi, kardiyolojik hastalıklar, sinir doku mühendisliği gibi biyomühendislik ve tıp alanlarında karşılaşılan ciddi problemlere çözüm olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: yeniden programlanmış hücreler, kök hücre, katyonik nanopartikül, stearamid



ABSTRACT

PREPARATION OF STEARAMIDE-BASED NANOPARTICLE SYSTEMS AND USING IN VITRO GENE TRANSFECTION OF FIBROBLAST CELLS

Funda ALKAN

Department of Molecular Biology and Genetic

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Nelisa Türkoğlu

Co-Adviser: Assoc. Prof. Murat DEMİRBİLEK

Induced pluripotent stem cells (IPSC) are preferred as an alternative source in regenerative medicine, disease modeling and drug screening thanks to their unique properties compared to other stem cells. As seen from the previous studies in the literature, most of the vector systems used for transfection of somatic cells to obtain IPSC are viral-based. The application of IPSC derived via viral vector systems, are limited due to immune response and tumor formation.

The aim of this study is to develop a non viral vector system for transfection of Yamanaka factors and to obtain IPSC. In this study, SLNP synthesis conditons in order to obtain high transfection efficacy were studied.

In this study, cationic stearamide cetylpyridium chloride lipid nanoparticles (SCLN) which are in solid lipid nanoparticle class are prepared via solvent diffusion method. The obtained NP system is going to be used for the delivery of plasmid encoding Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc and GFP to fibroblast cell line. Optimization studies on zeta potential and particle size have been performed in order to achieve low cytotoxicity and to eliminate macrophage clearance. Cytotoxicity studies for the plasmid/stearamide nanoparticle conjugate have been performed via L929 cell line.

Later, transfection of fibroblast cells has been carried out by using plasmid stearamide nanoparticle complex and the transfection efficiency was observed by following GFP expression with the inverted fluorescent microscope for 4 days.

The expression of the Oct3 / 4, Sox2, Klf4 and v-Myc genes which are IPS cell markers were determined by RT-qPCR. The stem cells are promising cells and seem as a solution for serious problems encountered in medical fields and bioengineering such as wound healing in diabetes, cardiological diseases and nerve-tissue engineering.

Keywords: reprogrammed cells, stem cell, cationic nanoparticle, stearamide



1.1 Literatür Özeti

Günümüzde birçok hastalığın tedavisi için kök hücrelerin kullanımı oldukça umut vaat edicidir. Otolog somatik hücrelerin yeniden programlanması ile elde edilen kök hücrelerin tedavi amaçlı kullanımı, klinik uygulamalarda hastada immün yanıt oluşturmaması ile büyük avantaj sağlamaktadır. Laboratuvar ortamında somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin bu amaçla kullanılması oldukça popülerdir. Çünkü, aktarılan genlerle hücreler kazandığı özellik sayesinde, hemen hemen birçok somatik hücre türüne dönüşebilme yeteneğine sahip olmaktadır.

UPK hücrelerin elde edilmesi için gen taşıyıcısı olarak viral ve non viral vektörlerden yararlanılmaktadır. En sık uygulanan viral vektörler Adeno-assosiyasyon virüsü, retrovirüs, adenovirüs ve herpesvirüs vektörleridir. Viral vektörlerin immünojenik cevap oluşturmaması, düşük yükleme kapasitesi, büyük ölçekli üretim ve kalite kontrolü gibi dezavantajları, gen taşınımı uygulamalarında kullanımını sınırlamıştır. Non viral vektörlerin ise transfeksiyon verimliliği ve gen ekspresyon seviyeleri, viral vektörlere oranla düşüktür. Ancak sentez kolaylığı, hücre/doku hedefleme, düşük immünojenite ve büyük ölçekli üretim kolaylığı gibi birçok avantajı vardır. Son yıllarda, gelişen vektör teknolojisiyle birlikte transfeksiyon verimliliği viral vektörlere benzer olan nonviral vektörler üretilmiştir [1], [2].

Viral olmayan gen taşınmasına yönelik iki temel yaklaşım, nükleik asitlerin katyonik lipidler (lipopleksler) veya katyonik polimerler (polipeksler) ile kombinasyonunu içerir. Polikatifonik vektörler, hedef dokuya terapötik ajanların/genetik materyallerin

ulaştırılmasında vazgeçilmezdir. Katyonik polimerler, elektrostatik etkileşimler sayesinde negatif yüklü plazmid DNA'yla biraraya gelerek konjugat oluşturur. Bu yetenekleri sayesinde katyonik polimerler viral olmayan vektörler arasında gittikçe daha popüler hale gelmiştir. Dahası pozitif yüklü bu polimerler, DNA'yı enzimatik bozulmadan korurlar, DNA'yı nanopartiküllere yoğunlaştırarak transfeksiyonu kolaylaştırırlar ve hücre alımını ve endolizozomal kaçışını kolaylaştırırlar [3].

Nanopartiküller (NP) katı koloidal parçacıklardır. Hazırlama işlemine bağlı olarak nanoküre ve nanokapsül yapısında iki tür nanopartikül üretilir. Nanoküreler etken maddenin yüze ye dağıtıldığı veya adsorbe edildiği monolitik bir yapıya sahiptir. Nanokapsüller ise etken madde çekirdeğe gömülü veya membran duvar yapısının dış yüzeylerine emdirilmiş şekildedir [2], [4]. Bunlara ek olarak geliştirilen katı lipid nanopartiküller ise fizyolojik olarak iyi tolere edilebilen bileşiklerden oluşur, büyük ölçüde kolayca üretilir, dondurarak kurutma ve saklama olanağına sahiptirler. Sterilize edilebilirler ve intravenöz olarak enjekte edildiklerinde düşük sitotoksinite gösterirler. Katı lipid nanopartiküller mikrovasküler sisteme geçebilecek ve makrofaj alımını engelleyecek kadar küçüktür. Partiküllerin yüzeylerine ligandlar eklenerek veya manyetik yönlendirme kullanılarak istenilen bölgeye hedefleme de mümkündür [5].

Pozitif yüklü nanopartiküller ise elektrostatik etkileşimlerle negatif yüklü DNA'yla biraraya gelerek etkileşir ve kompleks bir yapı oluşturur. Ayrıca yüksek zeta potansiyeline sahip nanopartikül sistemlerinde, elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali de daha azdır [3], [6], [7]. Nanopartiküllerin yüzey yükü, biyolojik evre ile olan etkileşimini ve biyoaktif bileşiklerle olan elektrostatik etkileşimini belirlemesinden ötürü çok önemlidir. Koloidal stabilite, nanopartiküllerin zeta potansiyeli ile analiz edilir. Partiküllerin boyutunu, zeta potansiyelini bulmak için Zetasizer cihazı kullanılacaktır. Zetasizer cihazı, belirli bir potansiyel altında hareketi sağlanan tanelerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplamaktadır. Zeta potansiyelinin ölçümü, koloidal dispersiyonun depolama kararlılığı hakkında öngörüler sağlar. Kararlılığı sağlamak ve parçacıkları bir araya getirmekten kaçınmak için, pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyel değerlerine ulaşılmalıdır. Zeta potansiyeliyle partiküller arası itme- çekme kuvveti belirlenir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli genellikle nanopartiküllerin yüzey yük özelliklerini

karakterize etmek için kullanılır. Partiküllerin elektriksel potansiyellerini ifade eder ve partiküllerin kompozisyonundan ve disperse edildiği ortamdan etkilenir. Hücresel membranlar çoğunlukla negatif yüklü olduğundan katyonik olan nanopartiküller membranlardan geçme eğilimindedir. Partikül yüzeyinin yükü hedeflendirme ve klerens açısından da oldukça önemli bir role sahiptir. Genel olarak negatif yüklü olan nanopartikül yüzeylerine opsoninler kolaylıkla adsorbe olur ve bu partiküllerin çok büyük bir kısmı retiküloendotelyal sistem makrofajları tarafından kan dolaşımından hızla uzaklaştırılır. Bu sebeple çalışmada sentezlenecek stearamid nanopartiküllerin zeta potansiyeli +30mV'u geçmeyecek şekilde pozitif yüklü olmasına dikkat edilecektir. Daha öne yapılan çalışmalarda, hazırlanan nanopartiküllerin pozitif yüklenmesi için katyonik sürfektantlardan cetyltrimethylammonium bromür; N,N-di-(b-steaorylethyl)-N,N-dimethylammonium klorür [8], polimerlerden kitosan [9] kullanılmıştır. Nanopartiküllerin hidrofobitesi biyouyumluluğu belirleyen önemli bir faktördür. Nanopartiküller intravenöz olarak verildiklerinde vücuttaki bağışıklık sistemleri tarafından kolaylıkla fark edilirler ve dolaşımdan temizlenirler. Nanopartiküllerin büyüklüğünün yanı sıra yüzey hidrofobitesi adsorbe edilen kan bileşenlerinin, çoğunlukla proteinler (opsoninler) miktarını belirler. Bunlar nanopartiküllerin in vivo kaderini belirler [3]. Bu opsoninlerin, nanopartiküllerin yüzeyine bağlanması, opsonizasyon olarak adlandırılır. Nanopartikül ve fagosit arasında bir köprü görevi görür. NP'ler kan dolaşımından çıkarıldığında özellikle karaciğer, dalak, akciğer ve kemik iliği gibi mononükleer fagositler sistemi (MPS) organlarından birinde tutulur. Çıplak nanopartiküllerin, MPS organlarındaki sekrestrasyonu çok hızlı, tipik olarak birkaç dakika civarındadır ve genellikle karaciğer ve dalakta yoğunlaşır. Dolayısıyla, kan proteinlerinin nanopartiküllerle etkileşiminin niteliksel ve niceliksel olarak anlaşılması için, yüzey modifikasyonu ile sirkülasyon süresi uzun nanopartiküllerin tasarlanması gerekir. Biyolojik olarak parçalanabilir ve uzun polimerik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu ile sağlanabilir [3].

Pluripotent kök hücreler temel olarak insan embriyo (embriyonik kök hücreler) ya da birincil indüklenen somatik hücreler (uyarılmış pluripoten kök hücreler)'den köken alabilir. Uyarılmış pluripoten kök hücre (UPKH)'ler insan ya da hayvan somatik hücrelerinin genetik olarak yeniden programlanmasıyla elde edilen yeni tip kök

hücrelerdir. Uyarılmış pluripoten kök hücrelerin ilk olarak 2006 yılında Takahashi ve ark.'nın [10] Oct4 , Sox2 , Klf4 , and c-Myc genlerini somatik hücrelere aktarması ve ekspresyonlarının sağlanması temelinde hücrelerin yeniden programlanmasıyla elde edilmiş ve daha sonra bu hücrelerin primer hücre tabakaları (ektoderm, mezoderm ve endoderm)'a dönüşebildiği ve diğer hücreler ile uyumlu olarak işlev gösterdikleri görülmüştür. Embriyonik hücrelerin sahip olduğu alıcı verici hücreler arasında oluşabilen immünolojik cevap ve etik problemlere karşı, uyarılmış pluripoten hücrelerin in vitro kültür ortamlarında hızlıca gelişebilen ve herhangi bir hücre tipine direk olarak dönüştürebilme özellikleri ile rejeneratif tıpta kullanımı açısından eşsiz potansiyellere sahiptir. Uyarılmış pluripoten hücreler hücre terapisi kapsamında klinik olarak çok yeni araştırmalara ve uygulamalara öncülük etmektedir, bu kapsamda uyarılmış pluripotent hücrelerin retina pigment epitel hücrelerine, A9 dopaminerjik nöron hücrelerine, pankreatik β -islet hücrelerine ve kalp kas hücrelerine dönüştürülmesine yönelik klinik faz çalışmaları devam etmektedir. Bu araştırmalara ek olarak yaşlanma-ilişkili maküler dejenerasyon, tip I diyabet, kalp krizi ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde uyarılmış pluripoten hücrelerin kullanımı konusunda birçok yeni araştırma devam etmektedir [11].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı pozitif yükü 20mV'un üzerinde, NP boyutu 150-200nm aralığında olan, daha önceki literatür çalışmaları incelendiğinde hiç kullanılmamış olan stearamid bazlı katyonik nanopartiküller üretmektir. Elde edilen NP ile somatik hücrelerden uyarılmış pluripotent kök hücresi elde edilmesi amacı ile Oct3/4, Sox2, Klf4 genlerini kodlayan Piggybac human 4-in 1 vektör L929 fibroblast hücrelerine aktarılacaktır.

1.3 Hipotez

Yapılan literatür taramalarında stearamid-bazlı nanopartiküllere rastlanmamıştır ve bu çalışmada stearamid nanopartiküller çözücü difüzyon yöntemi ile üretilecektir. Piggybac human 4-in 1 vektör-stearamid nanopartikül konjugatı ile sağlıklı bağ doku hücrelerine gen transferi yapılacaktır. Gen transferi sonucunda yeniden

programlanmış pluripotent kök hücreler elde edilecektir. Elde edilen kök hücreler diyabette yara iyileşmesi, kardiyolojik hastalıklar, sinir doku mühendisliği gibi biyomühendislik ve tıp alanlarında karşılaşılan ciddi problemlere çözüm olabilecektir.



2.1 Gen Aktarımı

Çıplak DNA, nükleazlar tarafından sindirilme ve hepatik alım klerensi (karaciger tarafından kan plazmasında bulunan yabancı bir maddenin arındırılması) nedeniyle intravenöz (damariçi) uygulamadan sonra hızla elimine olur. Bundan dolayı optimize DNA taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir [12]. Gen terapisi ilk olarak kalıtsal tek gen hastalıkları için bir tedavi olarak düşünülmüştür. Bugün; kanser[13], kardiyovasküler hastalıklar[14], nörodejeneratif bozukluklar[15] ve bulaşıcı hastalıklar[16] gibi sonradan kazanılmış hastalıklarda gen terapisi çalışmaları yapılmaktadır. Bu amaçla geliştirilen vektör sınıflarının her biri, uygulamalar için bir dizi farklı özellik ile karakterize edilerek uygun hale getirilir. Gen taşıyıcı sistemler genel olarak viral vektörler ve non viral vektörler olarak iki grupta incelenmektedir [17].

2.1.1 Viral Vektörler

Viral vektörler beş ana sınıfta incelenmektedir ve bu vektörler, genomlarının konak hücre kromatini ile bütünleşip kromozoma entegre olmasına (onkoretrovirüsler ve lentivirüsler) veya hücre çekirdeğinde baskın olarak ekstrakromozomal epizomlar olarak kalmasına (AAV'ler, adenovirüsler ve herpes virüsleri) göre iki grupta kategorize edilebilir. Bu ayrım, her bir vektörün belirli uygulamalar için uygunluğunun önemli bir belirleyicisidir; entegre olmayan vektörler, belirli koşullar altında, proliferasyon

hücrelerdeki kalıcı transgen ekspresyonuna aracılık edebilir, fakat entegre vektörler, bölünen hücrelerde stabil genetik değişimin muhafaza edilmesi gerektiğinde tercih edilen araçlardır [17].

2.1.1.1 Retrovirüsler

Onkoretrovirüs vektörleri, bugüne kadar klinik çalışmalarda en yaygın kullanılan ve viral vektör sistemlerin geliştirilen ilk sınıfıdır. Çoğunlukla, farklılaşabilen hematopoetik kök hücrelerin ex vivo transdüksiyonu için tercih edilen vektörler olmuştur. Retroviral vektörlerin önemli bir sınırlaması, kas, beyin, akciğer ve karaciğer dokusunu oluşturan hücreler gibi bölünmeyen hücreleri enfekte edememesidir. Eğer nükleer membran bozulursa hücre çekirdeğine erişebilmektedirler. Bu nedenle sadece bölünen hücreleri transdükte edebilirler [18].

2.1.1.2 Lentivirüsler

Lentivirüsler, retrovirüs ailesine aittir, ancak hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilirler. En çok bilinen lentivirüs insan immün yetmezliği (HIV)'dir. Devre dışı bırakılarak in vivo gen transferi için bir vektör olarak geliştirilmiştir. İnflamasyonun yokluğunda uzun süreli gen ekspresyonu oluşturan merkezi sinir sistemine (MSS) gen iletimi için etkili araçlar oldukları kanıtlanmıştır. Parkinson hastalığının hayvan modellerinde de terapötik etkinlikleri gösterilmiştir [19].

2.1.1.3 Adenovirüsler

Adenovirüsler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilen ve insanlarda iyi huylu solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilen bir DNA virüsleri ailesidir. Genomları bir düzineden fazla gen içerir ve genellikle konakçı DNA'ya entegre olmazlar. Bunun yerine, konakçı hücrenin çekirdeğinde epizomal (ekstrakromozomal) komponentler olarak çoğaltılırlar [20].

Adenovirüs vektörleri, genetik yükünü hücre çekirdeğine iletmek açısından, vektörün en etkili sınıfıdır ve adenovirüs vektörlerinin doğrudan enjeksiyonu, çoğu dokuyu verimli bir şekilde transdüksiyona tabi tutabilir. İmmünojenik adenovirüs vektörleri, geçici transgen ekspresyonunun avantajlı olduğu vasküler ve koroner arter hastalığının

tedavisinde, hücresel toksisite ve immünojenisitesinin antitümör etkilerini artırabilmesi nedeniyle kanser tedavisinde yer bulmaktadır [21], [22].

2.1.1.4 Adeno İlişkili Viral Vektörler

Adeno ilişkili virüs (AAV), basit, patojenik olmayan, tek iplikçikli bir DNA virüsüdür. Rekombinant AAV vektörleri (rAAV), çoğalmayan dokularda güvenli uzun süreli gen transferi ve ekspresyonu için en umut verici vektör sistemlerinden biridir. AAV, yabancı tip virüsün insan hastalığına neden olduğu hiçbir zaman gösterilmediği için gen terapisi için geliştirilmiş virüsler arasında eşsizdir. Vektörün küçük boyutu ve basitliği, akut enflamatuvar yanıtları veya toksik yan etkileri ortaya çıkarmadan sistemik olarak yüksek dozlarda uygulanmasını mümkün kılmaktadır. Kistik fibroz, kas distrofisi ve birkaç merkezi sinir sistemi hastalıklarında karaciğer yönelimli gen transferi ile tedavi geliştirmek için klinik çalışmalar yürütülmektedir [23], [24].

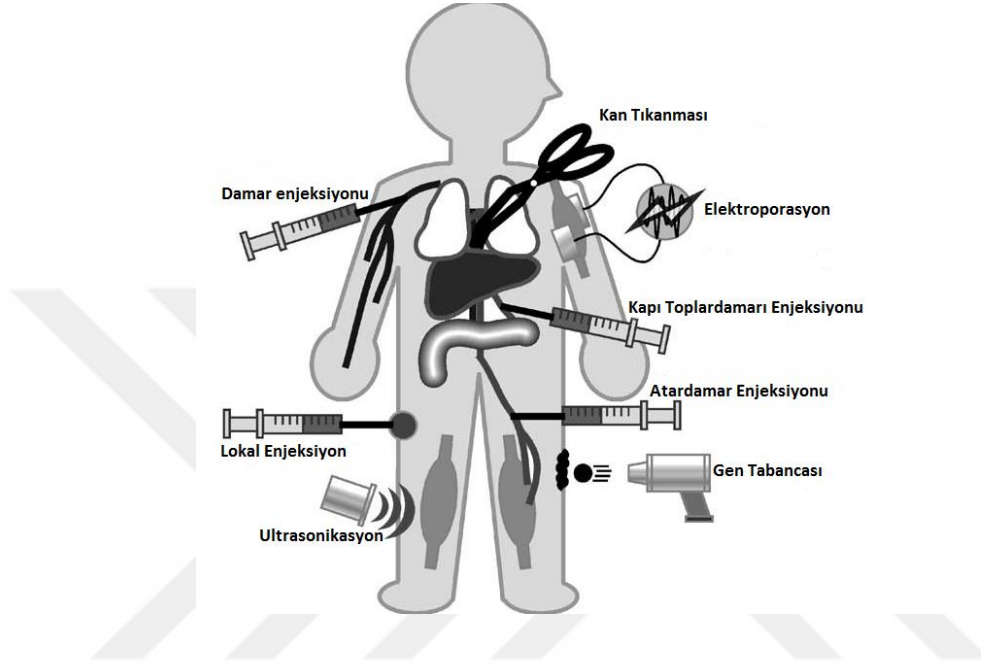
2.1.1.5 Herpes Virüsleri (HSV-1)

Ekzojen DNA'nın vektör genomuna dahil edilmesi için gerekli mevcut alan, spesifik terapötik uygulamalar için vektör seçimini etkileyen bir etmendir. HSV-1, gen transferi için geliştirilmekte olan tüm virüslerin en büyüğü ve en karmaşığıdır ve bu vektörün önemli bir özelliğı, yabancı DNA'nın büyük parçalarını taşıma kapasitesidir. HSV-1, duyuşal nöronlarda ömür boyu süreklilik oluşturabilen ve sinir sistemi hücrelerini enfekte eden bir virüştür. Bu doğal yönelim, nöropatolojik bozuklukları replikasyon-kusurlu HSV-1 vektörlerinin en umut verici uygulamalarından biri haline getirmiştir [25].

Viral vektörler yüksek gen transfeksiyon verimliliğine sahiptir, ancak viral elementlerinin eklemeli mutageneze sebep olması, immünolojik yanıt oluşturmaları ve sistemik olarak verildiklerinde birden çok organda birçok farklı hücre tipi tarafından istenmeyen vektör tutulmasına sebep oldukları daha az tercih edilir olmuştur. Bu sınırlamalar ve nanoteknoloji alanındaki paralel ilerlemeler, çeşitli nanopartikül-DNA dağıtım sistemlerinin gelişmesine yol açmıştır [26].

2.1.2 Non Viral Vektörler

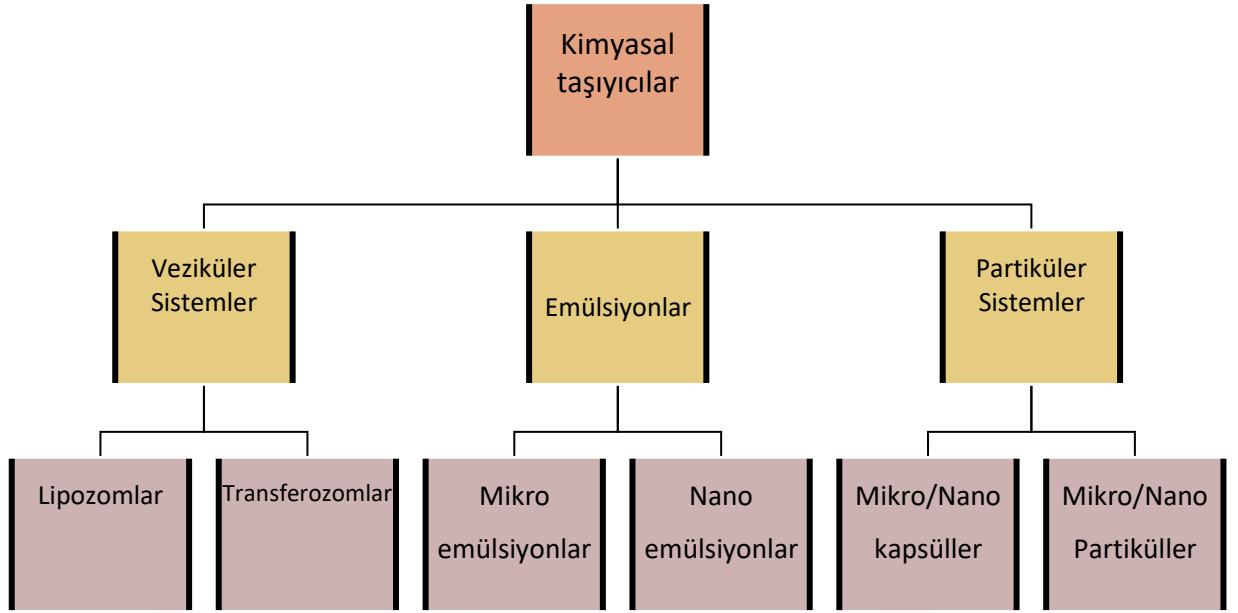
Nonviral vektörler, kullanım kolaylığı, geniş ölçekli üretim kolaylığı ve immün bağışıklık yanıt oluşturmaması gibi avantajlara sahiptir. Non viral vektör sistemlerinde çıplak DNA'yı elektroporasyon ve gen tabancası gibi fiziksel bir yöntemle (Şekil 2.1) ya da katyonik polimer ve lipid gibi bir kimyasal taşıyıcı tarafından taşımak mümkündür [27].



Şekil 2.1 Gen taşıma amaçlı kullanılan fiziksel yöntemler

Gen transferinde en önemli ve en zor olan sorun taşımadır. Sistemik uygulama sonrasında transfer, retiküloendotelyal sistemden (RES) kaçınmakla kalmayıp aynı zamanda hedef hücrelerin sitoplazmasına veya çekirdeğine gelmeden önce birkaç engeli aşması gerekir [28].

Viral olmayan vektörler genellikle katyoniktir ve negatif yüklü DNA ile elektrostatik etkileşim oluştururlar. Bunlar arasında katyonik polimerler, katyonik peptitler ve katyonik lipozomlar bulunur. Viral olmayan vektörler viral olanlardan daha az etkili olmasına rağmen, güvenlik, basitlik ve yüksek gen taşıma kabiliyeti avantajlarına sahiptir.



Şekil 2.2 Kimyasal taşıyıcıların şematik gösterimi

Yüksek seviyeli gen ifadesi ve fonksiyonel taşımayı sağlamak için yeni kimyasal taşıyıcılar tasarlanmıştır. Lipidler ve polimerler bu amaçla gen transferinde esas olarak kullanılmaktadır. Bu taşıyıcılar;

- ❖DNA'yı nükleazlardan ve diğer kan bileşenlerinden korumak için DNA ile yoğunlaştırılmış kompleksler oluşturabilirler,
- ❖Belirli hücre tiplerine ulaştırmayı hedeflemek için tasarlanabilirler,
- ❖DNA'nın sitosol veya çekirdeğe taşınmasını arttırmak için tasarlanabilirler,
- ❖Sitoplazmada DNA'dan ayrılmak için tasarlanabilirler,
- ❖Sürekli veya kontrollü bir ifade elde etmek için dokuda DNA salımını gerçekleştirmek üzere tasarlanabilirler [27] [29].

2.2 Gen Taşıyıcısı Olarak Nanopartiküler Sistemler

Nanopartiküller, makromoleküler bileşenlerden oluşan, $<1\mu\text{m}$ boyutlarında katı kolloidal partiküller olarak ilk kez 1970'lerde tanımlanmıştır [30]. Günümüze kadar kaydedilen ilerlemeler ve gelişen teknolojiyle birlikte nanopartikül sistemleri ilaç ve gen aktarımında taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Katyonik lipid ve polimerik nanopartiküller viral aracılı sistemlere alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu yapılar sahip oldukları yük nedeniyle negatif yüklü DNA ile etkileşim oluşturarak hızlı bir şekilde kompleks yapı oluşturma eğilimindedirler. Lipid ve polimerik nanopartiküllerin yüzey yükü yoğunlukları, hidrofobisiteleri ve stokiyometrilere üretim sırasında yapılan manipülasyonlarla değiştirilerek DNA bağlanma kapasitesi, Hücrelerin hedeflenmesi ve DNA'nın hücreye girişi arttırılabilmektedir [31].

2.2.1 Polimerik Nanopartiküller

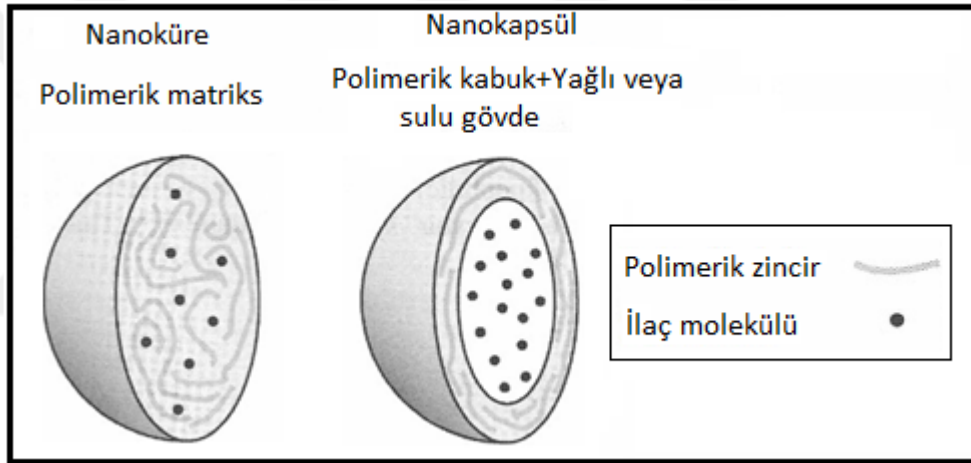
Gen aktarımı ve ilaç taşınmasında kullanılmak üzere geliştirilen polimerik nanopartiküller biyobozunur ve biyobozunmaz polimerler kullanılarak sentezlenmektedir. Polimerik nanopartiküller, uygulamanın ihtiyaçlarına ve kapsüllenecek etken madde tipine göre çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenmektedir. Bu nanoparçacıklar, nanotıp geliştirmek amacıyla çeşitli kullanışlı biyoaktif moleküllerin ve tıbbi ilaçların nanokapsülasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilir polimerik nanopartiküller, gösterdikleri vaatler nedeniyle etken madde taşıma sistemlerinde son derece tercih edilir [32]. Bu gibi nanoparçacıklar doku ve hücrelerle kontrollü / sürdürülebilir salınım özelliği, hücre içi boyut ve biyoyumluluk gösterir. Bunun dışında bu nanopartiküller;

- kan içerisinde stabildir,
- toksik özellik göstermez,
- non-trombojenik ve non-immünojeniktir,
- iltihaplanmaya neden olmaz,
- nötrofilleri aktive etmez,
- biyolojik olarak parçalanabilir,
- retiküloendotelial sistemden kaçınır,
- ilaçlar, proteinler, peptidler veya nükleik asitler gibi çeşitli moleküllere uygulanabilir [33].

Polimerik nanopartiküller genellikle polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ya da bunların kopolimeri olan poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyobozunur ve biyoyoumlu polimerlerden üretilir [34].

Hazırlama yöntemine bağlı olarak, enkapsüle edilmiş terapötik ajanın farklı özellikler ve farklı salım karakteristikleri sergilediği nanoküreler veya nanokapsüller elde edilir.

Nanokapsüller veziküler sistemlerdir, aktif madde bir kaviteye hapsedilir ve bir polimer membran ile çevrelenir, nanoküreler ise matris sistemlerdir burada aktif madde fiziksel olarak ve uniform olarak disperse edilmiştir [4], [33]. Nanoküre ve nanokapsül yapısı Şekil 2.3'te gösterildiği gibidir [4].



Şekil 2.3 Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi

2.2.1.1 Biyobozunur Polimerler

Hem sentetik polimerler hem de biyolojik olarak türetilen (veya doğal) polimerler, biyolojik olarak bozunabilir polimerik biyomalzemeler olarak geniş çapta araştırılmıştır. Biyolik olarak parçalanabilir polimerler in vivo koşullarda enzimatik, hidrolitik veya her iki yolla da parçalanarak toksik olmayan maddeler oluşturur. Biyoparçalanabilir polimerler

- yüksek biyoyararlanım
- daha iyi enkapsülasyon etkinliği,
- etkin madde salımının kontrolüne imkân sağlaması,

- etkin madde yan etkilerinin/toksik etkilerinin azaltılması
- biyolojik sistemlerle uyumlu
- biyolojik sistemden parçalanarak uzaklaştırılması gibi üstün özelliklerinden dolayı taşıyıcı sistemler olarak nanopartikül üretiminde sıklıkla kullanılmaktadırlar [35].

Etken madde taşınması amacıyla bovin serum albümin (BSA), insan serum albümin (HSA), kollajen, jelatin ve hemoglobin gibi doğal biyoparçalanabilen polimerler ile çalışılmıştır. Bu doğal polimerlerin kullanımı pahalı olmaları ve düşük saflıkları nedeniyle sınırlıdır. Bazı etken madde yüklü cihazların hazırlanmasında kullanılan sentetik biyoparçalanabilir polimerler; poli(amidler), poli(amino asitler), poli(alkil-asiano akrilatlar), poli(esterler), poli(ortoesterler), poli(üretanlar), ve poli(akrilamidler)'dir [36].

Sentetik Polimerler

- Poliesterler: Poli(hidroksi bütirat), poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit), poli(-kaprolakton), poli(-malik asit)
- Poliamidler: Poli(amino asitler), poli(imino karbonatlar)
- Polianhidritler: Poli[bis(p-karboksifenoksi propan-ko-sebasik asit)], poli(yağ asidi dimer-kosebasik asit)
- Fosfor bazlı Polimerler: Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazenler
- Diğerleri: Poli(siyano akrilatlar), poliüretanlar, poliorto esterler, poli-idropiranlar, poliasetallar [37]

Doğal Polimerler

- Polisakkaritler: Kitosan, kitin, agaroz, dekstran, aljinat, hiyaluronik asit.
- Protein yapısında olan polimerler: Albümin, jelatin, kolajen [38], [39]

2.2.1.2 Biyobozunur Olmayan Polimerler

Biyolojik ortamda parçalanmayan bu polimerler hidrofik veya hidrofob yapıda olurlar. Hidrojel olarak adlandırılan hidrofik olanlar suda çözünme göstermezken sulu ortamda

şişerler. Hidrofoblar suda çözünmez ve şişmezler. Polisakkarit ve akrilik bazlı polimerler gibi birçok biyolojik olarak parçalanamayan polimer peroral dozaj şekli, transdermal filmler ve cihazların üretimi gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir [38].

- Selüloz Türevleri: Selüloz asetat, selüloz asetat bütirat, etil selüloz.
- Akrilik Polimerler: Poli(hidroksi-etil-metakrilat), poli(hidroksietoksi-etilmetakrilat), poli(metoksi-etil-metakrilat), poli(metakrilik asit)
- Diğerleri: Polivinil pirolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler [40]

2.2.1.3 Polimer Degradasyonu

Polimerik biyomalzemelerin biyolojik olarak parçalanması, polimerde hidrolitik olarak veya enzimatik olarak hassas bağların ayrılmasını içerir; polimer erozyonuna yol açar. Parçalanma moduna bağlı olarak, polimerik biyomalzemeler, hidrolitik olarak parçalanabilir polimerlere ve enzimatik olarak parçalanabilir polimerlere ayrılabilir. Doğal olarak oluşan polimerlerin çoğu enzimatik bozunuma uğrar.

Hidrolitik olarak bozunabilir polimerler, omurgalarında hidrolitik olarak kararsız kimyasal bağlar olan polimerlerdir. Hidrolize duyarlı işlevsel gruplar arasında esterler, ortoesterler, anhidritler, karbonatlar, amidler, üreanlar, üreler vb bulunur [41].

Enzimatik olarak bozunabilir polimerlerin in vivo bozunum hızı, enzimlerin bulunabilirliği ve konsantrasyonuna bağlı olarak implantasyon bölgesine göre önemli derecede değişir. Bu polimerlerin kimyasal modifikasyonu da parçalanma oranlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Doğal polimerler biyoaktivite, hücrelere reseptör bağlama ligandları sunma yeteneği, hücre tetiklemeli proteolitik bozunmaya duyarlılık ve doğal yeniden modellenme gibi bazı doğal avantajlara sahiptir. Bu doğal polimerlerin doğal biyoaktivitesinin kendi dezavantajları vardır. Bunlara polimerlerin çoğuyla ilişkili güçlü bir immünojenik yanıt, arındırma ve hastalık bulaşma olasılığı ile ilgili karmaşıklıklar dahildir [42].

Sentetik biyomalzemeler genelde biyolojik olarak inert olup, daha öngörülebilir ve miktardan miktara değişmez özelliklere sahiptirler ve doğal polimerlerin dezavantajlarından çoğunun yoksun olduğu, spesifik uygulamalar için özelleştirilmiş

özellik profillerine sahip olan benzersiz avantajlara sahiptirler. Hidrolitik olarak parçalanabilir polimerler, enzimatik olarak parçalanabilir polimerlere kıyasla minimal bölgeden bölgeye ve hastadan-hastaya değişimleri nedeniyle genellikle implantlar olarak tercih edilir [7], [35], [41]. Polimerlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini etkileyen faktörler aşağıdaki gibidir.

- Kimyasal yapı ve kompozisyon
- Fizikokimyasal faktörler (iyon değişimi, iyonik kuvvet, pH)
- Fiziksel faktörler (şekil, boyut)
- Morfoloji (amorf, yarıkristal, kristal, mikroyapı)
- Degradasyon mekanizması (enzimatik, hidroliz, mikrobiyal)
- Molekül ağırlığı dağılımı
- Üretim koşulları ve sterilizasyon süreci
- Sertleştirme ve saklama koşulları
- Uygulama yolu ve etki bölgesi [41]

2.2.2 Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)

Lipid nanopartiküller ve özellikle katyonik katı lipid nanopartiküller, uzatılmış kan dolaşım profilleri ve büyük ölçekli üretimi, biyo-uyumlu malzemeler olması ve iyi depolama kararlılıkları gibi yaygın teknolojik avantajları nedeniyle son zamanlarda gen tedavisi için nonviral taşıyıcılar olarak önerilen, en iyi optimize edilmiş ve karakterize edilmiş taşıyıcı sistemlerden birini temsil etmektedir [43].

Katı lipid nanopartiküller (KLN), emülsiyonlara, lipozomlara ve polimerik nanopartiküllere alternatif bir taşıyıcı sistemidir. KLN, insanlarda farmasötik uygulamalar için onaylanmış olan ve intravenöz olarak enjekte edildiğinde düşük toksisite gösteren, fizyolojik olarak iyi tolere edilebilen bileşenler kullanılarak elde edilir. Polimerik nanopartiküllere benzer şekilde, katı matriksi etken maddeyi kimyasal bozunmaya karşı korur. Mükemmel depolama stabilitesi, herhangi bir organik çözücü kullanılmadan nispeten kolay bir üretiminin olması, buharla sterilizasyon ve liyofilizasyon olanağı ve büyük ölçekli üretimi gibi birçok avantajı vardır. Ek olarak, KLN'nin diğer bir avantajı da parçacıkların yükünün, kompozisyon yoluyla modüle

edilebilmesi ve böylece, karşıt yüklü moleküllerin, elektrostatik etkileşimler vasıtasıyla bağlanmasına izin verilebilmesidir [44], [45].

Katyonik KLN (KKLN), yani en az bir katyonik lipit içeren KLN, gen aktarımı için viral olmayan vektörler olarak önerilmiştir. KKLN'nin nükleik asitleri etkili bir şekilde bağlayabildiği, onları DNAaz I bozulmasından koruduğu ve bunları canlı hücrelere taşıdığı gösterilmiş ve gen taşıyıcısı olarak kullanılması oldukça iyi kanıtlanmıştır [46].

2.3 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlanması için uygun yöntemin seçimi, polimerin ve yüklenecek olan etken maddenin fiziko kimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu yöntemler formülasyonun polimerizasyon reaksiyonu gerektirmesi (Monomerlerin polimerizasyonu) veya direkt makromolekülden/önceden şekillendirilmiş polimerlerden elde edilmesine (Polimerlerin dispersiyonu) göre iki ana kategoride sınıflandırılabilir. Önceden oluşturulmuş polimerden nanoparçacıkların birincil üretim yöntemleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

2.3.1 Emülsiyon-Çözücü Evaporasyon Yöntemi

Nanoparçacıkların hazırlanması için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Emülsifikasyon – çözücü evaporasyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci adım, polimer solüsyonunun sulu faz içersinde emülsiyon haline getirilmesini gerektirir. İkinci adım sırasında polimer çözücüsü buharlaştırılır ve nanosfer olarak polimer çökmesine neden olur. Nano parçacıklar ultrasantrifüj ile toplanır ve stabilizatör kalıntılardan veya herhangi serbest bir etken maddeden arındırmak için distile su ile yıkanır ve saklama için liyofilize edilir. Bu yöntemin modifikasyonu, yüksek basınç emülsifikasyonu ve çözücü evaporasyonu yöntemi olarak bilinir. Bu yöntem, yüksek basınç altında homojenizasyona tabi tutulan bir emülsiyonun hazırlanmasını ve ardından organik çözücüyü uzaklaştırmak için genel karıştırma işlemini içerir. Boyut; karıştırma oranı, dispersiyon maddesinin türü ve miktarı, organik ve sulu fazın viskozitesi ve sıcaklık üzerindeki ayarlamalarla kontrol edilebilir. Bu yöntemde kullanılan polimerler PLA, PLGA, EC, selüloz asetat ftalat, Poly (ϵ -kaprolakton) (PCL), Poli (β -hidroksibutirat) (PHB)'tır [47].

2.3.2 Çift Emülsiyon ve Evaporasyon Yöntemi

Emülsiyon ve evaporasyon yöntemi, hidrofilik etken maddelerin zayıf sıkışmasının sınırlandırılmasından muzdariptir. Dolayısıyla, hidrofilik etken madde kapsüllenirken, w / o emülsiyonlarını oluşturmak için kuvvetli karıştırma altında organik polimer solüsyonuna etken maddenin sulu solüsyonlarının eklenmesini içeren çift emülsiyon tekniği kullanılır. Bu w / o emülsiyonu w / o / w emülsiyonunu oluşturmak üzere sürekli karıştırılarak ikinci sulu faza eklenir. Emülsiyon daha sonra evaporasyon yoluyla çözücünün uzaklaştırılmasına tabi tutulur ve nanopartiküller yüksek hızda santrifüj edilerek izole edilebilir. Oluşan nanopartiküller, liyofilizasyondan önce iyice yıkanmalıdır. Bu yöntemde nanopartiküllerin karakterizasyonunu etkileyen değişkenler; dahil edilecek hidrofilik etken madde miktarı, kullanılan stabilizör konsantrasyonu, polimer konsantrasyonu ve sulu fazın hacmidir [48].

2.3.3 Salting-Out Yöntemi

Salting out, su ile karışabilir bir çözücünün sulu çözeltiden salting out etkisi ile ayrılmasına dayanır. Polimer ve etken madde başlangıçta çözücü madde içerisinde çözünür ve daha sonra salting out ajanları (magnezyum klorür ve kalsiyum klorid gibi elektrolitler veya sukroz gibi elektrolitler) ve polivinilpirolidon veya hidroksietil selüloz gibi bir koloidal stabilizör içeren sulu jel içerisinde emülsiyon haline getirilir. Bu yağ / su emülsiyonu, çözücünün sulu faza difüzyonunu arttırmak için yeterli miktarda su veya sulu çözelti ile seyreltilir ve bu nanosfer oluşumuna neden olur. Karıştırma hızı, iç / dış faz oranı, organik fazdaki polimerlerin konsantrasyonu, elektrolit konsantrasyonu tipi ve sulu fazdaki stabilizatör tipi gibi çeşitli üretim parametrelerinde değişiklik yapılabilir. Salting out yönteminde sıcaklığın artırılması gerekmez ve bu nedenle ısıya duyarlı maddelerin işlenmesi gerektiğinde salting out yöntemi tercih edilebilir. En büyük dezavantajı, lipofilik ilaca özel uygulamaları ve nanopartiküllerin geniş çaplı yıkama adımlarıdır [49].

2.3.4 Emülsiyon-Difüzyon Yöntemi

Nanoparçacıkların hazırlanması için yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntemdir. Kapsülleyici polimer, kısmen suyla karışabilir bir çözücü (propilen karbonat, benzil alkol

gibi) içerisinde çözündürülür ve her iki sıvının başlangıçtaki termodinamik dengesini sağlamak için suyla doyurulur. Ardından, polimer-suya doymuş solvent fazı, stabilizör içeren sulu bir çözelti içerisinde emülsiyon haline getirilir ve bu emülsiyon yağ / polimer oranına göre nanosferlerin veya nanokapsüllerin oluşumuna ve dış faz için solvent difüzyonuna yol açar. Son olarak, çözücü kaynama noktasına göre evaporasyon veya filtrasyon yoluyla uçurulur. Bu teknik, yüksek kapsülleme verimliliği (genellikle %70), homojenizasyona ihtiyaç duyulmaması, yüksek tekrarlanabilirlik, ölçeklenebilme kolaylığı, basitlik ve dar boyut dağılımı gibi birçok avantaj sunmaktadır. Dezavantajları ise, süspansiyondan elimine edilecek yüksek miktarda su olması ve emülsifikasyon esnasında doymuş sulu dış faza suda çözünür ilacın sızdırılmasıdır ve bunlar kapsülleme verimliliğini düşürmektedir [50].

2.3.5 Çözücü Yer Değişimi / Çöktürme Yöntemi

Solvent yer değiştirmesi, bir organik çözeltiden önceden oluşturulmuş bir polimerin çöktürülmesini ve sürfaktan varlığı veya yokluğunda sulu ortamda organik çözücünün difüzyonunu içerir. Polimerler, etken madde veya lipofilik sürfaktan, aseton veya etanol gibi yarı polar suda karışabilir bir çözücü içerisinde çözündürülür. Çözelti daha sonra manyetik karıştırma altında stabilizör içeren bir sulu çözeltiye boşaltılır veya enjekte edilir. Nanopartiküller, hızlı çözücü difüzyonuyla anında oluşturulur. Solvent daha sonra düşük basınç altında süspansiyonlardan uzaklaştırılır. Organik fazın sulu faza eklenme oranları parçacık boyutunu etkiler. İki fazın karıştırma hızı arttıkça hem partikül boyutunda hem de etken madde tutukluğunda bir azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir [51].

Polimerik nanopartiküller hazırlamak amacıyla kullanılan Süperkritik Sıvı Teknolojisi yönteminin en büyük avantajı çöktürülmüş ürünün çözücü içermemesidir. Süperkritik sıvılar genel olarak süperkritik sıcaklığı üzerinde, basıncın değişmesine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanırlar. Süperkritik CO₂ en çok kullanılan süperkritik sıvıdır çünkü kritik olduğu durumlar uyumludur ($T_c=31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_c=73.8\text{ bar}$), toksik değildir, alev almaz ve ucuzdur. Süperkritik çözeltinin hızlı genleşmesi (RESS) ve süperkritik anti-çözücü yöntemi (SAS) en çok kullanılan yöntemlerdir. RESS yönteminde, etkin madde ve polimer süperkritik çözücüde yüksek basınçta

çözündürülür. RESS yöntemi, süperkritik sıvılardaki sınırlı çözünürlüklerinden ötürü yüksek molekül ağırlıklı polimerler için kullanılamaz. SAS yönteminde etken madde organik çözücüde çözündürüldükten sonra süperkritik sıvı (genellikle süperkritik CO₂) ile temasta bırakılır. Organik faz süperkritik çözücüde hızla çözünür ve geriye filtre edilebilen nanopartiküller kalır [52].

2.4 Nanopartikül Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin potansiyel başarıları; nanopartikülün üretim stratejisi, fiziksel özellikleri, etken madde yükleme etkinlikleri, etken madde salım potansiyelleri ve en önemlisi taşıyıcının kendisinin minimum toksik potansiyeli gibi önemli parametrelere ciddi şekilde bağlıdır.

Nanopartiküllerin boyutları, morfolojileri ve kimyasal içerikleri biyolojik mikro çevre ile ilişkilerini, stabilitelerini ve ekstra-intraselüler dağılımlarını önemli şekilde etkileyerek, nanopartiküllerin birbirlerinden çok farklı davranışlar sergilemesine neden olur. Bu sebeple nanopartikül formülasyonları için karakterizasyon çalışması yapılmaktadır. Partikül büyüklüğü ve dağılımı zeta potansiyel, yüzey özellikleri, etkin madde yükleme kapasitesi, etkin madde salım profili sıklıkla tayin edilen karakterizasyon yöntemleridir.

Nanopartiküller, taramalı elektron mikroskobu (SEM), iletim elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) gibi gelişmiş mikroskopik teknikler kullanılarak genellikle boyutları, morfolojisi ve yüzey yükleri ile karakterize edilmektedir. Ortalama parçacık çapı, bunların boyut dağılımı ve yükü fiziksel kararlılığı ve nanoparçacıkların in vivo dağılımını etkilemektedir. Elektron mikroskopisi teknikleri, zehirliliğini belirleyebilen polimerik nanoparçacıkların genel şeklinin saptanmasında çok yararlıdır. Nanoparçacıkların yüzey yükü, polimer dağılımının fiziksel kararlılığını ve yeniden dağılılabirliğini ve ayrıca in vivo performansını etkilemektedir [6].

2.4.1 Parçacık Boyutu

Parçacık boyutu dağılımı ve morfolojisi nanoparçacıkların karakterizasyonunun en önemli parametreleridir. Morfoloji ve büyüklük elektron mikroskopisi ile ölçülür. Nanoparçacıkların başlıca uygulaması ilaç salınımı ve ilaç hedeflemesidir. Parçacık

boyutunun etken madde salınımını etkilediği bulunmuştur. Daha küçük parçacıklar daha büyük yüzey alanı sunmaktadır. Sonuç olarak, üzerine yüklenen ilacın çoğu, hızlı etken madde salınımına yol açacak şekilde parçacık yüzeyine maruz kalacaktır. Aksine, etken madde daha büyük parçacıkların içinde yavaş yavaş yayılmaktadır. Bir dezavantaj olarak, daha küçük parçacıklar, nanoparçacık dispersiyonunun taşınması ve depolanması sırasında birikim eğilimindedir. Bu nedenle, nanoparçacıkların küçük bir boyutu ile maksimum kararlılığı arasında bir uzlaşma vardır [53]. Polimerin parçalanması partikül boyutundan da etkilenebilir. Örneğin, poli (laktik-ko-glikolik asidin) parçalanma hızının, in vitro olarak partikül boyutunun artması ile arttığı bulunmuştur [54]. Parçacık boyutunun ölçülmesinde kullanılan yaygın yöntemler aşağıdaki gibidir.

2.4.1.1 Dinamik ışık saçılması (DLS)

Günümüzde parçacık boyutunu belirlemenin en hızlı ve en yaygın yöntemi foton-korelasyon spektroskopisi (PCS) veya dinamik ışık saçılmasıdır (DLS). DLS, nano ve alt mikron aralıklarındaki kolloidal süspansiyonlarda Brown nanopartiküllerinin boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Brown hareketinde küresel parçacıkların bir solüsyonuna parlayan tek renkli ışık (lazer), hareketli parçacığa çarptığında dalga boyunu değiştirerek Doppler kaymasına neden olur. Bu değişiklik, parçacık büyüklüğü ile ilgilidir. Boyut dağılımını çıkarmak ve partikülün ortamdaki hareketinin bir tanımını vermek, partikülün difüzyon katsayısını ölçmek ve otokorelasyon fonksiyonunu kullanmak mümkündür [55].

2.4.1.2 Tarama Elektron mikroskopisi (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) doğrudan görselleştirme ile morfolojik inceleme sağlamaktadır. Elektron mikroskobisine dayanan teknikler, morfolojik ve boyutlandırma analizinde birçok avantaj sağlar; Ancak, boyut dağılımı ve dağılım ortalamaları hakkında sınırlı bilgi sağlamaktadır. SEM karakterizasyonu için, nanoparçacık çözeltisi önce bir numune tutucunun üzerine monte edilebilen kuru bir toz haline dönüştürülmeli ve ardından bir püskürtme makinesi kullanılarak altın gibi iletken bir metal ile kaplanmalıdır. Numune daha sonra odaklanmış bir elektron demeti

yardımıyla taranır. Numunenin yüzey özellikleri, numune yüzeyinden yayılan sekonder elektronlardan elde edilir. Nanopartiküller vakuma dayanabilmelidir ve elektron ışını polimerin zarar görmesine neden olabilir. SEM ile elde edilen ortalama boyut, dinamik ışık saçılımı ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanabilmektedir. DLS ve SEM tekniği zaman alıcı, masraflı ve boyut dağılımı hakkında tamamlayıcı bilgiye sıklıkla ihtiyaç duymaktadır [55].

2.4.1.3 İletim elektron mikroskobu (TEM)

TEM, SEM'den farklı prensiplerle çalışmakta, ancak genellikle aynı tür veriler elde edilmektedir. TEM için numune hazırlığı, elektron geçirgenliği için çok ince olması gerekliliği nedeniyle karmaşık ve zaman alıcıdır. Nanopartikül dağılımı, destek grid veya filmler üzerine çöktürülür. Nanopartiküllerin cihaz vakumuna dayanması ve kullanım kolaylığı sağlamak için, fosfotungstik asit veya türevleri, uranil asetat vs. gibi bir negatif boyama malzemesi veya plastik gömme kullanılarak nanopartiküller sabitlenir. Alternatif bir yöntem ise numuneyi vitroz buz içine gömdükten sonra sıvı azot sıcaklıklarına maruz bırakmaktır. Numunenin yüzey özellikleri, bir elektron demeti, ince bir numune yoluyla iletildiğinde, numuneyi geçerken elektron demetinin numune ile etkileşiminden elde edilmektedir [56].

2.4.1.4 Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) partikül boyutu ölçümünde ultra yüksek çözünürlük sunar ve atomik ölçeğin bir prob ucu kullanılarak sub-micron seviyesinde numunelerin fiziksel olarak taranmasına dayanmaktadır. Alet, prob ucu ve numune yüzeyi arasındaki kuvvetlere dayanarak örneğin topografik bir haritasını sağlamaktadır. Numuneler, özelliklerine bağlı olarak genellikle kontak veya kontaksız modda taranmaktadır. Kontak modunda, gezici uç ile numune arasındaki itme kuvveti (nanonewton büyüklüğünde) sabit kalacak şekilde gezici uç numune üzerinde gezdirilir. Prob, temassız halde iletken yüzey üzerinde gezinir. AFM'nin temel avantajı, iletken olmayan numunelerin spesifik olmayan bir şekilde görüntülenmesi, böylece hassas biyolojik ve polimerik nano ve mikroyapıların görüntülenmesine olanak sağlamasıdır. AFM boyut ve boyut dağılımı için en doğru tanımlamayı sağlar ve matematiksel işlem gerektirmez.

Ayrıca, AFM tekniği ile elde edilen partikül boyutu, çeşitli biyolojik koşulların etkisini anlamaya yardımcı olan gerçek resmi sağlar [56].

2.4.2 Yüzey Yükü

Nanoparçacıkların yüzey yükünün doğası ve yoğunluğu, biyolojik çevre ile olan etkileşimini ve biyoaktif bileşiklerle olan elektrostatik etkileşimini belirlediğinden, çok önemlidir. Koloidal stabilite, nanoparçacıkların zeta potansiyeli ile analiz edilmektedir. Bu potansiyel yüzey yükünün dolaylı bir ölçüsüdür. Dış Helmholtz düzlemi ile kayma yüzeyi arasındaki potansiyel farka karşılık gelir. Zetasizer partiküllerin boyutunu ve zeta potansiyelini bulmak için kullanılan cihazdır. Zetasizer cihazı, belirli bir potansiyel altında hareketi sağlanan tanelerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplamaktadır. Zeta potansiyelinin ölçümü, koloidal dispersiyonun depolama kararlılığı hakkında öngörüler sağlar. Kararlılığı sağlamak ve parçacıkları bir araya getirmekten kaçınmak için, pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyel değerlerine ulaşılmalıdır. Zeta potansiyeli aynı zamanda nanokapsüller içerisinde kapsüllenen veya yüzey üzerine kaplanan maddenin doğası hakkında bilgi sağlayabilir. Zeta potansiyeliyle partiküller arası itme- çekme kuvveti belirlenmektedir [6].

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli genellikle nanopartiküllerin yüzey yük özelliklerini karakterize etmek için kullanılır. Partiküllerin elektriksel potansiyellerini ifade eder ve partiküllerin kompozisyonundan ve disperse edildiği ortamdan etkilenmektedir.

Zeta potansiyeli -10 mV ile +10 mV arasında değişen nanopartiküller çoğunlukla nötral, +30mV'un üstünde olanlar kuvvetli katyonik veya -30mV'un altında olanlar ise kuvvetli anyonik olarak değerlendirilirler. Hücresel membranlar çoğunlukla negatif yüklü olduğundan katyonik olan nanopartiküller membranlardan geçme eğilimindedir. Partikül yüzeyinin yükü hedeflendirme ve klerens açısından da oldukça önemli bir role sahiptir. Genel olarak negatif yüklü olan nanopartikül yüzeylerine opsoninler kolaylıkla adsorbe olur ve bu partiküllerin çok büyük bir kısmı retiküloendotelial sistem makrofajları tarafından kan dolaşımından hızla uzaklaştırılır. Pozitif yüklü nanopartiküller ise elektrostatik etkileşimlerle negatif yüklü DNA'yla biraraya gelerek etkileşir ve kompleks bir yapı oluşturur. Ayrıca yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme

ihtimali daha azdır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma eğilimleri elde edilebilir. Zeta potansiyeli >60 mV üzerinde ise partiküllerin çok iyi seviyede kararlıdır [57].

2.4.3 Yüzey Hidrofobikliği

Yüzey hidrofobikliği, hidrofobik etkileşim kromatografisi, bifazik bölme, problemlerin adsorpsiyonu, temas açısı ölçümleri vb. gibi çeşitli tekniklerle belirlenebilmektedir. Son zamanlarda, nanoparçacıkların yüzey analizi için birkaç karmaşık analitik teknik literatürde bildirilmiştir. X ışını foton korelasyon spektroskopisi, nanoparçacıkların yüzeyindeki spesifik kimyasal grupların tanımlanmasına izin vermektedir. NP'lerin yüzey hidrofobisitesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ile doğrudan ölçülebilir. Bu teknik, hidrofobik bir jel matrisi ile etkileşime dayalı materyalleri ayıran kolon kromatografisini içermektedir. Nanopartikül ve jel, NP uzunluklarının yüzey hidrofobisitesinin bir fonksiyonudur. Propil agaroz jel sabit bir faz olarak kullanılır ve NP'lerin elüsyonu fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilebilir. Eriyik örnekleri toplanabilir ve optik yoğunluk 400 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Daha sonra jel matrisi NP'leri çıkarmak için yıkanabilir [58].

2.5 Nanopartikül Yüzey Modifikasyonları

NP'ler intravenöz olarak verildiklerinde vücuttaki bağışıklık sistemleri tarafından kolaylıkla fark edilirler ve dolaşımdan temizlenirler. NP'lerin büyüklüğünün yanı sıra yüzey hidrofobisitesi adsorbe edilen kan bileşenlerinin, çoğunlukla proteinler (opsoninler), miktarını belirler. Bunlar NP'lerin in vivo kaderini belirleyecektir. Bu opsoninlerin, NP'lerin yüzeyine bağlanması, opsonizasyon olarak adlandırılır, NP'ler ve fagositler arasında bir köprü görevi görmektedir. NP'ler kan dolaşımından çıkarıldığında MPS organlarından birinde tutulur. Çıplak nanoparçacıkların, MPS organlarındaki sekestrasyonu çok hızlı, tipik olarak birkaç dakika civarındadır ve genellikle karaciğer ve dalakta yoğunlaşmaktadır. Dolayısıyla, kan proteinlerinin NP'lerle etkileşiminin niteliksel ve niceliksel olarak anlaşılması için, yüzey modifikasyonu ile sirkülasyon süresi uzun NP'lerin tasarlanması gerekir. Biyolojik olarak parçalanabilir ve uzun polimerik NP'lerin yüzey modifikasyonu esas olarak iki yöntemle başarılmıştır:

- hidrofilik polimerler / sürfaktanlarla yüzey kaplama;
- hidrofilik bölümler ile biyolojik olarak bozunabilir kopolimerlerin geliştirilmesi.

Yaygın olarak kullanılan yüzey kaplama malzemeleri: polietilen glikol (PEG), polietilen oksit (PEO), poloksamer, poloksamin, polisorbata (Tween 80) ve lauril eterlerdir. Yapılan çalışmalarla biyoparçalanabilir kopolimer olan PEG ile hazırlanan nanopartiküllerde yüzeydeki PEG tabakasının opsonin uzaklaştırıcı fonksiyonu olduğu, PEG yüzeyindeki fırça yapısı ile ara yapılandırmaların fagositozu ve kompleman aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir [59].

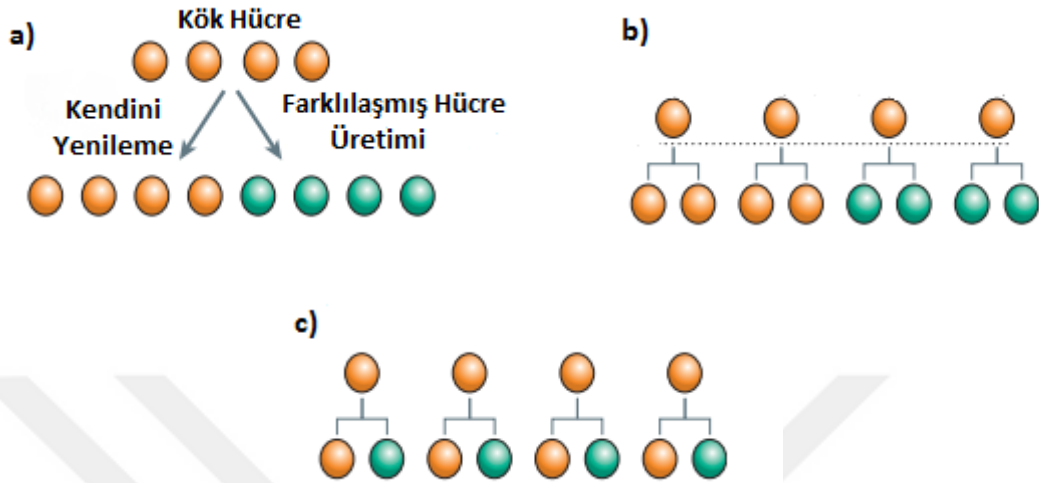
2.6 Kök Hücreler

Kök hücreler, kendini yenileme yoluyla sürdürülebilir bir yaşam döngüsü olan ve farklılaşma yoluyla belirli bir dokunun olgun hücrelerini üretme kabiliyetine sahip hücreler olarak tanımlanır. Kök hücreler, erken yaşam ve büyüme sırasında vücutta birçok farklı hücre tipine dönüşme potansiyeline sahiptir. Buna ek olarak, birçok dokuda, insan veya hayvan hala hayatta olduğu sürece, diğer hücreleri ikame etmek için sınırsız olarak bölünen bir tür iç onarım sistemi olarak hizmet ederler [60]. Bir kök hücre bölündüğünde, her yeni hücrenin ya bir kök hücre olması ya da bir kas hücresi, bir kırmızı kan hücresi veya bir beyin hücresi gibi daha özel bir işleve sahip başka bir hücre tipi olma potansiyeli vardır (Şekil 2.4).

Kök hücrelerin belli uyarılar altında farklı dokulardaki hücrelere dönüşebilme yeteneğine “Plastisite” ya da “Diferansiyasyon” denir. Hücreler arası iletişimlerin sonucunda kök hücreler belirli bir amaca yönelik olarak büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri ve sitokinler yardımıyla olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecine girmektedir [61]. Birçok değişimin gerçekleştiği bu sürece farklılaşma denir. Kendini yenileme (Self renewal) özelliğine sahip kök hücreler farklılaşma öncesi sürekli bölünerek mevcut sayılarını artırma eğilimindedirler. Kök hücrelerde asimetric ve simetric olmak üzere iki farklı bölünme şekli vardır [61].

Simetric hücre bölünmesinde (Şekil 2.4) kaynak hücrenin tüm özelliklerine sahip iki identik yavru hücre meydana gelir. Bu sayede hücreler, özelliklerinde değişme olmadan kendini yenilemek ya da farklılaşmış hücreler elde etmek adına sayılarını arttırabilirler.

Asimetrik bölünmede (Şekil 2.4) her bir kök hücre kendisiyle identik bir hücreye ve farklılaşarak olgun hücreye dönüşecek olan öncül bir hücreye bölünür.



Şekil 2.4 Kök hücre bölünme şekilleri
a)Kök hücre bölünmesi, b) Simetrik bölünme, c) Asimetrik bölünme

2.6.1 Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök Hücreler

Farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent kök hücreler olmak üzere 5 grupta incelenir.

2.6.1.1 Totipotent Kök Hücreler

Zigot oluşumundan sonraki gelişimin dördüncü gününe kadar olan aşamadaki blastomerlerin embriyonik ve ekstraembriyonik dokular dahil olmak üzere bir organizmanın tüm hücrelerini oluşturabilme potansiyelidir. Totipotent hücreler; herhangi bir özelleşmiş hücreye farklılaşabilmektedirler [62].

2.6.1.2 Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, tüm vücut hücrelerinin köken aldığı üç germ tabakası (mezoderm, endoderm, ekdoderm) hücrelerine dönüşebilen hücredir. Döllenen 4-

5 gün sonra meydana gelen blastosistin iç hücre kitlesini oluşturan embriyonik hücreler bu gruba dahildir.

Fare veya insan somatik hücrelerinde spesifik transkripsiyon faktörlerinin aşırı ekspresyonu ile üretilen ve moleküler ve fonksiyonel olarak embriyonik kök hücrelere oldukça benzer olan hücreler indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdir [63]. Somatik hücrelerden pluripotent hücre elde etmek için belli genlerin bir vektör aracılığıyla hücreye transfeksiyonu yapılması gerekir ve böylelikle transfekte hücrenin bu genleri eksprese etmesi sağlanır. İndüklenmiş pluripotent kök hücre; pluripotent kök hücrelerle aynı farklılaşma kapasitesine sahiptirler ve embriyonik kök hücreler gibi belli kök hücre proteinlerini ve genlerini eksprese ederler [64].

2.6.1.3 Multipotent Kök Hücreler

Bu hücreler belli bir hücre soyunun farklı hücre tiplerine dönüşebilen kök hücrelerdir. Farklılaşan hücre tipi sınırlıdır. Bağırsak kök hücreleri, deri kök hücreleri, hematopoietik kök hücreler ve nöral kök hücreler gibi çoğu yetişkin kök hücreleri örnek olarak verilebilir [65].

2.6.1.4 Oligopotent Kök Hücreler

Bir doku içerisinde iki veya daha fazla hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerdir. Lenfoid ve miyeloid kök hücreler ve vasküler kök hücreler bunlara örnek olarak verilebilir. Vasküler kök hücreler gerektiğinde düz kas hücrelerine gerektiğinde endotel hücrelerine farklılaşabilirler [66].

2.6.1.5 Unipotent Kök Hücreler

Öncü hücre olarak bilinen bu hücreler sadece bir hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Belirli yetişkin kök hücreleri (testis kök hücreleri), insan deri hücreleri veya hepatositler örnek olarak verilebilir. Öncü hücreler karaciğer ve beyin gibi organlarda ölen hücrelerin yerini alarak organ fonksiyonunun devamlılığını sağlarlar [67].

2.6.2 Elde edildiği Kaynağa Göre Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler ile ilgili birçok farklı sınıflandırılma yapılmıştır. İlk öne sürülen ve en çok kabul gören sınıflandırma; kök hücrelerin iki farklı kaynaktan elde edilmesine yönelik olandır.

2.6.2.1 Embriyonik Kök Hücreler

Zigot oluşumundan sonra gelişimin 5. gününde oluşan hücre topluluğuna “blastosit” denir. Blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücreler insan vücudaki 200’den fazla hücre türlerine dönüşebilirler. Vücuttaki herhangi bir farklılaşmış hücreyi oluşturma potansiyelindedirler. Embriyonik kök hücreden elde edilen ve embriyoid cisimcikler olarak adlandırılan hücre türleri ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Embriyonik kök hücreler diğer kök hücrelere göre farklılaşma potansiyeli daha yüksektir. Ayrıca hücre ömrünü belirleyen ve kromozomların ucunda bulunan telomerlerin embriyonik kök hücrelerde çok uzun olmasından dolayı çok uzun süre çoğalabilme yeteneğine sahiptir [68].

2.6.2.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Embriyonik olmayan kök hücreler; kendi aralarında hematopoetik kök hücreler(HKH), mezenkimal kök hücreler(MKH), organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreler(EKH) olmak üzere 3 grup altında sınıflandırılabilir. Doku veya organdaki farklılaşmamış bu hücreler kendini yenileyerek kullanabilir bir havuz oluştururlar ve gerektiğinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Kök hücreler farklılaşmadan önce bir safha geçirirler ve öncü hücre olacak şekilde yarı-farklılaşan hücreleri oluştururlar. Daha sonrasında bu hücreler bölünerek Dokuya özgü olana embriyonik olmayan kök hücrelerin asıl görevi içinde bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun bütünlüğünü sağlamaktır.

Tedavide yaygın olarak kullanılan ve üzerinde en çok çalışılan hematopoetik kök hücreler, kendi kendine yenileyebilme ve bütün olgun kan hücrelerine farklılaşabilme

özelliğine sahiptir. Fetal karaciğerden, periferik kandan, kordon kanından ve kemik iliğinden elde edilebilirler [69].

Mezenkimal kök hücreler(MKH), kemik iliğinden köken alırlar ve hem mezoderm kökenli hücrelere hem de mezoderm kökenli olmayan hücrelere farklılaşabilirler [70].



MATERYAL METOD

3.1 Kullanılan Sarf Malzemeler

- ❖ Fetal Bovine Serum (FBS)
- ❖ Tripsin EDTA
- ❖ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- ❖ DMEM F-12
- ❖ Bazik fibroblast büyüme faktörü
- ❖ GlutaMax
- ❖ Knockout Serum
- ❖ Non-essential amino asitler
- ❖ Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
- ❖ Dimetil sülfoksit (DMSO)
- ❖ Fenol
- ❖ Tripan blue
- ❖ Ditiotreitol (DTT)
- ❖ Stearamide
- ❖ Setil piridinyum klorid
- ❖ Etanol

- ❖Kloroform
- ❖İzopropil alkol
- ❖Agaroz
- ❖Amfisilin
- ❖Luria-Bertani (LB) broth
- ❖Luria-Bertani (LB) agar
- ❖TBE Buffer
- ❖DNA loading dye
- ❖RNA loading dye
- ❖DNA ladder
- ❖RNA ladder
- ❖Fosfat Buffered Saline (PBS)
- ❖25 cm² flask
- ❖75 cm² flask
- ❖6 well plate
- ❖24 well plate
- ❖96 well plate
- ❖Serolojik pipet
- ❖Petri kabı
- ❖Plastik öze
- ❖15mL ve 50mL falkon tüp
- ❖Pastor pipeti

3.2 Kullanılan Kitler

QIAGEN Mini Plasmid Kit (25)

Sigma Aldrich Taq Polymerase from *Thermus aquaticus*

Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit

Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit

Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix

3.3 Kullanılan Cihazlar

- Nano ZS, Malvern Zetasizer

Akışkan bir sıvı içerisinde yüzen veya asılı kalan parçacıkların; parçacık boyutu ölçümünü, zetapotansiyelini ve mobilite ölçümünü yapan cihazdır.



- IKA, Manyetik Karıştırıcı

Oluşturduğu manyetik alan etkisiyle cam malzemeler içindeki sıvıları bir balık yardımıyla karıştıran cihazdır.



- Sigma 3-18K Sartorius, Santrifüj

Sıvı karışımların farklı hızlarda döndürme işlemi ile yoğunluklarına göre birbirinden ayrılmasını sağlar.



- Zeiss EVO® LS 10, Taramalı Elektron Mikroskopy (SEM)

Odaklanmış bir elektron demeti ile numune yüzeyini tarayarak numune yüzeyinin topografisi ve kompozisyonu hakkında bilgi verir.



- Esco, Sentinel PLATINUM, Class II Flow kabin

Havanın filtreden geçirilerek ortama verilmesi ve bu havanın hepa filtre yardımıyla çevre korumalı olarak tekrar atmosfere atılması prensibiyle çalışır.



- Esco, CelCulture CO₂ inkübatörü

Homojen hava dolaşımı ile kararlı kabin sıcaklığı istenilen sıcaklıkta ayarlanabilmektedir. CO₂ oranı kullanıcıya göre değiştirilebilir ve istenilen oranda sabit kalmaktadır.



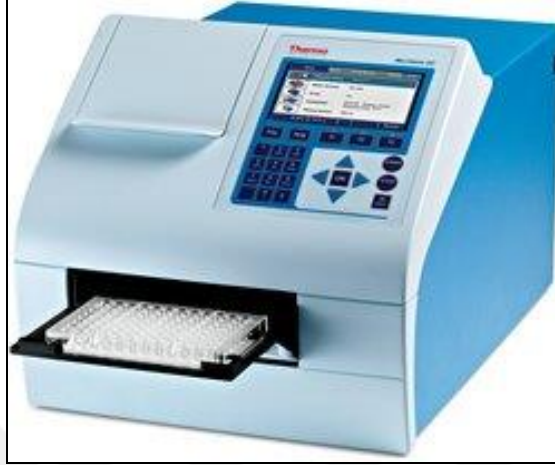
- Zeiss invert mikroskop

Hücre ve doku kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere ışık kaynağının üstte, objektiflerin ise altta olduğu ve çeşitli fokus ayarı olan örnek görüntüleme cihazıdır.



- Multiskan GO Microplate Spektrofotometre

DNA, RNA ve protein analizi gibi fotometrik araştırma uygulamalarında farklı dalga boylarındaki optik yoğunluğa göre numunedeki istenilen maddenin miktarı hakkında bilgi verir.



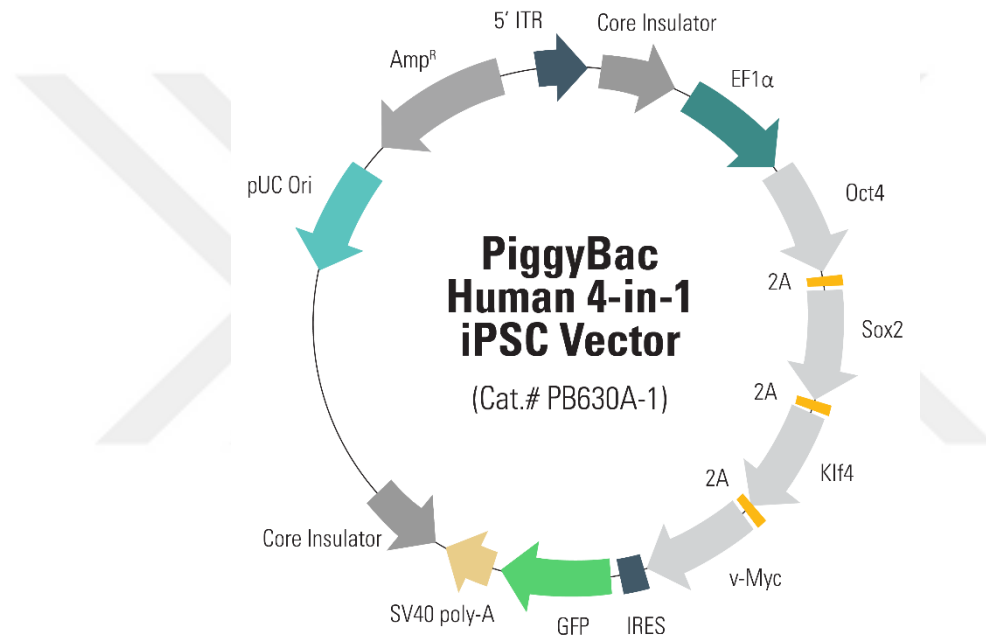
- AriaMx Real-time PCR System

Gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi floresan boyalar kullanılarak gerçekleşir. Floresan sinyali PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır.



3.4 Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc Gen Bölgelerini İçeren Plazmidin Çoğaltılması Ve Saflaştırılması

Çalışmada Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc gen bölgelerini taşıyan, amfisiline duyarlı plazmid kullanılarak fibroblast hücrelerini yeniden programlamak ve hücrelere pluripotent özellik kazandırılması amaçlanmıştır. Ayrıca plazmid üzerindeki GFP gen bölgesinin eksprese olmasıyla sentezlenen GFP floresan proteini transfeksiyon veriminin takibi amacıyla kullanılmıştır. Kullanılan plazmid yapısı Şekil 3.1 'deki gibidir.



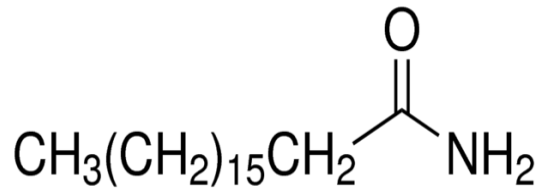
Şekil 3.1 Plazmid haritası

Çalışmada kullanılacak olan plazmitlerin çoğaltılması ve saflaştırılması için öncelikle plazmitler *E.coli JM109* suşuna transforme edilmiştir. Bakteri kültüründen tek koloni alınıp, glikoz içeren Luria- Bertani (LB) besiyerine ekim yapıldıktan sonra bakteri konsantrasyonu belli bir seviyeye ulaşınca kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık olarak 3-4 saat bekletilmiştir. Optik yoğunluk 600=0,4-0,5 aralığındayken 2500 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüjlenerak bakteri peleti elde edilmiş ve daha sonra elde edilen pelet 1,5 mL TSS (transformation storage solution) çözeltisinde çözdürülmüştür. *E. coli* çözeltisinden 300 µL alınarak üzerine 20 µL plazmit çözeltisinden ilave edilmiştir. 30 dakika buzda, 90 saniye 42° C'de ve daha sonra 2 dakika buzda bekletilmiştir. Üzerine 1

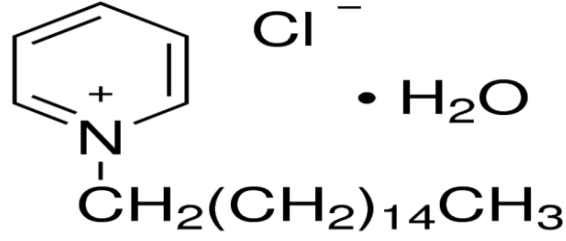
mL LBG (Luria- Bertani + %2 Gliserol) çözeltisi ilave edilerek 37° C’de 1 saat 250 rpm’de inkübe edilir. 100 µg amfisilin/mL içerenLB agar bulunduran petri kaplarına ekimi yapılmıştır. Daha sonra koloniler seçilerek antibiyotik içeren LB ortamında üretilir. Alkali liziz, adsorpsiyon, yıkama, desorpsiyon aşamalarından oluşan saflaştırma işlemi Qiagen Inc® firmasından temin edilen kit kullanılarak yapıldıktan sonra elde edilen DNA agaroz jelde yürütülmüştür. Saflık tayinlerinin belirlenmesi için Multiskan GO Microplate Spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları tespit edilmiştir.

3.5 Nanopartikül Sentezi

Nanopartiküller çözücü difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında gen taşınımı için nanopartiküllerin yük dağılımlarının 10-40mV arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada stearamid ve setilpiridinyum kullanılarak nano boyutlarda, katyonik yapıda partiküller elde edilmiştir. Bir yağ asidi olan stearamid ve katyonik amonyum bileşiği olan setilpiridinyum klorid yapısı Şekil 3.3’te gösterildiği gibidir. Katyonik stearamid: setilpiridinyum bazlı nanopartiküller su içerisinde tekli emülsiyon hazırlanarak aşağıda verilen koşullarda üretilmiştir.



Şekil 3.2 Stearamide kimyasal yapısı



Şekil 3.3 Setil piridinyum klorid kimyasal yapısı

Yöntemde lipid fazı için 0.75M stearamid ve 0.025M setilpiridinyum 4mL kloroform-metanol (1:1) çözücü sistemi içerisinde çözdürülmüştür. Sürfaktant fazı için 100 mL PBS tamponunda %2'lik (w/v) CTAB çözeltisi hazırlanmıştır. Lipid çözeltisi 1500 rpm'de manyetik karıştırıcı altında sürfaktant fazına Şekil 3.4'teki gibi damla damla pipetlenmiştir. Pipetasyon işlemi sonrasında lipid çözeltisinin sürfaktant fazına sonik prob altında (%30 amplitude, 50sn) Şekil 3.5'teki gibi homojenize edilmesiyle tekli emülsiyon hazırlanmıştır. Daha sonra nanopartikül çözeltisinden kloroform ve etanolü uzaklaştırmak için nanopartikül çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde 800 rpm'de 4-5 saat bekletilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 3.4 Nanopartikül sentez aşamaları

a) Lipid fazın sürfaktan fazına b) Tekli emülsiyon sistemi eklenmesi

Çözücüler ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra emülsiyon 5000 rpm’de 30 dk süre ile santrifüj edilmiş makro boyuttaki partiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısmı başka falkonlara aktararak 13000 rpm’de 1 saat süre ile santrifüj edilmiştir. Daha sonrasında nanopartiküller 30 dk 12000 rpm’de 2 kez santrifüj edilerek yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Son santrifüj sonrası elde edilen pellet üzerine yaklaşık 5 ml saf su eklenip pelletin çözünmesi sağlanmış ve bu nanopartikül çözeltisi -80°C’de bir gece bekletilmiş ve 48 saat süre ile -30°C’de liyofilize edilmiştir. Zeta sizer çalışmaları sonucunda elde edilen stearamid-setil piridinyum nanopartiküllerin yükleri beklenen düzeyin üzerinde veya altında olduğunda yapıdaki stearamide: setil piridinyum oranları değiştirilmiştir. Belirlenen oranlarda stearamide ve setil piridinyum içeren blend nanopartiküller hazırlanarak zeta sizer ile yükleri optimize edilmiştir.

3.6 Nanopartikül Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında, partikül boyutlarının dağılımı ve yüzey morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskopundan (SEM) yararlanılmıştır. Taramalı Elektron Mikroskobu’nda (SEM) elektron kaynağından elektronlar salınarak yüksek voltaj ile hızlandırılır. Elektron kaynağı olarak elektron tabancası kullanılmaktadır. Salınan elektronlar numune üzerine odaklanır ve bu elektron demeti numune yüzeyini taramaya başlar. Elektronlar ve numune atomları arasında oluşan etkiler uygun algılayıcılar tarafından toplanır. Bu bilgilerin sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla görüntü elde edilir.

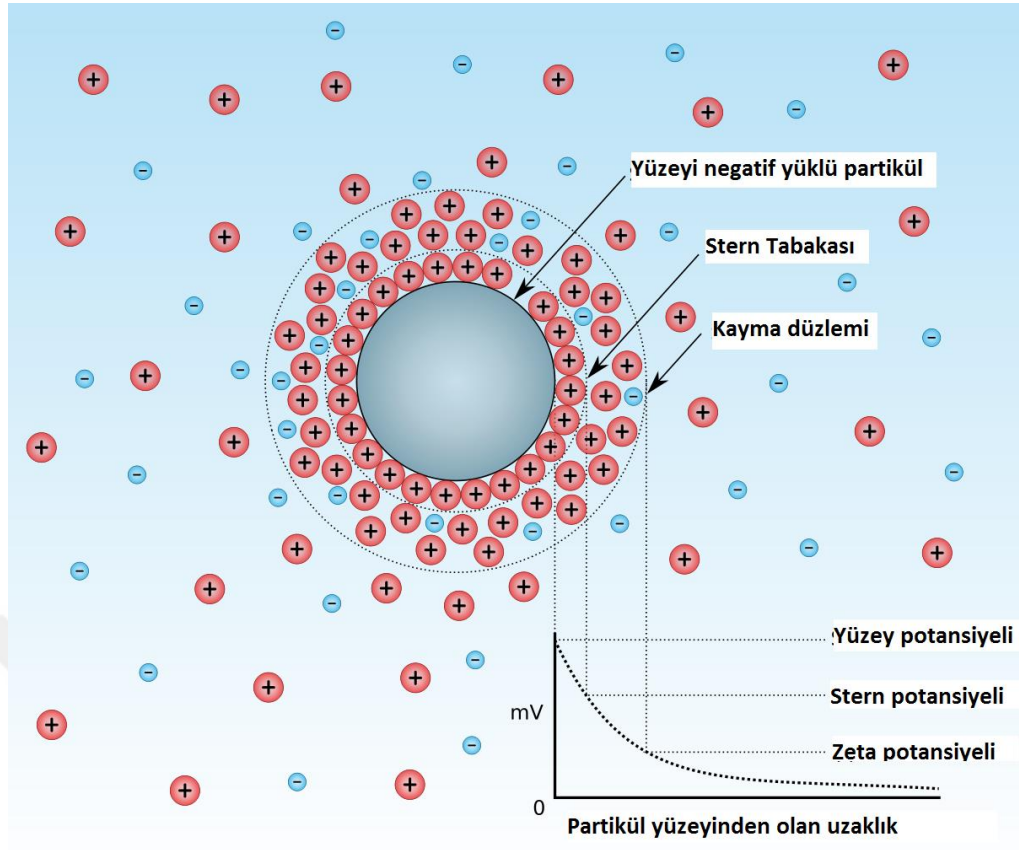
Stearamide: setil piridinyum klorid nanopartiküllerin yüzey morfoloji analizi SEM (Zeiss, EVO® LS 10) ile yapılmıştır. Katı formda elde edilen nanopartiküller karakterize edilmiştir. Nanopartiküllere 75 saniye boyunca 10 mA akım altında 1kV potansiyel uygulanarak ‘Spotter coater’ cihazıyla yüzeyi altın kaplanmıştır. Yüksek basınç koşulları altında ikincil elektron saptayan dedektör kullanılarak yüzey analizi yapılmıştır. İkincil elektron kaynağı olarak LaB₆ flaman kullanılmıştır. 1000x ve 3000x büyütme oranları arasında çalışılmıştır.

3.7 Nanopartikül/Plazmit Konjugatının Zeta Potansiyel Yükünün ve Partikül Boyutunun Ölçülmesi

Zeta-Sizer çalışmaları ile nanopartiküllerin yük ve zeta boy-boy dağılımları belirlenmiştir.

Hazırlanan nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarını hesaplamak için ZetaSizer (Malvern, Nano ZS) cihazı kullanılmıştır. Cihaz; Dinamik Işık Saçılması (DLS) yöntemini kullanarak ölçüm yapmaktadır. DLS, örnek çözeltinin küçük bir hacminden saçılan ışığın mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında değişiminin ölçülmesidir. Santrifüj sonrası distile su ile seyreltilmiş yaklaşık 1,5 ml hacimli nanopartikül çözeltisi zetasizer küvetine konulmuş ve sıcaklık kontrollü bir bölme içerisine yerleştirilmiştir. Küvet içerisindeki çözeltiden 633 nm’lik kırmızı lazer ışığının geçirilmesiyle saçılan ışık 90°’ye yerleştirilen dedektörler tarafından ölçülmüştür. Ölçülen ışık şiddeti elektronik sinyallere dönüştürülüp korelatöre gelir ve küçük zaman aralıklarında gelen bu sinyaller karşılaştırılır ve ışık şiddetinin değişim hızı hesaplanır. Işık şiddetindeki bu değişimler ölçülen bölgenin içinde ve dışındaki moleküllerin difüzyon hızıyla ilgilidir. Difüzyon ve partikül büyüklüğü arasındaki ilişki Brownian hareketi teorisiyle açıklanmaktadır. Bu teori baz alınarak küresel partiküllere ait difüzyon katsayısı fonksiyonlaştırılıp hidrodinamik çap hesaplanmaktadır [71].

Partikül boy ve boy dağılımının ölçülmesinde kullanılan Zetasizer cihazı partiküllerin zeta potansiyellerini de vermektedir. Bir sıvı içerisindeki parçacıkların bu sıvı ortamla arasında oluşturduğu zeta potansiyel, parçacıklar arasında itme ve çekme kuvvetlerinin oluşmasına neden olur. Aynı yükteki parçacıklar birbirini iterken farklı yükteki parçacıklar birbirini çeker. Bir parçacıktaki zeta potansiyeli belirlemek için belirli bir elektrik alan uygulanır ve Doppler prensibi kullanılarak elektrik alan içerisindeki parçacıkların hızının ölçümü Henry eşitliğiyle (3.1) hesaplanır [72]. Sıvı içerisinde bulunan parçacığın şematik gösterimi Şekil 3.6’daki gibidir.



Şekil 3.5 Zetasizer'da zeta potansiyeli ölçüm yönteminin şematik görüntüsü

$$\mu_e = (2\epsilon\zeta / 3\eta) \cdot F(ka) \quad (3.1)$$

μ_e : Elektroforetik hareketlilik

ζ : Zeta potansiyel (mV)

η : Viskozite (cP)

ϵ : Dielektrik sabiti

$f(ka)$: Henry fonksiyonu

K^{-1} : Elektriksel çift tabakanın kalınlığı (cm)

(ka) : Partikül yapının elektriksel çift tabaka kalınlığına oranı

3.8 Plazmid DNA'nın Nanopartikül Konjugatı ile L929 Hücrelerine Transfeksiyonu

Başarılı bir transfeksiyon için en önemli adım DNA'nın kalitesidir. Transfeksiyon için 260/280 nm'de ölçülen absorbans değerinin 1.8-2.0 aralığında olması gerekmektedir.

Büyüme ortamı; kullanılan hücre hattının çeşidine göre serumsuz DMEM, RPMI veya diğer besiyerlerinden seçilebilir. Bu çalışmada L929 hücre hattına transfeksiyon yapılacağı için DMEM besi yeri tercih edilmiştir. Adherent hücrelerin transfeksiyonu için optimum hücre yoğunluğunun %70-90 arasında olması gerekir. Hücrelerin transfeksiyon sırasında logaritmik büyüme evresinde olması gerekmektedir.

L929 hücre hattına transfeksiyon için serumsuz DMEM besiyeri, %10 FBS içeren DMEM besiyeri ve 6 well plate kullanılmıştır. Hücreler 24 saat önceden kuyucuklara ekilerek transfeksiyon anında logaritmik büyüme evresinde olması sağlanır. Her bir kuyucukta 4 mL besiyeri içerisinde 8×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılır. Etüvde 1 gece inkübasyona bırakılır. Transfeksiyondan bir saat önce serum içeren besiyeri, serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile değiştirilir. Sonrasında her bir well için 120 µg (120 µl) nanopartikül: 2 µg/ µl'den 8 µl plazmid DNA olacak şekilde nanopartikül (SCLN)-plazmid konjugat çözeltileri hazırlanır. Konjugat çözeltileri 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kuyucuklara aktarılır. Transfekte edilmiş hücreler karbondioksit inkübatöründe 4 saat süre ile plazmid-nanopartikül konjugatı ile etkileştirilir. 4 saat sonunda nanopartikül içeren besiyeri %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile değiştirilir. Plate 37°C %5 CO₂ ihtiva eden etüvde inkübasyona bırakılır. Transfeksiyon tayini hücrelerin GFP genini eksprese etmesiyle yaydığı GFP ışması ile, floresan ataçmanlı inverted mikroskopla 3 gün boyunca takip edilmiştir.

3.9 Nanopartikül-Plazmid Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyon etkinliği, transfekte olan hücrelerdeki plazmid genlerinin transkripsiyonunun RT-qPCR yöntemi kullanılarak gözlemlenmesi ve sentezlenen GFP (green fluorescent protein) bağlı proteinlerin varlığının floresan mikroskop altında 24-72 saat boyunca görüntülenmesiyle belirlenmiştir.

3.9.1 Floresan mikroskop ile GFP ekspresyonunun takibi

Hücre ve moleküler biyolojide, yeşil floresan proteini (GFP) geni sıklıkla repörtör bir gen olarak kullanılmaktadır. Bu genin ekspresyonu sonucu oluşan protein floresan ışık altında yeşil ışımaya saçar. Yeşil floresan protein(GFP) ekspresyonu sağlayan plazmid

DNA'ların hücre içine girişi GFP ekspresyonunun floresan atmaçlı invert mikroskop ile 3 gün süreyle takip edilir ve transfeksiyon verimi transfekte olmuş hücrelerin toplam hücre sayısına oranı ile hesaplanır.

3.9.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi

RNA izolasyonu

GeneJET RNA purification kiti kullanılarak transfekte edilen hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sırasında kullanılan bütün pipet uçları ve ependorf tüplerin RNase free olmasına dikkat edilmiştir. Hücreler PBS veya tripsinli ortamda kültür plaklarından kaldırılarak alındıktan (1×10^6 hücre) sonra mikrosantrifüj tüplerine aktarılır. 5 dk $250 \times g$ 'de santrifüj edilerek supernatant atılır. Elde edilen pellet (hücreler) 600 μ L lizis tamponu (14.3M β -mercaptoethanol ya da 2M DTT içeren) eklenerek 10 s vortekslenir. Üzerine 360 μ L etanol (%96-100) ilave edildikten sonra pipetlenerek karıştırılır ve bu solüsyondan izolasyon kolonlarına 700 μ L alınarak 1 dk $12000 \times g$ 'de santrifüj edilir. Kolon tarafından tutulan RNA molekülleri, yıkama solüsyonu I 'den 600 μ L ve yıkama solüsyonu II'den 200 μ L eklenerek yıkanır, her yıkama aşaması sonrasında 2 dk $12000 \times g$ 'de santrifüj edilir. RNA moleküllerini kolondan ayırmak için 100 μ L su (nükleaz-free) eklenerek 1 dk $12000 \times g$ 'de santrifüj edilir. Elde edilen RNA örnekleri kullanılmak üzere -20°C ya da -70°C 'de saklanır.

cDNA eldesi

First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak RNA'dan cDNA elde edilmiştir. 1 μ L dsDNAz tamponuna (10X), 1 μ L dsDNAz ve RNA (1 pg – 5 μ g) eklenir ve üzerine su (nükleaz-free) ilave edilerek son hacim 10 μ L'ye ile tamamlanır. Yavaşça çalkalandıktan sonra 2 dk 37°C ' de inkübe edilir. Örnek buza alınır ve solüsyon II eklenerek (4 μ L 5X reaksiyon karışımı, 2 μ L enzim karışımı ve 4 μ L nükleaz-free su) 10 dk 25°C 'de ve 15 dk 50°C 'de sonrasında 5 dk 85°C 'de inkübe edilir. cDNA örnekleri kullanılmak üzere -20°C ya da -70°C 'de saklanır.

Kantitatif PCR (RT-qPCR)

Eun Young ve arkadaşları tarafından kullanılan primerler ile cDNA örneklerinden Oct3/4, Sox2, Klf4 ve v-Myc gen bölgeleri hedeflenmiştir. RT-qPCR reaksiyonu için SYBR

Green temelli qPCR kiti kullanılmıştır. Reaksiyonda pozitif kontrol olarak GAPDH mRNA bölgesi hedeflenmiştir.

3.10 Transfekte Olmuş Hücrelerin Matrijele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi

Primer kök hücreleri, özel saklama koşullarında ve spesifik büyüme matrislerinin kullanımıyla diğer hücre gruplarına farklılaşmadan muhafaza edilebilmektedir. Kök hücreler için bazal membran matrisi olarak kullanılan ve bir protein karışımından oluşan Matrijel, jelatinimsi yapıda olup kök hücreleri farklılaşmamış halde korumaktadır. Transfeksiyon sonrası fibroblast hücreleri tripsin yardımıyla kuyucuklardan kaldırılır ve matrijel ile kaplanmış plate ekilir. Matrijel üzerine ekimi yapılan hücrelerden, özel büyüme matrislerinin kullanımıyla uyarılmış pluripotent kök hücre eldesi desteklenmiş olur.

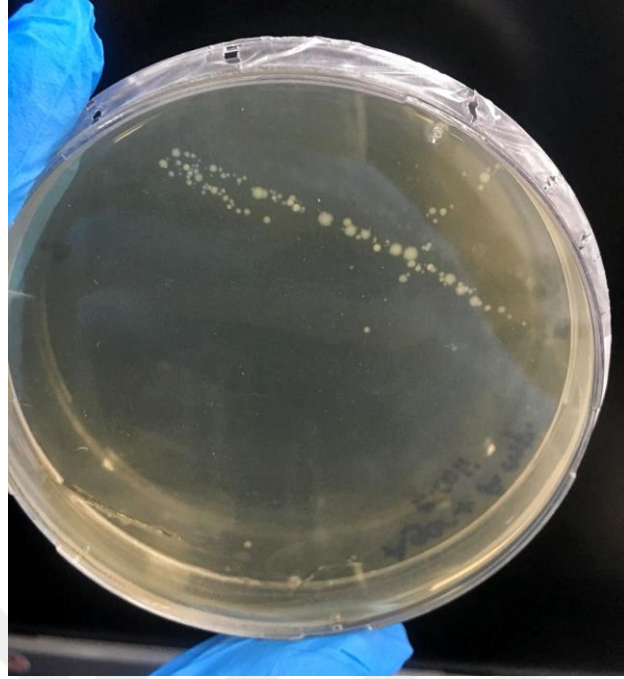
UPK hücreleri için içeriğinde 10 ng / mL bazik fibroblast büyüme faktörü, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler ve 100 mM b-merkaptoetanol bulunduran, %10 KnockOut Serum ve 1X GlutaMax içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's) besiyeri hazırlanır. Kullanılmadan önce buz üzerinde 2 saat boyunca tutularak eritilen matrijel 24 well plate üzerindeki her bir kuyucuğa 500µl olacak şekilde aktarılır. 10dk 37°C'de bekletilir. Tripsin yardımıyla plakalardan kaldırılan transfekte hücreler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre peleti üzerine 1 mL UPK mediumdan eklenerek pelet çözülür. Çözülen hücreler 37 °C'de bekletilen matrisjel üzerine dikkatli bir şekilde yavaşça ekilir. Ekimi yapılan hücreler 37°C'de, %5 CO₂ ihtiva eden etüvde konflüe oluncaya kadar kültüre edilir. Matrijel üzerindeki hücrelerin morfolojik değişimleri 7 gün boyunca invert mikroskop ile takip edilir.

4.1 Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc Gen Bölgelerinin İçeren Plazmidin Çoğaltılması Saflaştırılması

Çalışmada Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan, amfisiline duyarlı plazmid kullanılmıştır. Plazmidlerin çoğaltılması için öncelikle plazmitler *E.coli JM109* suşuna transforme edilmiştir.

Bakteri kültüründen tek koloni alınıp, glikoz içeren LB besiyerine ekim yapıldıktan sonra bakteri konsantrasyonu belli bir seviyeye ulaşınca kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık olarak 3-4 saat bekletilmiştir. Optik yoğunluk $600=0,4-0,5$ aralığındayken 2500 g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüjlenerek bakteri peleti elde edilmiş ve daha sonra elde edilen pelet 1,5 mL TSS (transformation storage solution) çözeltisinde çözdürülmüştür. *E. coli* çözeltisinden 300 μL alınarak üzerine 20 μL plazmit çözeltisinden ilave edilmiştir. 30 dakika buzda, 90 saniye 42°C 'de ve daha sonra 2 dakika buzda bekletilmiştir. Üzerine 1 mL LBG çözeltisi ilave edilerek 37°C 'de 1 saat 250 rpm'de inkübe edilmiştir.

Amfisilin ilaveli LB agar bulunduran petri kaplarında koloni oluşumu gözlenmiştir. Seçici besiyerinde çoğalan bakteri kolonileri plazmid DNA'yı genomunda bulundurmaktadır. Seçici besiyerinde çoğalan bakteriler Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



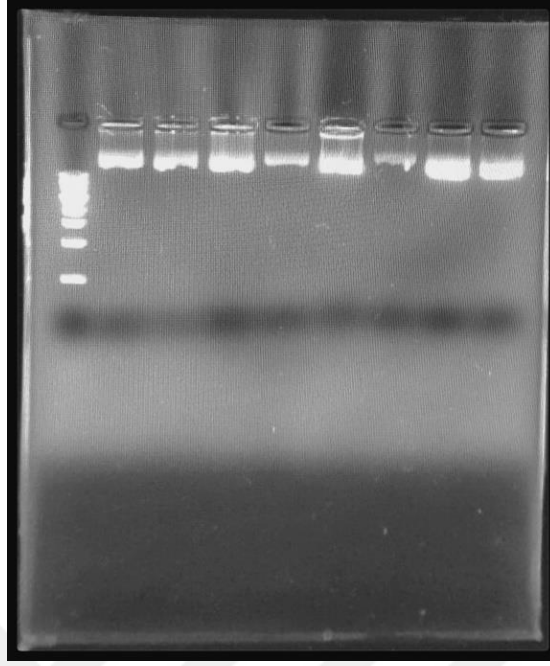
Şekil 4.1 Amfisilinli besiyerinde çoğalan bakteri kolonileri

Tek koloni halinde bulunan bakterilerden bir öze yardımıyla koloni seçilerek LB sıvı besi yerine aktarılmıştır. Bir gece boyunca inkübe edildikten sonra spektrofotometre ile 625 nm’de optik yoğunluğu (OD) ölçülmüştür. OD değeri 1.702 bulunmuştur. Besiyeri dilüe edilerek spektrofotometre ile yapılan 2. ölçüm sonucu absorbans değeri 0.507 elde edilmiştir.

Qiagen Inc® firmasından temin edilen izolasyon kiti ile plazmid saflaştırma işlemi firmanın önerdiği prosedürüne göre yapılmıştır.

Elde edilen plazmid DNA’lar Thermoscientific mikroDrop ile 260nm ve 280nm dalga boyundaki optik yoğunlukları ölçülmüş, saflık analizi için 260/280 değerleri tespit edilerek DNA saflıkları ve konsantrasyonları hesaplanmıştır. İzole edilen 7 plazmidin 260/280 değerleri sırasıyla 1.7, 1.8, 1.7, 1.8, 1.8,1.7,1.9, 1.7 olarak bulunmuştur. Tüm izole plazmid örnekleri transfeksiyonda kullanılmaya uygun saflık değerlerindedir.

Elde edilen plazmid DNA’lar ikinci tayin için (1Kb)marker ile %1’lik agaroz jelde 100V 30dk yürütülmüş, UV ışık altında görüntülenmiştir. Şekil 4.2’de plazmid DNA’lara ait agaroz jel görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.2 Plazmid DNA Agaroz jel görüntüsü

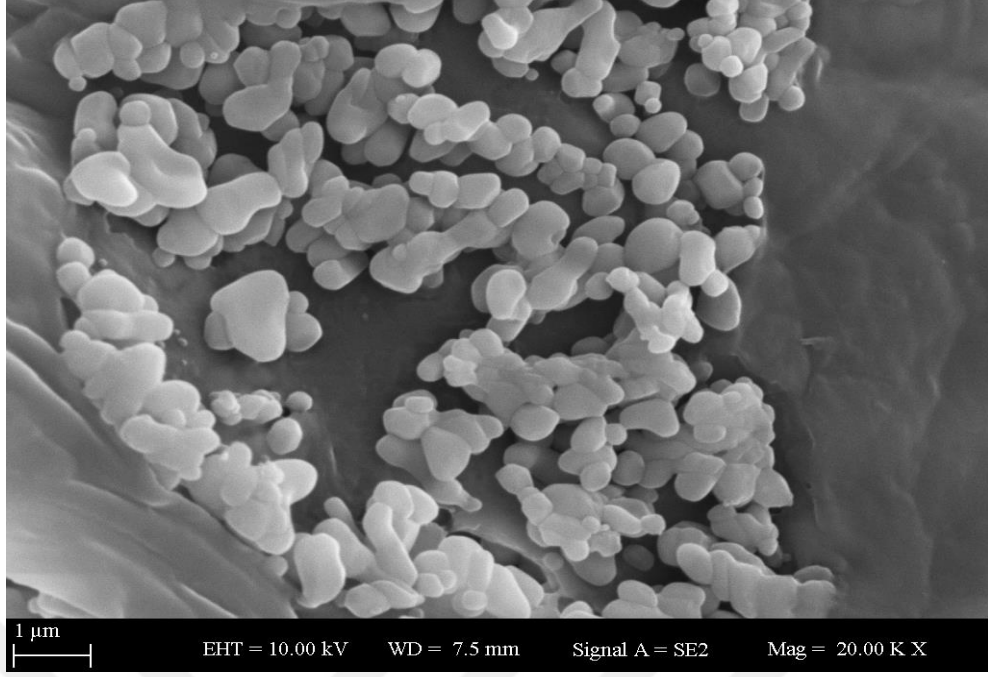
Agaroz jel görüntüleri ve saflık değerleri değerlendirildiğinde plazmit DNA'ların transfeksiyon çalışmalarında kullanılması uygun görülmüştür.

4.2 Nanopartikül Karakterizasyonu

Çalışmada gen aktarımında kullanılması amacıyla lipid yapıda katyonik nanopartiküller çözücü difüzyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Partiküllerin morfolojik yapısının ve boyutlarının tayin edilmesi için Sem analizi yapılmıştır.

Stearamide: setil piridinyum klorid nanopartiküllerin yüzey morfoloji analizi SEM (Zeiss, EVO® LS 10) ile yapılmıştır. Nanopartiküllere 75 saniye boyunca 10 mA akım altında 1kV potansiyel uygulanarak yüzeyi altın kaplanmıştır. 1000x ve 3000x büyütme oranları arasında çalışılmıştır.

Nanopartiküllerin morfolojik yapısı ve boyutları Şekil 4.3'te gösterildiği gibidir.



Şekil 4.3 Katyonik nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü

Nanopartiküllerin negatif yüklü DNA ile elektrostatik bir etkileşim oluşturacak şekilde pozitif yükle olabilmesi ve hücre zarından geçebilecek boyutta olabilmesi amacıyla zeta potansiyeli ve partikül boyutu üzerine karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Elde edilen nanopartiküllerin Zeta-Sizer (Malvern) ölçümleri Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Stearamid bazlı nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri

Formulasyon	Yapı		Parçacık Boyutu (nm)	Polydispersity index	Zeta Potansiyel (mV)
SSLN 29	Stearamid Tween 80	% 0.125 % 3	826.5±18.44	3.78±0.10	2.77±3.29
SSLN 30	Stearamid Tween 40	% 0.125 % 3	760.1±30.42	0.44±0.20	5.16±4.06
SSLN 31	Stearamid SDBS	% 0.125 % 1	557.6±25,04	0.376±0.09	28.1±5.3
SSLN 41	Stearamid Setilpiridinyum Tween 40	% 0.09 % 0.03 % 4	216.2±2.72	0.25±0,11	16.02±2.50
SSLN 58	Stearamid Setilpiridinyum CTAB	% 0.06 % 0.06 % 0.3	217.8±5.68	0.353±0.02	46.7±8.21
SCLN 63	Stearamid Setilpiridinyum CTAB	% 0.08 %0.04 % 0.2	173.6±13.91	0.257±0.05	36.5±0.06

Nanopartiküllerden 100 µg/mL distile su içerisinde stok çözeltiler hazırlandıktan sonra 25 °C’de ZetaSizer (Malvern, NanoZS) cihazı kullanılarak partikül boyutları ve yükleri ölçülmüştür.

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere nanopartikül yük ve boyutları kullanılan sürfaktan cinsine ve miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada, DNA ile etkileşebilecek pozitif yükte ve hücre zarından geçebilecek boyutta nanopartiküllerin sentezlenmesi amacıyla nanopartiküllerin pozitif yükünü arttırmaya, boyutlarının ise azaltılmasına yönelik sentez aşamasında çeşitli manipülasyonlar yapılmıştır.

SSLN 29 nanopartikülünde sürfaktant olarak Tween 80 kullanıldığında nanopartikül boyutu 826.5 ± 18.44 nm iken SSLN 30 nanopartikülünde sürfaktant olarak Tween 40 kullanıldığında boyut 760.1 ± 30.42 nm olarak saptanmıştır. SSLN 31 nanopartikülünde ise sürfaktant olarak SDBS kullanıldığında boyut daha da azaltılmış fakat yük de aynı şekilde azalarak negatif yüklenmiştir. Yükü arttırmak adına yapıya setilpiridinyum klorid eklenmiştir. Yapısı gereği lipidler agregre olmaya eğilimli olduklarından nanopartikül sentezi sırasında partikül çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde 1 gece tutulmak yerine 4-5 saat tutulmuştur. SSLN 41 nanopartikülünde görüldüğü üzere nanopartikül boyutu 216.2 ± 2.72 nm iken zeta potansiyeli $+16.02 \pm 2.50$ mV olarak belirlenmiştir. Nanopartikülün DNA ile etkileşimi gerçekleştirildikten sonra hücre zarından rahatlıkla geçebilmesi için aynı şekilde pozitif yükünü koruması gerekmektedir. Bu sebeple sentez sırasında katyonik sürfaktant olarak bilinen CTAB (setil trimetil amonyum bromid) yapıya dahil edilmiştir. SSLN 58 katyonik nanopartikülde boyut 217.8 ± 5.68 nm, zeta potansiyeli ise $+46.7 \pm 8.21$ mV olarak belirlenmiştir. Fazla pozitif yük, hücrelere toksik etki gösterdiğinden SSLN 63 katyonik nanopartikülde stearamid: setil piridinyum oranı ve sürfaktan oranı değiştirilerek yüzey yükü azaltılmıştır. Bu çalışmada fibroblast hücrelerinin transfeksiyonunda kullanılmak üzere hücreye toksik etki yaratmaması ve verimliliğin yüksek olması amacıyla SSLN 63 nanopartikülü tercih edilmiştir.

Daha önceki çalışmalara bakılarak lipid nanopartiküllerin kullanıldığı alanlar incelenmiştir. Vighi ve arkadaşları (2007); katı lipid nanopartiküllerin dondurularak kurutma işlemi öncesi ve sonrasında gen bağlama etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli yağ asitlerinden nanopartiküller sentezlemişlerdir. Bu çalışma kapsamında sentezlenen stearik asit lipid nanopartikülün boyutu 209 ± 23 nm iken zeta potansiyeli $+39.9 \pm 9.7$ mV olarak ölçülmüştür. Kim ve arkadaşları (2008); PC3 hücrelerine (insan prostat kanser hücreleri) siRNA aktarımını gerçekleştirmek amacıyla sentezledikleri katı lipid nanopartikülün zeta potansiyeli $+41.76 \pm 2.63$ mV iken partikül boyutu 117 ± 12 nm olarak belirlemişlerdir.

4.3 Nanopartikül/Plazmit Konjugatının Zeta Potansiyel Yükünün ve Partikül Boyutunun Ölçülmesi

Nanopartiküllerin DNA ile elektrostatik bir etkileşim oluşturabilmesi amacıyla katyonik yapıda olmaları esas alınmıştır. Ayrıca transfeksiyon verimliliğini arttırmak adına nanopartikül plazmid konjugatlarının pozitif yüklü olmaları tercih edilmiştir. Katyonik nanopartiküller plazmid DNA'sıyla etkileştirildikten sonra elde edilen nanopartikül/plazmit DNA konjugatlarının Zeta-Sizer (Malvern) ölçümleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

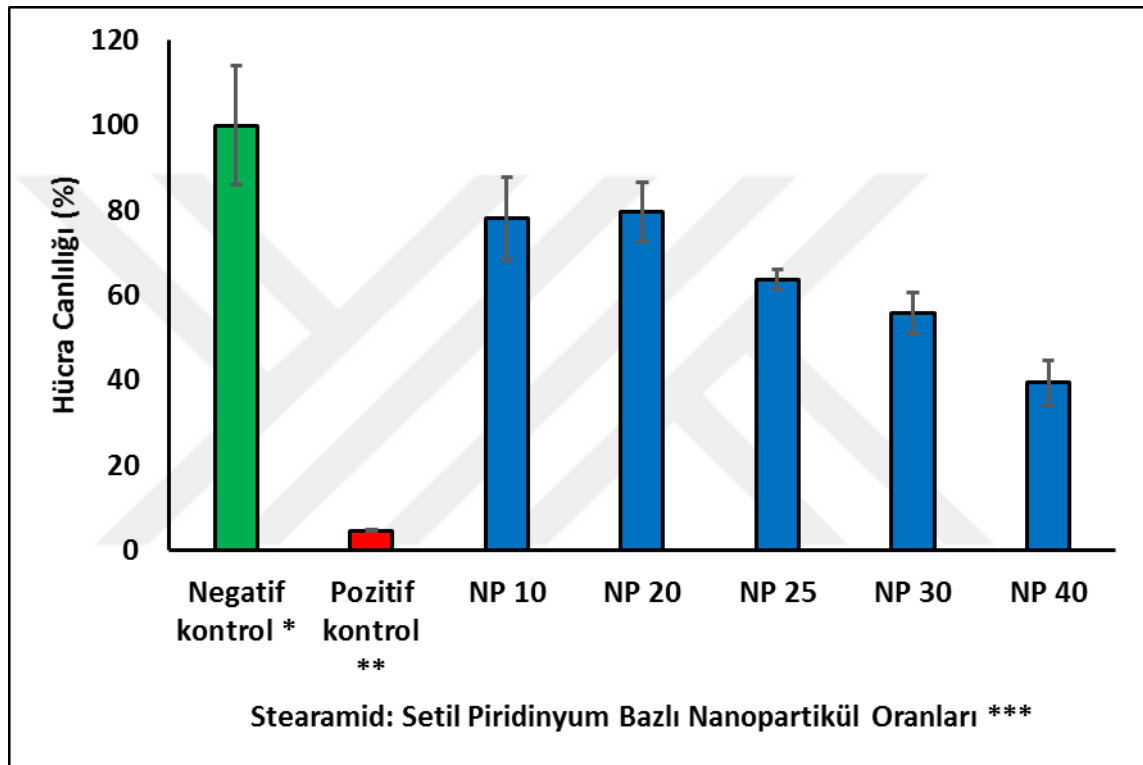
Çizelge 4.2 Nanopartikül/plazmid DNA konjugatlarının partikül büyüklükleri ve zeta potansiyeli

SSLN-DNA Konjugat	SSLN	DNA	Parçacık Boyutu (nm)	Polydispersity index	Zeta Potansiyel (mV)
Konjugat 1	32 µg (SSLN 41)	1 µg DNA	461.1±35.30	0.34±0.04	-23.1±5.3
Konjugat 2	30 µg (SSLN 58)	1 µg DNA	270.0±35.1	0.4±0.05	25.0±1.75
Konjugat 3	40 µg (SSLN 63)	2 µg DNA	713.8±10.4	0.42±0.02	14.9±0.361

Nanopartikül/plazmid DNA kompleksinin zeta potansiyeli ve boyutu kullanılan nanopartikülün zeta potansiyeli ve boyutuna bağlı olarak değişmektedir. Nanopartikül yükü yüksek bir pozitif değerde olduğunda nanopartikül/plazmid konjugatının da yükü pozitif değerde olmaktadır. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi SSLN 41 nanopartikülü plazmid DNA etkileştirildiğinde konjugatın zeta potansiyeli -23.1±5.3 mV olarak ölçülmüştür. SSLN 58 nanopartikülü kullanıldığında ise konjugatın zeta potansiyeli 25.0±1.75 mV olarak ölçülmüştür. Pozitif yükten kaynaklı hücre toksisitesini azaltmak için SSLN 63 nanopartikülü tercih edildiğinde ise zeta potansiyel 14.9±0.361 mV olarak ölçülmüştür.

4.3.1 SSLN'nin in vitro sitotoksitesinin değerlendirilmesi

SSLN'nin, L929 fibroblast hücreleri üzerindeki in-vitro sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla MTT testi yapılmıştır. L929 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren DMEM besi yerinde; 37°C'de, %5 CO₂ atmosferinde 24 saat boyunca kültüre edilmiştir. 96 well plate üzerinde beş tekrarlı gerçekleştirilen deney için her kuyu üzerine farklı konsantrasyonlarda SSLN eklenerek inkübatörde 24 saat boyunca nanopartikül ve fibroblast hücreleri etkileştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4'de verildiği gibidir.



Şekil 4.4 Stearamid: Setil piridinyum bazlı nanopartiküllerin in vitro sitotoksite sonuçları

(*) Negatif kontrol olarak DMEM besiyeri, (**) pozitif kontrol olarak %1 DMSO kullanılmıştır. (***) NP 10, NP 20, NP 25, NP 30, NP 40 kodlu nanopartiküllerde sırasıyla 10,3, 20,6, 25,75, 30,9 ve 41,2 µg nanopartikül kullanılmıştır.

L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT sonuçlarına (Şekil 4.4) göre negatif kontrolün 570 nm'de ölçülen optik absorbans değeri %100 hücre canlılığı olarak baz alınmıştır. Hücreler, 10,3 µg SSLN ile etkileştirildiğinde %78,1, 20,6 µg SSLN ile etkileştirildiğinde %79,5, 25,75 µg SSLN ile etkileştirildiğinde %63,6, 30,9 µg SSLN ile etkileştirildiğinde %55,8, 41,2 µg SSLN ile etkileştirildiğinde %39,5 hücre canlılığı tespit edilmiştir.

SSLN'nin 41,2 µg kullanımına kadar hücreler üzerinde artan bir toksik etki bulundurduğu belirlenmiştir.

Gen aktarımında kullanılmak üzere çalışılan katyonik lipidler ile ilgili literatür çalışmalarında çeşitli sitotoksikite testleri yapılmıştır. H. Lv ve arkadaşları (2006) katyonik lipid miktarı arttırıldıkça yapıdaki amin gruplarından dolayı hücre üzerindeki toksik etkinin arttığını saptamışlardır. Ayrıca pozitif yük arttıkça sitotoksitenin de arttığını belirtmişlerdir. Sung Hee Choi ve arkadaşları (2007), P53 tümör baskılayıcı geninin akciğer kanseri hücrelerine aktarılması amacıyla sentezledikleri katyonik lipid nanopartikülleri H1299 hücreleri (insan akciğer kanseri hücreleri) ile etkileştirdiklerinde hücrelerin %80 canlılıkla sağ kaldıklarını göstermişlerdir. Vighi ve arkadaşlarının (2010) katyonik lipid nanopartiküllerin plazmid DNA ile etkileşme kapasitesi ve gen aktarım özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada Na1300 hücre (fare nöroblastom hücreleri) hattı ile sitotoksikite testi yapılmıştır. Bu çalışmaya göre katyonik nanopartiküller nöroblastom hücreleri ile etkileştirdiklerinde hücre canlılığının etkileşim süresine ve plazmid DNA ile etkileştirilen nanopartikül miktarına ters orantılı olacak şekilde değiştiğini belirlemişlerdir. 0,8 mg nanopartikül ile 24 saat boyunca etkileşen hücrelerin canlılığı %20 olarak gösterilmiştir.

4.4 Saflaştırılan Plazmidlerin Nanopartikül Konjugatı ile L929 Fibroblast Hücre Hattına Transfeksiyonu

L929 hücre hattına transfeksiyon için serumsuz DMEM besiyeri, %10 FBS içeren DMEM besiyeri ve 6 well plate kullanılmıştır. Her bir kuyucuk içerisinde 8×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmış ve 24 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Serum, transfeksiyon veriminin ve gen ekspresyonunun azalmasına neden olduğu için transfeksiyondan bir saat önce serum içeren besiyeri, serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile değiştirilmiştir. Sonrasında her bir well için 120 µg (120 µl) nanopartikül: 2 µg/ µl'den 8 µl plazmid DNA olacak şekilde nanopartikül (SCLN)-plazmid konjugat çözeltileri hazırlanmıştır. Konjugat çözeltileri 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kuyucuklara aktarılmış ve transfekte edilecek hücreler karbondioksit inkübatöründe 4 saat süre ile plazmid-nanopartikül konjugatı ile etkileştirilmiştir. 4 saat sonunda nanopartikül içeren besiyeri %10 FBS içeren DMEM

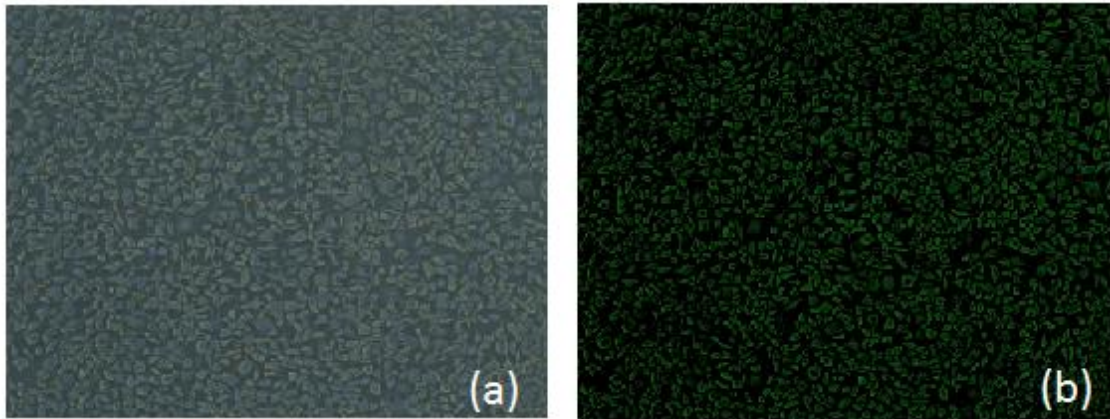
besiyeri ile değiştirilmiştir. Plate 37°C %5 CO₂ ihtiva eden etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon tayini hücrelerin GFP genini eksprese etmesiyle yaydığı GFP ışması ile, floresan ataçmanlı inverted mikroskopl 3 gün boyunca takip edilmiştir.

4.5 Nanopartikül-Plazmid Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

4.5.1 GFP Işımasının Takip Edilmesiyle Transfeksiyon Verimliliğinin Değerlendirilmesi

Taşıyıcı vektör ile aktarılan genlerin hücreye aktarılması ve hücrede eksprese edilmesi gen aktarımının başarı bir şekilde gerçekleştiğini gösterir. Gen ekspresyonunun tayini ise plazmid DNA üzerinde bulunan GFP gen bölgesinin hücrelerde eksprese olduktan sonra yaydığı yeşil ışığın gözlemlenmesiyle belirlenir.

Transfekte olmuş hücrelerde GFP ekspresyonu, floresan mikroskop ile takip edildiğinde 24. saatte en fazla olduğu saptanmıştır. L929 fibroblast hücrelerinin 24. saatte çekilmiş faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5Transfekte olmuş L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri

(a): 10x faz kontrast (b): 10x floresan

Literatür taraması yapıldığında Pedraza ve arkadaşları (2008) NIH/3T3 fibroblast hücreleri ve MC3T3-E1 osteoblast hücrelerinin transfeksiyonu için kalsiyum fosfat nanopartikülleri kullanmışlardır. NIH/3T3 fibroblast hücrelerinin transfeksiyon verimliliği % 40-50 arasında değişirken MC3T3-E1 osteoblast hücreleri için bu oranın

arttığını göstermişlerdir. Kievit ve arkadaşları C6 glioma hücrelerinin transfeksiyonu için demir oksit nanopartiküller kullanmışlardır. Transfeksiyon verimini artırma amaçlı farklı polimerlerle DNA'yı kaplayarak nanopartikül aracılığıyla aktarımını sağlamışlardır. Yapılan çalışmada transfeksiyon verimliliği kullanılan polimere göre değişim göstermiştir. NP-Kitosan-Polietilenimin(PEI)-DNA kompleksinin transfeksiyon verimliliğinin % 45.2 olduğunu göstermişlerdir.

İnvert mikroskop ile 3 gün boyunca incelenen hücrelerden floresan mikroskop ve faz kontrast görüntüleri alınmıştır. Bu görüntüler üzerinden yapılan hücre sayımı ile transfeksiyon verimi hesaplanmıştır. Farklı bölgelerden alınan ve 3 tekrar ile gerçekleştirilen hücre sayımı ile transfeksiyon verimliliği formül 1 kullanılarak hesaplanmıştır. Formül 1 kullanılarak 3 tekrarlı yapılan çalışmada hesaplanan transfeksiyon verimliliği %70 olarak bulunmuştur.

(4.1)

$$\text{Transfeksiyon Verimi \%} = \frac{\text{Transfekte Hücre Sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

4.5.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi

GeneJET RNA purification kiti kullanılarak transfekte edilen hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen mRNA örneklerinden 3'er µl alınarak mikroDrop plate üzerine aktarılmış ve 230 nm, 260 nm ve 280 nm'de optik yoğunlukları ölçülerek saflık ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır. Negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Sonuçlar, iki tekrarlı yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. RNA saflık analizini belirlemek için, 260/280 ve 260/230 oranları hesaplanmalıdır. 260/280 oranı nükleik asitlerde ~1.8 olduğunda, DNA ve RNA için ~2.0 olduğunda saflık veriminin en yüksek değerde olduğu kabul edilir. 260/230 oranının ise 1.8-2.2 aralığında olduğunda örnekler saf olarak değerlendirilir.

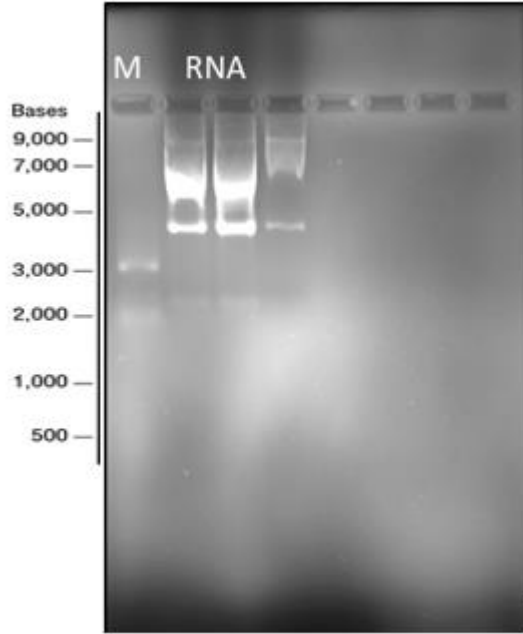
mRNA konsantrasyonu formül (4.2) ile aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır.

4.2

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times 100 (\text{dilüsyon faktörü}) \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Uygun saflıkta bulunan izole mRNA'ların 260/280 değeri 2.1, 260/230 değeri 2.1 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen mRNA örnekleri ikincil tayin için %1.5'luk agaroz jelde 70V 1 saat süreyle yürütülmüştür. Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.6' te gösterildiği gibidir.

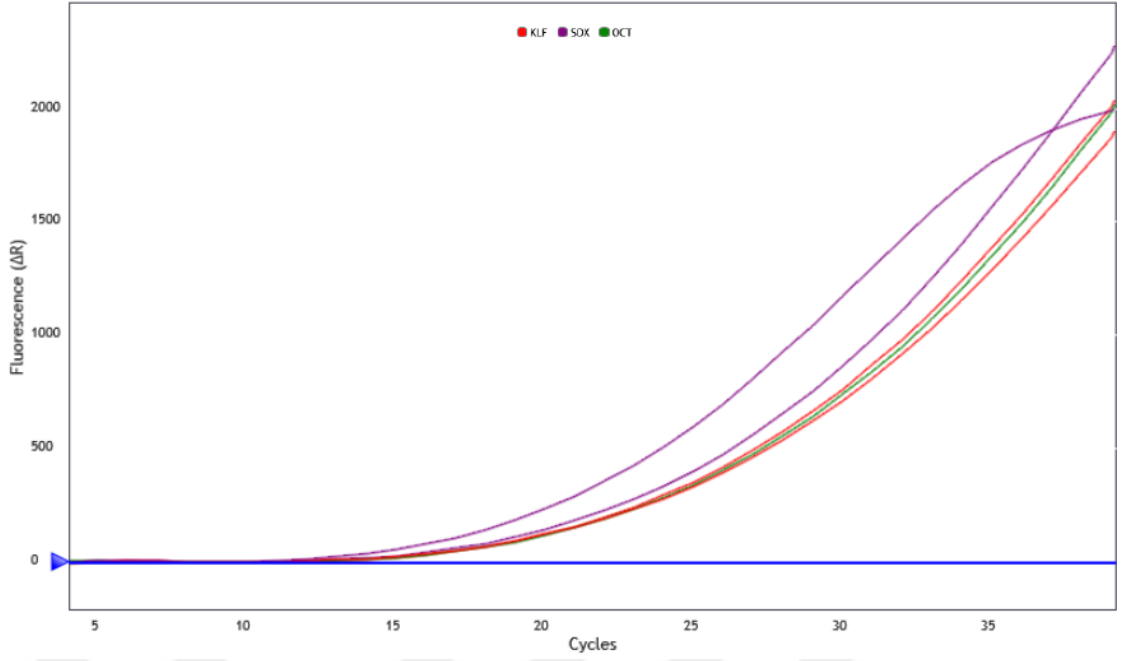


Şekil 4.6 mRNA jel görüntüsü

4.5.3 cDNA eldesi ve RT-qPCR

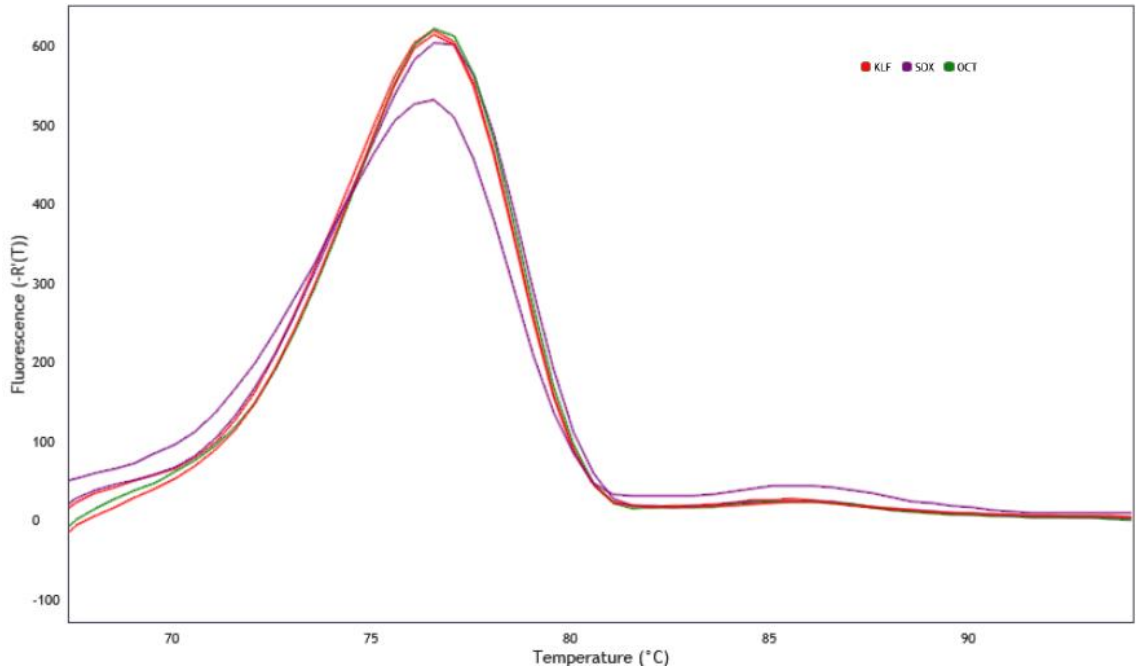
First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak elde edilen RNA'dan cDNA elde edilmiştir.

cDNA örneklerindeki Klf4, Oct4, Sox2 gen bölgeleri, özel primer çiftleri ve SYBR Green temelli qPCR kiti ile Real-Time PCR(AriaMx) cihazında iki tekrarlı çoğaltılarak analiz edilmiştir. Reaksiyonda pozitif kontrol olarak GAPDH mRNA bölgesi hedeflenmiştir. Amplifikasyon grafiği Şekil 4.6'da verilmiştir. Ekprese olan Klf4, Oct4 ve Sox2 gen bölgelerinin erime grafiği Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7 Klf4(Kırmızı) , Sox2(Mor), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri amplifikasyon grafiği

Gen bölgelerinin ikili tekrarları aynı renklerle gösterilmiştir. Mavi ile gösterilen çizgi eşik değeri çizgidir. Klf4 (Ct ort:13,41) , Sox2 (Ct ort:12,4), Oct4 (Ct ort:13,77) en bölgelerinde 12. döngüden sonra artış gözlenmiştir. Yeniden programlama faktörleri olarak bilinen Klf4, Oct4, Sox2 gen bölgelerinin transfekte hücrelerde mRNA düzeyinde eksprese olduğu Şekil 4.7’de verilen amplifikasyon grafiği ile gösterilmiştir.

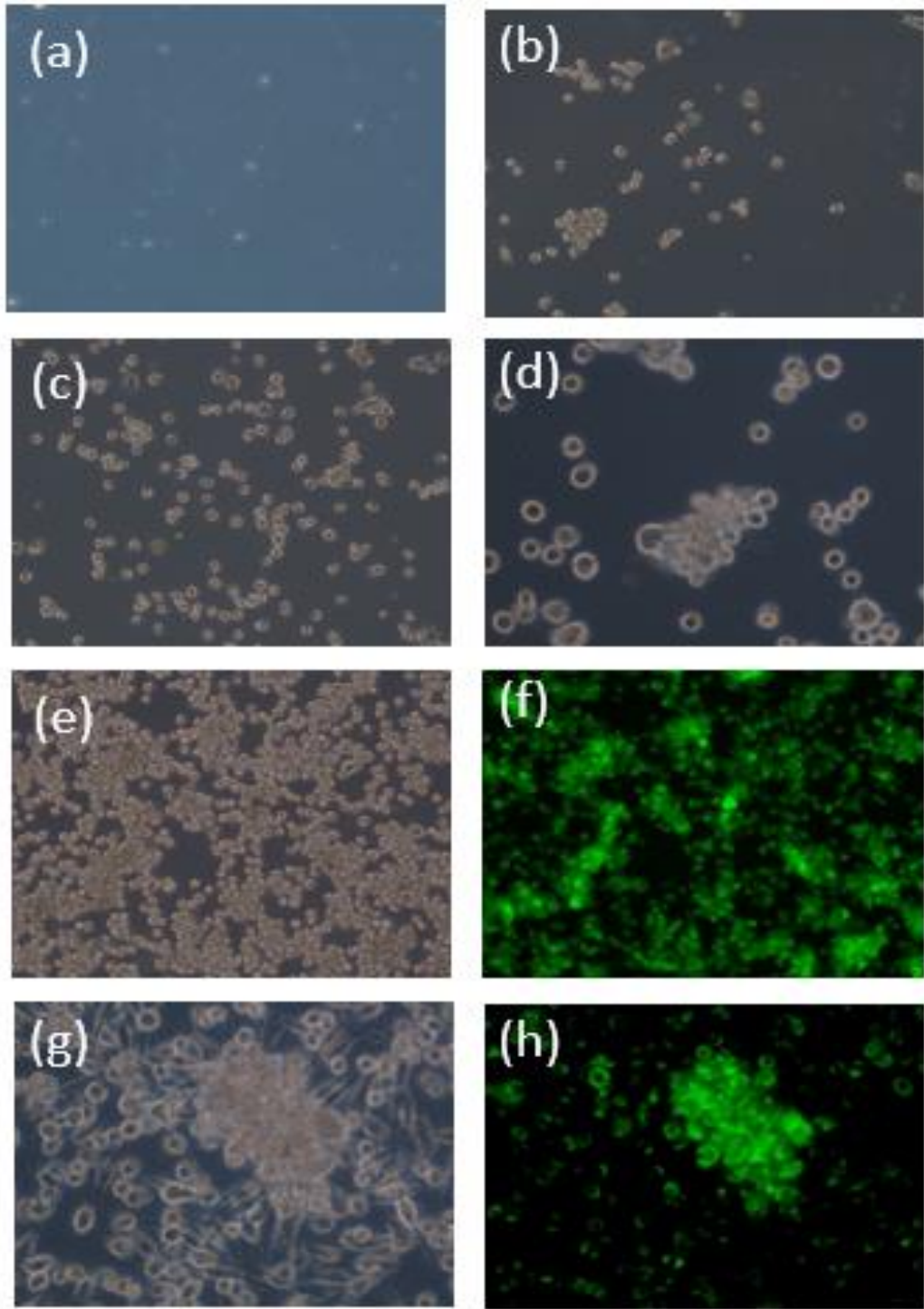


Şekil 4.8 Klf4(Kırmızı) , Sox2(Mor), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri erime eğrisi

Klf4 , Sox2, Oct4 gen bölgelerinin erime sıcaklığı (Tm) 76.5 °C olarak saptanmıştır. Erime grafiğinde her bir gen bölgesi için oluşan tek pik, amplifikasyonda tek bir ürünün çoğaldığını göstermektedir.

4.6 Transfekte Olmuş Hücrelerin Matrijele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi

Matrijel üzerine aktarıldıktan sonra transfecte hücrelerdeki morfolojik değişimler 15 gün boyunca invert mikroskop altında gözlemlenmiştir. Hücrelerdeki kolonileşme eğilimi matrijele aktarım işlemi sonrası 24. saat itibariyle gözlemlenmiştir. Bu hücrelerdeki GFP ekspresyonunun devam ettiği ise floresan mikroskop ile belirlenmiştir. Literatür çalışmalarına baktığımızda UPK hücreleri için benzer fotoğraflara rastlanmıştır. Şekil 4.9'da 12 gün boyunca matrijel üzerinde hücrelerin morfolojik değişimleri fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.9 Oct4, Sox2, Klf4, v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan plazmid DNA/SSLN konjugatı ile transfekte edilmiş L929 fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüleri
 (a): 1. Gün 10x faz kontrast (b): 6. Gün 10x faz kontrast (c): 7. Gün 5x faz kontrast
 (d): 9. Gün 20x faz kontrast (e): 10. Gün 10x faz kontrast (f): 10. Gün 10x floresan
 (g): 12. Gün 20x faz kontrast (h): 12. Gün 20x floresan

4.7 Tartışma

Birçok hastalığın tedavisi için kök hücrelerin kullanımı çokça çalışılan ve araştırılan bir alandır. Laboratuvar ortamında somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin bu amaçla kullanılması oldukça popülerdir.

Hücrelerin yeniden programlanmasını sağlayan gen bölgelerinin hedeflenen hücrelere aktarımında genellikle viral vektörler kullanılmaktadır. Ancak viral vektörlerin klinikte kullanımı immün cevap oluşturma riski ve tümör oluşumuna neden olabilirliği dolayısı ile sınırlıdır. Alternatif olarak geliştirilen virüs free sistemleri yeniden programlama teknolojisini geliştirmeye olanak sağlayacaktır. Bizim bu çalışmada amacımız L929 fibroblast hücrelerinden UPK hücrelerinin elde edilmesi için viral olmayan bir vektör sisteminin geliştirilmesi ve transfeksiyon çalışmalarında verimli bir şekilde kullanılması amacıyla özelliklerinin optimize edilmesidir.

Çalışma kapsamında sentezlenen Stearamid: setilpiridinyum lipid nanopartikül katyonik olması ve hücre zarından yapısı gereği kolaylıkla geçebileceğinden dolayı tercih edilmiştir. Literatür taraması yapıldığında stearamid bazlı lipid nanopartiküllere rastlanmamıştır. Zeta -Sizer cihazı kullanılarak çalışmada sentezlenen nanopartiküllerin boyutları 173.6 ± 13.91 nm ve zeta potansiyeli 36.5 ± 0.06 mV olarak ölçülmüştür.

L929 fibroblast hücre hattı ile yapılan sitotoksikite çalışmasında $40 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyona kadar pozitif yük nedeniyle az miktarda toksik bir etkisinin olduğu saptanmıştır. Ancak DNA ile etkileştirildikten sonra, konjugatın sahip olduğu katyonik özellik, DNA'nın fosfat gruplarından gelen anyonik yükler dolayısı ile azalarak, toksik etki ortadan kalkmıştır.

Boyut ve yük olarak hücrelere gen aktarımı için uygun görülen nanopartiküller, yeniden programlama faktörleri olan Klf4, Sox2, Oct4, v-Myc gen bölgelerini üzerinde bulunduran Piggybac human 4-in 1 ile etkileştirilerek L929 fibroblast hücrelerinin transfeksiyonunda kullanılmıştır. Floresan İnvert mikroskop ile takip edilen hücrelerde transfekte olmuş hücrelerin ve transfekte olmamış hücrelerin sayımıyla transfeksiyon verimi %70 olarak hesaplanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Ramamoorth, M. ve Narvekar, A., (2015). "Non viral vectors in gene therapy-an overview", Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 9: GE01.
- [2] Laçin, N.T. ve Kızılbey, K., (2016). Nanoparticles as Nonviral Transfection Agents, ed. Handbook of Nanoparticles. Springer, 891-921.
- [3] Soppimath, K. Aminabhavi, T. Kulkarni, A. ve Rudzinski, W., (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", Journal of Controlled Release, 70: 1-20.
- [4] Derman, S. Kızılbey, K. Akdeste, Z., (2013). "Polymeric Nanoparticles", Journal of Engineering and Natural Sciences 107-120.
- [5] Ana del Pozo-Rodríguez, D.D., Maria Ángeles Solinís, Jose Luis Pedraz, ve Enrique Echevarría, J.M.R., Alicia R. Gascón, (2010). "Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: In vivo protein expression after intravenous administration", International Journal of Pharmaceutics, 385: 157-162.
- [6] Sovan Lal Pal, U.J., P. K. Manna, G. P. Mohanta, R. Manavalan, (2011). "Nanoparticle: An overview of preparation and characterization", Journal of Applied Pharmaceutical Science, 01: 228-234.
- [7] Demir, D., (2013). Formulation And In Vitro Evalution Of Nanoparticles Containing Docetaxel, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [8] Olbrich, C. Bakowsky, U. Lehr, C. Muller, R. ve Kneuer, C., (2001). "Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA", Journal of Controlled Release, 77: 345-355.
- [9] Kumar, M. Bakowsky, U. ve Lehr, C., (2004). "Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers", Biomaterials, 25: 1771-1777.
- [10] Takahashi, K. ve Yamanaka, S., (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", Cell, 126: 663-676.
- [11] Trounson, A. ve DeWitt, N., (2016). "Pluripotent stem cells progressing to the clinic", Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17: 194-200.
- [12] Zhang, Y. Satterlee, A. ve Huang, L., (2012). "In Vivo Gene Delivery by Nonviral Vectors: Overcoming Hurdles?", Molecular Therapy, 20: 1298-1304.

- [13] Lowenstein, P., (1997). "Why are we doing so much cancer gene therapy? Disentangling the scientific basis from the origins of gene therapy", *Gene Therapy*, 4: 755-756.
- [14] Holladay, C. O'Brien, T. ve Pandit, A., (2010). "Non-viral gene therapy for myocardial engineering", *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2: 232-248.
- [15] Baekelandt, V. De Strooper, B. Nuttin, B. ve Debyser, Z., (2000). "Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases", *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2: 540-554.
- [16] Mitrophanous, K. Miskin, J. Binley, K. de Belin, J. Loader, J. Ferrige, G. Angell-Manning, D. Carlucci, M. Kelleher, M. Lucas, C. ve Ellis, S., (2012). "A Highly Effective Equine Infectious Anaemia Virus-Based Lentiviral Gene Therapy Platform for the Treatment of Ocular Diseases", *Molecular Therapy*, 20: S168-S169.
- [17] Thomas, C. Ehrhardt, A. ve Kay, M., (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy", *Nature Reviews Genetics*, 4: 346-358.
- [18] Parveen, Z. Krupetsky, A. Engelstädter, M. Cichutek, K. Pomerantz, R.J. ve Dornburg, R., (2000). "Spleen necrosis virus-derived C-type retroviral vectors for gene transfer to quiescent cells", *Nature Biotechnology*, 18: 623.
- [19] Kordower, J.H. Emborg, M.E. Bloch, J. Ma, S.Y. Chu, Y. Leventhal, L. McBride, J. Chen, E.-Y. Palfi, S. ve Roitberg, B.Z., (2000). "Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease", *Science*, 290: 767-773.
- [20] Marshall, E., (1999). "Gene therapy death prompts review of adenovirus vector", *Science*, 286: 2244-2245.
- [21] Alemany, R. Balagué, C. ve Curiel, D.T., (2000). "Replicative adenoviruses for cancer therapy", *Nature Biotechnology*, 18: 723.
- [22] Isner, J.M. ve Asahara, T., (1999). "Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization", *The Journal of clinical investigation*, 103: 1231-1236.
- [23] Kotterman, M.A. Chalberg, T.W. ve Schaffer, D.V., (2015). "Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook", *Annual review of biomedical engineering*, 17: 63-89.
- [24] Moss, R.B. Milla, C. Colombo, J. Accurso, F. Zeitlin, P.L. Clancy, J.P. Spencer, L.T. Pilewski, J. Waltz, D.A. ve Dorkin, H.L., (2007). "Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial", *Human gene therapy*, 18: 726-732.
- [25] Burton, E.A. Wechuck, J.B. Wendell, S.K. Goins, W.F. Fink, D.J. ve Glorioso, J.C., (2001). "Multiple Applications For Replication - Defective Herpes Simplex Virus Vectors", *Stem Cells*, 19: 358-377.

- [26] Nayerossadat, N. Maedeh, T. ve Ali, P.A., (2012). "Viral and nonviral delivery systems for gene delivery", *Advanced biomedical research*, 1.
- [27] Niidome, T. ve Huang, L., (2002). "Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors", *Gene Therapy*, 9: 1647.
- [28] Elsbahy, M. Nazarali, A. ve Foldvari, M., (2011). "Non-viral nucleic acid delivery: key challenges and future directions", *Current drug delivery*, 8: 235-244.
- [29] Wightman, L. Kircheis, R. Rössler, V. Carotta, S. Ruzicka, R. Kurs, M. ve Wagner, E., (2001). "Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo", *The journal of gene medicine*, 3: 362-372.
- [30] Kreuter, J. ve Speiser, P.P., (1976). "In vitro studies of poly (methyl methacrylate) adjuvants", *Journal of pharmaceutical sciences*, 65: 1624-1627.
- [31] Ravi Kumar, M. Hellermann, G. Lockey, R.F. ve Mohapatra, S.S., (2004). "Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art", *Expert opinion on biological therapy*, 4: 1213-1224.
- [32] Vasir, J.K. ve Labhasetwar, V., (2006). "Polymeric nanoparticles for gene delivery", *Expert opinion on drug delivery*, 3: 325-344.
- [33] Kumari, A. Yadav, S. ve Yadav, S., (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75: 1-18.
- [34] Vandervoort, J. ve Ludwig, A., (2002). "Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study", *International Journal of Pharmaceutics*, 238: 77-92.
- [35] Jain, R., (2000). "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices", *Biomaterials*, 21: 2475-2490.
- [36] Chasin, M. Domb, A. Ron, E. Mathiowitz, E. Langer, R. Leong, K. Laurencin, C. Brem, H. ve Grossman, S., (1990). "Polyanhydrides as drug delivery systems", *Biodegradable polymers as drug delivery systems*, 45: 43-70.
- [37] Middleton, J.C. ve Tipton, A.J., (2000). "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices", *Biomaterials*, 21: 2335-2346.
- [38] Pillai, O. ve Panchagnula, R., (2001). "Polymers in drug delivery", *Current Opinion in Chemical Biology*, 5: 447-451.
- [39] Özakar, E., (2014). Etkin Madde Yüklü Plga Nanopartiküllerinin Hazırlanması Vein Vitro Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [40] Ravi Kumar, M.N. ve Kumar Ş, N., (2001). "Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities", *Drug development and industrial pharmacy*, 27: 1-30.

- [41] Nair, L. ve Laurencin, C., (2007). "Biodegradable polymers as biomaterials", *Progress in Polymer Science*, 32: 762-798.
- [42] Panyam, J. ve Labhasetwar, V., (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 329-347.
- [43] Botto, C. Mauro, N. Amore, E. Martorana, E. Giammona, G. ve Bondi, M.L., (2017). "Surfactant effect on the physicochemical characteristics of cationic solid lipid nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, 516: 334-341.
- [44] Doktorovova, S. Shegokar, R. Rakovsky, E. Gonzalez-Mira, E. Lopes, C.M. Silva, A.M. Martins-Lopes, P. Muller, R. ve Souto, E.B., (2011). "Cationic solid lipid nanoparticles (cSLN): structure, stability and DNA binding capacity correlation studies", *International Journal of Pharmaceutics*, 420: 341-349.
- [45] Bondi, M.L. Azzolina, A. Craparo, E.F. Lampiasi, N. Capuano, G. Giammona, G. ve Cervello, M., (2007). "Novel cationic solid-lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery", *Journal of Drug Targeting*, 15: 295-301.
- [46] Xue, H.-Y. ve Wong, H.-L., (2011). "Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: an integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner", *ACS nano*, 5: 7034-7047.
- [47] Allemann, E. Gurny, R. ve Doelker, E., (1993). "Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 39: 173-191.
- [48] Zambaux, M. Bonneaux, F. Gref, R. Maincent, P. Dellacherie, E. Alonso, M. Labrude, P. ve Vigneron, C., (1998). "Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method", *Journal of Controlled Release*, 50: 31-40.
- [49] Allémann, E. Gurny, R. ve Doelker, E., (1992). "Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size", *International Journal of Pharmaceutics*, 87: 247-253.
- [50] Leroux, J.-C. Allémann, E. Doelker, E. ve Gurny, R., (1995). "New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 41: 14-18.
- [51] Beck-Broichsitter, M. Rytting, E. Lehardt, T. Wang, X. ve Kissel, T., (2010). "Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the "ouzo region" upon drug loading", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41: 244-253.
- [52] Mishima, K. Matsuyama, K. Tanabe, D. Yamauchi, S. Young, T.J. ve Johnston, K.P., (2000). "Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent", *AIChE journal*, 46: 857-865.
- [53] Redhead, H. Davis, S. ve Illum, L., (2001). "Drug delivery in poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine

- 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation", *Journal of Controlled Release*, 70: 353-363.
- [54] Betancor, L. ve Luckarift, H.R., (2008). "Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis", *Trends in biotechnology*, 26: 566-572.
 - [55] de Assis, D.N. Mosqueira, V.C.F. Vilela, J.M.C. Andrade, M.S. ve Cardoso, V.N., (2008). "Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of 99mTechnetium-fluconazole nanocapsules", *International Journal of Pharmaceutics*, 349: 152-160.
 - [56] Shi, H.G. Farber, L. Michaels, J.N. Dickey, A. Thompson, K.C. Shelukar, S.D. Hurter, P.N. Reynolds, S.D. ve Kaufman, M.J., (2003). "Characterization of crystalline drug nanoparticles using atomic force microscopy and complementary techniques", *Pharmaceutical research*, 20: 479-484.
 - [57] Honary, S. ve Zahir, F., (2013). "Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2)", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12: 265-273.
 - [58] Scholes, P. Coombes, A. Illum, L. Davis, S. Watts, J. Ustariz, C. Vert, M. ve Davies, M., (1999). "Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS", *Journal of Controlled Release*, 59: 261-278.
 - [59] Storm, G. Belliot, S.O. Daemen, T. ve Lasic, D.D., (1995). "Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17: 31-48.
 - [60] Reya, T. Morrison, S.J. Clarke, M.F. ve Weissman, I.L., (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells", *Nature*, 414: 105.
 - [61] Lakshmipathy, U. ve Verfaillie, C., (2005). "Stem cell plasticity", *Blood reviews*, 19: 29-38.
 - [62] Hochedlinger, K. ve Plath, K., (2009). "Epigenetic reprogramming and induced pluripotency", *Development*, 136: 509-523.
 - [63] Jaenisch, R. ve Young, R., (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming", *Cell*, 132: 567-582.
 - [64] Mitalipov, S. ve Wolf, D., (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming, ed. *Engineering of stem cells*. Springer, 185-199.
 - [65] Eisenberg, L.M. ve Eisenberg, C.A., (2003). "Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation", *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 69: 209-218.
 - [66] Ateş, U., (2016). "Kök hücreyi tanıyalım", *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon*, 1: 19-28.
 - [67] Slack, J.M., (2000). "Stem cells in epithelial tissues", *Science*, 287: 1431-1433.

- [68] Wobus, A.M., (2001). "Potential of embryonic stem cells", *Molecular aspects of medicine*, 22: 149-164.
- [69] Durand, C. ve Dzierzak, E., (2005). "Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells", *Haematologica*, 90: 100-108.
- [70] Pittenger, M.F. Mackay, A.M. Beck, S.C. Jaiswal, R.K. Douglas, R. Mosca, J.D. Moorman, M.A. Simonetti, D.W. Craig, S. ve Marshak, D.R., (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *Science*, 284: 143-147.
- [71] Xu, R., (2008). "Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement", *Particuology*, 6: 112-115.
- [72] Clogston, J.D. ve Patri, A.K., (2011). *Zeta potential measurement, ed. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. Springer, 63-70.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Funda ALKAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.01.1993, Ordu
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : fundaalkaan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Ünye Anadolu Lisesi	2011

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2015	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2013	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci

YAYINLARI

Bildiri

1. Alkan F., Turkoglu L. N., Demirbilek M. (2018). "Stearamid Bazlı Katyonik Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması Ve Fibroblast Hücrelerine Gen Transferinde Kullanımı", 3. Yaşam Bilimleri Kongresi, 23-24 Şubat 2018, Kayseri.
2. Senel I., Yalman V., Alkan F., Caliskan Z. (2016). "The synthesis of benzofuranone and indole derivatives and examination of their cytotoxic and anticarcinogenic effects on NIH 3T3 and MCF7 cells ", 28thNational Chemistry Congress, 15-21 Ağustos, Mersin.