



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

FOSFOESTER BAĞLARI İÇEREN GEN TAŞIYICI POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU

Sibel KÜÇÜKERTUĞRUL

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU

II. DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Koray GÖK

Haziran, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 19.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı , Kimyasal Teknolojiler Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



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



Prof. Dr. Tülin Banu İYİM
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Işıl Acar
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Aysel KANTÜRK FİGEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Lisans eğitimime İstanbul Üniversitesi'nde devam etmeye başladığım andan itibaren her türlü yardım ve kolaylığı sağlayan, lisansüstü eğitimim için beni teşvik eden, bu alanda beni geliştirmek için desteğini esirgemeyen, her zaman danışmanım olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde bana danışmanlık yapan, desteğini ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, anlayışı ve inancı için çok değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Koray GÖK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım için bana kapılarını açarak ev sahipliği yapıp imkan sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknolojiler Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Erdal CEVHER'e, Sayın Arş. Gör. Dr. Melike SESSEVMEZ'e, Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Kamber DEMİR'e, Sayın Arş. Gör. Selin YAĞCIOĞLU'na ve doktora eğitimlerini gerçekleştiren güler yüzlü diğer ekip arkadaşlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca farklı fakültelerde gerçekleştirmiş olduğum çalışmalar için anlayış gösteren Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ hocama ve diğer bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim hayatım boyunca edindiğim ve hâlâ yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve lisansüstü eğitimimde tanıştığım, bana manevi olarak güç verip destek olan diğer kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, benimle gururlanan ve gururlandığım ailem, canım annem Ferhunde KÜÇÜKERTUĞRUL'a, canım babam Adnan KÜÇÜKERTUĞRUL'a, canım kardeşim Sezer KÜÇÜKERTUĞRUL'a ve akrabalarıma sabır ve sevgileri için çok teşekkür ederim.

Ve ailemizin en minikleri canım yeğenlerim Buğlem Elif ARIKAN'a, Begüm Nur ARIKAN'a ve Berra PEKŞEN'e hayatımı renklendirdikleri için sonsuz sevgi ve teşekkürler.

Haziran 2018

Sibel KÜÇÜKERTUĞRUL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1. GEN TAŞIMA	2
2.1.1. Viral Vektörler.....	3
2.1.2. Viral Olmayan Vektörler	5
2.2. GEN TRANSFERİNDE KULLANILAN VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARA ÖRNEKLER.....	6
2.2.1. Polietilenimin (PEI).....	7
2.2.2. Poli(β -Amino Esterler) (PBAEs).....	8
2.2.3. Polimetakrilat	9
2.2.4. Poli(amido amin) ve Dendrimerleri (PAMAM).....	9
2.2.5. Poli-L-Lizin (PLL)	10
2.2.6. Fosfor İçeren Polimerler	11
2.2.7. Kitosan.....	12
2.3. POLİMERİK NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLER.....	17
2.3.1. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	19
2.3.1.1. Önceden Sentezlenmiş Polimerlerin Dispersiyonu:	20
2.3.1.2. Polimerizasyon Yöntemi:	21
2.3.1.3. İyonotropik Jelleşme:.....	21
2.3.2. Nanopartiküllerin Boyut ve Yüzey Özellikleri.....	22
2.3.2.1. Partikül Boyutu:.....	22
2.3.2.2. Yüzey Özellikleri:.....	22
2.4. GEN TRANSFER MEKANİZMASI.....	23

2.4.1. Gen Paketleme.....	24
2.4.1.1. Elektrostatik Etkileşim:.....	25
2.4.1.2. Enkapsülasyon:.....	25
2.4.1.3. Adsorpsiyon:.....	25
2.4.2. Sitotoksosite	26
2.5. GEN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERE AİT YAPILAN ÇALIŞMALARLA İLGİLİ KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	27
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. KİMYASAL MADDELER	31
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR.....	31
3.2.1. Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR).....	31
3.2.2. Liyofilizatör (Vakum Altında Dondurarak Kurutucu Sistem)	32
3.2.3. Santrifüj	32
3.2.4. Zeta Potansiyeli, Partikül Boyutu ve Patikül Boyutu Dağılımı (Polidisperslik İndeksi) (PDI) Ölçüm Cihazı.....	32
3.2.5. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC).....	32
3.2.6. Olympus Ters Mikroskop.....	32
3.2.7. Manyetik Karıştırıcı ve Terazî.....	32
3.2.8. Akış (Flow) Sitometri (Akan Hücre Ölçer).....	32
3.3. YÖNTEM.....	33
3.3.1. ChiA'dan ChiA _{saf} Sentezi.....	33
3.3.2. Chi'nin Depolimerizasyonu ile LMWChi Sentezi	33
3.3.3. Chi ve LMWChi Bileşiklerinin o-PEA Bileşiği ile Modifikasyon Reaksiyonu ...	33
3.3.4. Nanopartikül Hazırlama	34
3.3.5. Plazmid DNA (pDNA) Genini Taşıyan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	34
3.3.6. gnMChi-PEA ve gnMLMWChi-PEA Ürünlerinin Jel Elektroforez Analizleri ...	34
3.4. MCHİ-PEA VE MLMWCHİ-PEA ÜRÜNLERİNİN SİTOTOKSİSİTE VE İN VİTRO TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARI.....	35
3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması [82]	35
3.4.2. HEK293T Hücrelerinin Hazırlanması	36
3.4.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kullanımı:	36
3.4.3. Nanopartiküllerin Sitotoksitesininin MTT Testi ile İncelenmesi	36
3.4.4. Nanopartiküler Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliği.....	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI KİTOSAN VE MODİFİYE KİTOSAN ÜRÜNLERİNİN ELDE EDİLMESİNE AİT DENEMELER.....	39

4.1.1. MChi-PEA ve MLMWChi-PEA Ürünlerinin FTIR Analiz Sonuçları.....	44
4.1.2. Ürünlerin GPC Analizi Sonuçları.....	45
4.1.3. Chi ve MChi Ürünlerinden Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması.....	48
4.1.4. MChi-PEA ve MLMWChi-PEA Ürünleri ile nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	54
4.1.4.1. nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA Nanopartikül Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü, PDI ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular	55
4.1.5. Modifiye Kitosanolardan Elde Edilen Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilitelerinin İncelenmesi	64
4.1.6. gnMChi-PEA ₃ ve gnMLMWChi-PEA ₄₁₄ Formülasyonlarının Jel Elektropherez Sonuçları.....	65
4.1.7 nMChi-PEA ₃ ve nMLMWChi-PEA ₄₁₄ Formülasyonlarının MTT Testi ile Sitotoksosite Karakteristiklerinin Belirlenmesi.....	66
4.1.8 nMChi-PEA ₃ ve nMLMWChi-PEA ₄₁₄ Formülasyonlarının Transfeksiyon Etkinliğine Ait Bulgular	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	71
5.1. Chi'İN MODİFİKASYONU VE DEPOLİMERİZASYONU, ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONU.....	71
5.1.1. Chi'in o-PEA bileşigi ile Modifikasyon Reaksiyonu.....	71
5.1.2. Chi'in Depolimerizasyonu.....	73
5.1.3. MChi-PEA ve MLMWChi-PEA Ürünlerinin FTIR Spektrası.....	73
5.1.4. GPC Analiz Sonuçları Değerlendirmesi.....	75
5.2. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ ZETA POTANSİYELİ, PDI VE BOYUT ANALİZİ DEĞERLENDİRMESİ	76
5.3. gnMChi-PEA ₃ VE gnMLMWChi-PEA ₄₁₄ FORMÜLASYONLARININ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	79
5.4. nMChi-PEA ₃ VE nMLMWChi-PEA ₄₁₄ FORMÜLASYONLARININ SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	80
5.5. nMChi-PEA ₃ VE nMLMWChi-PEA ₄₁₄ NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN İN VİTRO TRANSFEKSİYON SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	81
5.6. SONUÇLAR	81
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Viral taşıyıcılar ile gen taşımının genel şematik gösterimi [10].	3
Şekil 2.2: a) Dallanmış ve b) lineer PEI [18].	7
Şekil 2.3: Proton-sünger hipotezi [19].	7
Şekil 2.4: Poli (β -Amino Ester) yapısı [12].	8
Şekil 2.5: PDMAEMA yapısı [2].	9
Şekil 2.6: Farklı jenerasyondaki PAMAM-dendrimerleri [27].	10
Şekil 2.7: Poli-L-Lizin [12].	11
Şekil 2.8: Polifosfoesterlerin genel yapısı, R: +2 değerlikli organik molekül; R': organik/inorganik atom veya molekül (H, etan) [30].	11
Şekil 2.9: Kitin ve kitosanın moleküler yapıları [37].	13
Şekil 2.10: Biyomedikal alanda kitosanın potansiyel uygulamaları [39].	14
Şekil 2.11: Kitosanın pH'a karşı davranışı. Düşük pH'ta (yaklaşık <6), amin grupları kitosan için polikatyonik davranışlar verir. Daha yüksek pH'ta (yaklaşık >6.5), kitosanın aminleri deprotonlanmış ve reaktiftir [38].	15
Şekil 2.12: Biyomedikal araştırma ve gen/ilaç transferinde kullanılan çeşitli tipteki nanopartiküller [44].	18
Şekil 2.13: Polimerik nanoyapıların şematik gösterimi [46].	18
Şekil 2.14: Nanopartikül hazırlama tekniklerinin şematik gösterimi (PNP: Polimerik nanopartikül, SCF: Süper kritik akışkan teknolojisi) [45].	19
Şekil 2.15: Çözücü buharlaştırma tekniği [50].	20
Şekil 2.16: İyonotropik jelleşme yönteminin şematik gösterimi [53].	21
Şekil 2.17: Zeta potansiyelinin şematik gösterimi [55].	23
Şekil 2.18: Polimer nanopartikül/DNA kompleks oluşumu ve gen transfer işlemi [56].	24
Şekil 2.19: Kitosan esaslı nanopartiküllerin gen paketleme yöntemlerinin şematik gösterimi [62].	26
Şekil 3.1: LMWChi sentezi [79].	33

Şekil 3.2: Jel elektroforez cihazı.	35
Şekil 3.3: Transfeksiyon işleminin hazırlanışı [84].	38
Şekil 4.1: o-PEA, Chi ve MChi-PEA ürününe ait FTIR spektra.	44
Şekil 4.2: o-PEA, LMWChi ve MLMWChi-PEA ürününe ait FTIR spektra.	45
Şekil 4.3: Chi, LMWChi _{0.4} (0.0004 g NaNO ₂), LMWChi ₁ (0.01 g NaNO ₂), LMWChi ₂ (0.02 g NaNO ₂), LMWChi ₃ (0.03 g NaNO ₂), LMWChi ₄ (0.04 g NaNO ₂), LMWChi ₅ (0.05 g NaNO ₂) GPC analizi sonuçları.	47
Şekil 4.4: MChi-PEA, MLMWChi-PEA ₁ (0.01 g NaNO ₂), MLMWChi-PEA ₂ (0.02 g NaNO ₂), MLMWChi-PEA ₃ (0.03 g NaNO ₂), MLMWChi-PEA ₄ (0.04 g NaNO ₂) GPC analizi sonuçları.	47
Şekil 4.5: nMChi-PEA ₃ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	56
Şekil 4.6: nMChi-PEA ₃ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	57
Şekil 4.7: nMChi-PEA ₈ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	57
Şekil 4.8: nMChi-PEA ₈ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	57
Şekil 4.9: nMLMWChi-PEA ₁₁ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	58
Şekil 4.10: nMLMWChi-PEA ₁₁ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	59
Şekil 4.11: nMLMWChi-PEA ₂₇ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	60
Şekil 4.12: nMLMWChi-PEA ₂₇ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	60
Şekil 4.13: nMLMWChi-PEA ₃₇ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	61
Şekil 4.14: nMLMWChi-PEA ₃₇ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	61
Şekil 4.15: nMLMWChi-PEA ₄₅ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	62
Şekil 4.16: nMLMWChi-PEA ₄₅ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	63
Şekil 4.17: nMLMWChi-PEA ₄₁₄ (%0.10) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.	64
Şekil 4.18: nMLMWCH-PEA ₄₁₄ (%0.10) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.	64
Şekil 4.19: gnMChi-PEA ₃ 'ya ait jel elektroforez görüntüsü.	66
Şekil 4.20: gnMLMWChi-PEA ₄₁₄ 'ya ait jel elektroforez görüntüsü.	66
Şekil 4.21: nMChi-PEA ₃ ve nMLMWChi-PEA ₄₁₄ formülasyonlarının HEK293T hücrelerine toksisitesi.	67

Şekil 4.22: nMChi-PEA ₃ formülasyonu; polimer:gen oranı 12:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.	69
Şekil 4.23: nMChi-PEA ₃ formülasyonu; polimer:gen oranı 20:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.	69
Şekil 4.24: nMLMWChi-PEA ₄₁₄ formülasyonu; polimer:gen oranı 25:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.	70
Şekil 4.25: nMLMWChi-PEA ₄₁₄ formülasyonu; polimer:gen oranı 12:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.	70
Şekil 5.1: MChi-PEA ürününe ait reaksiyon mekanizması.	72



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları [11].	4
Tablo 4.1: GPC analizi sonuçları.	46
Tablo 4.2: Nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	48
Tablo 4.3: ChiA _{saf} ve ChiA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.	49
Tablo 4.4: ChiA _{saf} nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	50
Tablo 4.5: ChiA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	51
Tablo 4.6: LMWChiA ve LMWChiA _{saf} nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	52
Tablo 4.7: MChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	53
Tablo 4.8: nMChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.	54
Tablo 4.9: nMLMWChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.	55
Tablo 4.10: nMChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	56
Tablo 4.11: nMLMWChi-PEA ₁ (0.01g NaNO ₂ 'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	58
Tablo 4.12: nMLMWChi-PEA ₂ (0.02g NaNO ₂ 'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	59
Tablo 4.13: nMLMWChi-PEA ₃ (0.03g NaNO ₂ 'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	60
Tablo 4.14: nMLMWChi-PEA ₄ (0.04g NaNO ₂ 'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	62

Tablo 4.15: nMLMWChi-PEA ₄ * nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.....	63
Tablo 4.16: nMChi-PEA ₃ ve nMLMWChi-PEA ₄₁₄ modifikasyonları ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının stabiliteleri.....	65
Tablo 4.17: Transfeksiyon etkinliği sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan derecelendirmeler.....	68
Tablo 4.18: nMChi-PEA ₃ ve nMLMWChi-PEA ₄₁₄ nanopartikül formülasyonlarının HEK293T hücrelerine transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları.....	68



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
As	: Aseton
Chi	: Kitosan
CO₂	: Karbondioksit
DD	: Deasetillenme derecesi
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FCS	: Fötal buzağı serumu
HCl	: Hidroklorik asit
HEK293T	: İnsan embriyonik böbrek 293 hücre hattı
kb	: Kilobaz
KBr	: Potasyum bromür
LMWChi	: Düşük molekül ağırlıklı kitosan
MChi-PEA	: Modifiye kitosan
MLMWChi-PEA	: Modifiye düşük molekül ağırlıklı kitosan
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NaNO₂	: Sodyum nitrit
NaOH	: Sodyum hidroksit
o-PEA	: Orto-fosforiletanolamin
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
THF	: Tetrahidrofur
TPP	: Sodyum tripolifosfat
PDI	: Polidisperslik indeksi
pDNA	: Plazmid DNA
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
M_w	: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
M_n	: Sayısal ortalama molekül ağırlığı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FOSFOESTER BAĞLARI İÇEREN GEN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU

Sibel KÜÇÜKERTUĞRUL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Koray GÖK

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın amacı, doğal polimer esaslı yeni bir viral olmayan gen taşıyıcı nanopartiküler sistemin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve gen taşıma kapasitesinin incelenmesidir.

Bu amaçla bir biyopolimer olan kitosana (Chi), ilk defa bu çalışmada, yapısında fosfoester bağlarını içermesiyle birlikte serbest NH_2 grubu bakımından zenginleştirmek için, bir etanolamin türevi olan o-fosforiletanolamin (o-PEA) bileşiği ile modifikasyon reaksiyonu uygulandı. Ortalama molekül ağırlığının gen taşıma karakteristiklerine etkilerini de incelemek için Chi'nin depolimerizasyonu da gerçekleştirildi ve ürün düşük molekül ağırlıklı kitosan (LMWChi) bileşiğine de aynı modifikasyon reaksiyonu uygulandı. Modifikasyon ürünleri modifiye kitosan (MChi) ve modifiye düşük molekül ağırlıklı kitosanın (MLMWChi) yapıları FTIR spektroskopi tekniği ile aydınlatıldı ve sitotoksosite özellikleri incelendi. Ortalama molekül ağırlıkları tayinleri ise GPC-SEC sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Takiben Chi, LMWChi, MChi ve MLMWChi bileşiklerinin iyonik jelasyon yöntemi ile nanopartiküler taşıyıcı sistem formülasyonları hazırlandı ve partikül boyutu, polidisperslik indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli özellikleri belirlenerek, formülasyonlar optimize edildi. Kullanılan Chi'nin piyasada bulunan fiziksel şekillerinin, nanopartikül formülasyonlarının özelliklerine etkileri de incelendi. Uygun boyut ve yük dağılımına sahip nanopartikül formülasyonlarının stabiliteyi incelendi. Optimize nanopartikül formülasyonlarının gen taşıma kapasitelerini tayin etmek için

polimer-pDNA kompleksleri hazırlandı ve bu kompleksler jel elektroforez tekniği ile yürütölerek ölçüldü. Uygun özelliklerdeki nanopartiköl formölasyonlarının insan embriyonik böbrek 293 (HEK293T) hücre hatları için *in vitro* transfeksiyon etkinlikleri de değeriendirildi.

Sonuç olarak, ilk defa bu çalışmada sentezlenen modifiye Chi esaslı nanopartiköl formölasyonların HEK293T hücreleri için diğer viral olmayan gen taşıyıcı sistemlere alternatif biyoyumlu, biyobozunur, toksik olmayan, stabil sistemler olarak kullanılabilirliği ortaya koyuldu.

Haziran 2018, 107 sayfa.

Anahtar kelimeler: Kitosan, düşük moleköl ağırlıklı kitosan, fosforilasyon, nanopartiköl, *in vitro* transfeksiyon.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

SYNTHESIS and CHARACTERIZATION of THE GENE CARRIER POLYMERIC NANOPARTICLES CONTAINING PHOSPHOESTER BONDS

Sibel KÜÇÜKERTUĞRUL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemical Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU

Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Mehmet Koray GÖK

The aim of this study realized in this thesis is to develop and to characterize a novel natural polymer based nonviral gene carrier nanoparticulate system and to investigate its gene binding capacity.

For this purpose, in order to enrich the free NH_2 group with also incorporation of phosphoester bonds in its structure, the modification reaction was applied to chitosan (Chi), which is a biopolymer, by using *o*-phosphorylethanolamine (*o*-PEA) compound, which is an ethanolamine derivative, for the first time. In order to investigate the effects of the average molecular weight on the gene binding characteristics, depolymerization of Chi was realized and the same modification reaction was also applied to low molecular weight chitosan (LMWChi) product. The structures of the modification products modified chitosan (MChi) and modified low molecular weight chitosan (MLMWChi) were clarified by FTIR spectroscopy technique and their cytotoxicity properties were also investigated. The determination of their average molecular weight was also realized by using GPC-SEC system. Afterwards, nanoparticulate carrier system formulations of the Chi, LMWChi, MChi and MLMWChi compounds were prepared by ionic gelation method and the formulations were optimized by the determination of their particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential properties. The effects of the

physical form of the Chi used in the market on the properties of the nanoparticle formulations was also studied. Stabilities of the nanoparticle formulations which have appropriate size and charge distribution were also examined. In order to determine the gene binding capacity of the optimized nanoparticle formulations, the polymer-pDNA complexes were prepared and these complexes were measured by running the gel electrophoresis technique. *In vitro* transfection efficiencies of the nanoparticle formulations with appropriate properties for human embryonic kidney 293 (HEK293T) cell line were also evaluated.

As a result, it was demonstrated that the modified Chi based nanoparticulate formulations synthesized in this study for the first time could be used as alternative biocompatible, biodegradable, non-toxic, stable systems for the non-viral gene carrier systems for HEK293T cell lines.

June 2018, 107 pages.

Keywords: Chitosan, low molecular weight chitosan, phosphorylation, nanoparticle, *in vitro* transfection.

1. GİRİŞ

Günümüzde gelişen teknoloji ile beraber biyoteknolojinin dikkat çeken uygulamalarından biri olan gen tedavisi (terapi) yöntemi, genetik bozuklukları düzeltmek ve sayısız hastalığı tedavi etmek için oldukça umut verici bir yöntemdir. Kalıtsal özellikleri ve genetik bilgiyi taşıyan genlerin yapısında meydana gelecek kusurdan dolayı oluşan hastalıklarda, genetik materyalin kusurlu bölgeye verilerek tedavi etmesi amaçlanır. Ancak gen tedavisinin başarılı olabilmesi için gerekli olan ve günümüzde birçok bilim insanının da karşılaştığı zorlukların başında gelen nokta ilgili genin ihtiyaç duyulan bölgeye taşınması durumudur. Bunun için 20. yüzyıldan itibaren gen transferinde genel olarak viral ve viral olmayan vektör olmak üzere iki tür taşıyıcı yaklaşımı kullanılmaktadır. Viral vektörlerin (virüsler) yan etkilerinden, toksik özelliklerinden ve güvenli olmamalarından dolayı viral olmayan vektörler ön plana çıkmaktadır. Viral olmayan vektörler ise doğal ve sentetik polimer, lipid veya lipozom esaslı olabilmektedir. Viral olmayan bu vektörler arasında da daha az toksisite göstermeleri, uygulama kolaylığı ve verimli transfeksiyon etkinliği özelliklerinden dolayı polimer esaslı viral olmayan gen taşıyıcıları tercih edilmektedir [1].

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada, kaynak araştırmalarında rastlanmayan, kitosan esaslı yapısında fosfoester bağları içeren yeni doğal polimerik gen taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin sentezi, karakterizasyonu ve gen taşıma etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle doğal bir polimer olan kitosanın fosforiletanolamin bileşiği ile modifikasyon reaksiyonu ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiş, yapısı aydınlatılarak, reaksiyon mekanizması açıklanmıştır. Daha sonra elde edilen modifiye kitosanların nanopartikül formülasyonları hazırlanarak özellikleri optimize edilmiştir. Optimize nanopartiküler formülasyonların gen taşıma kapasiteleri tayin edilerek, HEK293T hücreleri için *in vitro* transfeksiyon etkinlikleri de incelenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. GEN TAŞIMA

Gen tedavisi (terapi), genetik hastalıklar ve kronik rahatsızlıkların tedavisinde potansiyel etken oluşundan dolayı tıp, farmasötik ve biyoteknoloji alanlarında büyük ilgi görmektedir. Günümüzde immün (bağışıklık) yetmezliği, kistik fibrozis ve Parkinson hastalığı gibi genetik bozuklukların ve nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra kanser tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapiye de alternatif bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır [1,2].

Gen tedavisi, genetik hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla hastaya ilgili genetik materyalin (DNA ve RNA) aktarımının yapılmasıdır. Hastaya aktarılan yeni genetik materyal, genellikle hastalığa yol açan mutasyonun etkilerini düzeltme işlevine sahip genler içerir. Aktarılan bu genetik materyal ile amaçlanan sadece hastalıkları tedavi etmek değil, aynı zamanda hücre çekirdeğine taşınması sağlanarak protein üretimini denetleyen kontrollü gen ifadesini (ekspresyon) de gerçekleştirebilmektir [3,4,5].

Mevcut gen tedavisinde iki esas bileşen vardır; bunlardan birincisi, hedef bölgede ifade edilebilen etkili bir terapötik gen, ikincisi ise terapötik genleri spesifik bir hedef doku veya organa ileten etkili ve güvenli bir taşıma sistemidir. Bu sebeple genin transfer edilmesini sağlayan gen taşıma sistemlerinin, genetik materyalleri sistemik kan dolaşımında önceden bozulmadan korumak ve terapötik genleri hedef hücrelere verimli bir şekilde aktarmak üzere tasarlanması gereklidir [2,6].

Etkili bir gen taşıma sisteminin gerektirdiği özellikler ise; 1) biyouyumluluk ve immünojenisite (bağışıklık yanıtını uyarma yeteneği) göstermeme 2) kan dolaşımında kararlılık gösterebilme 3) transfer boyunca terapötik geni bozulmadan koruma 4) doku ve hücre seçiciliği 5) hedef hücreye girdikten sonra etkili endozomal kaçış ve lizozomal enzimler tarafından bozulmadan kaçış (endo-lizozomal kaçış) 6) terapötik geni çekirdeğe taşımadır [7].

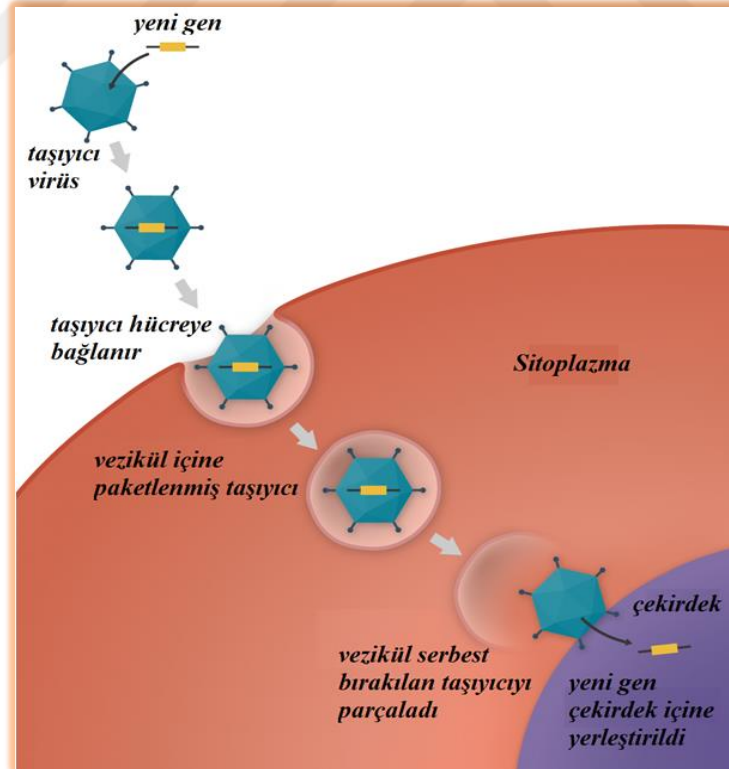
Genetik malzemenin hedeflenen dokuya başarılı bir şekilde aktarılması bahsedildiği üzere gen tedavinin amaçlarından biridir. Ancak yalnız terapötik genler nükleazlar tarafından hızla bozunup, zayıf hücre alımı gösterdikleri için etkili ve güvenli gen taşıyıcıların geliştirilmesinin gerekliliği gen terapinin başarılı olması için ön koşullardan biridir [8].

Gen transferini sağlayan bu gen taşıyıcılar diğer bir adıyla vektörler, yapılarına göre viral vektörler ve viral olmayan (non-viral) vektörler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

2.1.1. Viral Vektörler

Günümüzde en yaygın kullanılan viral vektörler, her birinin kendine has özelliklerinin bulunduğu retrovirüs, herpesvirüs, lentivirüs, adenovirüs ve adeno-ilişkili virüslerdir. Aynı zamanda RNA ve DNA virüsleri olarak da adlandırılan bu vektörler uygun gen taşıyıcısı olarak değerlendirilmektedir.

Virüsler, genetik malzemelerini hücelere taşıyan ve hücreye yerleşmek için doğal olarak gelişen biyolojik taşıyıcılardır. Bir virüsün ana faaliyeti, genomunu bir konakçı hücreden diğerine verimli bir şekilde taşımak, yeni hedef hücreye girmek, hücre çekirdeğine yönelmek ve genomun ifadesini başlatmaktır [8,9]. Viral taşıma yolu genel olarak Şekil 2.1’de, bu vektörlerin avantaj ve dezavantajları da Tablo 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1: Viral taşıyıcılar ile gen taşımamanın genel şematik gösterimi [10].

Tablo 2.1: Viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları [11].

<u>Viral Vektörler</u>	<u>Avantajlar</u>	<u>Dezavantajlar</u>
Retroviral Vektörler	DNA ile kolay birleşme özelliği, yükleme kapasitesinin 7-8 kb'den düşük olması	Stabilitesi yok, rastgele birleşme eğilimindedir ve hedeflenmesi zor
Lentiviral Vektörler	Yükleme kapasitesinin 10 kb olması, kararlı gen ifadesi	Mutasyona sebep olma
Adenovirüs Vektörler	Yüksek oranda gen ifadesi, yükleme kapasitesinin geniş olması (7-8 kb)	Birleşme eğiliminde olmama, viral proteinlere immünel tepki, geçici gen ifadesi
AAV (Adeno-ilişkili) Vektörler	Hedeflemede birleşme potansiyeli, düşük immün tepki ve patojenlik göstermeme	Sınırlı yükleme (4 kb), üretimi zor
Herpesvirüs Vektörler	Çeşitli ve geniş hücre tiplerine yüklenebilme, yükleme kapasitesi 50 kb'nin üzerinde	Toksik etki, DNA ile viral birleşme göstermeme
Poxvirüs Vektörler	Yükleme kapasitesi yüksek, yüksek gen ifadede DNA parçalarının yüklenebilmesi	Hücreye zarar verecek potansiyel etki

Bu tür vektörler, yüksek bir transfeksiyon oranına ve genoma yerleştirilen genetik materyalin hızlı bir şekilde transkripsiyonuna olanak tanır. Ancak virüsler, verilen genetik materyalin boyutu açısından sınırlı yükleme kapasitesi göstermesinin yanı sıra, toksik, immün ve yangı etkisi göstermektedir. Ayrıca sterilizasyonu ve karakterizasyonu zordur ve üretim maliyeti de oldukça yüksektir [8,9]. Ayrıca, viral vektörler kullanılarak gen terapinin potansiyelinin araştırıldığı klinik çalışmalarında bir hastanın ölümünün gerçekleşmesi bu taşıyıcılar ile ilgili güvenlik sorununu da ortaya çıkarmıştır [12].

Özellikle güvenli oluşu ile ilgili endişeler olmak üzere, gen taşıma kapasitelerinin de düşük olması, viral vektörlerin sınırlı kullanımı viral olmayan sistemlere dayalı alternatif vektörlerin değerlendirilmesine ve geliştirilmesine yol açmıştır.

2.1.2. Viral Olmayan Vektörler

Viral vektörlerin doğası gereği gösterdiği sınırlamadan ötürü, viral olmayan vektörler gen transferi için alternatif taşıyıcılar olarak ön plana çıkmaktadır [13]. Bu vektörler düşük immünojenisite, düşük üretim maliyeti, daha kolay üretilebilme ve tekrarlanabilme özelliğine sahip olmaları nedeniyle de viral vektörlere karşı avantajlı olmaktadır.

Viral olmayan vektörler, gen yükleme sırasında plasmid boyutu ile ilgili herhangi bir sınırlamaya sahip değildir. 200 nm'nin altında boyutlara sahip viral olmayan vektörler, genetik malzemeyi elektrostatik etkileşim veya enkapsülasyon vb. teknikler ile bağlayabilme kabiliyetinde olabilmektedir. Ayrıca genin işleyişinin çekirdek enzimleri tarafından bozulmasını önleyebilmekte ve hücresel girişe aracılık edebilmektedir. Bunun dışında, doku veya hücreye yapılan spesifik hedefleme için de taşıt madde üzerinde modifikasyona imkân sağlamaktadır.

Viral olmayan taşıyıcı sistemleri; genellikle tek başına DNA, lipid esaslı ve polimer esaslı taşıyıcılar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır [1,14,15].

Katyonik fosfolipit ve katyonik polimerler hem sabit katyonik yüklü olduklarından hem de negatif yüklü DNA ile elektrostatik olarak etkileşime girebilme ve lipo- veya polipleks yapılı kompleks oluşturabilme özelliklerinden dolayı günümüzde viral olmayan vektörler arasında araştırılmakta olan taşıyıcılardır. Bu vektörler arasında da çeşitlilik, kolay sentezlenebilme ve çeşitli geometrilere üretilebilme, hastalıklı bölgeye hedeflenen gen transferi için yüzey modifikasyonlarına imkân sağlama ve ayrıca katyonik polimer esaslı DNA/polimer komplekslerinin katyonik lipid esaslı komplekslerden daha kararlı olması gibi nedenlerden dolayı polimerik gen transfer sistemleri öne çıkmaktadır.

Katyonik polimerler, gen transferi için özel olarak hazırlanmış polimerler ve ham maddeler dahil olmak üzere çeşitli kimyasalları içermektedir. Primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner aminleri içeren DNA-bağlama kısımları; polimer omurgasında, pendant gruplarda veya aşılınmış oligomerlerde bulunabilmektedir.

Gen transferinde kullanılan bu polimerlerin pozitif yüklü olmalarından dolayı, negatif yüklü olan DNA ile kompleks oluşturabilme (polipleks) veya fiziksel birleşme ya da enkapsülasyon yoluyla DNA ile etkileşebilme özelliklerinin yanı sıra düşük toksisite, immün duyarlılık ve stabilite göstermeleri diğer avantajları arasındadır [9,14,16].

1960'dan beri (diethylamino)eter (DEAE)-dekstran gibi çeşitli polimerik viral olmayan vektörler gen transferi çalışmalarında geniş ölçüde kullanılmaktadır. Ancak düşük transfeksiyon etkinliği ve bazı durumlarda toksik etki göstermeleri hem klinik uygulamalarını kısıtlamakta hem de bu tip viral olmayan vektörler için çözüm bulunması ve geliştirilmesine yönelik çalışmaları gerektirdiğini göstermektedir [14].

2.2. GEN TRANSFERİNDE KULLANILAN VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARA ÖRNEKLER

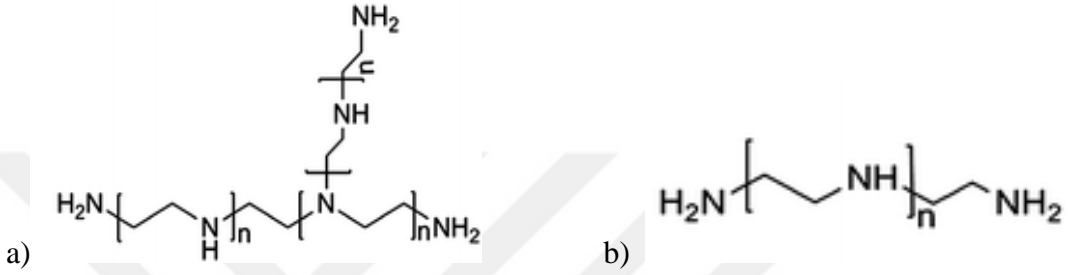
Transjenik polimerler adıyla anılan viral olmayan vektörler olarak kullanılan bu nanopartiküler sistemler; doğal polimerler (kitosan, dekstran, siklodekstrin, jelatin, kolajen ve türevleri vb.) ve sentetik polimerler genellikle molekül yapılarında azot atomu içeren homo-, kopolimer [poli(β -amino esterler), poli(amido aminler), poli(imidazoller), poli(etilen oksit/polipropilen oksit) kopolimerleri, poli(etilenimin) vb.] esaslı olabilmektedirler.

Doğal polimerler; genellikle toksik olmadıkları, yenilenebilir kaynaklardan elde edilebildikleri, biyoyumlu, biyobozunur ve düşük immünojeniteye sahip oldukları için terapötik uygulamalar için cazip adaylardır. Çoğu doğal katyonik polimerler, fizikokimyasal özellikleri geliştirmek için kolaylıkla modifiye edilebilen reaktif bölgeler içerir [17].

Bu tezde gerçekleştirilen çalışmalarda temel amaç, doğal bir katyonik polimer olan kitosanın fosforilasyonu ile yeni gen taşıyıcı polimerik nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu olduğundan aşağıda, gen taşıyıcı olarak günümüzde başarıyla kullanılabilen katyonik polimerlere kısaca örnekler verilmiştir. Kitosan ve fosfoester bağı içeren polimerler ise daha ayrıntılı olarak sunulmuştur.

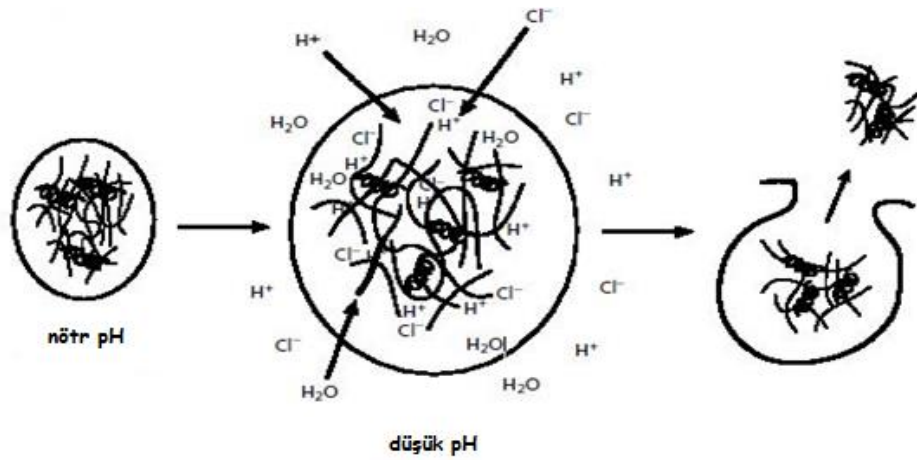
2.2.1. Polietileniminin (PEI)

PEI, etkili ve üzerinde oldukça çalışılan en çok bilinen viral olmayan sentetik polimerik taşıyıcılardan biridir. Lineer ve dallanmış molekül olmak üzere iki yapıda sentezlenebilir (Şekil 2.2). PEI yapısında bulunan amino grupları (-NH₂) sayesinde, negatif yüklü DNA ile kompleks (polipleks) yapıyı oluşturmayı sağlar ve bu polipleksler farklı hücre tipleri tarafından kolayca endositoz yoluyla hücreye alınabilir.



Şekil 2.2: a) Dallanmış ve b) lineer PEI [18].

Polietileniminin nispeten yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesinin sebebinin proton-sünger mekanizması sayesinde endozomal kaçışının etkili bir şekilde gerçekleşmesi olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.3). Çünkü polimerin her üç atomundan biri azot atomudur ve PEI yüksek amin yoğunluğuna sahip bir polimerdir. Fizyolojik pH'da (~7.4) sadece %15-20'si protonlanabilmektedir. Böylece endozom veya lizozom gibi düşük pH (4-6) ortamında protonlanmamış aminler protonları tutabilmekte ve oluşan polipleks yapısı hücre sitozolüne taşınabilmektedir.



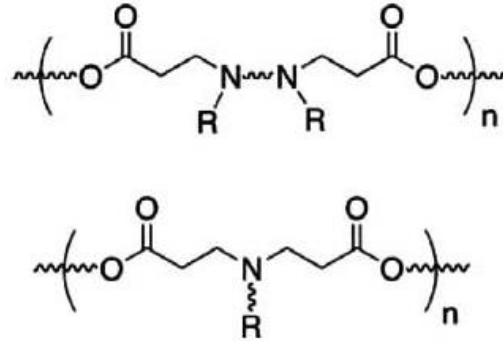
Şekil 2.3: Proton-sünger hipotezi [19].

PEI ayrıca yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesinin yanı sıra, DNA'yı çekirdek enzimleri tarafından bozunmaya karşı da etkili bir koruma gösterir. Poliplekslerin transfeksiyon etkinliği, artan molekül ağırlığı ile (600-70000 Da) artmaktadır. Ancak bu molekül ağırlığı artışı, PEI'nin en önemli dezavantajı olan toksisiteyi de artırmaktadır. Artan toksisite, hücre yüzeyindeki agregasyon ve yapışmadan kaynaklıdır ve bu durum hücrenin ölmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle PEI polipleks yapısı için belirlenen uygun molekül ağırlığı 5-25 kDa aralığındadır.

PEI'nin protein, peptit, PEG (polietilen glikol) gibi büyük moleküller veya daha küçük gruplar (şeker, küçük polimerler, açıl grupları) ile modifikasyonu sonucu oluşturduğu PEI türevleri, transfeksiyonda daha etkili ve hücrede daha az toksik etki göstermesini sağlamaya yönelik çalışmalardır [2,8,12,14,20,21].

2.2.2. Poli(β -Amino Esterler) (PBAEs)

Poli(beta-amino esterler) biyolojik olarak parçalanabilen katyonik polimerlerdir. Primer veya sekonder aminin diakrilatlarla Michael katılma reaksiyonu ile kolayca sentezlenebilmekte ve oluşan polimer yapısında ester bağları ile tersiyer amin grupları yer almaktadır (Şekil 2.4) [12,21]. Sentezlenen polimerlerin molekül ağırlığı, çözücü ve monomere bağlı olarak 2.000-50.000 arasında değişmektedir. Sentezde kullanılan çözücüye bağlı olarak polimer farklı mol kütlelerinde olabilmektedir [22].

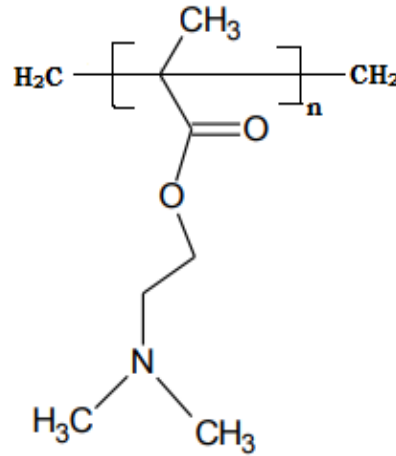


Şekil 2.4: Poli (β -Amino Ester) yapısı [12].

Fizyolojik pH'da protonlanabilen amin gruplarına sahip olması ve bozunabilen bağlar içermesi, sentezinin kolay ve yan ürünler içermemesi nedeniyle saflaştırma işlemine gerek olmaması PBAE'leri gen transferi için avantajlı hale getirmektedir. Transfeksiyon etkinliği de PEI ile kıyaslandığında çok daha yüksek olmaktadır [21,22].

2.2.3. Polimetakrilat

Yapısında bulunan katyonik yük nedeniyle, poli[2-(dimetilamino) etil metakrilat] (PDMAEMA) bir sentetik polimerik gen taşıyıcısı olarak önem taşımaktadır. PDMAEMA sentezi, amonyum persülfatın $[(NH_4)_2S_2O_8]$ başlatıcı olarak kullanıldığı 2-(dimetilamino) etil metakrilatın radikal polimerizasyonu ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.5) [2].



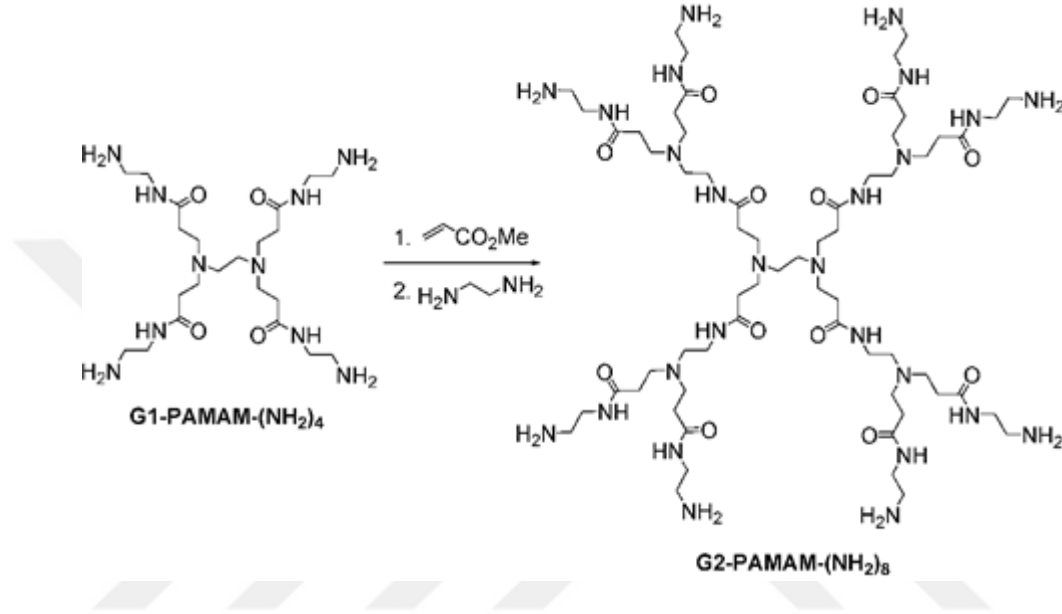
Şekil 2.5: PDMAEMA yapısı [2].

PDMAEMA polipekslerinin *in vitro* transfeksiyon etkinliğini göstermesi, polipeksin sitozole verildiğinde polimerin plazmiden kolayca ayrışabilmesinin yanı sıra polimerin endozomları destabilize etme yeteneğine sahip olması ile de ilişkilendirilmektedir [12]. Kaynaklarda bu konuda yapılan çalışmalarda DMAEMA monomeri homo- veya diğer akrilat monomerleri ile birlikte kopolimer halinde kullanıldığında nanopartikülün sitotoksitesinin azalmış olduğu, molekül ağırlığı 170 kDa'a kadar olan kopolimerler ise benzer molekül ağırlığındaki homopolimerlerle aynı transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu belirtilmiştir [2,12,23,24].

2.2.4. Poli(amido amin) ve Dendrimerleri (PAMAM)

Poli(amido amin), diğer katyonik polimerlere kıyasla biyobozunabilirlik, biyoyumluluk, suda çözünürlük ve daha düşük toksisite gibi birçok istenen özelliklere sahip, bir sentetik katyonik polimerdir. Sentezi, alifatik primer monoaminlerin veya bis(sekonder aminlerin) bisakrilamitlere Michael-tipi katılma reaksiyonu yoluyla gerçekleşmekte ve oluşan polimer amido ve tersiyer amino fonksiyonel gruplarını ana zincir boyunca içermektedir [2].

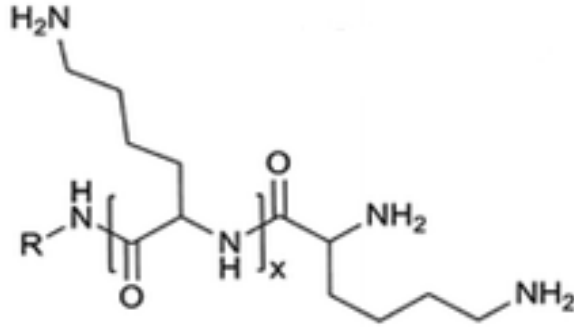
Sentezi ve ticari olarak kullanılabilme kolaylığı nedeniyle, poliamido amin (PAMAM) dendrimerleri ise gen transferi için en çok kullanılan dendrimer bazlı vektörler haline gelmiştir. Sentezdeki jenerasyon sayısı değiştirilerek, boyut ve yüzey yükü kontrol edilebilmektedir (Şekil 2.6). Çeşitli molekül yapıdaki PAMAM ve türevleri pek çok transfeksiyon işlemlerinde kullanılmaktadır. [2,14,25,26].



Şekil 2.6: Farklı jenerasyondaki PAMAM-dendrimerleri [27].

2.2.5. Poli-L-Lizin (PLL)

PLL polimerleri, gen transferi için kullanılan ilk katyonik polimerlerden biridir. Bu polimerler, lineer polipeptitlerin yapısında olup aminoasit lizin bileşiğinin tekrarlanan biriminden oluşur (Şekil 2.7). Bu nedenle biyolojik olarak parçalanabilir bir yapıya sahiptirler. Bu özellik *in vivo* uygulamalarda oldukça yararlıdır [8]. Ancak PLL polipeksleri dolaşım sistemine girdiğinde, hızlıca plazma proteinlerine bağlanarak dolaşım sisteminden atıldıklarından daha düşük transfeksiyon etkinliğine sebep olabilmektedir. Molekül ağırlığının artmasıyla DNA ile kompleks yapma özelliği ve transfeksiyon etkinliği daha yüksek olmaktadır [8,28,29].

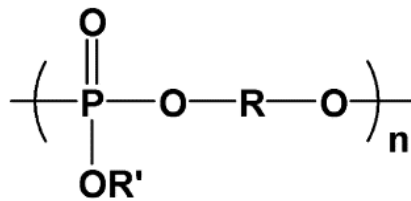


Şekil 2.7: Poli-L-Lizin [12].

2.2.6. Fosfor İçeren Polimerler

Gen transferi için kullanılan fosfor içeren biyobozunabilen polimerler; polifosfazenler (PPZ), polifosfoesterler (PPE) ve polifosforamidatlar (PPA)'ı kapsamaktadır. Bu polimerler, halka açılması, polikondenzasyon ve polikatılma gibi farklı yollardan sentezlenebilmektedir [2,30].

Polifosfoesterler, ana polimer zincirinde karbon ya da oksijen atomlarına bağlı fosfor atomlarından oluşan bir yapıya sahiptir (Şekil 2.8). Karboksilik asit polyesterlerinden bir önemli farkı, moleküler yapılarında +5 değerlikli fosfor atomu içerdiklerinden ana ve yan zincirlerinde farklı fonksiyonel grupların bulunması mümkün olabilmektedir. Bu da yapının çeşitliliğine ve böylece polimerin molekül ağırlığında ve biyobozunma derecelerinde de farklılıklara olanak sağlamaktadır [31,32].



Şekil 2.8: Polifosfoesterlerin genel yapısı, R: +2 değerlikli organik molekül; R': organik/inorganik atom veya molekül (H, etan) [30].

Çeşitli yan gruplara sahip monomerlerin polimerizasyonu ile ana polimer zinciri ve/veya yan dallarda olmak üzere moleküler yapıdaki farklılıklar ile PPE'lerin suda çözünürlüğünü ve fonksiyonelliğini ayarlamak mümkün olmaktadır. PPE'ler, asitli veya bazik koşullar altında ester bağının hidroliziyle parçalanma eğilimi gösterirler ve bu özellikle fosfoesteraz (hidroliz enzimi)

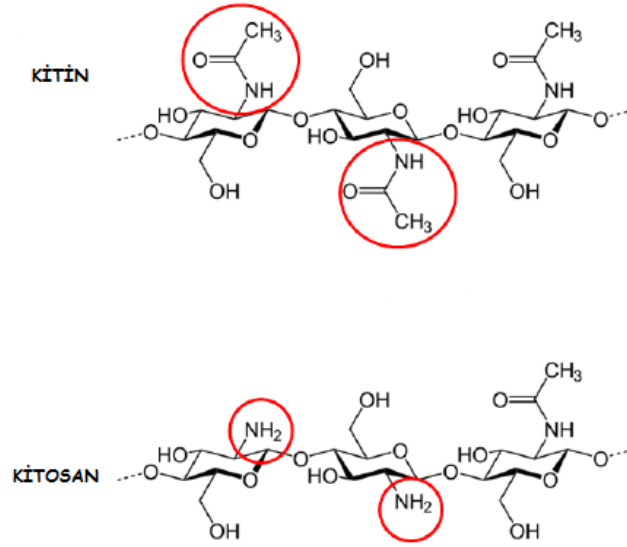
varlığında hızlanabilmektedir. PPE'lerin nihai parçalanma ürünleri, az toksik etkilere sahip fosfat, alkol ve diollerdir [33].

Plazmid DNA'yı başarılı bir şekilde bağlayabilen biyobozunabilir polifosfoesterler, kompleksler veya nanopartiküller oluşturabilmekte ve birçok hücrede etkili transfeksiyon gerçekleştirebilmektedir. PPE'lerin biyobozunabilirliği de en önemli avantajlarından birisidir ve bu taşıyıcılarla hücre dışı sürekli salım ile birlikte kabul edilebilir ölçüde hücre içi salım da sağlanabilmektedir. Bu yüzden, böyle bir gen dağıtım sistemi hem hücre içinde hem de hücre dışında genetik materyalin biyoyararlanımını önemli ölçüde geliştirebilmektedir. Bu kontrollü salım özelliği, taşıyıcının moleküler tasarımının yanı sıra polikasyonik polimer ve DNA (N/P) oranının değiştirilmesiyle de ayarlanabilmekte ve bu da *in vivo* transfeksiyon etkinliğini etkileyebilmektedir [30].

Tez çalışması kapsamında, kitosan biyopolimerinin modifikasyonunda, hem ana zincir yapısında bulunan fosfatın sahip olduğu uygun biyoyumlu yapıdan dolayı hem de yan zincir yapısında yer alan amin grubu-etanolamin- sayesinde daha az toksisiteye sahip pozitif yüklü orto-fosforiletanolamin bileşiği ile çalışılmıştır.

2.2.7. Kitosan

Karides, ıstakoz, yengeç ve karides benzeri deniz kabuklularının kabuk kısımlarında bol miktarda bulunan kitinin alkali ortamda deasetilenmesinden elde edilen, düşük pH değerlerinde katyonik özellik gösterebilen aminopolisakkarit yapıda bir biyopolimerdir. Kitosan molekülü asetilenmiş grupların derecesine bağlı olarak farklı tipteki N-asetil-D-glikozamin ve D-glikozamin ünitelerinden oluşan bir kopolimerdir. Böylece kitosanın molekül yapısı, (1→4)-β-glikozidik bağlarıyla bağlanmış haldeki iki farklı tipteki tekrarlanan üniteler olan N-asetil-2-amino-2-deoksi-d-glikopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-d-glikopiranoz ünitelerinden oluşan bir kopolimer olarak tanımlanır (Şekil 2.9) [2,21,34,35,36]. Bu nedenle kitosan, molekülünde yer alan çeşitli kimyasal yapıda, dizilişinde ve uzunluğundaki polimer zincirleri bakımından çeşitlilik göstermektedir.



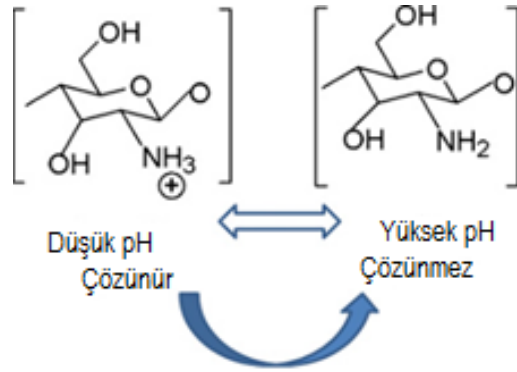
Şekil 2.9: Kitin ve kitosanın moleküler yapıları [37].

Biyoyapışabilirlik, antibakteriyel ve geçirgenlik artırıcı özellikler gibi avantaj sağlayan biyolojik özellikleri de bulunan kitosan, minimum immünojenisite ve düşük sitotoksisiteye sahip biyouyumlu ve biyobozunabildir. Bu nedenle, kitosan ve kitosan türevleri, gen transferinde güvenli kullanım için potansiyel katyonik taşıyıcılardan biridir [21]. Ayrıca kitinin sulu çözeltilerde ve organik çözücülerde zayıf çözünürlük göstermesinden dolayı pratik uygulamalarda kitin yerine kullanılması daha uygundur [38]. İlk olarak 1995'te Mumper ve arkadaşları, kitosanın gen terapi için uygun gen taşıyıcı olabileceğini bildirmişlerdir. O zamandan beri kitosan moleküllerinin DNA ile kompleks yaparak bir polipeks yapısı oluşturdukları ve DNA'yı bozunmadan korudukları bildirilmiştir [12]. Şekil 2.10'da kitosanın biyomedikal alandaki kullanımına örnekler görülmektedir.



Şekil 2.10: Biyomedikal alanda kitosanın potansiyel uygulamaları [39].

Kitosan, pH 6'nın altındaki asidik çözücüler içinde çözünürken suda çözünmemektedir. Ancak inorganik asitlerde çözünürlüğü sınırlıdır; %1'lik hidroklorik asitte, asetik asitte çözünür, ancak sülfürik veya fosforik asitte çözünmez [35,40]. Asidik ortamda sulu çözeltilerde (yaklaşık $\text{pH} < 5.5$), kitosanın pKa değerinin 6.3-6.4 civarında olmasından dolayı, molekülünde bulunan primer amin grupları, pozitif olarak yüklenirler (Şekil 2.11). Bu asidik pH'ta, birincil amin grupları protonlanır ve yüksek yük yoğunluğuna sahip bir katyonik polimer haline gelir, bu ise plazmid DNA ile stabil kompleksler oluşturabilir ve DNA'yı nükleaz (çekirdek) bozunmasından koruyabilmektedir [21]. Kitosan-DNA etkileşimi esas olarak kitosanın amino grupları ve yüklü DNA fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşim tarafından yönlendirilir. Yani molekül yapısındaki yüksek pozitif yükünden dolayı, elektrostatik etkileşim yolu ile negatif yüklü nükleotidlerle polielektrolit kompleks formlarını kolaylıkla oluşturabilmektedir [12].



Şekil 2.11: Kitosanın pH'a karşı davranışı. Düşük pH'ta (yaklaşık <6), amin grupları kitosan için polikasyonik davranışlar verir. Daha yüksek pH'ta (yaklaşık >6.5), kitosanın aminleri deprotonlanmış ve reaktiftir [38].

Deasetillenme derecesi (DD) ve ortalama molekül ağırlığı doğrudan polimerin kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirmektedir. Sigma-Aldrich tarafından satılan ticari kitosan, yüksek, orta ve düşük molekül ağırlıklı olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı kitosan, DD <75 ile moleküler ağırlığı 20 kDa ve 190 kDa arasında olan kitosan olarak tanımlanır. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ise genelde DD >75 ile 190 kDa ve 375 kDa arasında oluşan moleküler ağırlığı ile karakterize edilir [38]. Polimerin temel özelliklerini protonlanabilir amin gruplarının sayısını etkileyen deasetilasyon derecesi, çözünürlük, hidrofobiklik ve polianyonlarla elektrostatik olarak etkileşime girme kabiliyeti belirler. Kitosanın molekül ağırlığının geniş bir aralıkta bulunması da aynı derecede önemlidir. Genel olarak, düşük molekül ağırlığına ve düşük deasetilasyon derecesine sahip kitosanlar, yüksek molekül ağırlıklı benzerlerinden daha fazla çözünürlük ve daha hızlı bozulma sergilerler [41]. Kitosanın molekül boyutu ve ortamın pH'ı, hücre membranı üzerindeki geçirimsizliğini ve bozucu etkilerini belirleyen önemli parametrelerdir. Aynı zamanda nanopartikül boyutlarının kitosan molekül ağırlığını ve plazmid konsantrasyonunu düşürerek azaldığı görülmektedir [35].

Kitosan bazlı transfeksiyon sistemleri, immünojenik ve biyotoksik olmayan ve gen terapisinde viral vektörlerin tersine hedeflenen hücre için plazmid boyutunda bir sınırlamaya sahip olmamasından dolayı avantajlıdır. Ancak, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın toksisite problemlerine sebep olabilmesinden dolayı bazı uygulamalarda kaçınılmaktadır. Bununla birlikte, düşük molekül ağırlıklı kitosanın toksik ve hemolitik olmaması ile birlikte DNA ile kompleks oluşturabildiği ve nükleaz bozunmasına karşı koruduğu gösterilmiştir. Kitosanın en büyük dezavantajı, primer amin gruplarının deprotonasyonundan kaynaklanan fizyolojik pH

değerlerinde zayıf çözünürlük göstermesi, yavaş endozom salımı ve kitosan/pDNA kompleksinin istenilen sürede ayrışmasının zorluğudur [35].

Kitosan ve DNA içeren polipekslerin transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesinde kitosanın deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, kitosanın yükü ve ortam pH'sı gibi özellikler en önemli etkenlerdir. Yüksek deasetilasyon derecesi, DNA bağlama kabiliyetinin artmasına ve zincir boyunca daha yüksek yük yoğunluğuna bağlı olarak yüksek gen ifadesine sebep olmaktadır. DNA ile kompleks oluşturma üzerinde kitosanın molekül ağırlığının etkisinin yanında polimer zincirlerinin dolaşıklığının etkisi de olduğu ileri sürülmektedir. Kitosanın moleküler ağırlığı azaldıkça zincir dolaşıklığının kompleks üzerinde daha az etkisi bulunmaktadır. Kitosanın yüksek molekül ağırlığının ise ilk elektrostatik etkileşim meydana gelir gelmez serbest DNA ile daha kolay etkileşime girebileceği belirlenmiştir [21].

Nötral veya bazik pH koşullarında (pH~7.4) kitosanın çözünmez olması ve düşük transfeksiyon etkinliği göstermesinden dolayı kitosan modifiye edilmeye çalışılmaktadır. Nitrasyon, fosforilasyon, tiyolleme, açilleme, hidroksialkilasyon, graft polimerizasyon, aminasyon gibi birçok muhtemel modifikasyon kitosana kolaylıkla uygulanabilmektedir [36].

Yu ve arkadaşları, poli-L-lizin-graft-kitosan kopolimerlerinin etkili gen taşıyıcı vektörler olduğunu bildirmişlerdir. Kitosan-g-PLL polimeri hem PLL hem de 25 kDa molekül ağırlığındaki PEI'ya kıyasla gelişmiş DNA bağlama kabiliyeti, sitotoksosite azalması ve artan transfeksiyon verimliliği göstermiştir. PEI'nın kitosan ile konjügasyonu, kitosan bazlı polipekslerin tamponlama kapasitesini arttırmıştır. Kitosan-PEI türevi için sitotoksosite önemli ölçüde azalırken, transfeksiyon etkinliği de PEI ile karşılaştırılabilir durumdadır [35]. Jia ve ark. ise, N, N, N-trimetil kitosan, N-propil-N, N-dimetil kitosan, N-furfuril-N, N-dimetil kitosan ve N-dietilmetilamino kitosan gibi kitosanın kuaterner amonyum tuzlarının sentezini ve antibakteriyel aktivitesini bildirmişlerdir. Ek olarak, kuaternize kito-oligomerlerin de antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir ve kitosanın katyonik yapısından yararlanarak, terapötik uygulamalara yönelik çeşitli ilaç konjugat yaklaşımları geliştirilmiştir [34].

Bilhassa son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalarda karboester yapısı yerine, nükleik asit, DNA, RNA gibi biyomakromoleküllere yapısal benzerlik gösteren ve yüksek yapısal esneklik

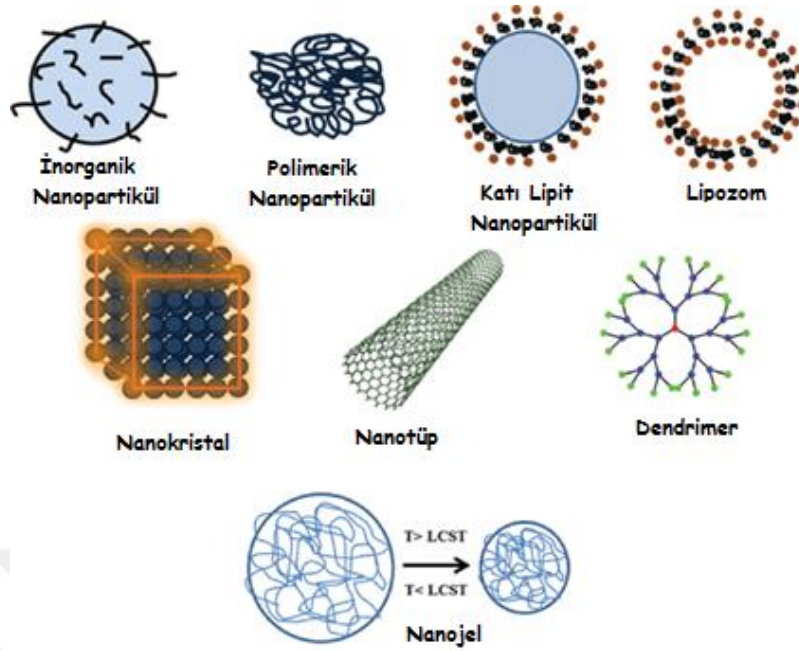
sağlayan fosforun polimer yapısında fosfoester bağları şeklinde bulunduğu biyoyumlu nanopartiküller biyomedikal uygulamalar için önem kazanmıştır.

Tez çalışmasında bu bağlamda hem kitosanın amin miktarını artırmak hem de yapıya fosfoester bağları katmak hedeflenerek uyumluluğunun artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca düşük molekül ağırlıklı (LMW) kitosanın daha iyi çözünürlük, biyoyumluluk, biyobozunabilirlik, biyoaktiflik ve hatta daha az toksisite göstermesinden ötürü, piyasada bulunan düşük molekül ağırlıklı kitosanın (~50-200 kDa) molekül ağırlığının daha da düşürülmesi amaçlanarak kitosanın depolimerizasyonu ile elde edilen ürünlerin modifikasyonu ile daha etkili gen taşıyıcı olması hedeflenmiştir.

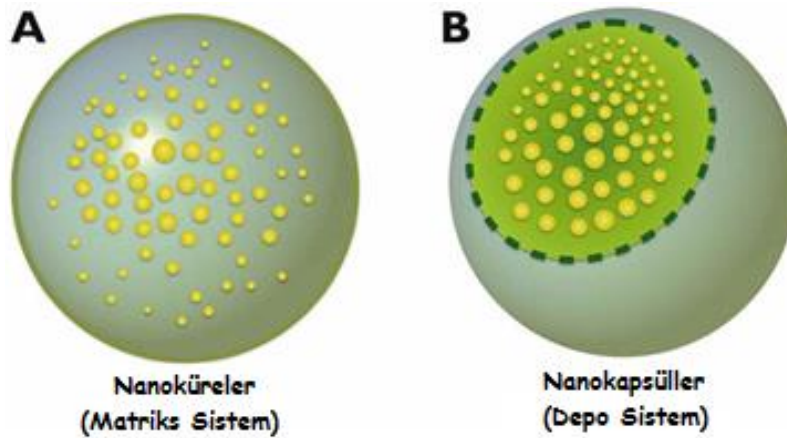
2.3. POLİMERİK NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLER

Günümüzde nanoteknolojik çalışmalardan biri nanopartiküller, nanokapsüller ve misel sistemler gibi biyoyumlu nanokompozitlerin terapötik ajan olarak kullanılabilirliği ve geliştirilmesine yöneliktir. Bu sistemler çoğunlukla polimerik ve mikron altı boyutlarda olduğundan, ilaç/gen taşıma ve transfer sistemlerinde çok yönlü avantajlara sahip olmaktadır.

Nanopartiküller, 10-1000 nm aralığında değişen bir büyüklüğe sahip katı partiküller veya partikül halindeki dağılım olarak tanımlanan kolloidal sistemlerdir. Nanopartiküller hücre içi ve mikron altı boyutlarından dolayı genellikle hücreler tarafından etkili bir şekilde alınıp, vücuttaki hedef dokuya ilgili maddenin salınmasını sağlamaktadır. Ayrıca, polimer özelliklerinin değiştirilmesiyle, ideal terapötik etki için gerekli süre boyunca hedef dokuda istenen terapötik seviyenin elde edilmesi için etken bir maddenin nanopartiküllerden salınımlarını kontrol edilebilmektedir [42,43]. Nanopartiküler sistemler çeşitli şekillerde olabilmektedirler (Şekil 2.12) [44].



Şekil 2.12: Biyomedikal araştırma ve gen/ilaç transferinde kullanılan çeşitli tipteki nanopartiküller [44]. Polimerik nanopartikül (PNP) terimi, herhangi bir polimer nanopartikül türü için, ama özellikle nanoküreler ve nanokapsüller için verilen genel bir terimdir (Şekil 2.13). Nanoküreler, tümünün katı olduğu partiküllerin ve moleküllerin küre yüzeyinde adsorbe edilebildiği veya partikül içinde enkapsülenebildiği matris sistemlerdir. Burada etken madde fiziksel ve homojen bir şekilde dağılmaktadır. Nanokapsüller, bir tür depo görevi gören vezikül sistemlerdir ve burada yer alan polimerik membranla çevrelenen sıvı dolgunun oluşturduğu boşlukta, adsorplanan etken madde tutulmaktadır [45].



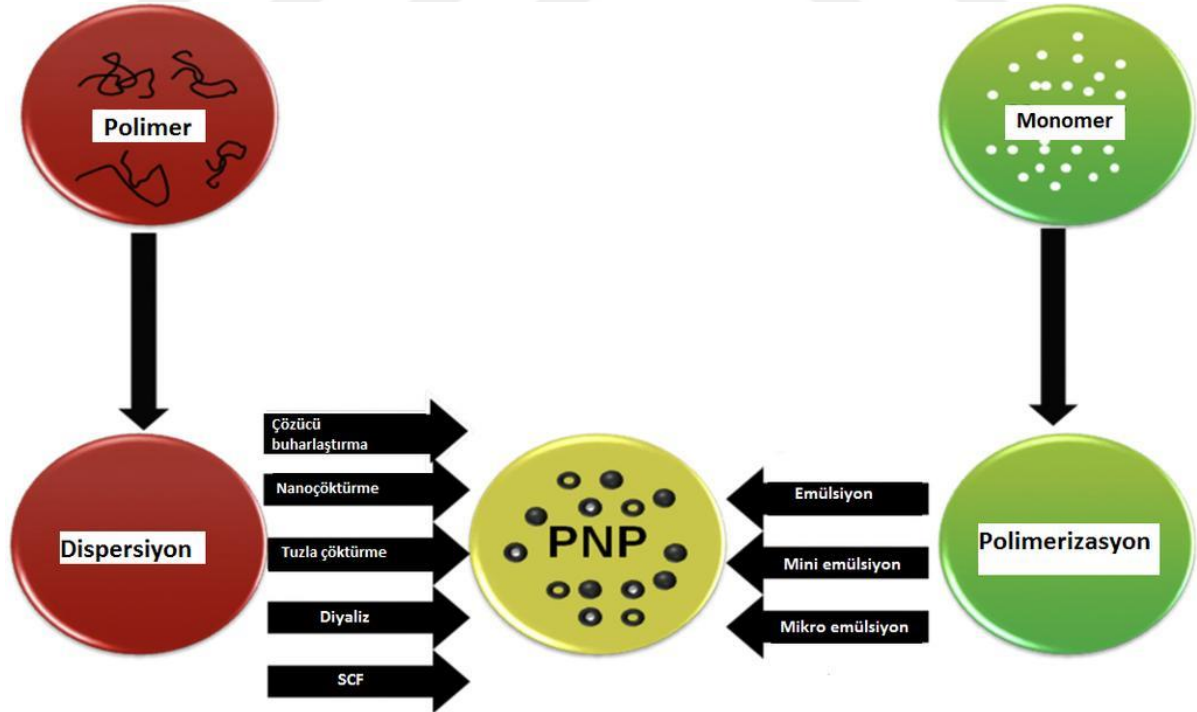
Şekil 2.13: Polimerik nanoyapıların şematik gösterimi [46].

Doğal ve sentetik polimerlerden yapılmış polimerik nanopartiküller, stabilite ve yüzey modifikasyonu kolaylığı sağlamaları nedeniyle dikkat çekmektedir. Polimer özelliklerini ve yüzey kimyasını ayarlayarak hem kontrollü gen/ilaç salımı hem de hastalığa özgü lokalizasyonu sağlamak için özel olarak üretilirler. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı polimerler; kitosan, aljinat, albümin, jelatin, poliakrilatlar, polikaprolaktonlar, poli (D, L-laktid-ko-glikolid) ve poli (D, L-laktid) vb.dir [47,48].

2.3.1. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Hazırlama yönteminin seçimi, parçacık boyutu, parçacık boyutu dağılımı, uygulama alanı vb. gibi birtakım faktörlere bağlıdır.

Genellikle hazırlanması için iki ana strateji kullanılmaktadır; önceden sentezlenmiş polimerlerin dispersiyonu ve monomerlerin polimerizasyonu. Polimerin tipine göre çeşitlilik gösteren bu yöntemler polimerizasyon, emülsifikasyon/çözücü difüzyonu, tuzla çöktürme, diyaliz, iyonotropik jelleşme, koaservasyon, püskürtürerek kurutma yöntemi ve nanoçöktürme (çözücü yer değişimi) vb. şeklinde sınıflandırılabilir (Şekil 2.14) [45,49].

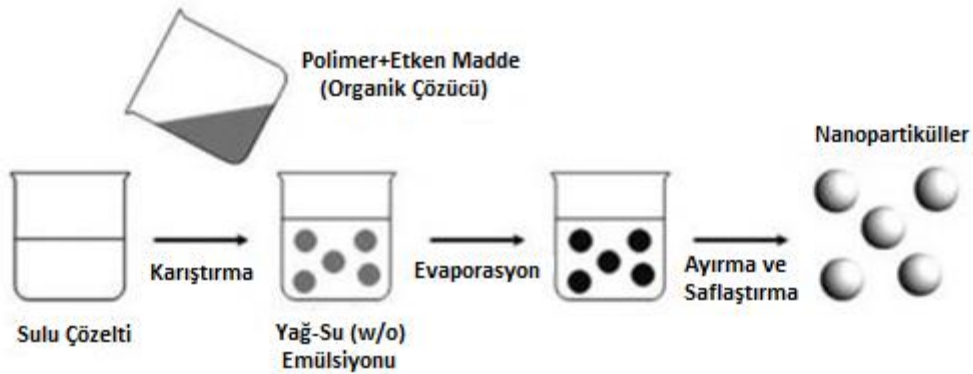


Şekil 2.14: Nanopartikül hazırlama tekniklerinin şematik gösterimi (PNP: Polimerik nanopartikül, SCF: Süper kritik akışkan teknolojisi) [45].

2.3.1.1. Önceden Sentezlenmiş Polimerlerin Dispersiyonu:

Poli (laktik asit) (PLA), poli (D, L-glikolid) (PLG), poli (D, L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) ve poli (siyanoakrilat) (PCA) polimerlerinden biyobozunabilir nanopartiküller hazırlamak için kullanılan yaygın bir tekniktir. Bu teknik çeşitli şekillerde kullanılabilir:

Çözücü buharlaştırma yöntemi: Bu yöntemde polimer, aynı zamanda hidrofobik etken maddenin çözünmesi için de çözücü olarak kullanılan, diklorometan, kloroform veya etil asetat gibi bir organik çözücü içinde çözündürülür. Daha sonra polimer etken madde karışımının, yüzey aktif madde içeren sulu çözelti ile emülsiyonu oluşturulur. Kararlı emülsiyon oluştuktan sonra ya vakum altında ya da sürekli karıştırma ile organik çözücü buharlaştırılır ve nanopartikül çökeltileri oluşturulur. Oluşan partikülün boyutu, stabilizatörün tipi ve konsantrasyonundan, homojenizatör hızından ve polimer konsantrasyonundan etkilenmektedir [42].



Şekil 2.15: Çözücü buharlaştırma tekniği [50].

Kendiliğinden olan/Doğal emülsifikasyon veya Çözücü difüzyon yöntemi: Çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye edilmiş halidir. Bu yöntemde, suyla karışan çözücü ile birlikte suyla karışmayan organik çözücünün küçük bir miktarı, bir yağ fazı olarak kullanılmaktadır. Çözücülerin kendiliğinden difüzyonundan dolayı, küçük partiküllerin oluşumuna yol açan iki faz arasında bir ara yüzey türbülansı meydana gelmektedir. Suyla karışabilir çözücünün konsantrasyonu arttıkça, partikül boyutunda bir azalma sağlanabilmektedir. Hem çözücü buharlaştırma hem de çözücü difüzyon yöntemleri hidrofobik veya hidrofilik etken maddeler için kullanılabilir [42].

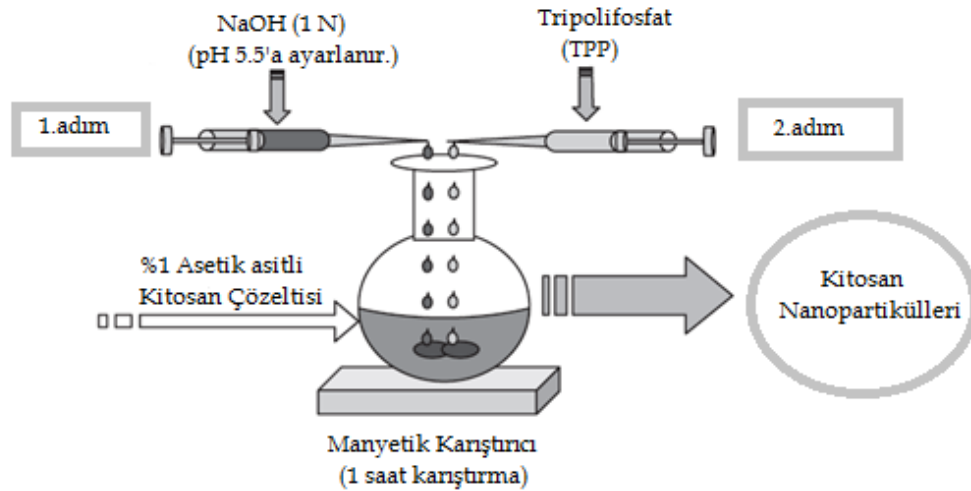
2.3.1.2. Polimerizasyon Yöntemi:

Bu yöntemde, monomerler sulu bir çözelti içinde nanopartiküller oluşturmak için polimerize edilir. İlaç/etken madde ya polimerizasyon ortamında çözünerek ya da polimerizasyon tamamlandıktan sonra nanopartiküller üzerine adsorpsiyon yoluyla dahil edilmektedir. Daha sonra nanopartikül süspansiyonu, polimerizasyon için kullanılan çeşitli stabilizatör ve yüzey aktif maddeleri uzaklaştırmak için saflandırılır. Bu uzaklaştırma işlemi, ultrasantrifüjleme ya da yüzey aktif madde içermeyen izotonik bir ortamda partiküllerin yeniden süspansiyonu ile gerçekleşmektedir [42].

2.3.1.3. İyonotropik Jelleşme:

Bu yöntem doğal polimerler olan kitosan ve aljinat gibi biyobozunabilen hidrofilik polimerlerden nanopartikül elde edilmesinde kullanılmaktadır. Elde edilen nanopartiküller, organik çözücü içermeyen, tamamen sulu ortamda sentezlenir.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan polianyon yapıdaki tripolifosfat (TPP), asetik asit içerisinde çözülmüş kitosan esaslı malzemeye damla damla katılır. Kitosandaki pozitif yüklü amin grubu ile negatif yüklü tripolifosfat arasındaki elektrostatik etkileşim sonucunda jelleşme kendiliğinden gerçekleşir (Şekil 2.16). Böylece iyonik nanojeller, karşıt yüklerin küçük iyonlarının varlığında jelleşen yüklü polisakkaritlerin sulu çözeltilerinden elde edilmiş küresel yapılar olmaktadır [42,51,52].



Şekil 2.16: İyonotropik jelleşme yönteminin şematik gösterimi [53].

2.3.2. Nanopartiküllerin Boyut ve Yüzey Özellikleri

2.3.2.1. Partikül Boyutu:

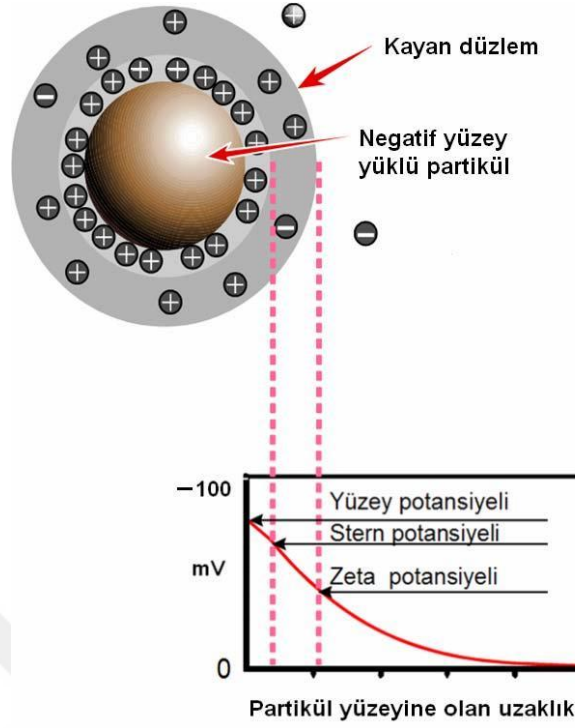
Partikül büyüklüğü ve boyut dağılımı, nanopartikül sistemlerinin en önemli özellikleridir. Nanopartikül sistemlerinin *in vivo* dağılımını, toksisitesini, uygunluğunu ve hedefleme kabiliyetini belirler. Ayrıca, ilaç yükleme, ilaç/gen salımı ve nanopartiküllerin stabilitesini de etkileyebilirler. Birçok çalışmada, mikron altı boyutlara sahip nanopartiküllerin mikropartiküllere göre avantaj sağladığı görülmüştür. Genel olarak nanopartiküller mikropartiküllere kıyasla nispeten daha yüksek hücre içi alıma ve küçük boyutları ile kısmen hareketliliklerinden dolayı daha geniş bir biyolojik hedefleme çeşitliliğine sahiptir.

Desai ve arkadaşları, 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin Caco-2 hücre hattına alımını 1 µm ve 10 µm ile kıyasladıklarında, sırasıyla 2.5 ve 6 kat daha fazla hücreye alımlarının gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Genellikle yapılan çalışmalarda ise nanopartiküllerin boyutunun <200 nm olması tercih edilmektedir [42,47].

2.3.2.2. Yüzey Özellikleri:

Nanopartiküllerin boyutlarına ek olarak yüzey özellikleri de onların hücre içindeki yaşam sürelerini belirlemede önemli bir etken olmaktadır. Nanopartiküllerin makrofaj hücrelerine yakalanmaması için hidrofilik bir yüzeye sahip olması gerekmektedir. Bu da ya nanopartikülün hidrofilik polimer/yüzey aktif madde ile kaplanmasıyla ya da hidrofilik karakterdeki polietilen glikol (PEG), polietilen oksit, polioksamer, poloksamin ve polisorbitat 80 (Tween 80) gibi biyobozunabilir kopolimerler ile formüle edilmesiyle gerçekleştirilmektedir.

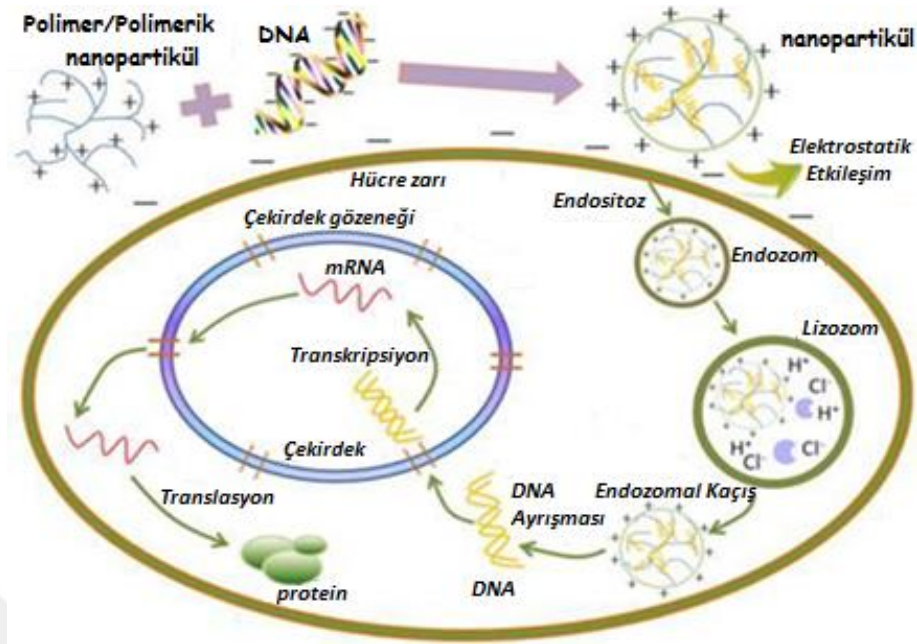
Zeta potansiyeli (ÇP), bir partikülün ve süspansiyon ortamının yüzeyi ile ilişkili yüklü gruplar arasında yaratılan elektrik potansiyelidir ve partikül yüzey yüküne ilişkin bilgi edinmek için kullanılabilir (Şekil 2.17). Partikülün bileşiminden ve içinde dağıldığı ortamdan etkilenmektedir. Partiküllerin agregasyonunun önlenmesi ve nanopartiküllerin kararlı oldukları zeta potansiyel değerinin -30 mV'un altı ve +30 mV'un üstü olduğu kabul edilmektedir. Böylece zeta potansiyeline bakılarak kolloidal dağılımın saklanma stabilitesi hakkında fikir yürütülebilmektedir [42,54].



Şekil 2.17: Zeta potansiyelinin şematik gösterimi [55].

2.4. GEN TRANSFER MEKANİZMASI

Uygun gen taşıyıcı vektör ve nanopartikül taşıyıcı sisteminin seçimi ile beraber hedeflenen gen salımının gerçekleşebilmesi için aynı zamanda etkili bir gen transfer mekanizmasının elde edilmesi gerekmektedir. Bu gen taşıma ve transfer mekanizması ise Şekil 2.18'de ifade edilmekte olan temel adımlardan meydana gelmektedir; Polimerik nanopartikül taşıyıcı ile DNA kompleksinin oluşumu; nanopartiküllerin hücre membranının spesifik bölgesine bağlanması; endositoz yoluyla hücre içerisine nanopartiküllerin girişi; endozom ve lizozom oluşumu; endo-lizozomal kaçış; gen/taşıyıcı nanopartikül kompleksin ayrışması; gen salımı; sitoplazma boyunca ilerleme, çekirdeğe geçiş ve genin ifadesi [4,56].



Şekil 2.18: Polimer nanopartikül/DNA kompleks oluşumu ve gen transfer işlemi [56].

Gen transferi işleminde gen taşıyıcı vektör ile DNA'nın etkileşerek kompleks oluşturma adımı olan "gen paketleme" adımı transfeksiyon işleminde başlangıç adımıdır ve transfeksiyon etkinliğinde önemi büyüktür. Tez kapsamında kitosan esaslı yeni bir gen taşıyıcı partiküler sistem geliştirildiği için aşağıda gen paketleme adımına ilişkin bilgilere yer verilmiştir.

2.4.1. Gen Paketleme

Taşıyıcı malzemenin gösterdiği pozitif yük ile DNA omurgası boyunca yer alan negatif yüklü fosfatlar arasındaki elektrostatik etkileşim sayesinde gen taşıyıcı vektörler DNA'yı küçük, sıkıştırılmış yapılara bağlar ve yoğunlaştırır. Yoğunlaştırma işlemi entropik olarak yönlendirilir ve katyonik polimerlerin plazmid DNA'yla bir araya getirilerek karıştırılmasıyla polipleksler kendiliğinden oluşurlar. Polipleksler, nükleolitik enzimlerin erişimini sterik olarak engelleyerek DNA'yı korur. Korunmasız plazmid DNA dakikalar içinde deoksiribonükleaz enzimi (DNase) tarafından bozunurken, poliplekslerdeki plazmid DNA saatlerce stabil kalır. Her bir polipleks parçacığı birçok polimer zinciri ile birlikte birkaç DNA molekülünü içerir. Poliplekslerin yapısı ve morfolojisi, kinetik olarak kontrol edilir ve çoğunlukla karıştırma sırasına (örneğin, DNA solüsyonuna polimer ekleme veya polimer solüsyonuna DNA ekleme) bağlıdır. Polipleksin boyutu ve yükü ise polimer özelliklerinden daha çok polimer ve DNA arasındaki orana bağlıdır [14,57].

Polikasyonun yapısı ise DNA bağlanmasını ve kompleksleşmeyi etkileyebilir. Örneğin, katyonik kısımların sayısı, polimer-DNA etkileşimi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Verimli DNA etkileşimi için bir polipeptitte en az altı ila sekiz yük gerektiği belirtilmiştir [14,57].

Yukarıda da bahsedildiği gibi DNA'yı hücre içine alabilmek için uygun boyutlara getirme hem hücre içi hem hücre dışı çekirdek bozunmasından DNA'yı koruma ve negatif yüklü hücre yüzeyinde yük iticiliğini önlemek için nötrale edebilecek gen taşıyıcı sistemleri tercih edilmelidir. Bunun için de üç temel paketleme yöntemi vardır:

2.4.1.1. Elektrostatik Etkileşim:

Birçok polimerik vektör, DNA'nın anyonik yapısı itibariyle elektrostatik etkileşim yoluyla kompleks oluşturmaktadır. Bu vektörler kolajen, kitosan, poli(etilen imin), dendrimerler gibi polimerlerdir. Bunlar DNA ile kendiliğinden birleşmeyi sağlayan, nötr pH'da protonlanabilen amin grupları içermektedir. Yeterli azot/fosfor (N/P) oranı sağlandığında, polimer DNA'yı çekirdek bozunmasından korurken hücre alım için de uygun boyutlara kompleksleme sağlanabilir. Pozitif yük özelliği bu yöntemin temelini oluşturup, güçlü elektrostatik kuvvet DNA paketleme ve korunması için olanak sağlasa da hedef bölgeye ulaşıldığında DNA/vektör ayrışmasının güçleşmesine yol açmaktadır [5].

2.4.1.2. Enkapsülasyon:

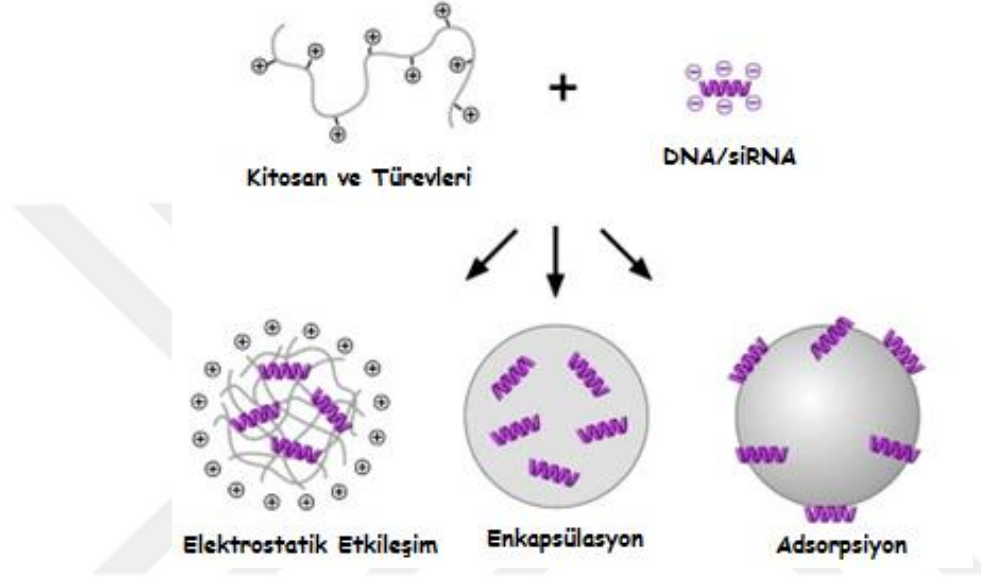
Elektrostatik etkileşime alternatif bir yöntem, DNA'nın biyolojik olarak bozunabilen küresel yapılarda kapsüllenmesidir. Bu yöntem için kullanılan biyobozunur polimerler; polifosfoester, poli(β -amino ester), poli(laktik asit) vb. Polimerlerin yapısında bulunan ester bağları, biyobozunurlukları ve DNA salımı üzerinde kontrol sağlamaktadır. Ancak bu yöntem organik çözücülere ve genetik yapıyı bozan aşırı sıcaklığa maruz kalmayı gerektirdiği için temel bir sorun teşkil etmektedir. Diğer sınırlayıcı etkenler ise düşük enkapsülasyon verimi, düşük pH'larda poliester hidrolizinden dolayı DNA bozunması, polimer tarafından yetersiz salım nedeniyle düşük DNA biyoyumluluğudur [5,58,59].

2.4.1.3. Adsorpsiyon:

DNA'nın elektrostatik olarak bağlanabildiği biyobozunur parçacıkların yüzeyine katyonik yapıların (PDMAEMA, PEI) konjuge veya adsorbe edilmesini içeren ve diğer iki yöntemi

kapsayan alternatif bir yöntemdir. Bu yöntem, enkapsülmede meydana gelen sınırlayıcı koşulların oluşmasını önlemeye ve hemen salımı gereken uygun DNA miktarını arttırmaya olanak sağlamaktadır [60,61].

Kitosan esaslı nanopartiküler sistemlerin gen paketleme tipleri aşağıda Şekil 2.19’da görülmektedir.



Şekil 2.19: Kitosan esaslı nanopartiküllerin gen paketleme yöntemlerinin şematik gösterimi [62].

2.4.2. Sitotoksosite

Gen transferinde hedeflenen, transfeksiyon etkinliğinin yüksek olmasının yanı sıra diğer önemli bir konu ise sitotoksosite yani taşıyıcının biyoyumluluğudur. Başka deyişle taşıyıcının toksiklik özelliğinin iyi bilinmesi gerekliliğidir. Gen terapinin başarılı olması için, baştan sona kadar transfeksiyon ve translasyonu gerçekleştirecek, hedeflenen hücrelerin canlı kalması gerekmektedir. Bu durumda kullanılan taşıyıcının birebir vektör özelliklerinde, kompleks oluşumu durumunda, hem hücreye taşınma hem de DNA'yı bırakması sırasında sitotoksik etki göstermemesi ve bunun göz önünde bulundurulması gerekir.

Sitotoksik etkiye sebep olan etkenler net bir şekilde belirlenememiştir. Ancak hücre yüzeyinin anyonik yapısı ile kullanılan vektörün sahip olduğu katyonik yapı arasındaki iyonik etkileşim, bu etkileşimin de membran yapısında bozulmaya ve hücre yüzeyinde vektör/DNA agregasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir. Bu etkileşimi arttıran parametreler ise molekül ağırlığı (Mw), katyonik yük yoğunluğu, kompleks yapının boyutu, yüzey yükü ve esnekliğidir

[63,64]. Bu nedenle taşıyıcının sitotoksosite özellikleri, standart test yöntemlerinden birisi ile tayin edilerek belirlenmesi önemli bir husustur.

2.5. GEN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERE AİT YAPILAN ÇALIŞMALARLA İLGİLİ KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarla ilgili olarak, kaynaklarda 1990 yılından günümüze kadar doğal ve sentetik polimerik nanopartiküler sistemlerin elde edilmesine ait çalışmalar ve bunların transfeksiyon verimliliği ile ilgili uygulamalar araştırılmıştır. Bu çalışmalar aşağıda özet şeklinde sunulmuştur.

Erbacher P., Zou S. ve arkadaşları, 1998, kitosan ve plasmid DNA'yı hazırlayarak kompleks oluşturmuşlar ve partikül boyutu ile HeLa hücrelerindeki transfeksiyon etkinliğini incelemişlerdir. Ayrıca 24 ila 96 saat arasındaki transfeksiyon etkinliği için PEI ile karşılaştırma yapmışlardır. Stabil ve 50-100 nm boyuta sahip kitosan/DNA kompleksleri oluşturmuşlar ve etkili bir transfeksiyon gözlemlemişlerdir. Ayrıca gen ifadesinin, 24 saatten 96 saate artan zaman diliminde, arttığını aynı koşullardaki PEI esaslı transfeksiyonun ise etkinliğinin düştüğünü görmüşlerdir. Aynı zamanda kitosan esaslı transfeksiyonun hücre tipine bağlı olduğunu da ele almışlardır. [65].

Godbey W.T., Barry M.A. ve arkadaşları, 2000, PEI/DNA komplekslerinin stabilitesini DNase (deoksiribonükleaz) 1 ve DNase 2, çeşitli pH seviyeleri ve artan maruz kalma süreleri kullanarak göstermişlerdir. PLL-DNA kompleksleri ile de karşılaştırılarak, polimerlerin DNA'yı bozunmadan korumada ne kadar etkili oldukları gösterilmiştir [66].

Kievit F.M., Veiseh O. ve arkadaşları, 2009, bu çalışmada hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda etkili gen aktarımı ve transfeksiyonu gösteren, viral olmayan bir nanopartikül gen taşıyıcı sentezlemişlerdir. Bu nanopartikül sistem, süperparamanyetik demir oksit nanopartikülünün (NP), kısa zincirli PEI ve kitosandan oluşturulmuş yeni bir kopolimer ile kitosan ve PEG'den oluşturulmuş graft polimer ile kaplanmasından elde edilmiştir. Nanopartikül sistemini oluşturan her bir bileşenin işlevini, toksisite değerlendirmeleri, DNA yükleme kapasiteleri, transfeksiyon analizleri ve malzeme özelliklerinin karakterizasyonu ile göstermişlerdir [67].

Olton D., Li J. ve arkadaşları, 2007, çalışmalarında etkili, nano boyutta ve monodispers kalsiyum fosfat/plazmid DNA (CaP-pDNA) partiküllerini sürekli olarak sentezlemek için yeni bir yöntem sunmuşlardır. Bu yöntemde CaP partiküllerinin hem sitokiyometrisi (Ca/P oranı) hem de kalsiyum ve fosfat öncülü çözeltilerde karıştırma yönteminin optimize çalışması yapılmış ve elde edilen sonuçlarda elle karışmaya karşın düzenli ve kontrollü bir karıştırmanın nano boyutlu partiküllerin transfeksiyonunu iki kat artırdığı bulunmuştur. Buna ek olarak 100-300 arasındaki optimum Ca/P oranında partikül boyutu 25-50 nm arasında sentezlenmiş ve HeLa ile MC3T3-E1 hücre hatlarında maksimum transfeksiyon görülmüştür [68].

Kunath K., Harpe von A. ve arkadaşları, 2003, hepatosit hücrelerine gen transferi için galaktozlanmış PEI'nin DNA ile kompleksini (gal-PEI) tasarlamışlardır. %3,5-31 geniş süstitüent derece aralığında değişen tüm PEI amino grupları ile birlikte gal-PEI sentezlenmiştir. Galaktozlanma ve süstitüent derecelerine göre partiküllerin boyutları, zeta potansiyelleri, sitotoksiteleri ve transfeksiyonları hakkında değerlendirme yapılmıştır [69].

Thanou M., Florea B.I. ve arkadaşları, 2002, kitosanın kuaternize modifikasyonları üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Oligomerik kitosandan (<20 monomer birimleri) trimetillenmiş (TMO) kitosan sentezlemişlerdir. TMO'lar kendiliğinden plazmid DNA ile kompleksler oluşturmuş ve bu kompleksler çeşitli hücre hatlarında, serum varlığında ve yokluğunda DOTAP lipopleksleri ile karşılaştırılmıştır. Kuaternize oligomer türevlerinin oligomerik kitosana üstün olduğu görülmüş ve trimetillenmiş kitosan-DNA komplekslerinin uygun özellikler taşıdığı ve gen transfer vektörleri olarak kullanılma potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır [70].

Gao Y., Xu Z. ve arkadaşları, 2008, arginin-kitosan (Arg-Cs)/DNA kendiliğinden oluşan nanopartikülleri (ACSN) hazırlamayı ve HEK 293 ile COS-7 hücrelerine dayalı olarak *in vitro* özelliklerini ve transfeksiyon etkinliğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Farklı N/P oranlarıyla hazırlanan ACSN'lerin partikül büyüklüğünü ve zeta potansiyelini sırasıyla 200-400 nm ve 0.23–12.25 mV bulmuşlardır [71].

Kim T.I., Seo H.J. ve arkadaşları, 2005, biyobozunabilir çapraz bağlı poli(β -amino ester)'i (CLPAE) pentaeritritol triakrilat ve N, N-dimetiletilediaminin Michael katılma reaksiyonu ile sentezlemişler, gen transferi için amino heksanoik asit ve lizin ile modifiye ederek sırasıyla CLPAE-Ahx ve CLPAE-Lys kopolimerlerini oluşturmuşlardır. İncelemeler sonucunda

CLPAE-Ahx'in toksik olmayan ve yüksek verimli bir gen transfer sistemi olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir [72].

Zhang X.Q., Wang X.L. ve arkadaşları, 2005, farklı ligand süstitüent dereceleri (sırasıyla %6,5, %12,5 ve %21,8) ile galaktozlanmış polifosforamidatlar (Gal-PPA'lar) sentezlemişler ve bu polimerleri hepatosit hücre hedefli gen taşıyıcıları olarak değerlendirmişlerdir [73].

Huang S.W., Wang J. ve arkadaşları, 2004, noniyonik ve suda çözünür bir polifosfoester olan poli(2-hidroksietil propilen fosfat)'ı (PPE3), poli(4-metil-2-okso-2-hidro-1,3,2-dioksafosfolan)'ın klorlanması ile sentezlemişlerdir. Devamında 2-benziloksietanol ile esterleştirme ve Pd/C'nin varlığında katalitik hidrojenasyon ile hidroksil grubunun korunmasının kaldırılması gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite, biyouyumluluk, gen ifadesi analizleri sonucunda bu polifosfoesterin yalın DNA bazlı gen terapisi için potansiyel olduğunu düşünmüşlerdir [74].

Lin S., Du F. ve arkadaşları, 2007, dimetilamino etil metakrilat (DMAEMA)'ın atom transfer radikal polimerizasyonu ile, poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(2-(dimetilamino) etil metakrilat) (PDMAEMA) parçalarından oluşan asit-değişkenli bir blok kopolimer ile doğrudan bağlantılı, halkalı bir orto ester bağı içeren PEG-a-PDMAEMA sentezlemişlerdir. PEG-a-PDMAEMA'nın plazmid DNA ile kondense olarak oluşturduğu polipleks nanopartiküllerinin üzerinde PEG zincirlerinin pH-bağımlı perdeleme/perdelememe etkisi boyut ve zeta potansiyel ölçümleri ile değerlendirilmiş, gen transfer taşıyıcısı olarak uygunluğu araştırılmıştır [75].

Luten J., Van Steenis J.H. ve arkadaşları, 2003, gen transferi için polimerlerin yeni bir sınıfı olarak gösterilebilecek suda çözünebilir katyonik polifosfazenleri sentezlemişlerdir. Polimerik taşıyıcı olarak iyi bilinen poli (2-dimetilaminoetil metakrilat) ile polifosfazenleri kıyaslamışlar ve polifosfazen esaslı poliplekslerin *in vitro* COS-7 hücrelerinde transfeksiyonu gerçekleştirdiğini göstermişlerdir [76].

Gan Q., Wang T. ve arkadaşları, 2005, gen veya protein makromoleküllerinin taşınması için taşıyıcı olarak kullanılmak üzere 100–250 nm boyut aralığında kitosan-tripolifosfat (TPP) nanopartiküllerin üretilmesinde polianyonla başlatılan iyonik jelasyon yöntemini araştırmışlardır. Farklı kitosan molekül ağırlıkları, farklı kitosan konsantrasyonları, farklı pH değerleri ve farklı kitosan:TPP oranları kullanarak partikül boyutu ve zeta potansiyeli üzerine etkilerini incelemişlerdir [77].

Yapılan kaynak araştırmalarında, gen transferinde birçok doğal ve sentetik taşıyıcının kullanıldığı görülmektedir. Bu alışmalar ışıkında, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın özgün yönü olan, kaynaklarda rastlanmayan, kitosan esaslı yeni bir gen taşıyıcı nanopartiküler sistemi ilk defa bu çalışmada elde edebilmek için:

- ✓ Kitosanın moleküler yapısında fosfoester bağları içermesi için bir alifatik amino fosfor bileşiği ile modifikasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesi vernn karakterizasyonu,
- ✓ Modifiye kitosanrnnden nanopartikül eldesi,
- ✓ Nanopartiküllerin gen taşımada önemli olan özelliklerinin (parçacık boyutu, dağılımı ve P) belirlenmesi,
- ✓ Sitotoksisite karakteristiklerinin belirlenmesi,
- ✓ Gen taşıma karakteristiklerinin değerlendirilmesi için “yeşil floresan protein gen”i (pEGFN1) kullanılarak *in vitro* gen taşıma/bağlama kapasitesinin belirlenmesidir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KİMYASAL MADDELER

Fosfoester bağları içeren modifiye kitosan (MChi-PEA) sentezi için kitosan (Chi) (deasetilasyon derecesi %75-85) (Sigma-Aldrich), orto-fosforiletanolamin (o-PEA) (Sigma-Aldrich), çözücü olarak glasiyal asetik asit (Merck), çöktürücü olarak aseton ve tetrahidrofuran (THF) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Düşük molekül ağırlıklı kitosan (LMWChi) sentezi için sodyum nitrit (NaNO₂) (Merck), çözücü olarak hidroklorik asit (%37) (Merck) ve çöktürücü olarak sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin eldesi için ise asetik asit (Merck) ve sodyum tripolifosfat (TPP) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Ayrıca tüm deneysel çalışmalarda kullanılan su ise deiyonize su olarak kullanıldı.

Jel elektroforez denemeleri için Agaroz (Sigma-Aldrich), etidyum bromür (moleküler biyoloji saflıkta) (Sigma-Aldrich) ve bromofenol mavisi (Sigma-Aldrich), Tris-Asetat-EDTA (TAE, pH 8.0) tamponu hazırlanışı için tris baz (Sigma-Aldrich), %99 saflıkta glasiyal asetik asit (Merck) ve EDTA (Sigma-Aldrich) kullanıldı.

İn vitro transfeksiyon denemelerinde insan embriyonik böbrek 293 (HEK293T) hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürü ve transfeksiyon denemeleri için Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM) kullanıldı. DMEM medyumunu hazırlamak için sodyum piruvat (Sigma) ve L-glutamat (Sigma), penisilin (Sigma), sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (Sigma) ve streptomisin (Sigma) kullanıldı. Fötal buzağı serumu (FCS) içeren DMEM çözeltisi için Sigma-Aldrich ürünü FCS kullanıldı.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

3.2.1. Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR)

Sentezlenen tüm ürünlerin yapıları Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) tekniği ile aydınlatıldı. FTIR analizleri Agilent Cary 630 model FT-IR cihazında gerçekleştirildi. Ürün/KBr oranı 1/200 mg olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmış tabletler kullanılarak, spektra 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında kaydedildi.

3.2.2. Liyofilizatör (Vakum Altında Dondurarak Kurutucu Sistem)

Ürünlerin saflandırılmasında, vakum altında dondurarak kurutma işlemi (liyofilizasyon) için, Telstar marka Lyo Quest model liyofilizatör kullanıldı.

3.2.3. Santrifüj

Santrifüj işlemi için maksimum 15000 rpm'de çalışan Hettich marka Universal 320R model santrifüj cihazı kullanıldı.

3.2.4. Zeta Potansiyeli, Partikül Boyutu ve Patikül Boyutu Dağılımı (Polidisperslik İndeksi) (PDI) Ölçüm Cihazı

Ürünlerin zeta potansiyelleri, partikül büyüklükleri ve PDI analizleri Zetasizer Nano series (Malvern Instruments) cihazında 25°C'de analiz edildi.

3.2.5. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Ürünlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi için TOSOH EcoSEC markalı GPC/SEC sistemi kullanıldı.

3.2.6. Olympus Ters Mikroskop

Hücrelerin görüntülenmesini sağlamak ve floresan aydınlatıcısı ile nanopartiküler sistemin transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi için IX71 model ters mikroskop kullanıldı.

3.2.7. Manyetik Karıştırıcı ve Terazı

Ürünlerin hazırlanma aşamasında WiseStir MSH model çoklu karıştırıcı ve C-Mag HS 7 markalı kontakt termometreli ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı. Kullanılan katı malzemelerin tartımı için Radwag marka analitik terazi kullanıldı.

3.2.8. Akış (Flow) Sitometri (Akan Hücre Ölçer)

Gen taşıyıcı nanopartiküler sistemin nicel olarak transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi için Guava easyCyte marka akış sitometri kullanıldı.

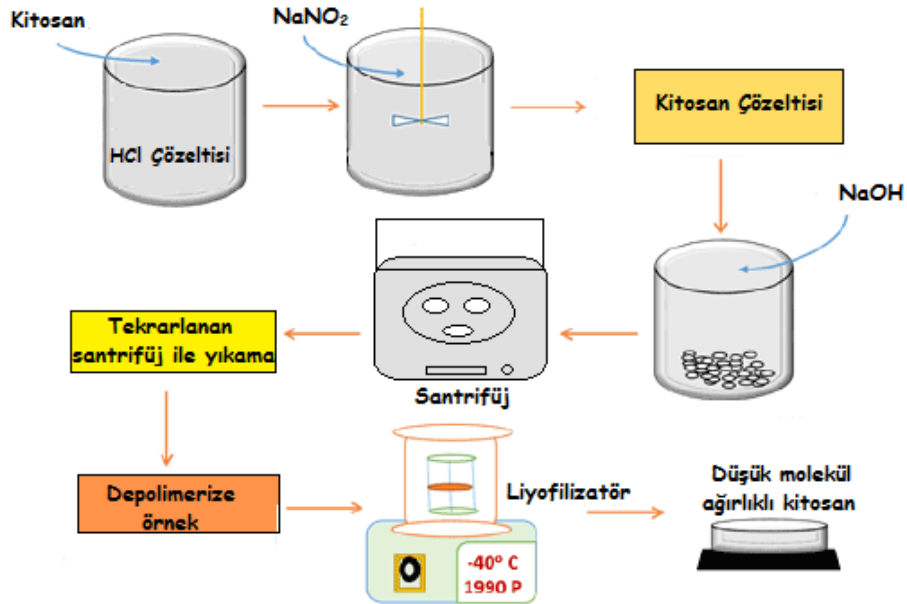
3.3. YÖNTEM

3.3.1. ChiA'dan ChiA_{saf} Sentezi

ChiA_{saf} sentezi, ChiA'nın %4'lük asetik asit içerisinde çözünmesinden sonra santrifüj edilerek liyofilizasyon işlemi uygulanmasıyla elde edildi.

3.3.2. Chi'nin Depolimerizasyonu ile LMWChi Sentezi

LMWChi sentezi, kullanılan kitosandaki 1 mol glukozamin ünitesi başına 0.001-0.1 değişen mol oranlarında sodyum nitrit (NaNO₂) ile reaksiyona tabi tutularak elde edildi. Reaksiyon süresi sonunda NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon durduruldu. Takiben oluşan LMWChi bileşikleri tekrarlanan santrifüj işlemine tabi tutuldu ve üst faz nötr pH'a ulaşana kadar deiyonize su ile yeniden süspanse edildi. Ürünlere liyofilizasyon işlemi uygulandı ve saklandı (Şekil 3.1) [78].



Şekil 3.1: LMWChi sentezi [79].

3.3.3. Chi ve LMWChi Bileşiklerinin o-PEA Bileşiği ile Modifikasyon Reaksiyonu

MChi-PEA ve MLMWChi-PEA bileşiklerini sentezleyebilmek için Chi ve LMWChi bileşiklerinin aşağıda belirtilen koşullarda o-PEA bileşiği ile modifikasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Başlangıç bileşiklerinin %4'lük asetik asit çözeltisi içinde ısıtılarak (50-55°C) çözünmesi sağlandı. İçerisine 1 mol glukozamin ünitesi başına 0,5 mol o-PEA olacak şekilde o-PEA bileşiği ilave edildi ve 70°C'de 1 saat karıştırıldı. Saflaştırma işlemi için MChi-PEA soğuk As içerisinde, MLMWChi-PEA ise THF içerisinde çöktürüldü, süzüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutularak +4°C'de saklandı.

3.3.4. Nanopartikül Hazırlama

MChi-PEA ve MLMWChi-PEA bileşiklerinden nanopartiküllerin hazırlanması, iyonik jelasyon tekniğine göre gerçekleştirildi. MChi-PEA veya MLMWChi-PEA bileşikleri 3 mg/ml olacak şekilde %1'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözüldü ve farklı oranlarda hazırlanmak üzere destile su ile seyreltildi. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP, %0,1'lik (a/h) olacak şekilde destile su ile hazırlandı ve sabit hızda (250 rpm) karıştırılan kitosan bileşiği çözeltilerinin içerisine, damla damla ilave edilerek bir saat boyunca sabit hızda (250 rpm) karıştırıldı. Nanopartikülleri (nMChi-PEA veya nMLMWChi-PEA) içeren çözeltiler +4 °C'de saklandı [77,80].

3.3.5. Plazmid DNA (pDNA) Genini Taşıyan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bölüm 3.3.2, 3.3.3 ve 3.3.4'te anlatılan sentez yöntemleri ve Bölüm 4.1.3-4.1.4'te anlatılan analiz sonuçlarına göre hazırlanan nanopartiküller, pDNA (Green Fluorescent Protein circular plasmid DNA; pEGFN1) ile 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1 gibi değişen oranlarda (a/a) muamele edilerek nanopartikül-gen kompleksi gnMChi-PEA ve gnMLMWChi-PEA hazırlandı.

3.3.6. gnMChi-PEA ve gnMLMWChi-PEA Ürünlerinin Jel Elektroferez Analizleri

Nanopartiküller ile pDNA arasında kompleks oluşturma kabiliyetlerinin incelenmesi için oluşturulan kompleksler jel elektroferezde (Cleaver Scientific Ltd., İngiltere) yürütüldü.

Agaroz, berrak çözelti oluşuncaya kadar TAE, pH 8.0 tamponu içerisinde kaynatılarak çözdürüldü. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra çözeltiliye 0.5 µg/ml derişimde etidyum bromür ilave edildi ve daha sonra donan jel, içerisinde pH 8.0 TAE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Yürütme için 9:1 (kompleks:elektroferez yükleme tamponu) oranında kompleks ile 6x agaroz jel yükleme boyası olan bromofenol mavisi karıştırılarak jeldeki kuyucuklara

uygulandı ve elektroforez işlemi sabit 100 volt akımda 1 saatte tamamlandı. Elektroforez işlemi sonrası, UV ışık altında incelenen jeller fotoğrafları çekilerek değerlendirildi [81].



Şekil 3.2: Jel elektroforez cihazı.

3.4. MCHİ-PEA VE MLMWCHİ-PEA ÜRÜNLERİNİN SİTOTOKSİSİTE VE *İN VİTRO* TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARI

3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması [82]

DMEM Medyumu; 13,38 g L-glutamat ve sodyum piruvat içeren toz DMEM, 60 mg penisilin, 3,7 g NaHCO₃ ve 100 mg streptomisin 1 L su içerisinde çözündürülerek hücre kültür medyumu hazırlandı.

FCS İçeren DMEM (DMEM+FCS); 174 ml DMEM medyumu üzerine 20 ml FCS, 2 ml Na-piruvat, 2 ml non-esansiyel aminoasit ve 2 ml L-glutamin katılarak 200 ml DMEM+FCS medyumu hazırlandı.

FCS İçermeyen DMEM (DMEM-FCS); 194 ml DMEM medyumu üzerine 2 ml Na-piruvat, 2 ml non-esansiyel aminoasit ve 2 ml L-glutamin katılarak 200 ml DMEM-FCS medyumu hazırlandı.

3.4.2. HEK293T Hücrelerinin Hazırlanması

3.4.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Kullanımı:

Çalışmalarda kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalından sağlanan HEK293T hücreleri aynı Anabilim Dalının laboratuvarında çoğaltılarak kullanıldı.

Hücrelerin bulunduğu kriyotüp sıvı azottan çıkarılarak 37°C'de su banyosu içerisinde çözdürüldü. 5 ml DMEM ile yıkanıp 5 dk. boyunca 2000 rpm'de santrifüj edilerek kriyotüp içerisindeki hücreler DMSO'dan arındırıldı. Takiben üst faz dekante edildi, hücreler 1 ml DMEM içerisinde dağıtıldı. Elde edilen HEK293T hücrelerinin konsantrasyonu, Thoma lamında hemositometrik yöntemle hücre sayımı ile ölçüldü.

Hemositometrik yöntemle hücre sayımı sırasında %0,4 tripan mavisi kullanılarak hücrelerin canlılığı da tespit edildi. Bu işlemden sonra hücreler birim cm^2 'ye uygun oranda kültür kaplarına ekildi. 1 gün boyunca üremeye bırakıldı. Daha sonra hücreler denemelerde kullanılacak petrilere uygun konsantrasyonda olacak şekilde dağıtıldı.

3.4.3. Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin MTT Testi ile İncelenmesi

nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA nanopartiküllerin sitotoksitesite karakteristiklerini değerlendirmek için, kantitatif bir yöntem olan MTT testi [83] HEK293T hücrelerine uygulandı. Bu test, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan mitokondriyal süksinat-dehidrojenaz enzimi ile çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşen, sarı renkli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) boyasının azalmasını ölçmeye dayalı kolorimetrik bir analizdir. Bu azalış sadece aktif hücrelerde gerçekleşmektedir ve bu aktivite hücrelerin canlılığının bir belirteci olarak yaşayan hücreleri belirlemede etkindir.

96 kuyucuklu petrilere, kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde %10 FCS içeren 150 μL DMEM'li hücreler ekildi. 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında kuyucuklarda bulunan DMEM+FCS alınarak 100 μL olacak şekilde DMEM-FCS ile nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA ürünlerinin değişen konsantrasyonları (50, 125, 250 ve 500 $\mu\text{g/ml}$) hücrelere ekildi. 4 saat inkübe edildikten sonra polimer örneklerini içeren medyum uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 μL MTT çözeltisi (DMEM-FCS içeren 1 mg/ml 'lik

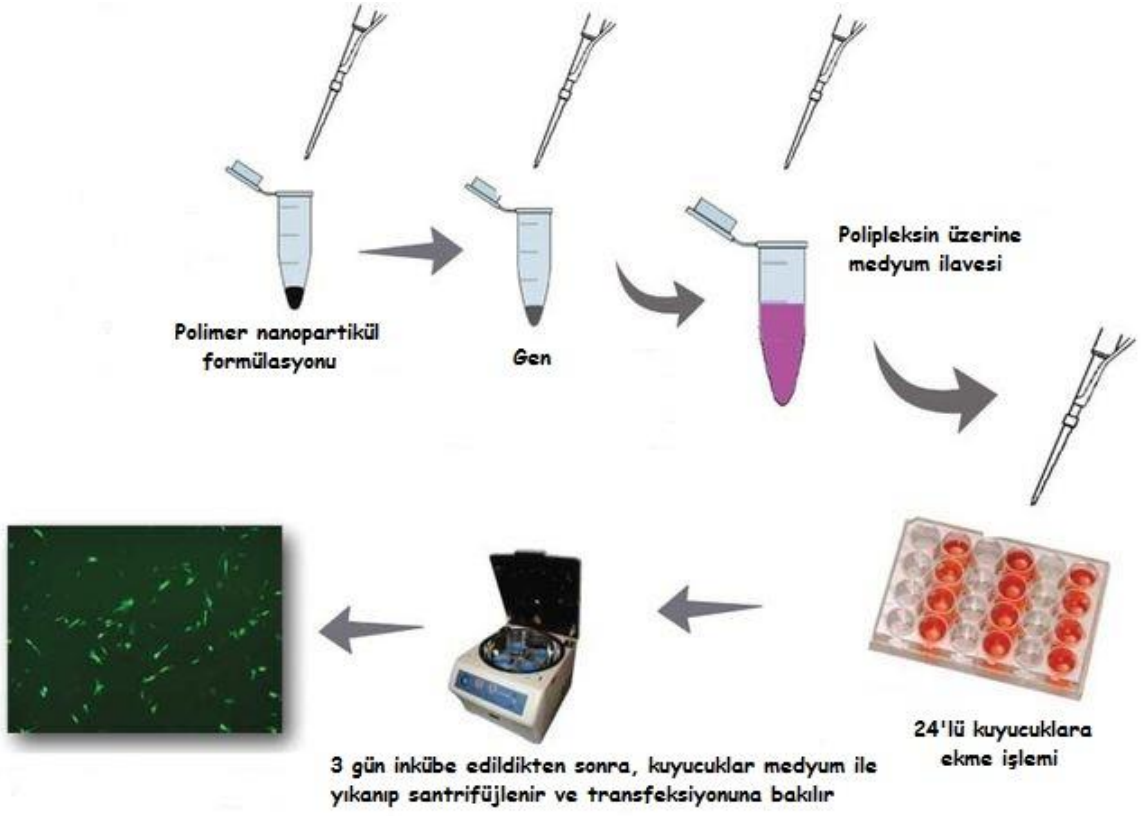
çözelti) ilave edildi ve 3 saat bekletildi. Etkileşmeyen MTT uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Daha sonra yaşayan hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerini çözmek için 150 µL dimetil sülfoksit ilave edildi ve çözülen boyanın verdiği absorbans mikropłaka (Elisa) okuyucusunda 550 nm dalga boyunda kaydedildi (ELx800, Biotek Instruments, Winooski, VT, A.B.D). Hücre canlılık oranı, Denklem 3.1’de verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{A_{\text{polimer}}}{A_{\text{sadece DMEM}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Denklem 3.1’de A_{polimer} ; polimer örnekleri ile inkübe edilmiş hücrelerin ortalama absorbans değerini, $A_{\text{sadece DMEM}}$ ise DMEM-FCS ile inkübe edilmiş kontrol hücrelerin ortalama absorbans değerini belirtmektedir.

3.4.4. Nanopartiküler Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliği

Yukarıda anlatılmış olan tüm analiz sonuçlarına göre uygun özelliklere sahip gnMChi-PEA ve gnMLMWChi-PEA ürünlerinin transfeksiyon etkinliği HEK293T hücrelerinde denendi. 24’lü kuyucuklara 20.000 civarında eritilen hücreler ekildi ve 1 gün boyunca proliferasyon yani hücrelerin çoğalması için 37°C’de CO₂ etüvünde inkübe edildi. 1 gün sonunda hücre proliferasyonu mikroskopta kontrol edilerek DMEM+FCS medyumı alındı. Nanopartiküler sistemler ve DMEM-FCS hücreler üzerine eklendi ve 4 saat 37°C’de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. 4. saatin sonunda hücre üzerindeki medyum atılarak yerine tekrar DMEM+FCS medyumı eklendi ve 3 gün boyunca 37°C’de CO₂ etüvünde inkübe edildi. Nanopartiküler taşıyıcıların transfeksiyon etkinliği, 3. gün sonunda hücrelerdeki yeşil floresan proteini ekspresyonları Olympus IX71 model ters mikroskopta 460-480 nm floresans ışık altında incelendi. Hücrelerin göstermiş oldukları yeşil ışımaya dayanılarak transfekte hücreler belirlendi. Takiben 24’lü kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılarak, her biri 250 µL PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 250 µL %0.25 Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek 2 dakika etüvde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden hareketlenmesi sağlandıktan sonra kuyucuklar iyice yıkandı. Hareketlenen hücrelerin ölmemesi için tripsinin aktivitesini durdurmak amacıyla kuyucuklar 500 µL DMEM+FCS ile yıkanarak santrifüj tüplerine alındı ve 1000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, çöken hücreler 300 µL PBS ile sulandırılarak 96’lı kuyucuklara yüklendi ve akış sitometride 488 nm dalga boyunda transfeksiyon etkinliği belirlendi.



Şekil 3.3: Transfeksiyon işleminin hazırlanışı [84].

4. BULGULAR

4.1. DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLIL KİTOSAN VE MODİFİYE KİTOSAN ÜRÜNLERİNİN ELDE EDİLMESİNE AİT DENEMELER

İki farklı fiziksel özellikteki Chi örneği [toz (ChiA) ve iplikli katı (ChiB)] Bölüm 3.3.3'te anlatıldığı gibi o-PEA bileşiği ile modifiye edildi (Deneme 1-2). Takiben daha uygun özelliklerdeki ChiA örneği çeşitli fiziksel işlemlerden geçirilerek saflandırılmış kitosan (ChiA_{saf}) elde edildi (Deneme 3) ve ChiA ile nanopartikül özellikleri bakımından karşılaştırmaları yapılırken ayrıca bunlardan elde edilen LMWChi (Deneme 4-5) ile de aynı karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Bölüm 3.3.2'de anlatılan depolimerizasyon yöntemine göre belirlenen mol aralıklarında hesaplanan NaNO₂ miktarları ile kitosanın depolimerizasyonu aşağıda belirtilen denemelerde (Deneme 6-11) gerçekleştirildi. Elde edilen depolimerizasyon ürünleri ile kitosanın o-PEA bileşiği ile modifikasyon reaksiyonları ise Bölüm 3.3.3'te anlatıldığı yöntemine göre aşağıda verilen denemelerde (Deneme 12-16) gerçekleştirildi.

Deneme 1

1 g ChiA, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisinde dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu, buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 1'de verilmiştir.

Deneme 2

1 g ChiB, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisinde dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu, buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 1'de verilmiştir.

Deneme 3

1 g ChiA, %4 asetik asit içeren 100 ml'lik asetik asit-destile su çözeltisine bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, çözelti santrifüj edilerek çözünmeyen kısımların çökmesi sağlandı ve üst sıvı dekante edilerek petrilere aktarıldı. Petrillerdeki sıvılar dondurulduktan sonra liyofilizasyon işlemine tabi tutularak ChiA_{saf} ürünü elde edildi. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 2'de verilmiştir.

Deneme 4

1 g ChiA_{saf}, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. ChiA_{saf} çözündükten sonra, 0.02 g NaNO₂ ChiA_{saf} çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşana kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChiA_{saf} ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 3'te verilmiştir.

Deneme 5

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. ChiA çözündükten sonra, 0.02 g NaNO₂ ChiA çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşana kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChiA ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 3'te verilmiştir.

Deneme 6

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Chi çözüldükten sonra, 0.0004 g NaNO₂ Chi çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşıncaya kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChi_{0,4} ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneme 7

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Chi çözüldükten sonra, 0.01 g NaNO₂ Chi çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşıncaya kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChi₁ ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneme 8

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Chi çözüldükten sonra, 0.02 g NaNO₂ Chi çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşıncaya kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChi₂ ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneme 9

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Chi çözüldükten sonra, 0.03 g NaNO₂ Chi çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşıncaya kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChi₃ ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneme 10

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Chi çözüldükten sonra, 0.04 g NaNO₂ Chi çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşıncaya kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChi₄ ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneme 11

1 g ChiA, %0.5 (a/h) oranında 50 mM HCl çözeltisinde çözdürülmek üzere, hazırlanan 200 ml (0.84 ml HCl+199.16 ml destile su) çözelti içerisinde bir gün boyunca çözünmeye bırakıldı. Chi çözüldükten sonra, 0.05 g NaNO₂ Chi çözeltisine katılarak 16 saat oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. 16 saatin sonunda pH'ı 10'un üzerine getirmek için 6 N NaOH kullanılarak çöktürme işlemi ile reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm'de 5 dk. boyunca kitosanlar santrifüj edildi ve süpernatantlar nötr pH'a ulaşıncaya kadar destile su ile yıkama yapılarak santrifüje devam edildi. pH nötrlendikten sonra, çöken kitosanlar santrifüj tüpünde yıkanarak petrilere koyulup dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu ve elde edilen LMWChi₅ ürünü buzdolabında +4°C'de saklandı.

Deneme 12

1 g ChiA, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisine dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 4-5'te verilmiştir.

Deneme 13

1 g LMWChi₁, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisine dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 6'da verilmiştir.

Deneme 14

1 g LMWChi₂, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisine dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 6'da verilmiştir.

Deneme 15

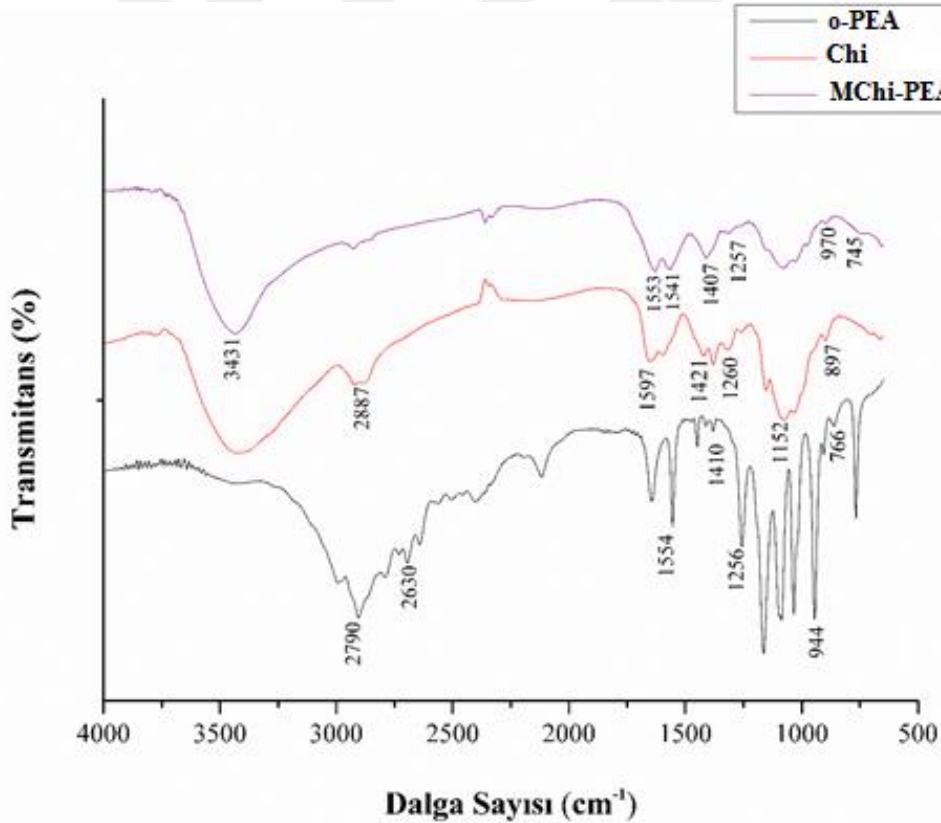
1 g LMWChi₃, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözünmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisine dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3-Nanopartikül Deneme 6'da verilmiştir.

Deneme 16

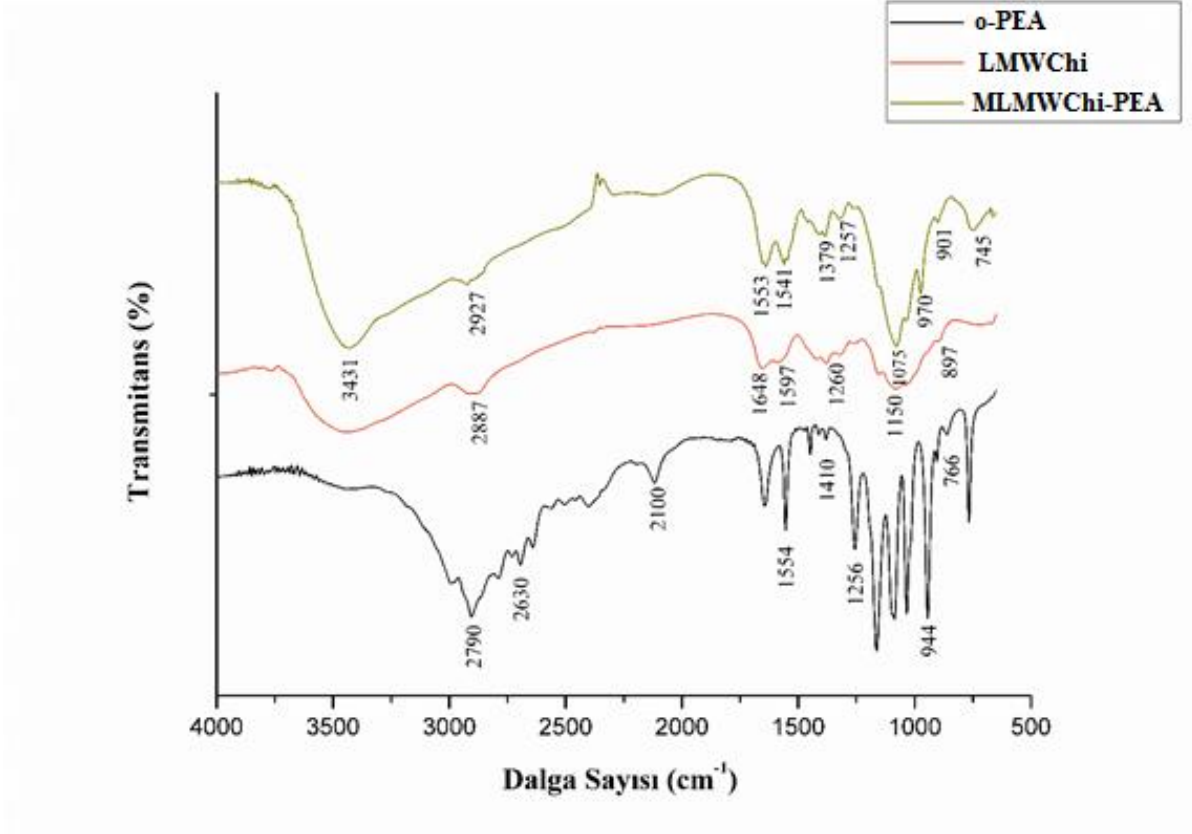
1 g LMWChi₄, 100 ml %4'lük asetik asit çözeltisi içerisinde (4 ml asetik asit+96 ml destile su) bir gün boyunca 50-55°C'de ısıtılarak çözülmeye bırakıldı. Çözündükten sonra, 0.394 g o-PEA katılarak 70°C'de boyunlu reaktörde, su banyosunun içerisinde 1 saat karıştırıldı. 1 saatin sonunda çözelti soğuk aseton içerisine dökülerek çöktürüldü ve 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Ürüne ait nanopartikül çalışmaları Bölüm 4.1.3- Nanopartikül Deneme 6'da verilmiştir.

4.1.1. MChi-PEA ve MLMWChi-PEA Ürünlerinin FTIR Analiz Sonuçları

Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı şekilde elde edilen LMWChi, MChi-PEA ve MLMWChi-PEA ürünlerinin FTIR analizleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi ve spektra aşağıda Şekil 4.1 ve 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.1: o-PEA, Chi ve MChi-PEA ürününe ait FTIR spektra.



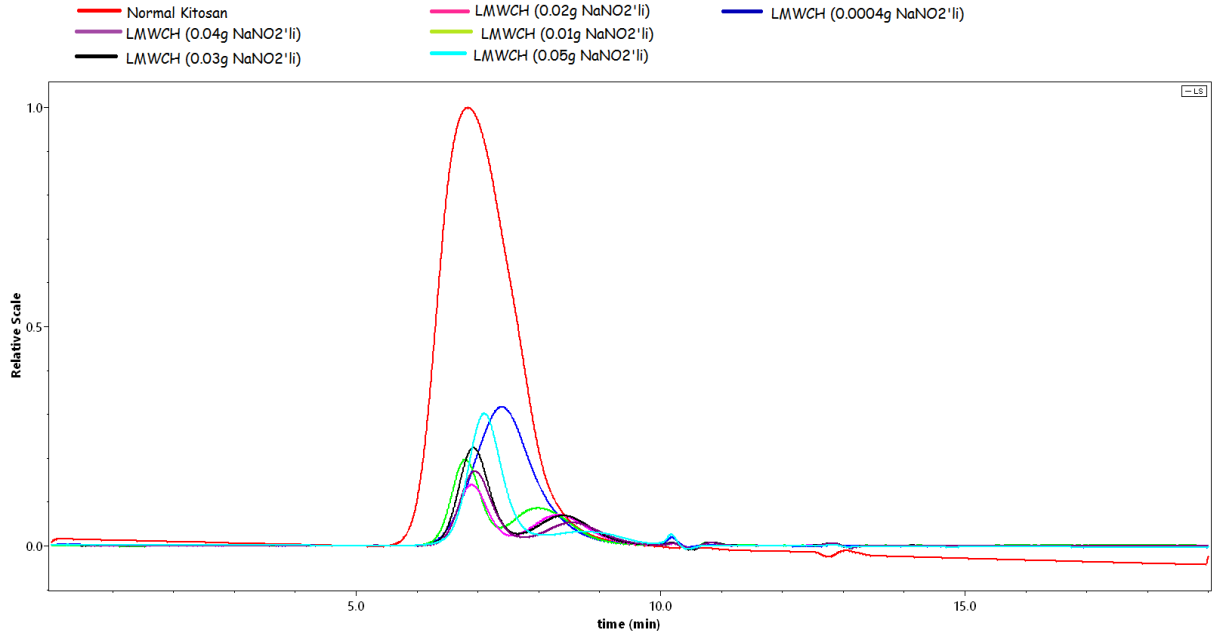
Şekil 4.2: o-PEA, LMWChi ve MLMWChi-PEA ürününe ait FTIR spektra.

4.1.2. Ürünlerin GPC Analizi Sonuçları

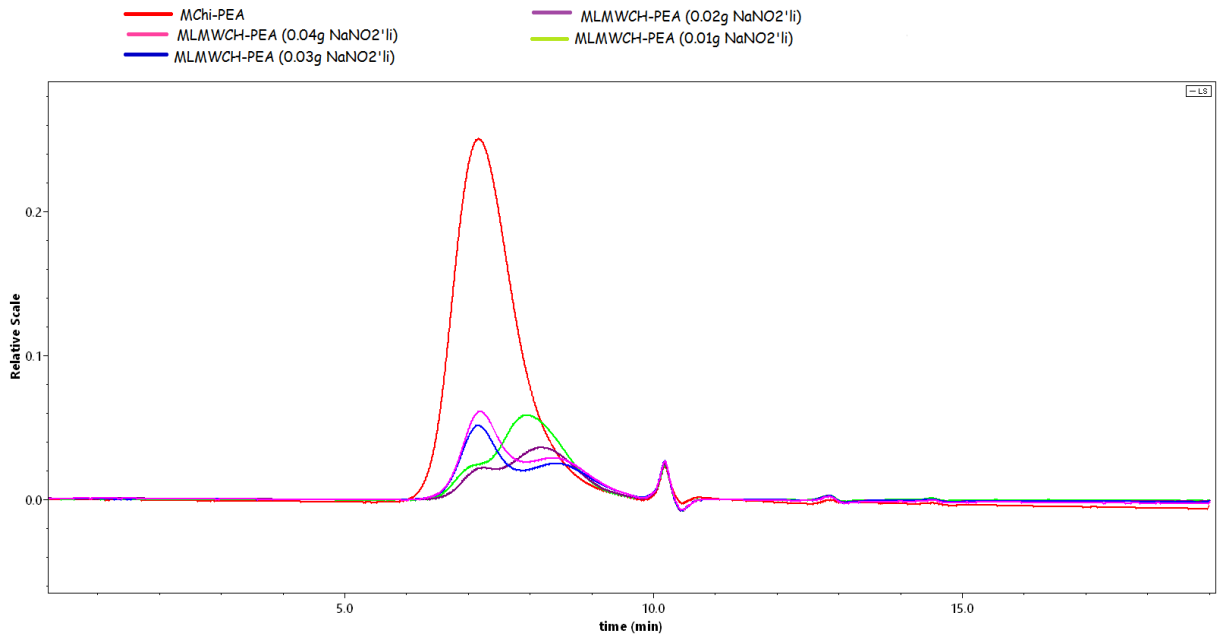
Chi, LMWChi, MChi-PEA ve MLMWChi-PEA ürünlerine ait örnekler %1'lik asetik asit içerisinde çözüldükten sonra, 1 mg/ml olacak şekilde 0.2 mol/l'lik sodyum asetat tamponu ile örnekler tamamlanarak viallere koyuldu ve cihaza yüklendi. GPC analizi sonuçlarına göre örneklerin ortalama molekül ağırlıkları M_n ve M_w ile PDI değerleri Tablo 4.1'de, toplu haldeki karşılaştırmalı GPC grafikleri ise Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.1: GPC analizi sonuçları.

Ürün	M_n (kDa)	M_w (kDa)	PDI (M_w/M_n)
Chi	103.1	268.3	2.601
LMWChi _{0,4}	88.4	138.4	1.565
LMWChi ₁	16.9	24.9	1.469
LMWChi ₂	13.5	17.2	1.273
LMWChi ₃	11.1	14.5	1.306
LMWCH ₄	8.3	10.7	1.286
LMWChi ₅	8.6	11.6	1.339
MChi-PEA	176.4	271.7	1.540
MLMWChi-PEA ₁	29.9	47.8	1.601
MLMWChi-PEA ₂	23.1	40.5	1.753
MLMWChi-PEA ₃	15.7	50.0	3.175
MLMWChi-PEA ₄	13.5	48.7	3.611



Şekil 4.3: Chi, LMWChi_{0.4} (0.0004 g NaNO₂), LMWChi₁ (0.01 g NaNO₂), LMWChi₂ (0.02 g NaNO₂), LMWChi₃ (0.03 g NaNO₂), LMWChi₄ (0.04 g NaNO₂), LMWChi₅ (0.05 g NaNO₂) GPC analizi sonuçları.



Şekil 4.4: MChi-PEA, MLMWChi-PEA₁ (0.01 g NaNO₂), MLMWChi-PEA₂ (0.02 g NaNO₂), MLMWChi-PEA₃ (0.03 g NaNO₂), MLMWChi-PEA₄ (0.04 g NaNO₂) GPC analizi sonuçları.

4.1.3. Chi ve MChi Ürünlerinden Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Nanopartikül Deneme 1

Bölüm 3.3.4'te belirtildiği şekilde Chi ve MChi örnekleri 3 mg/ml olacak şekilde %1'lik asetik asit içerisinde çözüldükten sonra Tablo 4.2'de belirtildiği miktarlarda çalışılarak nanopartikül formülasyonları hazırlandı. Sonuçlar Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2: Nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

Parametre	Chi veya MChi (%)	Çözelti hacmi (ml)	Chi veya MChi:TPP (a/a)	TPP miktarı (ml)
	0.10	6.67	4:1	5
Nanopartikül Formülasyonu	Chi veya MChi:TPP (a/a)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nChiA	4:1	344,4	0,533	53.7±3.67
nMChiA-PEA	4:1	190,7	0,405	43.2±4.91
nChiB	4:1	339,8	0,626	62.3±4.08
nMChiB-PEA	4:1	187,1	0,457	43.3±4.13

Nanopartikül Deneme 2

Bölüm 4.1.3 ve Tablo 4.2'ye göre belirtilen sonuçlara göre daha uygun özelliklerdeki ChiA örneği %4'lük asetik asit içerisinde çözünüp liyofilize edilerek elde edilmiş olan saflandırılmış kitosan (ChiA_{saf}) ve ChiA ile Bölüm 3.3.4'te ve Tablo 4.3'te belirtildiği şekilde nanopartikül formülasyonları hazırlama denemeleri gerçekleştirildi ve sonuçları Tablo 4.4–4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.3: ChiA_{saf} ve ChiA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.

Nanopartikül Formülasyonu	ChiA _{saf} veya ChiA (%)	ChiA _{saf} veya ChiA Çözeltisi Hacmi (ml)	ChiA _{saf} veya ChiA:TPP (a/a)	TPP Miktarı (ml)
n ₁	0.05	3.33	3:1	3.3
n ₂			4:1	2.5
n ₃			5:1	2.0
n ₄	0.10	6.67	3:1	6.7
n ₅			4:1	5.0
n ₆			5:1	4.0
n ₇	0.15	10.00	3:1	10.0
n ₈			4:1	7.5
n ₉			5:1	6.0
n ₁₀	0.20	13.33	3:1	13.3
n ₁₁			4:1	10.0
n ₁₂			5:1	8.0
n ₁₃	0.25	16.67	3:1	16.7
n ₁₄			4:1	12.5
n ₁₅			5:1	10.0

Tablo 4.4: ChiA_{saf} nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

Nanopartikül Formülasyonu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
n ₁ -ChiA _{saf}	158,6	0,480	33.0±9.77
n ₂ -ChiA _{saf}	183,1	0,456	33.0±10.0
n ₃ -ChiA _{saf}	212,9	0,512	30.0±9.77
n ₄ -ChiA _{saf}	163,5	0,690	35.2±7.23
n ₅ -ChiA _{saf}	228,2	0,522	35.0±9.77
n ₆ -ChiA _{saf}	252,7	0,531	33.0±6.70
n ₇ -ChiA _{saf}	187,2	0,559	33.5±6.02
n ₈ -ChiA _{saf}	221,0	0,479	33.0±2.57
n ₉ -ChiA _{saf}	266,0	0,544	30.0±6.45
n ₁₀ -ChiA _{saf}	171,1	0,509	34.4±5.89
n ₁₁ -ChiA _{saf}	250,7	0,516	28.0±5.0
n ₁₂ -ChiA _{saf}	286,4	0,550	28.0±7.90
n ₁₃ -ChiA _{saf}	283,6	0,328	26.4±4.43
n ₁₄ -ChiA _{saf}	248,5	0,477	29.0±9.0
n ₁₅ -ChiA _{saf}	319,3	0,625	25±8.50

Tablo 4.5: ChiA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

Nanopartikül Formülasyonu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
n ₁ -ChiA	97,40	0,412	36.0±3.00
n ₂ -ChiA	129,0	0,480	35.2±5.20
n ₃ -ChiA	147,1	0,479	36.0±8.31
n ₄ -ChiA	96,84	0,399	37.8±7.76
n ₅ -ChiA	127,9	0,495	35.0±9.00
n ₆ -ChiA	155,0	0,509	30.0±6.00
n ₇ -ChiA	144,4	0,482	39.5±4.77
n ₈ -ChiA	163,9	0,611	33.0±5.57
n ₉ -ChiA	204,3	0,614	30.0±6.00
n ₁₀ -ChiA	150,0	0,522	41.5±3.35
n ₁₁ -ChiA	206,7	0,569	32.0±5.0
n ₁₂ -ChiA	245,8	0,545	32.0±7.20
n ₁₃ -ChiA	156,9	0,564	35.5±3.56
n ₁₄ -ChiA	199,0	0,643	32.0±4.0
n ₁₅ -ChiA	282,0	0,596	30±5.50

Nanopartikül Deneme 3

Bölüm 3.3.2’de belirtilen yöntemle göre ChiA ve ChiA_{saf} kullanılarak depolimerizasyonla düşük molekül ağırlıklı kitosanlar olan LMWChiA ve LMWChiA_{saf} sentezlendi ve bunlardan nanopartikül formülasyonları hazırlandı. Bunlara ait özellikler Tablo 4.6’da sunulmuştur.

Tablo 4.6: LMWChiA ve LMWChiA_{saf} nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

Nanopartikül Formülasyonu	Kitosan (%)	Kitosan:TPP Oran	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
n ₁ -LMWChiA	0.05	3:1	165,0	0,133	27.0±6.83
n ₂ -LMWChiA		4:1	142,8	0,118	30.0±4.57
n ₃ -LMWChiA		5:1	141,1	0,136	33.4±10.4
n ₄ -LMWChiA _{saf}	0.05	3:1	131,9	0,383	30.7±5.59
n ₅ -LMWChiA _{saf}		4:1	131,9	0,294	35.5±8.14
n ₆ -LMWChiA _{saf}		5:1	137,2	0,277	39.0±7.99

Yapılan denemeler sonucunda toz haldeki kitosan olan ChiA’dan elde edilen nanopartikül formülasyonlarının daha uygun özelliklere sahip olduğu sonucuna varıldığından, takip eden denemelerde ChiA ve ondan elde edilmiş olan ürünler ile çalışılmaya karar verildi. Aşağıdaki tablolarda ChiA sadece Chi olarak kısaltılmış şekliyle verildi.

Nanopartikül Deneme 4

Tablo 4.3’te verilen parametrelere göre belirtilen miktarlarda, MChi-PEA ürününe ait nanopartikül formülasyonu hazırlama denemesi yapıldı ve sonuçları Tablo 4.7’de sunulmuştur.

Tablo 4.7: MChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

Nanopartikül Formülasyonu	MChi-PEA (%)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMChi-PEA ₁	0.05	2384	1,000	-
nMChi-PEA ₂		104,9	0,312	22.3±5.14
nMChi-PEA ₃		84,83	0,434	28.4±4.85
nMChi-PEA ₄	0.10	2166	0,916	-
nMChi-PEA ₅		216,9	0,342	20.8±4.01
nMChi-PEA ₆		177,26	0,379	28.1±15.2
nMChi-PEA ₇	0.15	2960	0,215	-
nMChi-PEA ₈		218,6	0,316	19.3±3.76
nMChi-PEA ₉		85,48	0,331	24.2±3.49
nMChi-PEA ₁₀	0.20	2493	0,534	-
nMChi-PEA ₁₁		250,5	0,421	18.1±3.39
nMChi-PEA ₁₂		98,06	0,248	22.6±7.18
nMChi-PEA ₁₃	0.25	1,288	1,000	-
nMChi-PEA ₁₄		161,7	0,241	18.0±4.87
nMChi-PEA ₁₅		104,1	0,261	23.0±5.25

4.1.4. MChi-PEA ve MLMWChi-PEA Ürünleri ile nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Tablo 4.7’de elde edilen sonuçlara göre %0.05 MChi-PEA içeren nanopartikül formülasyonlarından nMChi-PEA₂ ve nMChi-PEA₃ formülasyonları istenilen özelliklere sahip elde edildiği için Bölüm 3.3.4’te anlatılan yöntem ve Tablo 4.8-4.9’da belirtilen parametrelere göre nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA nanopartikülleri formülasyonları hazırlandı (Nanopartikül Deneme 5-6). nMLMWChi-PEA nanopartikülleri için; Bölüm 4.1’de ifade edilen LMWChi sentezinde 4 farklı NaNO₂ miktarı kullanılarak elde edilen düşük molekül ağırlıklı kitosanlara Bölüm 3.3.3’te belirtildiği gibi modifikasyon reaksiyonu uygulandı ve 4 farklı ürünün de nanopartikül formülasyonları hazırlandı. 45 mg/15 ml olacak şekilde %1 asetik asit içerisinde çözülen MChi-PEA ve MLMWChi-PEA ürünleri, 10 mg/10ml derişimde destile su içerisinde hazırlandı ve TPP ile muamele edildi.

Nanopartikül Deneme 5

Tablo 4.8: nMChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.

Nanopartikül Formülasyonu	MChi-PEA (%)	MChi-PEA Çözeltili Hacmi (ml)	MChi-PEA:TPP (a/a)	TPP Miktarı (ml)
nMChi-PEA ₁	0.05	1.67	3:1	1.667
nMChi-PEA ₂			4:1	1.250
nMChi-PEA ₃			5:1	1.000
nMChi-PEA ₄			6:1	0.833
nMChi-PEA ₅			7:1	0.714
nMChi-PEA ₆			8:1	0.625
nMChi-PEA ₇			9:1	0.556
nMChi-PEA ₈			10:1	0.500
nMChi-PEA ₉			20:1	0.250

Nanopartikül Deneme 6**Tablo 4.9:** nMLMWChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.

	MLMWChi-PEA (%)	MLMWChi-PEA Çözeltisi Hacmi (ml)	MLMWChi-PEA:TPP (a/a)	TPP Miktarı (ml)
nMLMWChi-PEA*	0.05	1.67	3:1	1.667
			4:1	1.250
			5:1	1.000
			6:1	0.833
			7:1	0.714
			8:1	0.625
			9:1	0.556
			10:1	0.500
			20:1	0.250
	0.10	3.33	3:1	3.330
			4:1	2.500
			5:1	2.000
			6:1	1.666
			7:1	1.428
			8:1	1.250
			9:1	1.111
			10:1	1.000

*: nMLMWChi-PEA₁₋₄ formülasyonlarının hazırlanmasında bu tabloda verilen parametreler kullanılmıştır (Tablo 4.11-4.15).

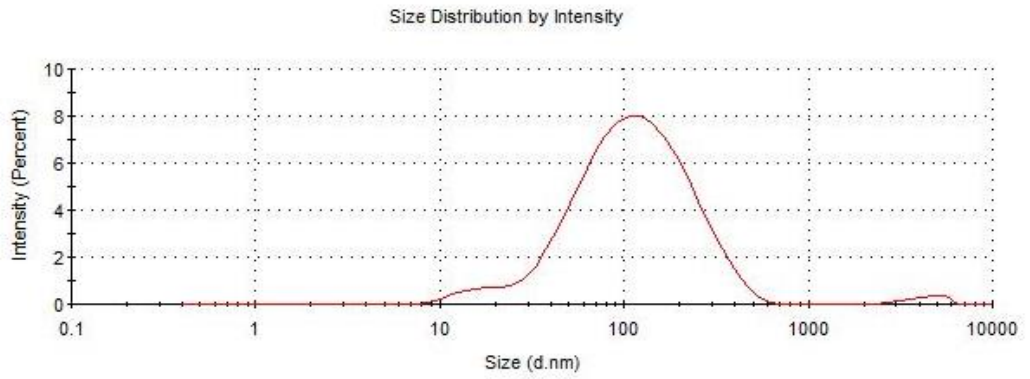
4.1.4.1. nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA Nanopartikül Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü, PDI ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular

Bölüm 4.1.4 nanopartikül formülasyonlarının hazırlandığı Nanopartikül Deneme 5 ve 6'da belirtilen parametreler ile hazırlanan nMChi-PEA ve nMLMWChi-PEA nanopartiküllerinin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.10-4.14'te verilmiştir. Uygun

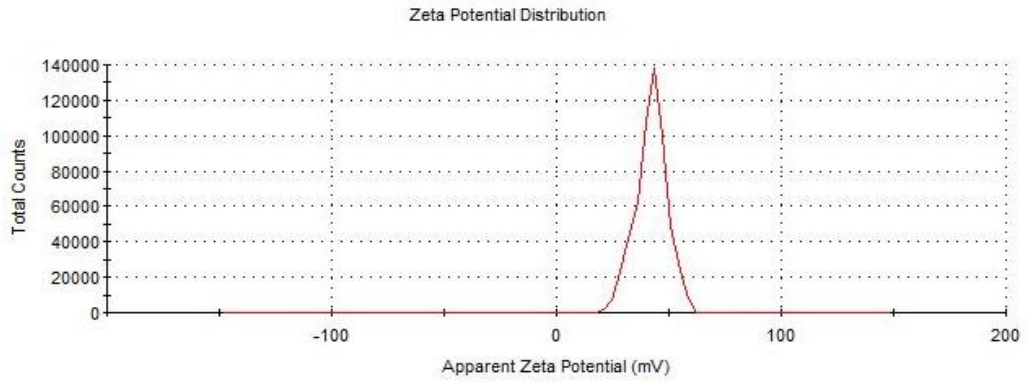
özelliklerde olan örneklere ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerine ait grafikler ise Şekil 4.5-4.16'da verilmiştir.

Tablo 4.10: nMChi-PEA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

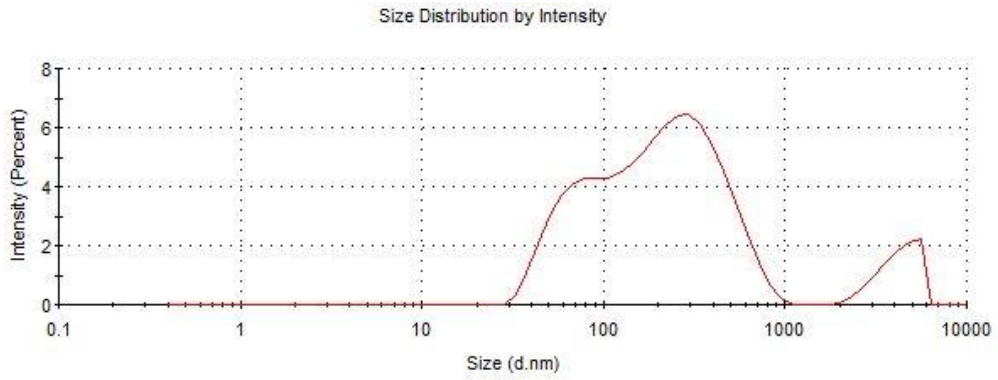
Nanopartikül Formülasyonu	MChi-PEA:TPP (a/a)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMChi-PEA ₁	3:1	97,40	0,410	28.4±4.85
nMChi-PEA ₂	4:1	80,15	0,400	31.9±3.87
nMChi-PEA₃	5:1	85,37	0,390	42.2±6.91
nMChi-PEA ₄	6:1	89,86	0,416	40.5±3.56
nMChi-PEA ₅	7:1	99,50	0,547	40.1±3.92
nMChi-PEA ₆	8:1	101,2	0,468	47.8±5.95
nMChi-PEA ₇	9:1	111,6	0,481	51.8±6.66
nMChi-PEA ₈	10:1	137,8	0,691	48.5±6.85
nMChi-PEA ₉	20:1	188,9	0,410	58.9±6.94



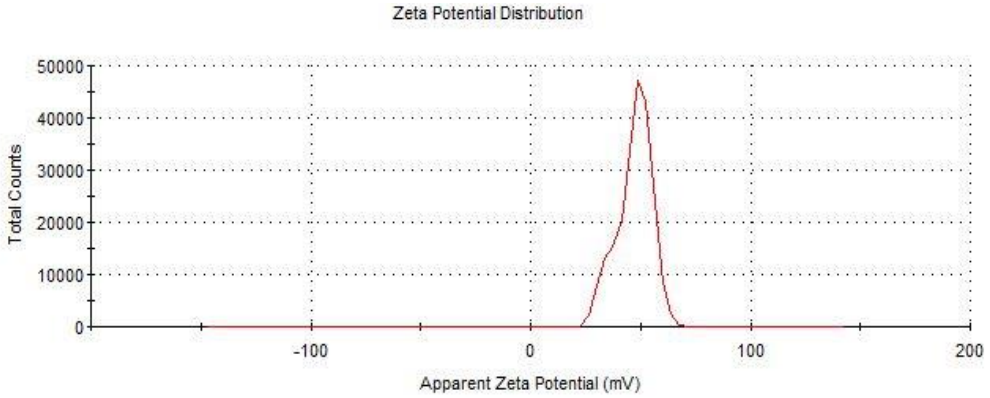
Şekil 4.5: nMChi-PEA₃ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.



Şekil 4.6: nMChi-PEA₃ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.



Şekil 4.7: nMChi-PEA₈ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.

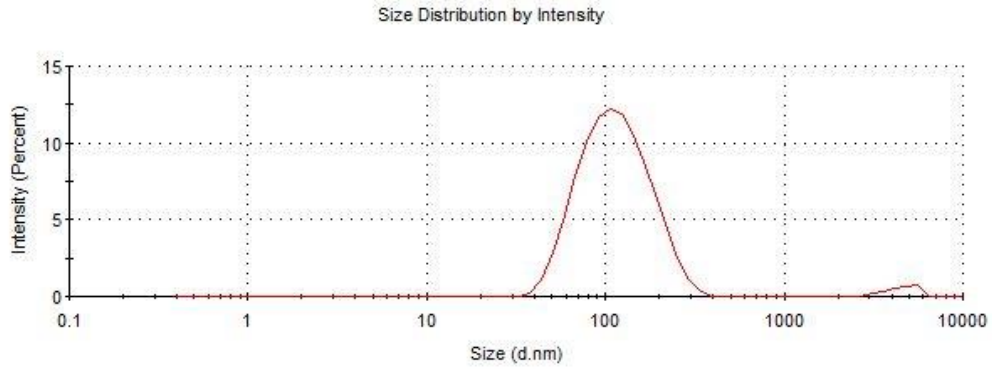


Şekil 4.8: nMChi-PEA₈ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.

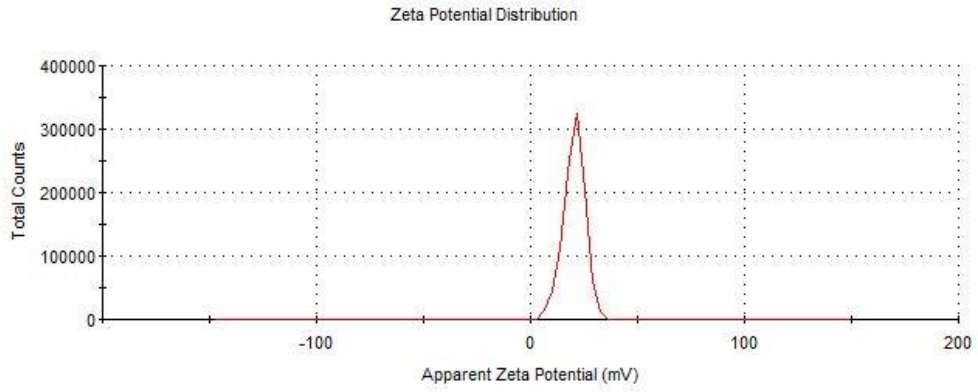
Tablo 4.11: nMLMWChi-PEA₁ (0.01g NaNO₂'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

nMLMWChi-PEA ₁	MLMWChi-PEA ₁ :TPP (a/a)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMLMWChi-PEA ₁₁	3:1	105,2	0,215	20.4±4.98
nMLMWChi-PEA ₁₂	4:1	85,78	0,400	29.0±7.31
nMLMWChi-PEA ₁₃	5:1	109,4	0,474	37.3±6.36
nMLMWChi-PEA ₁₄	6:1	103,6	0,505	35.6±9.95
nMLMWChi-PEA ₁₅	7:1	89,72	0,396	31.1±11.2
nMLMWChi-PEA ₁₆	8:1	92,93	0,301	41.0±6.35
nMLMWChi-PEA ₁₇	9:1	105,4	0,415	37.7±12.3
nMLMWChi-PEA ₁₈	10:1	101,1	0,380	41.0±8.91
nMLMWChi-PEA ₁₉	20:1	101,9	0,380	37.5±6.24

*0.01 g NaNO₂ ile sentezlenen MLMWChi'dan elde edilen nanopartiküller.



Şekil 4.9: nMLMWChi-PEA₁₁ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.

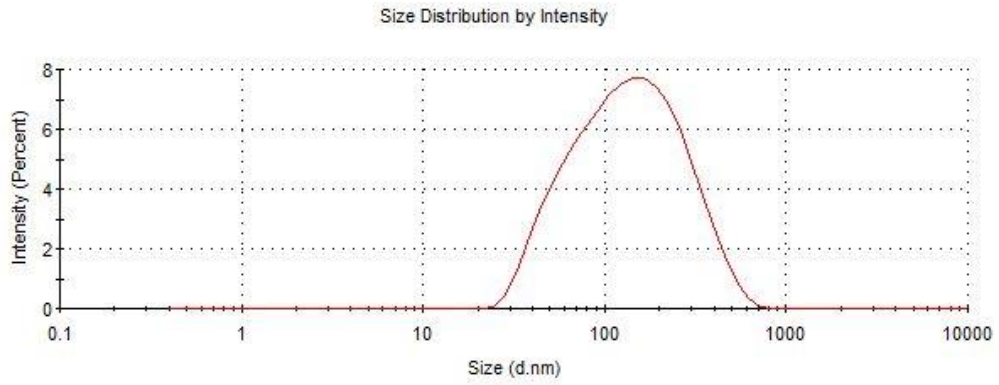


Şekil 4.10: nMLMWChi-PEA₁₁ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.

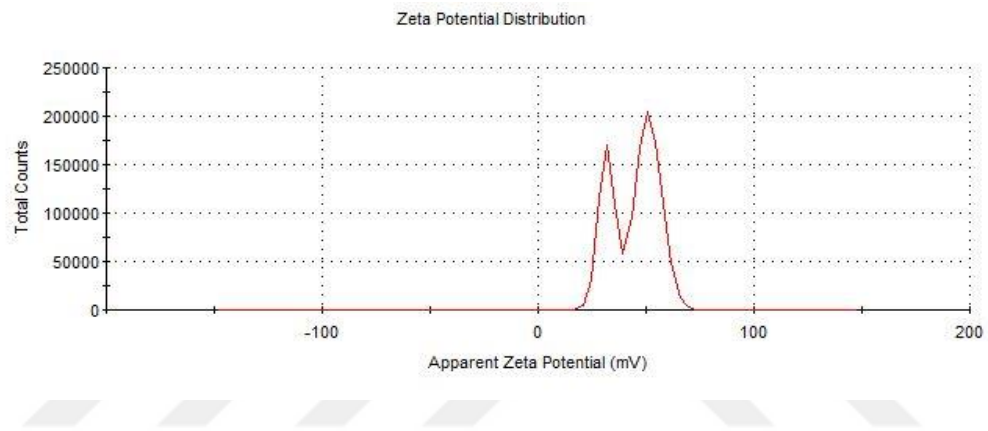
Tablo 4.12: nMLMWChi-PEA₂ (0.02g NaNO₂'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

nMLMWChi-PEA ₂	MLMWChi-PEA ₂ :TPP (a/a)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMLMWChi-PEA ₂₁	3:1	249,8	0,400	17.4±3.99
nMLMWChi-PEA ₂₂	4:1	85,81	0,290	23.9±5.41
nMLMWChi-PEA ₂₃	5:1	91,55	0,378	34.8±5.11
nMLMWChi-PEA ₂₄	6:1	95,36	0,407	32.3±9.15
nMLMWChi-PEA ₂₅	7:1	92,02	0,291	40.1±6.89
nMLMWChi-PEA ₂₆	8:1	100,2	0,299	32.9±9.13
nMLMWChi-PEA₂₇	9:1	107,1	0,286	44.5±10.8
nMLMWChi-PEA ₂₈	10:1	169,4	0,393	39.2±8.93
nMLMWChi-PEA ₂₉	20:1	115,7	0,377	39.3±9.20

*0.02 g NaNO₂ ile sentezlenen MLMWChi'dan elde edilen nanopartiküller.



Şekil 4.11: nMLMWChi-PEA₂₇ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.

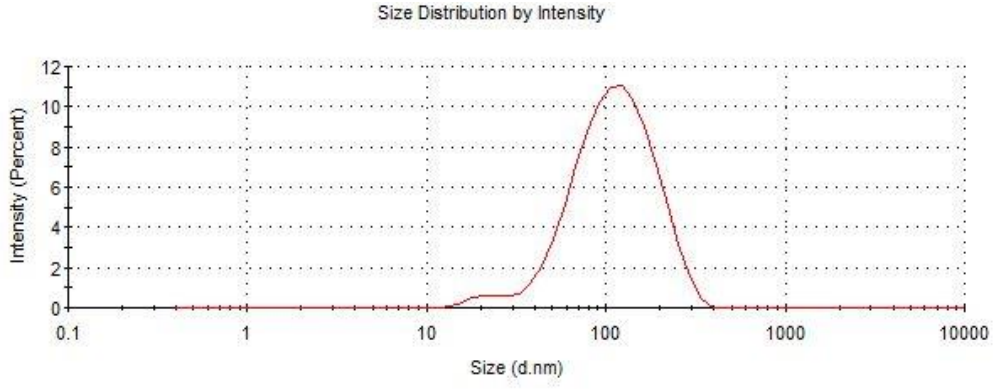


Şekil 4.12: nMLMWChi-PEA₂₇ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.

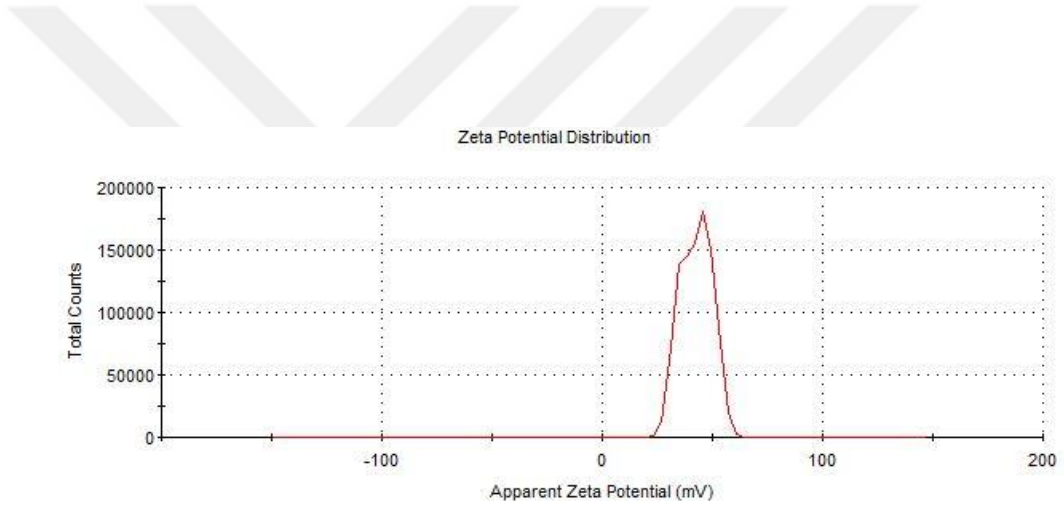
Tablo 4.13: nMLMWChi-PEA₃ (0.03g NaNO₂'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

nMLMWChi-PEA ₃	MLMWChi-PEA ₃ :TPP (a/a)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMLMWChi-PEA ₃₁	3:1	165,6	0,384	20.3±3.56
nMLMWChi-PEA ₃₂	4:1	89,39	0,264	30.7 ±5.57
nMLMWChi-PEA ₃₃	5:1	89,40	0,288	37.9±6.26
nMLMWChi-PEA ₃₄	6:1	98,67	0,398	38.3±8.74
nMLMWChi-PEA ₃₅	7:1	84,33	0,307	41.2±6.48
nMLMWChi-PEA ₃₆	8:1	94,09	0,278	43.4±7.09
nMLMWChi-PEA₃₇	9:1	96,63	0,250	42.6±7.07
nMLMWChi-PEA ₃₈	10:1	99,77	0,269	44.1±6.91
nMLMWChi-PEA ₃₉	20:1	107,5	0,356	39.2±5.09

*0.03 g NaNO₂ ile sentezlenen MLMWChi'dan elde edilen nanopartiküller.



Şekil 4.13: nMLMWChi-PEA₃₇ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.

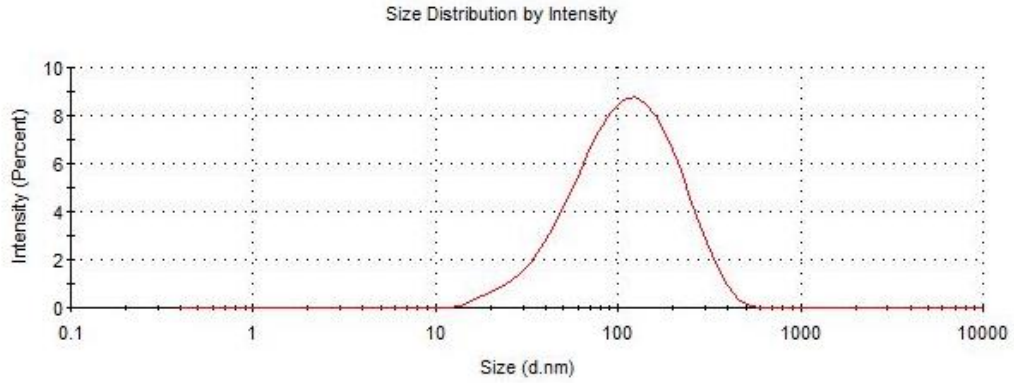


Şekil 4.14: nMLMWChi-PEA₃₇ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.

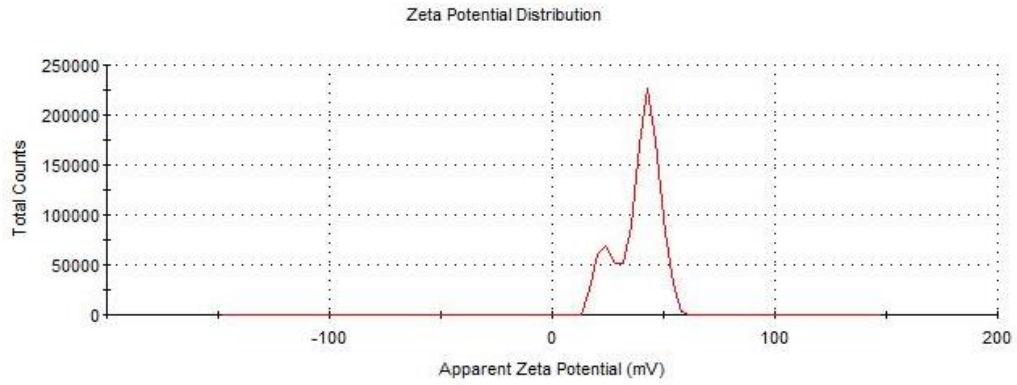
Tablo 4.14: nMLMWChi-PEA₄ (0.04g NaNO₂'li)* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

nMLMWChi-PEA ₄	MLMWChi-PEA ₄ :TPP (a/a)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMLMWChi-PEA ₄₁	3:1	139,8	0,202	18.5±3.85
nMLMWChi-PEA ₄₂	4:1	96,36	0,286	28.8±8.29
nMLMWChi-PEA ₄₃	5:1	93,58	0,296	33.0±9.31
nMLMWChi-PEA ₄₄	6:1	89,33	0,283	34.6±8.72
nMLMWChi-PEA ₄₅	7:1	91,86	0,285	38.8±9.38
nMLMWChi-PEA ₄₆	8:1	143,7	0,394	34.6±10.0
nMLMWChi-PEA ₄₇	9:1	101,4	0,297	38.6±12.9
nMLMWChi-PEA ₄₈	10:1	97,38	0,252	39.0±6.68
nMLMWChi-PEA ₄₉	20:1	164,2	0,252	34.0±8.25

*0.04 g NaNO₂ ile sentezlenen MLMWChi'dan elde edilen nanopartiküller.



Şekil 4.15: nMLMWChi-PEA₄₅ (%0.05) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.



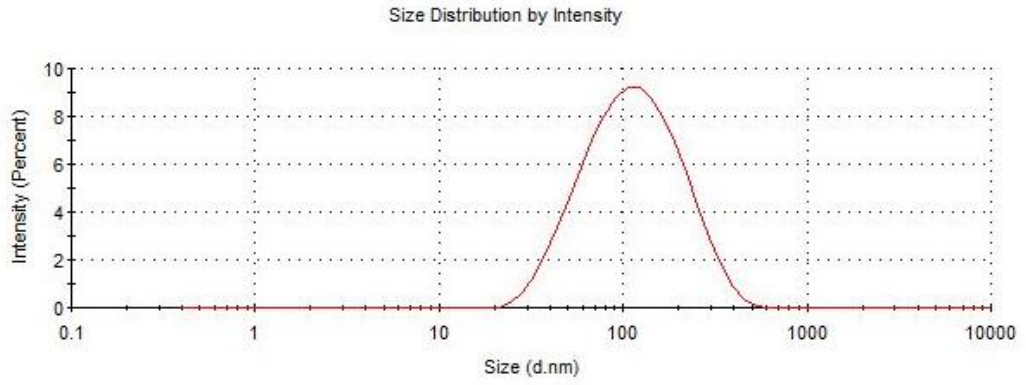
Şekil 4.16: nMLMWChi-PEA₄₅ (%0.05) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.

Tablo 4.11-4.14’te belirtilen sonuçlara göre uygun özelliklerde olan nMLMWChi-PEA₄ ürünü Bölüm 3.3.4’te belirtilen yonteme ve Tablo 4.9’da verilen nMLMWMChi-PEA %0.10 miktarına göre belirtilen oranlarda hazırlanmıştır. Parçacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.15’te verilmiştir.

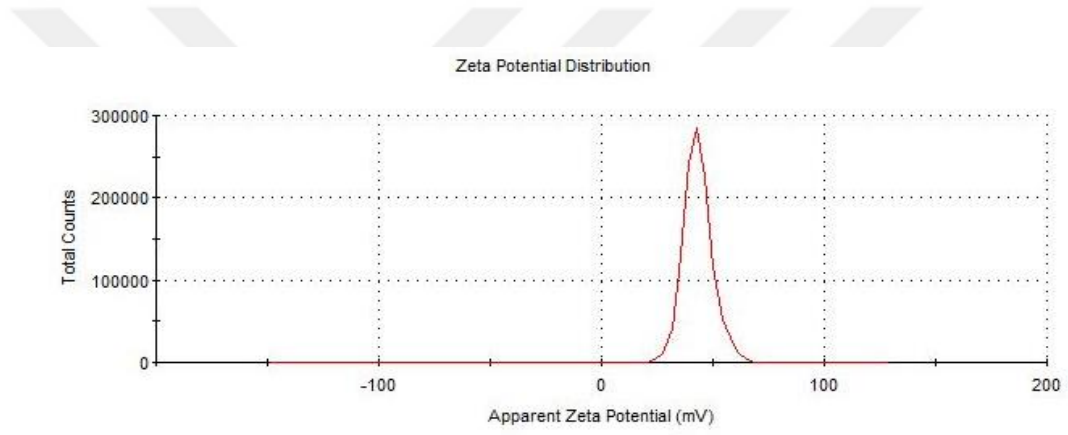
Tablo 4.15: nMLMWChi-PEA₄* nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

nMLMWChi-PEA ₄ (%)	nMLMWChi-PEA ₄	MLMWChi-PEA ₄ :TPP	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0.10	nMLMWChi-PEA ₄₁₀	3:1	195,0	0,257	19.9±4.48
	nMLMWChi-PEA ₄₁₁	4:1	100,1	0,273	27.3±7.22
	nMLMWChi-PEA ₄₁₂	5:1	100,8	0,280	31.8±7.26
	nMLMWChi-PEA ₄₁₃	6:1	102,1	0,288	34.6±8.06
	nMLMWChi-PEA₄₁₄	7:1	93,43	0,250	43.2±6.5
	nMLMWChi-PEA ₄₁₅	8:1	97,57	0,242	40.5±10.9
	nMLMWChi-PEA ₄₁₆	9:1	122,2	0,408	42.6±8.26
	nMLMWChi-PEA ₄₁₇	10:1	162,3	0,433	38.8±9.67

*0.04 g NaNO₂ ile sentezlenen MLMWChi’den elde edilen nanopartiküller.



Şekil 4.17: nMLMWChi-PEA₄₁₄ (%0.10) nanopartikülüne ait partikül boyutu grafiği.



Şekil 4.18: nMLMWCH-PEA₄₁₄ (%0.10) nanopartikülüne ait zeta potansiyeli grafiği.

4.1.5. Modifiye Kitosanolardan Elde Edilen Nanopartikül Formülasyonlarının Stabilitelerinin İncelenmesi

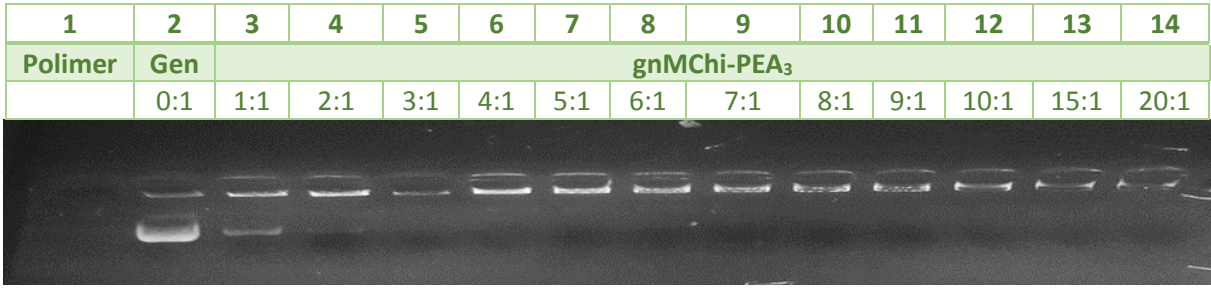
Bölüm 3.3.4'te belirtilen yöntem, nanopartikül deneme 5-6'daki parametrelere göre ve Tablo 4.10-4.16'da verilen sonuçlara göre en uygun özelliklere sahip nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ nanopartiküllerin stabilitiesi 1 ay boyunca +4°C'de partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları değerlendirilerek incelendi.

Tablo 4.16: nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ modifikasyonları ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonlarının stabiliteleeri.

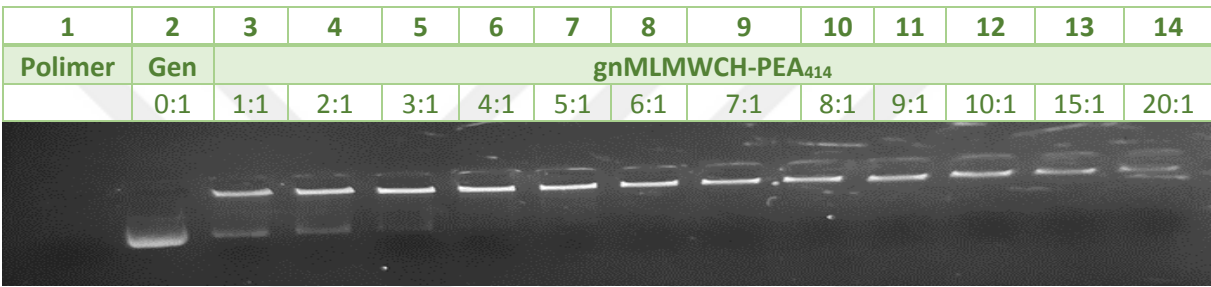
Nanopartikül Formülasyonu	MChi (%)	MChi:TPP (a/a)	Süre (Hafta)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
nMChi-PEA ₃	0.05	5:1	0	85,37	0,390	42.2±6.91
nMChi-PEA ₃			1	78,78	0,419	37.9±6.96
nMChi-PEA ₃			2	97,15	0,421	38.8±5.75
nMChi-PEA ₃			3	81,52	0,442	40.3±6.02
nMChi-PEA ₃			4	104,3	0,472	41.6±10.5
nMLMWChi-PEA ₄₁₄	0.1	7:1	0	93,43	0,250	43.2±6.5
nMLMWChi-PEA ₄₁₄			1	98,49	0,280	37.4±9.03
nMLMWChi-PEA ₄₁₄			2	108,4	0,256	48.9±8.56
nMLMWChi-PEA ₄₁₄			3	109,9	0,280	44.9±8.69
nMLMWChi-PEA ₄₁₄			4	95,38	0,380	36.6±9.45

4.1.6. gnMChi-PEA₃ ve gnMLMWChi-PEA₄₁₄ Formülasyonlarının Jel Elektroferez Sonuçları

Polimer/gen (a/a) oranına göre elde edilmiş olan gnMChi-PEA₃ ve gnMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarına ait jel elektroferez görüntüleri Şekil 4.19 ve 4.20’de sunulmuştur.



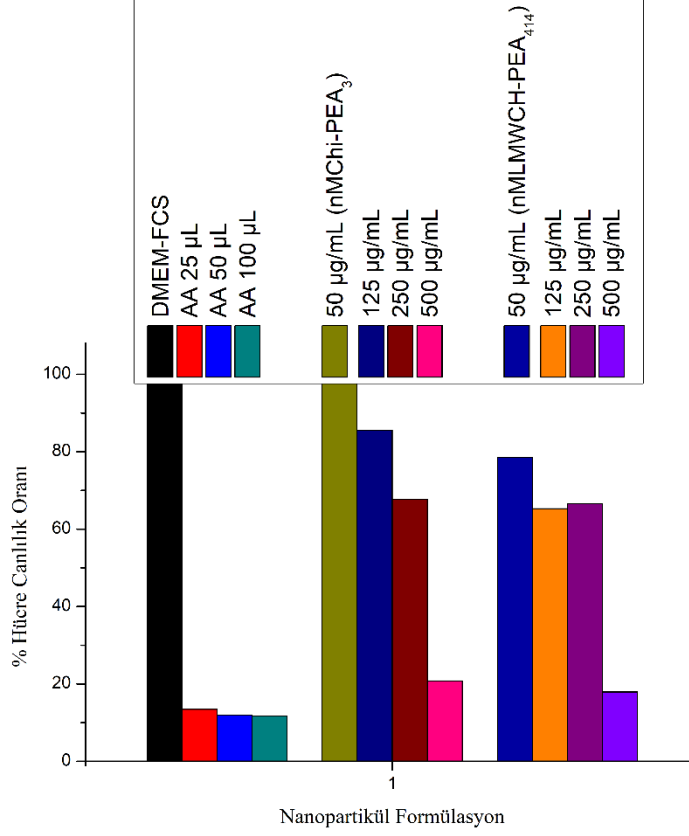
Şekil 4.19: gnMChi-PEA₃'ya ait jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.20: gnMLMWChi-PEA₄₁₄'ya ait jel elektroforez görüntüsü.

4.1.7 nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ Formülasyonlarının MTT Testi ile Sitotoksosite Karakteristiklerinin Belirlenmesi

nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarına ait sitotoksosite çalışmaları, Bölüm 3.4.3'te belirtilen yöntemle göre MTT yöntemi ile yapılmıştır. Çalışmada insan embriyonik böbrek 293 (HEK293T) hücreleri her bir kuyucuğa 10.000 hücre gelecek şekilde kullanıldı. Negatif kontrol olarak nanopartikül formülasyonlarının hazırlandığı %1'lik asetik asit (AA) çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar Şekil 4.21'de verildi.



Şekil 4.21: nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarının HEK293T hücrelerine toksisitesi.

4.1.8 nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ Formülasyonlarının Transfeksiyon Etkinliğine Ait Bulgular

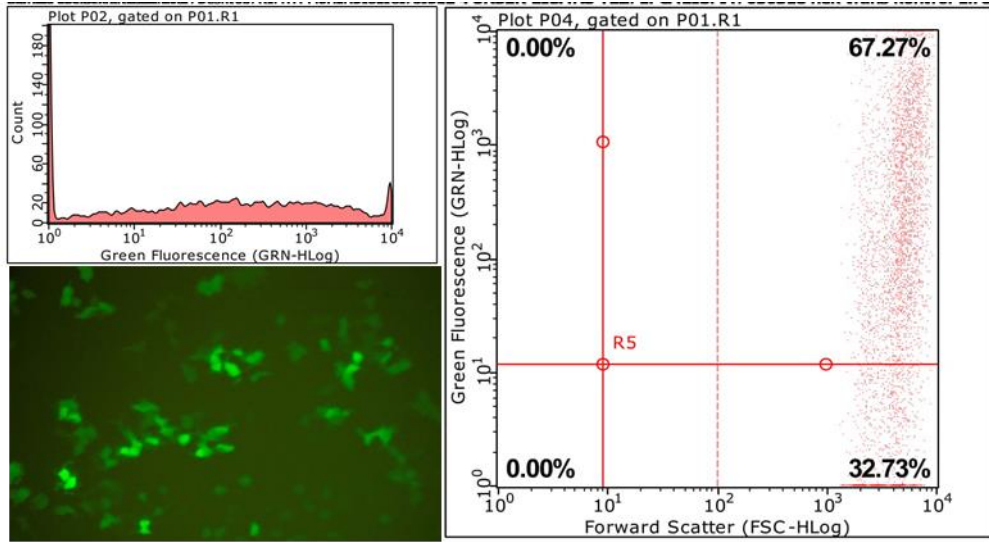
Yukarıda anlatılan tüm uygulama ve analiz sonuçlarına göre uygun özelliklere sahip olan nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarının transfeksiyon etkinliği HEK293T, hücrelerinde Bölüm 3.4.4'te belirtilen yöntemle göre incelendi ve 3 kez tekrarlandı. Değerlendirmelerde Tablo 4.17'deki derecelendirme kullanıldı. Sonuçlar Tablo 4.18 ile Şekil 4.22 - 4.25'te verilmiştir.

Tablo 4.17: Transfeksiyon etkinliği sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan derecelendirmeler.

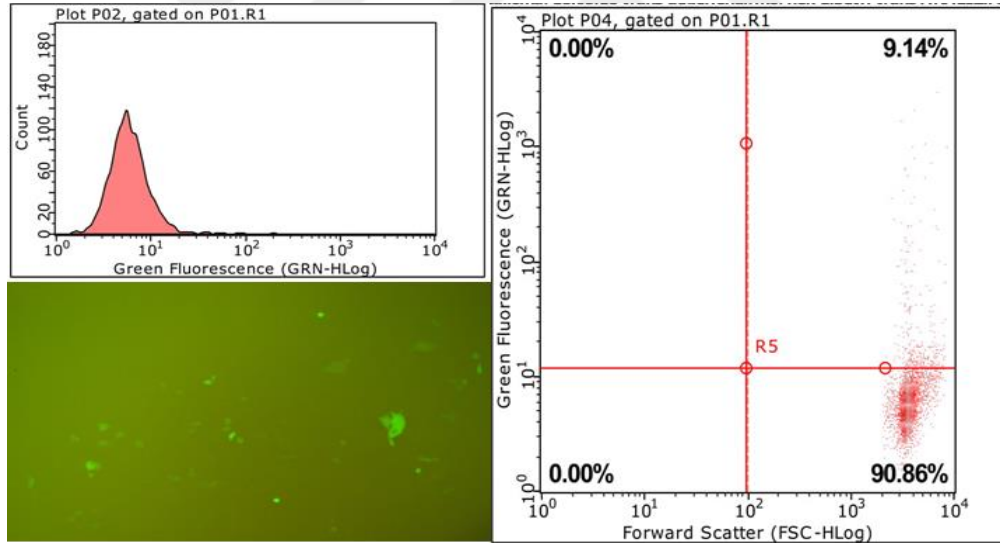
TOKSİSİTE DERECESESİ	ÜRÜNÜN ETKİSİ	TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ
5	Biyoyumlu	Çok İyi
4	Düşük Toksikite	İyi
3	Orta Toksikite	Orta
2	Yüksek Toksikite	Düşük
1	Toksik Madde	Yok

Tablo 4.18: nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ nanopartikül formülasyonlarının HEK293T hücrelerine transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları.

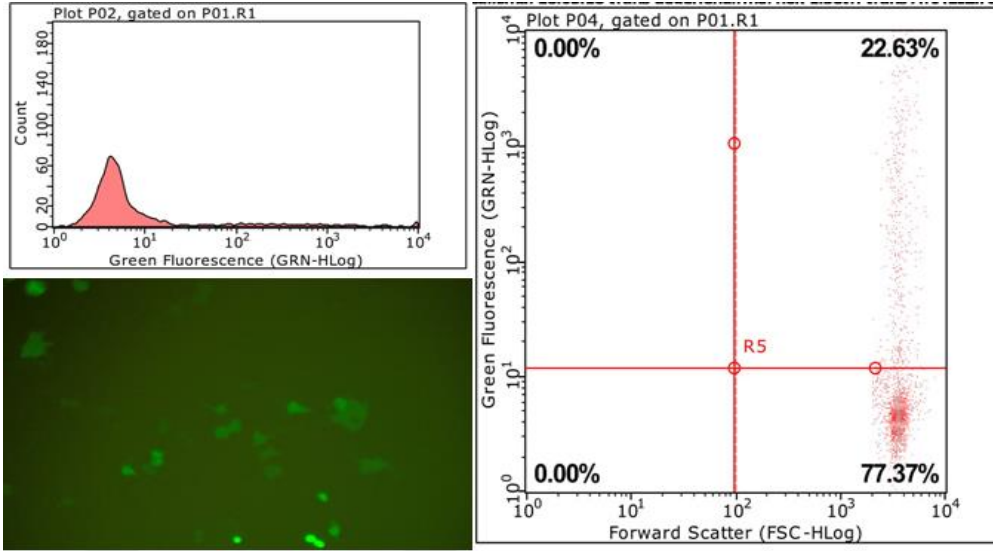
Nanopartikül Formülasyonu	<u>Polimer:pDNA Oranı</u>		<u>Miktar (µg)</u>		<u>Hacim (µL)</u>			<u>Hücre Tipi</u>	<u>Hücre Miktarı</u>	<u>Transfeksiyon Etkinliği</u>
	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Toplam			
nMChi-PEA ₃	4	1	8	1	8,00	1,25	9,25	HEK293T	20.000	1
	7	1	14	1	14,00	1,25	15,25			3
	12	1	24	1	24,00	1,25	25,25			5
	16	1	32	1	32,00	1,25	33,25			5
	20	1	40	1	40,00	1,25	41,25			3
	25	1	50	1	50,00	1,25	51,25			3
	30	1	60	1	60,00	1,25	61,25			5
	14	2	28	2	28,00	2,5	30,5			2
	20	2	40	2	40,00	2,5	42,5			2
nMLMWChi-PEA ₄₁₄	7	1	7	1	7,00	1,25	8,25			1
	12	1	12	1	12,00	1,25	13,25			4
	30	1	30	1	30,00	1,25	31,25			3
	25	1	25	1	25,00	1,25	26,25			5
	50	1	50	1	50,00	1,25	51,25			2
nMChi-PEA ₃ Konsantrasyonu: 0.5 µg/µl				nMLMWChi-PEA ₄₁₄ Konsantrasyonu: 0.1 µg/µl				Gen Konsantrasyonu: 0.8 µg/µl		



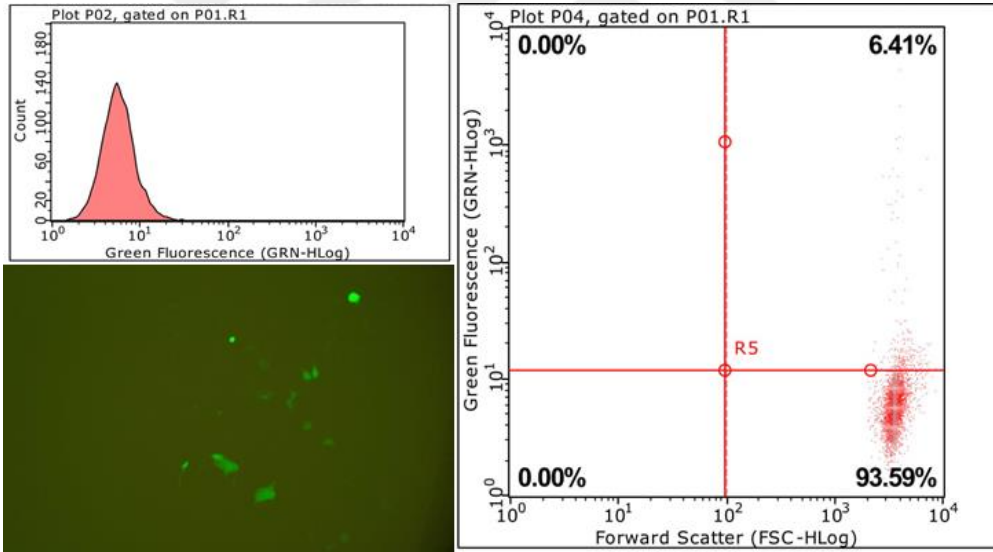
Şekil 4.22: nMChi-PEA₃ formülasyonu; polimer:gen oranı 12:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.



Şekil 4.23: nMChi-PEA₃ formülasyonu; polimer:gen oranı 20:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.



Şekil 4.24: nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonu; polimer:gen oranı 25:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.



Şekil 4.25: nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonu; polimer:gen oranı 12:1 (a/a) transfekte olan HEK293T hücrelerinin akış ölçerde gösterdiği etkinlik.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın amacı, doğal polimer esaslı yeni bir viral olmayan gen taşıyıcı nanopartiküler sistemin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve gen taşıma kapasitesinin incelenmesidir. Bu amaçla bir biyopolimer olan Chi'a, ilk defa bu çalışmada, yapısında fosfoester bağlarını içermesiyle birlikte serbest NH₂ grubu bakımından zenginleştirmek için, bir etanolamin türevi olan o-PEA bileşiği ile Bölüm 3.3.3'te belirtilen yönteme göre modifikasyon reaksiyonu uygulandı. Ortalama molekül ağırlığının gen taşıma karakteristiklerine etkilerini de incelemek için Chi'nin depolimerizasyonu da gerçekleştirilerek ürün LMWChi bileşiğine de aynı modifikasyon reaksiyonu uygulandı. Modifikasyon ürünleri MChi ve MLMWChi bileşiklerinin yapıları FTIR spektroskopi tekniği ile aydınlatıldı. Ortalama molekül ağırlıkları tayinleri ise 3 farklı açıdan tarama yapabilen ışık saçılım dedektörü bulunduran GPC-SEC sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ürünlerin sitotoksikite özellikleri incelendi. Takiben Chi, LMWChi, MChi ve MLMWChi bileşiklerinin iyonik jelyasyon yöntemi ile nanopartiküler taşıyıcı sistem formülasyonları hazırlandı ve partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli özellikleri belirlenerek, formülasyonlar optimize edildi. Kullanılan Chi'nin piyasada bulunan fiziksel şekillerinin nanopartikül formülasyonlarının özelliklerine etkisi de incelendi. Uygun boyut ve yük dağılımına sahip nanopartikül formülasyonlarının raf ömürleri hakkında bilgi edinmek için stabiliteleri incelendi. Optimize nanopartikül formülasyonlarının gen taşıma kapasitelerini tayin etmek için polimer-pDNA kompleksleri hazırlandı ve jel elektroforez cihazında yürümleri incelendi. Uygun özelliklerdeki nanopartiküller kullanılarak HEK293T hücrelerinde *in vitro* transfeksiyon etkinlikleri de değerlendirildi.

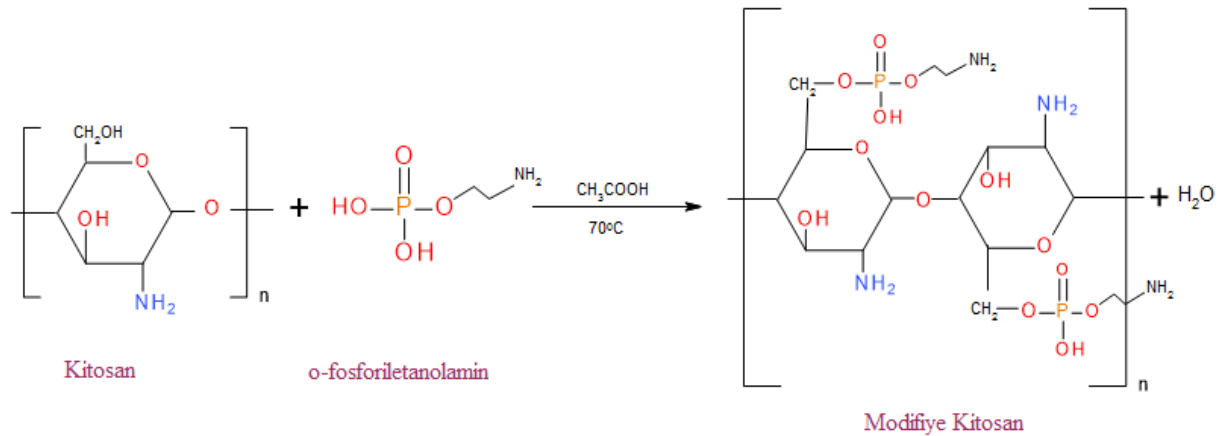
5.1. Chi'IN MODİFİKASYONU VE DEPOLİMERİZASYONU, ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONU

5.1.1. Chi'nin o-PEA bileşiği ile Modifikasyon Reaksiyonu

Chi bilindiği üzere N-asetil-D-glikozamin ve D-glikozamin ünitelerinin tekrarı ile oluşmuş farklı deasetilasyon derecesine sahip üstün biyoyumluluk ve biyobozunurluk gösteren, ekolojik bakımdan güvenli, toksisitesi düşük bir yarı doğal polimerdir. Bu karakteristikleri dolayısıyla antimikrobiyal, düşük immünojenisite gibi birçok biyolojik aktiviteye de sahiptir. Tekrarlanan ünitelerindeki glikozidik halkada serbest NH₂ grubu içermesi dolayısıyla

polikationik bir yapıda olup, aynı halkalar üzerinde serbest OH ve CH₂OH gruplarını da içermesi dolayısıyla da fonksiyonlitesi yüksek bir molekül yapısına sahiptir. Bu nedenle birçok modifikasyon reaksiyonları uygulanabilir ve bu sayede molekülü üzerine bağlanabilecek yan/pendant gruplar Chi molekülünün spesifik bir fonksiyonliteye sahip olmasına, biyolojik özelliklerinin yükselmesine veya fiziksel özelliklerinin iyileştirilmesine neden olmaktadır. Bu durum Chi'ı bilhassa biyoteknoloji ve nanobiyoteknolojide örneğin ilaç, gen salımı, gen susturma vb. alanlarda çok tercih edilen bir polimer haline getirmiştir. Chi'ın günümüzde nanobiyoteknolojide en yaygın olarak kullanıldığı alanlardan birisi transfeksiyon işlemlerinde gen taşıyıcı olarak kullanımındır. Bu alanda yapılan çalışmalar bilhassa transfeksiyon etkinliğini arttırmak için Chi'ın kationik yük yoğunluğunu arttırmak amacıyla yeni türevlerinin sentezlenmesi yönündedir. Bunların yanında plazmid DNA'yı başarılı bir şekilde bağlayabilen ve birçok hücrede etkili transfeksiyon gerçekleştirebilen biyobozunabilir polifosfoesterler, yenilikçi viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerdir.

Bu bağlamda bu tezle sunulan çalışmada, Chi'ın hem yük yoğunluğunu arttırmak hem de fosfoester bağları içeren bir türevini hazırlamak için, ilk defa bu tezle sunulan çalışmada, o-PEA bileşiği ile modifikasyon reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: MChi-PEA ürününe ait reaksiyon mekanizması.

Şekil 5.1'de görüldüğü gibi Bölüm 3.3.3'te belirtildiği gibi gerçekleştirilen modifikasyon reaksiyonu mekanizması, Chi molekülündeki serbest CH₂OH grupları ile o-PEA bileşiğindeki OH grupları arasında H₂O çıkışı ile meydana gelen kondenzasyon reaksiyonu şeklindedir. Bunun sonucunda elde edilen ürün MChi-PEA, Chi molekülündeki glikozidik halkalara fosfoester bağı ile bağlanmış serbest NH₂ uç gruplu yan/pendant grupları içeren bir yapıya

sahiptir. Bu şekilde modifikasyon reaksiyonu sonunda Chi molekülünün katyonik yük yoğunluğu artarken aynı zamanda esnek yan gruplara sahip olması da sağlanmış olmaktadır. Aşağıda ayrıntılı olarak verilen FTIR analizi de reaksiyon mekanizmasının bu şekilde olduğunu doğrulamaktadır.

5.1.2. Chi'in Depolimerizasyonu

Chi'in biyoteknolojideki uygulamalarında türevlerinin sentezlenmesinin yanında son yıllarda düşük molekül ağırlıklı Chi'dan üretilmiş nanopartiküller ilaç salım ve viral olmayan gen transferi uygulamalarında oldukça dikkat çekmektedir. Çeşitli depolimerizasyon reaksiyonları sonucu elde edilen bu düşük molekül ağırlıklı Chi esaslı malzemeler, piyasa da satılan yüksek, orta ve hatta düşük molekül ağırlıklı Chi'lara göre daha iyi çözünürlük, biyouyumluluk, biyoaktivite, biyobozunabilirlik ve düşük toksisite göstermektedirler. Ayrıca literatür araştırmalarında da görüldüğü üzere, Chi'in molekül ağırlığının gen transferi için kullanılacak gen taşıyıcı polimerik malzemenin nanopartikül özelliklerini etkilemektedir.

Bu bilgiler ışığında bu tezle sunulan çalışmada piyasadan satın alınan Chi ortalama molekül ağırlığını düşürmek amacıyla depolimerize edildi. Bölüm 3.3.2'de belirtilen yöntemle göre ön denemeler sonunda belirlenen 1 mol Chi glukozamine 0.001-0.1 mol aralığında NaNO₂ olacak şekilde hesaplanan NaNO₂ kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Bu oranlara karşılık gelen en düşük ve en yüksek miktar olarak 0.0004-0.04 g aralığındaki miktarlardan; 0.0004, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ve 0.05 g NaNO₂ ile çalışılarak çeşitli ortalama molekül ağırlıklarında LMWChi'lar sentezlendi. Tüm kullanılan NaNO₂ miktarları ile Chi'in depolimerize olduğu görülmüştür. Analiz sonuçlarına göre uygun bulunan LMWChi ürünleri ile yukarıda bahsedildiği şekilde Bölüm 3.3.3'te belirtilen yöntemle göre o-PEA bileşiği ile modifikasyon reaksiyonu gerçekleştirildi ve MLMWChi ürünleri sentezlendi. Bu modifikasyon reaksiyonlarının da Şekil 5.1'de belirtilen mekanizmaya göre gerçekleştiği FTIR analizi ile doğrulandı.

5.1.3. MChi-PEA ve MLMWChi-PEA Ürünlerinin FTIR Spektrası

MChi-PEA ve MLMWChi-PEA ürünlerinin yapıları Bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi, FTIR spektrofotometresi kullanılarak aydınlatılmıştır (Şekil 4.1-Şekil 4.2).

Chi'a ait FTIR spektrada (Şekil 4.1), 3494 cm⁻¹ de bulunan serbest hidroksil (OH) gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorpsiyon piki ile o-PEA'ya ait spektrada ~2790-2630

cm^{-1} de bulunan fosfat grubundaki hidroksil (OH) gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorpsiyon pikleri kaybolmuştur. Chi'in FTIR spektrasında 1260 cm^{-1} 'deki glikozidik halkadaki metilen ($-\text{CH}_2$) gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorpsiyon piki ile o-PEA'de 1256 cm^{-1} de bulunan yapıdaki fosfat (P=O), hidroksil ($-\text{OH}$), amin ($-\text{NH}_2$) gruplarının ve karbon-azot (C-N) bağlarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen şiddetli absorpsiyon piki, MChi-PEA ürününün FTIR spektrasında girişimli olarak 1257 cm^{-1} de yeni küçük bir absorpsiyon piki halinde görülmektedir. Ayrıca aynı spektrada 970 cm^{-1} de görülen yeni absorpsiyon piki, metilol grupları ile fosfat yapısı arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan C-O-P bağlarının gerilme titreşiminden ileri gelmektedir. 1421 cm^{-1} de Chi'daki serbest metilol grubundaki OH gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorpsiyon piki kaybolmuştur. Bu da modifikasyonun metilol grupları üzerinden gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Chi'da bulunan halkalı yapıdaki CH_2 gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen 2887 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikinin şiddeti ise reaksiyondan dolayı bir hayli azalarak geniş bir omuz haline dönüşmüştür. 745 cm^{-1} de yeni ortaya çıkan yaygın keskin absorpsiyon piki, o-PEA'de 766 cm^{-1} de bulunan NH_2 sallanma, P-C gerilme, P-O-C gerilme titreşiminden ileri gelen pikin kaymış olarak görülmesinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.2'de LMWChi ürününe ait FTIR spektrada görüldüğü üzere, depolimerizasyon reaksiyonu sonucu elde edilen LMWChi'in, primer NH_2 gruplarının gerilme titreşiminden ileri gelen $3750\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ 'de bölgesinde (maks. 3431 cm^{-1}) geniş bir absorpsiyon pikinin bulunması, Chi molekülünde yer alan piranoz halkalarının asimetric ve simetric titreşimlerinden ileri gelen $3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde (maks. 2887 cm^{-1}) küçük geniş absorpsiyon pikinin bu spektrada da görülmesi, yine Chi molekülünde bulunan amid-I pikinde (asetil-amid ünitelerinden ileri gelen) yer alan C=O gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen maks. 1648 cm^{-1} 'de bulunan geniş pikin bu spektra da yer alması, primer NH_2 gruplarının eğilme titreşimlerinden ileri gelen ve maks. 1597 cm^{-1} 'de bulunan omuz halindeki absorpsiyon pikinin burada da yer alması, 1421 cm^{-1} de Chi'daki metilol grubundaki OH gruplarının gerilme titreşiminden ileri gelen ve 1260 cm^{-1} de halkadaki metilen ($-\text{CH}_2$) gruplarının gerilme titreşimlerine ait absorpsiyon piklerinin de yine bu spektrada yer alması Chi'in herhangi bir bozunmaya uğramadan depolimerize olduğunu göstermektedir.

MLMWChi-PEA ürününe ait FTIR spektrada (Şekil 4.2) ise MChi-PEA ürününün FTIR spektrasına benzer şekilde o-PEA'ya ait spektrada $\sim 2790\text{-}2630 \text{ cm}^{-1}$ de bulunan fosfat

grubundaki hidroksil (OH) gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen absorpsiyon piklerin kaybolması, LMWChi ürününün FTIR spektrasında bulunan 1260 cm^{-1} de halkadaki metilen ($-\text{CH}_2$) grubunun gerilme titreşimine ait absorpsiyon piki ile o-PEA bileşiğinin FTIR spektrasında 1256 cm^{-1} de bulunan yapıdaki fosfat ($\text{P}=\text{O}$), hidroksil ($-\text{OH}$), amin ($-\text{NH}_2$) gruplarının ve karbon-azot ($\text{C}-\text{N}$) bağlarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen şiddetli absorpsiyon pikinin MLMWChi-PEA FTIR spektrasında girişimli olarak 1257 cm^{-1} de yeni küçük absorpsiyon piki halinde görülmesi, metilol grupları ile fosfat yapısı arasındaki reaksiyon sonucunda oluşan $\text{C}-\text{O}-\text{P}$ bağı gerilme titreşiminden ileri gelen MLMWChi-PEA ürününe ait FTIR spektrada 970 cm^{-1} de yeni küçük keskin absorpsiyon pikinin ortaya çıkması, 1421 cm^{-1} de LMWChi spektrasındaki metilol grubundaki OH gerilme titreşiminden ileri gelen absorpsiyon pikinin kaybolması modifikasyonun metilol grupları üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, MChi-PEA ve MLMWChi-PEA ürünlerine ait FTIR spektra değerlendirmeleri, Chi ve LMWChi ile o-PEA arasındaki modifikasyon reaksiyonlarının Şekil 5.1’de verilen mekanizmaya göre olduğunu, Chi’in bozunma olmadan depolimerize olduğunu doğrulamaktadır.

5.1.4. GPC Analiz Sonuçları Değerlendirmesi

Ürünlerin ortalama molekül ağırlıkları, Bölüm 4.1.2’de anlatılan GPC-SEC sistemi kullanılarak bulundu. Bölüm 4.1.2’de verilen Tablo 4.1’deki analiz sonuçlarına göre, piyasada satılan Chi’in sayısal ortalama molekül ağırlığı (M_n) 103.1 kDa , ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w) 268.3 kDa iken, bu Chi’in depolimerizasyon ürünleri LMWChi’ların (LMWChi_{0.4}, LMWChi₁, LMWChi₂, LMWChi₃, LMWChi₄, LMWChi₅) sayısal ortalama molekül ağırlıklarının (M_n) sırasıyla 88.4 , 16.9 , 13.5 , 11.1 , 8.3 , 8.6 kDa ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıklarının ise (M_w) 138.4 , 24.9 , 17.2 , 14.5 , 10.7 , 11.6 kDa olarak bulunduğu dolayısıyla depolimerizasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre 0.0004 g NaNO_2 kullanılarak elde edilmiş LMWChi’in (LMWChi_{0.4}) beklenildiği gibi ticari Chi’a daha yakın ortalama molekül ağırlığında olması ve 0.05 g NaNO_2 kullanılarak elde edilmiş LMWChi’in (LMWChi₅) ise ortalama molekül ağırlığının 0.04 g NaNO_2 kullanılarak elde edilmiş LMWChi’a (LMWChi₄) göre daha düşük olmamasından dolayı, o-PEA ile modifikasyon reaksiyonuna, $0.01-0.04\text{ g}$ aralığındaki NaNO_2 miktarları kullanılarak elde edilmiş LMWChi’lar ile devam edildi.

Modifiye ürünlerin molekül ağırlıklarına bakıldığında ise MChi-PEA'nın sayısal ortalama molekül ağırlığının (M_n) 176.4 kDa ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının (M_w) ise 271.7 kDa olduğu, o-PEA ile modifikasyon reaksiyonun gerçekleşmesi sonucu beklenildiği gibi Chi'nin molekül ağırlıklarına göre bir artış olduğu görülmüştür. MLMWChi-PEA₁, MLMWChi-PEA₂, MLMWChi-PEA₃ ve MLMWChi-PEA₄ ürünlerinin sayısal ortalama molekül ağırlıkları (M_n) sırasıyla 29.9, 23.1, 15.7, 13.5 kDa iken ağırlıkça ortalama molekül ağırlıklarının (M_w) ise 47.8, 40.5, 50 ve 48.7 kDa olduğu görülmüştür. MLMWChi-PEA ürünlerinin sayısal ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıklarına bakıldığında MChi-PEA'nın molekül ağırlığındaki artışa benzer şekilde burada da bir artış olduğu görülmektedir. Ancak bu artış sayısal ortalama molekül ağırlığında düzenli bir şekilde gerçekleşirken ağırlıkça ortalama molekül ağırlığında ise bu artışın düzensiz olduğu görülmüştür. Bunun o-PEA ile reaksiyon sonucu polimer zincirlerinde yer alan ve fonksiyonel gruplar (OH ve NH₂) taşıyan esnek pendant grupların moleküller arası/molekül içi etkileşimlerinden ileri geldiği düşünülmektedir. Nitekim MLMWChi-PEA₁, MLMWChi-PEA₂, MLMWChi-PEA₃ ve MLMWChi-PEA₄ ürünlerinin PDI değerleri sırasıyla 1.601, 1.753, 3.175, 3.611 olup, özellikle MLMWChi-PEA₃ ve MLMWChi-PEA₄'ün geniş bir dağılıma sahip olduğu görülmektedir. Bu ise yukarıda bahsedilen etkileşimlerin polimer molekülü içerisinde zincir yapılarının birbirlerinden ne kadar farklı olduğunu, başka deyişle heterodispers bir yapının oluştuğunu desteklemektedir.

5.2. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ ZETA POTANSİYELİ, PDI VE BOYUT ANALİZİ DEĞERLENDİRMESİ

Ürünlerden nanopartiküler formülasyonlar Bölüm 3.3.4'te belirtilen iyonik jelasyon yöntemine göre Bölüm 4.1'de verilen denemelerle hazırlandı. Nanopartiküller Chi esaslı ürünlerin çözündüğü asidik çözelti içerisine, TPP çapraz bağlayıcısı içeren polianyonik karakterdeki çözeltinin damla damla ilave edilmesiyle zıt yükler arasındaki etkileşim sonucunda elde edilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında Tablo 4.2'den de görüldüğü üzere öncelikle piyasada satılan Chi'nin toz halinde (ChiA) ve ipliksi yapıda (ChiB) olmak üzere iki fiziksel şekilde bulunması dolayısıyla, fiziksel halinin bir farklılık oluşturup oluşturmadığı incelendi. Sonuç olarak nChiA'nın (344,4 nm partikül boyutu, 0,533 PDI ve 53.7±3.67 mV zeta potansiyeli) nChiB'ye (339,8 nm partikül boyutu, 0,626 PDI ve 62.3±4.08 mV zeta potansiyeli) oranla daha iyi partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri

gösterdiği, dolayısıyla Chi'in fiziksel formunun partikülün özelliklerine etkisi olduğu görülmüştür. Benzer ön modifikasyon denemeleri ile elde edilen MChi-PEA ürünlerinden elde edilen nMChiA-PEA (190,7 nm partikül boyutu, 0,405 PDI, 43.2±4.91 mV zeta potansiyeli) ürünün de, nMChiB-PEA (187,1 nm partikül boyutu, 0,457 PDI, 43.3±4.13 mV zeta potansiyeli) ürününe oranla daha iyi partikül boyutu, PDI ve zeta değerleri göstermesi nedeniyle takip eden denemelerde toz halindeki ChiA ile devam edildi.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında saflandırmanın partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerine etkisi de ayrıca incelendi. Tablo 4.4'ten de görüldüğü üzere ChiA_{saf} malzemesinden elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutlarının 158,6-319,3 nm, PDI değerlerinin 0,328-0,690 ve zeta potansiyeli değerlerinin ise 25-35.2 mV aralığında olduğu, Tablo 4.5'ten de ChiA malzemesinden hazırlanan nanopartiküllerde ise partikül boyutlarının 96,84-282 nm, PDI değerlerinin 0,399-0,643 ve zeta potansiyeli değerlerinin ise 30-41.5 mV aralığında değiştiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre ChiA malzemesinden hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu daha küçük, PDI değerleri çok daha uygun ve kabul edilebilir, zeta potansiyeli değerlerinin ise daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüş olup ChiA ile çalışıldığında gen tutma kapasitesi ve transfeksiyon etkinliği bakımından daha yüksek sonuçlar alınabileceği öngörülerek takip eden denemelere bu malzeme ile devam etmeye karar verildi.

Saflandırmanın, LMWChi ürünlerinden elde edilen nanopartiküller üzerine etkisinin sonuçları da Tablo 4.6'da verilmiştir. nLMWChiA ürünlerinin 141,1-165,0 nm partikül boyutu, 0,118-0,136 PDI aralığı ve 27-33.4 zeta potansiyeli değeri gösterdiği, nLMWChiA_{saf} ürünlerinin ise 131,9-137,2 nm partikül boyutu, 0,277-0,383 PDI değeri ve 30.7-39.0 zeta potansiyeli değerleri sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre her ne kadar nLMWChiA_{saf}'ların daha yüksek zeta potansiyeli değerlerine sahip olduğu görülse de PDI değerlerindeki yükseklik, oluşan partiküllerin homodispers bir formülasyon değil de heterodispers olduğunu ortaya koymuş ve saflandırma işleminin yukarıda da değinildiği gibi nanopartiküllerin eldesi üzerinde olumsuz etki yarattığı sonucuna varılmıştır. Bu durum, saflandırma işleminde liyofilizasyon sonrasında malzemede muhtemel bir agregasyonun olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple de takip eden o-PEA ile modifikasyon denemelerinde LMWChi grubu içinde LMWChiA ürünü ile devam etmeye karar verilmiştir. Elde edilen ürünlerin kısaltmalarında karışıklığa sebebiyet vermemesi için A harfi kullanılmayıp MChi-PEA ve MLMWChi-PEA şeklinde gösterilmiştir.

İyonik jelasyon tekniği ile elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerine; polimer-çapraz bağlayıcı oranı, çözelti hacmi, pH, karıştırma hızı, çapraz bağlayıcı miktarı gibi birçok faktör etki etmektedir. Bunlardan bir tanesi de kullanılan polimerin çözelti içindeki yüzde miktarıdır. Bu miktarın yüksek olması durumunda partikül boyutunda artma ve özellikle PDI değerlerinde oldukça yükseklik yani geniş bir dağılım ortaya çıkabilmektedir. Buna karşın düşük olması durumunda ise zeta potansiyeli değeri oldukça düşük seviyede kalmakta ve nanopartikül yeterli yük yoğunluğuna sahip olamayacağı için gen tutma kapasitesi de yeterli olamayacaktır. Bu sebeple Bölüm 4.1.3 ve Tablo 4.3'te belirtilen parametrelere göre MChi-PEA ürününden çözelti içerisinde değişen % oranlarda (0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25) içerecek şekilde alınarak MChi-PEA:TPP oranları 3:1, 4:1, 5:1 (a/a) olacak şekilde elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI değerleri incelendi. Tablo 4.7'de verilen sonuçlara göre % MChi-PEA oranı 0.05 iken daha uygun partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri elde edildiği görülmüştür. Bu sebeple takip eden denemelerde %0.05 polimer içerecek şekilde hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının sonuçları değerlendirilmiştir.

MChi-PEA ve MLMWChi-PEA ürünleri kullanılarak hazırlanan nMChi-PEA ve nMLWMChi-PEA nanopartiküllerin Bölüm 4.1.4'te Tablo 4.8 ve 4.9'da belirtilen parametrelere göre hazırlanan nanopartikül formülasyonlarından, polimerik gen taşıyıcı sistem olarak en uygunu belirlenmeye çalışıldı. Tablo 4.10'daki sonuçlara göre her ne kadar hazırlanan nMChi-PEA'ların hepsi de uygun polimerik gen taşıyıcı malzeme olarak kullanılabilir niteliklerde olsa da nMChi-PEA₃ formülasyonunun 85,37 nm partikül boyutu ve 0,390 PDI değeri ve 42.2±6.91 mV yük değeri ile en uygun formülasyon olduğu aşıkardır. Dolayısıyla stabilite ve gen tutma kapasitesi çalışmalarında bu formülasyon ile devamına karar verildi. Nitekim nMChi-PEA₅ ve nMChi-PEA₈ formülasyonlarının PDI değerleri yüksek çıksa da partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri bakımından polimerik gen taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilir niteliktedir.

Tablo 4.11-4.15'te yer alan nMLMWChi-PEA₁, nMLMWChi-PEA₂, nMLMWChi-PEA₃, nMLMWChi-PEA₄ formülasyonlarının sonuçlarına bakıldığında, yine bütün formülasyonlar polimerik gen taşıyıcı sistemler olarak uygun ve kullanılabilir nitelikte olsalar da, nMLMWChi-PEA₄₅ formülasyonunun 91,86 nm partikül boyutu, 0,285 PDI ve 38.8±9.38 mV zeta potansiyel değeri ile en uygun formülasyon olduğu saptandı. Ayrıca özellikleri bakımından başarılı

bulunan nMLMWChi-PEA₄ ürünü ile %0.10 oranına göre değişen MLMWChi-PEA₄:TPP oranlarında nanopartiküller hazırlandı. nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonun 93,43 nm partikül boyutu, 0,250 PDI ve 43.2±6.5 zeta değeri ile nMLMWChi-PEA₄₅ formülasyonu ile karşılaştırıldığında fosfoester bağı içeren düşük molekül ağırlıklı polimerik gen taşıyıcı sistem olarak daha uygun olduğuna karar verildi.

Bölüm 3.3.4'te belirtilen yönteme göre nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarının raf ömürleri hakkında bilgi edinmek için 1 ay süre ile +4°C'deki stabiliteleri incelendi. Tablo 4.16'daki sonuçlara bakılınca nMChi-PEA₃ formülasyonun partikül boyutunun 85,37 nm'den 104,3 nm'ye yükselmesine, PDI değerinin 0,390'dan 0,472 değerine yükselmesine ve zeta potansiyeli değerinin ise 42.2±6.91'den 41.6±10.5 değerine düşmesine rağmen, bu değişmelerin kabul edilebilir sınırlarda olması nedeniyle polimerik gen taşıyıcı nanopartiküller sistem olarak uygunluğunu koruduğu görülmüştür. Benzer şekilde nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonun partikül boyutunun 93,43 nm'den 95,38 nm'ye yükselmesine, PDI değerinin 0,250'den 0,380 değerine yükselmesine ve zeta potansiyeli değerinin ise 43.2±6.5'ten 36.6±9.45 değerine düşmesine rağmen yine aynı deyişle bu değişmelerin kabul edilebilir sınırlarda olması nedeniyle polimerik gen taşıyıcı nanopartiküller sistem olarak uygunluğunu koruduğu görülmüştür.

5.3. gnMChi-PEA₃ VE gnMLMWChi-PEA₄₁₄ FORMÜLASYONLARININ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Modifiye kitosanların nanopartikül formülasyonlarının pDNA ile kompleks oluşturup oluşturmadıklarını veya nanopartikülün hangi oranda geni tuttuğunu belirlemek için Bölüm 4.1.6'da belirtildiği gibi polimer-pDNA kompleksleri jel elektroforezde yürütülmüş ve Şekil 4.19-4.20'deki görüntüler elde edilmiştir.

Jel elektroforez sonuçlarına göre, gnMChi-PEA₃ formülasyonunun 3:1, gnMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonunun ise 7:1 oranında pDNA'nın tamamını tutabildiği görülmüştür. Gök ve arkadaşlarının daha önceki yaptıkları bir çalışmada [85] kitosanın polimer:pDNA (a/a) 4:1 oranında pDNA molekülünün tamamını tutabildiği ifade edilmişken bu çalışmada sentezlenen gnMChi-PEA₃ formülasyonunun 3:1 gibi daha düşük bir oranda bunu başardığı görülmektedir. gnMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonunda ise depolimerizasyon sonucu zincir üzerindeki katyonik yük yoğunluğunun oldukça azalmasına karşın, yapılan modifikasyon reaksiyonu ile

Chi'in moleküler yapısına hem fosfoester bağlarının hem de NH₂ uç gruplu yan zincirlerinin yer alması sağlandığından, 7:1 gibi bir oranda gen ile kompleks oluşturabilme kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir. Sonuç olarak bu her iki formülasyonun da uygun bir gen taşıyıcısı olabileceği açıktır.

5.4. nMChi-PEA₃ VE nMLMWChi-PEA₄₁₄ FORMÜLASYONLARININ SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarının sitotoksosite analizleri, Bölüm 3.4.3'te belirtilen, kantitatif bir yöntem olan MTT testi ile HEK293T hücrelerinde gerçekleştirildi.

Şekil 4.21'de negatif kontrol grubu olarak asetik asitin 25 µL, 50 µL ve 100 µL hacimleri ile nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonlarının 50 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyonlarının HEK293T hücrelerinin %hücre canlılık oranları üzerine etkisi görülmektedir. Asetik asitin yalnız başına uygulamalarının hepsinde toksik etki gösterdiği görülmüştür. nMChi-PEA₃ örneğinin ise birçok transfeksiyon çalışmasında maksimum konsantrasyon olarak belirlenen 50 µg/mL konsantrasyon uygulamasında hiçbir toksik etki göstermediği, hatta daha da yüksek konsantrasyonlar olan 125 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda bile %hücre canlılık oranlarını sırasıyla 85.53 ve 67.76 düşürdüğü gözlenirse de kabul edilebilir ve uygulanabilir konsantrasyonlar olduğu belirlenmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ise beklenildiği gibi toksik etki göstermektedir.

nMLMWChi-PEA₄₁₄ ürününe ait sitotoksosite bulgularına bakıldığında ise 50 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda %hücre canlılık oranlarını sırasıyla 78.55, 65.26 ve 66.58 düşürdüğü gözlenirse de transfeksiyon çalışmaları için maksimum uygulanabilir konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Ayrıca nMChi-PEA örneği ile karşılaştırıldığında daha yüksek toksik etki gösterdiği görülmüş bunun sebebinin ise modifikasyon sonucu zincir gruplara ilave edilen pendant gruplardan ve zincirler arası etkileşimlerle oluşan heterodispers yapılardan kaynakladığı düşünülmektedir. Nitekim bu örneklerin PDI değerlerinin de 3'ün üzerinde olması da bu sonucu doğrulamaktadır. Benzer şekilde nMChi-PEA örneğinde de olduğu gibi 500 µg/mL konsantrasyonda ise toksik etki göstermektedir.

5.5. nMChi-PEA₃ VE nMLMWChi-PEA₄₁₄ NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN *İN VİTRO* TRANSFEKSİYON SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Gen taşıma özellikleri uygun bulunan nMChi-PEA₃ ve nMLMWChi-PEA₄₁₄ içeren formülasyonlarının, HEK293T hücrelerinde *in vitro* transfeksiyon etkinliği hakkında ön bilgi edinmek için çalışmalar Bölüm 3.4.4'te belirtilen yöntem ve Bölüm 4.1.8'deki denemelerle gerçekleştirildi. Bulgular Tablo 4.18'de ve Şekil 4.22-4.25'te sunulmuştur. Hem floresans mikroskop incelemeleri sonucu hem de akış sitometrisi sonuçlarına bakıldığında nMChi-PEA₃ örneklerinde HEK293T hücrelerinde *in vitro* transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısı 20.000, polimer-pDNA oranının 12:1 ve 24 µg polimere 1.25 µg gen miktarı olduğu saptandı. Benzer şekilde nMLMWChi-PEA₄₁₄ örneklerinde HEK293T hücrelerinde *in vitro* transfeksiyonun en yüksek olduğu hücre sayısı ise 20.000, polimer-pDNA oranının 25:1 ve 25 µg polimere 1.25 µg gen miktarı olduğu görülmektedir.

5.6. SONUÇLAR

Bu tezle sunulan çalışmada:

- ✓ İlk defa Chi'a bir etanolamin türevi olan o-PEA bileşiği ile modifikasyon yapılarak fosfoester bağı içeren ve amin grubunca zenginleştirilmiş bir türevi sentezlenerek, yapısı aydınlatıldı ve modifikasyon reaksiyonunun mekanizması ortaya koyuldu,
- ✓ İlk defa bu çalışmada depolimerize Chi ürünlerine de söz konusu modifikasyon uygulandı, yapısı aydınlatıldı ve modifikasyon reaksiyonunun mekanizması ortaya koyuldu,
- ✓ İlk defa bu modifikasyon ürünlerinden nanopartikül formülasyonları hazırlandı, karakterize edildi ve optimizasyon çalışmaları yapıldı,
- ✓ İlk defa kullanılan Chi'ın fiziksel şeklinin optimizasyon çalışmalarındaki etkisi incelendi,
- ✓ İlk defa bu modifikasyon ürünlerinden hazırlanan optimize nanopartikül formülasyonlarının gen taşıma kapasiteleri belirlendi,
- ✓ İlk defa yüksek gen taşıma kapasiteli formülasyonlar ile HEK293T hücrelerine *in vitro* transfeksiyon etkinliği çalışmaları gerçekleştirildi.

- ✓ Çalışmada sentezlenen nMChi-PEA₃ formülasyonunun kaynaklarda belirtilen diğer viral olmayan gen taşıyıcılara göre 3:1 gibi düşük bir polimer/pDNA oranında bile yüksek gen tutma kapasitesine sahip olduğu ve transfeksiyon etkinliğinde de başarı sağladığı görüldü.
- ✓ Çalışmada sentezlenen nMLMWChi-PEA₄₁₄ formülasyonunun ise nMChi-PEA'ya nazaran daha uygun boyut ve PDI değerine sahip bir üstünlüğü olsa da molekül ağırlığının düşük olması nedeniyle 7:1 gibi yüksek bir polimer/pDNA oranında gen tutma kapasitesine sahip olduğu dolayısıyla ve aynı oranda *in vitro* transfeksiyon etkinliğine daha yüksek konsantrasyonda nanopartikül ile ulaşılabildiği görüldü.
- ✓ Sonuç olarak ilk defa bu çalışmada sentezlenen modifiye Chi esaslı nanopartiküler formülasyonların HEK293T hücrelerinde diğer viral olmayan gen taşıyıcı sistemlere alternatif biyouyumlu, biyobozunur, toksik olmayan, stabilitesi uygun sistemler olarak kullanılabilirliği ortaya koyuldu.
- ✓ Çalışmalarımız transfeksiyon etkinliği denemelerinin optimizasyonunu takiben farklı hücrelerdeki etkinliklerinin incelenmesi yönünde devam etmektedir. Bundan sonraki dönemlerde transfeksiyon etkinliğinin düşük olduğu bilhassa primer hücrelerde etkin bir transfeksiyon sağlamak yönünde çalışmalarımızı sürdürmeyi hedeflemekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1]. Park, T.G., Jeong, J.H., Kim, S.W., 2006, Current status of polymeric gene delivery systems, *Advanced drug delivery reviews*, 58(4), 467-486.
- [2]. Mintzer, M.A., Simanek, E.E., 2008, Nonviral vectors for gene delivery, *Chemical reviews*, 109(2), 259-302.
- [3]. Xu, F.J., Li, H., Li, J., Zhang, Z., Kang, E.T., Neoh, K.G., 2008, Pentablock copolymers of poly (ethylene glycol), poly ((2-dimethyl amino) ethyl methacrylate) and poly (2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery, *Biomaterials*, 29(20), 3023-3033.
- [4]. Özgümüş, S., Gök, M.K., Pabuccuoğlu, S., 2016, Chitosan: Gene Delivery, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 1735-1749.
- [5]. Wong, S.Y., Pelet, J.M., Putnam, D., 2007, Polymer systems for gene delivery—past, present, and future, *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 799-837.
- [6]. Hughes, J.A., Rao, G.A., 2005, Targeted polymers for gene delivery, *Expert opinion on drug delivery*, 2(1), 145-157.
- [7]. Reschel, T., Koňák, Č., Oupický, D., Seymour, L.W., Ulbrich, K., 2002, Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations, *Journal of Controlled Release*, 81(1-2), 201-217.
- [8]. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., Yan, J., 2006, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 114(1), 100-109.
- [9]. Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., Fernandes, J.C., 2004, Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 57(1), 1-8.
- [10]. 2016, *What is gene therapy?*, <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gene-therapy>, [Ziyaret tarihi: 24 Şubat 2018].
- [11]. Walther, W., Stein, U., 2000, Viral vectors for gene transfer, *Drugs*, 60(2), 249-271.
- [12]. Tiera, M.J., Winnik, F.M., Fernandes, J.C., 2006, Synthetic and natural polycations for gene therapy: state of the art and new perspectives, *Current gene therapy*, 6(1), 59-71.
- [13]. Liu, F., Huang, L., 2002, Development of non-viral vectors for systemic gene delivery, *Journal of controlled release*, 78(1-3), 259-266.
- [14]. Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S., Stayton, P.S., 2005, Design and development of polymers for gene delivery, *Nature reviews Drug discovery*, 4(7), 581.

- [15]. Niidome, T., Huang, L., 2002, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene therapy*, 9(24), 1647.
- [16]. Bhavsar, M.D., Amiji, M.M., 2007, Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery, *Expert opinion on drug delivery*, 4(3), 197-213.
- [17]. Samal, S.K., Dash, M., Van Vlierberghe, S., Kaplan, D.L., Chiellini, E., Van Blitterswijk, C., Moroni, L., Dubruel, P., 2012, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7147-7194.
- [18]. Jaeger, M., Schubert, S., Ochrimenko, S., Fischer, D., Schubert, U.S., 2012, Branched and linear poly (ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application, *Chemical Society Reviews*, 41(13), 4755-4767.
- [19]. Cho, Y.W., Kim, J.D., Park, K., 2003, Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(6), 721-734.
- [20]. Gao, X., Kim, K.S., Liu, D., 2007, Nonviral gene delivery: what we know and what is next, *The AAPS journal*, 9(1), E92-E104.
- [21]. Jiang, H.L., Kim, Y.K., Cho, C.S., Cho, M.H., 2011, Medical polymer-based gene therapy, In Non-Viral Gene Therapy, *InTech.*, 417-438.
- [22]. Jeong, J.H., Kim, S.W., Park, T.G., 2007, Molecular design of functional polymers for gene therapy, *Progress in Polymer Science*, 32(11), 1239-1274.
- [23]. Van de Wetering, P., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E., Van Steenbergen, M.J., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E., 2000, Copolymers of 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate with ethoxytriethylene glycol methacrylate or N-vinyl-pyrrolidone as gene transfer agents, *Journal of controlled release*, 64(1-3), 193-203.
- [24]. Agarwal, A., Unfer, R., Mallapragada, S.K., 2005, Novel cationic pentablock copolymers as non-viral vectors for gene therapy, *Journal of controlled release*, 103(1), 245-258.
- [25]. Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck J., Ryder J., Smith, P., 1985, A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules, *Polymer Journal*, 17(1), 117-132.
- [26]. Arima, H., Kihara, F., Hirayama, F., Uekama, K., 2001, Enhancement of gene expression by polyamidoamine dendrimer conjugates with α -, β -, and γ -cyclodextrins, *Bioconjugate chemistry*, 12(4), 476-484.
- [27]. García-Gallego, S., Franci, G., Falanga, A., Gómez, R., Folliero, V., Galdiero, S., Javier de la Mata F., Galdiero, M., 2017, Function Oriented Molecular Design: Dendrimers as Novel Antimicrobials, *Molecules*, 22(10), 1581.
- [28]. Ward, C.M., Read, M.L., Seymour, L.W., 2001, Systemic circulation of poly (L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy, *Blood*, 97(8), 2221-2229.

- [29]. Brown, M.D., Schätzlein, A., Brownlie, A., Jack, V., Wang, W., Tetley, L., Gray A.I., Uchegbu, I. F., 2000, Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents, *Bioconjugate chemistry*, 11(6), 880-891.
- [30]. Zhao, Z., Wang, J., Mao, H.Q., Leong, K.W., 2003, Polyphosphoesters in drug and gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(4), 483-499.
- [31]. Pillai, O., Panchagnula, R., 2001, Polymers in drug delivery, *Current opinion in chemical biology*, 5(4), 447-451.
- [32]. Steinbach, T., Ritz, S., Wurm, F.R., 2014, Water-Soluble Poly(phosphonate)s via Living Ring-Opening Polymerization, *ACS Macro Lett.*, 3, 244-248.
- [33]. Zhang, G., Zhang, M., He, J., Ni, P., 2013, Synthesis and characterization of a new multifunctional polymeric prodrug paclitaxel-polyphosphoester-folic acid for targeted drug delivery, *Polym. Chem.*, 4, 4515.
- [34]. Samal, S.K., Dash, M., Van Vlierberghe, S., Kaplan, D.L., Chiellini, E., Van Blitterswijk, C., Moroni, L., Dubruel, P., 2012, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7147-7194.
- [35]. Khan, W., Hosseinkhani, H., Ickowicz, D., Hong, P.D., Yu, D.S., Domb, A.J., 2012, Polysaccharide gene transfection agents, *Acta biomaterialia*, 8(12), 4224-4232.
- [36]. Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100 (2004), 5 – 28.
- [37]. Raftery, R., O'Brien, F.J., Cryan, S.A., 2013, Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications, *Molecules*, 18(5), 5611-5647.
- [38]. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., 2011, Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- [39]. Campos, E.V., Oliveira, J.L., Fraceto, L.F., 2017, Poly (ethylene glycol) and cyclodextrin-grafted chitosan: from methodologies to preparation and potential biotechnological applications, *Frontiers in chemistry*, 5:93, 1-15.
- [40]. Douglas, K.L., Piccirillo, C.A., Tabrizian, M., 2008, Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 676-687.
- [41]. Bowman, K., Leong, K.W., 2006, Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery, *International journal of nanomedicine*, 1(2), 117.
- [42]. Mohanraj, V. J., Chen, Y., 2006, Nanoparticles-a review, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.

- [43]. Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 329-347.
- [44]. Qasim, M., Lim, D.J., Park, H., Na, D., 2014, Nanotechnology for diagnosis and treatment of infectious diseases, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(10), 7374-7387.
- [45]. Rao, J.P., Geckeler, K.E., 2011, Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters, *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.
- [46]. Bahamonde-Norambuena, D., Molina-Pereira, A., Cantin, M., Muñoz, M., Zepeda, K., Vilos, C., 2015, Nanopartículas poliméricas en dermatocósmética, *International Journal of Morphology*, 33(4), 1563-1568.
- [47]. Singh, R., Lillard Jr, J.W., 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- [48]. Faraji, A.H., Wipf, P., 2009, Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(8), 2950-2962.
- [49]. Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.
- [50]. Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z.M., 2013, Polymeric nanoparticles, *Sigma*, 31, 107-120.
- [51]. Vauthier, C., Bouchemal, K., 2009, Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharmaceutical research*, 26(5), 1025-1058.
- [52]. Gök, M.K., 2013, *Doğal ve Sentetik Biyouyumlu Polimerik Nanopartiküler Gen Taşıyıcı Sistemlerin Elde Edilmesi ve Transfeksiyon Etkinliğinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 150.
- [53]. Gökçe, Y., 2008, *Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [54]. Cho, W.S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I.L., MacNee, W., Poland, C.A., Lang Tran, C., Donaldson, K., 2012, Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles, *Toxicological Sciences*, 126(2), 469-477.
- [55]. Gürbüz, A.A., 2007, *Magnetik nanopartiküller ile sulu çözeltilerden krom giderilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [56]. Massadeh, S., Alaamery, M., Polymer nanoparticles for targeted gene delivery, *Nanotechnology in Drug Delivery*, 1-20.
- [57]. Elouahabi, A., Ruysschaert, J.M., 2005, Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes, *Molecular therapy*, 11(3), 336-347.

- [58]. Wang, D., Robinson, D.R., Kwon, G. S., Samuel, J., 1999, Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery, *Journal of Controlled Release*, 57(1), 9-18.
- [59]. Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 329-347.
- [60]. Singh, M., Briones, M., Ott, G., O'Hagan, D., 2000, Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 811-816.
- [61]. Munier, S., Messai, I., Delair, T., Verrier, B., Ataman-Önal, Y., 2005, Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43(3-4), 163-173.
- [62]. Mao, S., Sun, W., Kissel, T., 2010, Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 12-27.
- [63]. Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H.P., Kissel, T., 1999, A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity, *Pharmaceutical research*, 16(8), 1273-1279.
- [64]. Godbey, W.T., Wu, K.K., Hirasaki, G.J., Mikos, A.G., 1999, Improved packing of poly (ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency, *Gene therapy*, 6(8), 1380.
- [65]. Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A.M., Remy, J.S., 1998, Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability, *Pharmaceutical research*, 15(9), 1332-1339.
- [66]. Godbey, W.T., Barry, M.A., Saggau, P., Wu, K.K., Mikos, A.G., 2000, Poly (ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery, *Journal of biomedical materials research*, 51(3), 321-328.
- [67]. Kievit, F.M., Veiseh, O., Bhattarai, N., Fang, C., Gunn, J.W., Lee, D., Ellenbogen, R.G., Olson, J.M., Zhang, M., 2009, PEI-PEG-chitosan-copolymer-coated iron oxide nanoparticles for safe gene delivery: synthesis, complexation, and transfection, *Advanced functional materials*, 19(14), 2244-2251.
- [68]. Olton, D., Li, J., Wilson, M.E., Rogers, T., Close, J., Huang, L., Kumta, P.N., Sfeir, C., 2007, Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: influence of the synthesis parameters on transfection efficiency, *Biomaterials*, 28(6), 1267-1279.
- [69]. Kunath, K., von Harpe, A., Fischer, D., Kissel, T., 2003, Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency, *Journal of Controlled Release*, 88(1), 159-172.

- [70]. Thanou, M., Florea, B.I., Geldof, M., Junginger, H.E., Borchard, G., 2002, Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines, *Biomaterials*, 23(1), 153-159.
- [71]. Gao, Y., Xu, Z., Chen, S., Gu, W., Chen, L., Li, Y., 2008, Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency, *International journal of pharmaceutics*, 359(1-2), 241-246.
- [72]. Kim, T.I., Seo, H.J., Choi, J.S., Yoon, J.K., Baek, J.U., Kim, K., Park, J.S., 2005, Synthesis of biodegradable cross-linked poly (β -amino ester) for gene delivery and its modification, inducing enhanced transfection efficiency and stepwise degradation, *Bioconjugate chemistry*, 16(5), 1140-1148.
- [73]. Zhang, X.Q., Wang, X.L., Zhang, P.C., Liu, Z.L., Zhuo, R.X., Mao, H.Q., Leong, K.W., 2005, Galactosylated ternary DNA/polyphosphoramidate nanoparticles mediate high gene transfection efficiency in hepatocytes, *Journal of controlled release*, 102(3), 749-763.
- [74]. Huang, S.W., Wang, J., Zhang, P.C., Mao, H.Q., Zhuo, R.X., Leong, K.W., 2004, Water-soluble and nonionic polyphosphoester: synthesis, degradation, biocompatibility and enhancement of gene expression in mouse muscle, *Biomacromolecules*, 5(2), 306-311.
- [75]. Lin, S., Du, F., Wang, Y., Ji, S., Liang, D., Yu, L., Li, Z., 2007, An acid-labile block copolymer of PDMAEMA and PEG as potential carrier for intelligent gene delivery systems, *Biomacromolecules*, 9(1), 109-115.
- [76]. Luten, J., Van Steenis, J.H., Van Someren, R., Kemmink, J., Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E., Koning, G.A., Crommelin D.J.A., Van Nostrum, C.F., Hennink, W.E., 2003, Water-soluble biodegradable cationic polyphosphazenes for gene delivery, *Journal of controlled release*, 89(3), 483-497.
- [77]. Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., McCarron, P., 2005, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2-3), 65-73.
- [78]. Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., Buschmann, M.D., 2006, High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation, *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.
- [79]. Choudhary, S., Devi, V. K., Raichur, V., 2015, N-deacetylation and Characterization of Chitosan: Impact on Optimized Nanoparticulate Drug Delivery Systems, *Int Nanomed Nanosurg*, 2(1), 1-12.
- [80]. Fan, W., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., 2012, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.

- [81]. Reul, R., Nguyen, J., Biela, A., Marxer, E., Bakowsky, U., Klebe, G., Kissel, T., 2012, Biophysical and biological investigation of DNA nano-complexes with a non-toxic, biodegradable amine-modified hyperbranched polyester, *International journal of pharmaceutics*, 436(1-2), 97-105.
- [82]. Potineni, A., Lynn, D.M., Langer, R., Amiji, M.M., 2003, Poly(ethylene oxide)-modified poly (β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery, *Journal of Controlled Release*, 86(2-3), 223-234.
- [83]. Sharma, D., Singh, J., 2017, Synthesis and Characterization of Fatty Acid Grafted Chitosan Polymer and Their Nanomicelles for Nonviral Gene Delivery Applications, *Bioconjugate chemistry*, 28(11), 2772-2783.
- [84]. Hsu, C.Y.M., Uludağ, H., 2012, A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine, *nature protocols*, 7(5), 935.
- [85]. Gök M.K., Pabuccuoğlu S., Cevher E., Demir K., Pabuccuoğlu S., Synthesis of nanoparticulate gene carrier systems based on chitosan, Almanya, Patent, EP2995627, Aralık 2016.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sibel KÜÇÜKERTUĞRUL
Doğum Yeri	Kadıköy
Doğum Tarihi	17.09.1993
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0535 262 48 98
E-Posta Adresi	sibelkucukertugrul@gmail.com
Web Adresi	http://pprbiotech.istanbul.edu.tr/ http://aves.istanbul.edu.tr/sibelkucukertugrul/



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	15.06.2015

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Kimyasal Teknolojiler Programı