



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİ(β-AMİNO ESTER) ESASLI NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU ve UYGULAMASI

Aslı ÖZÇELİK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU

II. DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi M. Koray GÖK

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler Programı

İSTANBUL-2019

Bu çalışma, 11.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

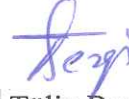
Tez Jürisi



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



Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



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

ÖNSÖZ

Lisans eğitimime İstanbul Üniversitesi'nde devam ederken kendisinden aldığım ilk Polimer Kimyası dersinden itibaren değerli bilgilerimi benimle paylaşan, kensine ne zaman danışsam bana zaman ayırıp sabırla ve ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, fikirleri ve yol göstericiliği ile ilerleme kaydetmemi sağlayan, lisansüstü eğitimim için beni teşvik eden, bu alanda beni geliştirmek için desteğini esirgemeyen, lisans ve yüksek lisans tez danışmanım olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU'na teşekkür ederim.

Öğrenci asistanlığımdan bugüne kadar desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman her konuda, tez çalışmamın ilerlemesinde bana danışmanlık yapan, önerilerini göstermekten kaçınmayan, üstün sabrı ve inancı için ikinci tez danışmanım çok değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Koray GÖK'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım için bana Anabilim Dalı imkanlarını kullanmamı sağlayan, beni hiçbir zaman yanıtsız bırakmayan 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, ve doktora eğitimlerine devam eden, yardımlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen, öncelikle Kimya Yüksek Mühendisi Kevser BAL'a, Kimya Yüksek Mühendisi Emine Büşra EKER'e ve diğer arkadaşlarıma 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.

Halen çalışmakta olduğum Depar Deri ve Plastik San. Tic. A.Ş. yönetim kurulu başkanı Sayın Mehmet KEÇECİ'ye, yönetim kurulu üyesi Sayın Erdem KEÇECİ'ye destekleri, teşvikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim-öğretim hayatım boyunca edindiğim ve hâlâ yanımda olan, yardımlarını, desteklerini, bilgi ve birikimlerini hiç sakınmayan, yorulduğumda bana güç verip tekrar devam etmemi sağlayan, öncelikle Cemile FIRSATBUL, İlayda KİRALİ'ye, tüm arkadaşlarıma, birlikte büyüdüğüm, birlikte ağladığım, bana kardeş eksikliğini hiçbir zaman hissettirmeyen çok değerleri kuzenlerim Gamze GÜN, Çağla UZUN, ve Damla UZUN'a, yüksek öğrenimim zamanında tanıştığım sakinliği, sabrı ve sevgisi ile bana destek veren Aybüke DEDEOĞLU'na teşekkür ederim.

Doğduğum günden bu güne yanımda olan, bana hem anne hem baba olan, benimle ağlayan, benimle gülen, bana olan inancını hiç kaybetmeyen, benimle gurur duyan, maddi manevi desteğini benden esirgemeyen canım annem Emriye DÜZGÜN'e, inancı, sevgisi, sabrı ve desteği için çok teşekkür ederim. |

Haziran 2019

[Aslı ÖZÇELİK]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	2
2.1.HÜCRE BİYOLOJİSİ	2
2.1.1. Hücre	2
2.1.2 Hücre (Plazma) Membran	3
2.1.3 HÜCRE DIŞI MALZEMENİN Hüresel Girişi.....	4
2.1.3.1. Endositoz ve Endozomlar	4
2.1.4. Nükleik Asitler ve Deoksiribonükleik Asit (DNA).....	6
2.2. GEN TRANSFERİ	7
2.2.1. Gen Transferi Tarihi Gelişimi	8
2.2.2. Gen Terapinin Güncel Pozisyonu.....	8
2.3 GEN TRANSFERİ YÖNTEMLERİ	10
2.3.1 Viral vektörler	10
2.3.1.1 <i>Reto-viral Vektörler</i>	10
2.3.1.2 <i>Adenoviral Vektörler</i>	10
2.3.1.3 <i>Adeno İlişkili Vektörler</i>	11
2.3.1.4 <i>Poxvirus (Aşı Virüsü)</i>	11
2.3.2 Viral Olmayan Gen Taşıma Sistemleri.....	11
2.3.2.1 <i>Polimer Esaslı Vektörler</i>	11
2.4 VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARDA GEN TRANSFERİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	15
2.4.1 Nanopartikül Boyutu	15
2.4.1.1 <i>Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri</i>	15

2.4.2 Zeta Potansiyeli	17
2.5. VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARDA GEN TRANSFERİ.....	19
2.5.1. Gen Paketleme.....	20
2.5.1.1. Elektrostatik Etkileşim	21
2.5.1.2 Enkapsülasyon	21
2.5.1.3. Adsorbsiyon	21
2.5.2. Endozomal Kaçış.....	21
2.6. GEN İFADESİ.....	22
2.6.1. Transkripsiyon.....	23
2.6.2. Translasyon.....	23
2.7.DNA SALIMI	23
2.8. BİYOUYUMLULUK.....	23
2.8.1. Sistemin kandaki stabilitesi	24
2.8.2. Sitotoksosite	24
2.9. GEN TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERE AİT YAPILAN ÇALIŞMALARLA İLGİLİ KAYNAK ARAŞTIRMALARI	24
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR	29
3.2.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)	29
3.2.2. Jel Geçirgenlik Kromatografisi ve Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi (GPC/SEC)	29
3.2.3. Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı.....	29
3.2.4. pH Metre.....	29
3.2.6. Olympus Ters Mikroskop.....	29
3.2.7. Akış (Flow) Sitometri (Akan Hücre Ölçer).....	30
3.3. YÖNTEM.....	30
3.3.1. PBAE Bileşiklerinin Sentez Yöntemi	30
3.3.2. PBAE Ürünlerinden Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması.....	31
3.3.3. PBAE Ürünlerinin Tampon Kapasitelerinin Belirlenmesi	31
3.3.4. Plazmid DNA (pDNA) Genini Taşıyan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	32
3.3.5. Jel Elektrophorez Analizi	32
3.3.6. Sitotoksisite ve <i>İn Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliği Çalışmaları	33
3.3.6.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.3.6.2. HEC293 Hücrelerinin Hazırlanması.....	34

3.3.7. Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksitesinin MTT Testi ile İncelenmesi	34
3.3.8. Nanopartikül Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Transfeksiyon Etkinliği	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. SENTEZ VE KARAKTERİZASYON	37
4.1.1 Sentezlenen PBAE Ürünlerine Ait FTIR Spektra	38
4.1.2 Sentezlenen PBAE Ürünlerine Ait GPC Analizi Sonuçları	41
4.2 PBAE ÜRÜNLERİNDEN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASINDA OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI.....	41
4.3. B31,B32,B33,B34 PBAE ÜRÜNLERİNE AIT TAMPON KAPASİTESİ	49
4.4. B31 VE B32 ÜRÜNLERİNİN JEL ELEKTROFOREZ ANALİZLERİ.....	50
4.5. PBEA ÜRÜNLERİNİN MTT TESTİ İLE SİTOTOKSİTİE KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ.....	53
4.6. İN VİTRO TRANFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARI	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
5.1. SENTEZ VE KARAKTERİZASYON	57
5.1.1. PBEA Ürünlerinin Sentezi	57
5.1.1. B1, B2, B3, B4, B31, B32, B33,B34 Ürünlerinin FTIR Spektrası.....	59
5.1.2 GPC/SEC Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	61
5.2. PBAE ÜRÜNLERİNDEN ELDE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN PARTİKÜL BOYUTU, PDI VE ZETA POTANSİYELİ DEĞERLENDİRMESİ.....	62
5.3. B31, B32, B33, B34 ÜRÜNLERİNİN TAMPON KAPASİTESİ ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	64
5.4. B31 B32 FORMÜLASYONLARININ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	65
5.5. NB31 FORMÜLASYONUNUN SİTOTOKSİTİE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	65
5.6. NB31 FORMÜLASYONUNUN İN VİTRO TRANFEKSİYON ETKİNLİĞİ SONUÇLARI	66
5.7 SONUÇLAR	67
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Farklı Türde Hücre Ve Hücresel Bileşenlerin Göreceli Boyutlarını Göstermektedir. Karşılaştırma İçin Yetişkin Bir İnsan Gösterilmiştir	2
Şekil 2.2: Hücre Membranının Yapısı	3
Şekil 2.3: Madde Geçiş Yolları	5
Şekil 2.4: Endositoz Mekanizması	5
Şekil 2.5: Gen Terapisinde Anahtar Basamakların Şematik Gösterimi	8
Şekil 2.6: Klinik Çalışmalarda Gen Tedavisi İle Ele Alınan Farklı Bulguların Grafikselsunumu	9
Şekil 2.7: Klinik Çalışmalarda En Sık Kullanılan Gen Transferi Vektörleri	9
Şekil 2.8: PBAE Sentezi	14
Şekil 2.9: A) Polimer Nanopartikül Nanokürecikler B) Yağ, C) Su İçeren Nanokapsüller ...	16
Şekil 2.10: PNP İçin Farklı Hazırlama Tekniklerinin Gösterimi	16
Şekil 2.11: Bir Partikülün Çözelti İçerisinde Oluşan Yüzey Yükü Tabakaları	18
Şekil 2.12: Kolloidal Sistemlerin Kararlılığını İfade Eden pH Değerlerine Karşılık Zeta Potansiyeli	19
Şekil 2.13: Gen Transferi Aşamaları	20
Şekil 2.14: Endozomal Kaçış	22
Şekil 2.12: Kolloidal Sistemlerin Kararlılığını İfade Eden pH Değerlerine Karşılık Zeta Potansiyeli	19
Şekil 2.13: Gen Transferi Aşamaları.....	20
Şekil 2.14: Endozomal Kaçış	22
Şekil 3.1: Jel Elektroforez Cihazı.....	33
Şekil 4.1: B1 VE B2 PBAE Ürünlerine Ait Ftır Spektra.	39
Şekil 4.2: B3 VE B4 PBAE Ürünlerine Ait Ftır Spektra..	39
Şekil 4.3: B31 VE B32 PBAE Ürünlerine Ait Ftır Spektra.	40
Şekil 4.4: B33 VE B34 Ürünlerine Ait Ftır Spektra.	40
Şekil 4.5: nB3'e Ait Boyut Ve Dağılım Grafiği.	42
Şekil 4.6: nB3'e Ait Zeta Potansiyeli Grafiği	43

Şekil 4.7: n ₁ B31'e Ait Boyut Ve Dağılım Grafiği.....	44
Şekil 4.8: n ₁ B32'e Ait Boyut Ve Dağılım Grafiği	44
Şekil 4.9: n ₁ B31'e Ait Zeta Potansiyeli Grafiği.....	45
Şekil 4.10: n ₁ B32'e Ait Zeta Potansiyeli Grafiği.....	45
Şekil 4.12: gnB31 Jel Elektroforez Sonuçları	52
Şekil 4.14: nB31 Formülasyonunun HEK293 Hücrelerine Toksisitesi.....	53
Şekil 5.1: TEMEDA ve AP Reasyon Mekanizması.....	58



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: PBAE'lerin Sentezlerinde Uygulanan Reaksiyon Koşulları, Semboller Ve Ürünlerin Fiziksel Durumu.....	37
Tablo 4.2: PBAE Ürünlerinin Gpc/Sec Analizi Sonuçları	41
Tablo 4.3: nPBAE'lerin Boyut, Dağılım Ve Zeta Potansiyeli Değerleri	42
Tablo 4.4: n ₁ B3 Grubu Formülasyonlarının Boyut, Dağılım Ve Zeta Potansiyeli Değerleri .	43
Tablo 4.5: n ₂ B31, n ₂ B32, n ₂ B33 Formülasyonlarının Boyut, Dağılım Ve Zeta Potansiyeli Sonuçları.....	46
Tablo 4.6: B31-DMSO Çözeltisi Kullanılarak nB31 Hazırlanmasında Optimizasyon Çalışmaları.....	47
Tablo 4.7: Tablo 4.6'da Verilen Nanopartikül Sonuçlarına Göre En Uygun Değerleri Veren Formülasyonların Zeta Potansiyelleri.....	49
Tablo 4.8: B31 PBAE Ürününün Jel Elektroforez Denemesinde Kullanılan Oranlar	51
Tablo 4.9: B32 PBAE Ürününün Jel Elektroforez Denemesinde Kullanılan Oranlar	52
Tablo 4.10: DMSO Ortamında Hazırlanmış nB31 Formülasyonlarının HEK293 Hücrelerine Transfeksiyon Etkinliğine Ait Sonuçlar.	54
Tablo 4.11: NaAc Ortamında Hazırlanmış nB31 Formülasyonlarının HEK293 Hücrelerine Transfeksiyon Etkinliğine Ait Sonuçları.	55

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
g	: Gram
kb	: Kilobaz
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
M_w	: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
M_n	: Sayısal ortalama molekül ağırlığı

Kısaltmalar	Açıklama
AP	: 3-amino-1-propanol
CO	: Karbondioksit
DAMP	: 1,5-Diamino-2-metilpentan
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EDA	: Etilendiamin
FCS	: Föetal buzağı serumu
HCl	: Hidroklorik asit
HEK293	: İnsan embriyonik böbrek 293 hücre hattı
HEEDA	: N-(2-Hidroksietil)etilendiamin
kb	: Kilobaz
KBr	: Potasyum bromür
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAc	: Sodyum Asetat Tamponu
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
THF	: Tetrahidrofuran
TPP	: Sodyum tripolifosfat
PDI	: Polidisperslik indeksi
PDI_n	: Partikül Boyutu Dağılımı
pDNA	: Plazmid DNA
TEMEDA	: Trimetilolpropan etoksilat (1 EO/OH) metil eter diakrilat

ÖZET

POLİ(β -AMİNO ESTER) ESASLI NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve UYGULAMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ash ÖZÇELİK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU

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

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın amacı, sentetik polimer esaslı yeni bir viral olmayan gen taşıyıcı nanopartiküller sisteminin sentezlenmesi, yapısının aydınlatılması ve gen transferi alanında uygulamasının incelenmesidir.

Gen transferi alanında kullanılan iki temel vektörden biri olan viral olmayan vektörler, viral vektörlere göre biyogüvenlilik konusunda daha başarılıdır. Bu nedenle tez kapsamında viral olmayan gen taşıyıcı vektör olarak 12 adet poli(β -amino ester) (PBAE) sentezlendi ve yapıları Fourier Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile aydınlatıldı. Ortalama molekül ağırlıkları tayinleri ise Jel Geçirgenlik Kromatografisi-Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi (GPC-SEC) kullanılarak belirlendi. Sentezlenen PBAE'lerin nanopartikül formülasyonları (nPBAE) nanoöktürme yöntemi ile oluşturularak, Zetasizer sisteminde partikül boyutları, dağılımı (PDI_n) ve zeta potansiyelleri ölçüldü ve formülasyonların optimizasyonları gerçekleştirildi. Yapı aydınlatması ve nPBAE'lerin optimizasyonundan sonra nihai ürün olarak kullanılacak uygun özelliklerdeki nPBAE'lerin plasmid DNA (pDNA) ile kompleksleri, iyonik etkileşim ve enkapsülasyon yöntemi ile hazırlandı. Takiben nPBAE'in pDNA bağlayabilme özelliği jel elektroforez ile analiz edildi.

nPBAE'lerin *in vitro* transfeksiyon etkinliği floresans mikroskopta ve akan hücre ölçer cihazında, sitotoksitesisi ise insan embriyonik böbrek hücre (HEK293) hatları kullanılarak MTT yöntemi ile incelendi.

Sonuç olarak, bu tezde sentezlenen nPBAE'lerin HEK293 hücresinde yüksek *in vitro* transfeksiyon etkinliğine sahip, diğer viral olmayan gen taşıyıcı sistemlere alternatif biyouyumlu, toksik olmayan sistemler olarak kullanılabilirliği saptandı.

Haziran 2019, |91| sayfa.

Anahtar kelimeler: | Poli(β -amino ester), nanopartikül, transfeksiyon. |



SUMMARY

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION and APPLICATION OF NANOPARTICLES BASED ON POLY(B-AMINO ESTER)

M.Sc. THESIS

Ash ÖZÇELİK

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Name of Department

Supervisor : Prof. Dr. Saadet K. PABUCCUOĞLU

Co-Supervisor : Dr. M. Koray GÖK

The aim of the study realized in this thesis is to synthesize a new non-viral gene carrier nanoparticulate system based on synthetic polymer, to clarify its structure and to examine its application in gene transfer.

Non-viral vectors, which are one of the two main vectors used in transgenesis are more successful in biosafety than viral vectors. For this reason, 12 types of poly(β -amino ester) (PBAE) are synthesized as non-viral gene carrier vectors within the scope of the thesis and their structure is clarified by Fourier Infrared Spectroscopy. The average molecular weights were determined using Gel Permeation Chromatography-Size Exclusion Chromatography (GPC-SEC) system. Nanoparticle formulations (nPBAEs) of synthesized PBAEs were formed by nanoprecipitation method, their particle sizes, polydispersity index (PDI_n) and zeta potentials were measured in the Zetasizer system and the optimization of formulations were realized. After the clarification of the structures and the optimization of the nPBAEs, the complexes of the plasmid DNA with nPBAEs, which have appropriate properties and will be used as final product, were fabricated by ionic interaction and encapsulation methods. Then binding capacity of the nPBAEs with pDNA was analyzed by gel electrophoresis.

In vitro transfection efficiency of nPBAE was examined using by fluorescence microscopy and flow cytometry, their cytotoxicity was investigated using human embryonic kidney cell lines (HEK293) according to the MTT assay. As a result, it was determined that nPBAEs synthesized in this thesis could be used as alternative biocompatible, non-toxic systems to other non-viral gene carrier systems with high *in vitro* transfection efficiency in the HEK293 cells.

June 2019, 91 pages.

Keywords: Poly (β-amino ester), nanoparticle, transfection.



1. GİRİŞ

Gen terapi, hastanın hücrelerini genetik olarak değiştirerek hastanın sağlık durumunu tedavi etmek veya iyileştirmek için kullanılan prosedür olarak tanımlanmaktadır. Kalıtsal ve kazanılmış hastalıkların tedavi edilmesi için, terapötik bir gen materyali ve bununla ilişkili düzenleyici elementlerin çekirdeğe aktarılmasıyla gen terapi eşsiz bir olanak sağlar. Bu tedavide, tedavi edici özelliği olan genler, güvenli ve verimli bir taşıyıcı ile hedef dokuya ya da hücreye transfer edilmektedir. Bu amaçla kullanılan taşıyıcılar viral ve viral olmayan taşıyıcılar olmak üzere ikiye ayrılır. Viral taşıyıcılar, hedefe ulaşma verimliliği açısından bilinen en verimli taşıyıcılar olmakla birlikte güvenilirlik ve üretim zorlukları açısından uygulamaları çok kısıtlıdır ve yan etkileri oldukça fazladır. Bu sebeple, güvenli ve üretimi kolay alternatif bir metod olarak viral olmayan vektörler araştırılmaktadır. Transjenik polimerler adıyla anılan viral olmayan vektörler olarak kullanılan nanopartikül sistemler doğal polimerler (kitosan, dekstran, jelatin, kolajen ve türevleri vb.) ve sentetik polimerler ise poli(β -aminoester)ler (PBAE), poli(amidoamin)ler, poli(imidazol)ler, polietilen oksit/polipropilen oksit kopolimerleri, polietilen oksit vb. esaslı olabilmektedirler. Katyonik polimerler, negatif yüklü DNA molekülünü kompleksleyebilme ve koruyabilme gibi özel avantajlar sağlayabildikleri için transfeksiyon vektörleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yaygın kullanımına rağmen bazı katyonik polimerler önemli ölçüde sitotoksik olabilmektedirler. Sonuç olarak, bir gen transfer uygulaması için katyonik polimerin seçiminde en önemli özellikler genellikle transfeksiyon verimliliğinin yüksek olması, toksik özelliğinin olmamasıdır.

Tez kapsamında gerçekleştirilecek olan çalışmanın başlıca amacı, yeni PBAE'lerin sentezi, karakterizasyonu, bunların uygun özelliklerdeki nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için optimizasyon çalışmaları ve uygun özelliklerdeki formülasyonların gen taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğinin incelenmesidir.

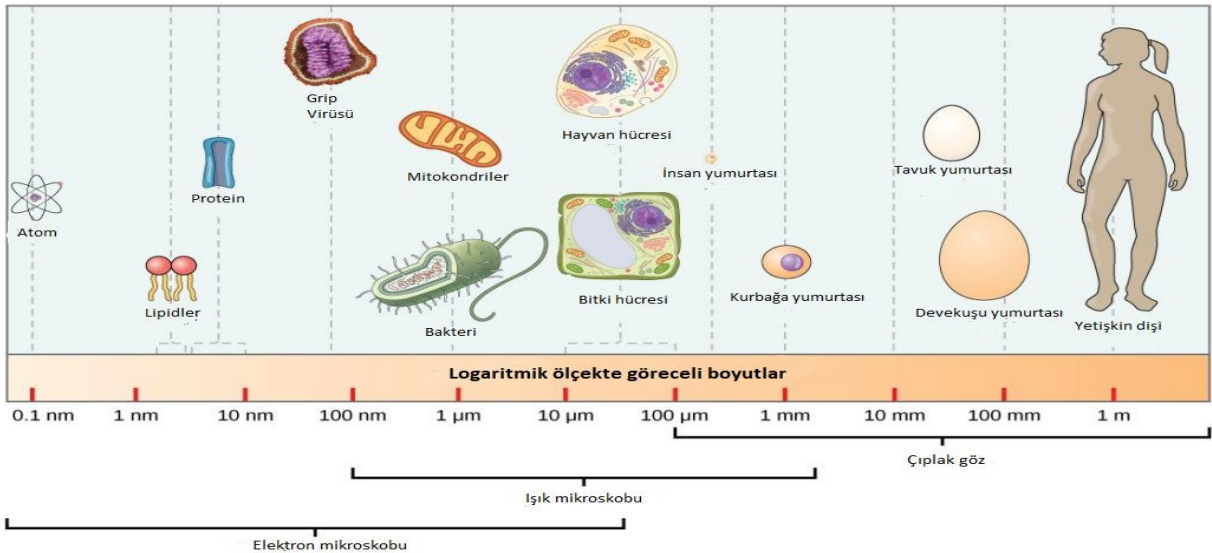
Bu amaçla, öncelikle sentetik bir polimer olan PBAE'lerin sentezi gerçekleştirilerek ve yapıları aydınlatıldı. Daha sonra elde edilen PBAE'lerin nanopartikül formülasyonları hazırlandı ve özellikleri optimize edildi. Optimize nanopartikül formülasyonların gen taşıma kapasiteleri tayin edilerek, HEK293 hücreleri için *in vitro* transfeksiyon etkinlikleri incelendi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.HÜCRE BİYOLOJİSİ

2.1.1. Hücre

Hücre, bir organizmanın en küçük yaşam birimidir. “Hücre” terimi ilk defa bir İngiliz fizikçi olan Robert Hooke (1635-1702) tarafından tanımlanmıştır [1]. 18. yüzyılın sonlarında görüntüleme alanındaki gelişmeler doğrultusunda, bilim insanları canlı organizmaları görselleştirmekle ilgilenmeye başladılar. Bununla birlikte Dr.Theodore Schwann (1810-1882) tarafından hayvan dokusunun hücrelerden oluştuğu ve her hücrenin bir çekirdeği olduğu belirtildi [2]. İlk hücrenin keşfedilmesinden günümüze kadar yapılan çalışmalar ve ortaya çıkan gelişmelerle birlikte insan vücudunda ± 10 trilyon civarında hücre olduğu ileri sürülmektedir. Yine de, hücrelerin tümü vücutta aynı işleve sahip değildir. Hücreler, epitel, kas ve nöron hücreleri olarak farklı işlevleri yerine getirme konusunda ayrılmışlardır. Genel olarak, hücrelerin büyüklüğü 10 μm ile 50 μm arasındadır, ancak işlevine bağlı olarak bu değişebilir. Şekil 2.1’de farklı türde hücre ve hücrenel bileşenlerin göreceli boyutları gösterilmektedir.

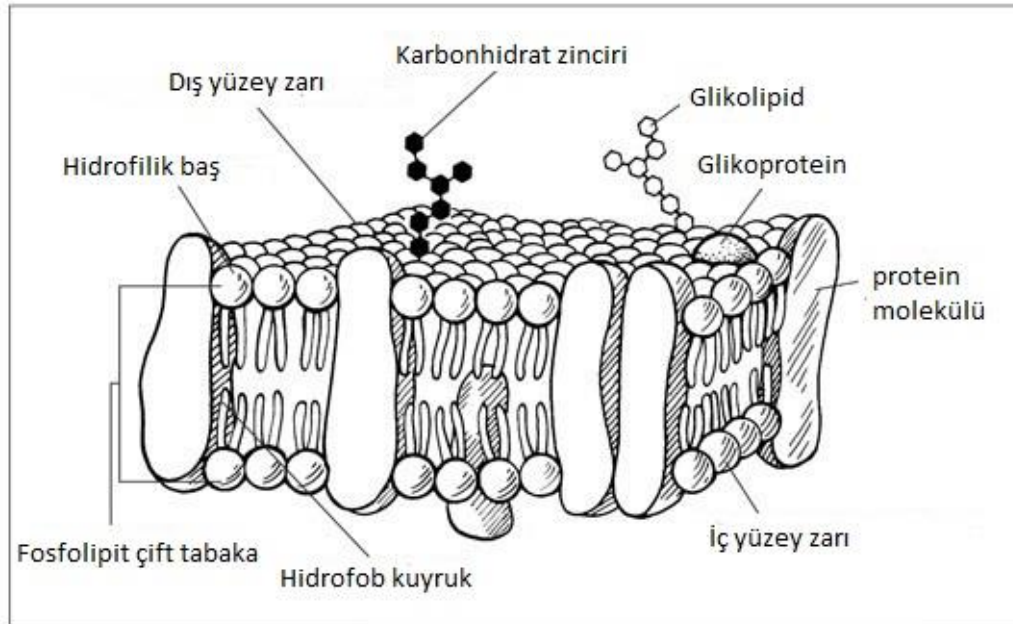


Şekil 2.1: Farklı türde hücre ve hücrenel bileşenlerin göreceli boyutlarını göstermektedir. Karşılaştırma için yetişkin bir insan gösterilmiştir [3].

2.1.2 Hücre (Plazma) Membran

Hücre zarı (veya plazma zarı), 3 nm kalınlığında bir hücrenin koruyucu sınırırır [4]. Hücre zarının yarı geçirgenliği sayesinde hücre içerisine ne alındığı ve hücreden ne verildiği düzenlenmektedir.

Ayrıca, seçici olarak geçirgen olan bu zar, hücreler arasındaki elektriksel ve kimyasal sinyalleri kontrol eder. Lipitler, hücre zarının kütesinin yarısını oluştururken, diğer yarısı proteinlerden, kolesterol ve şekerden (karbonhidratlar) oluşur. Şekil 2.2'de hücre zarının yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Hücre Membranının Yapısı [5].

Membranın lipit tabakası, fosfolipid moleküllerinin kendiliğinden birleşmesi ile oluşmaktadır. Bu lipitler, suda çözünür bir hidrofilik fosfat başı ve lipit içinde çözünür bir hidrofobik yağ asidi kuyruğu içerir. Hidrofobik kuyruklar, hücre içi ve hücre dışı sıvılarda yer alan su molekülleri tarafından itilmekte olup hidrofilik kafalar ise hücre içi ve hücre dışı sıvılarla temas halinde olarak iki tabakalı zarın iç kısmında bulunurlar [6]. Lipit tabakasının yüksek hidrofobik ortamı, yağda çözünen moleküllerin hücreye girmesini kolaylaştırır. Hücre zarındaki proteinler ise hücrenin kimyasını oluşturur ve kimyasal mesajların hücreye transferini sağlar.

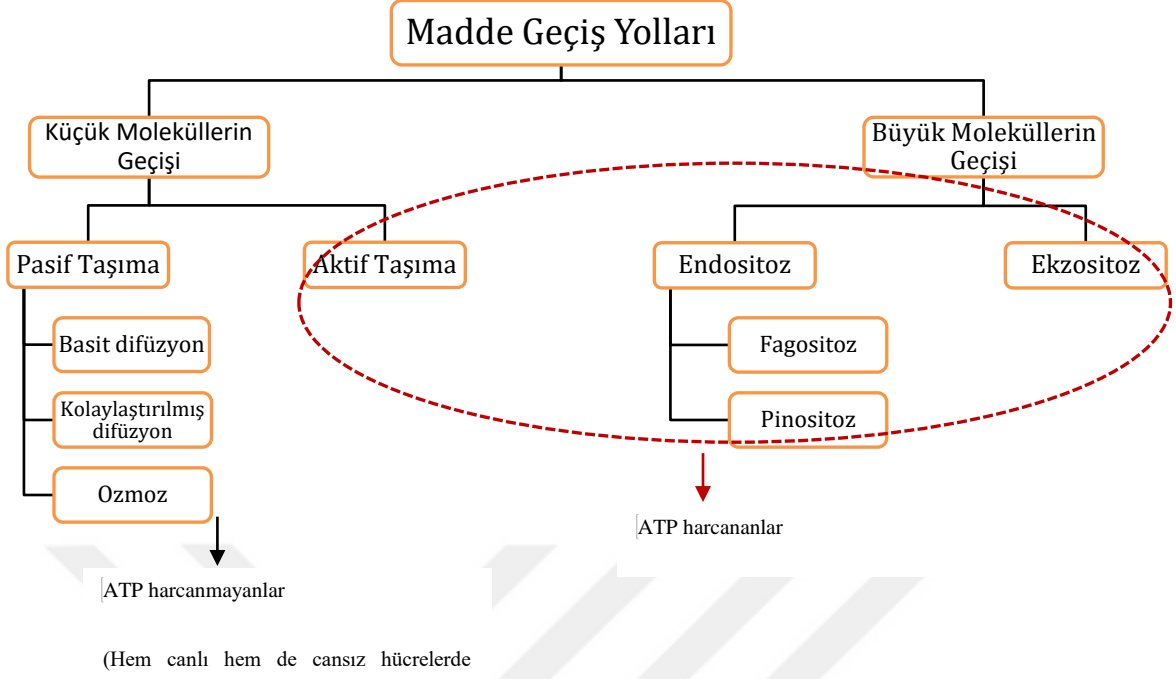
Diğer yandan, spesifik proteinler zar üzerinde gözenekler oluşturur ve bu şekilde iyonlar, glukoz, amino asitler ve üre gibi suda çözünür moleküller de hücre içerisine geçiş yapabilir [7]. Protein parçaları yoluyla membranın dış yüzeyine bağlanan glikozaminoglikanlar (GAG'ler) olarak adlandırılan şeker zincirleri vardır. Proteoglikanlar (PG'ler) adı verilen protein-karbonhidrat kompleksleri, hücre zarının yük karakteristiğinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Hücre yüzeyindeki en bol PG, hücre zarını negatif yüklü yapan polianyonik heparan sülfat proteoglikanlardır (HSPG) [8]. Bu nedenle, negatif elektrik yüküne sahip herhangi bir bileşik, hücre zarı tarafından elektrostatik olarak itilecektir, pozitif yüklü parçacıklar ise hücre yüzeyi ile etkileşime girebilecektir.

2.1.3 HÜCRE DIŞI MALZEMENİN Hücresel Girişi

2.1.3.1. Endositoz ve Endozomlar

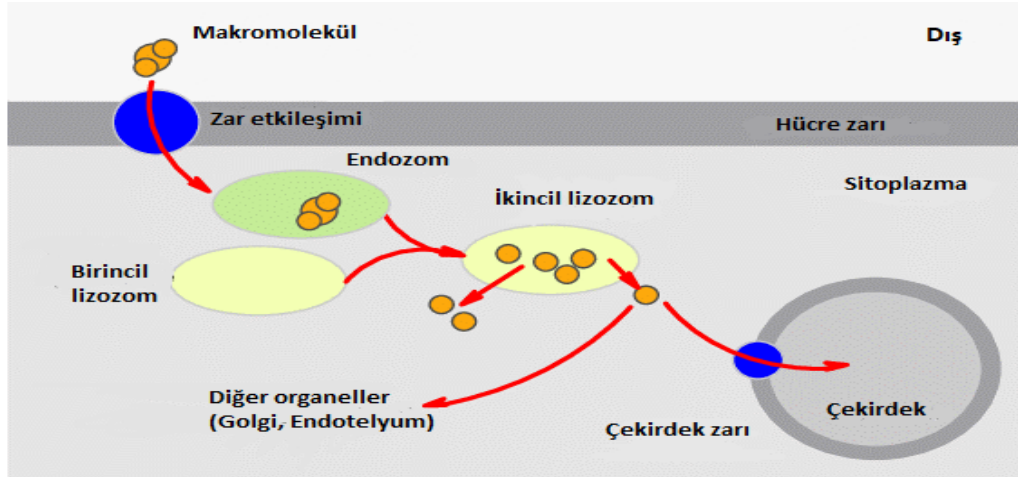
Bir hücre, yaşam fonksiyonlarını yerine getirebilmek için gerekli olan besin maddelerini kullanır. Difüzyon ve aktif taşıma; amino asitler, şekerler ve belirli iyonlar gibi küçük maddelerin hücre zarından geçmek için kullandıkları en yaygın yollardır [9]. Difüzyon, hücre zarının içi ve dışı arasındaki iyon konsantrasyonu farklılığından kaynaklanan bir itici güç olan konsantrasyon gradiyentine göre bir partikülün (atom, iyon veya molekül) basit ve pasif hareketi olarak tanımlanır. Parçacıklar, daha yüksek konsantrasyona sahip oldukları bir bölgeden daha düşük konsantrasyonlu bir bölgeye taşınırlar. Aktif taşıma, bir partikülün konsantrasyon gradiyentine karşı, yani daha düşük konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyona geçişte gereken enerjinin karşılanması gereken bir işlemdir. Bu sebeple özel protein taşıyıcıları tarafından desteklenmektedir.

Bununla birlikte, çok büyük moleküller, difüzyon veya aktif taşıma yoluyla hücre zarından giremezler. Bunun için endositoz adı verilen hücre zarının özel bir işlevini kullanırlar. Endositoz için tarif edilen birkaç yol olmasına karşın ana mekanizma geneli itibari ile aynıdır. Genel olarak, endositotik yollar iki ana kategoriye ayrılabilir: büyük parçacıkların alımı olan fagositoz, akışkan ve çözünenlerin alımını gerektiren pinositozdur. Şekil 2.3'te madde geçiş yolları şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.3: Madde geçiş yolları [10].

Endositoz sırasında; enerji harcanarak hücre zarının içeri doğru genişlemesi ile cepler oluşur. Bu cepler yardımıyla büyük moleküller hücre içine alınır. Plazma zarının iki kısmı birbirini takip ettiğinde, zarın bir kısmı sıkışır ve endozom adı verilen iç zara bağlı bir kese oluşturur. Şekil 2.4'te endositoz mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.4: Endositoz Mekanizması [11].

Kese, hücre zarının yakınında olduğunda endozomal bölmenin pH'ı yaklaşık 6'dır. Endozomal keseler olgunlaştıkları ve bir lizozomal duruma ve daha sonra çekirdeğe yaklaştıkça, endozomun proton pompaları tarafından keseler içine H⁺ iyonu alınarak daha fazla asitleşir (pH-5) [12]. Endositotik taşıma yolunu lizozomal sindirim kısmı takip eder. Lizozomlar, hücre içi ve hücre dışı bileşiklerin sindiriminde uzmanlaşmış hidrolitik enzimler içeren organellerdir.

Lizozom, ökaryotik hücrelerde bulunan tek zarla çevrili, makromoleküllerin parçalanmasını sağlayan hidrolaz enzimlerine sahip membrana bağlı organeldir. Hidrolaz enzimleri hücre ölümü gerçekleştiği zaman hücrenin kendi kendini sindirmesinden yani otolizden de sorumludur. Lizozom enzimleri yaklaşık pH 5'te aktivite gösterir ve pH'nın bu civarda tutulması için sitoplazmadan lizozom içine zarla bulunan proton pompaları lizozom içine H⁺ pompalar.

2.1.4. Nükleik Asitler ve Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Her canlı organizmada veya hücrede iki çeşit nükleik asit vardır: ribonükleik asit (RNA) ve deoksiribonükleik asit (DNA). 1868 yılında İsviçreli bilim adamı Friedrich MIESHER, bu moleküllere çekirdekte bulunan asit anlamına gelen "nükleik asit" adını vermiştir [13]. Nükleik asitler bütün canlılarda bulunan organik moleküllerdir. Sadece virüsler ya DNA ya da RNA içerirler. DNA ve RNA fosforca zengin organik moleküller olup, organizmanın genetik bilgi deposudur. Nükleik asitlerin kimyasal yapısında C (karbon), H (hidrojen), O (oksijen), N (azot) ve P (fosfor) elementleri bulunur. Nükleik asitlerin biyolojik fonksiyonu genetik bilgiyi saklanması, çoğaltılması, çeşitlendirilmesi ve nesilden nesile aktarılması şeklinde sıralanabilir.

Her iki nükleik asit çeşidi de (DNA ve RNA) nükleotid denenen yapı taşlarından (monomerlerden) meydana gelmişlerdir. Bu nedenle nükleik asitlere polinükleotid adı da verilir. Nükleotidler DNA ve RNA'nın yapısına girme özelliklerinin yanında, enerji metabolizmasında, fizyolojik aktivite düzenleyici moleküller olarak görev yaparlar. Bir nükleotid üç kimyasal kısımdan oluşmuştur: inorganik fosfat, beş karbonlu bir şeker (riboz veya deoksiriboz) ve azot içeren bazlar (adenin, timin, guanin, sitozin). Genetik bilgi bu azot içeren bazlar yardımıyla kodlanır. DNA'da yer alan bilginin RNA'ya kopyalanmasına

transkripsiyon denir. Transkripsiyonda; DNA'yı oluşturan nükleotit dizisi, RNA olarak kopyalanır [13].

2.2. GEN TRANSFERİ

Gen tedavileri, genetik bozukluklardan, enfeksiyonlardan ve kanserden kaynaklanan hastalıkların tedavisi için son zamanlarda oldukça büyük ilgi görmektedir.

Avrupa İlaç Ajansı (EMA), bir gen terapisi tıbbi ürününün, aşağıdaki iki özelliği karşılayan biyolojik bir tıbbi ürün olduğunu tanımlamıştır. Bu özellikler sırasıyla;

(1) Bir genetik dizinin düzenlenmesi, onarılması, değiştirilmesi, eklenmesi veya silinmesi amacıyla insanlarda kullanılan veya uygulanan bir rekombinant nükleik asit içeren veya bunlardan oluşan bir aktif madde içermesi.

(2) Terapötik, profilaktik(viral enfeksiyonlara karşı koruyan araç) veya tanısal etki, içerdiği rekombinant nükleik asit dizisine veya bu dizinin genetik ekspresyon ürünüyle doğrudan ilişkili olması [14].

Genel olarak gen terapisi, germ çizgi gen terapi ve somatik gen terapisi olarak iki kategoriye ayrılır. Bu iki yaklaşım arasındaki fark, somatik gen terapisinde bazı hedef hücrelere genetik materyalin eklenmesidir, ancak değişim sonraki jenerasyona geçmez. Germ çizgisi gen terapidde terapötik veya modifiye gen, gelecek nesile aktarılabilir. Bu fark önem taşımaktadır, çünkü mevcut yasalar sadece somatik hücrelerde gen terapisine izin vermektedir [15].

Gen terapi için ana hedef, hedef hücreye bir terapötik gen ulaştırarak, çeşitli hastalık biçimlerini genetik bir kaynaktan tedavi etmektir. Çeşitli yöntemlere veya gen terapi türlerine rağmen terapi, hastalığın nedeninden sorumlu olan mutant genin tanımlanmasıyla başlar. Bir sonraki adım, aynı sağlıklı geni klonlamaktır. Buna terapötik gen veya transgen denir. Terapötik gen, örneğin güçlendirmek veya onarmak için ihtiyaca göre uyarlanır. Terapötik gen üretildikten sonra vektör adı verilen bir araca yüklenir. Vektörün işlevi, terapötik geni hedef hücreye iletmektir. Vektör, hedef hücreye ulaştıktan sonra, genetik materyali çekirdeğe iletir. Çekirdekte genetik materyal DNA'ya entegre olur ve kusurlu veya mutasyona uğramış geni düzeltir. Gen terapiyi gerçekleştirmenin en kritik adımı, vektörleri seçmektir.

Vektörler, genetik materyali çok çeşitli hücelere, dokulara ve tüm organlara taşıyan araçlardır. Gen terapide sıralı anahtar adımlar Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5: Gen terapisinde anahtar basamakların şematik gösterimi [16].

2.2.1. Gen Transferi Tarihi Gelişimi

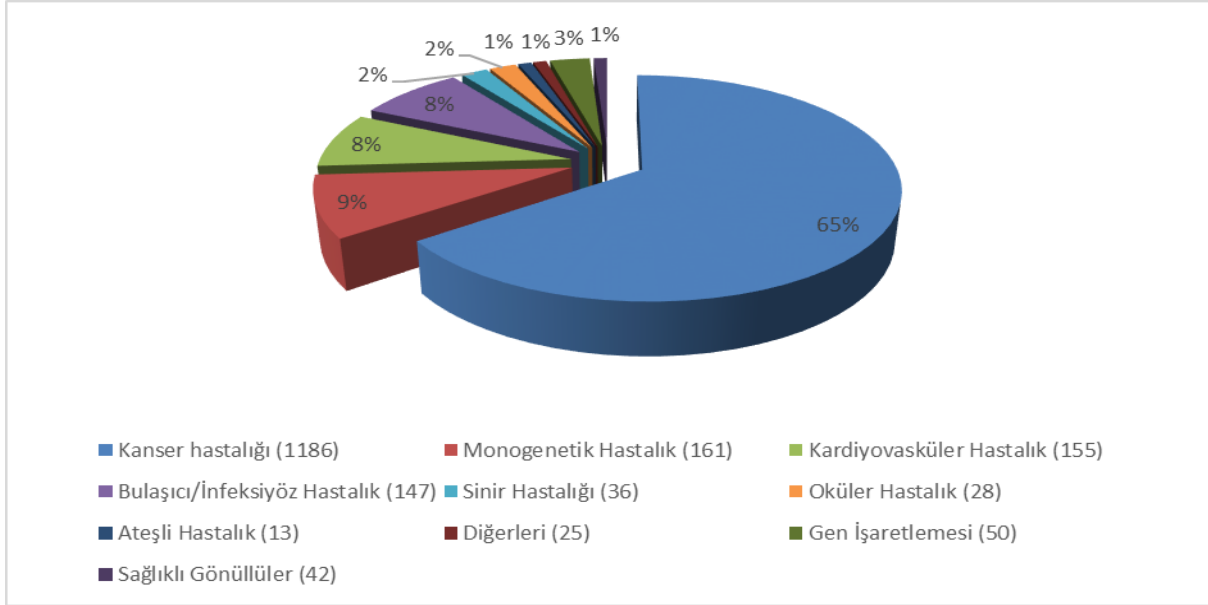
İnsan gen terapi kavramları, 1970'lerin başında, moleküler genetik ve hücre biyolojisinin büyümesinin yanı sıra rekombinant DNA teknolojisinin keşfi sonucu ortaya çıkmıştır. İnsan gen terapi sürecinde kayda değer başarılar elde edilmiştir ve son yıllarda tıpta en önemli itici güçlerden biridir [17].

Gen terapide onaylanan ilk klinik denemeleri 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilmiştir. Dr. W. French Anderson, Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü'nde çalışırken bu önemli klinik denemeyi geliştirmeye yardımcı olmuştur. Adenosin deaminaz (ADA) eksikliği, enfeksiyona karşı savunmasız kalmasını sağlayan, genetik bir hastalığı olan dört yaşındaki bir kız, ilk hastası olmuştur. Beyaz kan hücreleri alınıp, adenosin deaminaz yapmak için normal genler bu hücelere yerleştirilmiştir. Hastalık tam tedavi edilememesine rağmen kontrol altına alınabilmiştir [18]. Gen terapi ile ilgili ilk düşüncelerden yaklaşık on yıl sonra, 175'den fazla klinik çalışma yapılmıştır ve 2000'e yakın hasta daha tedavi edilmiştir [19].

2.2.2. Gen Terapinin Güncel Pozisyonu

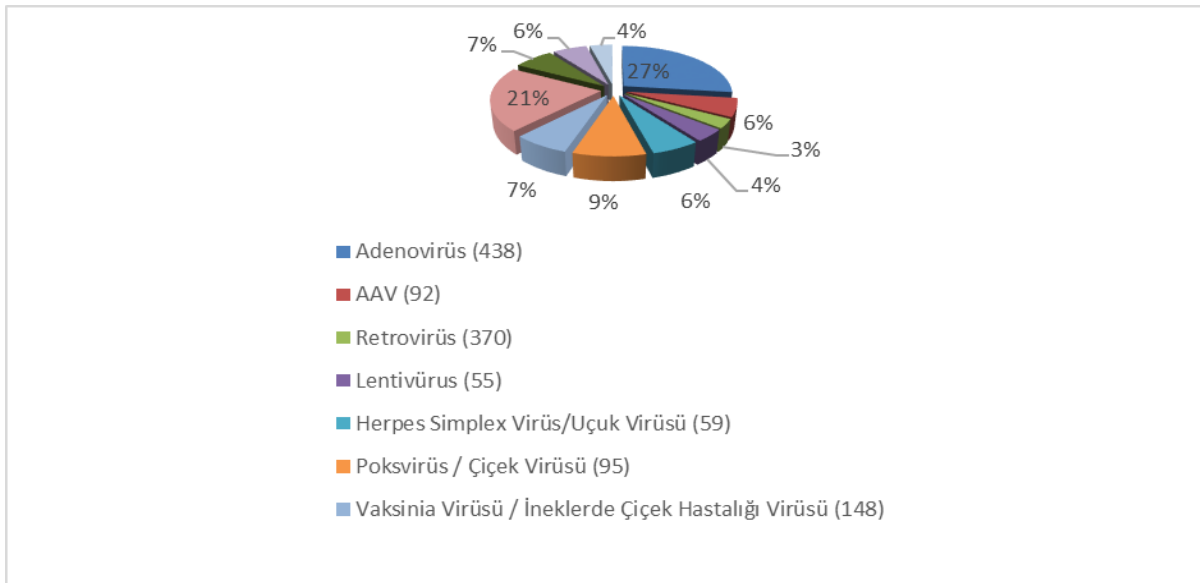
Bugüne kadar kanser, gen terapi ile tedavi edilmeye çalışılan en yaygın hastalıktır. Şekil 2.6'da görüldüğü gibi kanser, tüm dünyada devam etmekte olan klinik gen tedavisi

çalışmalarının % 60'ından fazlasını oluşturmaktadır, bunu monogenetik ve kardiyovasküler hastalıklar takip etmektedir.



Şekil 2.6: Klinik çalışmalarda gen tedavisi ile ele alınan farklı bulguların grafiksel sunumu [20].

Şu anda dünya çapında 1800'den fazla onaylanmış gen terapi klinik denemesi yürütülmüştür ve halen devam etmektedir. Şekil 2.7'de görüldüğü gibi adenoviral vektörler, retroviral vektörler, klinik çalışmalarda en sık kullanılan gen transfer vektörleri olmuştur.



Şekil 2.7: Klinik çalışmalarda en sık kullanılan gen transferi vektörleri [20].

2.3 GEN TRANSFERİ YÖNTEMLERİ

Gen transferi, moleküler tıp alanındaki en yenilikçi tedavi yöntemidir. Gen transferinin verimliliğini ve stabilitesini arttırmak için, sayısız laboratuvar denemesi yapılarak viral ve viral olmayan vektörler değerlendirilmektedir.

2.3.1 Viral vektörler

Virüsler, spesifik hücre tiplerine nükleik asit verilmesinde yüksek verimli özelliktedirler. Gen aktarımı ve ekspresyonunun etkinliği korunurken adenovirüs gibi bir viral vektörün patojenitesinin ortadan kaldırılması gerekir. Bu patojenite ortadan kaldırılmadığı sürece viral vektörlerin kullanımı toksisite açısından güvenli görülmemektedir. Ek olarak virüsler, verilen genetik materyalin boyutu açısından sınırlı yükleme kapasitesine sahiptir ve hücre zarından zor geçmektedirler. Bu dezavantajlar göz önüne alındığında araştırmacılar daha az toksik etki gösteren ve üretim maliyetleri viral vektörlere oranla daha düşük olan viral olmayan vektörlere yönelmişlerdir. Aşağıda bazı viral vektörlerin özellikleri verilmiştir [21].

2.3.1.1 Reto-viral Vektörler

Retroviral vektörler, gen terapi işlemlerinde en sık kullanılan gen transfer vektörlerinden biridir. Retrovirüsler, adenoviral ve lentiviral vektörlerin aksine, transfeksiyonda daha etkindirler. Bu vektörlerin dezavantajları ise, DNA ile rastgele birleşme eğiliminde olmaları, ve hedeflendirilmelerinin oldukça zor olmasıdır.

2.3.1.2 Adenoviral Vektörler

Adenoviral vektörler çok sayıda farklı türden izole edilmiştir ve 100'den fazla farklı çeşidi bulunmaktadır. Adenovirüsler hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere geni transfer etmek için kullanılabilir. Adenovirüsler, büyük DNA parçacıkları (38 kb'ye kadar) dağıtabilmektedirler, ancak retrovirüslerin aksine, konakçı genoma entegre olmayacakları için gen ekspresyonu çok kısa sürelidir. Adenovirüslere karşı doğal ve akut immünolojik yanıtlar, klinik uygulamalarını karaciğer, akciğer (özellikle KF (Kistik Fibrozis) tedavisi için) veya lokalize kanser gen tedavisi gibi birkaç doku ile sınırlı hale getirmiştir. Adenoviral vektörler kullanılarak gerçekleştirilen gen tedavisi ciddi yan etkilere ve hatta bazı hastaların ölümüne neden olmuştur [22].

2.3.1.3 Adeno İlişkili Vektörler

Adeno ilişkili vektörler (AVV) tek zincirli DNA virüsleridir. Gen terapide kullanılan kusurlu vektörlerde uzaklaştırılan Rep ve Cap adı verilen iki viral protein kodlarlar. Adenovirüslere benzer şekilde, AAV'ler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilir. Bununla birlikte, DNA'ları, retrovirüslere benzer şekilde konak hücre genomuna entegre olur. Adeno ilişkili vektörlerin sistemdeki ana dezavantajı, AAV üretimi için yardımcı virüslere (adenovirüsler veya HSV) ihtiyaç duyulmasıdır. Bu zorluklara ek bu vektörlerin kapasitesi çok sınırlıdır (5 kb'den az DNA) [23].

2.3.1.4 Poxvirus (Aşı Virüsü)

Poxvirus virüsleri dünya genelinde çiçek virüsünü yok eden aşılar olarak kullanılmıştır. Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilen çift sarmallı DNA virüsleridir. Bu virüsler, 25 kb'ye kadar transgenik diziyi (yaklaşık 186 kb) barındırabilirler [24].

2.3.2 Viral Olmayan Gen Taşıma Sistemleri

Viral olmayan vektörler, yukarıda bahsedilen viral vektörlerin dezavantajları nedeniyle alternatif gen taşıma sistemleri olarak geliştirilmiştir. Viral olmayan sistemler genellikle katyoniktir. Elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü DNA ile etkileşime girerler. Bu durum, taşıyıcıya, negatif yüklü hücre membranları ile verimli bir şekilde etkileşime girmesini ve esas olarak endositoz yolu boyunca meydana gelen hücreye içselleşmesini sağlayacak avantajı sağlar [25].

Transfeksiyon yapan konakçı hücrelerin etkinliği, viral olmayan yöntemlere kıyasla viral vektörlerde nispeten yüksektir. Viral vektörleri kullanmanın temel sakıncaları, immünojenikliği ve sitotoksitesidir. Viral olmayan vektörleri kullanmanın en büyük avantajı biyoyumlu olmalarıdır. Viral olmayan vektörler, daha az immünotoksitesinden dolayı dikkat çekmiştir. Bu vektörlerin klinik çalışmalarda kullanımı 2004'ten günümüze kadar yükselirken viral vektörlerin kullanımı önemli ölçüde azalmıştır. Verimlilik, özgüllük, gen ekspresyon süresi ve güvenlikte kaydedilen ilerlemeler, klinik deneylerde viral olmayan vektörlerin kullanımının artmasına neden olmuştur. En yaygın şekilde kullanılan viral olmayan dağıtım sistemleri, aşağıda tarif edilecektir.

2.3.2.1 Polimer Esaslı Vektörler

Doğal polimerler

Gen transferinde en çok kullanılan doğal polimerler, kitosan, aljinat, jelatindir.

Kitosan: Katyonik polisakkarit bazlı doğal bir polimerdir ve en çok çalışılan viral olmayan vektörlerden biridir. Yüksek konsantrasyonlarda toksik değildir. Kitosanın pozitif yükü, elektrostatik olarak negatif yüklü DNA ile bağlanır. Birincil amin grubu içerir ve pKa değeri 6.2'dir. Bu nedenle asidik ortamlarda (örn: asetik asit, glutamik asit, aspartik asit, sitrik asit, laktik asit, hidroklorik asit) kolayca çözünür. Yapısal olarak, farklı ilaç taşıma uygulamaları için kolayca kimyasal olarak modifiye edilen amin ve hidroksil grupları gibi önemli fonksiyonel gruplar içerir. Gen transferinde kullanımını üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Jelatin: Hayvan kollajeninin asit veya alkalinin kısmi hidrolizinden elde edilen (denatüre) bir proteindir. Aynı zamanda klinik olarak stabilizatör olarak kullanılır. Çeşitli aşılarda bir plazma arttırıcı olarak kullanımını mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ilaç taşıma uygulamalarında jelatin bazlı nanopartiküller (GNP) üzerine odaklanılmaktadır. DNA, vektör yüzeyinin belirli fonksiyonel gruplarla modifiye edilmesi ile veya elektrostatik çekim ile GNP'lere yüklenebilir [26].

Poli (L-lisin) (PLL): Poli(L-lisin), gen transferi için kullanılan ilk katyonik polimerlerden biridir. PLL'ler tekrar birimi olarak yapısında amino asit lisini barındırır ve lineer polipeptitlerdir. Böylece biyolojik olarak parçalanabilir bir yapıya sahiptirler. Bu özellik, in vivo uygulamalar için çok kullanışlıdır. Bununla birlikte, PLL polipleksleri, plazma proteinlerine hızla bağlanır ve dolaşımdan temizlenir.

Aslında, PLL tek başına veya modifikasyon olmaksızın uygulandığında zayıf transfeksiyon yeteneğine sahiptir. Bu vektörlerin hem transfeksiyon yeteneğini arttırmak için polietilen glikol ile modifiye edilmiştir.

Sentetik polimerler

Katyonik polimerler, polipleks adı verilen kompleksleri oluşturmak için DNA ile birleştirilmektedir. Polipleksler, lipoplekslerden daha karardır ve hücre dışı ortamda kolaylıkla bozunmazlar

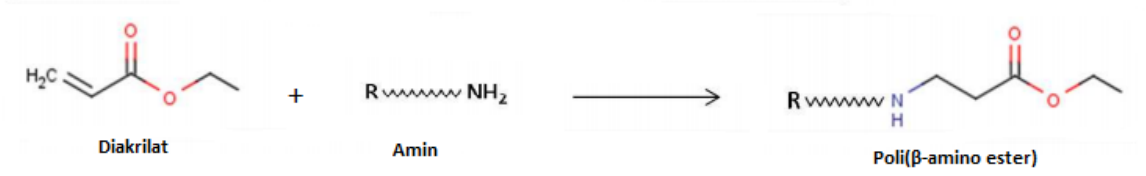
Sentetik polimerlerin bazıları; poli [2-(dimetilamino) etil metakrilat] (PDMAEMA), poli[2-(dimetilamino) etil akrilat (PDMAEA) ve poli(N-vinil piroolidon) dur. Bu polimerler

polietilenimin (PEI) gibi yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olsa bile, kandaki düşük stabiliteleri, kan serumundaki komponentler ile yüksek etkileşim özelliği nedeniyle polietilen glikol ve poli [N- (2-hidroksipro-pilmetakrilamid)] (PHPMA) ile modifiye edilerek kullanılırlar.

PEI: Katyonik polimerler, endozomal pH'ın düşmesini engelleyen proton sünger etkisi sergileyen yüksek yoğunluklu amin gruplarına sahiptir. PEI, *in vivo* ve *in vitro* gen transferi için en önemli standart olarak kabul edilir. Ancak toksik etkisi yüksektir ve bu nedenle araştırmacılar PBAE'lere yönelmiştir.

PBAE: Bu bileşikler son zamanlarda biyoyumlulukları, biyobozunurlukları nedeniyle son derece büyük ilgi çekmiş ve antikanser ilaçları, antimikrobiyal uygulamalar, gen transferi ve doku onarımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerde dikkat çeken en önemli polimer gruplarından biri olan PBAE'lerde bulunan amin grupları, kompleks oluşturmak için negatif yüklü gen veya terapötikler ile elektrostatik olarak etkileşime girebilir. PBAE'ler, mükemmel fiziksel-kimyasal ve mekanik özellikleri nedeniyle, çok yönlü formülasyonlarda son zamanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinde, yaraların kapanması ve cerrahi implantlar için PBAE'ler oldukça ilgi çekmektedir.

PBAE sentezi Michael katılma reaksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi bir primer amin (örneğin; 3-amino-1-propanol, 4-amino-1-butanol, 5-amino-1-pentanol) veya bir bis sekonder amin bileşiğinin (örneğin; pentan-1,3-diamin, 2-metilpentan-1,5-diamin) bir diakrilat bileşiği (örneğin; 1,3-butandiol diakrilat, 1,5-pentandiol diakrilat) ile polikondenzasyon reaksiyonu sonucu PBAE elde edilmektedir. PBAE'ler modifikasyon için farklı kimyasal bileşiklerle uyumludur ve poliester yapısında olduğu için hidrolizle parçalanabilen ester bağlarını içermesi nedeniyle sitotoksitesinin azaldığı belirtilmiştir [27].



Şekil 2.8: PBAE Sentezi [28].

PBAE'ler yapılarında tekrarlanan birimlerde negatif yüklü DNA ile etkin bir şekilde etkileşime girmelerine olanak sağlayan pozitif yüklü olabilen çoklu amin grupları içerirler [29]. Biyogüvenlik konusunda başarılı olmaları, yüksek transfeksiyon verimi göstermeleri ve sentezlerinin kolay olması gibi üstün özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sentetik polimer esaslı taşıma sistemleri olarak tercih edilmektedir.

Biyomühendislik alanında PBAE'lerin kullanım formları;

Nanopartikül: Tipik olarak, katyonik PBAE'ler, nanopartikül oluşturmak için gen ve proteinler gibi terapötik anyonik makromoleküllere elektrostatik olarak bağlanabilir. Nanopartiküllerin oluşumu, herhangi bir kimyasal modifikasyon olmadan, polimer zincirleri üzerindeki karşıt yükler ve biyomakromoleküller arasındaki elektrostatik etkileşimler tarafından gerçekleştirilir.

Misel: Polimerik misel, blok kopolimerlerin oluşturduğu çekirdek-kabuk yapısını temsil eder. Prensipte olarak, hidrofobik PBAE bloklarına, amfifilik blok kopolimerler özelliği kazandırmak için hidrofilik bloklar (özellikle poli(etilen glikol) (PEG), ile aşılır. Yöntemlerin gelişmesiyle araştırmacılar, PBAE blokları içeren çok yönlü blok kopolimerleri tasarlayabilmekte, üretebilmekte ve bunları çeşitli uygulamalarda kullanabilmektedirler.

Jel: PBAE'lerden oluşan jel yapıları, hidrojeller ve nanojellerdir. Temelde morfolojileri ve uygulama alanları ile ayırt edilir. PBAE'lerin ilaç salımından, doku mühendisliğine kadar geniş bir uygulama alanına vardır. Ayrıca, jeller hidrofobik / hidrofilik ilaçlar ve proteinler için çok yönlü taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir. PBAE jellerinin bu özellikleri biyomedikal alanlarda geniş bir uygulama alanına sahip olmasını sağlar.

2.4 VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARDA GEN TRANSFERİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

2.4.1 Nanopartikül Boyutu

Nanoteknoloji, mühendislik ve kimyanın geliştirdiği hibrid bir bilim dalıdır. Günümüzde nano boyut kavramı malzemenin 1-1000 nm büyüklüğüne sahip olması anlamına gelmektedir. Nano boyutta malzemelerin özellikleri makroskopik boyuttan oldukça farklı olabilmektedir. Nanoteknoloji kullanım alanlarına endüstriyel olarak örnekler; nano boyutlu kaplamalar, seramik, mürekkep üretimi, mühendislik, uzay, çevre ve bilgisayar teknolojileri, ilaç salım sistemleri verilebilir. Nanoteknolojideki son gelişmeler, tıp da dahil olmak üzere birçok alanda önemini göstermiştir.

Nanoteknolojinin başlıca ilgi alanlarından biri biyolojik olarak bozunabilen ve biyouyumlu nanopartiküller ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi olmuştur. Gen terapide ise nanoteknoloji uygulamaları en fazla 200 nm boyuta sahip olan partiküllerin kullanılması ile gerçekleşmektedir. Bu sınırın belirlenmesinde, hücreler arası boşluklar ve difüzyon hızı gibi hücrel faktörlerin önemi büyüktür [30].

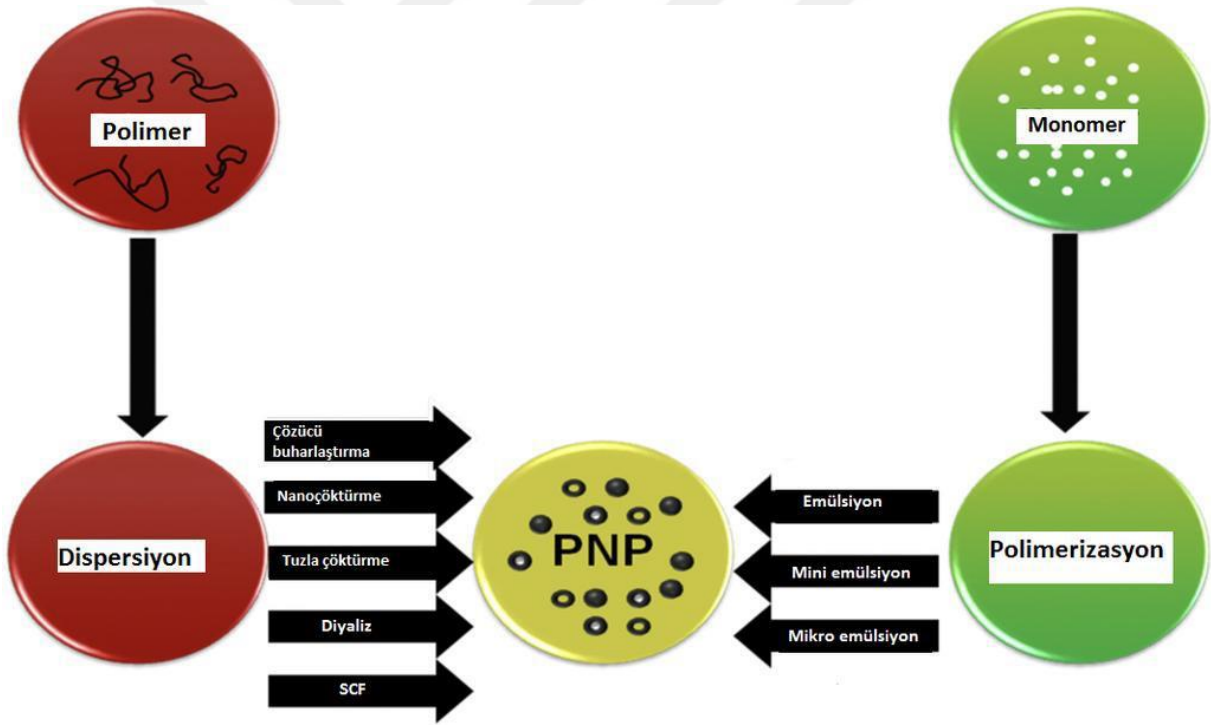
2.4.1.1 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartiküller sıklıkla 10-1000 nm aralığında katı, stabil kolloidal partiküller olarak tanımlanır. Polimer nanopartikül (PNP) terimi, herhangi bir polimer nanoparçacık türü için verilen, ancak spesifik olarak nanokürecikler ve nanokapsüller için verilen ortak bir terimdir. Nanokürecikler matris parçacıklarıdır, yani kütesinin tamamı katı olan molekülleri küre yüzeyinde adsorbe edilebilir veya parçacık içinde kapsüllenebilir ve genel olarak, bunlar küresellerdir. Nanokapsüller, tutulan maddelerin katı bir madde kabuğu ile çevrili bir sıvı çekirdeğe (yağ veya su) sahip, rezervuar görevi gören veziküler sistemlerdir. PNP'lerin şematik bir gösterimi Şekil 2.9'da gösterilmektedir.



Şekil 2.9: a) Polimer nanopartikül nanokürecikler b) yağ, c) su içeren nanokapsüller [31].

Polimerik nanopartiküller, misel polimerizasyonu, emülsiyon-difüzyon, emülsiyon-koaservasyon, nanoçöktürme, yüzeylearası polimerizasyon, çoklu emülsiyon, iyonotropik jelleşme, püskürterek kurutma (spray-drying) gibi yöntemler kullanılarak hazırlanabilir. PNP için farklı hazırlama tekniklerinin gösterimi Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10: PNP için farklı hazırlama tekniklerinin gösterimi [31].

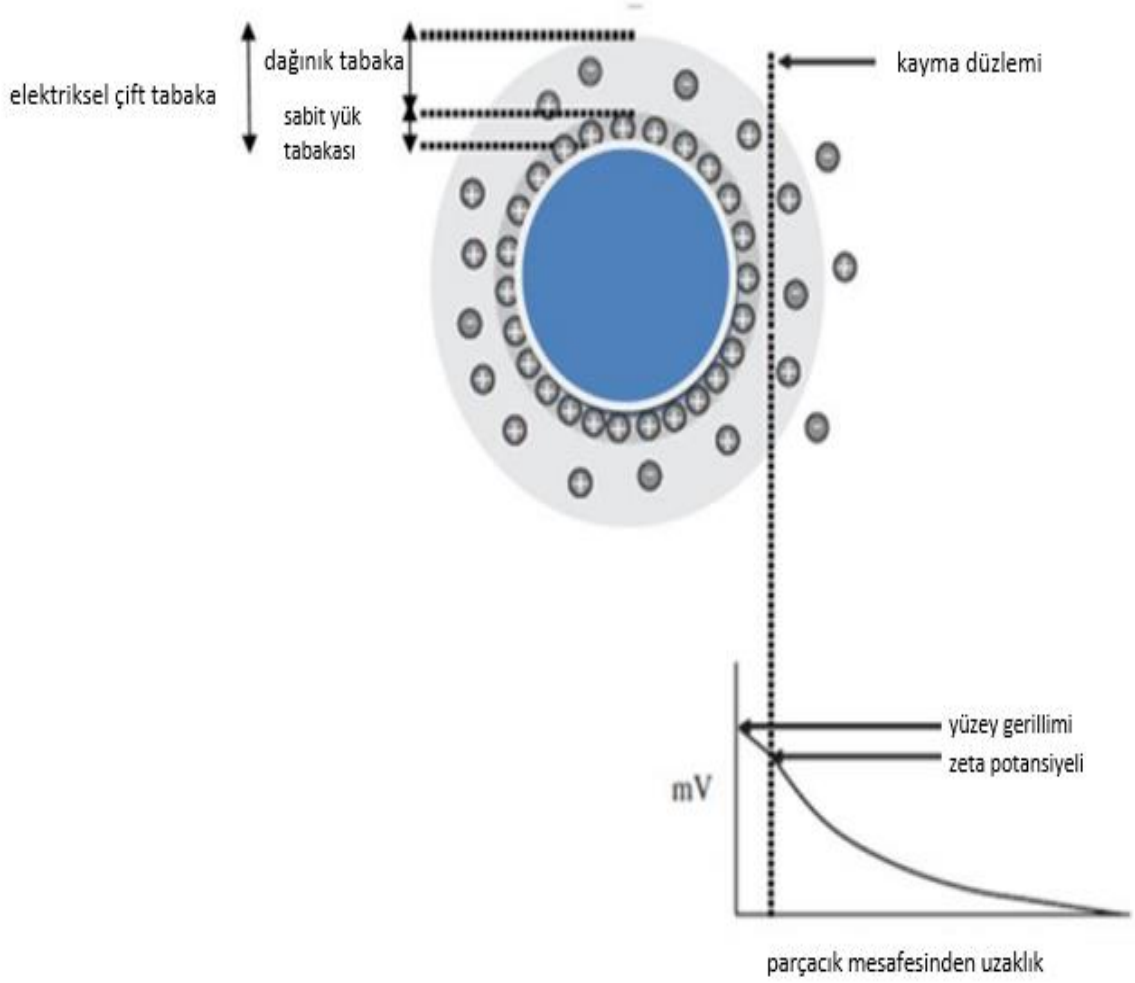
Tez kapsamında yapılan çalışmalarda nanopartiküller, PBAE esaslı ürünlerden nanoçöktürme metodu kullanılarak hazırlandı. Nanoçöktürme yöntemi, Fessi ve arkadaşları tarafından PNP'nin hazırlanması için geliştirilmiştir. Aynı zamanda çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da adlandırılır [32].

Nanoçöktürme yönteminde sistem, üç temel bileşenden (polimer, çözücü ve su) oluşur. Ek olarak, çözücü olmayan faz, yüzey aktif madde ile desteklenebilir. Yöntem organik faz ve su fazı arasında gerçekleşir. Organik fazı, polimerin kendisine uygun çözücüsü oluşturur. Su fazını ise su veya sulu çözeltiler oluşturmaktadır. Bu teknikte özellikle polikaprolakton (PCL), poli(laktid) (PLA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli(alkilsiyano akrilat) (PACA) ve PBAE gibi sentetik biyobozunabilir polyesterler kullanılmaktadır. Bu teknikte partikül oluşumunu etkileyen en önemli parametreler ise; organik fazı damlatma hızı ve oranı, sulu fazı karıştırma hızı, organik faz katılma metodu ve organik faz/sulu faz oranıdır [33].

2.4.2 Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli (ζ) mV, kolloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyelin kısaltmasıdır. Teorik bir bakış açısından, zeta potansiyeli, dağınık bir partikül veya damlacığın ara yüz çift katmanındaki elektrik potansiyeldir ve sürekli fazdaki ara yüzden uzak bir noktaya kadardır. Başka bir deyişle, zeta potansiyeli, hareketli dispersiyon ortamı ile dağılmış partiküle bağlı dispersiyon ortamının sabit tabakası arasındaki potansiyel farkıdır.

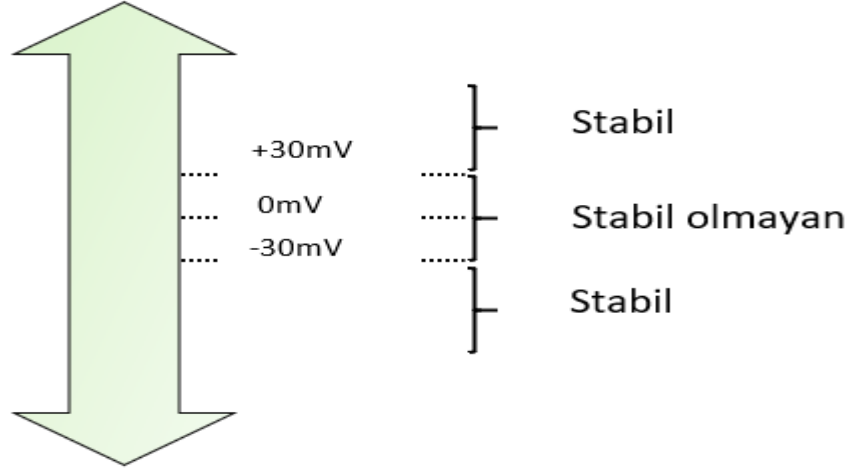
Zeta potansiyelini etkileyen en önemli faktör ortamın pH'dır. Diğer faktörler ise iyonik kuvvet, konsantrasyon ve sıcaklıktır. Zeta potansiyelinin önemi, oluşan sistemin stabiliteyi hakkında oldukça bilgi veriyor olmasıdır. Şekil 2.11'de partikül yüzeyinde bulunan tabakalar gösterilmiştir.



Şekil 2.11: Bir partikülün çözelti içerisinde oluşan yüzey yükü tabakaları [34].

Yüksek zeta potansiyeli olan (negatif veya pozitif) sistemler elektriksel olarak stabilize halde iken, düşük zeta potansiyeli olan ise agregasyona uğrama eğilimindedir. Şekil 2.12’de görüldüğü gibi partiküllerin zeta değerleri -30 mV’un altı ve $+30$ mV’un üstü olduğunda partiküller kararlı kabul edilir. Zeta potansiyelinin pozitif olması sistemdeki nanopartiküllerin pozitif yük yoğunluğunun yeterli düzeyde olduğunu gösterir dolayısıyla negatif yüklü bileşiklerle örneğin DNA molekülü ile bağlanarak kompleks oluşturmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Pozitif Zeta Potansiyeli



Negatif Zeta Potansiyeli

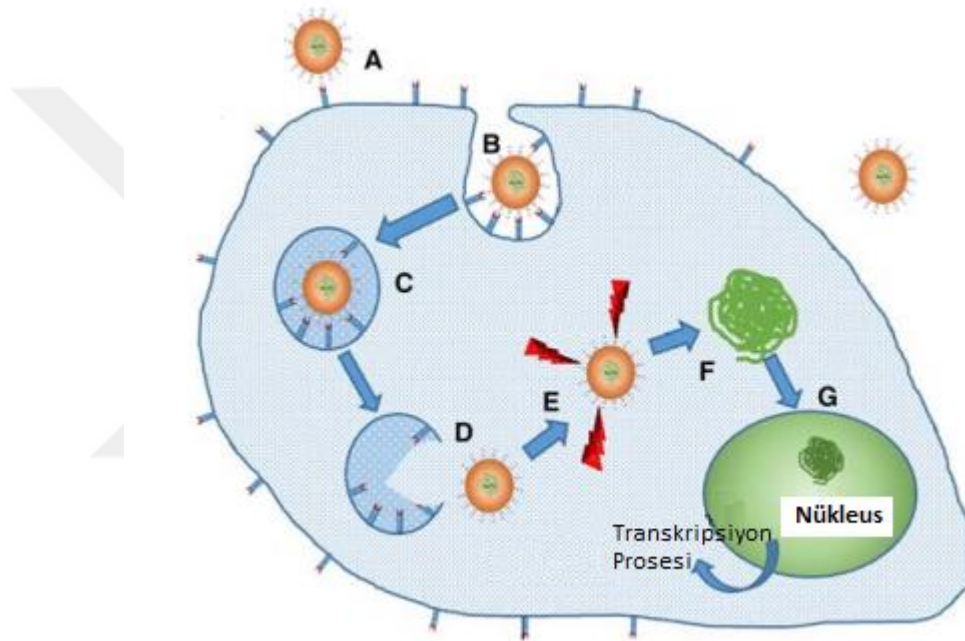
Şekil 2.12: Kolloidal sistemlerin kararlılığını ifade eden pH değerlerine karşılık zeta potansiyeli [34].

2.5. VİRAL OLMAYAN POLİMERİK TAŞIYICILARDA GEN TRANSFERİ

Viral olmayan polimer esaslı nanopartikül formülasyonları kullanılarak gerçekleştirilen gen transferi işleminde bulunması gereken adımlar aşağıda Şekil 2.13’de gösterilmiştir:

- (A) Nanopartiküllerin hücre zarının spesifik bölgesine (hedeflenen grubun reseptöre) bağlanması
- (B) Nanopartiküllerin hücreye endositoz yoluyla girmesi,

- (C) Endozom oluşumu,
- (D) Endo-lizozomal kaçış,
- (E) Gen-nanoparçacık ayrışması,
- (F) Gen salımı,
- (G) Sitoplazma boyunca ilerleme, çekirdeğe geçiş ve gen entegrasyonu



Şekil 2.13: Gen Transferi Aşamaları [35].

2.5.1. Gen Paketleme

Gen paketleme, DNA'nın hücreye aktarılmadan önce verimli bir şekilde vektöre yüklenmesidir ve başarılı transfeksiyon için önemli bir adımdır. Polimerlerin, DNA'ya bağlanması, enzimatik bozunmayı önlemesi ve hücre içine giriş yapabilmesi için DNA-bağlama özelliklerine sahip olmaları gerekir. Gen paketleme işlemi polimerik yapıların katyonik grupları ile DNA yapısı içerisinde yer alan anyonik yük yoğunluğuna sahip fosfat grupları arasında meydana gelen elektrostatik etkileşimler ile gerçekleşmektedir [36].

Protonasyon, katyonik polimerlerin net pozitif yükünü arttırmanın yaygın bir yöntemidir [37]. Katyonik polimerlerde, daha yüksek yük yoğunluğu, polimerin DNA'ya daha güçlü şekilde

bağlanmasını sağlar fakat güçlü bağlanma daha iyi transfeksiyon anlamına gelmez ve sitoplazmada DNA'nın açılmasını ve salımını önleyerek transfeksiyonu engelleyebilir [38].

2.5.1.1. Elektrostatik Etkileşim

Bugüne kadar geliştirilen polimerik vektörlerin çoğu, elektrostatik etkileşimle kompleksleşmeyi sağlamak için DNA'nın anyonik yapısından faydalanmıştır. Bu polimerlere örnek olarak PLL, PEI, kitosan ve PBAE gösterilebilir. Bahsi geçen polimerler DNA ile amino grupları sayesinde yeterli pozitif yük yoğunluğuna sahip olmaları durumunda kendiliğinden etkileşime girebilir. Polimerin DNA'yı çekirdek bozunmasından koruyarak hücrenin içine transferi; taşıyıcı ile arasındaki azot:fosfat (N:P) yük dengesinin kurulmasına bağlıdır.

2.5.1.2 Enkapsülasyon

DNA'nın elektrostatik olarak yoğunlaşmasına bir alternatif olarak biyolojik olarak parçalanabilen küresel yapılar içinde kapsüle edilmesidir. Enkapsülasyon işlemi kullanılan biyobozunur polimerlere örnek olarak poli (2-dimetilaminoetil metakrilat) (PDMAEMA), lineer polietilenimin (L-PEI), PLL verilebilir. Yapısında ester bağları bulunduran polimerlerin biyolojik olarak parçalanmaları daha kolaydır ve vücuttan daha kolay atılırlar. Polimerin ester bağları taşımasının diğer avantajları ise taşıdıkları genin enzimatik reaksiyonlarla bozunmasını engelleyebilmesidir. Bahsedilen avantajların yanı sıra bu yöntemde, polimerin organik çözücülerle maumele edilmesi, enkapsülasyon verimliğinin düşük olması gibi bazı kısıtlamalar mevcuttur.

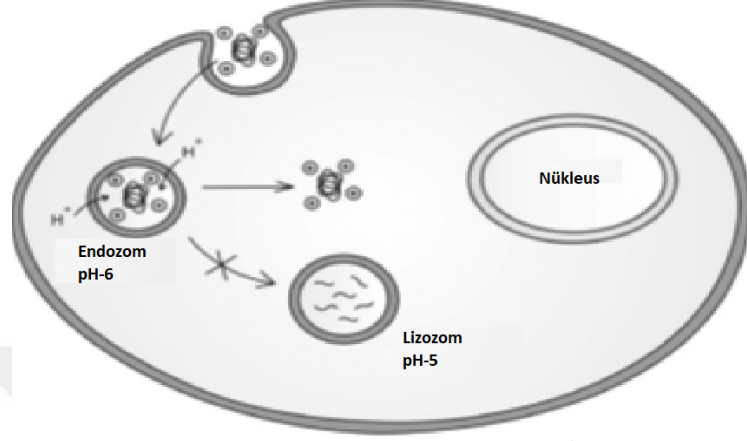
2.5.1.3. Adsorbsiyon

Yukarıda bahsedilen iki yöntemin sahip olduğu kısıtlamalar sebebiyle alternatif bir DNA paketleme yöntemi olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde elektrostatik etkileşim ve enkapsülasyon bir aradadır. DNA'nın adsorbe edilmesi, elektrostatik etkileşimle bağlanabildiği taşıyıcı yüzeyine katyonik grupların (katyonik surfaktanlar, PDMAEMA, PEI adsorbe veya konjuge olmasından ileri gelmektedir.

2.5.2. Endozomal Kaçış

Hücre içine endozomal yoldan alınan gen veya terapötik ajanın endozomdan kaçışı gerekmektedir. Şekil 2.14'de görüldüğü gibi, endositoz yoluyla hücre içine alınan poliplekslerden, tamponlama kapasitesi daha yüksek olan yapılar daha iyi bir şekilde

endolizozomal kaçışı gösterirken, düşük tamponlama kapasitesine sahip yapılar ise endozomal veziküllerde yalnız kalarak enzimatik olarak bozunurlar ve lizozom içinde parçalanmaktadırlar [27].



Şekil 2.14: Endozomal Kaçış [39].

Kompleksler endozomal veziküller ile hücre içine alındığında, endozomal bölme proton pompaları ile asitlenir ve pH'ı düşer. Terapötik polimer-gen kompleksleri, hücresel yüzeyde pH 7.4'ten endozomal vezikül içinde pH 5.5'e kadar bir pH düşüşü ile karşı karşıya kalmaktadır. Vezikül, endozomdan lizozoma kadar olgunlaştıkça, pH 4.5-5.0 civarında daha da asidik hale gelir ve terapötik DNA, lizozomda farklı nükleaz tipleri ile karşı karşıya kalır. Bu nedenle, lizozomlardaki terapötik nükleik asitlerin bozulmasını önlemek ve hücrede yüksek transfeksiyon sağlamak için, herhangi bir gen iletim vektörünün endozomlardan zaman içinde kaçabilmesi önemlidir.

2.6. GEN İFADESİ

Gen ekspresyonu, bir başka genden gelen bilgileri kullanarak fonksiyonel bir gen ürününün sentezlenmesi işlemidir. Genler proteinleri kodlar ve proteinler hücre fonksiyonunu belirler. Bu nedenle, belirli bir hücrede ifade edilen binlerce gen, o hücrenin ne yapabileceğini belirler. Dahası, DNA'dan RNA'ya proteine bilgi akışındaki her adım, hücreye, ürettiği proteinlerin miktarını ve türünü ayarlayarak fonksiyonlarını kendi kendine düzenlemek için potansiyel bir kontrol noktası sağlar.

2.6.1. Transkripsiyon

Transkripsiyon, çekirdekte spesifik genler tarafından üretilen enzimatik kompleksler vasıtasıyla gerçekleşen gen ekspresyonunun ilk adımındır. Bu aşamada, deoksiribonükleik asitten (DNA'dan) ribonükleik aside (RNA'ya) genetik bilgi, DNA'yı oluşturan nükleotit dizisinin bir RNA dizisi olarak kopyalanır. Üç ana RNA sınıfı, ribozomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) ve haberci RNA'dır (mRNA) ve hepsi protein sentezinde önemli rol oynar. Transkripsiyon sırasında, DNA'nın çift sarmalının açılması ve bir RNA molekülünün üretimi için bir model olarak bir DNA dizisi kullanılır [6].

2.6.2. Translasyon

Translasyon, mRNA'lardaki dizilime uygun olarak ribozomlarda gerçekleştirilen amino asit zinciri veya polipeptit sentezi aşamasıdır. Bu aşamada, çekirdekteki çift sarmallı DNA'dan kopyalanan tek sarmallı bir mRNA, proteinler (polipeptitler) üretir [39].

2.7. DNA SALIMI

Polipleksler, DNA'nın serum enzimlerinden korunmasını sağlamak için sadece hücre dışında yüksek stabiliteye sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda DNA'nın salımını ve verimli bir şekilde transfeksiyonu sağlamak için hücreye girdikten sonra dissosiyasyonu gerekmektedir. Verimli bir transfeksiyon için vektörün DNA'dan ayrılması gerekmektedir [40]. Vektörden DNA'nın ayrılması polimerin zincir uzunluğuna ve ortalama molekül ağırlığına bağlıdır. Çünkü transfeksiyon için kullanılan her polimer için optimal bir zincir uzunluğu ve moleküler ağırlık gerekmektedir [41].

PBAE'lerde yer alan ester grupları sayesinde hücre içerisinde bu gruplar hidrolitik olarak parçalanarak daha hızlı DNA salımı sağlanmaktadır. Bu sayede PBAE'ler ilgili genin çekirdeğe yönlenmesini kolaylaştırarak yüksek transfeksiyon etkinliği elde edilmesini sağlamaktadır [42].

2.8. BİYOYUMLULUK

Gen transferi sistemlerinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri biyoyumluluk konusudur. Başarılı bir gen terapi için vektörün biyoyumlu olması gerekmektedir, aksi takdirde vektör,

toksik etkisinden dolayı hücrenin ölümüne sebep olabilir. Gen transferinde biyouyumluluk kriteri sistemin kandaki stabilitesi ve sitotoksisite olarak tanımlanmaktadır.

2.8.1. Sistemin kandaki stabilitesi

Gen transferi için kullanılan polimerler, DNA'yı serum enzimleri tarafından bozulmaya karşı koruma açısından önemli bir role sahiptir. Sistemin stabilitesi, DNA'nın polimer ile kuvvetli bir kompleks oluşturma aşamasından, hedef hücreye gidene kadar koruması gerekmektedir. Polimerik vektörden DNA'nın serbest bırakılması ise negatif yüklü serum proteinleri ile etkileşimden sonra gerçekleşebilmektedir.

Stabiliteyi bozan diğer bir faktör de polipeks agregasyonudur. Polipeks agregasyonu özellikle katyonik komplekslerde daha yaygındır. Hidrofilik monomerlerin ve / veya PEG gibi polimerlerin modifiye edilmesiyle katyonik polimerler veya polipekslerde yapılan modifikasyonlar sayesinde, hidrofilik koruma sağlanır ve kompleksin agregasyonu veya stabilitesindeki azalma önlenmektedir [43].

2.8.2. Sitotoksisite

Gen terapinin başarılı olması için, hedeflenen hücrelerin, belirtilen proteinlere transkripsiyon ve translasyonu sürdürmek için stabil kalması gerekir. Bu bağlamda polipeksin ve DNA'nın hücre içine salımından sonra kalan vektörün sitotoksik etkileri dikkate alınmalıdır. Bu etkiler için henüz kanıtlanmış bir mekanizma bulunmamaktadır fakat mevcut olan hipotezlere göre sitotoksik etkinin taşıyıcı yüzeyinde bulunan katyonik gruplar ile hücre yüzeyinde bulunan anyonik gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bahsedilen bu etkileşimin, hücre yüzeyinde membran fonksiyonunu ciddi şekilde bozabilecek ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilecek polipeks birikmesi ile sonuçlandığı düşünülmektedir [27] [44].

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

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarla ilgili olarak, kaynaklarda 2000 yılından günümüze kadar PBAE sentetik polimerik nanopartiküler sistemlerin elde edilmesine ait çalışmalar ve bunların transfeksiyon verimliliği ile ilgili uygulamalar araştırılmıştır. Bu çalışmalar aşağıda özet şeklinde sunulmuştur.

Gök, M.K, 2012, doktora tezi kapsamında *in vitro* tranfeksiyon alanında kullanılmak üzere PBAE ve kitosan esaslı modifiye polimerler sentezlemiştir. PBAE ve modifiye kitosan polimerlerin tranfeksiyon verimliliği açısından HEK293, POF ve POEF hücrelerinde yüksek başarı göstermiştir ve ürünler patentlenmiştir [44].

Jia-Hui Gong, Yi Wang, ve arkadaşları, 2018, güvenli ve verimli bir gen taşıyıcı olarak Michael katılması reaksiyonu ile bir dizi yeni biyobozunur florlanmış poli (β -amino ester)ler'in (FPBAE) tasarımını ve sentezini gerçekleştirmişlerdir. Tranfeksiyon etkinliği testinin sonuçları hem HeLa hem de HEK-293T hücre hatlarında sırasıyla% 70 ve % 90'dan yüksek olarak sonuçlandırmışlardır. Araştırmacılar yüksek tranfeksiyon etkinliğini büyük oranda florinasyona bağlanmışlardır. Ayrıca, sitotoksiste ve hemoliz tahlili, düşük moleküler ağırlık ve ayrılabilir ester bağlarının varlığı nedeniyle, PEI ile karşılaştırıldığında daha biyoyumlu olduğunu belirlemişlerdir. Sonuçlar birlikte ele alındığında, hem yüksek gen tranfeksiyon etkinliği hem de çok daha düşük toksisiteye sahip yeni polimer FPBAE, arzu edilen bir gen vektörü olarak belirtmişlerdir [45].

Yongsheng Gao, Jian-Yuan Huang, ve arkadaşları,2016, geliştirdikleri bir gen taşıma vektörü olan yüksek dallı poli (β -amino esterler) (HPAE'ler)'in molekül ağırlığı dağılımı ve konfigürasyonunun gen tranfeksiyonu, biyoyumluluk ve verimlilik üzerindeki etkileri araştırmışlardır. Geliştirdikleri HPAE'ler ile yüksek gen tranfeksiyon etkinliği ve düşük sitotoksiste elde edilebileceğini göstermişleridir. Geleneksel PEI, PAMAM dendrimer ve PDMAEMA'dan farklı olarak, aynı anda yüksek molekül ağırlıklı HPAE'ler tarafından daha yüksek gen tranfeksiyon etkinliği ve düşük sitotoksiste gösterdiğini görmüşlerdir. Araştırmacılar elde ettiği bu sonuçlarla, hem polimerin moleküler ağırlığının hem de konfigürasyonunun, vektörün tranfeksiyon kabiliyeti ve sitotoksitesi üzerindeki etkileri konusunda yeni bir anlayış geliştireceğini belirtmişlerdir. [45].

Dezhong Zhou, Yongsheng Gao, ve arkadaşları,2016, karşılaştırmalı olarak farklı hücre tiplerinde 2 ila 126 kat daha yüksek *in vitro* tranfeksiyon etkinliği gösteren yeni bir Michael katılma yaklaşımı yoluyla HPAE'lerin sentezini araştırmışlardır. Dallanmış yapıların, cilt hastalıklarında viral olmayan gen terapisinin başarılı bir şekilde uygulanmasına yönelik PBAE'lerin tranfeksiyon verimini ve güvenliğini önemli ölçüde artırabileceğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, insan adipoz türevi mezenkimal (bağ dokularında bulunan,

erişkin haldeki kök hücre tipi) kök hücreleri HADSC ve HeLa hücreleri ile yaptıkları transfeksiyon çalışmalarıyla, dallanmış yapılı PBAE'lerin etkili transfeksiyon için büyük öneme sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçlarla, HPAE'lerin yüksek performanslı viral olmayan gen iletim vektörleri olduğunu göstermişlerdir. [46].

Daniel G. Anderson, Akin Akinc, ve arkadaşları, 2004, araştırmalarında 486 adet PBAE sentemişlerdir ve bu PBAE'lerin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin, gen transferine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, PBAE'lerin moleküler ağırlıklarının, partikül büyüklüklerinin, yüzey yüklerinin ve optimal polimer / DNA oranının, transfeksiyon verimi konusundaki etkinliğini araştırmışlardır [47].

Steven R. Little a, David M. Lynn, ve arkadaşları, 2004, çalışmalarında, PBAE içeren mikropartiküllere özgü karakterizasyon ve formülasyon hususlarını araştırmışlardır. Plazmidin mikropartiküllerden salınımın, bileşimdeki PBAE miktarına dayanarak kontrol edilebilirliğini göstermişlerdir [48].

Elina Vuorimaa, Tiia-Maaria Ketola, ve arkadaşları, 2011, PBAE'leri, DNA komplekslemelerini ve transfeksiyon kabiliyetlerini araştırmışlardır. Bu çalışma için farklı transfeksiyon etkinliğine sahip on polimer seçmişlerdir ve PBAE'leri transfeksiyon verimliliği ve gen taşıma kapasiteleri açısından değerlendirmişlerdir [50].

Yapılan kaynak araştırmalarında, gen transferi çalışmalarında PBAE'lerin yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.

Bu çalışmalar ışığında, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın özgün yönü olan, kaynaklarda rastlanmayan, monomerler kullanılarak yeni PBAE esaslı bir gen taşıyıcı nanopartikül formülasyonlarını ilk defa bu çalışmada elde edebilmek için:

- Gen transferi sistemlerinde viral taşıyıcıların yerini alabilecek, yeni sentetik polimer PBAE polimerik taşıyıcı sistemin diakrilat monomeri olarak kullanılan trimetilolpropan etoksilat (1 EO/OH) metil eter diakrilat (TEMEDA) sabit tutularak 4 farklı diamin bileşiği ile (1,5-diamino-2-metilpentan, (DAMP), etilendiamin (EDA), 3-amino-1-propanol (AP), N-(2-Hidroksietil) etilendiamin (HEEDA) ile üç farklı sentez yöntemi ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi ve ürünler karakterize edildi,

- Uygun özelliklerdeki PBAE 'ler kullanılarak nanopartikül formülasyonları hazırlandı gen transfer uygulamalarında önemli olan, partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli gibi özellikleri karşılaştırılmalı olarak incelendi,
- Transfeksiyonda kullanılacak olan uygun özelliklerdeki PBAE ürünün sitotoksosite karakteristikleri belirlendi,
- Ürünlerin *in vitro* gen taşıma/bağlama kapasiteleri jel elektroforez analizi ile belirlendi,
- Jel elektroforez analizi sonuçlarına göre seçilen ürünün *in vitro* transfeksiyon etkinliği HEK293 hücre hattı kullanılarak incelendi. |



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.KİMYASAL MADDELER

PBAE sentezinde, 4 farklı amin bileşiği; 1,5-diamino-2-metilpentan (DAMP) (Sigma-Aldrich), etilendiamin (EDA) (Sigma-Aldrich), 3-amino-1-propanol (AP) (Sigma-Aldrich), N-(2-Hidroksietil) etilendiamin (HEEDA) (Sigma-Aldrich) ve trimetilolpropan etoksilat (1EO/OH) metil eter diakrilat (TEMEDA) (Sigma-Aldrich) kullanıldı. PBAE'den elde edilecek nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich), ve polimer sentezinde çözücü olarak tetrahidrofuran (THF) (Sigma-Aldrich) kullanıldı.

Ürünlerin tampon kapasitelerinin belirlenmesinde ise sodyum klorür (NaCl) (Merck), hidroklorik asit (%37) (Merck) ve sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich) kullanıldı.

Jel elektroforez denemeleri için kullanılan kimyasal maddeler; bromofenol mavisi (Sigma-Aldrich), etidyum bromür (moleküler biyoloji saflıkta) (Sigma-Aldrich), agaroz (Sigma-Aldrich), tris asetat-EDTA (TAE, pH 8.0) tamponu hazırlanışı için tris baz (Sigma-Aldrich), %99 saflıkta glasiyal asetik asit (Merck) ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma-Aldrich) kullanıldı.

Sitotoksisite denemelerinde insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) kullanıldı. *In vitro* transfeksiyon denemelerinde ise HEK293 hücre hattı kullanıldı Hücre kültürü ve transfeksiyon denemeleri için Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM) ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanıldı. Medyumların hazırlanması için ihtiyaç durumlarında gerek duyulan kimyasal maddeler ise, sodyum piruvat (Sigma) ve L-glutamat (Sigma), penisilin (Sigma), sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (Sigma), streptomisin ve fötal buzağı serumu (FCS) (Sigma) kullanıldı. DMEM çözeltisi için ise Sigma-Aldrich ürünü olan FCS kullanıldı. Tüm denemelerde kullanılan su deiyonize sudur.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

3.2.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Tüm ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında FTIR analizi için Agilent Cary 630 model FT-IR spektrofotometresi kullanıldı. Yapıların aydınlatılması, örnek/KBr oranı 1/200 olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmış tabletler kullanılarak, 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında kaydedilerek gerçekleştirildi.

3.2.2. Jel Geçirgenlik Kromatografisi ve Boyutlarına Göre Ayırma Kromatografisi (GPC/SEC)

Ürünlerin sayısal (M_n) ve ağırlıkça (M_w) ortalama molekül ağırlıkları ile polidispersite indekslerinin (PDI) (M_w/M_n) belirlenmesi için GPC analizleri, bir TSK-jel GMPWXL kolonunda GPC/SEC sistemi kullanılarak (Tosoh Bioscience; Japonya) gerçekleştirildi. GPC analizi sonuçlarına göre örneklerin ortalama molekül ağırlıkları M_n ve M_w ile PDI değerleri kaydedildi.

3.2.3. Zeta Potansiyeli ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı

Ürünlerinin partikül büyüklükleri, zeta potansiyelleri ve polidispersite (PDI_n) analizleri Zetasizer Nano series (Malvern Instruments) cihazında, deiyonize suda 25°C da yapıldı.

3.2.4. pH Metre

Tampon kapasitelerinin belirlenmesinde $\pm 0,01$ hassiyetle ölçüm yapabilme özelliğine sahip, Hanna marka pH metre kullanıldı.

3.2.5. Jel Elektroforez Cihazı

Nanopartikül formülasyonlarının, pDNA ile kompleks yapabilme özelliklerinin incelenmesi için jel elektroforezde (Cleaver Scientific Ltd., İngiltere) cihazı kullanıldı.

3.2.6. Olympus Ters Mikroskop

Hücrelerin görüntülenmesini sağlamak ve floresan aydınlatıcısı ile nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi için IX71 model Olympus ters mikroskop (Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.

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

Gen taşıyıcı nanopartikül formülasyonlarının nicel olarak transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi için Guava easycyte marka (Amerika Birleşik Devletleri) akış sitometri kullanıldı.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. PBAE Bileşiklerinin Sentez Yöntemi

Tüm PBAE'lerin sentezi, monomerler olarak, aynı diakrilat bileşiğine karşılık farklı diamin bileşikleri kullanılarak, Michael katılma reaksiyonu mekanizmasına göre gerçekleştirildi. Sentezde kullanılacak sıcaklık, süre, monomer molar oranları (diakrilat/amin) gibi reaksiyon şartları, yapılan optimizasyon denemelerine göre saptandı.

Kullanılan sentez yöntemleri;

- A. THF'de çözerek dietilelerde çöktürme yöntemi; 1/1.1 monomer molar oranına göre 5mmol diakrilat ve 5,5mmol diamin monomerleri ayrı kaplarda 5mL THF'de çözüldü. Daha sonra THF'de çözülmüş diakrilat monomeri üzerine, azot gazı ortamında, 25 °C'de ve sabit karıştırma altında damla damla THF'de çözülmüş diamin monomeri eklendi. 10 dk. daha azot akımı altında karışması sağlanarak reaksiyonun gerçekleşmesi için inkübatörde 50°C'da 48 saat 100 rpm'de sürekli olarak karışmaya bırakıldı [48].

Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon kabı içerisindeki malzeme +4°C'da soğuk dietileter'de çöktürüldü. Çöken PBAE, 40°C'da vakum altında kurutuldu. Ürünler karakterizasyon ve diğer denemeler için buzdolabında +4°C'da saklandı.

- B. 60°C'da ve 48 saat çözücüsüz sentez yöntemi; 1/1.1 monomer molar oranına göre öncelikle reaksiyon kabına 5mmol diakrilat monomeri ilave edildi, azot gazı ortamında, sabit hızla karıştırılarak ve 25°C'da 5,5mmol diamin monomeri damla damla edildi. 10 dk azot akımı altında karıştırıldıktan sonra inkübatörde 60°C'da 48 saat 100 rpm'de sürekli olarak karışmaya bırakıldı [48]. Ürünler karakterizasyon ve diğer denemeler için buzdolabında +4°C'da saklandı.

- C. DMSO içinde çözerek 60 °C’da sentez yöntemi; 1/1.1 monomer molar oranına göre 2 mL DMSO içerisinde 5mmol diakrilat monomeri reaksiyon kabına ilave edildi sabit karıştırma hızında, azot gazı ortamında 5mmol diamin monomeri damla damla reaksiyon kabına ilave edildi. 10 dk azot akımı altında karıştırıldıktan sonra inkübatörde 60°C’da 48 saat 100 rpm’de sürekli olarak karışmaya bırakıldı [48]. Ürünler karakterizasyon ve diğer denemeler için buzdolabında +4°C’da saklandı.

Yukarıda belirtilen her 3 yönteme (A,B ve C) göre diakrilat monomeri aynı kalmak suretiyle 4 amin monomeri ile PBAE sentezleri gerçekleştirildi. Nanopartikül formülasyonunda en uygun özelliklerdeki ürün seçilerek, bu ürünün sentezinde uygulanan yöntemle göre diakrilat/amin mol oranları 1/1.2, 1/1.3, 1/1.4 ve 1/2 olacak şekilde PBAE’ler sentezlendi. Aşağıda Tablo 4.1’de tüm PBAE’lerin sentezlerinde uygulanan reaksiyon koşulları, semboller ve ürünlerin fiziksel durumu belirtilmiştir.

3.3.2. PBAE Ürünlerinden Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

PBAE ürünlerinden nanopartikül formülasyonları (nPBAE), nanoçöktürme yöntemine göre (DMSO-su sistemi) kullanılarak hazırlandı.

Bu yöntemle göre, PBAE ürününün DMSO içerisindeki konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde çözüldü. Bu çözülden 200 µL alınarak, 1300 µL deiyonize su üzerine eklenip çeşitli süre(1-2dk) ve hızlarda(2700-3000 rpm) karıştırıldı. Bu aşamada optimizasyonu gerçekleştirilen parametreler ise; çözelti konsantrasyonu, vortex hızı, polimer çözeltisi/deiyonize su oranı ve vortex süresidir.

Burada elde edilen PBAE ürünlerinin nanopartikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri ölçüldü. Yukarıda ifade edilen parametreler denenerek hangi nanopartikül formülasyonunun özellikleri karşılaştırılarak *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için daha uygun olduğuna karar verildi [51].

3.3.3. PBAE Ürünlerinin Tampon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Seçilen PBAE ürünlerinin proton tamponlama kapasiteleri asit baz titrasyon yöntemi ile belirlendi [52].

PBAE ürünlerinin tampon kapasitelerinin belirlenmesinde 6mg PBAE, 150 mM’lık NaCl çözeltisi içerisinde son konsantrasyon 0.5 mg/mL olacak şekilde çözüldü. Karıştırılan çözelti

üzerine 0.1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek çözelti pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra 0.1 M hidroklorik asitten 20'şer μL eklendi ve pH değerleri pH metre ile ölçülerek kaydedildi. NaCl negatif kontrol grubu olarak kullanılmış olup, ürünlerin proton kapasiteleri çözelti pH'sı 7.4'den 5'e düşene kadar eklenen kümülatif HCl hacminden, $\text{mmol H}^+ / 1 \text{ g polimer}$ olacak şekilde hesaplandı.

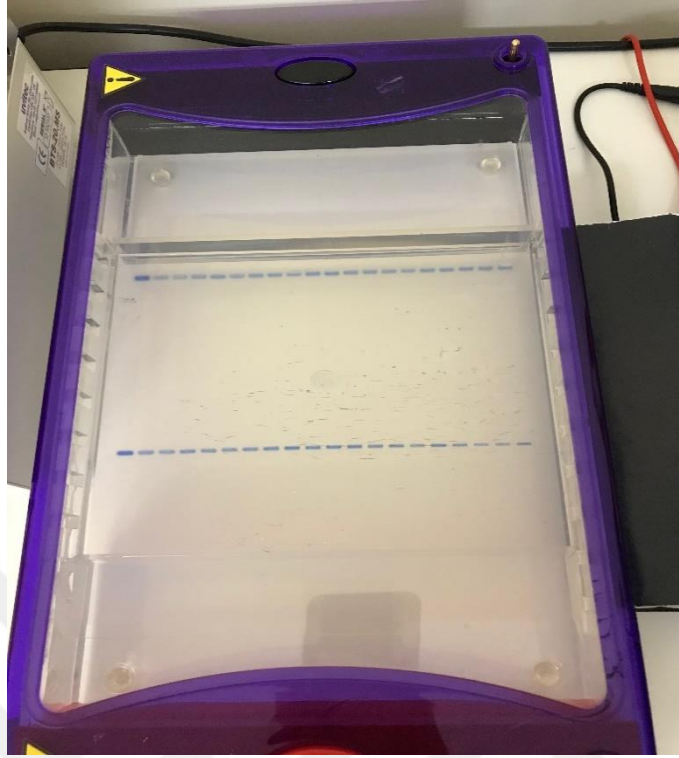
3.3.4. Plazmid DNA (pDNA) Genini Taşıyan Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Bölüm 3.3.1'de anlatılan sentez yöntemleri ve 3.3.2'de anlatılan nanopartikül formülasyonlarını hazırlama yöntemleri ve Bölüm 4.1'de anlatılan analiz sonuçlarına göre hazırlanan nanopartikül formülasyonlarından başarılı bulunanlar, pDNA (Green Fluorescent Protein Circular Plasmid DNA ile 1:1 oranından başlayıp 70:1 oranına kadar değişen oranlarda (a/a) muamele edilerek nanopartikül-gen kompleksleri hazırlandı. Bu kompleksler iyonik etkileşim (ignPBAE) ve enkapsülasyon (egnPBAE) tekniklerine göre ayrı ayrı hazırlandı. İyonik etkileşim tekniğinde ependorfa alınan PBS üzerine PBAE çözeltisi eklenerek vortex işlemi gerçekleştirildikten sonra pDNA eklendi ve 30 dk bekletildi. Enkapsülasyon tekniğinde ise öncelikle polimer çözeltisi üzerine pDNA eklenip 30 dk'lık bekleme süresinin ardından polimer-pDNA, ayrı bir ependorfta bulunan PBS üzerine damla damla ilave edildi ve vortex işlemi gerçekleştirildi.

3.3.5. Jel Elektroforez Analizi

Nanopartikül formülasyonlarının, pDNA ile kompleks yapabilme özellikleri jel elektroforezde aşağıda belirtildiği şekilde incelendi.

Agaroz, berrak çözelti oluşuncaya kadar TAE, pH 8.0 tamponu içerisinde kaynatılarak çözüldü. Ardından çözelti, oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra içerisine 0.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve daha sonra donan jel, içerisinde pH 8.0 TAE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Yürütme için 9:1 (kompleks:elektroforez yükleme tamponu) oranında kompleks ile 6x agaroz jel yükleme boyası olan bromofenol mavisi karıştırılarak jeldeki kuyucuklara eklendi ve elektroforez işlemi sabit 100 volt akımda 1 saat boyunca gerçekleştirildi. Jel elektroforez analizi sonrasında ise, UV ışık altında (UVITEC UV transilüminatör (Cleaver Scientific; İngiltere)) fotoğrafları çekilerek incelendi [53].



Şekil 3.1: Jel elektroforez cihazı.

3.3.6. Sitotoksisite ve *İn Vitro* Transfeksiyon Etkinliği Çalışmaları

3.3.6.1. Çözeltilerin Hazırlanması

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

FCS İçeren DMEM (DMEM+FCS); 174 mL DMEM medyumunun üstüne, 2 mL esansiyel olmayan aminoasit, 2 mL Na-piruvat, 20 mL FCS ve 2 mL L-glutamin eklenerek 200 mL'lik DMEM+FCS medyumu hazırlandı.

FCS İçermeyen DMEM (DMEM-FCS); 194 mL DMEM medyumu üstüne 2 mL esansiyel olmayan aminoasit, 2 mL Na-piruvat ve 2 mL L-glutamin eklenerek 200 mL'lik DMEM-FCS medyumu hazırlandı.

PBS pH 7.4 tampon çözeltisi; NaCl 8 g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.44g, KH₂PO₄ 0.24g alınarak üzerine 490 mL deiyonize su ilave edilerek maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra pH 7.4 olarak ölçüldü.

Nac pH 5 tampon çözeltisi: 80mL destile su üzerine 0.138g sodyum asetat ve 46µL asetik asit eklendi ve pH 5 olarak ölçüldü.

3.3.6.2. *HEC293 Hücrelerinin Hazırlanması*

Tez kapsamındaki denemelerde kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalından temin edilen HEK293 hücre hattı aynı Anabilim Dalının laboratuvarında çoğaltılarak kullanıldı.

Hücrelerin bulunduğu kriyotüp sıvı azottan alınarak 37°C'de su banyosu içerisinde çözüldü ve 5 mL DMEM ile yıkanıp 5 dakika süresince 2000 rpm hızda santrifüjlenerek kriyotüp içerisindeki hücreler DMSO'dan temizlendi. Daha sonra üst faz dekante edildi ve hücreler 1 mL DMEM içerisinde yayılması sağlandı. Thoma lamında hemositometrik yöntemle (%0,4 tripan mavisi kullanılarak) hücre sayımı elde edilen HEK293 hücrelerinin konsantrasyonu ölçüldü ve hücrelerin canlı olup olmadığı kontrol edildi. Bu işlemin ardından hücrelerin kültür kaplarına ekim işlemi birim cm²'ye uygun oranda olacak şekilde gerçekleştirildi ve hücreler 24 saat süresince üremeye bırakıldı. Bu sürecin ardından, hücreler, *in vitro* tranfeksiyon denemeleri için petrilere uygun konsantrasyonda olacak şekilde dağıtıldı.

3.3.7. *Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksitesinin MTT Testi ile İncelenmesi*

Yukarıda anlatılan test metodlarında başarılı bulunan PBAE nanopartiküllerin sitotoksitesite karakteristiklerini belirlemek için, kantitatif bir yöntem olan MTT testi [55], HEK293 hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. 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 analiz yöntemidir. Bu azalış sadece aktif hücrelerde gerçekleşmektedir ve bu aktivite hücrelerin canlılığının bir belirteci olarak yaşayan hücreleri belirlemede etkindir.

96 kuyucuklu petrilere, kuyucuk başına 1x10⁴ hücre içerecek şekilde %10 FCS içeren 100 µL DMEM içerisinde ekildi ve 1 gün süresince 37°C ve %5 CO₂'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında kuyucuklarda bulunan DMEM+FCS alınarak, son çözelti miktarı 100 µL olacak şekilde DMEM-FCS ile PBAE nanopartikül formülasyonlarının farklı konsantrasyonları (50, 125, 250 ve 500 µg/mL) hücrelerin üzerine ilave edildi.

4 saatlik inkübasyon işleminden sonra, polimer örneklerini içeren medyum uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µL MTT çözeltisi (DMEM-FCS içeren 1 mg/mL'lik çözelti) eklendikten sonra hücreler 3 saat daha bu ortamda inkübe edildi. Ardından yaşayan hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerini çözmek için 150 µL DMSO ilave edildi ve çözülen boyanın verdiği absorbans mikropłaka (Elisa) okuyucusunda 550 nm dalga boyunda kaydedildi (ELx800, Biotek Instruments, Winooski, VT, A.B.D). Hücrenin canlılık oranı, Eşitlik 3.1'de verilen formüle göre hesaplandı.

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

Eşitlik 3.1'de A_{PBAE} ; polimer örnekleri ile inkübe edilmiş hücrelerin ortalama absorbans değerini ifade ederken, A_{DMEM} ise DMEM-FCS ile inkübe edilmiş kontrol hücrelerin ortalama absorbans değerini göstermektedir [58].

3.3.8. Nanopartikül Formülasyonlarının *In Vitro* Transfeksiyon Etkinliği

Bölüm 3.3'de anlatılan yöntemlere yapılan tüm analizlere göre uygun özelliklere sahip PBAE nanopartikül formülasyonunun *in vitro* transfeksiyon etkinliği HEK293 hücre hatları kullanılarak incelendi. 24'lü kuyucuklara 3.5×10^4 civarında hücre ekimi gerçekleştirildi ve 24 saat süresince proliferasyon için, yani hücrelerin çoğalması için 37°C'da CO₂ etüvünde inkübasyon işlemine tabi tutuldu. 24 saat sonunda ise hücre proliferasyonu mikroskop ile kontrol edildi ve DMEM+FCS medyumunu hücreler üzerinden alındı. Gen ve nPABE kompleksleri jel elektroforez sonuçlarına göre PBS içerisinde olacak şekilde Bölüo 3.3.4'de belirtildiği şekilde iyonik etkileşim ve enkapsülasyon metoduna göre ayrı ayrı hazırlandı. Hazırlanan kompleksler 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Bu sürenin bitiminde ise hücre üzerindeki medyum alınarak yerine tekrar DMEM+FCS medyumunu eklendi ve 72 saat süresince 37°C'da %5 CO₂ etüvünde inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Nanopartiküler taşıyıcıların *in vitro* transfeksiyon etkinliğini belirlemek için, 72 saat sonrasında hücrelerdeki yeşil floresan protein ekspresyonları Olympus IX71 model ters mikroskopta 460-480 nm floresans ışık altında analiz edildi. Hücrelerin göstermiş oldukları yeşil ışığa göz önüne alınarak transfekte olan hücreler saptandı. Ardından 24'lü kuyucuklardaki medyum ortamdaki olarak kuyucukların her biri 250 µL PBS ile yıkandı ve PBS'ten arındırıldı. Her bir kuyucuğa 250 µL %0.25 Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 2 dakika etüvde tutuldu. Hücrelerin yüzeyden hareketlenmesi sağlandıktan sonra kuyucuklar

özenli bir şekilde tekrar yıkandı. Hareketlenen hücrelerin ölmemesi için ise, tripsinin aktivitesini durdurma amaçlı kuyucuklara ilave edilen 500 µL DMEM+FCS ile yıkayıp santrifüj tüplerine alındı. Daha sonra 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken hücreler ise 300 µL PBS ile sulandırılarak 96'lı kuyucuklara yüklendi ve akış sitometride 488 nm dalga boyunda *in vitro* transfeksiyon etkinliği analiz edildi.

|



4. BULGULAR

4.1. SENTEZ VE KARAKTERİZASYON

Bölüm 3.3.1’de anlatılan her 3 yönteme (A, B ve C) göre diakrilat monomeri aynı kalmak suretiyle 4 farklı amin monomeri ile PBAE sentezlerine ait reaksiyonlar gerçekleştirildi. Bu PBAE’lerin nanopartikül formülasyonları hazırlanıp en uygun özelliklerdeki ürün seçilerek, bu ürünün sentezinde uygulanan yöntemle göre diakrilat/amin mol oranları 1/1.2, 1/1.3, 1/1.4 ve 1/2 olacak şekilde PBAE’ler sentezlendi. Aşağıda Tablo 4.1’de tüm PBAE’lerin sentezlerinde uygulanan reaksiyon koşulları, semboller ve ürünlerin fiziksel durumu belirtilmiştir.

Tablo 4.1: PBAE’lerin sentezlerinde uygulanan reaksiyon koşulları, semboller ve ürünlerin fiziksel durumu

Diakrilat Monomeri	Amin Monomeri	Diakrilat/ Amin mol oranı	Sentez Yöntemi*	PBAE Sembolü	PBAE Fiziksel Görünüş
TEMEDA	DAMP	1/1,1	A	A1	Çöktürme sırasında bulanık, 2 saat sonunda çökme gözlenmedi
TEMEDA	EDA	1/1,1	A	A2	Çöktürme sırasında bulanıklık giderilemedi
TEMEDA	AP	1/1,1	A	A3	Çöktürme sırasında bulanık, 2 saat sonunda çökme gözlenmedi
TEMEDA	HEEDA	1/1,1	A	A4	Çöktürme sırasında bulanık, 2 saat sonunda hafif jelimsi yapı.
TEMEDA	DAMP	1/1,1	B	B1	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	EDA	1/1,1	B	B2	Jel kıvamında, şeffaf.

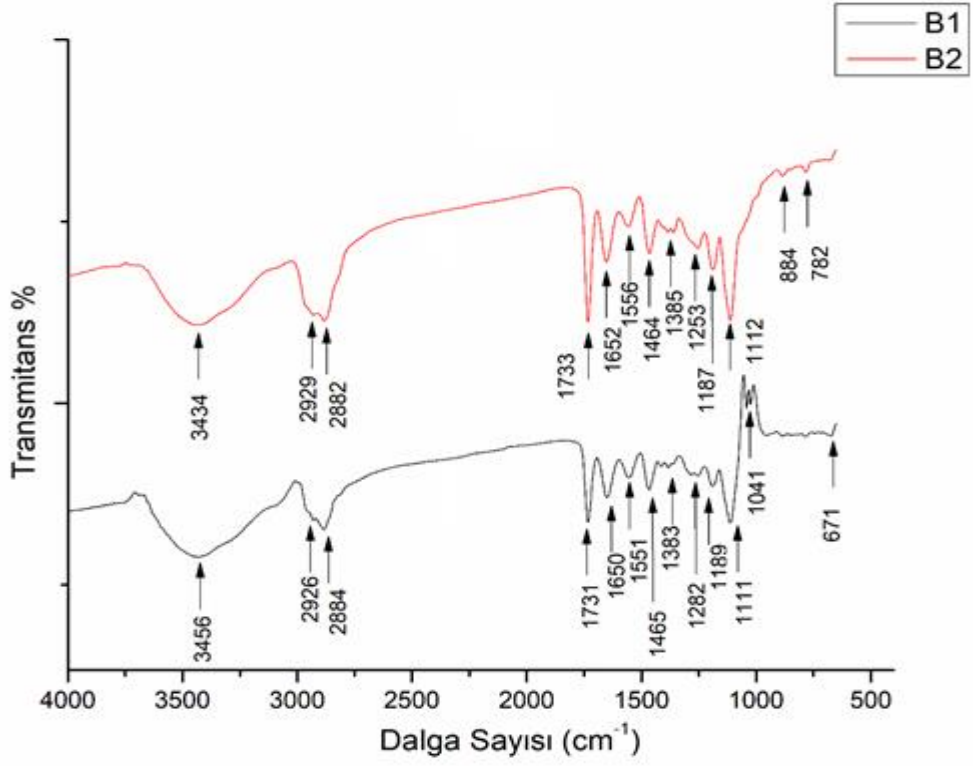
Tablo 4.1 (devam): PBAE'lerin sentezlerinde uygulanan reaksiyon koşulları, semboller ve ürünlerin fiziksel durumu

TEMEDA	AP	1/1,1	B	B3	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	HEEDA	1/1,1	B	B4	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	DAMP	1/1,1	C	C1	Daha koyu jel kıvamında, şeffaf
TEMEDA	EDA	1/1,1	C	C2	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	AP	1/1,1	C	C3	Daha koyu jel kıvamında kıvamında, şeffaf
TEMEDA	HEEDA	1/1,1	C	C4	Şeffaf, viskozitesi çok yüksek
TEMEDA	AP	1/1,2	B	B31	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	AP	1/1,3	B	B32	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	AP	1/1,4	B	B33	Jel kıvamında, şeffaf.
TEMEDA	AP	1/2,0	B	B34	Jel kıvamında, şeffaf.

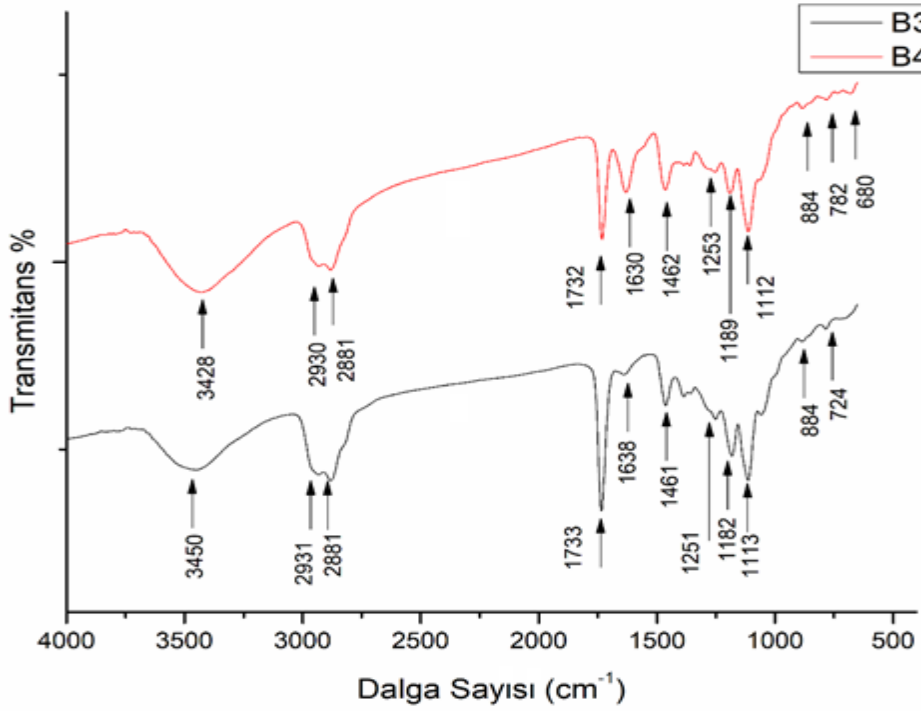
*: A, B ve C yöntemleri Bölüm 3.3.1'de anlatılmıştır.

4.1.1 Sentezlenen PBAE ürünlerine ait FTIR spektra

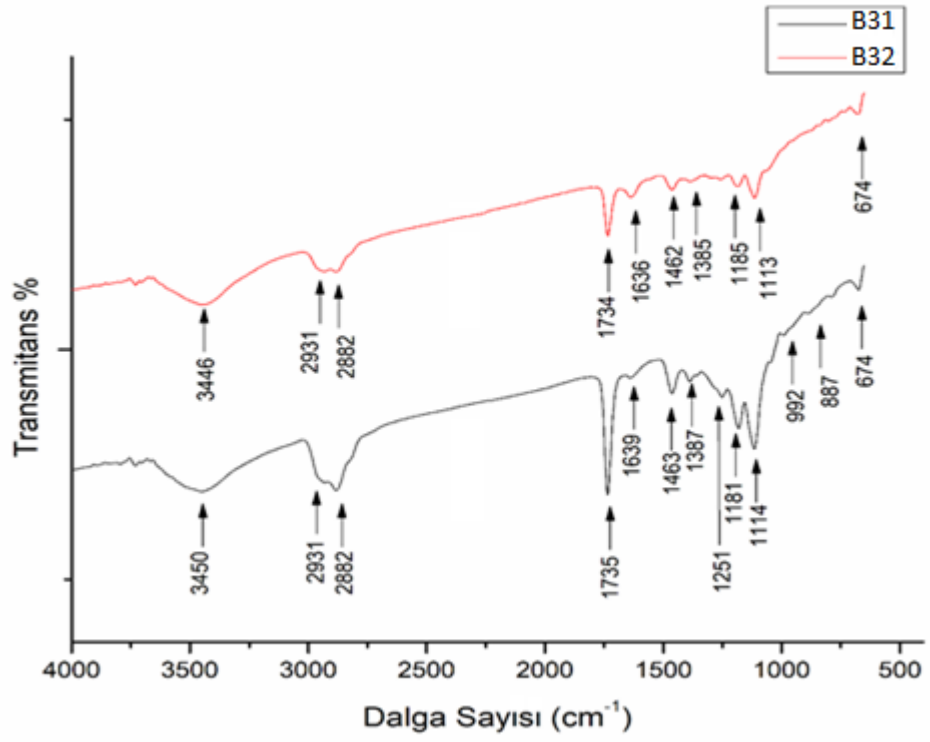
Seçilen PBAE ürünlerinden B1 ve B2'ye ait FTIR spektra karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1'de, B3 ve B4'e ait FTIR spektra karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2'de, B31 ve B32'ye ait FTIR spektra karşılaştırmalı olarak Şekil 4.3'te, B33 ve B34'e ait FTIR spektra ise karşılaştırmalı olarak Şekil 4.4'de verilmiştir.



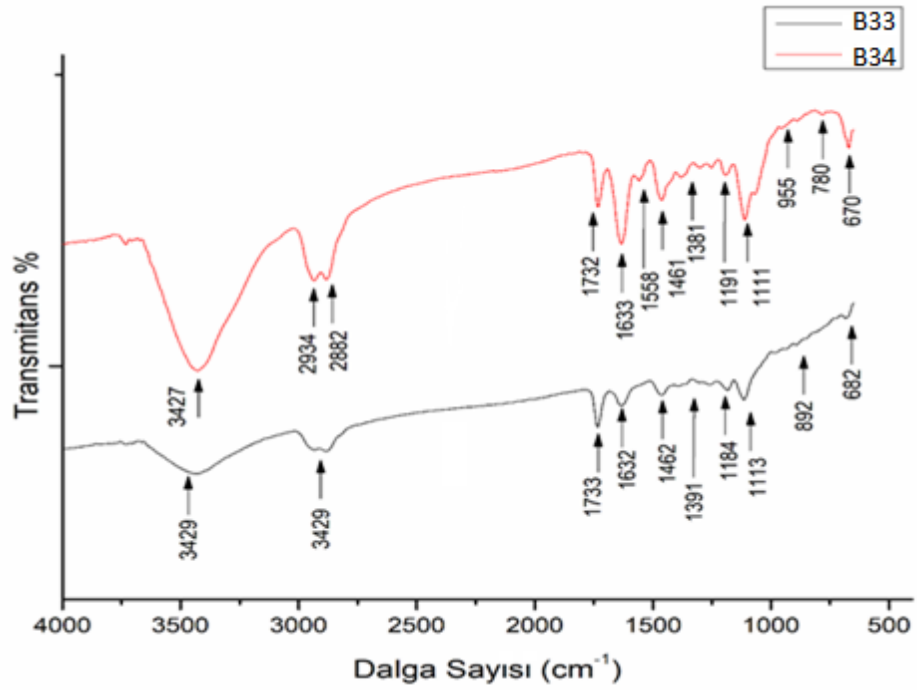
Şekil 4.1: B1 ve B2 PBAE Ürünlerine ait FTIR Spektra.



Şekil 4.2: B3 ve B4 PBAE Ürünlerine ait FTIR Spektra..



Şekil 4.3: B31 ve B32 PBAE Ürünlerine ait FTIR Spektra.



Şekil 4.4: B33 ve B34 Ürünlerine ait FTIR Spektra.

4.1.2 Sentezlenen PBAE Ürünlerine ait GPC Analizi Sonuçları

Seçilen PBAE ürünlerinin (B1,B2,B3,B4,B31,B32,B33 ve B34) Bölüm 3.2.2.'de belirtilen cihaz ve yöntem ile sayısal ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları M_n ve M_w ile PDI değerleri ölçülerek sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: PBAE ürünlerinin GPC/SEC Analizi Sonuçları

Ürün	M_n (kDa)	M_w (kDa)	PDI (M_w/M_n)
B1	2,5	2,9	1,151
B2	4,4	9,2	2,120
B3	9,1	13,5	1,478
B4	1,5	5,7	3,840
B31	9,2	13,7	1,493
B32	3,0	3,1	1,026
B33	0,7	1,1	1,443
B34	0,6	0,7	1,236

4.2 PBAE ÜRÜNLERİNDEN NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASINDA OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

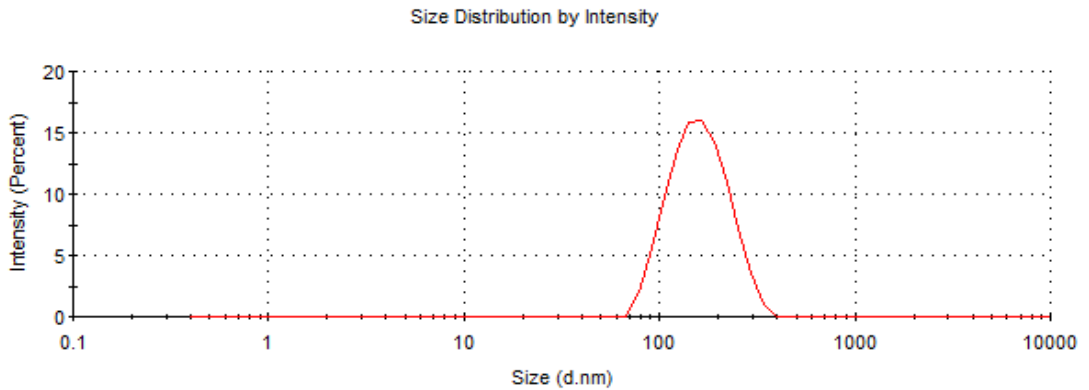
nPBAE'nin hazırlanması Bölüm 3.3.2'de anlatılan yöntemle göre gerçekleştirildi. Tablo 4.1'de görüldüğü üzere A1,A2,A3 ürünlerinin diyetlerde çöktürme işlemi gerçekleşmediğinden dolayı nanopartikül formülasyonları hazırlanamadı. Bu nedenle diğer PBAE'lerden hazırlanan nPBAE'lerin özellikleri Bölüm 3.2.3'de belirtilen sistem kullanılarak tayin edildi. Sonuçlar Tablo 4.3'de verildi. Şekil 4.5'de ise *in vitro* transfeksiyonda kullanmak için en uygun özelliklere sahip nPBAE olan nB3'e ait partikül büyüklüğü ve PDI, zeta potansiyeli grafiği ise Şekil 4.6'da cihazdan elde edilen grafikler halinde verildi.

Tablo 4.3: nPBAE'lerin boyut, dağılım ve zeta potansiyeli değerleri

nPBAE	Boyut (nm)	PDI _n	Zeta Potansiyeli (mV)
nA4	227,5	0,599	6,93 ±3,13
nB1	151,7	0,138	12,4±6,2
nB2	149,9	0,438	9,94±3,31
nB3	162,1	0,091	20,4±7,71
nB4	182,5	0,424	6,64±3,35
nC1	81,69	0,65	9,23±5,31
nC2	552,4	0,454	5,13±7,31
nC3	113,79	0,39	6,55±6,62
nC4	235,6	0,714	11,42±4,84

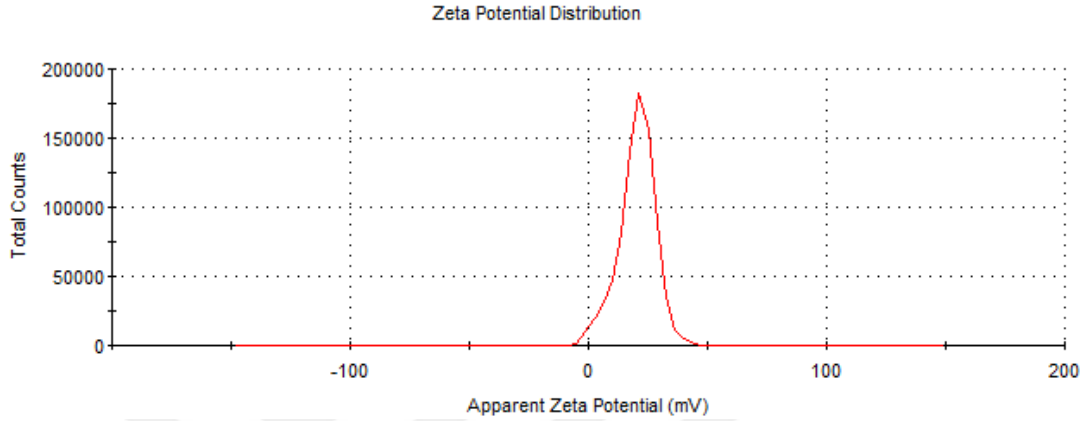
Z-Average (d.nm): 162,1
PdI: 0,091
Intercept: 0,917
Result quality : Good

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	166,4	100,0	55,42
Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Peak 3:	0,000	0,0	0,000

**Şekil 4.5:** nB3'e ait boyut ve dağılım grafiği.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 20,4	Peak 1: 20,4	100,0	7,71
Zeta Deviation (mV): 7,71	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00893	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



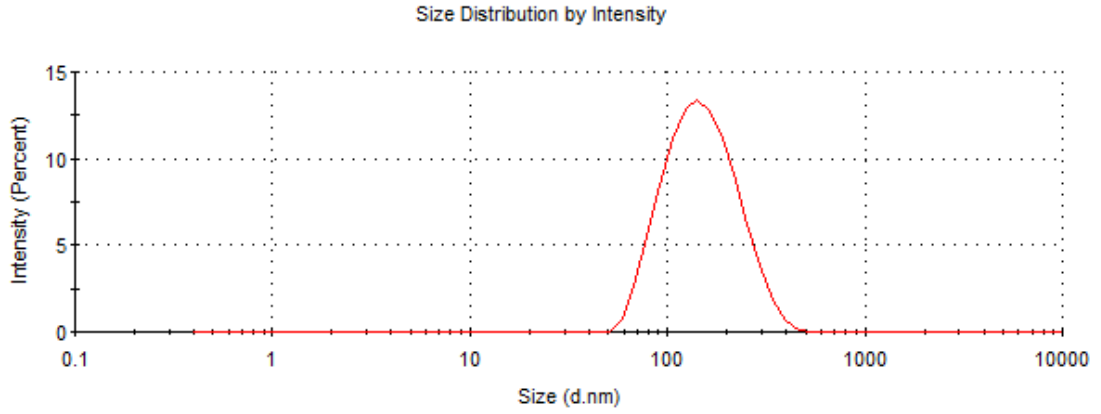
Şekil 4.6: nB3'e ait zeta potansiyeli grafiği

Tablo 4.1'de sentez koşulları verilen ve B31, B32, B33 ve B34 sembolleri ile gösterilen PBAE ürünleri kullanılarak Bölüm 3.3.2'de anlatılan yöntemle hazırlanan nPBAE'ler olan n₁B31, n₁B32, n₁B33, n₁B34'e ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.4'de verildi. Tablodan da görüldüğü gibi bu formülasyon grubu içerisinde *in vitro* transfeksiyonda kullanmak için en uygun özelliklere sahip nPBAE olan n₁B31 ve n₁B32'ye ait partikül büyüklüğü ve PDI grafikleri sırası ile Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de, zeta potansiyeli grafikleri ise sırası ile Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da cihazdan elde edilen grafikler halinde verildi.

Tablo 4.4: n₁B3 grubu formülasyonlarının boyut, dağılım ve zeta potansiyeli değerleri

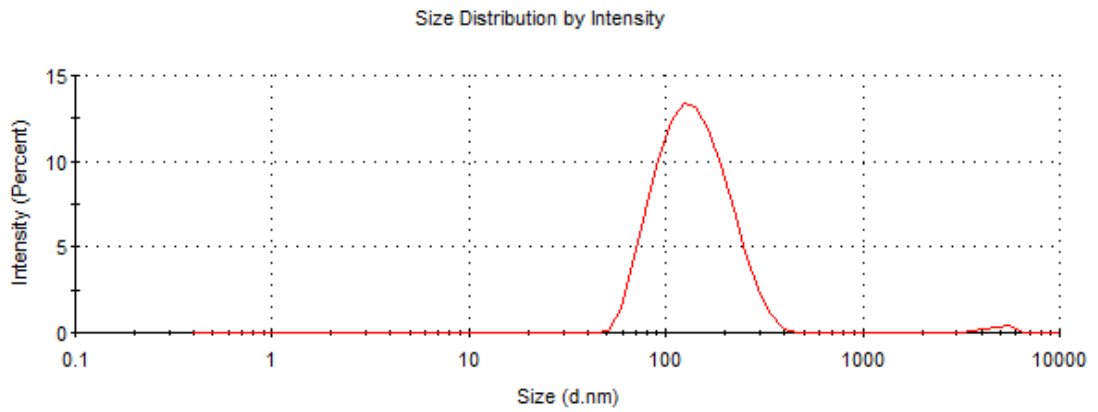
n ₁ B3	Boyut (nm)	PDI _n	Zeta Potansiyeli (mV)
n ₁ B31	134,2	0,172	14,7±3,11
n ₁ B32	124,1	0,203	13,1±7,37
n ₁ B33	232,1	0,273	11,8±4,74
n ₁ B34	899	0,547	2,29±4,08

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 134,2	Peak 1: 158,6	100,0	65,56
Pdl: 0,172	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,885	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Şekil 4.7: n₁B31'e ait boyut ve dağılım grafiği.

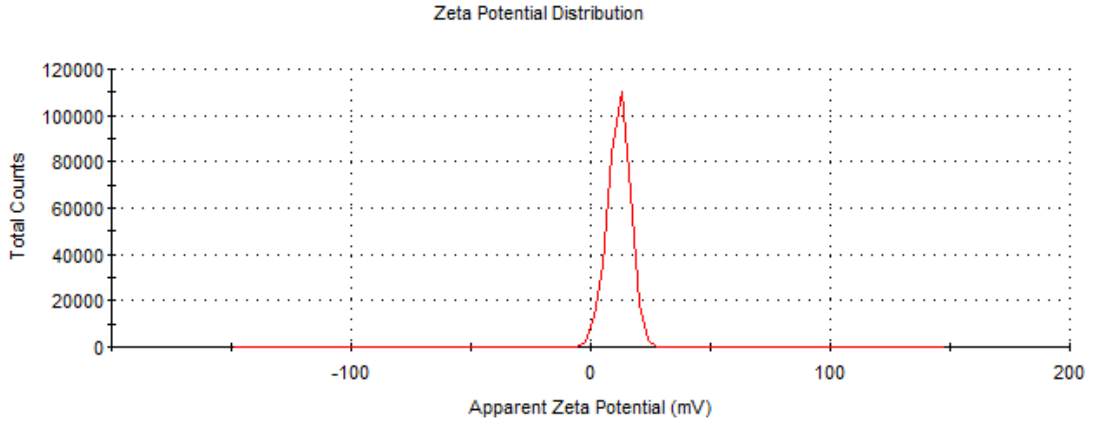
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 124,1	Peak 1: 146,0	98,8	60,04
Pdl: 0,203	Peak 2: 4784	1,2	731,0
Intercept: 0,825	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality : Good			



Şekil 4.8: n₁B32'e ait boyut ve dağılım grafiği

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 14,7	Peak 1: 14,7	100,0	3,11
Zeta Deviation (mV): 3,11	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0137	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

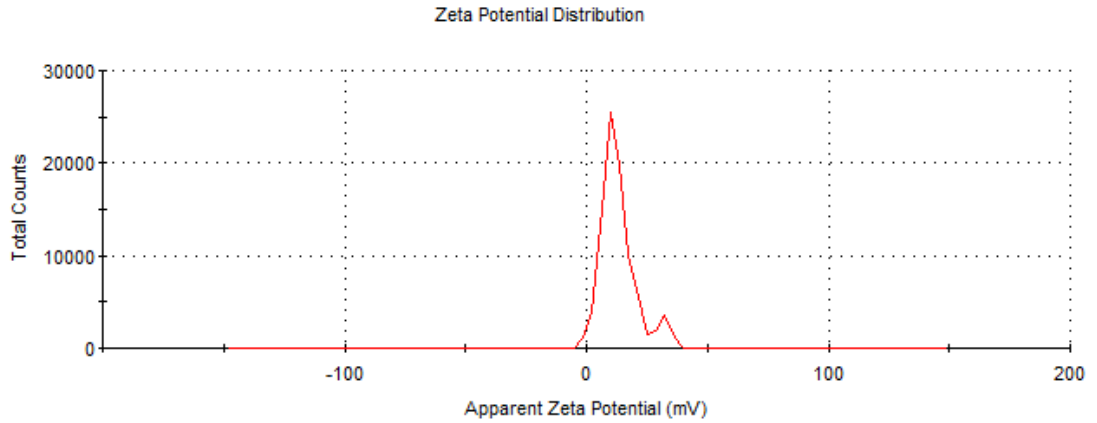
Result quality : **Good**



Şekil 4.9: n₁B31'e ait zeta potansiyeli grafiği.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 13,1	Peak 1: 11,6	91,0	5,22
Zeta Deviation (mV): 7,37	Peak 2: 30,6	9,0	3,58
Conductivity (mS/cm): 0,00865	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : **Good**



Şekil 4.10: n₁B32'e ait zeta potansiyeli grafiği.

Bölüm 4.3'de yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda en başarılı bulunan n₁B31, n₁B32 formülasyonlarının ve diğer n₁B33 formülasyonunun ileri optimizasyon çalışmaları Bölüm 3.3.2'de belirtilen yöntemle göre polimer çözeltisi/deiyonize su oranları değiştirilerek

gerçekleştirildi ve nanopartikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları Tablo 4.5’de verildi.

Tablo 4.5: n₂B31, n₂B32, n₂B33 formülasyonlarının boyut, dağılım ve zeta potansiyeli sonuçları

n ₂ B3	(Polimer Çöz./Deiyonize Su)(μ L)	Boyut (nm)	PDI _n	Zeta Potansiyeli (mV)
n ₂ B31	(50/1450)	174,4	0,281	13,8 \pm 2,81
n ₂ B31	(100/1400)	99,54	0,347	17,2 \pm 3,68
n ₂ B31	(500/1000)	601,8	0,231	11,1 \pm 3,76
n ₂ B32	(50/1450)	244,8	0,289	9,83 \pm 5,07
n ₂ B32	(100/1400)	214,4	0,417	11,7 \pm 6,4
n ₂ B32	(500/1000)	5387	1	4,56 \pm 4,64
n ₂ B33	(50/1450)	539,4	0,564	9,29 \pm 3,4
n ₂ B33	(100/1400)	314,6	0,366	10,5 \pm 3
n ₂ B33	(500/1000)	1145	0,588	7,12 \pm 3,64

Bölüm 4.3’de verilen Tablo 4.3-5’de verilen sonuçlara dayanılarak Bölüm 3.3.2’de anlatılan yönteme göre, en uygun özelliklerdeki B31 ürünün 5mg/mL ve 10mg/mL konsantrasyonlarında B31-DMSO çözeltileri kullanılarak bu çözeltilerden farklı miktarlarda alınarak farklı miktarda deiyonize su ile tamamlamak suretiyle hazırlanan farklı konsantrasyonlarda, vortex hızında ve süresinde çalışılarak Tablo 4.6’da verilen nB31 formülasyonları elde edildi. Bu sonuçlara göre en uygun boyutu ve dağılım değerlerini veren formülasyonların zeta potansiyelleri de ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.7’de verildi.

Tablo 4.6: B31-DMSO çözeltisi kullanılarak nB31 hazırlanmasında optimizasyon çalışmaları

nB31 No	B31-DMSO çözeltisi kons. (mg/mL)	B31-DMSO çözeltisi hacmi (μL)	Su hacmi (μL)	Hız (rpm)	Süre (dk)	Boyut (nm)	nPDI
1	10	1	75	2700	1	438	0,517
2	10	2	50	2700	1	649,3	0,584
3	10	2	50	2700	2	1070	0,759
4	10	2	50	3000	2	1251	0,894
5	10	2	100	2700	1	598,1	0,477
6	10	2	100	3000	1	440,6	0,622
7	10	2	100	2700	2	562,4	0,526
8	10	2	100	3000	2	728,7	0,539
9	10	2	150	3000	1	443,7	0,374
10	10	2	200	3000		417,9	0,427
11	10	2	200	3000	2	411,8	0,455
12	10	3	50	2700	1	657,9	0,53
13	10	3	50	3000	1	1446	1
14	10	3	100	2700	1	637,7	0,566
15	10	3	100	3000	1	740,5	0,521
16	10	3	150	3000	1	555,9	0,521
17	10	3	200	2400	1	729,6	0,445
18	10	3	200	2400	2	900	0,333

Tablo 4.6 (devam): B31-DMSO çözeltisi kullanılarak nB31 hazırlanmasında optimizasyon çalışmaları.

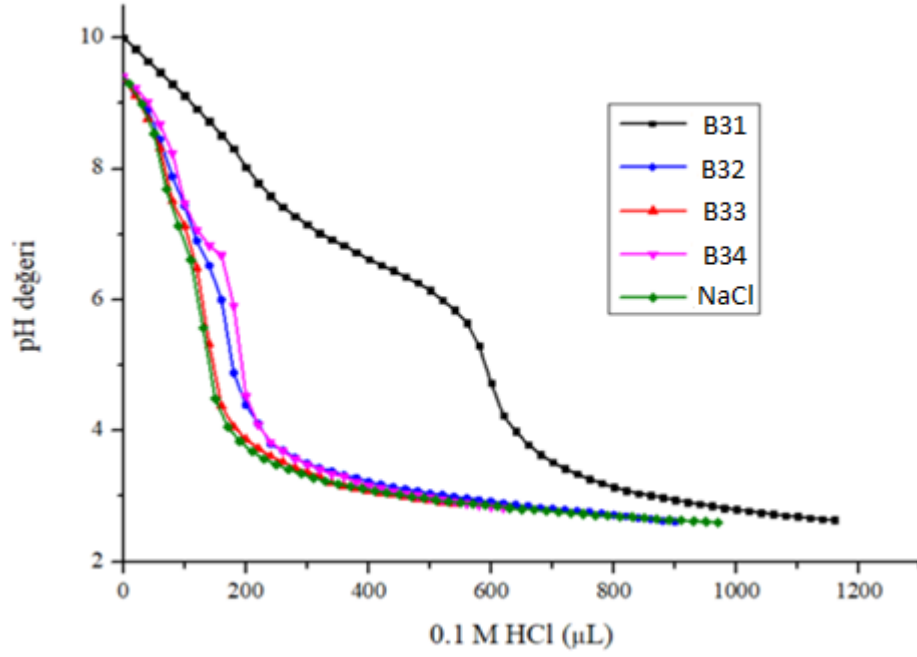
19	10	3	200	2700	1,5	553,8	0,372
20	10	3	200	3000	1	302,6	0,408
21	10	3	200	3000	2	293,9	0,325
22	10	3	225	3000	1	274	0,266
23	10	3	250	3000	1	312,3	0,379
24	10	4	300	3000	1	272	0,239
25	10	5	50	2700	0,5	815,5	0,555
26	10	5	50	2700	1	747,8	0,718
27	10	5	50	3000	1	1610	1
28	10	5	50	3000	2	2187	1
29	10	5	100	2700	2	434,5	0,507
30	10	5	200	2700	1	668	0,644
31	10	5	200	3000	1	468,5	0,471
32	10	5	200	3000	2	707,9	0,636
33	10	6	500	3000	1	350,5	0,3
34	10	10	50	3000	1	1129	0,828
35	10	10	50	3000	2	395,4	0,631
36	10	10	500	3000	1	2085	1
37	5	3	112,5	2700	1	205	0,142
38	5	5	187,5	2700	1	193,8	0,09
39	5	6	225	2700	1	205,8	0,183
40	5	13	450	2700	1	205,3	0,237
41	5	200	1300	2700	1	248,6	0,03

Tablo 4. 7: Tablo 4.6'da verilen nanopartikül sonuçlarına göre en uygun değerleri veren formülasyonların zeta potansiyelleri

nB31 No	B31-DMSO çözeltisi kons. (mg/mL)	B31-DMSO çözeltisi hacmi (µL)	Su Hacmi (µL)	Hız (rpm)	Süre (dk)	Zeta Potansiyeli (mV)
37	5	3	112,5µL	2700	1	21,3±2,1
38	5	5	187,5µL	2700	1dk	19,1±4,17
39	5	6	225 µL	2700	1dk	20,8±5,57
40	5	13	450µL	2700	1dk	17,34±4,18
41	5	200	1300µL	2700	1dk	18,1±2,26

4.3. B31,B32,B33,B34 PBAE ÜRÜNLERİNE AİT TAMPON KAPASİTESİ

B31,B32,B33,B34 PBAE ürünlerinin proton tampon kapasiteleri Bölüm 3.3.3'te anlatılan yöntemle göre belirlendi. Ürünlere ait tampon kapasiteleri grafikleri Şekil 4.11'de verildi. Tampon kapasiteleri B31 ürünü için 5,67, B32 ürünü için 1,34, B33 ürünü için 1,41, B34 ürünü içinse 1,67 mmol H⁺/ 1 g polimer olarak hesaplandı.



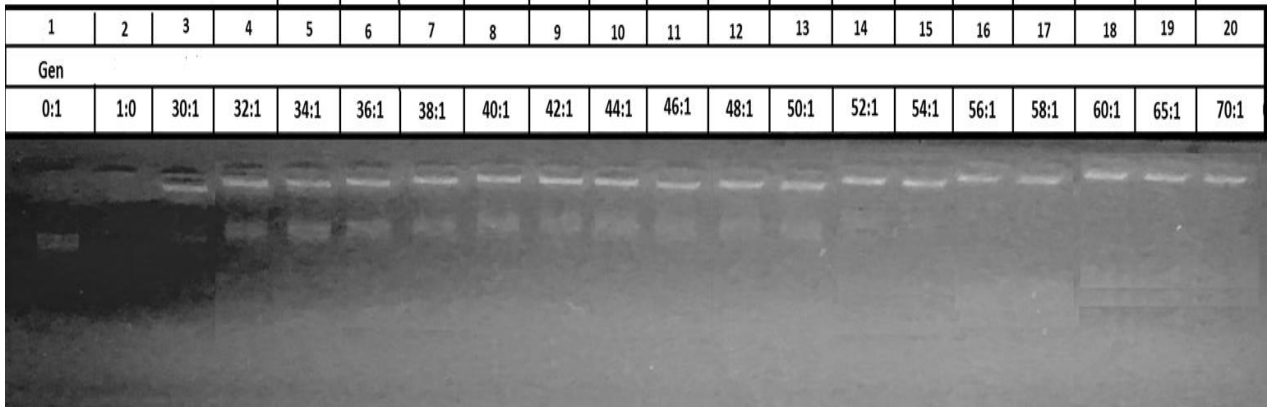
Şekil 4.11: B31, B32, B33, B34 PBAE'leri Tampon Kapasitesi Grafiği

4.4. B31 VE B32 ÜRÜNLERİNİN JEL ELEKTROFOREZ ANALİZLERİ

Bölüm 3.3.5'de belirtilen yöntemle gerçekleştirilen jel elektroforez denemesinde B31 ve B32 PBAE'leri kullanıldı. Polimer-gen kompleksi oluşturulmasında kullanılan polimer konsantrasyonu 1mg/mL'dir. Tablo 4.8'de B31 PBAE ürününün jel elektroforez denemesine ait oranlar verildi. B32 PBAE ürününün jel elektroforez denemesine ait oranlar ise Tablo 4.9'da verildi. Tablo 4.8'de verilen polimer/gen (a/a) oranına göre elde edilmiş olan gnB31 kompleksine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.12'de verildi. Tablo 4.9'da verilen polimer/gen (a/a) oranına göre elde edilmiş olan gnB32 kompleksine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.13'de verildi.

Tablo 4.8: B31 PBAE ürününün jel elektroforez denemesinde kullanılan oranlar

Ürün	Sıra	Oran	Polimer Miktarı (µL)	Gen Miktarı (µL)	Su miktarı (µL)
Gen (912,57 ng/µL)	1	0:1	-	1,095	7,902
	2	1:0	1	-	50
Polimer B32 (1:0)	3	30:1	30	1,095	50
	4	32:1	32	1,095	50
	5	34:1	34	1,095	50
	6	36:1	36	1,095	50
	7	38:1	38	1,095	50
	8	40:1	40	1,095	50
	9	42:1	42:	1,095	50
	10	44:1	44	1,095	50
	11	46:1	46	1,095	50
	12	48:1	48	1,095	50
	13	50:1	50	1,095	50
	14	52:1	52	1,095	50
	15	54:1	54	1,095	50
	16	56:1	56	1,095	50
	17	58:1	58	1,095	50
	18	60:1	60	1,095	50
	19	65:1	65	1,095	50
	20	70:1	70	1,095	50

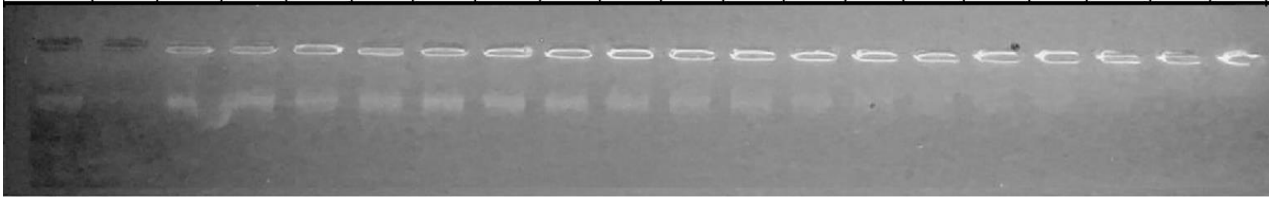


Şekil 4.112: gnB31jel elektroforez sonuçları

Tablo 4. 9: B32 PBAE ürününün jel elektroforez denemesinde kullanılan oranlar

Ürün	Sıra	Oran	Polimer Miktarı (µL)	Gen Miktarı (µL)	Destile Su (µL)
Gen (912,57 ng/µL)	1	0:1	0:1	1,095	7,902
	2	1:1	1:1	-	50
Polimer B32 (1:0)	3	30:1	30	1,095	50
	4	32:1	32	1,095	50
	5	34:1	34	1,095	50
	6	36:1	36	1,095	50
	7	38:1	38	1,095	50
	8	40:1	40	1,095	50
	9	42:1	42:	1,095	50
	10	44:1	44	1,095	50
	11	46:1	46	1,095	50
	12	48:1	48	1,095	50
	13	50:1	50	1,095	50
	14	52:1	52	1,095	50
	15	54:1	54	1,095	50
	16	56:1	56	1,095	50
	17	58:1	58	1,095	50
	18	60:1	60	1,095	50
	19	65:1	65	1,095	50
	20	70:1	70	1,095	50

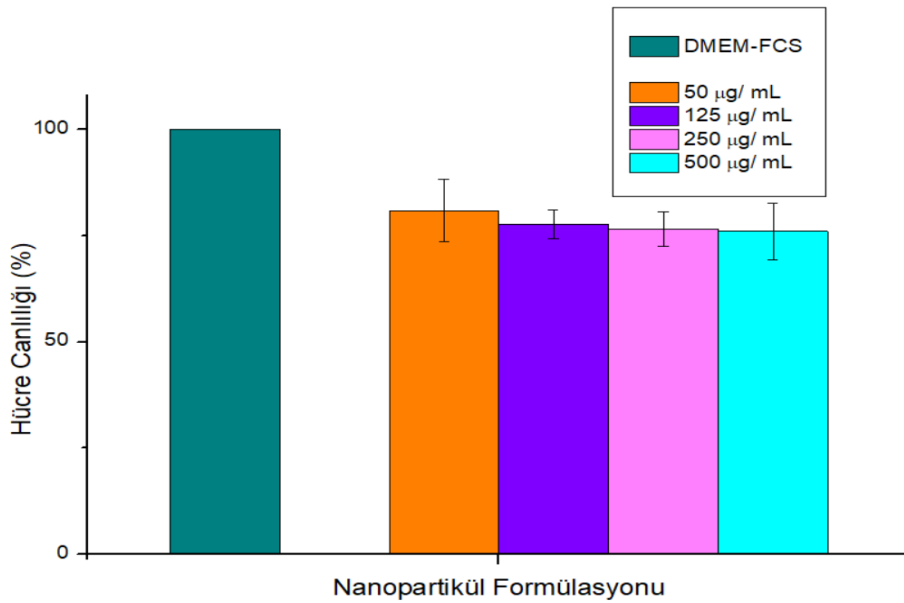
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Gen																			
0:1	1:0	30:1	32:1	34:1	36:1	38:1	40:1	42:1	44:1	46:1	48:1	50:1	52:1	54:1	56:1	58:1	60:1	65:1	70:1



Şekil 4.13: gnB32 jel elektroforez sonuçları

4.5. PBEA ÜRÜNLERİNİN MTT TESTİ İLE SİTOTOKTİSİTE KARAKTERİSTİKLERİNİN BELİRLENMESİ

nB31 formülasyonlarına ait sitotoksisite çalışmaları Bölüm 3.3.6'da belirtilen MTT test yöntemine göre yapıldı. Sitotoksisite çalışmasında hücre tipi olarak HEK293 hücre hatları kullanıldı ve her bir kuyucuğa 10000 hücre gelecek şekilde çalışıldı. Sonuçlar Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.124: nB31 formülasyonunun HEK293 hücrelerine toksisitesi.

4.6. *İN VİTRO* TRANFEKSİYON ETKİNLİĞİ ÇALIŞMALARI

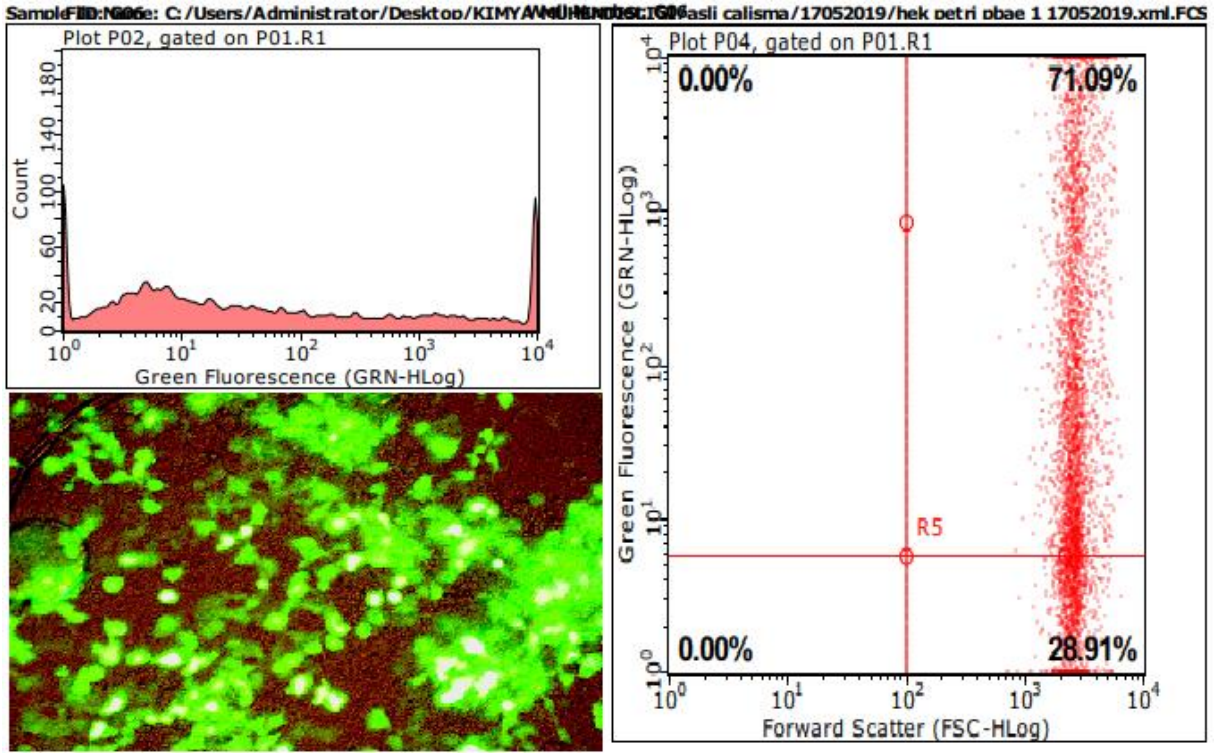
Bölüm 4.3’de belirtilen optimizasyon çalışmalarına, Bölüm 4.1’de verilen sentez ve karakterizasyon çalışmalarına, daha önceki bölümlerde anlatılan tüm analiz sonuçlarına ve uygulama yöntemlerine göre uygun özelliklere sahip olan n₁B31 ürünün *in vitro* transfeksiyon etkinliği HEK293 hücrelerinde Bölüm 3.3.8’de belirtilen yöntemle göre incelendi ve deneyler 2 kez tekrarlandı. Sonuçlar Tablo 4.10-11 ve Şekil 4.15-16’da verildi.

Tablo 4.10: DMSO ortamında hazırlanmış nB31 formülasyonlarının HEK293 hücrelerine transfeksiyon etkinliğine ait sonuçlar.

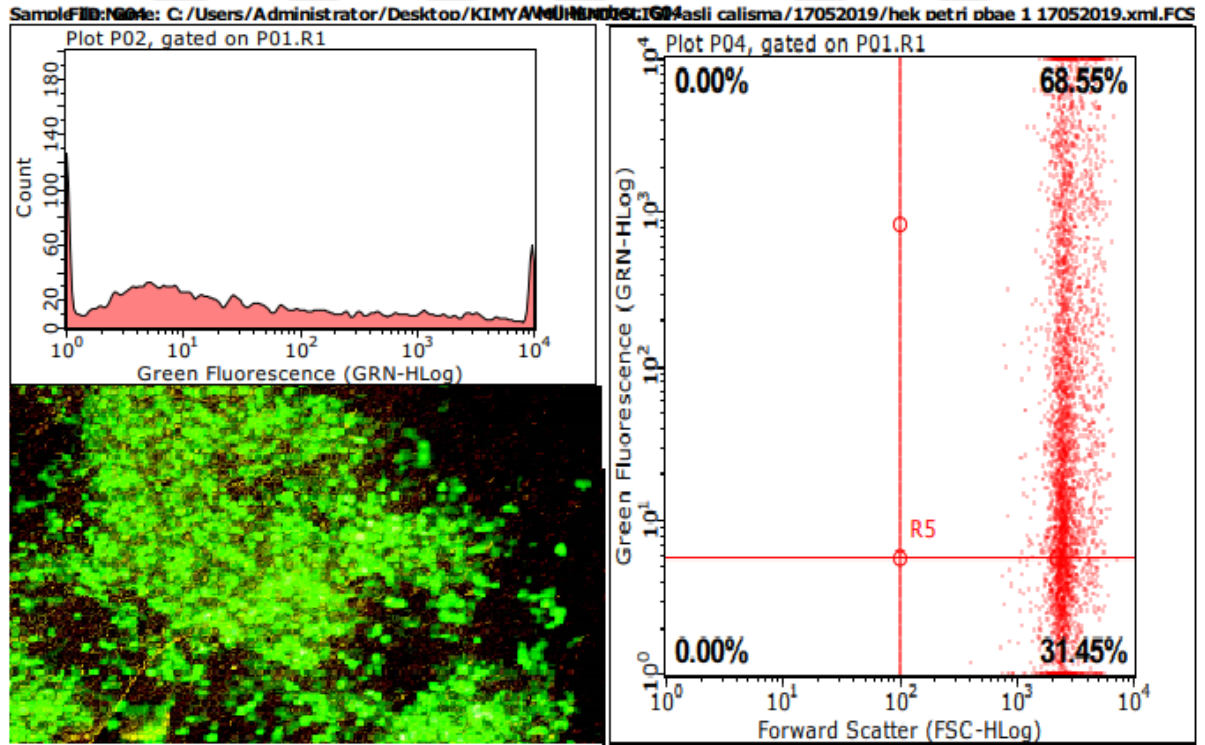
Nanopartikül Formülasyonu	Polimer: pDNA Oranı (a µg /a µg)		Miktar (µg)		Hacim (µL)			Hücre Tipi	Hücre Miktarı	Çözücü Ortamı	Transfeksiyon Etkinliği %
	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Toplam				
ignB31 (250PBS)	60	1	60	1	12	1	13	HEK293	35000	DMSO	41,38
ignB31 (250PBS)	80	1	80	1	16	1	17				48,10
ignB31 (250PBS)	100	1	100	1	20	1	21				25,16
ignB31 ₁ (250PBS)	60	1	120	2	24	2	26				45,64
ignB31 ₁ (250PBS)	80	1	160	2	32	2	34				49,94
ignB31 ₁ (250PBS)	100	1	200	2	40	2	42				50,4
ignB31 ₂ (500PBS)	60	1	60	1	12	1	13				29,18
ignB31 ₂ (500PBS)	80	1	80	1	16	1	17				25,64
ignB31 ₂ (500PBS)	100	1	100	1	20	1	21				29,2
egnB31 (250PBS)	60	1	60	1	12	1	13				25,39
egnB31 (250PBS)	80	1	80	1	16	1	17				71,09
egnB31 (250PBS)	100	1	100	1	20	1	21				68,55
B31 PBAE Konsantrasyonu: 5 mg/mL								Gen Konsantrasyonu: 1,0 µg/µL			

Tablo 4.11: NaAc ortamında hazırlanmış nB31 formülasyonlarının HEK293 hücrelerine transfeksiyon etkinliğine ait sonuçları.

Nanopartikül Formülasyonu	Polimer : pDNA Oranı (a µg /a µg)		Miktar (µg)		Hacim (µL)			Hücre Tipi	Hücre Miktarı	Çözücü Ortamı	Transfeksiyon Etkinliği (%)
	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Polimer	Gen	Toplam				
ignB31 ₁ (250PBS)	60	1	60	1	12	1	13	HEK293	35000	NaAc	18,35
ignB31 ₁ (250PBS)	80	1	80	1	16	1	17				10,87
ignB31 ₁ (250PBS)	100	1	100	1	20	1	21				6,65
ignB31 ₂ (500PBS)	60	1	60	1	12	1	13				6,63
ignB31 ₂ (500PBS)	80	1	80	1	16	1	17				2,7
ignB31 ₂ (500PBS)	100	1	100	1	20	1	21				1,19
egnB31 (250PBS)	60	1	60	1	12	1	13				13,66
egnB31 (250PBS)	80	1	80	1	16	1	17				10,91
egnB31 (250PBS)	100	1	100	1	20	1	21				6,12
B31 PBAE Konsantrasyonu: 5 mg/mL								Gen Konsantrasyonu: 1,0 µg/µL			



Şekil 4.15: egnB31 (250 PBS) formülasyonu; polimer:gen oranı 80:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücrelerinin akış ölçerlerde gösterdiği etkinlik.



Şekil 4.16: egnB31 formülasyonu; polimer:gen oranı 100:1 (a/a) transfekte olan HEK293 hücrelerinin akış ölçerlerde gösterdiği etkinlik. |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

[Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmanın amacı, sentetik polimer esaslı yeni bir viral olmayan gen taşıyıcı nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi, karakterizasyonu ve gen taşıma kapasitesinin incelenmesidir. Bu amaçla yapılan kaynak araştırması ışığında son yıllarda viral olmayan polimerik nanopartiküller sistemler arasında araştırmacılar tarafından ilgi gören PBAE esaslı gen taşıyıcı nanopartikül formülasyonlarının sentezi için bir diakrilat monomerine karşılık dört farklı amin monomeri ile üç farklı sentez yöntemine göre ürünler hazırlandı. Sentezlenen tüm ürünlerin FTIR analizi ile yapıları aydınlatılarak üç farklı açıdan tarama yapabilen ışık saçılma dedektörü içeren GPC-SEC sistemi ile ortalama molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksleri belirlendi. Karakterizasyon işlemleri sonrası öncelikle proton tampon kapasitesi belirlendi ardından en uygun fiziksel özelliklere sahip nanopartikül formül veya formülasyonların eldesi için nanoçöktürme yöntemi ile farklı parametreler denenerek nanopartikül formülasyonları hazırlandı.

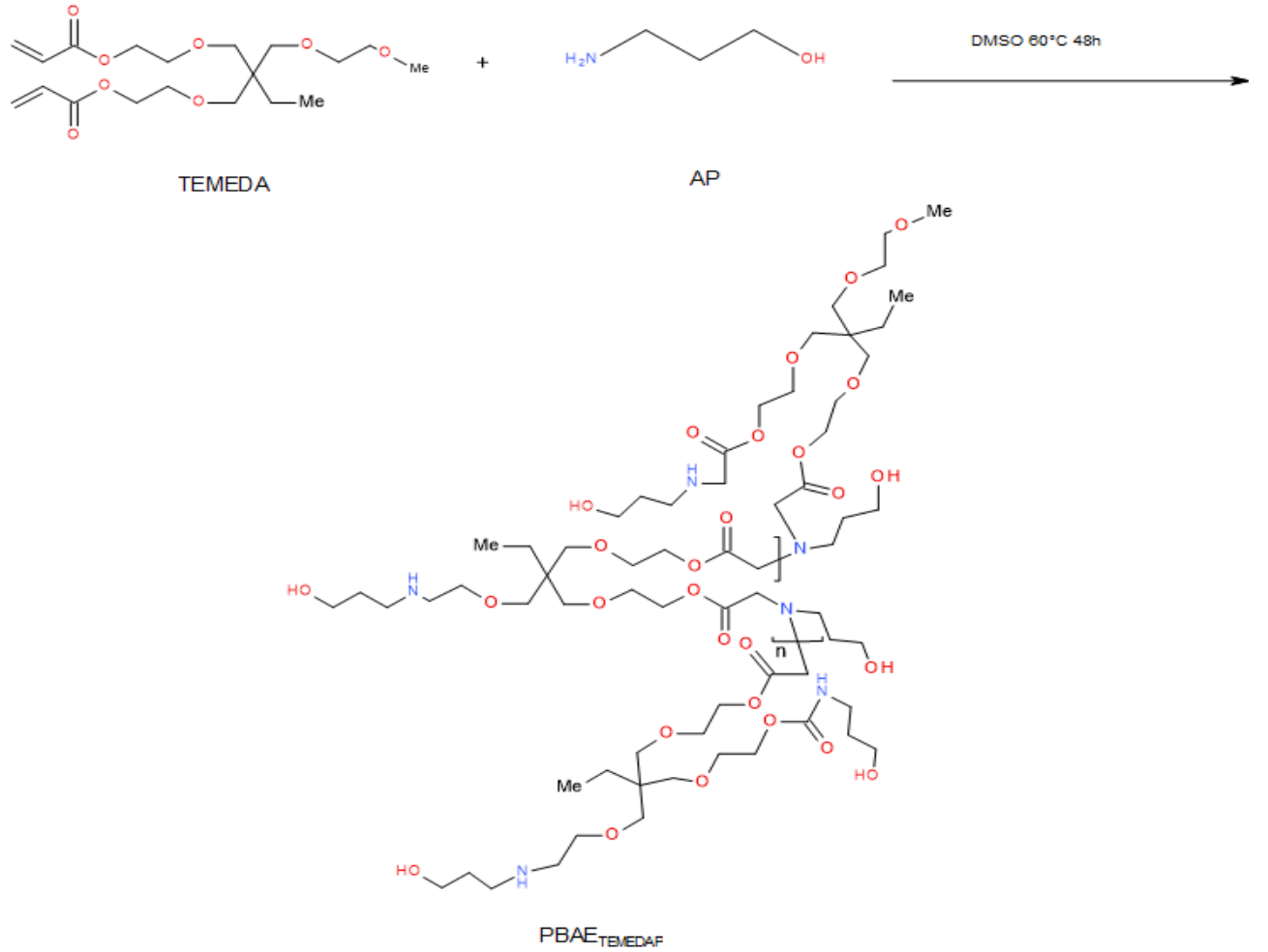
Değişen polimer-pDNA oranlarında (a/a) hazırlanan nanopartikül formülasyonları jel elektroforezde yürütülerek transfeksiyon çalışmaları için en az gerekli olan oran belirlendi. Transfeksiyonda kullanılacak nPBAE ürününün MTT tekniği ile HEK293 hücrelerine sitotoksisite özelliği incelendi. pDNA yüklenmiş PBAE esaslı nanopartiküllerin transfeksiyon etkinliği HEK293 hücre hattı kullanılarak incelendi. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

5.1. SENTEZ VE KARAKTERİZASYON

5.1.1. PBEA Ürünlerinin Sentezi

Çalışma da PBAE polimerlerinin sentez optimizasyonu kapsamında TEMEDA monomerine karşılık dört farklı amin monomeri; DAMP, EDA, AP , HEEDA kullanılarak üç ayrı sentez yöntemi (A:THF içerisinde çözülerek, B: Çözücüsüz Sentez Yöntemi, C: DMSO içerisinde çözülerek) kullanılarak gerçekleştirildi. Optimizasyon reaksiyonları kapsamında A kısaltması ile belirtilen diakrilat ve amin monomerlerinin THF içerisinde çözülerek reaksiyon sonunda dietileterde çöktürme yöntemi ile elde edilmesi planlandı. İlk üç amin monomeri kullanılarak sentezlenmesi amaçlanan PBAE'lerin çökmediği, dördüncü amin monomeri olan HEEDA

kullanılarak elde edilen PBAE ürününün ise çöktüğü görüldü. Sentez optimizasyonları kapsamında B kısaltması ile verilen çözücüz sentez yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrası PBAE ürünleri başarıyla elde edilmiştir. Benzer şekilde yine sentez optimizasyonları kapsamında PBAE'ler C kısaltması ile gösterilen sentez yöntemi ile Tablo 4.1'de verilen diakrilat ve amin monomerlerinden DMSO içerisinde çözülerek elde edildi. Tez kapsamında en uygun özelliklere sahip nanopartikül formülasyonu olan nB3 grubu *in vitro* transfeksiyon deneylerinde kullanıldığından, B3 PBAE ürünü TEMEDA ve AP monomerlerinin Michael Katılma reaksiyonuyla ilerleyen polikondenzasyondan elde edilen B3 PBAE ürününe ait reaksiyon mekanizması Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1: TEMEDA ve AP reaksiyon mekanizması.

5.1.1. B1, B2, B3, B4, B31, B32, B33, B34 Ürünlerinin FTIR Spektrası

Bölüm 5,1'de belirtildiği gibi A kısaltmasıyla verilen sentez yöntemine göre sentezlenmesi amaçlanan A1,A2, A3 PBAE'lerinin çökmemesi, dördüncü amin monomeri olan HEEDA kullanılarak elde edilen PBAE ürününün ise çökmesine karşılık bir sonraki ön çalışma olan nanopartikül eldesinde istenilen sonuçları vermemesi sebebiyle A1, A2, A3 ve A4 ürünlerinin FTIR ile karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilse de tez kapsamında verilmemiştir.

Benzer şekilde yine sentez optimizasyonları kapsamında Bölüm 4.1'de verilen C kısaltması ile belirtilen sentez yöntemine göre diakrilat ve amin monomerlerinin DMSO içerisinde çözülerek elde edilmesi planlandı. Bütün amin bileşikleri kullanılarak elde edilen PBAE ürünlerinin hepsinde ürün eldesi gerçekleşmiş olsa da bir sonraki adım olan ön çalışma kapsamında nanopartikül formülasyonlarının eldesinde istenilen sonuçların elde edilememesi sebebiyle FTIR ile karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilse de tez kapsamında bunlara ait FTIR spektra verilmemiştir.

Bununla beraber B kısaltması ile verilen çözücüsüz sentez yöntemine göre her 8 üründe sentezlenmiş olup FTIR ile karakterizasyonları ve GPC-SEC sistemi ile ortalama molekül ağırlıkları ve PDI'ları belirlendikten sonra ön nanopartikül çalışmaları kapsamında elde edilen nanopartikül formülasyonları *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için uygun fiziksel özellikler verdiği için FTIR ile karakterizasyonları Şekil 4.1-4.4 arasında verilmiştir.

B grubu PBAE ürünlerinin FTIRspektrasına bakıldığında; her dört spektrada da görüldüğü üzere diakrilat monomerinde yer alan vinil gruplarının gerilme titreşimlerinden ileri gelen $1640-1635\text{ cm}^{-1}$ aralığında bulunan keskin absorpsiyon pikinin şiddetinin azalması (B1'de maks. 1652 cm^{-1} 'de, B2'de maks. 1650 cm^{-1} 'de ve B4'de ise maks. 1630 cm^{-1} 'de bulunan keskin pikinin şiddetinin azalmış olması, B3 ürünüde ise 1638 cm^{-1} 'de bulunan çok küçük keskin pikinin bulunması, oluşan PBAE ürününün reaksiyon karışımından saflandırılarak ayrılmadığı için az da olsa ortamda bulunan serbest diakrilat monomerinin varlığını göstermektedir, $3100-3500\text{ cm}^{-1}$ de bulunan B1 ve B2 ürünleri için sekonder amin (B1 için maks. 3456 cm^{-1} B2 için maks. 3434 cm^{-1}), B3 ve B4 ürünleri için ise hidroksil gruplarının (B3 için maks. 3450 cm^{-1} ve B4 için maks. 3428 cm^{-1}) deformasyon ve gerilme titreşiminden ileri gelen geniş bandın yer alması, $1750-1725\text{ cm}^{-1}$ de bulunan doymuş alifatik ester yapılarında bulunan C=O bağı gerilme titreşiminden ileri gelen büyük keskin piklerin varlığı

(B1 için maks. 1731 cm^{-1} , B2 için maks. 1733 cm^{-1} , B3 için maks. 1733 cm^{-1} ve B4 için maks. 1732 cm^{-1}), $1590\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ aralığında bulunan $\text{H}_2\text{C-NH-CH}_2$ gruplarına ait gerilme titreşiminden ileri gelen küçük absorpsiyon pikinin varlığı (B1 için maks. 1551 cm^{-1} ve B2 için maks. 1556 cm^{-1}), $1475\text{-}1460$ bölgesinde bulunan ester yapılarda bulunan $-\text{CH}_2$ deformasyonuna ait simetrik gerilme titreşiminden kaynaklanan pikinin varlığı (B1 için maks. 1465 cm^{-1} , B2 için maks. 1464 cm^{-1} , B3 için maks. 1461 cm^{-1} ve B4 için maks. 1462 cm^{-1}) ve ayrıca $1190\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ aralığında sekonder amin gruplarındaki C-N, N-H bağlarının deformasyon titreşimlerine ait küçük ve keskin bandlar veya omuzların bulunması (B1 için maks.ları $1189, 1111\text{ cm}^{-1}$, B2 için maks.ları $1187, 1112\text{ cm}^{-1}$, B3 için maks.ları $1182, 1113\text{ cm}^{-1}$ ve B4 için maks.ları $1189, 1112\text{ cm}^{-1}$) PBAE yapıların oluştuğunu doğrulamaktadır.

Benzer şekilde Bölüm 3.3.1'de belirtilen B3 ürününün sentez koşullarında farklı diakrilat:amin oranları çalışılarak elde edilmiş olan B31, B32, B33 ve B34 PBAE ürünlerinin Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilen FTIR spektrasına bakıldığında; her dört spektrada da görüldüğü üzere diakrilat monomerinde yer alan vinil gruplarından ileri gelen $1640\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$ aralığında bulunan keskin absorpsiyon pikinin şiddetinin azalmasının yanı sıra B31'de maks. 1636 cm^{-1} 'de, B32'de maks. 1639 cm^{-1} 'de ve B33 ürününde ise 1632 cm^{-1} 'de bulunan çok küçük keskin pikinin bulunması, B34 ürününde ise 1633 cm^{-1} 'deki pikinin bulunması oluşan PBAE ürününün reaksiyon karışımından saflandırılarak ayrılmadığı için az da olsa ortamda bulunan serbest diakrilat monomerinin varlığını göstermektedir. $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde hidroksil gruplarının varlığından ileri gelen (B31 için max 3446 cm^{-1} , B32 için max. 3450 cm^{-1} , B33 için maks. 3429 cm^{-1} ve B34 için maks. 3427 cm^{-1}) gerilme titreşimi sonucu meydana gelmiş geniş bandın varlığı, $1750\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$ de bulunan doymuş alifatik ester yapılarından kaynaklanan C=O bağı gerilme titreşimi sonucu oluşan büyük keskin piklerin varlığı (B31 için maks. 1734 cm^{-1} , B32 için maks. 1735 cm^{-1} , B33 için maks. 1733 cm^{-1} ve B34 için maks. 1732 cm^{-1}), $1475\text{-}1460$ bölgesindeki ester yapılarda bulunan $-\text{CH}_2$ deformasyonuna ait simetrik gerilme titreşiminden kaynaklanan pikinin varlığı (B31 için maks. 1462 cm^{-1} , B32 için maks. 1463 cm^{-1} , B33 için maks. 1462 cm^{-1} ve B34 için maks. 1461 cm^{-1}) ve ayrıca $1190\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ aralığında C-N, N-H bağlarının deformasyonlarına ait küçük ve keskin bandlar veya omuzların bulunması (B31 için maks.ları $1185, 1113\text{ cm}^{-1}$, B32 için maks.ları $1181, 1114\text{ cm}^{-1}$, B33 için maks.ları $1184, 1113\text{ cm}^{-1}$ ve B34 için maks.ları $1191, 1111\text{ cm}^{-1}$) PBAE yapılarının sentezlendiğini doğrulamaktadır.

5.1.2 GPC/SEC Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ürünlerin ortalama molekül ağırlıkları, Bölüm 3.2.2’de belirtilen GPC-SEC sistemi kullanılarak bulundu. Bölüm 4.1.2’de verilen Tablo 4.2’deki analiz sonuçlarına göre, TEMEDA ve DAMP monomerlerinden oluşan, diakrilat/diamin oranı 1/1,1 olan B1 PBAE ürünün M_n değeri 2,5 kDa, M_w değeri 2,9 kDa ve PDI değeri ise 1,151 olarak bulundu. Sentezlenen ürünün PDI değerinin 1’e çok yakın olması, B1 ürününün homodispers yapıda olduğunu göstermektedir.

TEMEDA ve EDA monomerlerinden oluşan, diakrilat/diamin oranı 1/1,1 olan B2 PBAE ürünün M_n değeri 4,4 kDa, M_w değeri 9,2 kDa ve PDI değeri ise 2,120 olarak bulundu. Sentezlenen ürünün PDI değerinin 2’e yakın olması, B2 ürününün heterodispers yapıda olduğunu göstermektedir.

TEMEDA ve AP monomerlerinden oluşan, diakrilat/amin oranı 1/1,1 olan B3 PBAE ürünün M_n değeri 9,1 kDa, M_w değeri 13,5 kDa ve PDI değeri ise 1,478 olarak bulundu. B3 ürünün PDI değerinin 1,5’a yakın değerde olması, polimerin tam bir monodispers yapıda olmasa da homodispers zincirlerin de varlığını göstermektedir. Burada ki monodispersiteden sapmanın sebebinin özellikle diakrilat monomerinde bulunan dallanmaya müsait fonksiyonel grupların varlığı olduğu düşünülmektedir.

TEMEDA ve HEEDA monomerlerinden oluşan, diakrilat/diamin oranı 1/1,1 olan B4 PBAE ürünün M_n değeri 1,5 kDa, M_w değeri 5,7 kDa ve PDI değeri ise 3,840 olarak bulundu. B4 ürünün PDI değerinin 4’e yakın değerde olması, polimerin heterodispers yapıda olduğunu göstermektedir.

Benzer şekilde B3 ürünün sentez koşulları kullanılarak farklı diakrilat:amin oranları ile elde edilen B31, B32, B33 ve B34 ürünlerinin GPC/SEC analizi sonuçları incelendiğinde; TEMEDA ve AP monomerlerinden oluşan, diakrilat/diamin oranı 1/1,2 olan B31 PBAE ürünün M_n değerinin 9,2 kDa, M_w değerinin 13,7 kDa ve PDI değerinin ise 1,493 olduğu görülmüştür. B31 ürünün PDI değerinin 1,5’e yakın değerde olması, ürünün yukarıda B3 ürününe benzer şekilde tam bir monodispers yapıya sahip olmadığı görülmektedir.

TEMEDA ve AP monomerlerinden oluşan, diakrilat/amin oranı 1/1,3 olan B32 PBAE ürünün M_n değerinin 3,0 kDa, M_w değerinin 3,1 kDa ve PDI değerinin ise 1,026 olduğu görülmüştür.

B32 ürünün PDI değerinin 1'e çok yakın değerinde olması, polimerin homodispers yapıda olduğunu göstermektedir.

TEMEDA ve AP monomerlerinden oluşan, diakrilat/amin oranı 1/1,4 olan B33 PBAE ürünün M_n değeri 0,7 kDa, M_w değeri 1,1 kDa ve PDI değerinin ise 1,443 olduğu görülmüştür.. B33 ürünün PDI değerinin 1,5'e yakın değerinde olması, ürünün homodispers yapıya yakın olmadığını göstermektedir. Bununla beraber M_n ve M_w değerleri incelendiğinde amin monomeri miktarının artmasıyla polikondenzasyonun çok ileri düzeyde olmadığı başka deyişle oligomerik yapıların oluşmasına sebebiyet verdiği görülmüştür.

TEMEDA ve AP monomerlerinden oluşan, diakrilat/amin oranı 1/2 olan B34 PBAE ürünün M_n değerinin 0,6 kDa, M_w değerinin 0,7 kDa ve PDI değerinin ise 1,236 olduğu, ölçülmüştür. B34 ürünün polidisperslik indisinin 1,3'e yakın değerinde olması, ürünün homodispers yapıya yakın olduğunu gösterse de B33 ürününe benzer şekilde amin monomerinin miktarının diakrilatın monomerinin 2 katına çıkmasıyla daha da oligomerik yapıların oluştuğunu doğrulamaktadır.

5.2. PBAE ÜRÜNLERİNDEN ELDE EDİLEN NANOPARTİKÜLLERİN PARTİKÜL BOYUTU, PDI VE ZETA POTANSİYELİ DEĞERLENDİRMESİ

Bu tezle sunulan çalışmada Bölüm 3.3.1'de belirtildiği gibi diakrilat monomeri sabit tutularak dört farklı amin monomeri ile 1:1.1 diakrilat:amin oranı kullanılarak toplamda on iki farklı moleküler PBAE sentezlendi, reaksiyon koşullarının optimizasyonları gerçekleştirildi ve yapıları aydınlatılarak karakterize edildi. Bu ürünlerden *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere nanoçöktürme yöntemi ile Bölüm 3.3.2'de belirtildiği gibi nanopartikül formülasyonları hazırlanıp, partikül boyutu, nPDI ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Bölüm 4.2'de, Tablo 4.1 ve Tablo 4.3'de belirtilen sonuçlara göre A grubu PBAE ürünlerinden A1, A2 ve A3 ürünleri sentez aşamasında çöktürme işlemi gerçekleştirilemediğinden uygulama dışı bırakılmış olup, A4 ürünü ise 227,5 nm partikül boyutu ve 0,599 PDI_n değerleri ile partikül boyutu 200 nm'den büyük ve geniş bir dağılıma sahip olması sebebiyle transfeksiyon çalışmaları için uygun bulunmadı. B grubu PBAE ürünlere bakıldığında ise 151,7 nm partikül boyutu ve 0,138 nPDI değerine sahip B1 ürünü ile 162.1 nm partikül boyutu ve 0,091 PDI_n değerine sahip B3 ürünlerinin *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için kullanımı oldukça uygun bulundu. Bununla beraber 149,9 nm partikül boyutu ve 0,438 PDI_n değerine sahip B2 ürünü

ile 182,5 nm partikül boyutu ile 0,424 PDI_n değerine sahip B4 ürünü de *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için kullanımı uygun gibi gözükse de B1 ve B3 ürünlerinin göstermiş oldukları daha iyi sonuçlar sebebiyle ikinci planda bırakıldı. C grubu ürünlere bakıldığında ise 81,69 nm partikül boyutu sonucu ile C1 ürünü dikkat çekmesine rağmen 0,650 gibi geniş bir PDI_n değeri göstermesi, yine benzer şekilde 113,79 nm partikül boyutu ile C3 ürünü dikkate değer bulunmasına rağmen 0,390 PDI_n değeri göstermesi bu iki ürün de B2 ve B4 ürünleri gibi ikinci planda bırakıldı. Gruplara genel olarak bakıldığında ise B sentez yöntemi ile elde edilen ürünlerin daha iyi sonuçlar verdiği görüldü.

Yukarıda bahsedildiği gibi başarılı bulunan ürünlerin Tablo 4.4'da verilen zeta değeri sonuçlarına bakıldığında ise en iyi sonucu 20,4±7,71 ile B3 ürünün, ardından ikinci sırada ise 12,4±6,2 değerleri ile B1 ürünün verdiği görülmektedir. Bu sebeple bu sonuçlar ışığında bundan sonraki aşamada TEMEDA monomeri ile AP monomerinden 60 °C'de çözücüsüz ortamda 48 saat reaksiyon süresini içeren B sentez yöntemi ile elde edilmiş olan B3 ürününün farklı diakrilat ve amin oranlarında sentezinin optimizasyonlarının yapılmasına karar verildi.

Bölüm 3.3.1'de belirtilen yöntemle göre farklı diakrilat:amin monomer oranları kullanılarak elde edilen ürünlerden Bölüm 3.3.2'de belirtilen yöntemle göre elde edilen nanopartikül formülasyonlarının fiziksel özelliklerine ait sonuçlar Tablo 4.4'de verilmiştir. Bu ürünler arasından özellikle 134,2 nm partikül boyutuna, 0,172 PDI_n değerine ve 14,7±3,11 mV zeta potansiyeli değerine sahip B31 ürünü ile 124,1 nm partikül boyutu, 0,203 PDI_n değeri ve 13,1±7,37 mV zeta potansiyeli değerine sahip B32 ürünü *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için uygun bulundu.

Nanopartikül optimizasyon çalışmaları kapsamında öncelikle polimer çözelti-deiyonize su oranı belirleme kapsamında yapılan, sonuçları Tablo 4.5'de verilen çalışmada özellikle B31 ürünü 50:1450 (174,4 nm partikül boyutu, 0,281 nPDI değeri, 13,8±2,81mV zeta potansiyeli) ve 100:1400 (99,54 nm partikül boyutu, 0,347 nPDI değeri, 17,2±9,68 mV zeta potansiyeli) oranları ile *in vitro* tranfeksiyon çalışmaları için uygun bulunsa da yukarıda bahsi geçmiş olan 200:1300 oranları ile elde edilen sonuçların optimizasyon çalışmaları için daha uygun olduğuna karar verildi.

Kaynaklarda bulunan çalışmalarına bakıldığında özellikle AP monomeri ile sentezlenen gen taşıyıcı sistemlerin zeta potansiyeli değerlerinin özellikle monomerin yapısında bulunan OH

grupları sebebiyle düşük çıktığı ve gen ile kompleks oluşturma (jel elektroforez) ve transfeksiyon çalışmalarında 100:1, 200:1 hatta 300:1 gibi yüksek polimer:gen oranlarında kullanıldığı görülmüştür [56][57]. Elde edilen nanopartikül formülasyonlarında kullanılan DMSO çözücü miktarının hücreler üzerinde yaratacağı negatif etki düşünüldüğünde bu miktarın azaltılması ve buna karşılık nanopartikülün fiziksel özelliklerinde meydana gelen değişiklikleri görmek adına Bölüm 3.3.2’de belirtilen yöntemle göre Tablo 4.6’da verilen oranlarda tekrar optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışma kapsamında 5 mg/mL PBAE:DMSO oranına sahip ürünlerden elde edilen nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için daha uygun fiziksel özelliklere sahip olduğu görüldü. Özellikle Tablo 4.6’da bulunan nB31 yapısındaki 37 numaralı nanopartikül formülasyonununun 193,8 nm boyut, 0,09 PDI_n ve Tablo 4.7’de verilen 21,3±2,1 mV zeta değeri ile *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için en uygun olduğuna karar verildi.

5.3. B31, B32, B33, B34 ÜRÜNLERİNİN TAMPON KAPASİTESİ ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tamponlama kapasitesi vektörün önemli bir özelliğidir ve endozomal kaçış kabiliyeti hakkında bilgi vermektedir. Tamponlama kapasitesi yüksek olan PBAE gen taşıyıcı sistemi gen ile kompleks oluşturup hücreye girdikten sonra endo-lizozomal kaçışı daha kolay gerçekleştirebilmektedir. Özellikle lizozomun asidik ortamı içerisinde membran bütünlüğünün bozulmasını sağlayarak gen kompleksinin kaçışını sağlamaktadırlar. Bunun için çalışma da B31,B32,B33,B34 ürünlerinin tamponlama kapasiteleri Bölüm 3.3.3.’de belirtilen asit baz titrasyon yöntemine göre belirlendi. Buna göre ürünlerin proton tampon kapasiteleri B31; 5,67 mmol H⁺, B32; 1,34 mmol H⁺, B33; 1,41 mmol H⁺ ve B34; 1,67 mmol H⁺ olarak hesaplandı. Şekil 4.11’de de görüldüğü gibi B31 PBAE ürünü en iyi tamponlama özelliğini gösterdi. Diğer ürünlerden B32 ve B34 ürünleri için de az da olsa tampon etkisi görülse de yeterli değildir. B33 ürünü ise hiçbir şekilde bu etkiyi gösterememiştir. Bütün bu sonuçlara göre B31 ürününün sadece geni kompleks yaparak bozunmadan korumanın dışında, aynı zamanda endozomun membran destabilizasyonunu sağlama, pozitif yüklü iyonları yakalayarak lizozomun şişmesini sağlamak, ozmolariteyi arttırmak ve protonizasyon yoluyla endozomun yırtılmasını kolaylaştırmak özelliklerine de sahip olduğu açıktır [54].

5.4. B31 B32 FORMÜLASYONLARININ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Yukarıda da bahsedildiği gibi kaynaklarda bulunan benzeri çalışmalarına bakıldığında AP monomeri kullanılarak sentezlenen gen taşıyıcı sistemlerden elde edilen nanopartikül formülasyonlarının pDNA ile yüksek oranlarda birleşebildiği görüldüğünden dolayı burada da farklı olarak Bölüm 3.3.5’de belirtilen yöntem ve Tablo 4.8-9’da verilen oranlara göre ayrı bir optimizasyon çalışması gerçekleştirildi. Burada özellikle polimer çöz:deiyonize su oranı en iyi nanoapartikül formülasyonu sonuçları veren 200:1300 oranı ile birlikte deiyonize su miktarı 50 µL’de sabit tutularak farklı miktarlarda polimer çözeltisi kullanılarak hazırlanan ürün-pDNA kompleksleri jel elektroforezde yürütülerek pDNA’nın tamamının kompleks oluşturup oluşturmadığına veya hangi oranda oluşturduğuna bakıldı ve sonuçlar Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verildi. Buna göre her iki üründe de polimer çöz:su oranları ile hazırlanan nanopartikül formülsyonları arasında bir fark olmadığı görülmekle birlikte B31 ürünü için 54:1 polimer:gen oranında ve B32 ürünü içinse 60:1 polimer:gen oranında taşıyıcı sistemin pDNA’nın tamamını kompleks haline getirdiği görüldü.

Yukarıda bahsi geçen tüm sentez, karakterizasyon, tampon kapasitesi, nanopartikül sonuçlarına bakıldığında *in vitro* transfeksiyon çalışmaları için en uygun PBAE ürünün B31 ürününden hazırlanan nB31 olduğuna karar verilmiş olup bundan sonraki toksik doz oranı belirleme ve transfeksiyon çalışmalarında bu ürünün kullanımı yönünde karar verildi.

5.5. NB31 FORMÜLASYONUNUN SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

nB31 formülasyonlarının sitotoksosite analizleri Bölüm 3.3.6’da belirtilen MTT yöntemine göre ve Bölüm 4.5’de belirtildiği şekilde HEK293 hücre hattı kullanılarak dört farklı konsantrasyon aralığı (50 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL) kullanılarak gerçekleştirildi. Pozitif kontrol grubu olarak hiç nanopartikül formülasyon katılmamış grup kullanıldı. Şekil 4.14’de verilen sonuçlara bakıldığında 50 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyon aralıkları için %80,9, %77,6, %76,5 ve %75,9 hücre canlılığı oranları görülmüştür. Özellikle Bölüm 4.6’da belirtilen *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında kullanılan derişimlerde herhangi bir toksikasyon görülmediği gibi ayrıca burada kullanılan değerlerin üzerinde konsantrasyon değerlerine sahip (125 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL)

değerlerde bile herhangi bir yüksek toksikasyon görülmemiştir. Bu sonuçlar ışığında nB31 formülasyonu ile elde edilen gen kompleksleri ile *in vitro* transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirildi.

5.6. NB31 FORMÜLASYONUNUN *İN VİTRO* TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİ SONUÇLARI

nB31 formülasyonunun *in vitro* transfeksiyon etkinliği HEK293 hücrelerinde Bölüm 3.3.8’te belirtilen yonteme göre Bölüm 4.6’daki denemelerle yapıldı. Bulgular Tablo 4.10-11’de ve Şekil 4.15-16 verildi. *In vitro* transfeksiyon çalışmalarında kullanılan hücre sayısı 35000 olmakla birlikte bu tez çalışması ile elde edilen nanopartikül formülasyonların yanında kaynaklarda [48] uygulanan sodyum asetat (NaAc) tamponu ile de elde edilen nanopartikül formülasyonları ile de transfeksiyon etkinliği denemeleri karşılaştırma amacıyla gerçekleştirildi. Sonuçlara bakıldığında özellikle enkapsülasyon yapılarak ve PBS ortamı içerisinde elde edilen gen komplekslerinde daha yüksek transfeksiyon etkinliği sonuçları görülürken, iyonik jelasyon mekanizması ile olanlarda ise daha düşük sonuçlar görülse de kaynaklarda belirtilenlerle kabul edilebilir oranlar olduğu görüldü. Özellikle egnB31₁ (250PBS) ürünü 80:1 ve 100:1 oranlarında %71,09 ve %68,55 transfeksiyon etkinliği sonucu göstermiştir. Kaynaklardaki çalışmalara bakıldığında kabul edilebilir transfeksiyon etkinliğine sahip ignB31₁ (250PBS) ürünü ise 80:1 ve 100:1 oranlarında %49,94 ve %50,4 değerlerinde transfeksiyon etkinliği göstermişlerdir. Nanopartikül formülasyonu eldesinde NaAc tamponu kullanıldığında *in vitro* transfeksiyon değerlerinin ise ancak %15-%20 aralığı gibi düşük olduğu görüldü.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında sentezlenmiş nB31 PBAE ürününden elde edilen enkapsülasyon yöntemi ile hazırlanmış gen komplekslerinin transfeksiyon çalışmalarında daha başarılı olduğu görülmüştür. Bunun en büyük sebebinin ise nB31 formülasyonunun özellikle yüksek tampon kapasitesine sahip olması dolayısıyla endo-lizozomal kaçışı gerçekleştirerek geni hücre içi-dışı dış etkenlerden koruması ve ardından sitoplazma içerisinde bu kompleks yapının bozularak genin çekirdeğe yönlenmesidir. Neticesinde de ilgili genin çekirdekte yer alan gen dizilimine katılarak ilgili proteinin üretilmesini sağlayarak kuvvetli yeşil floresans ışımaların görülmesidir (Şekil 4.14-15).

5.7 SONUÇLAR

Bu tezle sunulan çalışmada gerçekleştirilen tüm deneylerin sonuçları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, bu tez çalışması ile ilk defa TEMEDA ve AP monomerlerinden sentezlenen biyoyumlu PBAE ürününden hazırlanan nanopartiküler gen taşıyıcı sistemlerin HEK293 hücre hattında:

- ✓ *In vitro* transfeksiyon etkinliği yüksek,
- ✓ Toksik olmayan gen transfer sistemleri olarak kullanılabilceği saptandı
- ✓ Viral veya piyasada hali hazırda bulunan viral olmayan taşıyıcılarla gerçekleştirilen çalışmalarla kıyaslandığında benzer şekilde transfeksiyon etkinliği gösterebilen bu taşıyıcı sistemlerin araştırma-geliştirmeye yönelik çalışmalarda kullanılabilcek ticari bir kit ürününe dönüşme potansiyeline sahip olduğu da görüldü. ,

Çalışmanın devamında, bu çalışmada sentezlenen nPBAE formülasyonları ile bilhassa günümüze kadar yapılan çalışmalarda transfeksiyon etkinliğinin düşük olduğu belirtilen diğer hücre hatlarında *in vitro* çalışmaların yapılması öngörülmektedir.

|

KAYNAKLAR

- [1] Mazzeo, P., 1999, A unifying concept: the history of cell theory. *Nature Cell Biology*, 1(1), E13-E15.
- [2] Hajdu, S. I., 2002, A note from history: Introduction of the cell theory. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 32(1), 98-100.
- [3] Rye, C. and Wise, R., 2003, *Module 1: Introduction to Biology*, Biology, Chapter 4.2, Prokaryotic Cells, Opentask, Texas, ISBN: 1-947172-02-6, 108.
- [4] Chen, A., & Moy, V. T., 2000, Cross-Linking of Cell Surface Receptors Enhances Cooperativity of Molecular Adhesion. *Biophysical Journal*, 78(6), 2814–2820.
- [5] Goodman, V., 2016, *Cell Membrane Structure*, <https://slideplayer.com/slide/7345279/>, [Ziyaret Tarihi: 25 Mayıs 2019].
- [6] Bolsover, S. R., 2004, *Cells and Tissues*, Cell biology : A short course (2nd ed.). Hoboken, N.J.(ed).1, A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, ISBN 0-471-26393-1, 3-10.
- [7] Edidin, M., 2003, Lipids On The frontier: A Century of Cell-Membrane Bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 414–418.
- [8] Perrimon, N., & Bernfield, M., 2000, Specificities of Heparan Sulphate Proteoglycans in Developmental Processes, *Nature*, 404(6779), 725–728
- [9] Conner, S. D., & Schmid, S. L., 2003, Regulated Portals of Entry Into The Cell, *Nature*, 422(6927), 37–44.
- [10] Anderson, R. G. & Jacobson, K., 2002, A Role For Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains, *Science* 296, 1821–1825.
- [11] R. Delatouchea , M. Mondona , F. Colletted , Ch. Bachmannb , G. Frapperb , Ch. Lenc , V. Heroguezd , Ph. Bertrand., 2012, Development of New Trizolyl-Based Acidic Sensitive Releasing Systems, *Latvian Journal of Chemistry*, No 1/2, 2012, 41–48.

- [12] Luby-Phelps, K.,2000, Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: Volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area, *A Survey of Cell Biology*, 192, 189-221.
- [13] W. Min., Jiang, W., Liu. X., Ling. J.J., Chen. J., Ting F. Zhu.,2019, Mirror-image gene transcription and reverse transcription, *Chem* 5, 1–10.
- [14] Wirth. T., Parker N., Ylä-Herttuala. S.,2013, History of gene therapy, *Gene* 525, 162–169.
- [15] Rosenberg, S.A., Anderson, W.F., Blaese, M., Hwu, P., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Ettinghausen, S.E., 1993. The development of gene therapy for the treatment of cancer, *Ann. Surg*, 218, 455–463 (discussion 463–4).
- [16] Ramamoorth, M.,2015, Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, Vol-9(1): GE01-GE06.
- [17] Friedmann, T.,1997, The Road toward Human Gene Therapy-A 25-year Perspective, *Annals of Medicine*, 29(6), 575–577.
- [18] Blaese RM.,1997, Gene therapy for cancer, *Sci Am*, 276: 111-5.
- [19] Ross, G., Erickson, R., Knorr, D., Motulsky, A. G., Parkman, R., Samulski, J., Smith, B. R.,1996, Gene therapy in the United States: a five-year status report. *Human Gene Therapy*, 7(14), 1781-1790.
- [20] Taylor,P.L.,2009, The Ethics of Protocells—Moral and Social Implications of Creating Life in the Laboratory, *The American Journal of Human Genetics*, 85(2), 140–141.
- [21] Jang HH, et al.,2004, Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117(5):625-35.
- [22] Bett AJ, Prevec L, Graham FL.,1993, Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors, *J Virol*, 1993;67:5911-21.
- [23] El-Aneed, A.,2004, An overview of current delivery systems in cancer gene therapy, *Journal of Controlled Release*, 94(1), 1–14.

- [24] Walther, W., Stein, U., Fichtner, I., Voss, C., Schmidt, T., Schleef, M., Schlag, P. M., 2002, Intratumoral Low-Volume Jet-Injection for Efficient Nonviral Gene Transfer, *Molecular Biotechnology*, 21(2), 105–116.
- [25] El-Aneedy, A., 2004, *An overview of current delivery systems in cancer gene therapy*. *Journal of Controlled Release*, 94(1), 1–14.
- [26] Jana, S., & Jana, S., 2017, *Natural polymeric biodegradable nanoblend for macromolecules delivery*, Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends, In: P. M. Visakh, Markovic. G., Pasquini. D.(ed), 4, Woodhead, England, ISBN: 9780081004081, 289–312.
- [27] Wong, S.Y., Pelet, J.M., Putnam, D., 2007, Polymer Systems for gene delivery-past, present and future, *Progress In Polymer Science*, 32, 799-837.
- [28] Keeney, M., Ong, S.-G., Padilla, A., Yao, Z., Goodman, S., Wu, J. C., Yang, F., 2013, Development of poly(β -amino ester)-based biodegradable nanoparticles for non viral delivery of non viral delivery of minicircle DNA, *ACS Nano*, 7(8), 7241–7250.
- [29] Zugates, G. T., Tedford, N. C., Zumbuehl, A., Jhunjhunwala, S., Kang, C. S., Griffith, L. G., Anderson, D. G., 2007, Gene Delivery Properties of End-Modified Poly(β -amino ester)s, *Bioconjugate Chemistry*, 18(6), 1887–1896.
- [30] Gharpure, K. M., Wu, S. Y., Li, C., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K., 2015, Nanotechnology: Future of Oncotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(14), 3121–3130.
- [31] Rao, J. P., & Geckeler, K. E., 2011, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913.
- [32] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S., 1989, Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*, 1989;55:R1–4
- [33] Huertas, C.E.M., Fessi, H., Eaissari, A., 2010, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142.

- [34] Mitra, S.P, 2009, Lipid Nano-particles in medicine, production, stability and drug delivery, *Journal of Surface Science and Technology*, 27(12):15-110.
- [35] Özgümüş, S., Gök, M. K., & Pabuccuoğlu, S.,2016, Chitosan: Gene Delivery, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 1735–1749.
- [36] Sun, C.B. et al.,2011, Molecular dynamics simulations of DNA/PEI complexes: effect of PEI branching and protonation state, *Biophys. J*, 100, 2754–2763.
- [37] Koper, G., R. van Duijvenbode, A. Borkovec,2003, Synthesis and protonation behavior of comblike poly(ethyleneimine), *Macromolecules*, 36:2500–2507.
- [38] Alshamsan, A., A.Haddadi, H.Uludag.,2009, Formulation and delivery of siRNA by oleic acid and stearic acid modified polyethylenimine, *Mol. Pharm*, 6:121–133.
- [39] Lodish, H. F., 2004, *Molecular Cell Biology* (5th ed.), New York, W.H. Freeman and Co, ISBN: 0716743663.
- [40] Schaffer, D.V. et al.,2000, Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 598–606.
- [41] Strand, S.P. et al.,2010, Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking, *Biomaterials* 31, 975–987.
- [42] Aied, A., Greiser, U., Pandit, A., & Wang, W.,2013, *Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. Drug Discovery Today*, 18(21-22), 1090–1098.
- [43] Lai, T.C. et al.,2012, Bioreducible polyether-based pDNA ternary polyplexes: balancing particle stability and transfection efficiency, *Colloids Surf. B* 99, 27–37
- [44] 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.

- [45] Gong, J.-H., Wang, Y., Xing, L., Cui, P.-F., Qiao, J.-B., He, Y.-J., & Jiang, H.-L., 2018, Biocompatible fluorinated poly(β -amino ester)s for safe and efficient gene therapy, *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1-2), 180–193.
- [46] Gao, Y., Huang, J.-Y., O’Keeffe Ahern, J., Cutlar, L., Zhou, D., Lin, F.-H., & Wang, W., 2016, Highly Branched Poly(β -amino esters) for Non-Viral Gene Delivery: High Transfection Efficiency and Low Toxicity Achieved by Increasing Molecular Weight, *Biomacromolecules*, 17(11), 3640–3647.
- [47] Zhou, D., Gao, Y., Aied, A., Cutlar, L., Igoucheva, O., Newland, B., Wang, W., 2016, Highly branched poly(β -amino ester)s for skin gene therapy, *Journal of Controlled Release*, 244, 336–346.
- [48] Anderson, D. G., Akinc, A., Hossain, N., & Langer, R., 2005, Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(β -amino esters), *Molecular Therapy*, 11(3), 426–434.
- [49] Little, S. R., Lynn, D. M., Puram, S. V., & Langer, R., 2005, Formulation and characterization of poly (β amino ester) microparticles for genetic vaccine delivery, *Journal of Controlled Release*, 107(3), 449–462.
- [50] Vuorimaa, E., Ketola, T.-M., Green, J. J., Hanzlíková, M., Lemmetyinen, H., Langer, R., Yliperttula, M., 2011, Poly(β -amino ester)–DNA complexes: Time-resolved fluorescence and cellular transfection studies, *Journal of Controlled Release*, 154(2), 171–176.
- [51] Nasti, A., Zaki, N.M., Leonardis, P., Ungphainboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M.G., Tirelli, N., 2009, Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-Hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation, *Pharmaceutical Research*, 26 (8), 1918-1930.
- [52] X. Hu, H. Wang, J. Yang, W. Liu, W. Wang., 2017, Introducing primary and tertiary amino groups into a neutral polymer: a simple way to fabricating highly efficient nonviral vectors for gene delivery, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (13) 40468 (1–9).
- [53] 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 pharmaceuticals*, 436(1-2), 97-105.

[54] Gök, M.K., 2019, In vitro evaluation of synergistic effect of primary and tertiary amino groups in chitosan used as a non-viral gene carrier system, *European Polymer Journal Volume* 115, 375-383.

[55] 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.

[56] Dosta, P., Segovia, N., Cascante, A., Ramos, V., & Borrós, S., 2015, Surface charge tunability as a powerful strategy to control electrostatic interaction for high efficiency silencing, using tailored oligopeptide-modified poly(beta-amino ester)s (PBAEs), *Acta Biomaterialia*, 20, 82–93.

[57] Segovia, N., Dosta, P., Cascante, A., Ramos, V., & Borrós, S., 2014, Oligopeptide-terminated poly (β -amino ester)s for highly efficient gene delivery and intracellular localization, *Acta Biomaterialia*, 10(5), 2147–2158. |

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Aslı ÖZÇELİK
Doğum Yeri	Bakırköy
Doğum Tarihi	10.10.1993
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0553 481 35 49
E-Posta Adresi	asliozcelik@live.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	2017

Yüksek Lisans

Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı	Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı

Makale ve Bildiriler

| |