

**KOLON KANSER HÜCRELERİ İÇİN ALTIN KAPLI
MANYETİK YÜKLÜ TRANSFEKSİYON AJANLARININ
KULLANILMASI**

**USE OF GOLD COATED MAGNETICALLY LOADED
NANOPARTICLES IN TRANSFECTION OF COLON
CANCER CELLS**

DUYGU DENİZ USTA

PROF. DR. ERHAN BİŞKİN
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

DUYGU DENİZ USTA' nın hazırladığı “**Kolon Kanser Hücreleri için Altın Kaplı Manyetik Yüklü Transfeksiyon Ajanlarının Kullanılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Başkan

.....

Prof. Dr. Erhan BIŞKİN

Danışman

.....

Prof. Dr. Kevser ÖZDEN PIŞKİN

Üye

.....

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21 / 11 / 2014

DUYGU DENİZ USTA

ÖZET

KOLON KANSER HÜCRELERİ İÇİN ALTIN KAPLI MANYETİK YÜKLÜ TRANSFEKSİYON AJANLARININ KULLANILMASI

Duygu Deniz USTA

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan BİŞKİN

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Ağustos 2014, 78 sayfa

Kanser, hala insanoğlunun ölümüne yol açan en önemli sağlık problemlerinden biridir. Sağlık sektöründeki harcamaların önemli bir kısmı bu alana yapılmaktadır. Kanserinin erken tanı ve tedavisine yönelik yapılan çalışma bütçelerinin büyüklüğü konunun önemini kavramada en önemli göstergelerdendir. Tedavide kullanılan cerrahi yöntem, kemoterapi, radyo terapi gibi geleneksel yöntemlerin yanında, bugün artık nanoteknoloji tabanlı yaklaşımlarda da oldukça yol katedilmiştir. Bu yaklaşımlar sayesinde bugün tanı ve tedaviyi aynı anda gerçekleştirebilecek sistemler kullanılabilir. Bu nanoteknolojik ürünlerden bir tanesi de nanopartiküller olup, görüntüleme sistemlerinden, kontrollü ilaç salımına, gen susturmadan, gen aktarımına kadar oldukça geniş bir yelpazede kullanımları bulunmaktadır. Gen terapi ilaç olarak genlerin kullanıldığı gelecek vaat eden bir tedavi yöntemidir. Fakat gen terapide en büyük problem ilgili genin aktarımını sağlayacak vektörlerdir. Geniş bir kullanıma sahip viral vektörler yüksek transfeksiyon verimi sağlamalarının yanında, ciddi yan etkileri barındırmaktadır. Bu yüzden daha emniyetli ve yüksek transfeksiyon verimi sağlayacak vektörlerin geliştirilmesi en çok çalışılan konulardandır.

Sunulan tez kapsamında, bu eksiklikler göz önünde bulundurularak non-viral bir vektörün üretimi ve bu vektör aracılığıyla en fazla ölüme yol açan kanser türlerinden olan kolon kanseri hücre hattına (DLD-1) TP53 geninin aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu genin seçilme sebebi; kolon kanserlerinin %60'ında mutasyona uğramış p53'ün görev kaybının tanımlanmış olmasındandır. Bu genin aktarımı kanser gen terapisi açısından kritik bir öneme sahiptir.

Non-viral vektör olarak; altın takılı silika kaplı manyetik nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Partiküller, negatif yüke sahip hücre zarından, negatif yüklü pDNA'nın geçişini sağlamak amacıyla pozitif hale getirilmiştir. Bu amaçla APTES ve 2-aminoetantiyol gibi "kendiliğinden tek tabaka oluşturan" moleküllerden yararlanılmıştır. Partiküllerin karakterizasyon çalışmaları TEM (transmisyon elektron mikroskobu), Zeta Sizer, XRD (X-ışını kırınımı) ve FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) ile yapılmıştır. Daha sonra, yeşil floresans protein ve p53 genlerini taşıyan plazmitler, *E.coli* bakterisi içerisinde çoğaltılıp, bu plazmitlerin Axygen, AxyPrep Midi Plazmit saflaştırma kiti aracılığıyla saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan plazmitler belirli konsantrasyonlarda partiküllerle etkileştirilip, bu etkileşim agaroz jel elektroforezi aracılığıyla izlenmiş ve pDNA-partikül konjugatlarının yükleri Zeta Sizer ile saptanmıştır. Uygun olduğuna karar verilen konsantrasyonlar ile in-vitro çalışmalara devam edilmiştir. Hücreler üzerindeki toksik sınırın belirlenebilmesi için L929 (fare fibroblast hücreleri) hücrelerinden yararlanılmıştır. Hücreler üzerindeki sitotoksitite çalışmalarında WST-1 (4-[3-4-iyodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzen disülfonat) testinden yararlanılmıştır. Son olarak; p53 mutant insan kolorektal adenokarsinoma hücreleri (DLD-1) kullanılarak pDNA-nanopartikül kompleksinin magnet aracılı transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. WST-1 testiyle DLD-1 hücreleri üzerindeki sitotoksitite, pDNA üzerindeki GFP geni sayesinde üretilen yeşil floresans protein aracılığıyla floresans mikroskobu yardımıyla gen ekspresyon durumu, ikili boyama aracılığıyla da apoptoz-nekroz durumu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, kanser gen terapisi, non-viral vektörler, pozitif hale getirilmiş altın takılı silika kaplı manyetik nanopartiküller, p53-GFP plazmit, transfeksiyon.

ABSTRACT

USE OF GOLD COATED MAGNETICALLY LOADED NANOPARTICLES IN TRANSFECTION OF COLON CANCER CELLS

Duygu Deniz USTA

Master of Science, Division of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Erhan BİŞKİN

Co-Supervisor: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

August 2014, 78 pages

Cancer is still one of the most important problems of mankind's health that cause to death. There is a significant portion of spendings in the health sector. The early diagnosis and treatment of cancer and the budgets spent on this filed are the most important indicators to understanding of the size of the work. Nowadays in the treatment of cancer, besides the traditional methods such as surgical techniques, chemotherapy, radiation therapy, nanotechnology based approach has been covered the way. Thanks to these new approach, diagnosis and treatment can be perform simultaneously. Nanoparticles, one of the nanotechnological products, have a wide range of applications such as imaging systems, controlled drug delivery, gene silencing as well as gene delivery systems. Gene therapy is one of the promising methods that used genes as a drug. But the biggest problem in the gene therapy is the vectors that transfer the genes. Besides the high transfection efficiency of viral vectors, this systems have significant side effects. Therefore, the development of safer and high transfection efficiency systems provide the interest of scientists and became one of the most studied topics.

The aim of this study is the considering of the above mentioned deficiencies and production of non-viral transfection vector by transfer of TP53 gene through the colon cancer cell line (DLD-1) that is one of the highest death of cancer type. The selection of this gene type is because of the loss of p53 gene function in 60% of the colon cancer during the mutation. This gene transfection has a critical role in cancer gene therapy.

In this study, we carried out gold attached silica coated magnetite nanoparticles as a non-viral vectors. This particles have been positively charged by APTES and 2-aminoethan thiol to transfer of negatively charged pDNA through the cell membrane. The chemical and physical properties of the nanoparticles was carried out by FTIR, TEM, XRD and ζ -sizer respectively. Then, the plasmids that carrying the green fluorescence protein and p53 was replicated in *E.coli* bacteria. Purification process of this plasmids were performed by Axygen, AxyPrep and Midi plasmid purification kits. As prepared positively charged gold attached silica coated magnetite nanoparticles were interacted with several concentration of plasmids and the interaction between pDNA-nanoparticte conjugations was followed by agarose gel electrophorese and the charge of this conjugates measured by ζ -sizer so, the appropriate concentrations were selected to start the in-vitro studies. L929 cell lines (mouse fibroblast cells) were used to measure the toxicity board of the nanoparticles into the cells by applying the WST-1(4-[3-4-iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzen disulfonate) assay. Finally, pDNA-nanoparticle complexes were transfected by using a magnetic field into the p53 mutated DLD-1 cells. The cytotoxicity of the as prepared complex onto the DLD-1 cells was carried out by WST-1 assay. The gene expression was followed fluorescence microscope by pDNA that carrying *GFP* genes which produced green fluorescence protein. Apoptosis and necrosis situation of the cancer cells were carried out by double staining.

Keywords: Cancer, cancer gene therapy, non-viral vectors, positively charged gold attached silica coated magnetite nanoparticles, p53-GFP plasmid, transfection.

TEŞEKKÜR

Kendisiyle çalışma fırsatı vererek, tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü yardımı yapan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, danışman hocam Prof. Dr. Erhan Bişkin'e,

Kendi laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan, tezimin büyük bölümünde deneyim ve bilgisinden yararlandığım eş danışmanım Doç. Dr. Mustafa Türk'e

Tez jürimde yer alarak bana destek olan sayın hocalarım Prof. Dr. Tülin Kutsal'a, Prof. Dr. Kevser Özden Pişkin'e, Prof. Dr. Mustafa Kocakulak'a ve Yrd. Doç. Dr. Eda Çelik Akdur'a

Laboratuvarının kapılarını bana açan ve her türlü desteği veren sayın hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve ekibine,

Sorduğum her soruda eşsiz bilgilerini benimle paylaşan çok değerli hocam Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel'e ve ekibine,

Çalışmaktan büyük zevk aldığım, her sıkıştığımda bana destek olan çalışma arkadaşım Kuroş'a,

Her ihtiyacım olduğunda ellerinden geldiğince bana yardım eden çalışma arkadaşlarım Elif, Lena, Behzat, Mehmet, Araz, Erkan, Ali, Rıza, Dilek ve Selçuk'a

Her zaman, her koşulda, hep yanımda olan, bana her türlü desteği sağlayan, karşılıksız sevgi ve emekleri için çok sevdiğim aileme

Sonsuz Teşekkürler.

Duygu Deniz Usta

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser Nedir? (Sebepleri-Türleri).....	3
2.1.1. Kanser ve p53 Tümör Baskılayıcı Geni	6
2.1.2. Kolorektal Adenokarsinoma ve p53 İlişkisi	7
2.2. Kanser Tedavi Yöntemleri	8
2.2.1 Cerrahi Yöntem	8
2.2.2. Radyasyon Terapisi.....	8
2.2.3. Kemoterapi	8
2.3. Nanoteknoloji Tabanlı Yeni Tedaviler	9
2.3.1. Nanoteknoloji Nedir?	9
2.3.2. Kanser Nanoteknolojisi.....	10
2.4. Gen Terapi	11
2.4.1. Gen Terapi Çeşitleri	12
2.4.2. Gen Terapide Kullanılan Vektörler	13
2.4.2.1. Viral Vektörler.....	14
2.4.2.2. Non-Viral Vektörler	14
2.5. Organik Partiküller.....	16
2.5.1. Karbon Nanoyapılar	16
2.5.2. Polimerler	17
2.5.3. Lipozomlar.....	18
2.5.4. Dendrimerler	18
2.5.5. Miseller	19
2.5.6. Virüsler	19
2.6. İnorganik Materyaller.....	19
2.6.1. Altın Nanopartiküller	19
2.6.2. Kalsiyum Fosfat.....	20
2.6.3. Silika Nanopartiküller.....	20

2.6.4.	ZnO Nanopartiküller	20
2.6.5.	TiO ₂ Nanopartiküller	21
2.7.	Manyetik Nanopartiküller	21
2.7.1.	Demir oksit Nanopartiküller	22
2.7.2.	Manyetik Nanopartikülleri Sentezleme Yöntemleri	23
2.7.3.	Manyetit Nanopartiküllerin Fonksiyonel Hale Getirilmesi.....	24
2.7.3.1.	Silika Kaplama	25
2.7.3.2.	Manyetik Nanopartiküllerin Silanizasyonu	25
2.7.3.3.	Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller.....	26
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1.	Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi	28
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.1.2.	Polyol Yöntemi ile Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi	28
3.1.3.	Manyetik Nanopartiküllerin Silika ile Kaplanması	29
3.1.4.	Silika Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin APTES ile Kaplanması	30
3.1.5.	Altın Nanopartiküllerin APTES@Si@MNPs Üzerine Takılması.....	30
3.1.6.	Altın Nanopartikül Takılı APTES@Si@MNPs 'lerin Katyonik Hale Getirilmesi	30
3.2.	Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	32
3.3.	Gen Transferi	33
3.3.1.	<i>E.coli</i> İçerisindeki p53-GFP Geni Taşıyan pDNA'nın Çoğaltılması	33
3.3.2.	Plazmit DNA İzolasyonu	34
3.3.2.1.	Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve İzolasyon Protokolü	35
3.3.3.	Plazmit DNA Derişim Tayini	37
3.3.4.	Plazmit DNA-Nanopartikül Etkileşimi.....	38
3.3.4.1.	Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.3.4.2.	Zeta Potansiyellerinin Ölçümü.....	39
3.3.5.	In-Vitro Çalışmalar.....	39
3.3.5.1.	Hücrelerin Çoğaltılması ve Transfeksiyon Çalışmaları	39
3.3.5.2.	WST Metodu ile Hücre Canlılık Analizinin Saptanması	41
3.3.5.3.	İkili Boyama Metodu ile Hücrelerdeki Apoptoz/Nekrozun Saptanması	43
4.	DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	45
4.1.1.	FTIR analizi	45
4.1.2.	XRD sonuçları	46

4.1.3.Nanopartiküllerin TEM görüntüleri	47
4.2. pDNA- Nanopartikül Etkileşiminin Saptanması.....	49
4.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	49
4.2.2. Zeta Potansiyel Sonuçları.....	49
4.3. Sitotoksitite Sonuçları	51
4.4. pDNA-Nanopartikül Konjugatları ile Kansere Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Değerlendirilmesi.....	55
5. GENEL SONUÇLAR	60
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 2012 Yılı rakamlarla dünya kanser istatistikleri.....	3
Çizelge 2.2 Türkiye ölüm nedeni istatistikleri, 2013.....	4
Çizelge 3.1. Axygen plazmit izolasyonu tampon çözeltileri.....	35
Çizelge 3.2.Floresan mikroskopide apoptotik hücrelerin nekrotik ve normal hücreden ayırımı.....	44
Çizelge 4.1. Değişen partikül konsantrasyonlarına bağlı transfeksiyon verimi	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanoteknoloji ve bağlantılı olduğu alanlar.....	10
Şekil 2.2. En son ve en yaygın kanser gen terapi yaklaşımları.....	12
Şekil 2.3. İlaç, kontrast ajanı ve hedeflenmiş ligand taşıyabilmek için fonksiyonel hale getirilmiş polimerik bir nanopartikülün şematik görüntüsü.....	18
Şekil 2.4. Manyetofeksiyonun şematik görüntüsü.....	22
Şekil 2.5. Manyetik nanopartiküllerin ters spinal yapısı.....	23
Şekil 2.6. Silanizasyon ile silika yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesi.....	26
Şekil 2.7. Au kaplı MNP'lerin –SH grupları aracılığıyla modifikasyonu.....	27
Şekil 3.1. Solvotermal ile MNP üretiminin kimyasal formülü.....	29
Şekil 3.2. Au Takılı APTES@Si@MNP.....	31
Şekil 3.3. p53-EGFP içeren pDNA'nın omurga yapısı.....	33
Şekil 3.4. <i>E.coli</i> 'den pDNA izolasyon basamakları.....	37
Şekil 3.5. Farklı oranlardaki pDNA-NP konjugatların bulunduğu 96'lık plaka.....	41
Şekil 3.6. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile WST-1'den formazan tuzu oluşumu.....	42
Şekil 4.1. FTIR analizleri A) Si@MNP, B) APTES@Si@MNP.....	46
Şekil 4.2. XRD spektrumları A) MNP, B) Si@MNP, C) Au@Si@MNP.....	47
Şekil 4.3. TEM görüntüleri A-B) Solvo termal ile üretilmiş manyetit nanopartiküller, C-D-E-F) Silika@MNP'ler, G-H) Au takılı Silika@MNP'ler.....	48
Şekil 4.4. p53-GFP pDNA-pozitif hale getirilmiş altın takılı manyetik nanopartikül konjugatlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	49
Şekil 4.5. Zeta potansiyel sonuçları A) APTES takılı Silika@MNP'ler, B) 2-aminoetantiyol takılı altın modifiye APTES@Silika@MNP'ler.....	50
Şekil 4.6. pDNA-nanopartikül konjugatlarının zeta potansiyel değeri.....	51
Şekil 4.7. magnet uygulanmadan, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları.....	52
Şekil 4.8. Magnet uygulanmış, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları.....	52
Şekil 4.9. Magnet uygulanmadan, artan Nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları.....	54
Şekil 4.10. Magnet uygulanmış, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları.....	54

Şekil 4.11. Gen aktarımı sonucu DLD-1 hücrelerinin floresans mikroskop görüntüleri	
A) Kültüre edilmiş DLD-1 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü, B) Pozitif kontrol olarak kullanılmış ticari transfeksiyon ajanı ile gerçekleştirilmiş transfeksiyon görüntüleri, C-D) 1,5 mg/ml partikül kullanıldığında, magnetsiz (C) ve magnetli (D) transfeksiyon görüntüleri, E-F) 2 mM partikül kullanıldığında, magnetsiz (E) ve magnetli F) transfeksiyon görüntüleri.....	56
Şekil 4.12. 3 mg/ml partikül konsatrasyonunda hücreler üzerinde meydana gelen aglomerasyon.....	57
Şekil 4.13. Apoptoz-Nekroz floresans mikroskop görüntüleri A-B) Magnetsiz, 1,5 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz, C-D) Magnetsiz, 2 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz transfeksiyon görüntüleri, E-F) Magnetli, 1,5 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz, G-H) Magnetli, 2 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

TP53	Tümör Protein 53
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
STM	Taramalı Tünelleme Mikroskobu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
dsDNA	Çift İplikli DNA
ssDNA	Tek İplikli DNA
pDNA	Plazmid DNA
ASON	Antisens Oligonükleotit
RES	Retiküloendotelyal Sistem
PLL	Poli-l-lizin
PEI	Poli-etilenimin
PAA	Poli-amido-amin
CNT	Karbon Nanotüp
PEG	Polietilen-glikol
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
siRNA	Küçük İnterferans RNA
ZnO	Çinko Oksit
TiO ₂	Titantum Oksit
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MFH	Manyetik Sıvı Hipertermi
MNP	Manyetik Nanopartikül

APTES	3-aminopropiltrioksisisilan
APS	3-aminopropiltrimetoksisisilan
AEAPS	N-(2-aminoetil)- 3 aminopropiltrimetoksisisilan
GFP	Yeşil Floresans Protein
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
DLD-1	İnsan Kolorektal Adenokarsinoma Hücre Hattı
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
TEA	Trietilen Amin
CTAB	Setiltrimetilamonyum Bromit
2-aminoetantiyol	Sistamin
XRD	X-Işını Kırınım Yöntemi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
LB	Luria Bertani
TBE	Trisma Base EDTA
FBS	Fetal Bovine Serum
WST	Suda Çözülebilir Tetrazolyum Tuzu
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
PI	Propidyum İyodid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
Kb	Kilobaz (Çifti)
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü
Au@APTES@Si@MNP	Altın Takılı APTES'le Pozitif Hale Getirilmiş Silika Kaplı Manyetik Nanopartikül

1. GİRİŞ

Kanser, yıllık 10 milyondan fazla insana hasta tanısının konduğu önemli bir ölüm sebebidir. Karsinogenezis, hücre sinyal iletimi ve apoptoz gibi çok sayıda hücreyel fizyolojik sistemin rol aldığı oldukça kompleks bir olaydır. Başlangıçta lokalize bir hastalık olarak başlar, fakat vücuttaki başka bölgelere hızla yayılma eğilimi, hastalığı tedavi edilemez hale getirir. Hastalıkta yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri; kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaledir. Mevcut kanser tedavilerinde sıkça karşılaşılan problemler; anti-tümör ajanlarının nonspesifik sistemik dağılımı, tümör bölgesine ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları, tolere edilemeyen sitotoksitite, terapötik yanıtları görüntülemeledeki güçlükler ve çoklu ilaç direnci gelişimidir. Tüm bu problemleri ortadan kaldıracak yenilikçi teknolojilerin gelişimi acil ve önemli bir ihtiyaçtır [1].

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, gen terapinin onkolojide kullanımına yönelik oldukça fazla bir eğilim bulunmaktadır. Teoride gen terapisi; bir ya da daha fazla mutant alel taşıyan somatik hücreye normal aleli sokmaktır. Normal alelin ifadesi normal fenotipi oluşturan işlevsel gen ürününün meydana gelmesini sağlamaktadır [2]. Başarılı bir gen terapi, o geni taşıyan gen aktarım (vektör) sistemlerine bağlıdır. Uygun gen aktarım sisteminin seçimi; hedef geni çekirdeğe ve çekirdek içerisindeki spesifik DNA'ya ulaştırmada çok kritik bir önem taşımaktadır. Günümüzde gen terapide kullanılan vektörler viral ve non-viral olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Viral vektörler yüksek transfeksiyon verimi sağlamalarının yanında pek çok olumsuzluğu da barındırmaktadırlar. Örneğin; bunların hazırlanması oldukça komplekstir, immün yanıt oluşturma riski kişileri ölüme dahi götürebilmektedir, sınırlı büyüklükte gen taşıma kapasiteleri bulunmaktadır. Viral vektörlerin aksine; non-viral vektörler sağladığı avantajlardan dolayı (düşük toksitite, düşük immün yanıt oluşturma, mükemmel biçimde kimyasal modifikasyona olanak verme özelliği) yoğun şekilde çalışılmaktadır. Fakat bunlarında transfeksiyon verimleri oldukça düşük ve kısa süreli bir gen ekspresyonu sağlamaktadırlar [1].

Non-viral vektör olarak, manyetik nanopartiküllerin kullanımı önemli bir yere sahiptir. Manyetofeksiyon, vektör olarak MNP'lerin seçildiği ve gen aktarımında bir manyetik alandan yararlanılan transfeksiyon yöntemidir. Dışardan uygulanan manyetik alan aracılığıyla partiküllerin hücre yüzeyindeki sedimentasyonları hızlandırılır [1].

Sunulan tez kapsamında da solvo termal yöntemiyle üretilmiş MNP'ler kullanılmıştır. Daha sonra partiküller, silika ile modifiye edilip, üzerlerine altın nanopartiküllerin takılması gerçekleştirilmiştir. Bu partiküller p53-GFP genlerini içeren pDNA'ları taşımada kullanılacakları için APTES ve sistamin aracılığıyla pozitif hale getirilmiştir. Pozitif hale getirmedeki amaç hücre içerisine girişi de sağlamaktır. Partiküllerin karakterizasyon çalışmalarında; TEM, XRD, FTIR ve Zeta ölçümlerinden yararlanılmıştır. pDNA'ların çoğaltılması için *E.coli* bakterisinden yararlanılıp, daha sonra bu bakterilerden pDNA'ların saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan pDNA'lar farklı konsantrasyondaki partiküllerle etkileştirilip; ortaya çıkan (+) yükün ölçümü Zeta Sizer ile yapılmıştır. pDNA-partikül konjugat oluşumu içinse; agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır. En uygun partikül konsantrasyonlarının seçiminden sonra bunların hücreler üzerindeki toksik etkinin belirlenmesi için L929 hücrelerine aktarılmıştır. Daha sonra DLD-1 (insan kolon kanser hücre hattı) hücreleriyle çalışılmaya geçilmiştir. Çalışmada kolon kanserinin seçilme sebebi; bu kanserin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramış p53 geni bulunmasındandır. Partiküllerin DLD-1 üzerindeki toksik etkisi WST-1 ile belirlenip, apoptoz/nekroz olaylarının gözlenmesi için ikili boyamadan yararlanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Nedir? (Sebepleri-Türleri)

Kanser, teknolojinin hızla gelişmekte olduğu dünyamızda hala insanoğlunun en önemli sağlık problemi ve ölüm sebeplerinden biridir. Kanser, tüm yaştaki insanları etkiler ve her üç insandan biri, yaşamının herhangi bir döneminde bu hastalıkla karşılaşmaktadır. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 7,6 milyon insan kanserden hayatını kaybetmekte ve gelişmekte olan ülkelerdeki ölümlerin %70'i kanser sebebiyle gerçekleşmektedir. Bu sayının 2025 yılına gelindiğinde 25 milyonu aşacağı öngörülmektedir. 2012 verilerine göre dünya genelinde 8,2 milyon kişi kanserden hayatını kaybetmiş, 32,6 milyon yaşayan kanser hastası bulunmakta iken (5 yıl içerisinde tanı konmuş) ve 14,1 milyon kişiye yeni kanser vakası teşhisi konulmuştur. Çizelge 2.1.'de rakamlarla ifade edilen veriler hastalık tablosunun ciddiyetini ülkeler bazında açık şekilde ortaya koymaktadır [3].

Çizelge 2.1. 2012 Yılı rakamlarla dünya kanser istatistikleri [3]

Tahmini rakamlar (binlerdeki)	Erkek			Kadın		
	Vakalar	Ölüm	5 Yıllık prevalans	Vakalar	Ölüm	5 Yıllık prevalans
Dünya	7427	4653	15362	6663	3548	17182
Gelişmiş Bölgeler	3244	1591	8616	2832	1287	8297
Az Gelişmiş Bölgeler	4184	3062	6747	3831	2261	8885
WHO Afrika Bölgesi	265	205	468	381	250	895
WHO Amerika Bölgesi	1454	677	3843	1429	618	4115
WHO Doğu Akdeniz Bölgesi	263	191	461	293	176	733
WHO Avrupa Bölgesi	1987	1080	4857	1750	852	4933
WHO Güneydoğu Asya Bölesi	816	616	1237	908	555	2041
WHO Batı Pasifik Bölgesi	2642	1882	4493	1902	1096	4464
IARC üyesi (24 ülke)	3706	1900	9259	3354	1570	9425
Amerika Birleşik Devletleri	825	324	2402	779	293	2373
Çin	1823	1429	2496	1243	776	2549
Hindistan	477	357	665	537	326	1126
Avrupa Birliği (EU-28)	1446	715	3759	1211	560	3487

Kanser gelişmiş ülkelerde kalp hastalıkları ve felçten sonra üçüncü ölüm sebebiyken, Amerika'da kalp hastalıklarından sonra ikinci ölüm sebebidir [4]. Ülkemizde de tablo dünyadakinden pek farklı olmayıp her geçen gün kanserli hasta sayısı ve ölümler hızla artmaktadır. Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi ülkemizde de dolaşım sistemi hastalıklarından sonra en çok rastlanan ikinci hastalık kanserdir [5].

Çizelge 2.2. Türkiye ölüm nedeni istatistikleri, 2013 [5]

	Toplam	Erkek	Kadın
Toplam	100,0	100,0	100,0
Dolaşım sistemi hastalıkları	39,8	35,8	44,6
İyi huylu ve kötü huylu tümörler (malign ve benign neoplazmlar)	21,3	25,3	16,5
Solunum Sistemi Hastalıkları	9,8	10,7	8,8
Endokrin, beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar	5,6	4,3	7,2
Dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler	5,5	7,3	3,3
Sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları	4,1	3,4	4,9
Diğer (enfeksiyon ve parazit hastalıkları, mental ve davranışsal bozukluklar, kas-iskelet sistemi ve bağ dokusunun hastalıkları vb.)	13,9	13,2	14,8

Not: Tablodaki rakamlar, yuvarlamadan dolayı toplamı vermeyebilir.

Günümüzde bilinen 200'den fazla kanser türü bulunmaktadır. Vücudumuzda bulunan 60'dan fazla organı oluşturan farklı türdeki hücrelerin her birinde kanserli hücreye dönüşme potansiyeli bulunmaktadır. Bu kanserden bazıları; Baş ve Boyun Kanseri, Mide kanseri, Rahim Ağzı Kanseri, Safra Yolu ve Safra Kesesi Kanseri, Prostat Kanseri, Pankreas Kanseri, Özefagus Kanseri, Melanoma, Karaciğer Kanseri, Kan Kanseri, İnce- Kalın Bağırsak Kanseri, Rahim Kanseri, Meme kanseri, Böbrek Kanseri, Akciğer Kanseri, Kolon Kanseri, vb.. Kanseler arasında en öldürücü olan akciğer kanseri olup; bunu sırayla meme, prostat ve kolon kanserleri izlemektedir. Kadınlarda birinci sırada meme kanseri, ikinci sırada kolon, üçüncü sırada akciğer kanseri görülürken, erkeklerde de ilk sırayı akciğer kanseri, ikinciyi prostat, üçüncüyü kolon kanseri oluşturmaktadır [3, 5].

A.B.D. Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından yapılan tanımlamaya göre kanser; kontrolsüz bölünme ve anormal hücre çoğalması ile meydana gelen hücrelerin çevredeki dokuyu istilası (metastaz) olarak tanımlanır. Yüze yakın sayıdaki hastalığı içine alan kompleks bir olgudur. Embriyonik kökenlerine göre farklı gruplara ayrılırlar. Örneğin; epitel (ektodermal, endodermal) kökenli olan karsinomalar, bağ dokudan türemiş (mezodermal) sarkomalar, kan yapıcı hücrelerden meydana gelen lösemiler, pigment hücreleri melanositlerden türemiş melanomalar, germ hücreleri ve gonadal dokulardan türeyen teratomalardır [6]. Kalıtsal mutasyonlar veya virüsler, X-ray ışınları, UV, çeşitli kimyasallar, sigara, vb. gibi çevresel faktörler tarafından oluşturulan mutasyonlar, anormal hücre oluşumunun en önemli sebepleridir. Kansere sebep olan bu mutasyonlar DNA hasarının tamirini, hücre

bölünmesini (döngüsünü), apoptozisi, hücrel farklılaşma ve hücre-hücre teması gibi pek çok hücrel işlevi etkilemektedir [7].

Hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli genetik kontrolün ortadan kalkması çok hücreli bir kitlenin ortaya çıkışına sebep olur. Bu kitleler ameliyatla alınabilen, ciddi bir hasara yol açmayan iyi huylu bir tümör olabileceği gibi, kan dolaşımına girebilme, diğer dokuları istila edebilme yetisine sahip kötü huylu tümörlerde olabilir. Bunların tedavileri zordur ve hastada hayati risk oluştururlar [2].

Bir çok kanser türünde hücre döngüsünde meydana gelen mutasyonlar oldukça etkin rol oynarlar. Devamlı olarak bölünen kanser hücreleri hücre döngüsünden çıkamazlar. Çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması, hücre büyüme ve bölünme sürecini kapsamaktadır. Bir hücre bölünmesinden diğer bölünmeye kadar geçen sürede meydana gelen olaylar hücre döngüsünü oluşturur. Hücre döngüsü interfaz (G1, S, G2 fazlarını kapsar) ve mitotik fazdan (M) oluşur. Bu döngünün sıkı şekilde düzenlenmesini sağlayan kontrol noktaları (G1/S, G2/M ve M) ve siklin, siklin bağımlı kinazlar olarak adlandırılan iki protein sınıfı bulunmaktadır. Bu noktaların kontrolü ise genler tarafından düzenlenir. Eğer DNA replikasyonu, DNA onarımı ya da kromozom düzenlenmeleri sırasında bir hata ya da sapma meydana gelirse; hücreler, hücre döngüsündeki ilerlemelerini (kontrol noktaları ve iki protein sınıfını düzenlemeleriyle) koşullar düzelinceye dek durdururlar. Bu sayede hücreler ortaya çıkacak anomalilerden kurtulmaya çalışır. Tüm bunlara rağmen hücredeki DNA ve kromozom hasarı düzeltilemeyecek boyutlarda ise hücre apoptoz denen ikinci bir savunma hattını devreye sokar [2, 7].

Programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz; hücre tarafından genetik olarak kontrol edilen (genetik materyal tarafından ne zaman gerçekleşeceğine karar verilen) ve sonunda hücrenin intihar ettiği bir süreçtir [2]. Bugün apoptoz dışında bilinen en az yedi çeşit programlı hücre ölümü bulunmaktadır [8]. Programlanmış hücre ölümleri; hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak, bir sonraki kuşağa kalıtım yoluyla aktarılacak ve kansere yol açacak olası genetik mutasyon sayısını azalttığı gibi yüksek organizasyonlu canlılarda yetişkin hale gelinceye kadar ki geçen zamanda gelişime katkısı olmayan belli hücreleri elemek için de kullanılır. Apoptozis, nekrozisten konağın bağışıklık sistemini uyarma yetisi bulunmamasıyla ayrılır. Nekrozis bir ya da daha fazla hücrenin, dokunun ya da organın rastlantısal olarak geri dönüşümsüz ve programsız bir biçimde hasar görmesi sonucu meydana

gelen istenmeyen, ölümcül sonuçlar doğurabilen patolojik bir ölümdür [2, 8]. Otofaji ise; hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilip, lizozomlarla birleşerek burada parçalanmasıdır [8]. Hücre döngüsünün kontrol noktalarını düzenleyen genler apoptozla da yakından bağlantılı olup, pek çok kanser tipinde mutasyona uğramıştır [2].

Vücutta hücre çoğalması ve programlanmış hücre ölümleri arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge sağlıklı hücrelerdeki proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından sağlanır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar ya da yanlış ifadelenmeler sonucunda kanser hücreleri açığa çıkar. Proto-onkogenler denen normal hücre genleri, normal hücre büyümesini ve bölünmesini uyaran proteinleri şifreler. Bu genlerin mutasyona uğramış ve kanser gelişimine katkıda bulunan haline onkogen denir [9]. Tümör baskılayıcı genler ise; ürünleri hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptozis sürecini başlatan genlerdir. Normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşme ihtimalini azaltırlar. Kanserlerin çok büyük kısmında bir tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin mutasyonu mevcuttur [2].

2.1.1. Kanser ve p53 Tümör Baskılayıcı Geni

Vücutta kanser oluşumunda pek çok gen için içinde bulunmasına rağmen; insan TP53 geni ayrı bir öneme sahiptir. Bu gen tarafından kodlanan p53 transkripsiyon faktörü; tümör baskılayıcı olarak ve kanser oluşumundaki çeşitli sinyal yollarının ana düzenleyicisi olarak kilit bir rol üstlenir [10, 11]. TP53 tüm insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında en sık mutasyona uğrayan genidir [2]. Genin hücre döngüsünü durdurmayı düzenleme, DNA onarımı, senesens (yaşlanma) ve apoptoz üzerindeki etkileri, önemli görevleri arasındadır [12]. p53 proteini hücre içerisinde sürekli olarak sentezlenir, fakat hızla parçalandığından hücrelerde çok düşük bir seviyede bulunur. Birçok olay, bu proteinin çekirdek içerisinde hızlı bir şekilde artışına yol açar. Bu olaylardan en önemlisi genomda meydana gelen hatalardır. p53 proteini DNA hasarlarına karşı iki farklı yanıtı başlatır. Bunlar; 1-DNA onarımı için hücre döngüsünün durdurulması, 2-DNA onarılamaz ise hücrenin apoptozise ve hücre ölümüne yönlendirilmesi. Her iki olayda da ilgili genlerin baskılanması ya da uyarılması p53 tarafından gerçekleştirilir. Dolayısıyla TP53 geninde meydana gelen bir mutasyon p53'te işlevsel bir kaybın oluşmasına ve hücrelerin hücre döngüsü kontrol noktalarında tutulamamalarına ya da DNA hasarına karşı apoptoz

yönlendirilememelerine sebep olur [2, 13]. Kısacası p53 kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir ve kanserlerin yaklaşık % 50-55'inde mutanttır. Dolayısıyla günümüzde kanser gen terapilerinde kullanılan genlerin başını çekmektedir [14].

2.1.2. Kolorektal Adenokarsinoma ve p53 İlişkisi

Sindirim sistemi alınan besin maddelerinin işlenerek sindirilmesini ve bu işlenmeden sonra atıkların vücut dışına atılmasına yardım eder. Sindirim sistemi ağız, dil, dişler, farinks, tükürük bezleri, özefagus, mide, ince ve kalın bağırsak, rektum ve anüsten meydana gelir. Kolon vücudun sindirim sisteminin bir parçasıdır. Kolon veya rektumda (kalın bağırsağın kısımları) gelişen kanser kolorektal kanser (aynı zamanda kolon kanseri, rektal kanser, bağırsak kanseri olarakta bilinmektedir) olarak adlandırılır. Kolon kanseri; kolonun içini döşeyen hücrelerde bir mutasyon olduğu zaman meydana gelir. Mutasyonlar, bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesine yol açar. Bu hücreler daha sonra kalın bağırsak içindeki sağlıklı dokuyu ve vücudun diğer bölgerindeki hücreleri etkileyerek kanserin yayılmasına sebep olurlar. Kolon kanserinin pek çok tipi olmasına rağmen (örn; leiomyosarkom, lenfoma, melanoma, nöroendokrin tümörler) en yaygın olanı adenokarsinomlardır. Bu kanser türü kolonun iç tabakasında bulunan glandüler yapıların hücrelerinde başlar ve tedavi edilmezse potansiyel olarak ilk önce kolon duvarlarına daha sonra lenf sistemi ve diğer organlara yayılır [15]. TP53 geni 17. kromozomun kısa koluna yerleşmiş olan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. Bu genin somatik mutasyonları solid tümörlerde oldukça yaygındır. Kolon kanserlerinin %60'ında mutasyona uğramış p53'ün görev kaybı tanımlanmıştır [16]. Günümüzde kolon kanserinin tedavisinde kullanılan klasik yöntemler olmasına rağmen (kemoterapi, radyoterapi, ameliyat gibi), yeni tedavi yöntemlerinden olan hedeflendirilmiş terapilerde (monoklonal antibodiler, anjiyogenez inhibitörleri kullanılarak gerçekleştirilir) kullanılmaya başlanmıştır [17]. Kolon kanserlerinde oldukça önemli olan p53 geni üzerine de etkin bir şekilde gerçekleştirilebilecek hedeflendirilmiş terapi ve gen terapi çalışmaları yoğun şekilde sürdürülmektedir [18].

2.2. Kanser Tedavi Yöntemleri

2.2.1 Cerrahi Yöntem

Kanser tedavisinde tercih edilen yöntemlerin başında gelip solid tümörlerin uzaklaştırılması için kullanılır. Özellikle erken aşamadaki iyi huylu tümörler için uygulanır. Cerrahi müdahale tümör boyutu büyük olduğunda, tümör hayati organlara yakın olduğunda veya uzak metastaz (yüksek dereceli tümörlerde) durumunda tavsiye edilmez. Tümörün diğer organlara yayıldığı durumlarda etkili bir yöntem değildir [7].

2.2.2. Radyasyon Terapisi

Yüksek enerjili radyasyon ile direk tümör dokusunun hedeflendiği bir tedavidir. Radyasyon terapisinde kanser hücrelerini parçalamak için iyonize radyasyon kullanılır. İyonize radyasyon harici olarak kullanılan X ve gama ışınları ile dahili olarak kullanılan radyoizotopları içermektedir. Kemoterapi ile karşılaştırıldığında lokalize, noninvaziv ve tedaviden sonra sistemik toksite üretmeyen bir yöntemidir [19]. Direkt olarak DNA hasarı veya hücre bölünmesini engelleyen reaktif oksijen türlerinin açığa çıkarılmasıyla kanser hücreleri öldürülür. Bugün dünya çapındaki tüm kanser hastalarının yarısından fazlasına tek başına radyasyon tedavisi uygulandığı gibi, tedaviden daha iyi sonuçlar almak için kemoterapi ya da cerrahi işlemlerden birisiyle radyasyon tedavisinin birlikte uygulanması da gerçekleştirilebilmektedir. Fakat radyasyon terapisinde, radyasyonun tümör hücresine ulaşırken geçtiği yerlerdeki sağlam hücrelerin ölümüne yol açması ve tedavi edici dozlardaki ışına karşı gelişen direnç tedavinin etkinliğinin önüne geçmektedir [19, 20].

2.2.3. Kemoterapi

Kanserde en çok kullanılan tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerini öldürmek için gerekli kemoterapötik ajanlar enjeksiyon yoluyla damar içine veya ağız yoluyla verilir. Uzun süredir uygulanan bir yöntem olmasına rağmen; kemoterapötik ajanlar hala tümör dokusuna ulaşmada zayıftırlar. Ayrıca toksite sebebiyle verilen dozlarda sınırlı tutulmak zorundadır [21].

Geleneksel tedavilerdeki sınırlayıcı faktörler bilim adamlarını yeni yöntemler bulmaya itmiştir. Günümüzde en çok araştırma yapılan ve umut vaat eden alanlardan bazıları; nanoteknolojik uygulamalarla elde edilen hedeflenmiş terapiler,

gen tedavisi ve çok fonksiyonlu materyallerin üretimidir. Nanoteknolojik yaklaşımlarla hazırlanan materyallerin geleneksel materyallere göre avantajları şunlardır; 1- Çok fonksiyonluluk, 2- Arttırılmış etki, 3- Hedefler için arttırılmış seçicilik, 4- Teranostik potansiyeli, 5- Değişmiş farmakokinetik, 6- Kontrollü sentez, 7- Kontrollü salınım, 8- Yeni özellikler ve etkileşimler, 9- Gelişmiş fiziksel stabilite, 10- İmmünojenite yoksunluğu [22].

Çok fonksiyonlu, işlevsel yeni nesil nanoyapılarla geleneksel tedavilerdeki kısıtlamaların ortadan kaldırılması hedeflenmektedir [23, 24].

2.3. Nanoteknoloji Tabanlı Yeni Tedaviler

2.3.1. Nanoteknoloji Nedir?

Görüntüleme sistemlerindeki icatlar ve gelişmeler insanoğluna atomları, bunların düzenlenişlerini, oluşan kimyasal bağların görüntülenebilmesini kısacası gözle görülemeyecek kadar küçük boyutları görebilme olanağı vermiştir (Scanning tunneling microscope (STM) , Atomic force microscopy (AFM), Transmission electron microscopy (TEM), Scanning electron microscope (SEM), vb. aracılığıyla) [25]. Bu gelişmeler bilim adamlarına çok küçük boyutların kontrol edilebileceğini düşündürmüştü ve ünlü fizikçi Richard Feynman'ın Amerikan Fizik Cemiyeti'ndeki atomların direkt kontrolüyle bir sentezin olasılığından bahsettiği 'There's Plenty of Room at the Bottom' adlı konuşması ile nanoteknoloji kavramı 1959 yılında hayatımıza girmiştir [22]. "Nanoteknoloji" terimi ise ilk kez 1974'te Norio Taniguchi tarafından yarı-iletken işlemlerin nanoboyuttaki kontrolü için kullanılmıştır. Daha sonra Eric Drexler nesnelere atom-atom oluşturan programlanmış çok küçük makineleri geliştiren kişi olup, Feynman'ın kavramlarından etkilenerek "nanoteknoloji" terimini bağımsız olarak 1986'da kitabı Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology'de kullanmıştır [22]. Günümüzde nanoteknoloji; nano boyuttaki yapıların (1-100 nm arasındaki boyutlar) kontrolü aracılığıyla çeşitli materyal, sistem ve aletlerin oluşturulması ve daha sonra bunların fizik, kimya, biyoloji, mühendislik, malzeme bilimi, tıp ve daha başka pek çok alanda kullanımı şeklinde tanımlanmaktadır [26].



Şekil 2.1. Nanoteknoloji ve bağlantılı olduğu alanlar [26]

ABD Ulusal Nanoteknoloji Girişimine (NNI) göre, nanoteknoloji temelde üç alt başlığı kapsamaktadır. Bunlar; i) atomik, moleküler veya makromoleküler düzeyde araştırma ve teknoloji geliştirmek; ii) üretilen nanomalzemelerin boyut dağılımına göre (küçük ve/ veya orta boyutta) fonksiyonel özellik taşıyan yeni yapılar, cihazlar ve sistemler geliştirmek ve bunların uygulamaları; iii) atomik ölçekte malzemelerin kontrolü ve manipülasyonunu gerçekleştirmektir [27].

Günümüzde nanoteknoloji; doğal nanoteknoloji, elektronik nanoteknoloji, kimyasal nanoteknoloji, nanobiyoteknoloji, biyomedikal nanoteknoloji, kanser nanoteknolojisi gibi alanlara ayrılarak hayatımızın pek çok alanında bizlere yeni uygulamalar sunmaktadır [27].

Tüm bu uygulamalar içerisinde insan sağlığını ve yaşam standartlarını iyileştirmek için yapılan çalışmalar ayrı bir öneme sahiptir. Bugün ilerleyen teknolojik uygulamalara rağmen insanoğlu hala pek çok hastalık sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Bu hastalıklardan bir tanesi de kanserdir. Ülkelerin bu konudaki milyonlarca dolarlık yatırımları; hastalığın önüne geçmeyi, tanı-tedavi için yapılan harcamaların azaltılmasını, sağlıklı toplumlar yaratmayı amaçlamaktadır. Bu amaçlar için en çok çalışan ve ümit vaat eden alanlardan biri de kanser nanoteknolojisidir.

2.3.2. Kanser Nanoteknolojisi

Kanser gelişmiş ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Cerrahi yöntem, radyasyon terapisi, kemoterapi gibi geleneksel tedaviler tümörün erişilebilirliği ile sınırlıdır. Kanser tanı ve tedavisinde erken teşhis eksikliği, az olan ilaç biyoyararlanım ve spesifik olmayan sistemik ilaç dağıtımı, tümöre ulaşan yetersiz ilaç konsantrasyonları, gerçek zamanlı olarak tedaviye verilen cevapların izlenememesi

gibi eksikliklerin olması bugün çözüm bekleyen önemli sorunlar arasındadır [28]. Aslında biyomedikal nanoteknolojinin bir türü olan kanser nanobiyoteknolojisi bu problemlerin çözülmesi için gerekli çeşitli materyaller ve teknikler üzerine odaklanmaktadır. Kanser nanoteknolojisi araştırma faaliyetleri genellikle yedi kategoriye ayrılır. İlki; en erken ve pre-semptomatik aşamadayken kanserlerin tanısında kullanılacak erken görüntüleme ajanları ve teşhis tekniklerinin geliştirilmesidir. İkincisi; tedavilerin etkilerinin yerinde değerlendirmelerini sağlayabilecek tekniklerin geliştirilmesidir. Üçüncüsü; biyolojik bariyerleri geçerek terapötik ajanları doğru bir şekilde tümör bölgesine aktaracak; hedeflenmiş cihazları, materyalleri, taşıyıcıları geliştirmektir. Dördüncüsü; tahmini moleküler değişiklikleri gözlemeyi sağlayan ve kanser öncesi hücreleri kötü huylu olanlarından ayırt etmeyi sağlayan ajanların geliştirilmesidir. Beşincisi; kanseri tetikleyen mutasyonların ve aynı zamanda kansere yatkınlık gösteren genetik markerların saptanması için çeşitli gözetim sistemlerinin geliştirilmesidir. Altıncısı; yaşam kalitesini kötü bir şekilde etkileyen kanser semptomlarının kontrolü için metodların geliştirilmesidir. Sonuncusu ise; klinik tedavide araştırmacılara yardım etmek için yeni hedefleri hızlıca tanımlayacak ve olası yan etkiler ile ilaç direncinin tahminini gerçekleştirecek tekniklerin geliştirilmesidir [27].

Kanser nanoteknolojisi araştırmalarında iki önemli eğilim vardır. Bunlardan bir tanesi; tümörün hem görüntülenmesini hem de tümöre ilaç vermeyi aynı anda yapabilecek çok fonksiyonlu nanomateryallerin geliştirilmesidir. Eğer bu materyaller kanser tedavisinde etkin bir biçimde kullanılabilirse nanoteknoloji alanındaki en radikal gelişme olacağı düşünülmektedir. Bir diğer eğilim ise; tümörlü bölgeye sadece bir değil aynı anda birçok ilacı verebilmektir. Böylece kanser tedavisinde en sıkıcı problemlerden olan ilaç dirençliliği sorununu çözmek hedeflenmektedir [27].

Yeni nesil teknolojiler kullanılarak kanser tanı ve tedavisinde pek çok sorunu ortadan kaldırmayı amaçlayan kanser nanoteknolojisinde; bu amaç için kullanılan yollardan biri de gen terapidir.

2.4. Gen Terapi

İnsan genomunu dizileme ve moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler gen terapinin ortaya çıkması ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamıştır. Gen terapi; ilaç olarak genlerin kullanıldığı gelecek vaat eden bir tedavi yöntemidir [29, 30]. Gen terapi, kanser [31], AIDS [32], kardiyovasküler sistem hastalıkları [33], bulaşıcı hastalıklar

[34], kistik fibrozis [35], X'e bağılı şiddetli kombine immün yetmezlik [36] gibi pek çok hastalıkta efektif biçimde kullanılabilir [37] .

Kanserin kompleks doğasından dolayı; kanser gen terapisi pek çok terapötik strateji içerir. Bu stratejiler immünolojik ve moleküler hedefli terapiler olmak üzere temelde ikiye ayrılır [38, 39]. Şekil 2.2. daha ayrıntılı bir sınıflandırmayı sunmaktadır:



Şekil 2.2. En son ve en yaygın kanser gen terapi yaklaşımları [39]

Tümör baskılayıcı genler olağandışı hücre çoğalmasını sınırlayan genlerdir [40]. Bu ailenin en önemli temsilcilerinden biri p53 genidir. Kanserli hücrelerde apoptozu ve hücre döngüsünden çıkmayı uyarmak kanser gen terapisinin başlıca amaçlarındandır [41]. Kanser türlerinin %50'sinden fazlasında p53 geni mutasyonu bulunmaktadır [42]. Bunlar göz önüne alınarak kanserli hücrelere yabancı tip p53 genin transfeksiyonu kanser gen terapisinin en çok çalışılan araştırma konularındandır [43]. Bu gün hücre kültürü çalışmalarında p53'ün apoptozu uyardığı ve hücre bölünmesini durduğu etkin çalışmalar gerçekleştirilmiştir [43, 44].

2.4.1. Gen Terapi Çeşitleri

Gen terapi hedeflenen hücre tipine göre germline gen terapisi ve somatik gen terapisi olmak üzere ikiye ayrılır.

Germline gen terapisi; gametler (sperm ve yumurta) ve zigot üzerinde yapılan ve değişikliğin bir sonraki kuşaklara aktarıldığı gen tedavisidir. Germline gen terapisinin kullanımı etik sebeplerden dolayı Avrupa'da yasaklanmış olmasına

rağmen; Amerika'da FDA tarafından bu alanda yapılan çalışmalara izin verilmektedir.

Somatik gen terapisi ise; bir sonraki kuşağa aktarımın olmadığı, vücut hücrelerine yapılan gen terapi şeklidir. Tüm dünyada üzerinde yoğun şekilde çalışmaların yapıldığı bir tedavidir [45].

2.4.2. Gen Terapide Kullanılan Vektörler

Gen terapide çift iplikli DNA (dsDNA), tek iplikli DNA (ssDNA), plazmid DNA ve antisens oligonükleotitler (ASON) gibi farklı tipteki genetik materyallerin aktarımı gerçekleştirilir [46, 47]. Gen terapi teorik olarak bozuk geni sağlıklı olanla değiştirme ya da gerekli proteinin ifadesi için eksik olan genin eksikliğini tamamlama işlemi olsa da pratikte hedeflenen bölgeye (hücre ya da çekirdek) ulaşıncaya kadar aşılması gereken engellerin bulunduğu karmaşık bir işlemdir [48, 49]. Hücre çekirdeğine ulaşıncaya kadar genlerin hem hücre dışında hem de hücre içinde degradasyonu bu önemli sorunlardandır [50]. Dolayısıyla tedavinin başarısı, esas olarak terapötik genin herhangi bir biyodegradasyon olmadan hedeflenen hücreye girişine bağlıdır [51]. Bununla birlikte DNA 'nın biyolojik ortamdaki nükleaz duyarlılığı, polianyonik hidrofil ve oldukça büyük makromolekül yapısı hücre zarından pasif bir şekilde geçişini sınırlandırır [52, 53]. Bu yüzden terapötik DNA'yı nükleazlar aracılığıyla herhangi bir degradasyon olmadan ve hücre içinde transkripsiyonundan emin olunacak şekilde hedef hücreye taşıyacak vektör adı verilen taşıyıcılar kullanılır [37, 51].

Başarılı bir gen transferi için kullanılacak taşıyıcı sistem şu özelliklere sahip olmalıdır:

- 1- Vasküler endotelial hücreler ve kan bileşenleri ile etkileşim içinde olmamalı [54],
- 2- Retikuloendotelial sistemden (RES) kaçabilme yeteneğine sahip olmalı, güçlü bir immün yanıt oluşturmamalı [30],
- 3- Hücre zarından geçip hedef bölgeye ulaşabilecek kadar küçük olmalı [54],
- 4- Hazırlanması kolay ve büyük miktarlarda ticari olarak üretimleri ucuz olmalıdır.

Bu ihtiyaçları karşılamayı hedefleyen gen transfer sistemleri (vektörler) iki grupta sınıflandırılır:

2.4.2.1. Viral Vektörler

Terapötik genleri taşıyan non-patojenik hale getirilmiş virüslere viral vektörler denir. Vektör olarak kullanılan virüslerin genlerinin hastalık yapıcı kısımları genetik mühendisliği uygulamalarından yararlanılarak uzaklaştırılır ve bu genlerin yerini terapötik genler alır [55]. Taşıyıcı olarak en çok kullanılan virüsler; adeno virüsler, retro virüsler, adeno-ilişkili virüsler, herpes virüsüdür [56]. Yüksek transfeksiyon verimliliğine sahip olmalarına rağmen akut immün yanıt oluşturarak ölüme yol açabilirler [57, 58]. Büyük miktarlardaki üretimi zor ve pahalıdır [52, 58]. Sınırlı büyüklükteki genlerin taşınması gerçekleştirilebilir [52]. Tüm bu olumsuzluklar araştırmacıları daha güvenli, ucuz ve etkin alternatif vektörler bulmaya itmiştir. Böylece non-viral vektörler ortaya çıkmıştır [59].

2.4.2.2. Non-Viral Vektörler

Viral vektörlerin dezavantajları bilim adamlarını daha etkin vektörler bulmaya itmiştir. Böylece non-viral vektörler geliştirilmiştir. Non-viral vektörler nispeten güvenli, düşük immün cevap oluşturan, hazırlaması kolay, düşük maliyetli ve büyük miktarlarda üretimi mümkün olan taşıyıcılardır. Ayrıca farklı ve büyük genlerin taşınmasını gerçekleştirebilirken, stabilitelerinden dolayı uzun süre depolanabilirler [57, 60, 61]. Fakat düşük transfeksiyon verimine sahip olmaları geniş bir yelpazede kullanımlarını sınırlamaktadır [62]. Non-viral taşıyıcı sistemler iki grupta sınıflandırılır:

Herhangi bir taşıyıcı sisteme ihtiyaç duymadan hücre zarını daha geçirgen hale getirmek için fiziksel kuvvetlerin kullanıldığı ilk grupta hücre zarını geçici olarak zayıflatmak için mekanik, ultrasonik, elektrikli, hidrodinamik ya da lazer tabanlı sistemlerden yararlanır. Hücre zarındaki bu geçici değişim taşınan DNA'nın hedef hücreye girişini sağlar [63].

Elektroporasyon yönteminde; hücre zarının geçirgenliğini kontrollü bir elektrik alan uygulayarak arttırmanın sonucunda aktarılacak olan DNA'nın hücre içine geçişi sağlanır [64]. Başarılı bir şekilde çeşitli dokularda kullanılmıştır (Deri [65], kas [66], karaciğer [67] ve tümör [68], vb.) [69]. Güvenli, verimli ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasına rağmen in-vivo uygulamalarda kısıtlamalara sahiptir [70].

Gen tabancası yönteminde; hedef hücre veya doku içerisine gönderilecek gen; biyouyumlu, hızlandırılmış altın, tungsten, gümüş gibi ağır metal partikülleri kullanılarak taşınır. İdeal partikül taşıyıcı; biyouyumlu, inert ve küçük çaplı olmalıdır

(genellikle 1-1.5 μm) [71]. Taşıyıcılar, plazmit DNA ile kaplanır ve gerekli hızlandırma yüksek voltajlı elektrik kıvılcımı altında su buharlaştırma [72] veya helyum deşarjı aracılığıyla sağlanır [73]. Gen tabancası aracılığıyla transfer yönteminin pek çok avantajı vardır. Hızlı şekilde gerçekleştirildiğinde yüksek seviyede ve uzun ömürlü gen ekspresyonu başarılabilir [74, 75]. Fakat; tüm dokuya gen transferinde düşük penetrasyondan dolayı verimlilik oldukça azdır [48].

Ultrason aracılı gen transferi ya da sonoporasyon; ultrason dalgaları kullanılarak hücre zarının geçirgenliğini, zarda meydana gelen porlar ya da akustik kaviteyonlar aracılığıyla arttıran yeni yöntemler arasındadır. Güvenli olması, non-invaziv olması ve ameliyat gerekmeden iç organlara ulaşabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır [70]. Yöntemin verimliliği hücrelerin maruz kaldığı ultrason dalgalarının yoğunluğu ve şiddetinden, DNA konsantrasyonundan, kontrast faktörün kullanımından etkilenmektedir [70, 71].

Hidrodinamik enjeksiyon sistemi iç organlara özellikle de karaciğere etkili bir biçimde DNA'nın hedeflenmesinin gerçekleştirildiği kolay bir yaklaşım şeklidir [76]. İlk kez 1996 yılında Budker ve ark. tarafından farelerin femoral arterlerinden iskelet kasları içerisine hızlı enjeksiyonla plazmid DNA eklenmiştir [77]. En yaygın kemirgenlerde kullanılmış gen transfer yöntemidir. İnsan üzerindeki olumsuz yan etkilerinden dolayı; bizde uygulanabilirliği bulunmamaktadır [78].

Non- viral taşıyıcı sistemlerin ikinci grubunda; DNA çekirdeğe ve hücre içerisine çeşitli kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla sentezlenmiş taşıyıcılarla taşınır [63]. Kimyasal vektörler viral vektörlerin taşıdıkları sakıncaları aşmak için ortaya çıkmış umut verici, alternatif taşıyıcı sistemlerdir. Bu vektörler hücre çekirdeğine gen transferini iyileştirmek için üç amaç taşırlar:

- 1- DNA'nın (-) yükünü maskelemek,
- 2- DNA'yı daha küçük yapmak için sıkıştırmak,
- 3- DNA'yı hücre içi nükleazlar tarafından yıkımdan korumak.

Bu amaçlar anyonik DNA ile polikatyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimler, biyobozunur polimerler aracılığıyla enkapsülasyon veya DNA'ya adsorbsiyon ile gerçekleştirilir [48].

DNA ve polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak oluşturulan gen salım sistemleri anyonik DNA ile katyonik lipitler veya polimerler arasındaki elektrostatik ilgiyi kullanırlar [79-82]. Kendi kendine düzenlenen nano boyuttaki katyonik lipit-DNA salım sistemleri olan lipoplexler genlerin taşınması için kullanılırlar [83]. Lipoplexlerin düşük verimlilikleri yanısıra (+) yükden dolayı sahip oldukları toksite in-vivo'da kullanımlarını sınırlamaktadır [84]. Bir başka kendiliğinden düzenlenebilen nano boyutlu yapı polyplex denen katyonik polimerlerdir (fizyolojik pH'da) [85]. Bu sistemde de toksite, düşük verimlilik, polimer polidispersitesi gibi sorunların üstesinden gelinmelidir [86]. Bugün bilim adamları bu problemleri çözmek için; poli-l-lizin (PLL) [87], poli-etilenimin (PEI) [88], poli-amido-amin (PAA) [89], vb. gibi monodispers, biyobozunur polimerlere yönelmişlerdir.

Çeşitli yaklaşımlar kullanılarak aktif moleküllerin, biyomoleküllerin ve inorganik nanopartiküllerin enkapsülasyonu oldukça önemli bir araştırma konusu olup, birçok grup tarafından aktif olarak çalışılmaktadır [90-94]. DNA enkapsülasyonu için kullanılan biyodegradable polimer sistemleri katyonik sistemlere göre üstün özelliklere sahiptir. Örneğin; polimer bozunabilirliğinden dolayı vücuttan uzaklaştırılması kolaydır, kontrollü DNA salımına olanak verir ve DNA'ya iyi bir koruma sağlar. Fakat bu sistemde de hazırlama koşullarındaki olumsuzluklardan (organik solventler, yüksek sıcaklık, yüksek kayma kuvveti) dolayı transfer edilecek DNA'nın parçalanması [95], düşük enkapsülasyon verimliliği [96], düşük DNA biyoyararlanımı sebebiyle tamamlanmamış DNA salımı gibi problemler mevcuttur [97, 98]. Bu sebeple DNA'yı enkapsüle edip in-vivo'da kullanım için blok-kopolimer miseller [99], inversiyon emülsiyonu, lipozomlar [100, 101] ve çok tabakalı sistemler geliştirilmiştir [102, 103]. Gen terapi uygulamalarında en çok kullanılan sistemlerden bir tanesi de DNA adsorbsiyonu, enkapsülasyonu ya da taşınması için kullanılan çeşitli organik ve inorganik partiküllerdir [50, 82, 104-106].

2.5. Organik Partiküller

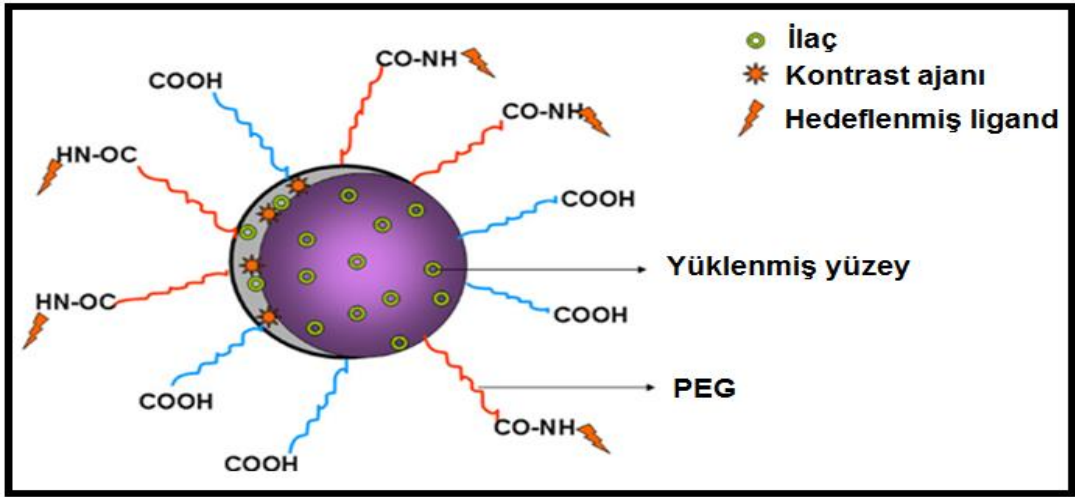
2.5.1. Karbon Nanoyapılar

Tek ve çok duvardan meydana gelebilen karbon nanotüpler (CNT) karbon grafit nanomateriyalleridir. Liu ve ark. tarafından uygun biçimde işlevselleştirilmiş CNT'lerin herhangi bir yan etkiye neden olmadan, intravenöz şekilde safra aracılığıyla vücuttan atılabildiği gösterilmiştir. Kovalent ve kovalent olmayan

etkileşimlerle karbon nanotüplerle terapötik ajanlar bir araya getirilebilir. CNT'lerin radyo frekansı ve lazer tedavisi ile bağlantılı olarak termik ablasyon ile kanser hücrelerini öldürmede de kullanıldığı gösterilmiştir [107]. Karbon nanotüpler ve amonyum ile fonksiyonel hale getirilmiş karbon nanotüpler ile (-) yüklü plazmid DNA arasındaki elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak DNA'nın hedef bölgeye taşınımı gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonel hale getirilmiş karbon nanotüpler aracılığıyla yapılan gen terapide çıplak DNA'ya göre yüksek ekspresyon düzeyleri elde edilmiştir [108, 109].

2.5.2. Polimerler

Polimerler nanopartikül sentezi için çok uygun materyallerdir. İlaç ve protein yükleme-salınım için oldukça başarılı olup, sentezlenen partikülün raf ömrünü de arttırlar [110]. Polimerik nanopartiküllerin en önemli özellikleri biyouyumluluk, biyobozunurluk, kimyasal transformasyonlar aracılığıyla kolaylaştırılmış yüzey modifikasyonları, mükemmel farmakokinetik kontrol ve kontrollü ilaç salımıdır [111]. Polimer nanopartiküller genellikle doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki sınıfta toplanırlar. Yaygın olarak kullanılan polimerik malzemeler; polilaktik asit, poliglukolik asit, polilaktik glikolik asit, poli kaprolakton, poliglutamik asit, polymalik asit ve bunların kopolimerleridir [112]. PEG hidrofilik yapısı nedeniyle nanopartiküllerin yüzeyini kaplamada kullanılan, bundan dolayı özellikle ilaç salım sistemlerinde tercih edilen bir polimerdir. PEG kaplama partiküllerin kararlılığını ve biyouyumluluğunu artırır [113]. Nanotıptaki bir diğer efektif sistem polimerik nanokonjugatlardır. Bunlar yüzeylerinde tümör dokusu ile direk bağlantı kurabilecek pek çok fonksiyonel grup barındırırlar [24]. Şekil 2.3.'te fonksiyonel hale getirilmiş polimerik bir nanopartikülün çeşitli amaçlar için kullanımı gösterilmiştir [7].



Şekil 2.3. İlaç, kontrast ajanı ve hedeflenmiş ligand taşıyabilmek için fonksiyonel hale getirilmiş polimerik bir nanopartikülün şematik görüntüsü [7]

2.5.3. Lipozomlar

Lipozomlar, kendi kendine düzenlenme özelliği olan, globüler şekle sahip kolloidal nano yapılar olup, merkezi sulu boşluğu çevreleyen çift katlı lipit tabakasının oluşturduğu bir yapıdır. Bugün piyasada FDA tarafından metastasik meme kanseri tedavisi için onaylı (Doxil, DaunoXome, Myocet) lipozom tabanlı antikanser ajanları bulunmaktadır [114, 115]. Çeşitli antibodiler ile konjuge lipozomların gelişmiş terapötik etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. PEG'lenmiş lipozomlar ve lipozom aracılı siRNA, DNA salımı aracılığıyla da bugün farklı kanser türlerinin tedavisinin gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır [116, 117].

2.5.4. Dendrimerler

Yaygın olarak kullanılan nanotaşıyıcılardan olup düzgün şekilde düzenlenmiş kompleks moleküllerden oluşan dallı bir yapıya sahiptirler. Çekirdek, dallar ve uç gruplarından meydana gelir. Dendrimerlerin hidrofobik çekirdek, hidrofilik yüzeyleri hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçların taşınabilmesine olanak sağlar [118]. Dendrimerlerin büyüklüğü, şekli ve farmakokinetik özellikleri onların jenerasyon sayısına, çekirdeğin ve dalların kimyasal kompozisyonuna, yüzey fonksiyon gruplarına bağlıdır. Dendrimerler çözünürlük artırma, foto-dinamik terapi, ilaç salımı, biyolojik görüntüleme ve kanser tedavisi gibi çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır [119, 120].

2.5.5. Miseller

Miseller 1-100 nm (kendi kendine düzenlenme özelliği olan amfifilik di-triblok kopolimerleridir) arasında küçük küresel, kolloidal partiküllerdir [121]. Misel büyüklüğü; misel çekirdeğine ve ilacın kimyasal doğasına bağlıdır. Miseller hidrofilik baş ve sulu ortam içinde bulunan hidrofobik kuyruk kısmından oluşan yapıya sahiptir [122]. Sulu ortamda düşük konsantrasyonlarda bileşenler monomer halinde bulunurken, konsantrasyon artışıyla tipik misel oluşumu görülür [123]. Genelde hidrofobik çekirdek oluşumu için yaygın kullanılan polimerler; poliesterler, polieterler ve poliamino asitlerdir [122]. Diğer ilaç salım sistemleri ile karşılaştırılınca polimerik miseller çeşitli avantajlara sahiptir [123]. $\alpha 2$ ligand konjuge misellerin spesifik olarak aktif bir biçimde beyine hedeflendirilmesi [124], pek çok çalışmada EGFR reseptör hedeflemesinin monoklonal antibodiler aracılığıyla yapıldığı [125], kanser hücrelerini hedeflemede bir başka önemli molekül folatın ligand olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir [126].

2.5.6. Virüsler

Kanser tedavi uygulamalarında doğal nanopartiküller olarak oldukça çalışılmaktadır. Viral nanopartiküller sentetik nanopartiküllere göre belirgin boyuta sahip olmaları, immün sistemden kolaylıkla kaçabilmeleri, biyoyumlulukları ve biyobozunur olmaları gibi kendiliğinden üstün özelliklere sahiptirler. Bu amaçla kullanılan viral nanopartiküller arasında cowpea mosaik virüsü (CPMV) ve Q β , MS2 vb., bakteriyofajlar üzerinde çeşitli gruplar yoğun şekilde çalışmaktadır [127].

2.6. İnorganik Materyaller

2.6.1. Altın Nanopartiküller

Altın nanopartiküller gen terapi ve ilaç salım uygulamaları için en uygun ve verimli inorganik yapılardır [128]. Toksik değildirler, biyoyumlu ve inerttirler [129]. Bu partiküllerle pek çok çalışma yürütülmektedir. Örneğin; Visaria ve ark. PEG kaplı altın nanopartikülleri kullanarak TNF- α salımını gerçekleştirmişlerdir. Bu sistem azaltılmış sistemik toksiteye sağlarken, tümör parçalanmasını da arttırmıştır. CYT-6091 gibi altın nanokonjugatları ile ilgili çalışmalar Faz-1 aşamasındadır [130]. Methotrexate (dihidrofolat redüktaz inhibitörü), doxorubicin gibi ilaçlarla da çalışmalar yürütülmektedir [131, 132]. Fototermal terapilerde de altın nanopartiküller kullanılmaktadır [133]. Altın nanopartikülün fiziksel boyutu hücre içine alımda önemli bir role sahiptir [134]. Hedefleme amaçlı çeşitli ligandların kullanımıyla birlikte

büyüyen boyut nedeniyle in-vivo'da etkili bir ilaç hedefleme başarısızdır [4]. Son yapılan çalışmalarda pankreatik kanser hücrelerinde antibodiler aracılığıyla EGFR reseptörleri hedeflenmiş [135], yumurtalık kanserinde siRNA aracılığıyla gen susturma yapılmış [136] , PEG modifiye lipit altın porfirin kullanılarak etkili hücre içi alımı ve tümör yıkımı gerçekleştirilmeye çalışılmıştır [137].

2.6.2. Kalsiyum Fosfat

Yüksek biyouyumluluğu sebebiyle nükleik asit ve ilaç salımında taşıyıcı sistem olarak kalsiyum nanopartiküllerin kullanımı oldukça araştırılmaktadır. Nükleik asitlerdeki (-) yüklü fosfat grubu ile kalsiyum fosfattaki pozitif yüklü Ca^{2+} arasındaki etkileşim bu partiküllerin avantajlı olmasını sağlamaktadır. Fakat partiküllerdeki zayıf kararlılık ve büyük boyut hücre içine salım uygulamalarında büyük bir engel oluşturmuştur. Partiküllerin çeşitli polimerle kaplanması ve sentez aşamasında pH gibi çeşitli parametrelerin ayarlanmasıyla bu sorunlar giderilmeye çalışılmaktadır [138]. Partiküllerin görüntüleme ve tedavide de kullanılabileceği Morgan ve ark. tarafından gösterilmiştir. Bu partiküllerin insan üzerinde kullanımı için daha pek çok çalışma yapılmalıdır [139].

2.6.3. Silika Nanopartiküller

Son gelişmelerle partikül büyüklüğü, morfolojisi ve porozitesinin iyi bir şekilde kontrolünün sağlandığı silika nanopartiküllerin ilaç salım sistemlerinde kullanılabilirliği yaygın şekilde çalışılmaktadır. Partiküllerin büyük yüzey alanı ve gözenekli yapısı, etkin ilaç enkapsülasyonu ve hedef bölgeye ulaşmaya kadar degrade olmayı engellediği gibi ayarlanabilir partikül şekli ve büyüklüğü sayesinde; hücre içine partikül alım oranları da arttırılabilir. Gözenekli yapısı sayesinde pek çok avantajı beraberinde getiren bu partiküllerle in-vivoda etkin tedavilerin yapılabilmesi için daha pek çok çalışma yapılmalıdır [140].

2.6.4. ZnO Nanopartiküller

Çinko oksit yarı iletken bir malzeme oluşuyla farklı teknolojik uygulamalarda umut vaat eden bir malzemedir. Antimikrobiyal etkisi ile ilgili pek çok çalışma yürütülmekte olup, üstün fizikokimyasal özellikleri kanser alanındaki çalışmalarda da yer almasını sağlamıştır [141, 142]. Shen ve ark. tarafından kütle spektrometresi kullanılarak, polimetil metakrilat kaplı ZnO nanopartiküller aracılığıyla düşük düzeylerdeki kanser biyomarkerlarının tespiti gerçekleştirilmiştir [143, 144]. Dorfman ve ark. ZnO partikülleri kullanarak çok düşük seviyedeki telomeraz aktivitesinden yararlanarak

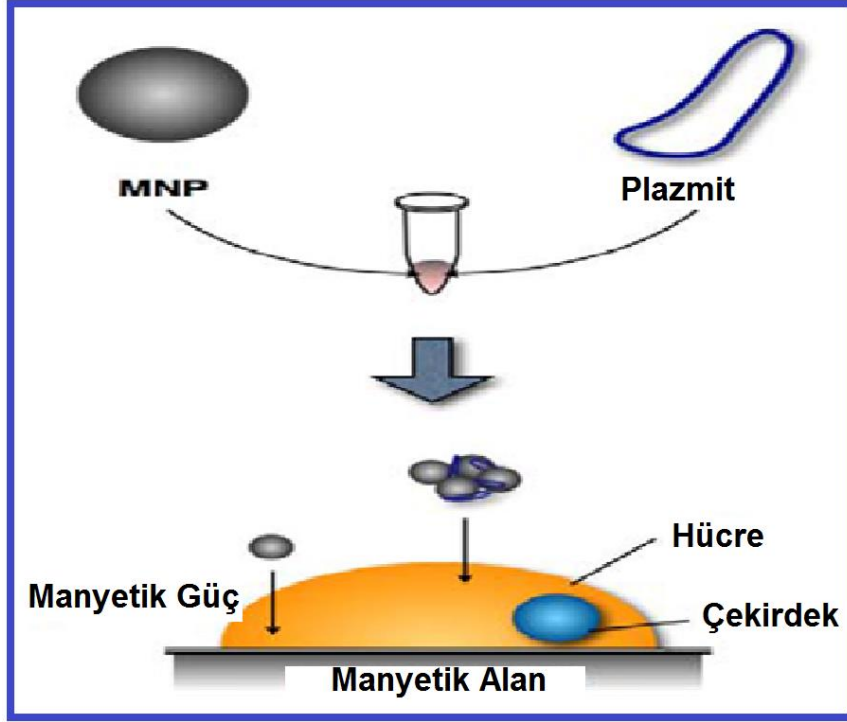
kanser tanı ve taraması için yüksek verimli tanıma gerçekleştirmiştir [145, 146]. Başka bir çalışmada yüzeyi silika ve amin grupları ile modifiye edilmiş ZnO nanopartiküllerin gen transfeksiyonu için kullanılıp, transfeksiyon verimini arttırdığı tespit edilmiştir [147, 148]. Bundan başka hedeflenmiş ilaç taşıyıcı olarak, yüzey modifikasyonu ile luminesens hale getirilerek eş zamanlı gen transferinin izlendiği çalışmalar da yapılmaktadır. İlerleyen zamanlarda hedefli gen salımı, gen susturulması ve seçici olarak kanser hücrelerinin yıkımının gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir [149].

2.6.5. TiO₂ Nanopartiküller

TiO₂ nanopartiküller kanser tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak çalışılan bir başka taşıyıcı sistemdir. Etkin bir fotokatalitik aktiviteye sahip olması ilgiyi daha da arttırmaktadır [7].

2.7. Manyetik Nanopartiküller

Günümüzde manyetik nanopartiküller önemli biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; biyolojik varlıkların (hücre, protein, nükleik asitler, enzim, bakteriler, virüsler, vb.) manyetik biyo-ayırımı ve tespiti, klinik tanı ve tedavi (örneğin; MRI (Manyetik Rezonans Görüntüleme) ve MFH (Manyetik Sıvı Hipertermi), hedefli ilaç taşınımı ve salımı, biyolojik etiketler, gen terapi, vb.. Manyetik nanopartiküllerin kontrast ajanı olarak MRI'da [150, 151], hipertermide [152], kontrollü ilaç salımında kullanılmasının [153] yanında etkin bir biçimde nükleik asitler (plazmitler, siRNA'lar, vb.) için transfeksiyon ajanı olarak da kullanımı bulunmaktadır [154, 155]. Hedefli ilaç dağıtımından esinlenerek ortaya çıkmış, manyetik nanopartiküllerin vektör olarak kullanıldığı gen transfeksiyonuna manyetofeksiyon denilmektedir. Yöntemin temelinde MNP-nükleik asit kompleksi oluşturulduktan sonra, bu bileşimin hücre kültürüne eklenmesi ve manyetik bir güç uygulayarak yapının hücre zarından geçip sitoplazma içine çekilmesi vardır [26]. Şekil 2.4 basit bir biçimde manyetofeksiyonu şematize etmektedir.



Şekil 2.4. Manyetofeksiyonun şematik görüntüsü [26]

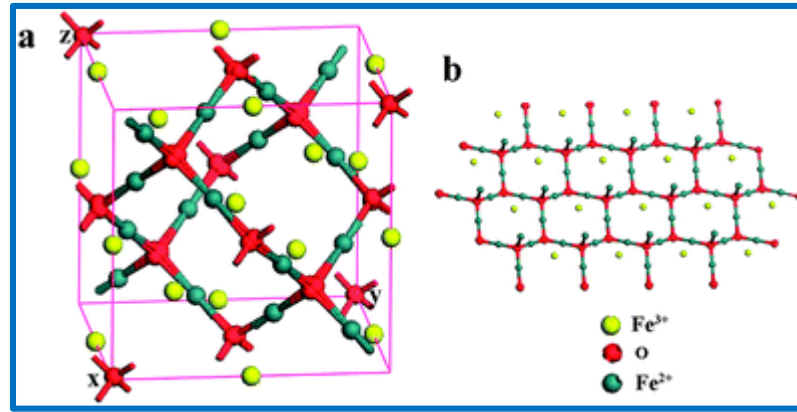
Demir oksit nanopartiküller yüksek manyetik momente sahip CoFe_2O_4 , NiFe_2O_4 ve MnFe_2O_4 gibi bileşiklerle karıştırıldığında diğer manyetik materyallere göre üstün performans gösterirler. Fakat bu nanopartiküller, hücreler için oldukça toksik olduğundan in-vivo ve in-vitro kullanımları sınırlıdır. Ama demir oksitler (manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) gibi) göreceli olarak güvenli kullanım sağlamaktadır. Demir oksitlerin biyomedikal amaçlı kullanımında yüzey modifikasyonunun gerçekleştirilmesi önemli bir adımdır. Bu modifikasyonu gerçekleştirmek için literatürde kaydedilmiş çeşitli bileşikler kullanılmıştır. Bunlardan bazıları; doğal polimerler (proteinler (serum albümin, streptavidin) ve karbonhidratlar (kitosan, heparan sülfat gibi)), sentetik organik polimerler (polietilen glikol, polivinil alkol, poli-L-laktik asit), silika ve altındır. Yüzey kaplamayla nanopartiküllerdeki aglomerasyon, sitotoksitite gibi problemlerin önüne geçmenin yanında fonksiyonelleştirme yapabilmekte hedeflenir [26].

2.7.1. Demir oksit Nanopartiküller

Demir oksit nanopartiküller geniş kullanım alanlarına sahip olduklarından dolayı yoğun bir şekilde ilgi çekmektedirler. In-vitro tanıda, küçük demir oksit nanopartiküller kullanılarak yapılan uygulamalar yaklaşık 40 yıldır çalışılmaktadır. Geçen 20 yıllık sürede kanıtlanmış biyoyumluluğundan dolayı biyolojik

uygulamalarda umut verici bir aday olmasından dolayı farklı çeşitteki demir oksitlerle yapılan çalışmalarda farkedilecek oranda bir artış gözlenmiştir (özellikle maghemit ve manyetit nanopartiküller).

Manyetit, Fe_3O_4 , en yaygın olan demir oksitlerden biridir. Fe kanyonları interstisyel tetrahedral ve oktahedral bölgeleri işgal ederken, oksijen tarafından şekillendirilmeyle kapalı paketlenmiş (fcc closed packing) kübik ters spinel bir yapı ortaya çıkar [156]. Şekil 2.5'te manyetitin ters spinel yapısı sunulmuştur.



Şekil 2.5. Manyetik nanopartiküllerin ters spinel yapısı [156]

Manyetitin oktahedral yapısında, elektronlar oda sıcaklığında Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının arasında çok kolay bir şekilde hareket etme yeteneğine sahiptirler. Bu da manyetitin yarı metalik özelliği taşıyan malzemeler sınıfında olduğunun önemli göstergesidir [157]. Maghemitte manyetite benzer bir yapıya sahiptir. Fakat; maghemitte Fe iyonlarının çoğu Fe^{3+} pozisyonunda bulunmaktadır [156].

Manyetit nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve kimyası hücresel terapiler, doku onarımı, ilaç taşınımı, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), hipertermi, gen tedavisi (özellikle manyetofeksiyon aracılı gen terapi) ve daha pek çok alanda aktif olarak kullanılmalarını sağlamaktadır. Tüm bu uygulamalarda manyetik nanopartiküllerin 100 nm'den küçük boyut, yüksek manyetik özellik, çok dar boyut dağılımı, biyouyumluluk, yüzeyde interaktif fonksiyon özelliklerine sahip olmaları gerekmektedir [158].

2.7.2. Manyetik Nanopartikülleri Sentezleme Yöntemleri

Literatürde manyetik nanopartiküllerin (manyetit ve maghemit) sentezi için çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Şimdiye kadar yayınlarda mikroemülsiyon, sol-jel

sentezi, sonokimyasal reaksiyon, prekürsörlerin hidroliz ve termolizi, akış injeksiyon sentezi, termal bozunma, solvotermal, elektrospray sentezi ve ikili çöktürme olmak üzere birçok yöntem rapor edilmiştir [159].

Manyetik nanopartiküllerin sentezinde iki temel problem bulunmaktadır. Birincisi sentezlenen partiküllerin monodispers olarak; uygun boyutta oluşumu, ikincisi ise, partikül sentezinde hiç bir saflaştırma tekniği (ultrasantrifikasyon, ayırma kromatografisi, vb.) kullanmadan kullanılan prosedürlerin tekrarlanabilirliğidir. İkili çöktürme tekniği, manyetik nanopartikül üretiminde kullanılan en yaygın, basit, etkin ve verimin yüksek olduğu bir yöntemdir. Demir oksit nanopartiküller, Fe^{3+} ve Fe^{2+} tuzlarının baz çözeltisinin içine eklenmesi ile çökeltme yoluyla sentezlenir [158].

Son zamanlarda, polyol yöntemi (solvotermal) ile manyetit sentezi oldukça dikkat çeken yöntemler arasına girmiştir. Bu yöntemde nanopartiküller solvotermal ortamında (yüksek sıcaklık, yaklaşık $200^{\circ}C$) farklı organik solventler varlığında (etilen glikol ve propilen glikol gibi) oluşturulur. Üretilen nanopartiküllerin yüksek mıknatıslanma gücü, hidrofilik yapıda olmaları ve kontrol edilebilir ikincil yapılarla sahip olmaları bu yöntemin avantajları arasındadır [160].

Literatürde solvotermal yöntemi ile farklı morfolojilerde (kompakt mikrosferler, çiçek benzeri nanosferler, nanosferler ve ikincil yapılar gibi) başarılı bir şekilde sentezlenmiş manyetit partiküller bulunmaktadır. Farklı morfolojide olmaları, yeni özellikler ve yenilikçi uygulamalarda kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (MRI görüntülemesi, fotonik krisaller ve ilaç salımı gibi) [160].

2.7.3. Manyetit Nanopartiküllerin Fonksiyonel Hale Getirilmesi

Manyetik demir oksit nanopartiküllerde herhangi bir yüzey modifikasyonu olmadığında, partiküllerdeki hacme göre büyük yüzey alanı hidrofobikliğin başlıca nedenidir. Partiküller arasındaki hidrofobik etkileşimler aglomerasyona sebep olarak; büyük kümelerin oluşmasına bu da partikül büyüklüğünün artmasına yol açar. Oluşan kümeler arasındaki güçlü dipol-dipol etkileşimleri partiküllerin ferromanyetik davranış göstermesinin başlıca sebebidir [161]. İki büyük partikül kümesi yan yana geldiğinde her biri bir diğerinin manyetik alanını etkilemektedir. Bu etkileşim agregasyonun artışına sebep olur [162]. Tüm bunlara ek olarak vander waals kuvvetlerinden ortaya çıkan ek topaklaşma nedeniyle manyetik demir oksit nanopartiküllerde yüzey modifikasyonu vazgeçilmez bir uygulamadır. Yüzey modifikasyonu için amino grupları, silika, çeşitli polimerler, surfaktantlar ve organik

bileşiklerden yararlanılır [163].

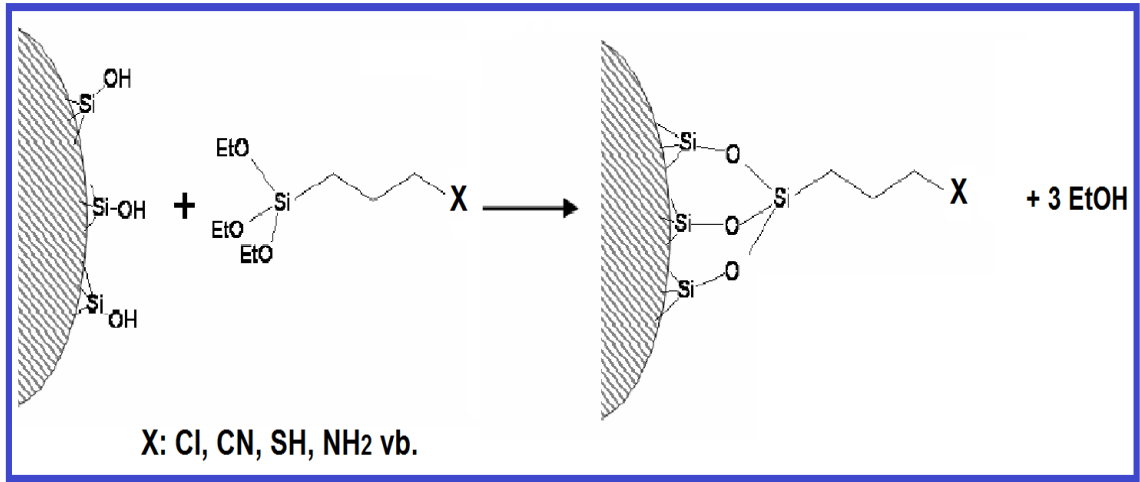
2.7.3.1. Silika Kaplama

Manyetik demir oksit nanopartiküllerin modifikasyonu için son yıllarda pek çok materyal keşfedildi. Bunlardan bazıları; soy metaller, metal oksitler ve inorganik silikadır. Bu materyaller arasında silika, Fe_3O_4 çekirdeği ile aşındırıcı sıvı ortam arasındaki kimyasal teması önleyen yoğun bir kabuk oluşturduğundan oldukça başarılı bir malzemedir. Silika kabuğun yüzey kimyasının biyo-konjugasyon için çeşitli kimyasallar ve moleküller için biyouyumlu oluşu bir diğer avantajıdır. Silika yüzey üzerine çeşitli birleştirme ajanları eklenip, buraya spesifik ligandların takılması gerçekleştirilmiş, daha sonra bu hedefli ligandların hedef organlar üzerine antikor-antijen tanınmasıyla salımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Silika kaplı demir oksit nanopartiküllerin sentezlenmesinde en çok kullanılan iki yöntem; mikroemülsiyon ve tetraetil ortosilikatın alkalın hidrolizidir (Stöber methodu olarak da bilinir). Mikroemülsiyon metodu; silika kaplamayı sınırlandırmak ve kontrol etmek için miselleri kullanır. Bu yöntemde; oluşan silika kaplı manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde surfaktant tabakasının bulunması, sonuç nanopartiküllerle biyokonjugasyon sağlanmasını engellemektedir. Bu yöntemde çekirdek-kabuk (core-shell) nanopartikülün oluşması için surfaktant kullanılır. Bunun aksine; Stöber yönteminde surfaktant kullanımı yoktur. Fakat; partiküller hala kararlıdır ve kolayca dispers olurlar. Bu yöntemle elde edilen çekirdek-kabuk $Fe_3O_4@SiO_2$ NP'ler birçok biyo-aplikasyonda başarılı bir kullanım için idealdir. Fakat silika yüzeyin üzerindeki bu surfaktant tabakası, silika yüzeyin sağladığı kolay biyo-konjugasyon avantajını bloke eder [164].

2.7.3.2. Manyetik Nanopartiküllerin Silanizasyonu

Silanlar, $Y(CH_2)_n-Si-R_3$ genel kimyasal formülüne sahip bifonksiyonel moleküller olarak tanımlanmaktadır. Yüzeyi fonksiyonel hale getirmek için en çok kullanılan silanlardan biri $NH_2(CH_2)_3-Si(OC_2H_5)_3$ kimyasal formülüne sahip 3-aminopropiltrietoksisilandır (APTES). Silis gruplarının yüzey kimyasının iyice tanımlanmış olması fonksiyonelleştirme, kaplama ajanı olarak kullanımı sağlamaktadır. Bu kaplama, partiküllerin birçok uygulamada (özellikle biyolojik uygulamalar) kullanımına olanak verir. Reaksiyonun gerçekleşmesi için çok az miktarda suyun ortamda bulunması yeterlidir. Silanizasyon sırasında iki reaksiyon aynı anda gerçekleşir. n-silan hidroksil gruplarının yüksek reaktif silanol türlerine

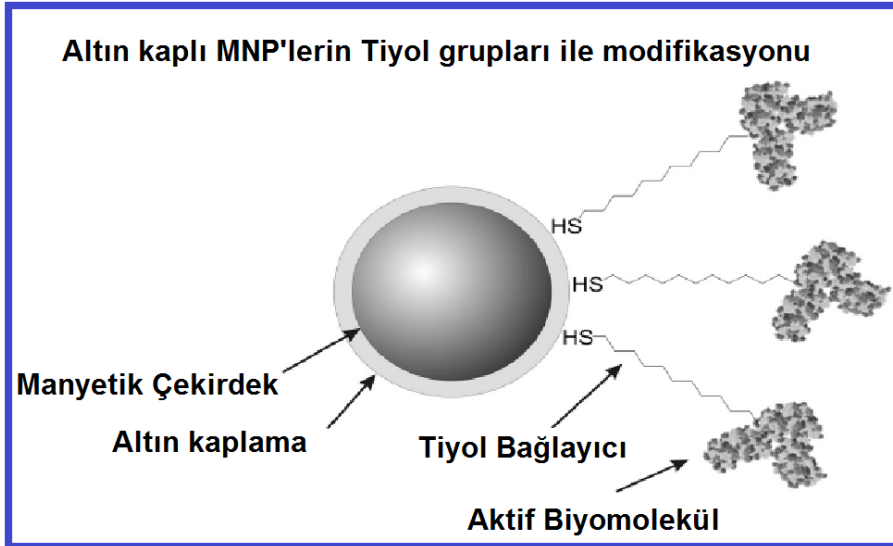
hidroliz olmaları ve ortaya çıkan silanol gruplarının kondensasyon reaksiyonu ile silika kaplı yüzeyde bulunan -OH grupları ile tepkimesi sonucunda kararlı Si-O-Si kovalent bağlarının oluşmasıdır [165]. Sıcaklık, solvent tipi, başlangıç katalizörü, organosilan konsantrasyonu ve zaman; reaksiyonu etkileyen bazı parametrelerdir. 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES), 3-aminopropiltrimetoksi silan (APS), ve N-(2-aminoetil)- 3 aminopropiltrimetoksisilan (AEAPS) silanizasyonda en çok kullanılan amin kaynaklarıdır [166]. Şekil 2.6.'da trietoksisilan kullanılarak silika yüzeylerin silanizasyonu gösterilmiştir [167].



Şekil 2.6. Silanizasyon ile silika yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesi [167]

2.7.3.3. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller

Altın, biyolojik uygulamalar için en çok kullanılan materyallerden biridir. Altın kararlı bir yapıya sahip olmasının yanında, tiyol linker üzerinden kolayca fonksiyonel hale getirilebilir. Şekil 2.7.'de altın kaplı manyetik nanopartiküllerin tiyol linker ile fonksiyonel hale getirilmesi gösterilmektedir [167].



Şekil 2.7. Au kaplı MNP'lerin –SH grupları aracılığıyla modifikasyonu [167]

Tiyoller ve birçok başka sülfür bileşikleri, altın yüzeylere karşı yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu özellik bilim adamları tarafından biyoteknolojide sıklıkla kullanılmaktadır (örneğin; immunoassay için antijen bağlamada).

Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin (18-80 nm çapında) ilk kez 2001 yılında Lin ve ark. tarafından ters misel mekanizması ile sentezlendiği rapor edilmiştir. Demir oksit nanopartiküllerin sentezi miseller içinde gerçekleştirilmiştir ve bu işlemi takiben altın kaplanmıştır. Altın kaplı manyetitin yüzeyine agregasyonu önlemek için 1-dodekantiyol ($C_{12}H_{25}SH$) kendiliğinden düzenlenme mekanizmasıyla bağlanmıştır. Tiyol grupları taşıyan altın kaplı partiküllerin, biyomoleküller ile fonksiyonelize edilmesi için; hedef molekülün diğer ucunda fonksiyonel uçlar taşıması gerekmektedir [167].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez iki kısımdan oluşmaktadır. İlk kısımda transfeksiyon amacıyla kullanılacak nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyon ve amaca uygun şekilde fonksiyonel hale getirilmesi, ikinci kısımda; *E.coli*'den p53-EGFP genini taşıyan plazmidin saflaştırılması, partikül ve plazmidin etkileştirilmesi ve sonra, pDNA-partikül konjugatlarının fare fibroblast hücreleri (L929) üzerindeki toksik etkisinin incelenip, toksik sınırın belirlenerek, bu konjugatların belirlenen oranlarının kanser (DLD-1) hücrelerine aktarımının gerçekleştirilip, sitotoksitite testleri; apoptoz/nekrozun araştırılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmadaki deneyler ayrıntılı bir biçimde ilerleyen bölümlerde anlatılmıştır.

3.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Deneysel olarak iki kısımdan oluşan tez kapsamında ilk önce gen transfeksiyonunda kullanılacak olan nanopartiküllerin sentezi, sonra bunların modifikasyonu ve fonksiyonel hale getirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için gereken karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır (TEM, Zeta Sizer, XRD, FTIR).

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Manyetik nanopartiküllerin sentezi için polyol (solvotermal) yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan maddeler; demir tuzu ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$); Sigma Aldrich (A.B.D.), üre; Sigma Aldrich (A.B.D.), 1-2 propilen glikol (PG); Sigma Aldrich (A.B.D.) ve süksinik asit BDH'den (İngiltere) temin edilmiştir.

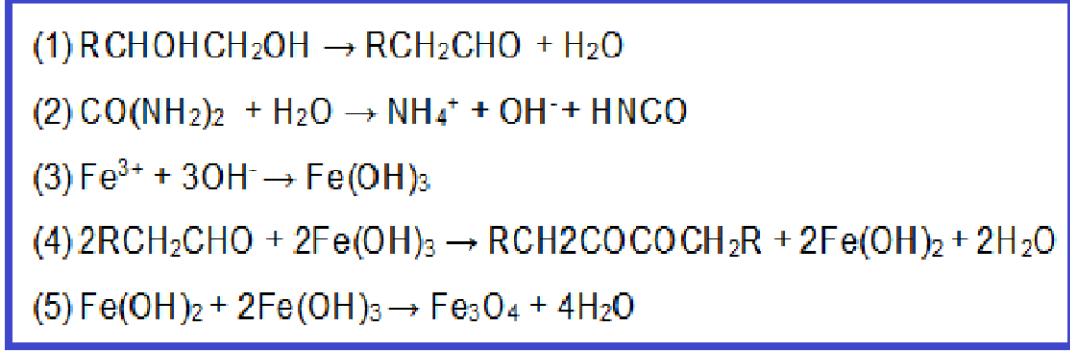
Silika kaplamada kullanılan; TEOS (tetraetil ortosilikat); Sigma Aldrich (A.B.D.), etanol; Merck (Almanya), amonyak; Merck (Almanya)'den temin edilmiştir.

APTES (3-aminopropiltrioksosilan); Sigma Aldrich (A.B.D.), TEA (triötilen amin); Merck (Almanya), sistamin (2-aminoötilenol); Sigma Aldrich (A.B.D.), altın tuzu ($HAuCl_4$); Sigma Aldrich (A.B.D.), CTAB; Merck (Almanya), tri-sodyum sitrat; BDH (İngiltere), toluen; Sigma Aldrich (Almanya)'dan temin edilmiş olup tüm deneylerde ultra saf su kullanılmıştır.

3.1.2. Polyol Yöntemi ile Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Bu yöntemde manyetik nanopartiküllerin sentezi için Cheng ve ark. tarafından kullanılmış polyol yönteminden yararlanılmıştır. Yöntemde; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (3 mmol), süksinik asit (1 mmol) ve üre (30 mmol), 1, 2 propilen glikol (30 ml) içerisine eklenip,

manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüne kadar karıştırılmıştır. Şekil 3.1.'de manyetik nanopartiküllerin oluşumu sırasındaki reaksiyonlar kimyasal olarak gösterilmiştir [160].



Şekil 3.1. Solvotermal ile MNP üretiminin kimyasal formülü [160]

Elde edilen çözelti, 50 ml kapasiteye sahip Teflon reaktör içerisine aktarılıp 200°C'ye kadar ısıtılmış olan etüvde bir gece boyunca reaksiyona tabi tutulmuştur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, reaktör oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve içerisindeki siyah renkli çözelti magnet yardımıyla toplanarak, organik ve inorganik safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla peş peşe etanol ve saf su ile yıkanmıştır. Son olarak yıkanan partiküller 60°C'de altı saat boyunca vakum ortamında yapıdan tamamen suyun uzaklaştırılması için kurutulmaya bırakılmıştır [160].

3.1.3. Manyetik Nanopartiküllerin Silika ile Kaplanması

Manyetik nanopartikülleri biyoyumlu ve stabil hale getirip agregasyonu önlemek ve negatif yüzey yükü sağlamak; böylece manyetik nanopartiküllerin; in-vivo uygulamalarda kullanımını gerçekleştirmek amacıyla iyi tanımlanmış bir yöntem olan silika kaplama sağladığı avantajlardan dolayı oldukça tercih edilmektedir [168]. Manyetik nanopartiküllerin silika kaplanması sol-jel methodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; 5 ml tetraetil ortosilikat (TEOS) üç boyunlu reaktör içerisinde, 80 ml etanol ve 20 ml distile su ile oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Sonra önceden sentezlenmiş olan 20 mg manyetik nanopartikül reaktöre eklenerek 20 dk boyunca oda sıcaklığında iyice dispers etmek için soniklenmiştir. Son olarak 5 ml amonyak (%28 w/w) damla damla ortama eklenmiş ve 6 saat boyunca mekanik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra silika kaplanmış olan manyetik nanopartiküller magnet yardımıyla toplanarak

bir kaç kez distile su ile yıkanmıştır [169].

3.1.4. Silika Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin APTES ile Kaplanması

Silika kaplı manyetik nanopartikülleri (Si@MNPs) pozitif hale getirmek için 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) kullanılmıştır. Burada izlenen yöntem şöyledir; 0.4 gr silika kaplı manyetik nanopartiküller bir gece boyunca 90°C'da bekletilerek yapıdaki suyun tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra partiküller üç boyunlu reaktöre aktarılarak 20 ml toluen eklenmiştir. Sonikatör yardımıyla partiküller iyice dispers edildikten sonra ortama 4 ml APTES ve 0.1 ml trietilen amin (TEA) eklenmiştir. Silanizasyon reaksiyonu 8 saat boyunca 130°C'da reflux sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

APTES kaplı manyetik nanopartiküller önce toluenle sonra da etanol ile beş kere yıkanarak çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir [170].

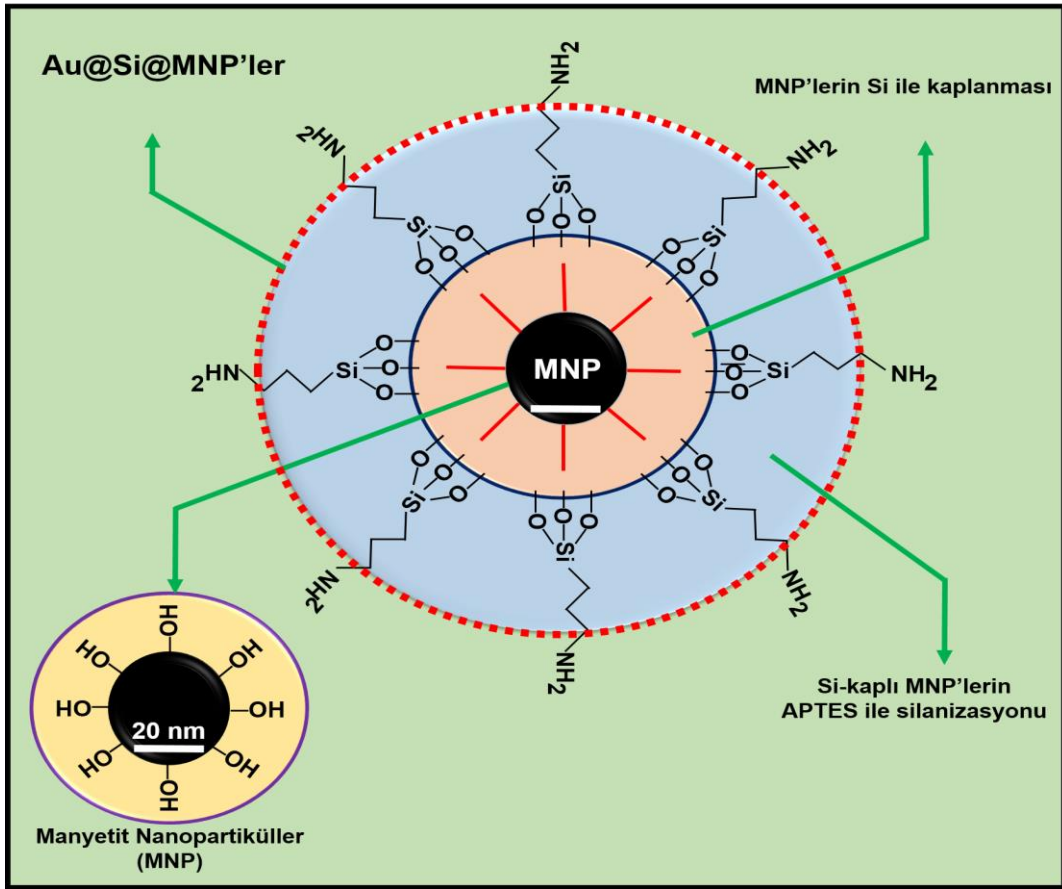
3.1.5. Altın Nanopartiküllerin APTES@Si@MNPs Üzerine Takılması

Manyetik nanopartiküller, aglomerasyonun engellenmesi ve yüzey üzerine farklı moleküllerin immobilize edilebilmesi için silika tabakası ile kaplanmıştır. Daha sonra negatif yüzeye sahip partiküller silanizasyon yöntemi ile APTES yardımıyla pozitif hale getirilmiştir. Burada amaç; trietoksisilanların taşıdığı -NH₂'ler sayesinde yüzeyi pozitif hale getirmektir. Bir sonraki aşamada yüzeyde bulunan -NH₂'ler üzerinden altın nanopartiküllerin indirgenmesi hedeflenmiştir. Burada takip edilen yöntem şöyledir; 0.2 gr altın tuzu (HAuCl₄), 0.35 gr setiltrimetilamonyum bromit (CTAB) içeren 35 ml su içerisinde çözülmüştür. Bu karışım yağ banyosunda kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Kaynamaya 5 dakika boyunca devam edilmiştir. Daha sonra 0.045 gr tri-sodyum sitrat 2 ml deiyonize su içerisinde çözünerek ortama eklenmiştir. Kaynama 30 dakika boyunca devam ettirilmiştir. Elde edilen altın nanopartiküller oda sıcaklığına kadar soğutulularak 400 mg APTES@Si@MNPs ortama eklenerek mekanik karıştırıcı ile 12 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen Altın@APTES@Si@MNP'ler magnet aracılığıyla toplanıp 3 kez deiyonize su ile yıkanmıştır [170].

3.1.6. Altın Nanopartikül Takılı APTES@Si@MNPs 'lerin Katyonik Hale Getirilmesi

(-) yüke sahip pDNA'ların (-) yüke sahip hücrelerin içerisine girişinin sağlanabilmesi için; solvotermal ile üretilen, üzerine Au nanopartikül takılı APTES@Si@MNP'lerin

(+) hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, tiyol gruplarının altına olan ilgisi bilindiğinden (+)'liği sağlama amacıyla sistaminin (2-aminoetantiyol, Sigma, A.B.D.) yararlanılmıştır. Sistaminin taşıdığı -SH gruplarının Au nanopartiküllere takılması, açıkta kalan -NH₂ uçları sayesinde de pozitif yük sağlaması sağlanmıştır. Bu amaçla etanol içerisinde 1M'lık sistamin çözeltisi hazırlanmıştır. Sonikatör yardımıyla iyice dispers edilen, su içerisinde bekletilen nanopartiküllerden (10 mg/ml) 1'er ml ependorfa alınıp, magnet yardımıyla çekilip, üzerindeki su alınmış ve etanol içerisinde tekrar iyi bir şekilde dispers edilmeleri sağlanmıştır. İyice dispers edilen partiküllerin üzerine 225 µl sistamin eklenmesi gerçekleştirilmiştir [171]. 1 saat boyunca düşük hızda karıştırılmıştır. Partiküller magnet yardımıyla tekrar çekilmiş, üzerindeki etanol tamamen alınıp; üzerine aynı miktar ultra saf su ilavesi gerçekleştirilmiş ve iyi bir şekilde dispers edilmiştir. Partikülleri (+) hale getirme, transfeksiyon çalışmaları yapılırken her seferinde taze üretimin sağlanması için tekrarlanmıştır. Şekil 3.2. tez kapsamında kullanılan partiküllerin şematize edilmiş görüntüsüdür.



Şekil 3.2. Au Takılı APTES@Si@MNP

3.2. Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Tez kapsamında üretilen nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin tespiti için Bilkent Üniversitesi UNAM'da bulunan transmisyon elektron mikroskobundan (FEI, Model; Tecnai G2 F30, Amerika) yararlanılmıştır. Geçirimli Elektron Mikroskobu veya TEM (Transmission Electron Microscope) çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyütülür ve floresans ekran, fotoğrafik film katmanı ya da CCD kamera gibi bir sensör üzerine odaklanır. Geçirimli Elektron Mikroskobu, görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikroyapısal incelemesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelede malzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir [172].

Bu sistemde örnek hazırlanırken partiküllerimiz sonikatör aracılığıyla iyi bir şekilde dispers edilmiştir ve daha sonra bakır TEM gridleri üzerine 1 damla (~10 µl) örneklerimizden ekleme yapılmıştır. Tamamen kuruduktan sonra, örneklerin incelenmesine başlanmıştır.

Bir başka analiz yöntemi olan X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Her bir kristalin faz için bu kırınım profilleri bir nevi parmak izi gibi o kristali tanımlar. Su içerisinde bekletilen partiküller, etüvde 1 gece bekletilerek tamamen kurutulmuş ve bu kuru örneklerden analiz yapılmıştır.

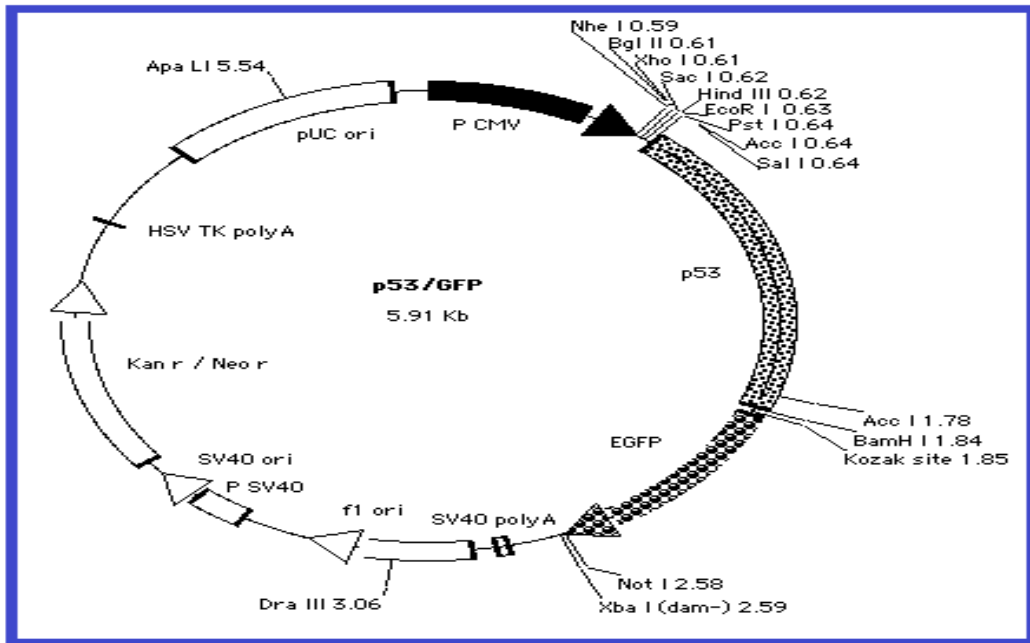
Partiküllerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)) Hacettepe Kimya Mühendisliği'nde yapılmıştır. Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışın şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı,sıvı,gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir. Bu analizde de tamamen kurutulmuş örnekler kullanılmıştır [173].

3.3. Gen Transferi

Tezin ikinci iş paketini oluşturan kısımda gen transferi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk önce aktarılacak olan geni taşıyan *E.coli* içerisindeki p53-GFP plazmidleri uygun koşullarda çoğaltılmış ve saflaştırılmış, sonra bu plazmidler partiküllerle etkileştirilip hücre kültürü çalışmalarına geçilmiş ve sitotoksitite testleri yapılmış, en son hücrelerdeki apoptoz/nekroz belirlenerek çalışmanın deneysel kısmı sonlandırılmıştır.

3.3.1. *E.coli* içerisindeki p53-GFP Geni Taşıyan pDNA'nın Çoğaltılması

p53-EGFP geni taşıyan, 5,91 kb boyutunda olup; kanamisin ve neomisin antibiyotiklerine karşı direnç geni taşıyan pDNA içeren *E.coli* bakterisi Hacettepe Üniversitesi Biyokimya A.B.D.'dan temin edilmiştir. GFP (yeşil floresans protein), in-vivo ve in-vitro koşullarda spesifik hücre türlerinin optik olarak saptanmasına olanak sağlar. Şekil 3.3.'te p53-GFP genlerini taşıyan pDNA'nın omurga yapısı verilmiştir.



Şekil 3.3. p53-EGFP içeren pDNA'nın omurga yapısı

Gliserol stok içerisinde saklanmış bakteriler kullanımdan önce otoklav aracılığıyla (121°C' da, 15 dakika boyunca) sterilize edilmiş LB Broth (Isolab, France) (25gr/ 1L) ortamında çoğaltılmıştır. Buradaki amaç stokta bekleyen bakterilerin uyandırılıp, tamamen üremelerini sağlamaktır. Hazırlanan LB Broth içerisine, sadece kanamise direnç geni taşıyan plazmidlerin içinde bulunduğu *E.coli* bakterisinin üremesi için

kanamisin eklemesi yapılmıştır. Kanamisin antibiyotiğinin stok konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde önceden otoklavlanmış ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Stoktan alınıp besiyerine eklenen kanamisinin konsantrasyonu (çalışma konsantrasyonu) 50 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Antibiyotik eklemesinden sonra hızlı bir şekilde gliserol çözeltisi içinde saklanan bakterilerin (-80 °C' de) LB Broth içerisine aktarımı gerçekleştirilmiştir. 50 ml'lik besiyeri içine aktarılan bakterilerin ağız tamponla kapatılarak 8 saat boyunca 37°C'de çalkalamalı etüvde (Edmund Bühler, Almanya) çoğalması gerçekleştirilmiştir. Bu arada toz haldeki LB agar (Isolab, France) içerisinde 40 g/L olacak şekilde hazırlanmış çözelti otoklavlama yardımıyla sterilize edilip, gerekli konsantrasyondaki antibiyotik eklemesinden sonra cam petrilere dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra agar üzerine LB Broth içerisindeki bakterilerden steril öze yardımıyla alınıp çizgi yöntemiyle ekim gerçekleştirilmiştir. Burada amaç agar üzerinde tek kolonileri elde etmek ve bu kolonileri tekrar LB Broth'da çoğaltıp, üreyen bakterilerden pDNA izolasyonunu gerçekleştirmektir. Ekim yapılan petrilere bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra, oluşan tek kolonilerden LB Broth içerisine ekim yapılmış ve 8 saat boyunca 37°C 'de çalkalamalı etüvde bakterilerin büyümesi sağlanmıştır. 8 saat sonunda 50 ml'lik taze LB Broth ortamı, çoğalan bakterilerin üzerlerine eklenerek, 16 saat 37°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiş ve en son çoğalan bakterilerden Axygen, AxyPrep Midi Plazmit saflaştırma kiti yardımıyla p53-GFP taşıyan plazmitlerin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Plazmit DNA İzolasyonu

Tek koloni izolasyonu ile çoğaltılan *E.coli*'den p53-GFP genini taşıyan plazmidlerin saflaştırılması Axygen, AxyPrep Midi Plazmid saflaştırma kiti aracılığıyla yapılmıştır. Daha sonra elde edilen plazmitler partiküllerle etkileştirilerek transfeksiyon çalışmalarına geçilmiştir.

3.3.2.1. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler ve İzolasyon Protokolü

Çizelge 3.1. Axygen Plazmit İzolasyonu Tampon Çözeltileri

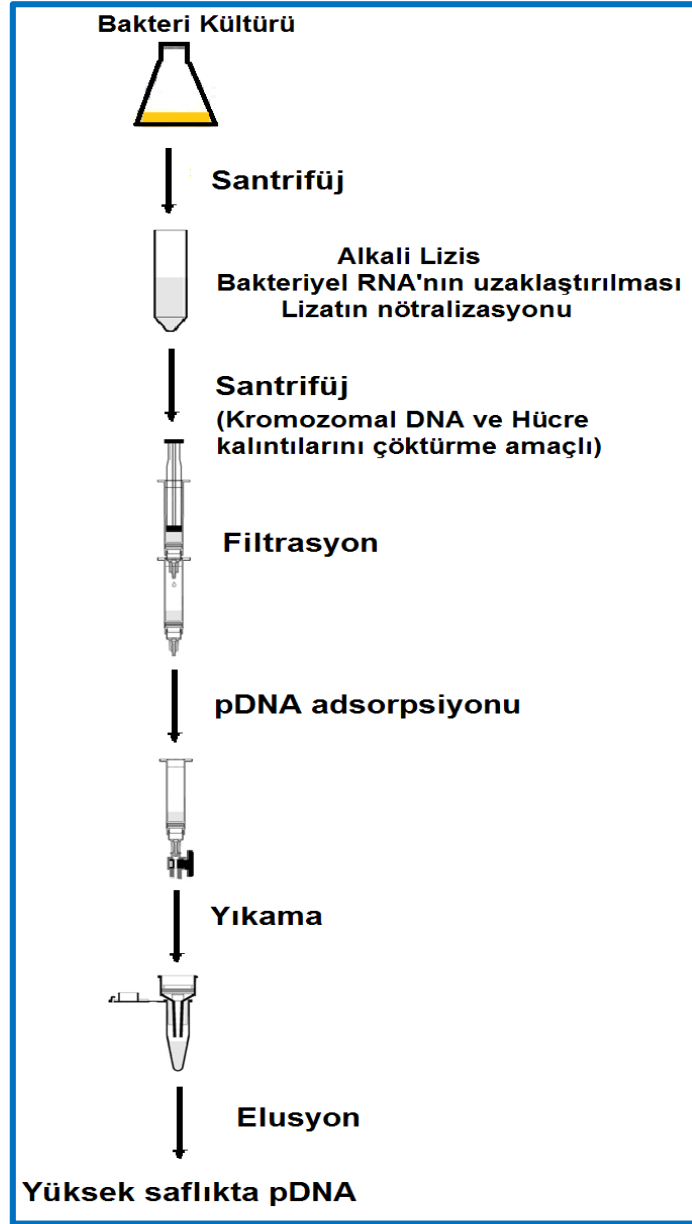
TAMPON	İŞLEVİ	SAKLAMA KOŞULLARI
RNAaz A	Buffer S1 içerisine eklenir	Oda sıcaklığı
Buffer S1	Bakteriyal Süspansiyon Tamponu	RNAaz ilavesinden sonra 4°C'de
Buffer S2	Bakteriyal Lizis Tamponu	Oda sıcaklığı
Buffer S3K	Nötralizasyon Tamponu	Oda sıcaklığı
Buffer B	DNA Bağlama Tamponu	Oda sıcaklığı
Buffer W1	Yıkama Tamponu	Oda sıcaklığı
Buffer W2	Tuz Giderme Tamponu	Oda sıcaklığı
Eluent	Ayırma Tamponu	Oda sıcaklığı

Bir gece önceden, tek kolonilerin üretildiği agardan LB Broth içerisine ekimi yapılmış *E.coli* bakterisi içerisinden plazmitler Axygen, AxyPrep Midi Plazmid saflaştırma kiti kullanılarak şu protokole göre saflaştırılmıştır:

- 100 ml besiyeri içerisinde, bir gece çoğaltılmış olan *E.coli* bakterisinden yüksek kopya plazmit eldesi için 30 ml alınmıştır. Bakteriyi çöktürmek için 3000Xg'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, santrifüj tüpü kağıt bir havlu üzerine ters çevirilerek kalan atık medyumun uzaklaşması sağlanmıştır.
- Bakteri pelleti, içerisinde RNaz A bulunan 4,5 ml Buffer S1 yardımıyla tekrar süspansiyon hale getirilmiştir.
- Daha sonra 4,5 ml Buffer S2 eklenmesi yapılmış ve tüp 6-8 kez hafifçe ters-düz edilmiştir. 5 dakika içerisinde Buffer S3K eklenmiştir.
- Kullanmadan önce 4°C'ye kadar soğutulmuş, 4,5 ml Buffer S3K tüpe eklenmiştir.

- Tüp yavaşça 10 kez ters-düz edilmiştir. 5 dk. Oda sıcaklığında bekletilmiştir.
5. Kullanmadan önce 4°C'ye kadar soğutulmuş Buffer B eklenmiş ve tüp yavaşça 10 kez ters-düz edilmiştir. 6000Xg'de, 4°C'de 10 dk. santrifüj yapılmıştır.
 6. Oluşan süpernatant kısmı Midiprep şırınga filtre içerisine aktarılmıştır. Şırınga içindeki supernatant Midiprep plazmit kolonu içerisine filtrelenmiştir. Kolon -25-30 inç Hg basınca ayarlanmış vakum pompası yardımıyla; kolonda hiçbir lizat artığı kalmayacak şekilde vakumlanmıştır.
 7. Kolon içerisine bu sefer 7 ml Buffer W1 eklenmiş ve vakum yapılmıştır.
 8. En son Buffer W2 eklenmiş ve vakum yapılmıştır.
 9. Kolonun uç kısmı plastik bir aparat kullanılarak açılmış ve 1,5 ml'lik bir ependorf içerisine oturtulmuştur. Üzerine 300 µl Buffer W2 eklenerek 12,000gXg'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
 10. Kolonun uç kısmı yeni bir 1,5 ml'lik bir ependorf içerisine oturtulmuş ve üzerine 300 µl eluent eklenerek, oda sıcaklığında 1 dk. beklendikten sonra 12,000gXg'de 1 dk. boyunca santrifüj yapılmıştır.
 11. Elde edilen plazmitler -20 °C'de saklanmıştır.

Şekil 3.4.'te *E.coli*'den pDNA izolasyon basamakları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *E.coli*'den pDNA izolasyon basamakları

3.3.3. Plazmit DNA Derişim Tayini

Elde edilen DNA örneklerinin saflığının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi için spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 oranı esas alınmaktadır. Bu oranın 1,8-2,0 arasında olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Cihaz kullanılırken eluent ile sıfırlama yapılarak, ölçümü etkileyecek etkiler ortadan kaldırılmış ve cihaza 2 µl örnek yüklenmiştir. Sonuç olarak A260/A280 oranı 1,83 bulunmuştur. Bu bize elde

ettiğimiz plazmitin oldukça saf bir şekilde izole edildiğini kanıtlamıştır. Konsantrasyon ise 446,44 ng/μl olup, çalışmalar için kullanımı oldukça uygun bulunmuştur.

3.3.4 Plazmit DNA-Nanopartikül Etkileşimi

pDNA-nanopartikül etkileşimini (pozitif hale getirilmiş nanopartiküllerin pDNA'ya tutunup tutunmadığının saptanması için) saptamak için agaroz jel elektroforez görüntüleri ve Zeta potansiyel (Malvern, UK) değerleri alınmıştır.

3.3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

200-50,000 bç boyutları arasındaki DNA ve RNA gibi yüklü moleküllerin bir elektrik alan içinde yürütülerek ayrıştırılması tekniğine dayanan agaroz jel elektroforez yöntemi, plazmit DNA-nanopartikül etkileşimini göstermek için kullanılmıştır. Tez boyunca kullandığımız plazmit DNA 5,91 kb büyüklüğünde olup, bu DNA'ya uygun por çapı sağlamak için %1'lik agaroz çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için; agaroz (Sigma A 5093-500G) 1 g/100 ml (%1) olacak şekilde hassas terazide tartılmıştır. Üzerine 1x TBE (Trisma Base EDTA) ilave edilmiştir. 1xTBE (1 litre için; 54 g Tris-base, 27,5 g borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8)) tamponu stok olarak 5xTBE tamponundan ultra saf su ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım mikrodalga fırında çözünene kadar ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır. Karışım biraz soğuduktan sonra çeker ocak altında üzerine 2 μl etidyum bromür (0,5 μg/ml) (nükleik asitleri floresans işaretlemede kullanılan bir enterkalasyon ajanıdır) ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra yürütmenin yapılacağı, içine yükleme yapılacak olan kuyucukların oluşmasını sağlayan tarakların oturtulduğu jel tablasına dökülüp, polimerleşmesi için 20-30 dk. beklenmiştir. Polimerleşmeden sonra taraklar çekilerek örnek yükleme kuyucukları hazır hale gelmiştir. Soğuyan jel, elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzerine 1XTBE tamponu eklenmiştir. Her kuyucuğa önceden 30 dk. boyunca etkileştirilmiş, 4 μl DNA (446,44 ng/μl), 4 μl nanopartikül (10 mg/ml) konjugatından, üzerlerine 8 μl, 6X yükleme boyası eklenerek yüklenmiştir. Her kuyucuk için farklı konsantrasyonlarda partiküller hazırlanmıştır (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,0 mg/ml) ve örnekler 50 voltta, 25 dk. boyunca jelde yürütülmüştür. En son UV ışık altında görüntülenmiştir. Standart olarak kullanılan DNA ladder'ı Promega 1kb DNA'dır. Burada amaç; farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nanopartiküllerin saflaştırılan plazmitlerle konjugasyon yapıp yapmadığını araştırmaktır.

3.3.4.2. Zeta Potansiyellerinin Ölçümü

pDNA-nanopartikül konjugatlarının oluşup oluşmadığı Zeta potansiyel sonuçları alınarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Zeta potansiyelleri; taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Zeta potansiyel ölçümü; dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolünün anahtarıdır. Belli bir yükteki tane, süspansiyon içerisindeki karşı yükteki iyonları çeker, sonuç olarak, yüklü tanenin yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşur ve daha sonra da yüklü tanenin yüzeyinden dışa doğru yayılmış bir yüzey oluşur. Yayılmış bu yüzey içerisinde "kayma yüzeyi" diye adlandırılan bir sınır bulunur. Yüklü tane ve onun etrafında bulunan iyonların, kayma yüzey sınırına kadar olan kısmı, tek bir parça olarak hareket eder. Bu kayma yüzeyindeki; potansiyel zeta potansiyeli olarak isimlendirilir ve hem tanenin yüzey yapısından hem de içinde bulunduğu sıvının içeriğinden etkilenir. Tanelerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü değil, zeta potansiyel değerleri belirler. Zeta potansiyelini belirlemek için iyice dispers edilmiş örneklerimizden 1-1,5 ml kuvars küvetlere alınarak oda sıcaklığında analiz yapılmıştır [174].

3.3.5. In-Vitro Çalışmalar

Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında; hücreler üzerindeki toksik sınırın belirlenebilmesi için L929 fare fibroblast hücrelerinden yararlanılmıştır. Sitotoksik sınır belirlendikten sonra DLD-1 (insan epitelyum kolorektal adenokarsinoma) hücre hattı ile çalışılmaya geçilmiştir. Bu çalışmalarda hücrelerin, pDNA-altın takılı manyetik nanopartiküllerle etkileşimi, bu nanopartiküllerin hücreler üzerine olan toksik etkileri ve hücre canlılığı üzerine etkileri ile aktarılan genin transfeksiyon verimi araştırılmıştır.

3.3.5.1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Transfeksiyon Çalışmaları

İnsan adenokarsinoma hücreleri (DLD-1 hücre hattı); %1 penisilin-streptomisin, %10 FBS içeren L glutaminli RPMI-1640 besiyerinde, 25'lik flasklar içerisinde, %5 CO₂ içeren inkübatörde (Binder) 37°C'de inkübe edilmiştir. Her gün kontrol edilen hücrelerin; iki günde bir besiyerleri taze besiyeri ile değiştirilmiş, 3.gün yeterli konfluensiye ulaşan hücreler (% 75-80) pasajlama yapmak için tripsin-EDTA yardımıyla yüzeyden kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler otomatik hücre sayım cihazı ile sayılarak (Invitrogen Countess) 96 kuyucuklu iki plate içerisine; her kuyucukta 3X10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapıp, 24 saat karbondioksit etüvünde

inkübasyona bırakılmıştır.

Bir gün sonra, transfeksiyona başlamadan önce sentezlenmiş, sistamin aracılığıyla pozitif hale getirilmiş altın nanopartikül takılı manyetik nanopartiküllerin plazmitlerle yarım saatlik etkileşimi gerçekleştirilmiştir. Burada 4 µl DNA (446,44 ng/ µl) ve 4 µl nanopartikül (10 mg/ml), her kuyucuk için farklı konsantrasyonlarda partiküller hazırlanıp (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,0 mg/ml) plazmitlerle etkileştirildikten sonra kuyucuklara eklenmiştir. Hücre kültürü çalışmasında pozitif kontrolü sağlamak için ticari, katyonik bir polimer olan in-vitro transfeksiyon ajanı (TurboFect, Fermentas, EU) kullanılmıştır. Bu ajandan da 4 µl alınıp, sadece 4 µl plazmit ile inkübasyonu sağlanmıştır. Plazmitler ve hazırlanan nanopartiküller 1 ml'lik bir ependorfa alınıp yarım saat oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

24 saatlik inkübasyondan sonra, transfeksiyona hazırlık amacıyla hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilip, üzerlerine serumsuz besiyeri eklenmiştir. Solvotermal yöntemiyle sentezlenmiş sistamin aracılığıyla pozitif hale getirilmiş altın takılı manyetik nanopartiküllerin plazmitlerle yarım saatlik etkileşiminden sonra, her kuyucuğa partikülle etkileştirilmiş plazmitlerin eklenmesi gerçekleştirilmiştir. İlk sıradaki kuyucukların 6 tanesine herhangi birşey eklenmemiştir (- kontrol). İkinci sıradaki; altı kuyucuğa ise pozitif kontrol amacıyla ticari, in-vitro transfeksiyon ajanı ile etkileştirilmiş plazmitler eklenmiştir. Üç, dört, beş ve altıncı kuyucuklara magnet uygulanmamış, (+) hale getirilmiş solvotermal ile üretilmiş Au takılı APTES@Si@MNP-pDNA konjugatları üç tekrarlı olacak biçimde eklenmiştir, böylece hücrelerin kendiliğinden plazmit-nanopartikül kompleksini hücre içine alışı incelenmiştir, aşağıdaki dört sıraya (sekiz, dokuz, on, on bir) ise magnet uygulanarak, magnetin etkisi araştırılmaya çalışılmıştır. Kuyucuklara eklemeler aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi yapılmıştır ve her örnek için üç tekrarlı çalışılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Magnet Yok	Magnet Yok	Magnet Yok	Magnet Yok		Magnet Var	Magnet Var	Magnet Var	Magnet Var	
B	H	H+P+T	3mg/ml H+P+NP	3mg/ml H+P+NP	3mg/ml H+P+NP	3mg/ml H+P+NP		3mg/ml H+P+NP	3mg/ml H+P+NP	3mg/ml H+P+NP	3mg/ml H+P+NP	
C	H	H+P+T	2,5mg/ml H+P+NP	2,5mg/ml H+P+NP	2,5mg/ml H+P+NP	2,5mg/ml H+P+NP		2,5mg/ml H+P+NP	2,5mg/ml H+P+NP	2,5mg/ml H+P+NP	2,5mg/ml H+P+NP	
D	H	H+P+T	2mg/ml H+P+NP	2mg/ml H+P+NP	2mg/ml H+P+NP	2mg/ml H+P+NP		2mg/ml H+P+NP	2mg/ml H+P+NP	2mg/ml H+P+NP	2mg/ml H+P+NP	
E	H	H+P+T	1,5mg/ml H+P+NP	1,5mg/ml H+P+NP	1,5mg/ml H+P+NP	1,5mg/ml H+P+NP		1,5mg/ml H+P+NP	1,5mg/ml H+P+NP	1,5mg/ml H+P+NP	1,5mg/ml H+P+NP	
F	H	H+P+T	1mg/ml H+P+NP	1mg/ml H+P+NP	1mg/ml H+P+NP	1mg/ml H+P+NP		1mg/ml H+P+NP	1mg/ml H+P+NP	1mg/ml H+P+NP	1mg/ml H+P+NP	
G	H	H+P+T	0,5mg/ml H+P+NP	0,5mg/ml H+P+NP	0,5mg/ml H+P+NP	0,5mg/ml H+P+NP		0,5mg/ml H+P+NP	0,5mg/ml H+P+NP	0,5mg/ml H+P+NP	0,5mg/ml H+P+NP	
H			Au-Solvo	Au-Solvo Kontrol	Au-Solvo Kontrol	Au-Solvo Kontrol		Au-Solvo	Au-Solvo Kontrol	Au-Solvo Kontrol	Au-Solvo Kontrol	

H: Hücre, P: Plazmit, NP: Nanopartikül, T: Turbofekt

Şekil 3.5. Farklı oranlardaki pDNA-NP konjugatların bulunduğu 96'lık well plate

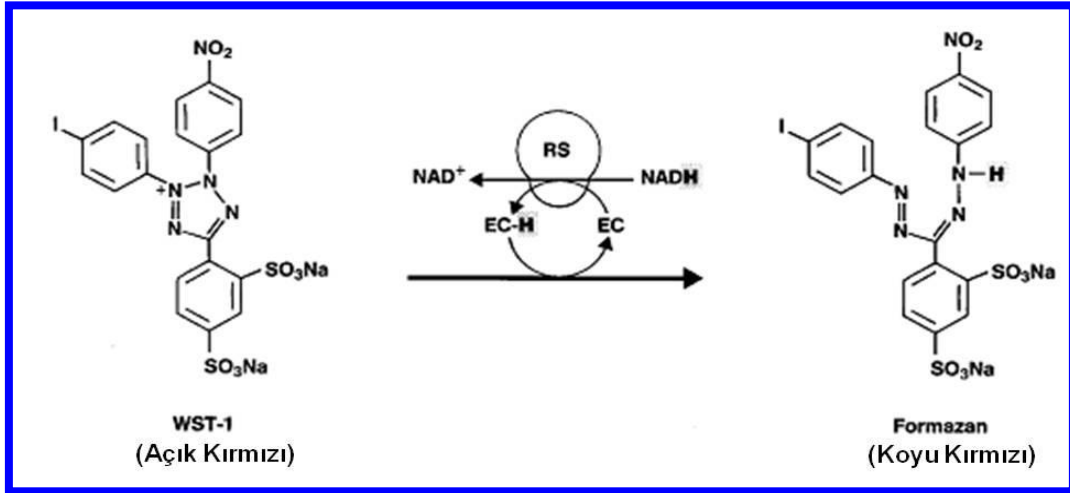
Uygun konsantrasyondaki eklemelerden sonra, hücreler 6 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 6 saatin sonunda hücrelerin üzerlerindeki besiyeri tamamen çekilmiş ve kuyucukların üzerine %1 penisilin-streptomisin, %10 FBS içeren, L glutaminli RPMI-1640'dan 200 µl eklenerek, 48 saat sonra oluşabilecek gen ekspresyonunu gözlemleyebilmek için CO₂ inkübatörü içerisinde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kanserli hücrelerle çalışmalara geçilmeden önce; yukarıda kullanılan konjugatların (plazmit-nanopartikül) kullanım oranları, toksik sınırlar saptanarak belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla ilk önce fare fibroblast hücreleri (L929 hücre hattı) üzerinde çalışılıp, daha sonra kanserli hücreler üzerinde çalışmalara geçilmiştir. Fare fibroblast hücreleri (L929 hücre hattı); %1 penisilin-streptomisin, %10 FBS içeren, L glutaminli DMEM F-12 besiyerinde, 25'lik flasklar içerisinde, %5 CO₂ içeren inkübatörde (Binder) 37°C'de inkübe edilmiştir. Protokolün gerisi yukarıda anlatıldığı gibi olup belirlenen oranların uygun olduğu görülmüş ve böylece DLD-1 üzerindeki transfeksiyon çalışmalarına geçilmiştir.

3.3.5.2. WST Metodu ile Hücre Canlılık Analizinin Saptanması

Transfeksiyon çalışmalarında kullanılan, pozitif hale getirilmiş altın takılı manyetik nanopartiküller ile plazmit konjugatlarının, hücre içerisine girerken kullanılan

manyetik alanın DLD-1 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini saptamak için WST-1'den (water-soluble tetrazolium salt) yararlanılmıştır. WST-1 (4-[3-4-iyodofenil]-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzen disülfonat) analizinde sitotoksosite testlerinde sıkça kullanılmakta olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid]'in aksine; herhangi bir çözme basamağı olmadan doğrudan okuma yapılabilmekte, daha etkili sinyal alınmakta ve hücelere daha az toksik etki yarattığı bilinmektedir.

Hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi WST-1'de bulunan tetrazolyum halkasını parçalayarak formazan tuzlarını oluştururlar. Açık kırmızı bir renkte olan WST-1'den koyu kırmızı renkteki formazan tuzları oluşur (Şekil 3.6.). Oluşan formazan tuzu miktarı ile canlı hücre sayısı arasında bir korelasyon bulunmaktadır. Canlı hücre oranı ile doğrudan bağlantılı olan formazan tuzlarının miktarı ELISA okuyucuda 420-480 nm arasında tayin edilebilir. Formazan tuzu oluşumuyla ilişkili olarak artan absorbans değeri ölçülerek sonuçlar elde edilmektedir.



Şekil 3.6. Mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile WST-1'den formazan tuzu oluşumu. (EC: Elektron bağlayıcı reaktif, RS: Mitokondriyal süksinat-tetrazolyum-redüktaz sistemi)

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullandığımız kullandığımız bu yöntemde transfeksiyon işlemini gerçekleştirdiğimiz 48 saat beklemiş, 96 kuyucuklu platelerimizi kullandık. Bunların içerisindeki besiyeri, partikül-plazmit içerikleri tamamen uzaklaştırılıp, yerine her kuyucuğa fenol red içermeyen 200 µl besiyeri ve 10 µl WST-1 (Roche, Almanya) solüsyonu eklenmiştir. 4 saat boyunca 37°C

ve %5 CO₂ ortamında ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu platemiz, PowerWave XS2 mikroparka okuyucu (BioTek, ABD) ile 440 nm dalga boyunda okunarak canlı hücre miktarı tayin edilmiştir. Kontrol grubunun bulunduğu kuyucuğun optik yoğunluğu %100 kabul edilerek, her bir kuyucuğun ölçülen optik yoğunluğu da kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Böylece polyol yöntemiyle sentezlenmiş partiküllerin L929 ve DLD-1 hücrelerinin canlılıklarına etkisi saptanmaya çalışılmıştır.

3.3.5.3. İkili Boyama Metodu ile Hücrelerdeki Apoptoz/Nekrozun Saptanması

Tez kapsamında kullanılan; pozitif hale getirilmiş, altın nanopartikül takılı, manyetik nanopartiküller aracılığıyla taşınan p53-GFP geni taşıyan plazmitlerin; hücreleri apoptoz ya da nekroza götürüp götürmediğinin araştırılmasında ikili boyama tekniği kullanılmıştır.

Floresans boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanımları canlı ve ölü hücre ayırımının yapılabilmesini sağlar. İkili boyama tekniğinde bu floresan boyalardan ikisinin bir arada kullanımı söz konusudur. Yapılan çalışmada canlı veya ölü, tüm hücreleri boyayabilen bir boya olan Hoechst boyası ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya olan propidyum iyodid beraber kullanılmıştır. Burada Hoechst boyası hem canlı hem de cansız hücreleri boyarken, hücre zarı sağlam olan (canlı) hücreler, propidyum iyodid boyasının hücre içerisine girişine izin vermezler [175].

Çizelge 3.2. Floresan mikroskopide apoptotik hücrelerin nekrotik ve normal hücrelerden ayrımı [175]

	Hoechst Boyası	Propidyum iyodid	Apoptotik morfoloji
Nekrotik hücreler	+	+	-
Apoptotik hücreler	+	-	+
Normal hücreler	+	-	-

Ayırım yapılırken kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler oldukları düşünülür [175].

İçerisinde transfeksiyon çalışmasının yapıldığı 96 kuyucuklu platelerden bir tanesi ikili boyama için kullanılmıştır. Boyama solüsyonu hazırlanırken; 1ml PBS'de 10 mg Ribonükleaz A, 1 ml PBS'de 200 µg Hoechst 33342, 1 ml PBS'de 100 µg Propidyum İyodid olacak şekilde çözülüp stok çözeltiler hazırlanmıştır. Gen ekspresyonu için beklenen 48 saat sonunda, kuyucukların içerisindeki besiyerleri çekilerek, PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 80 µl ikili boyama solüsyonu eklenmiştir. İkili boyama solüsyonu stok çözeltilerden; 10 ml PBS içerisine, 500 µl Hoechst (Invitrogen, ABD), 100 µl PI (Invitrogen, ABD) ve 100 µl Ribonükleaz A (Sigma, Almanya) ilave edilerek hazırlanmıştır. Solüsyon içerisindeki Ribonükleaz A sitoplazmik RNA'yı yok etmek amacıyla kullanılmaktadır. 15 dakikalık inkübasyon (37°C ve %5 CO₂) sürecinden sonra 96 kuyucuklu well plate'in her bir kuyucuğu, Leica DM6000B inverted mikroskop (Leica Microsystems, Almanya) altında apoptoz için DAPI filtresi, nekroz için FITC (480-520 nm dalga boyunda) filtresi kullanılarak görüntüler elde edilmiştir. Alınan görüntülerdeki hücreler canlı, apoptotik ve nekrotik olma durumlarına göre sayılmış (10 farklı alanda yaklaşık 1000 hücre sayılmıştır) ve apoptotik hücre sayısı yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

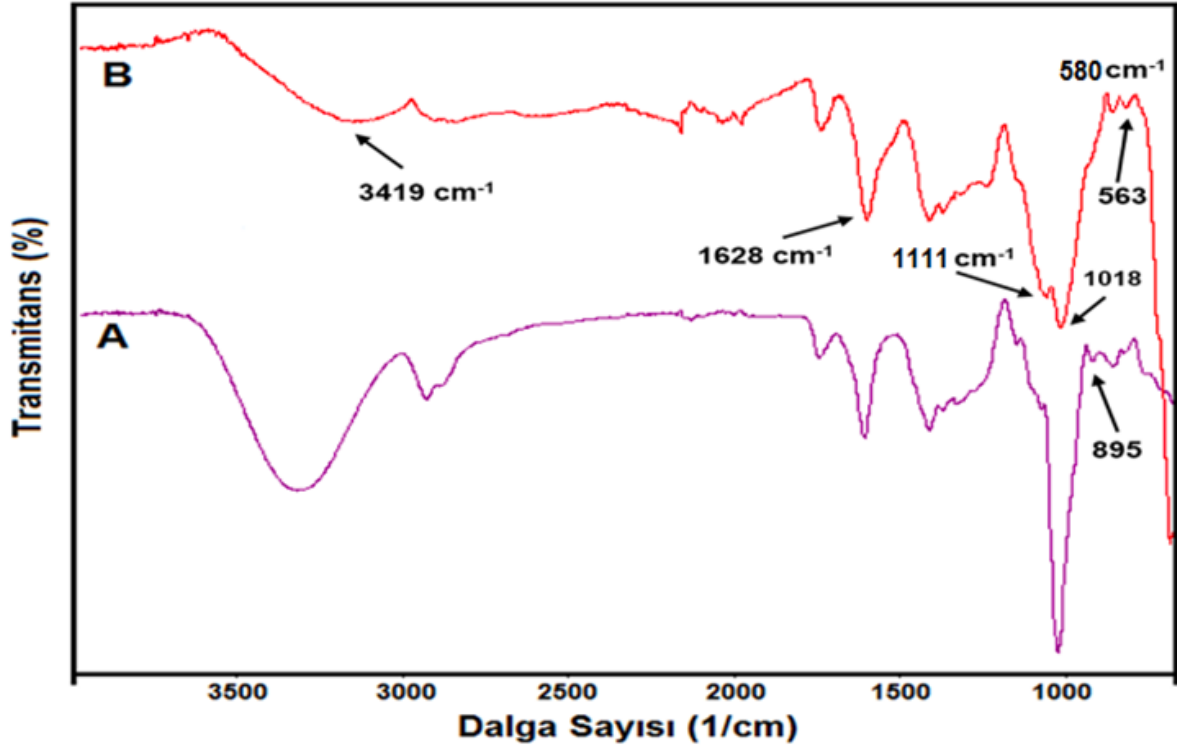
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında önceki bölümlerde anlatılmış çalışmalara ait analizler ve sonuçlar bu bölümde anlatılmıştır. Solvo termal ile üretilmiş manyetik nanopartiküllerin, bunların üzerine silika kaplanmış hali ve altın nanopartiküllerin üzerlerine oturtulmuş hallerinin karakterizasyon çalışmaları taramalı elektron mikroskobu (TEM), XRD ve FTIR ile karakterize edilmiştir. *E.coli*'den saflaştırılan plazmit DNA'nın miktar ve saflık tayini için nanodroptan yararlanılmıştır. Plazmitle etkileştirilen partiküllerin, plazmit üzerine tutunup tutunmadıkları agaroz jel elektroforezi ve Zeta Potansiyel ölçümüyle saptanmaya çalışılmıştır. En son in-vitro uygulamalara geçilip, WST-1 ve ikili boyama tekniklerinden yararlanılarak; hücre canlılığı ve sitotoksitite saptanarak, aktarılan genin ekspresyon düzeyleri belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1. FTIR analizi

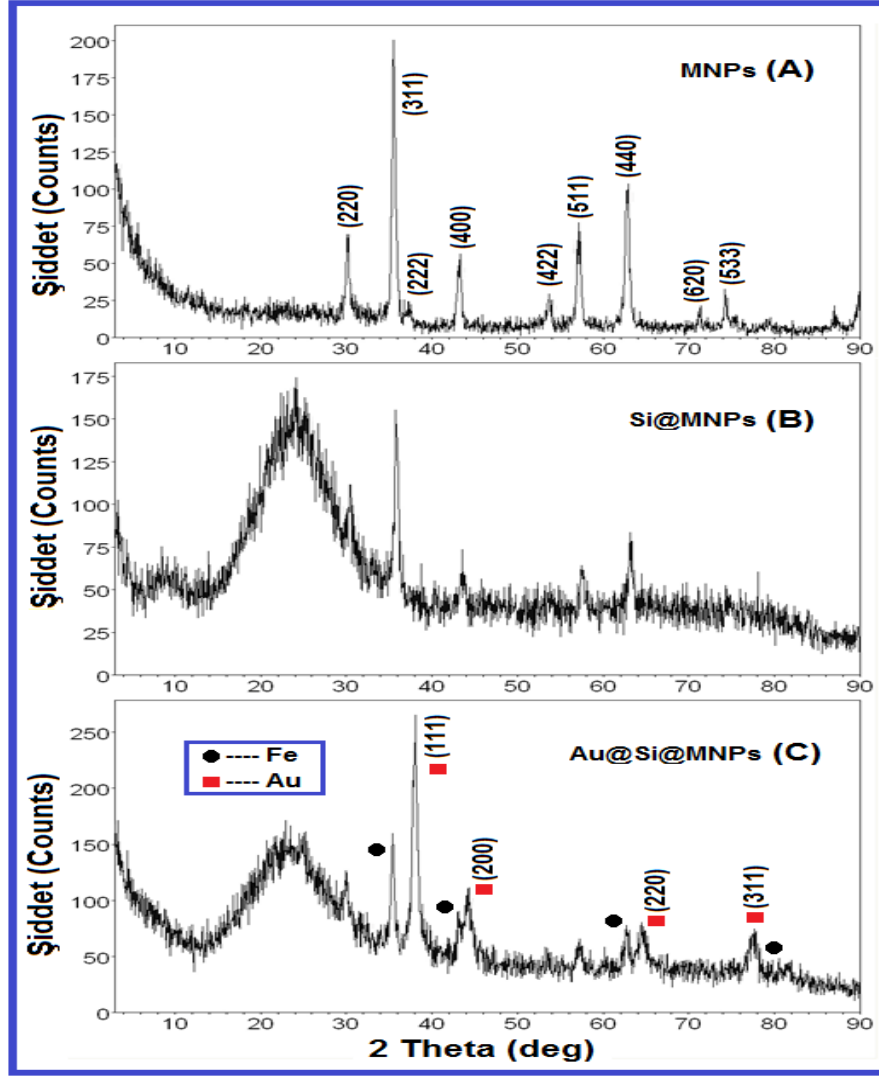
Si@MNP ve APTES@Si@MNP'lerin yüzey kimyasal yapılarını karakterize etmek üzere FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Seçilen partiküllere ait FTIR spektrumları Şekil 4.1.'de sunulmuştur. Şekil 4.1.B'de, 563 veya 580 cm^{-1} 'de görülen adsorbsiyon piki APTES@Si@MNP'lere ait Fe-O pikidir. Bu pik MNP'lere ait özgü absorpsiyon piki olarak tanımlanmıştır [229]. Burada Fe-O piki; aminopropiltrioksi-silan gruplarının polikondensasyon reaksiyonu ile Si@MNP üzerinde bulunan -OH grupları ile oluşturduğu kovalent bağ sonucu ortaya çıkmaktadır. MNP'lerin yüzeyinde silan polimerlerine ait adsorpsiyon pikleri 1111, 1018 cm^{-1} 'de Si-O-H ve Si-O-Si grupları ile teyit edilmiştir. 895 ve 794 cm^{-1} 'de görülen pik Si-O-H absorpsiyon bantlarının titreşim-germeye bağlı pikidir. Ayrıca, 3419 ve 1628 cm^{-1} 'deki görülen iki geniş pik -NH₂ (titreşimi) ve N-H (germe) bantlarını ifade etmektedir. Elde edilen sonuçları şöyle değerlendirmek mümkündür; yüzeyinde -OH grupları taşıyan manyetik nanopartiküller Stöber yöntemi ile mikroemulsiyon reaksiyonu sonucu Si ile kaplanmıştır. Sentezlenen partiküllerin yüzey kimyasal analizinde bariz bir şekilde Fe-O-Si ve Si-O-H bantlarına ait pikler görülmüştür. Ayrıca Si@MNP'ler APTES ile silanizasyon reaksiyonuyla başarılı bir şekilde pozitif hale getirilmiştir. Literatürdeki FTIR analizlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir [176].



Şekil 4.1. FTIR Analizleri A) Si@MNP, B) APTES@Si@MNP

4.1.2. XRD sonuçları

MNP, Si@MNP ve Au@Si@MNP'lerin kristal yapısının belirlenmesi için X-ışınları saçılması (XRD) analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklerin spektrumları Şekil 4.2.'de verilmiştir. Burada 220, 311, 222, 400, 422, 511, 440, 620 ve 533 iki teta değerlerindeki MNP'lerin kristal yapısına özgü (kübik ters spinel) piklerini göstermektedir. Çıkan pikler standart Fe_3O_4 'ün (kübik faz) XRD spektrumları ile uyumludur [229]. MNP'lere ait spektrumda başka fazlara ait piklerin çıkmaması üretilen partiküllerin yüksek saflıkta olduğunu ve sentez sonrası elde edilen partiküllerin siyah renkte olması manyetit fazda olduğunu ifade etmektedir. Si@MNP ve Au@Si@MNP'lere ait piklerde de demir oksit nanopartiküllerin karakteristik pikleri gözükmemektedir fakat kaplama işleminden sonra piklerin şiddetinde azalma ve piklerde genişleme gözlenmiştir. Bu sonuçlar; MNP'lerde kaplama işleminden sonra kristal yapılarının bozulmamasını ifade etmektedir. Buradan; silika kaplama ve altın takma proseslerinin manyetik partiküllerin fiziksel özelliklerini değiştirmedeği, hala manyetik özelliğini koruduğu görülmektedir [176, 177].

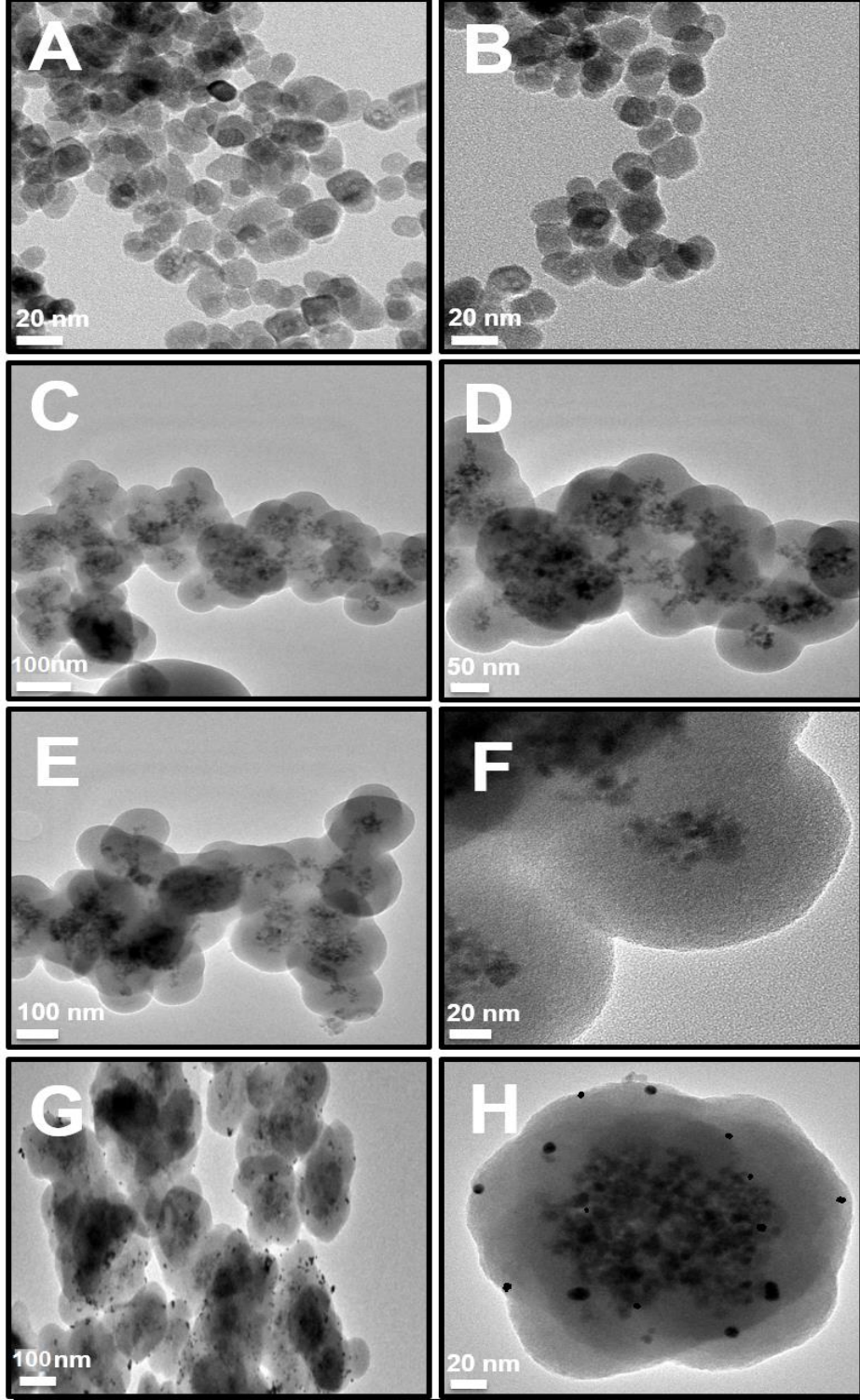


Şekil 4.2. XRD Spektrumları A) MNP, B) Si@MNP, C) Au@Si@MNP

4.1.3. Nanopartiküllerin TEM görüntüleri

MNP'lerin, Si@MNP'lerin ve Au takılı APTES'le modifiye edilmiş Si@MNP'lerin büyüklük ve morfolojilerine ait bilgi veren TEM görüntüsü Şekil 4.3.'te sunulmuştur. Şekil 4.3. A-B'de gösterilen çıplak kübik yapıya sahip manyetik nanopartiküllerin ortalama 20 nm olduğu gözlemlenmiştir. Geniş spesifik yüzey alanı ve yüksek yüzey enerjisinden kaynaklanan aglomerasyonun önüne silika kaplama ile geçilmeye çalışılmış ve silika kaplamayla 50 nm'lik Si@MNP'ler elde edilmiştir. Burada elde edilen sonuçlar FTIR sonuçlarını destekleyerek Si ile kaplama reaksiyonunun başarılı ile tamamladığını kanıtlamaktadır. Aglomerasyonun tamamen olmasa da kısmen önüne geçilmiştir. Şekil 4.3. G ve H'de ise H_{Au}Cl₄ ve trisodyum sitrat kullanımıyla elde edilen altın nanopartiküller silika tabakasının üzerine takılmış bir şekilde açıkça görülmektedir. Burada, Au nanopartikülleri; ortamda bulunan sitrat

grupları ve APTES (-NH₂ grupları) “Ligand Exchange” yaparak Si@MNP’lerin üzerine takılmalarını sağlamıştır. Tam bir altın kaplamanın olmayışı kullanılan altın nanopartiküllerin miktarının arttırılabileceğini göstermektedir [170, 178].

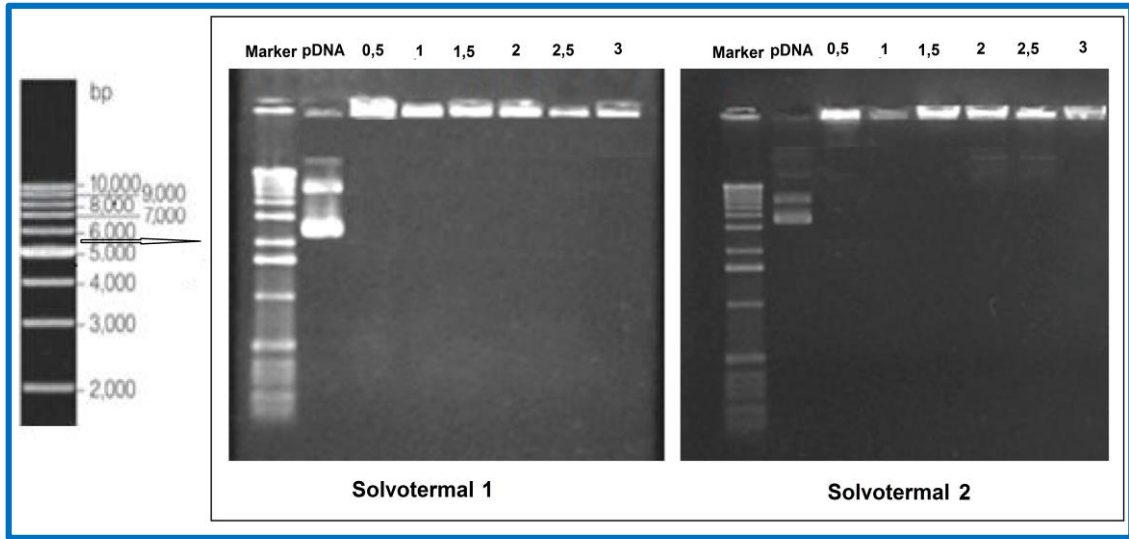


Şekil 4.3. TEM Görüntüleri A-B) Solvo termal ile Üretilmiş Manyetit Nanopartiküller, C-D-E-F) Silika@MNP’ler, G-H) Au Takılı Silika@MNP’ler

4.2. pDNA- Nanopartikül Etkileşiminin Saptanması

4.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi

E.coli'den Axygen, AxyPrep Midi Plazmid saflaştırma kiti yardımıyla saflaştırılan plazmitler, farklı konsantrasyonlardaki partiküllerle etkileştirilerek agaroz jele yüklenmiştir. Her tekrarda aynı sonucun alınıp alınmadığını görmek için iki tekrarlı çalışılmıştır. 8 kuyucuklu jellerin; ilk kuyucuğuna 1kb'lık DNA ladder'ı yüklenmiştir. İkinci kuyucuğa sadece plazmit, diğerlerine ise artan oranlarda pDNA-nanopartikül konjugatlarından eklenmiştir. Bu yüklemelerden sadece pDNA'nın olduğu kuyucukta bir ilerleme olması, (-) yüklü pDNA'nın yükünden dolayı katotdan anoda doğru hareket ettiğini, pozitif hale getirilmiş altın takılı manyetik nanopartiküllerle etkileşmiş olan pDNA'ların ise; oluşan total pozitif yükden dolayı hareket edemediği gösterilmiştir. pDNA üzerine tutunan nanopartiküller bu harekete engel olmuş, dolayısıyla bu sonuç bize partiküllerle-plazmidlerin etkileştiğini ve 30 dk.'lık sürenin bu etkileşim için yeterli olduğunu göstermiştir.

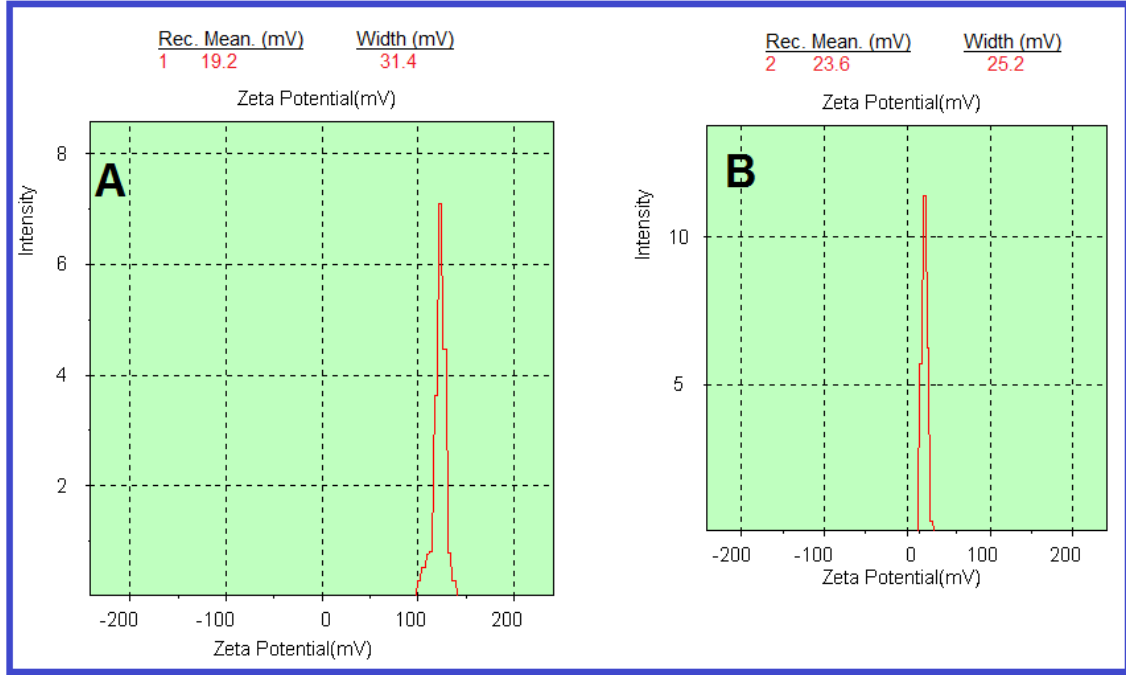


Şekil 4.4. p53-GFP taşıyan pDNA-pozitif hale getirilmiş altın takılı manyetik nanopartikül konjugatlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri

4.2.2. Zeta Potansiyel Sonuçları

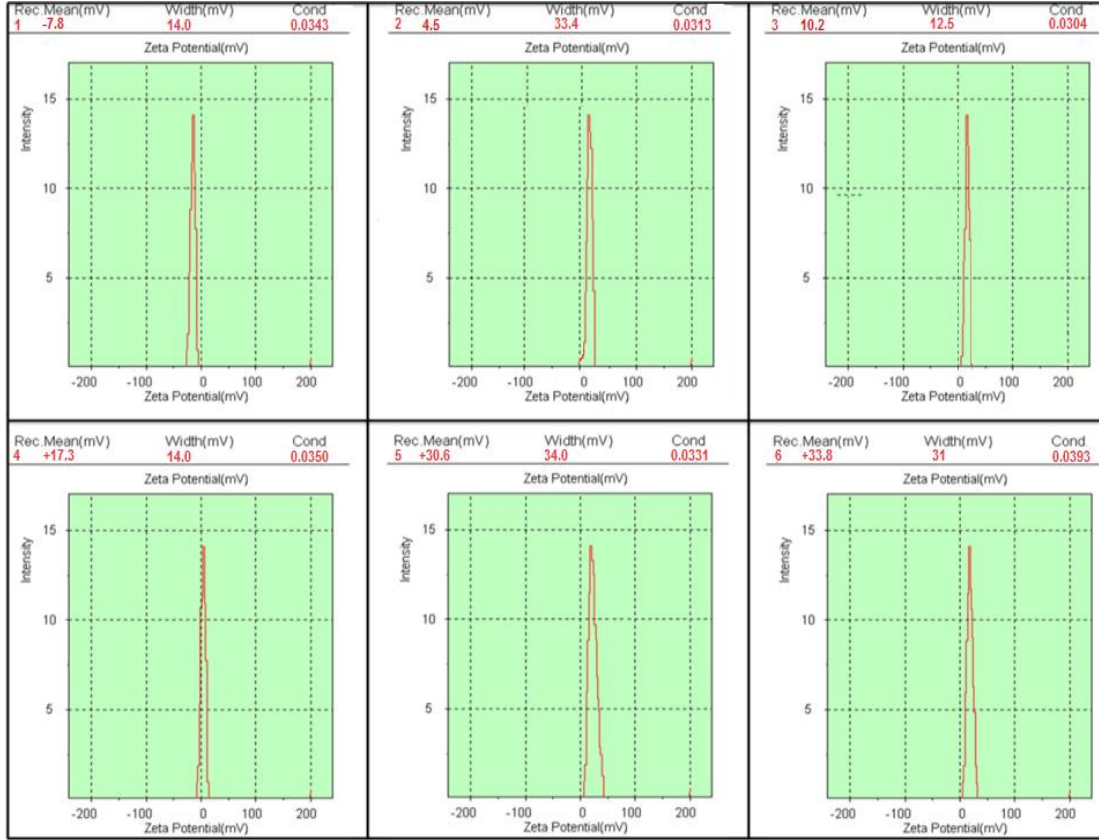
Partikülleri pozitif hale getirmek için hem Aptes hem de sistaminden yararlanılmıştır. Silika üzerinden takılan aptes yüzeyi pozitif hale getirmektedir. İlk şekildeki 19,2 mV'luk potansiyel aptesle kaplama sonucu elde edilmiştir. İkinci şekilde ise; altın

üzerinden takılan sistaminler yükün daha da artışı sağlanmış; potansiyel 23,6 mV olarak ölçülmüştür. Böylece partiküllerin başarılı şekilde (+) hale getirildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Zeta Potansiyel sonuçları A) APTES takılı Silika@MNP'ler, B) 2-aminoetantiyol takılı altın modifiye APTES@ Silika@MNP'ler

Çalışmanın transfeksiyon kısmında farklı konsantrasyonlarda tek bir ana stoktan hazırlanan partiküllerin pDNA ile etkileşimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla seçilen partikül konsantrasyonlarının hücreler için toksik olmamasına ve ekspresyon düzeylerini olumsuz etkilememelerine dikkat edilmiştir. 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml ve 3 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan partiküller 30 dk. boyunca pDNA'larla etkileştirilip, pDNA-partikül konjugatlarının tek tek potansiyel ölçümleri alınmıştır. Total yüklerin değişimi aşağıda sunulmuştur. pDNA (-) yüklü olduğundan düşük konsantrasyonlarda sonuç (-) çıkarken, artan konsantrasyonlarda partiküller plazmitlere takılarak total yükün artışı sağlanmıştır ve görüldüğü gibi daha yüksek potansiyel değerleri kaydedilmiştir. 3 mg/ml'lik konsantrasyonda +33,8 mV'luk potansiyel kaydedilip, bu değerlerin hücre kültürü çalışmaları için uygun olduğuna karar verilmiş ve partiküllerin plazmitlere takıldığı gösterilmiştir. Şekil 4.6.'da farklı partikül konsantrasyonlarıyla etkileştirilen pDNA'ların total yükleri gösterilmektedir.

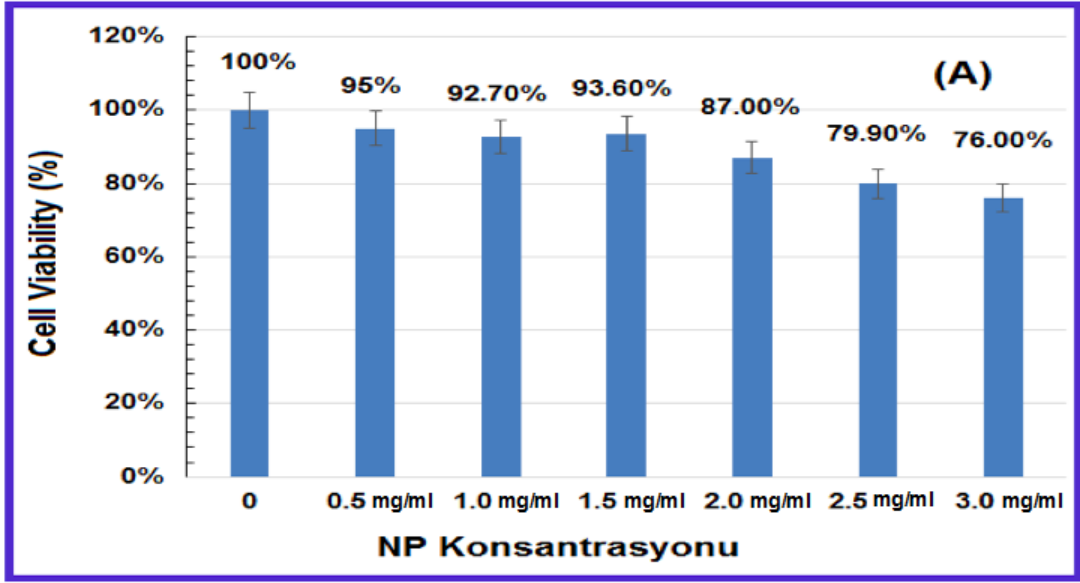


Şekil 4.6. pDNA-nanopartikül konjugatlarının Zeta Potansiyel değerleri

Bu değerler literatürdeki bilgilerle uyumludur. Yapılan çalışmalarda 40 mV'lara kadar ulaşılmış ve bu değerlerin hücreler üzerine bir olumsuz etkisi kaydedilmemiştir [179-181]. Artan +'lik hem hücreye toksik açıdan zarar verecek hem de partiküller tarafından tutulan plazmitler hücre içerisinde bırakılmayarak gen ekspresyon seviyelerini düşürecektir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak pDNA ile etkileştirilecek partikül konsantrasyonları; 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml ve 3 mg/ml seçilmiştir.

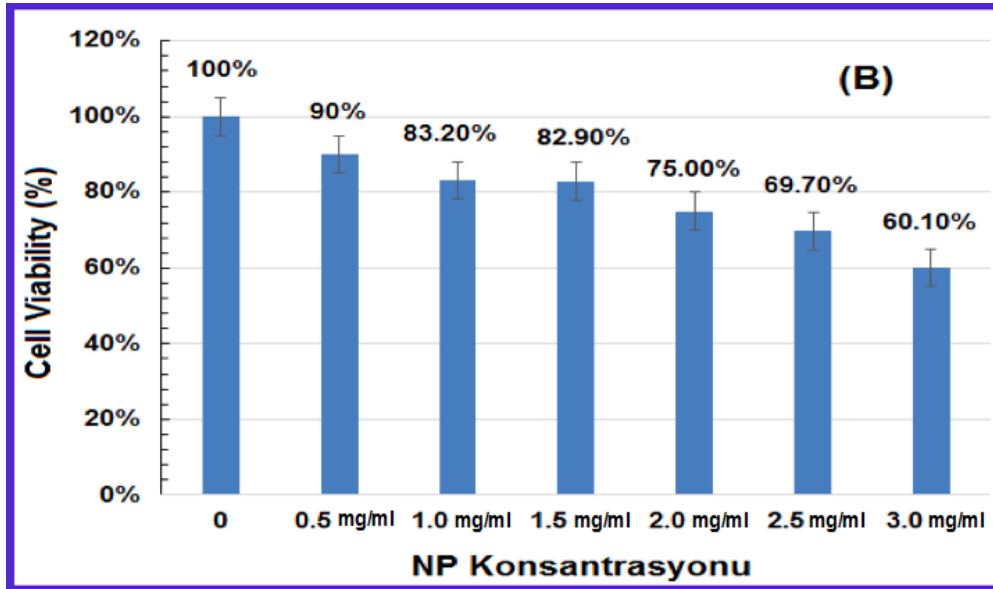
4.3. Sitotoksitite Sonuçları

Kanser hücreleri üzerine uygulanacak pDNA-nanopartikül konjugatlarının konsantrasyonları, ilk önce L929 hücreleri ile yapılan denemelerle belirlenmiştir. Hücre canlılık testlerinden alınan sonuçlara göre; belirlenen konsantrasyonların kanser hücreleri içinde kullanabileceği saptanmıştır. L929 hücrelerinin canlılık yüzdeleri aşağıdaki şekilde belirlendiği gibidir. Magnetin uygulanmadığı kısımda hücre canlılığı; 0,5 mg/ml'de %95, 1 mg/ml'de %92,70, 1,5 mg/ml'de %93,60, 2 mg/ml'de %87, 2,5 mg/ml'de 79,90, 3 mg/ml' de ise %76 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Magnet uygulanmadan, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları

Magnetin uygulandığı kısımda ise; 0,5 mg/ml'de %90, 1 mg/ml'de %83,2, 1,5 mg/ml'de %82,9, 2 mg/ml'de %75, 2,5 mg/ml'de %69,7, 3 mg/ml'de ise %60,1 olarak tespit edilmiştir.



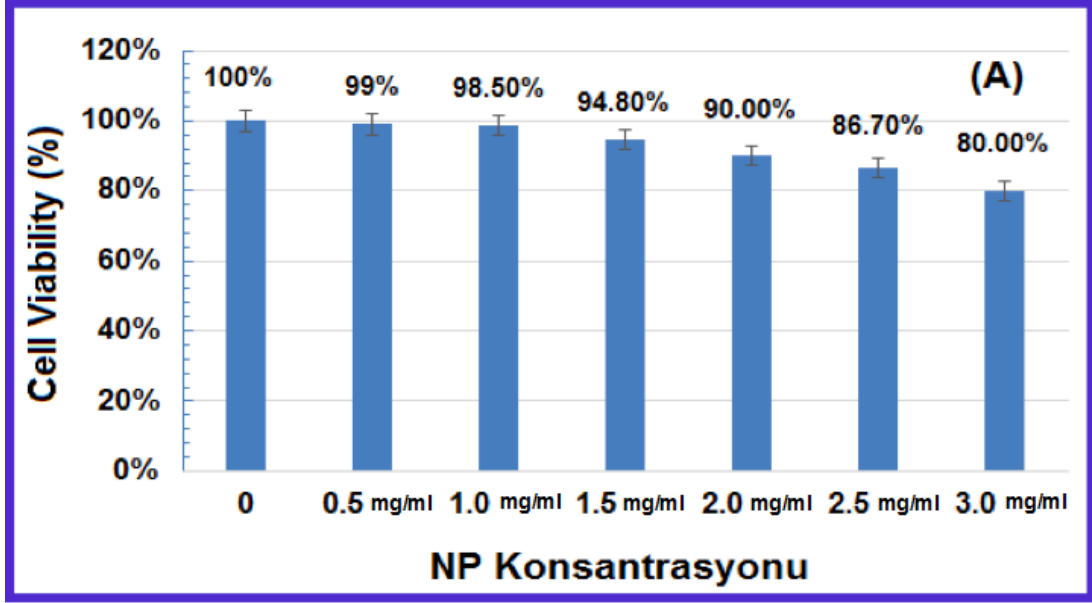
Şekil 4.8. Magnet uygulanmış, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları

Magnet uygulanan kısımdaki daha düşük olan hücre canlılık oranları, partiküllerle taşınan plazmitlerin hücre içerisine taşınıp burada ifade olarak, hücreyi apoptoza

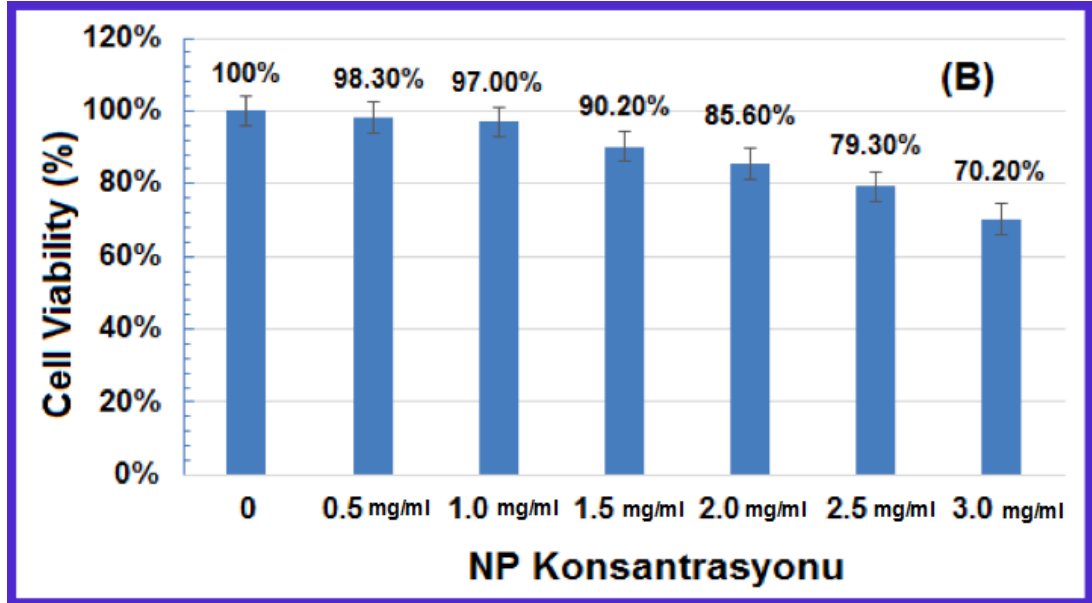
sürüklemiş olabileceğini akla getirmektedir. Magnetsiz kısımda ise; kendiliğinden hücre içine giren partikül-plazmit miktarının daha az olduğu ve buna bağlı olarak daha yüksek canlılık oranlarının kaydedildiği düşünülmüştür. Bunun doğruluğu kanser hücreleri ile yapılan ikili boyamadan sonra belirlenecektir. Çünkü bu oranların kaydedilmesinde, magnetin gücü ya da artan partikül konsantrasyonlarının hücreler üzerine olan toksikliği de etkili olmuş olabilir. Bu çalışmayla seçilen partikül konsantrasyonlarının kanser hücreleri üzerinde de uygulanabileceği gösterilmiş ve toksik sınırlar içerisinde hareket edilmeye çalışılmıştır.

Oranlar seçilirken literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurulmuş ve %70'in altında canlılık oranı verebilecek konsantrasyonlar seçilmemeye çalışılmıştır [155, 171, 180, 181]. Fakat artan konsantrasyonlarda %70'den daha az canlılık oranları elde edilmiş olup, oranın çok düşmemesi sebebiyle kanser hücreleri üzerinde de bu partikül konsantrasyonlarıyla çalışılmaya devam edilmiştir.

DLD-1 kolon kanseri hücre hattıyla yapılan çalışmalarda Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi gene magnetin uygulandığı kısımda daha düşük hücre canlılık oranları kaydedilmiştir. Bu veriler L929 hücreleriyle yapılan çalışmayla uyumludur. L929 ve DLD-1 hücre hatlarının canlılıkları oranları arasında bu kadar farklılık olması; fibroblast hücrelerinin kanser hücrelerine kıyasla; daha dayanıksız ve hassas olmasıyla açıklanmaktadır. Dolayısıyla fibroblast hücrelerindeki canlılık oranları daha düşük kaydedilmiştir. Fakat literatürde de yapılan çalışmalarda partiküllerin toksik etkileri üzerine çelişkili yayınlar bulunmaktadır. Örneğin; insan akciğer karsinoma hücreleri (A549) üzerine uygulanan 40 and 80 mg/mL'lik konsantrasyonlarda oldukça düşük sitotoksitite sonuçları alınmışken; aynı konsantrasyonlar kullanılarak, insan fibroblast hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada oldukça fazla sitotoksik etki gözlenmiştir [178].



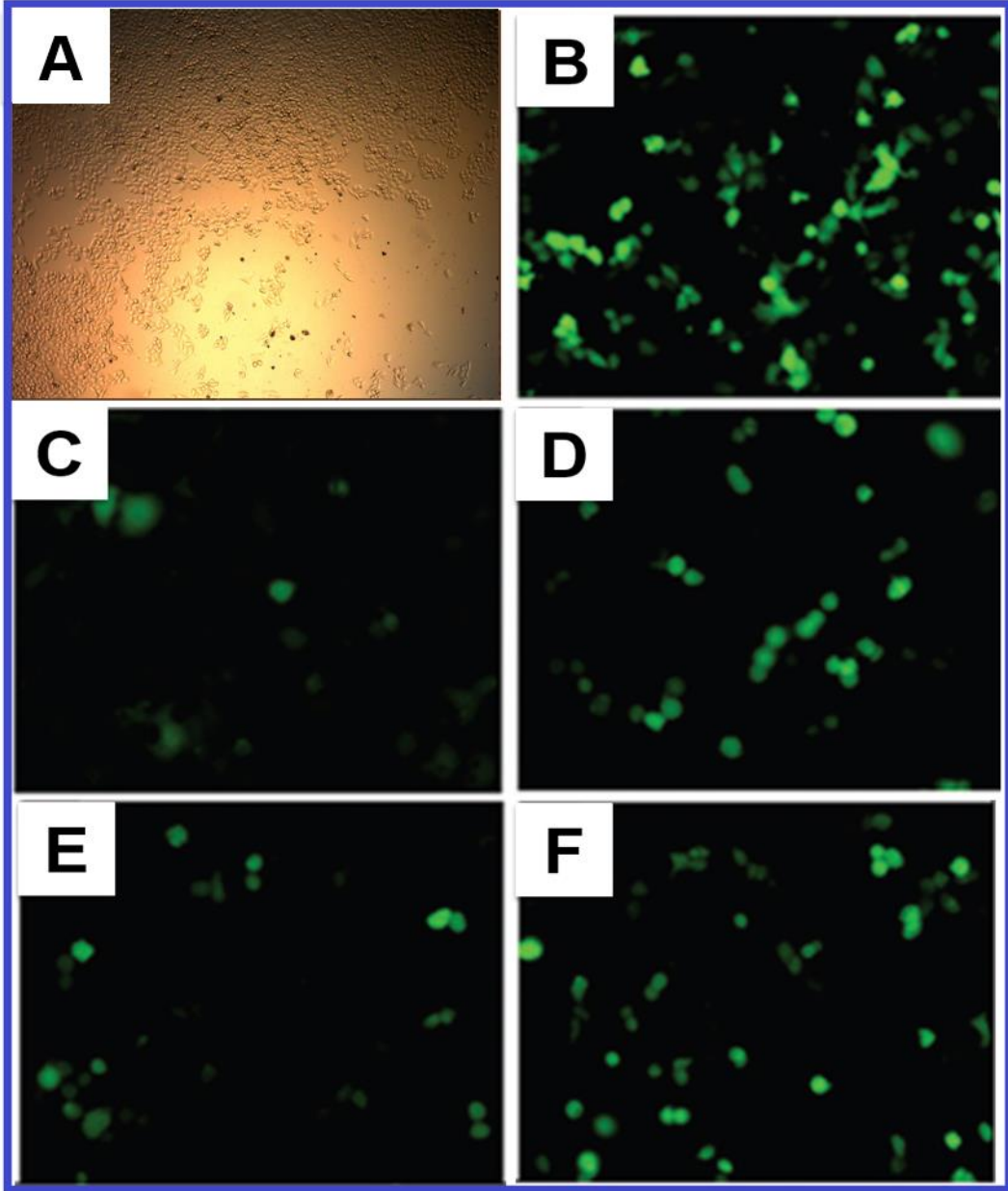
Şekil 4.9. Magnet uygulanmadan, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları



Şekil 4.10. Magnet uygulanmış, artan nanopartikül konsantrasyonuna karşı sabit kalan pDNA miktarlarındaki hücre canlılık oranları

4.4. pDNA-Nanopartikül Konjugatları ile Kanser Hücreleri Arasındaki Etkileşimin Değerlendirilmesi

DLD-1 hücreleri içerisine aktarılan pDNA'larımız GFP geni taşımaktadır. GFP, 450-490 nm'lik floresans ışık altında yeşil renk veren bir proteindir. Bu geni taşıyan pDNA'nın hücre içerisine girip, genin ifadesi sonucunda yeşil floresans renkte ışık üretmesi, ekspresyonun takibine olanak sağlamaktadır. GFP'nin ifadesinin gözlenmesi aynı plazmit üzerinde taşınan p53 geninin de ifade olduğunu göstermektedir. p53 geninin ifadesiyle de hücrelerin apoptoza gitmesi beklenmektedir. Şekil 4.11.'de hücrelerin floresans mikroskobu görüntüleri, magnet uygulanmamış kısımdaki GFP gen ekspresyonları ve magnet uygulandıktan sonraki GFP ekspresyonları gösterilmiştir. En iyi oranlar 1,5 mg/ml ve 2 mg/ml'lik partikül-pDNA konjugatlarından elde edilmiştir. Bu sebeple sadece bu konsantrasyonlara ait görüntüler konulmuştur. Düşük konsantrasyonlarda ve toksik etkiden dolayı yüksek konsantrasyonlarda herhangi bir ışımaya rastlanılmamıştır. Ekspresyon seviyeleri 0'a çok yakın olduğundan bu konsantrasyonlardaki gen ifadeleri aşağıdaki şekilde gösterilmemiştir. Magnetin kullanılması şekillerde de görüldüğü gibi hücre içerisine girişi etkilemiş, dolayısıyla ekspresyonlarda bir artış görülmüştür. Magnet uygulanmayan kısımda da çok düşük olsa da bir ekspresyon gözlenmiştir.

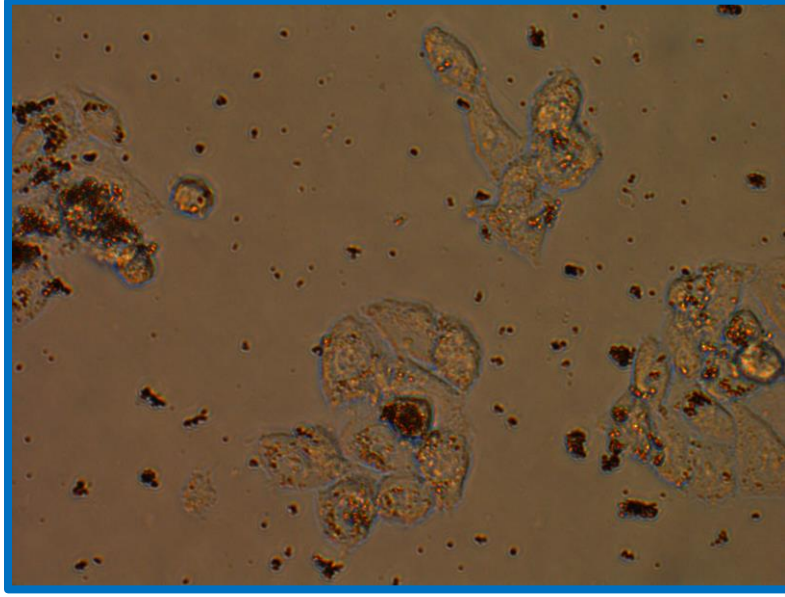


Şekil 4.11. Gen aktarımı sonucu DLD-1 hücrelerinin floresans mikroskop görüntüleri

A) Kültüre edilmiş DLD-1 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü, B) Pozitif kontrol olarak kullanılmış ticari transfeksiyon ajanı ile gerçekleştirilmiş transfeksiyon görüntüleri, C-D) 1,5 mg/ml partikül kullanıldığında, magnetsiz (C) ve magnetli (D) transfeksiyon görüntüleri, E-F) 2 mg/ml partikül kullanıldığında, magnetsiz (E) ve magnetli (F) transfeksiyon görüntüleri

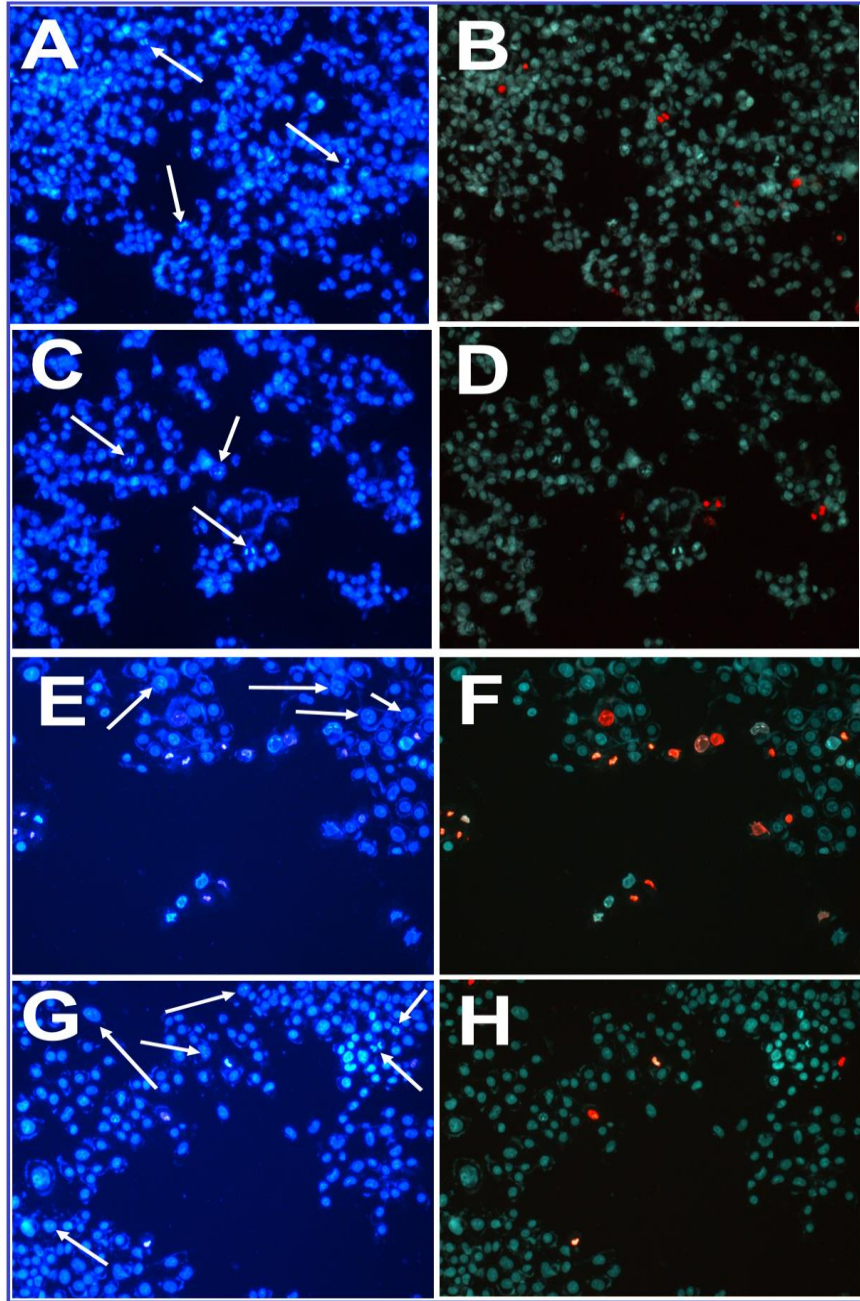
Artan partikül konsantrasyonları hücreler üzerinde toksik etki yaratmış ve hücreleri nekroza götürmüştür. Artan konsantrasyonlarda (2,5 mg/ml ve 3 mg/ml) partiküllerde aglomerasyonun arttığı; dolayısıyla bir araya gelmiş partiküllerin

magnet ile hücre içerisine çekilirken hücre zarına zarar verdiği; bu sebeple hücreler üzerinde nekrotik bir etki yarattığı söylenebilir.



Şekil 4.12. 3 mg/ml partikül konsantrasyonunda hücreler üzerinde meydana gelen aglomerasyon

Şekil 4.13.'te pDNA ile etkileştirilmiş 1,5 ve 2,0 mg/ml konsantrasyondaki partiküllerin magnet uygulanmadığında ve magnet uygulandığında, hücreler üzerinde meydana getirdiği apoptoz-nekrozu göstermektedir. Magnet uygulaması hücre içerisine alınan partikül miktarını arttırmış ve aktarılan p53 geni hücre içerisinde ifade olarak hücreyi apoptoza sürüklemiştir. Magnet uygulanmadığında da gene hücre içerisine düşük de olsa partiküllerin girişi gözlenmiştir. Ayrıca transfeksiyon verimine paralel olarak 1,5 ve 2 mg/ml'lik konsantrasyonlarda; magnetsiz bölgede % 0,5-5, magnetli bölgede; %2-8'lik apoptoz oranları kaydedilmiştir.



Şekil 4.13. Apoptoz-Nekroz floresans mikroskop görüntüleri A-B) Magnetsiz, 1,5 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz, C-D) Magnetsiz, 2 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz transfeksiyon görüntüleri, E-F) Magnetli, 1,5 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz, G-H) Magnetli, 2 mg/ml partikül kullanıldığında hücrelerdeki apoptoz/nekroz

On farklı alanda yaklaşık 1000 hücrenin sayılmasıyla hesaplanan transfeksiyon verimleri aşağıda sunulmuştur. İlk çizelge magnet uygulanmadan elde edilen

transfeksiyon verimleri olup, ikincisi; magnet uygulandığında elde edilmiş verilerdir. Magnet uygulaması bariz şekilde hücre içine partikül alımını arttırmış, bu da daha fazla pDNA'nın hücre içerisine girip; çekirdeğe aktarılan genin ifadesinin gerçekleşmesi sonucu transfeksiyon verimlerinin artmasını sağlamıştır.

Çizelge 4.1. Değişen Partikül Konsantrasyonlarına Bağlı Transfeksiyon Verimi

Partikül Konsantrasyonu	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	1,5 mg/ml	2,0 mg/ml	2,5 mg/ml	3,0 mg/ml	Pozitif Kontrol
Transfeksiyon Verimi	% 0,1	%0,3	% 1	% 6,8	% 0,7	% 0,5	% 72

Not: (Magnetsiz Alan) pDNA (446,44 ng/ µl) ve partikülden (10 mg/ml) eşit miktarlarda alınmıştır. (4'er µl)

Partikül Konsantrasyonu	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	1,5 mg/ml	2,0 mg/ml	2,5 mg/ml	3,0 mg/ml	Pozitif Kontrol
Transfeksiyon Verimi	% 0,32	% 0,71	% 3	% 10	% 1,1	% 0,26	% 72

Not: (Magnetli Alan) pDNA (446,44 ng/µl) ve partikülden (10 mg/ml) eşit miktarlarda alınmıştır. (4'er µl)

5. GENEL SONUÇLAR

Tez çalışması boyunca elde edilen sonuçlar bu bölümde maddeler halinde sunulmuştur.

Tez çalışması kapsamında, verimli bir şekilde gen transfeksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla manyetit nanopartiküllerin üretimi, son zamanlarda oldukça dikkat çeken yöntemlerden biri olan; polyol yöntemiyle gerçekleştirmiştir.

Polyol yönteminde, manyetit nano partiküllerin üretimi için; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, süksinik asit, üre ve 1,2 propilen glikolden yararlanılmıştır.

Üretilen nanopartiküllerin yüksek mıknatıslanma gücü, hidrofilik yapıda olmaları ve kontrol edilebilir ikincil yapılara sahip olmaları bu yöntemin avantajları arasındadır.

XRD sonuçlarında; 220, 311, 222, 400, 422, 511, 440, 620 ve 533 iki teta değerlerindeki MNP'lerin kristal yapısına özgü (kübik ters spinel) piklerini göstermektedir. MNP'lere ait spektrumda başka fazlara ait piklerin çıkmaması üretilen partiküllerin yüksek saflıkta olduğunu ve sentez sonrası elde edilen partiküllerin siyah renkte olması manyetit fazda olduğunu ifade göstermektedir.

Sentezlenen nanopartiküllerin şekil ve morfolojileri TEM analizleriyle ortaya konmuştur. Yapılan analizde ~ 20 nm çapa sahip nanopartiküller elde edilmiştir.

Manyetik nanopartiküllerdeki aglomerasyonun önüne geçme, biyolojik sistemlerdeki biyoyumluluğu sağlamak ve daha pek çok avantajdan dolayı; partiküller sol-jel metoduyla silika ile kaplanmıştır.

Yüzeyi fonksiyonel ve pozitif hale getirmek için bifonksiyonel moleküllerden silan grubundan APTES'den yararlanılmıştır.

APTES'in taşıdığı $-\text{NH}_2$ 'ler sayesinde pozitif hale getirilen yüzeye, $-\text{NH}_2$ 'ler üzerinden altın nanopartiküllerin indirgenmesi gerçekleştirilmiştir.

Altın nanopartiküllerin eldesi için; HAuCl_4 , CTAB ve tri-sodyum sitrattan yararlanılmıştır.

Tüm basamaklardan sonra Au takılı APTES@Si@MNP'ler elde edilmiştir.

Partiküllerin karakterizasyon çalışmalarında; TEM, XRD, FTIR ve Zeta Sizer ölçümlerinden yararlanılmıştır.

Si@MNP ve Au@Si@MNP'lere ait XRD piklerinde de demir oksit nanopartiküllerin karakteristik pikleri gözükmemektedir. Fakat; kaplama işleminden sonra piklerin şiddetinde azalma ve piklerde genişleme gözlenmiştir. Bu sonuç; MNP'lerde kaplama işleminden sonra kristal yapının bozulmadığını ifade etmektedir.

Si@MNP ve APTES@Si@MNP'lerin yüzey kimyasal yapılarını karakterize etmek üzere FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. 563 veya 580 cm^{-1} 'de görülen adsorbsiyon piki APTES@Si@MNP'lere ait Fe-O pikidir. MNP'lerin yüzeyinde silan polimerlerine ait 1111, 1018 cm^{-1} 'deki pikler adsorpsiyon pikleridir ve Si-O-H ve Si-O-Si grupları ile teyit edilmiştir. 895 ve 794 cm^{-1} 'de görülen pik Si-O-H absorpsiyon bantlarının titreşim-germeye bağlı pikidir. Ayrıca, 3419 ve 1628 cm^{-1} 'deki görülen iki geniş pik NH_2 (titreşimi) ve N-H (germe) bantlarını göstermektedir.

Yapılan analizler sonucu partiküllerin başarılı bir şekilde silika ile kaplandığı ve altınların yüzeye takıldığı gözlenmiştir. Fakat yüzeyin tamamen altınla kaplanması söz konusu olmayıp, bu yapının oluşturulabilmesi için Au oranının artırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen partiküller ~50-100 nm çapa sahip olup, hücre transfeksiyonunda ilerleyen aşamalarda kullanılmıştır.

Partikülleri pozitif hale getirmede hem APTES hem de 1M'lık sistamin çözeltisinden yararlanılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleriyle elde edilen pozitiflik belirlenmiştir. APTESle kaplama sonucunda 19,2 mV'luk, altın üzerinden takılan sistaminler (2-aminoetantiyol) aracılığıyla 23,6 mV'luk potansiyel elde edilmiştir. Sonuçlar partiküllerin başarılı şekilde (+) hale getirildiğini göstermektedir.

Pozitif hale getirilen partiküller, p53-EGFP genini taşıyan plazmitlerin DLD-1 kolon kanseri hücre hattını transfeksiyonunda kullanılmıştır.

p53-EGFP geni taşıyan pDNA 'yı barındıran *E.coli* bakterisinin sıvı besiyerinde çoğaltılmasından sonra, tek koloni izolasyonu için katı besiyerine ekim yapılmıştır.

Tek koloni tekrar sıvı besiyerine alınıp, bakteriler çoğaltılmış ve daha sonra Axygen,

AxyPrep Midi Plazmid saflaştırma kiti aracılığıyla bakterilerin içerisindeki plazmitlerin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pDNA'ların miktarı ve saflık tayini Nanodrop ölçümleriyle elde edilmiştir.

Sabit orandaki pDNA'lar artan konsantrasyonlarda partiküllerle etkileştirilerek; pozitif hale getirilmiş partiküllerle pDNA arasındaki etkileşim, partiküllerin pDNA'ları yeterince tutup tutamadığı, agaroz jel elektroforeziyle saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 8 kuyucuklu jeller hazırlanmış ve 6 kuyucuğa 4 µl DNA (446,44 ng/µl), 4 µl nanopartikül (10 mg/ml) (her kuyucuk için farklı konsantrasyonlarda partiküller hazırlanmıştır (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,0 mg/ml)) ve 8 µl, 6X yükleme boyası yüklenmiştir. Geri kalan kuyucuklara DNA ladder'ı ve sadece pDNA eklenmiştir. Sonuç olarak sadece pDNA'nın olduğu kuyucukta bir ilerlemenin olması, diğer kuyucuklardaki partiküllerin pDNA'lara tutunduğunu göstermiştir. Böylece beklenen sonuç elde edilmiştir.

In-vitro çalışmalarda ilk önce hücreler üzerinde partiküllerin oluşturduğu toksik sınırın belirlenebilmesi için L929 fare fibroblast hücrelerinden yararlanılmıştır. Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT testi kullanılmıştır. Magnetin uygulanmadığı kısımda hücre canlılığı 0,5 mg/ml'de %95, 1 mg/ml'de %92,70, 1,5 mg/ml'de %93,60, 2 mg/ml'de %87, 2,5 mg/ml'de 79,90, 3 mg/ml'de ise %76 olarak belirlenmiştir. Magnetin uygulandığı kısımda ise; 0,5 mg/ml'de %90, 1 mg/ml'de %83,2, 1,5 mg/ml'de %82,9, 2 mg/ml'de %75, 2,5 mg/ml'de %69,7, 3 mg/ml'de ise %60,1 olarak tespit edilmiştir. Bu oranların kanser hücrelerinde çalışmaya uygun olduğuna karar verilmiştir.

DLD-1 hücreleriyle yapılan MTT testinde, partiküllerin hücre içerisine girişinde herhangi manyetik alan kullanılmadığında; 0,5 mg/ml'de %99, 1 mg/ml'de %98,5, 1,5 mg/ml'de %94,8, 2 mg/ml'de %90, 2,5 mg/ml'de 86,7, 3 mg/ml'de ise %80 hücre canlılık oranları kaydedilmiştir. Magnetin uygulandığı kısımda ise; 0,5 mg/ml'de %98,3 1 mg/ml'de %97, 1,5 mg/ml'de %90,2, 2 mg/ml'de %85,6, 2,5 mg/ml'de %79,3, 3 mg/ml'de ise %70,2 olarak tespit edilmiştir.

Magnetin uygulandığı kısımda her iki hücre tipinde de hücre canlılık yüzdeleri azalmıştır. Çünkü magnetin etkisiyle partiküller daha çok bir araya gelme eğiliminde olup, hücre üzerinde toksik etki yaratmıştır. Ayrıca artan partikül konsantrasyonları

da hücreler üzerinde toksik etki yaratmış olup, en ideal partikül konsantrasyonunun 1,5 ve 2,0 mg/ml olduğu sonucuna varılmıştır.

p53-GFP genini taşıyan pDNA ile yapılan transfeksiyon çalışmasında ise; en ideal partikül konsantrasyonunun 1,5 mg/ml ve 2,0 mg/ml'de olduğu görülmüştür. Çünkü magnetsiz kısımda 1,5 mg/ml'de %1'lik, 2,0 mg/ml'de 6,8' lik; magnetli kısımda ise; 1,5 mg/ml'de % 3'lük, 2,0 mg/ml'de %10'luk bir transfeksiyon verimi elde edilmiştir. Magnet kullanımının transfeksiyon verimini arttırdığı bariz şekilde ortaya konmuştur. Transfeksiyon verimi GFP proteinin ifadesi sonucu yeşil ışığa yapan hücrelerin sayımı ve apoptoza giden hücrelerin sayımı yoluyla gerçekleştirilmiş olup; her iki hücre sayısı hemen hemen birbirinin aynısı olarak kaydedilmiştir.

Gerek toksite gerekse nekroz sonuçlarıyla, sistamin ve APTES aracılığıyla (+) hale getirilmiş Au takılı Si@MNP'lerin hücreler üzerinde çok fazla toksik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Fakat yapılan analizler belirli bölgelerdeki hücre sayımları sonucuna dayalı nitel analizler olup, gen ekspresyonunu kanıtlamak için ekstra Western Blot, PCR gibi tekniklerden yararlanılmalıdır.

Sonuç olarak tez kapsamında non-viral bir transfeksiyon ajanı olarak kullanılan 2-aminoetantiyol ve APTES aracılığıyla (+) hale getirilmiş Au takılı Si@MNP'lerin üretimi, karakterizasyonu ve DLD-1 hücre hattını transfekte edip, hücreleri başarılı bir şekilde apoptoza götürmesi gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Misra R, Acharya S, Sahoo SK, Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy, *Drug Discovery Today*,15:842-50, **2010**.
- [2] Klug WS, Cummings MR., *Concepts of genetics*: Pearson Education, Inc; **2003**.
- [3] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A, Cancer statistics, 2014, *CA: a cancer journal for clinicians*, 64:9-29, **2014**.
- [4] Cai W, Gao T, Hong H, Sun J, Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology, science and applications* ,1:17, **2008**.
- [5] Gültekin M, Boztaş G, *Türkiye kanser istatistikleri*, **2014**.
- [6] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, *Molecular biology of the cell*, Garland, New York, 139-94, **1994**.
- [7] Rani D, Somasundaram VH, Nair S, Koyakutty M, Advances in Cancer Nanomedicine, *Journal of the Indian Institute of Science*, 92:187-218, **2012**.
- [8] Öz-Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D, Otofaji: bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, Kasım sayısı Yayında. **2011**.
- [9] Vogelstein B, Kinzler KW, Cancer genes and the pathways they control, *Nature medicine*, 10:789-99, **2004**.
- [10] Levine AJ, Oren M, The first 30 years of p53: growing ever more complex, *Nature Reviews Cancer*, 9:749-58, **2009**.
- [11] Lane DP., Cancer, p53, guardian of the genome, *Nature*, 358:15-6, **1992**.
- [12] Aylon Y, Oren M, New plays in the p53 theater, *Current opinion in genetics & development*, 21:86-92, **2011**.
- [13] Çevik Ö, Aydın U, Gürsoy RN, Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Cilt: 32/sayı1/ ss 67-90, **2012**.
- [14] Yılmaz E, Altunok V., Kanser ve p53 Geni, *Avkae Dergisi*, 1:19-23, **2011**.
- [15] Peterson E., *Colon Cancer: Protect Yourself: Brain Food*, **2014**.
- [16] Hoff PM., Is there a role for routine p53 testing in colorectal cancer?, *Journal of clinical oncology*, 23:7395-6, **2005**.
- [17] Albayrak A, Gürsan N, Gündoğdu C, Kolorektal kanserlerde c-erbB-2 ve p53 ekspresyonunun prognostik önemi, *J Clin Exp Invest*, www.jceionline.org Vol: 5, **2014**.

- [18] Waldner MJ, Neurath MF, The molecular therapy of colorectal cancer, *Molecular aspects of medicine*, 31:171-8, **2010**.
- [19] Kaliberov SA, Buchsbaum DJ., Cancer Treatment with Gene Therapy and Radiation Therapy, *Advances in cancer research*, 115:221, **2012**.
- [20] Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D, Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes, *The Oncologist*, 7:492-508, **2002**.
- [21] Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, Targeted nanoparticles for cancer therapy, *Nano today*, 2:14-21 **2007**.
- [22] Scheinberg DA, Villa CH, Escorcía FE, McDevitt MR, Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7:266-76, **2010**.
- [23] Jelveh S, Chithrani DB, Gold nanostructures as a platform for combinational therapy in future cancer therapeutics, *Cancers*, 3:1081-110, **2011**.
- [24] Kateb B, Chiu K, Black KL, Yamamoto V, Khalsa B, Ljubimova JY, Nanoplatfoms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: What should be the policy?, *Neuroimage*, 54:S106-S24, **2011**.
- [25] Gupta SRN., Advances in Molecular Nanotechnology from Premodern to Modern Era, *International Journal of Materials Science and Engineering*, Vol. 2, No. 2, **2014**.
- [26] Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M, Application of magnetic nanoparticles to gene delivery, *International journal of molecular sciences*, 12:3705-22, **2011**.
- [27] Varadan VK, Chen L, Xie J, Nanomedicine: design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems: *John Wiley & Sons*, **2008**.
- [28] Gindy ME, Prud'homme RK, Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy. **2009**.
- [29] Friedmann T., Human gene therapy—an immature genie, but certainly out of the bottle, *Nature medicine*, 2:144-7, **1996**.
- [30] Mohsen MMü, Cationic liposomes as gene delivery system, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5:2007-12, **2011**.
- [31] Rochlitz CF., Gene therapy of cancer, *Swiss medical weekly*, 131:4-9, **2001**.
- [32] Yu M, Poeschla E, Wong-Staal F., Progress towards gene therapy for HIV infection, *Gene therapy*, 1:13-26, **1994**.

- [33] Dishart KL, Work LM, Denby L, Baker AH, Gene therapy for cardiovascular disease, *BioMed Research International*, 138-48, **2003**.
- [34] Bunnell BA, Morgan RA, Gene therapy for infectious diseases, *Clinical microbiology reviews*, 11:42-56, **1998**.
- [35] Davies JC, Geddes DM, Alton EW, Gene therapy for cystic fibrosis, *The journal of gene medicine*, 3:409-17, **2001**.
- [36] Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC, Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID, *Nature Reviews Cancer*, 3:477-88, **2003**.
- [37] Gardlík R, Pálffy R, Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P, Vectors and delivery systems in gene therapy, *Medical Science Monitor Basic Research*, 11:RA110-RA21, **2005**.
- [38] Heo DS., Progress and limitations in cancer gene therapy, *Genetics in Medicine*, 4:52S-5S, **2002**.
- [39] El-Aneed A., Current strategies in cancer gene therapy, *European journal of pharmacology*, 498:1-8, **2004**.
- [40] Weinberg RA., Tumor suppressor genes, *Science*, 254:1138-46, **1991**.
- [41] Opalka B, Dickopp A, Kirch H-C, Apoptotic genes in cancer therapy, *Cells Tissues Organs*, 172:126-32, **2002**.
- [42] Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V, Mutations in the p53 tumor suppressor gene important milestones at the various steps of tumorigenesis, *Genes & cancer*, 2:466-74, **2011**.
- [43] Sauter ER, Takemoto R, Litwin S, Herlyn M, p53 alone or in combination with antisense cyclin D1 induces apoptosis and reduces tumor size in human melanoma, *Cancer gene therapy*, 9:807-12, **2002**.
- [44] Roy I, Holle L, Song W, Holle E, Wagner T, Yu X, Efficient translocation and apoptosis induction by adenovirus encoded VP22-p53 fusion protein in human tumor cells in vitro, *Anticancer research*, 22:3185-9, **2001**.
- [45] Stribley JM, Rehman KS, Niu H, Christman GM, Gene therapy and reproductive medicine, *Fertility and sterility*, 77:645-57, **2002**.
- [46] Ferreira GN, Monteiro GA, Prazeres DM, Cabral J, Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications, *Trends in biotechnology*, 18:380-8, **2000**.
- [47] Knipe JM, Peters JT, Peppas NA, Theranostic agents for intracellular gene delivery with spatiotemporal imaging, *Nano today*, 8:21-38, **2013**.

- [48] Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H, Gene therapy and DNA delivery systems, *International journal of pharmaceutics*, 459:70-83, **2014**.
- [49] Wong SY, Pelet JM, Putnam D, Polymer systems for gene delivery—past, present, and future, *Progress in Polymer Science*, 32:799-837, **2007**.
- [50] Luo D, Saltzman WM, Synthetic DNA delivery systems, *Nature biotechnology*, 18:33-7, **2000**.
- [51] Nam HY, Park JH, Kim K, Kwon IC, Jeong SY, Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers, *Archives of pharmacal research*, 32:639-46, **2009**.
- [52] Nagasaki T, Shinkai S, The concept of molecular machinery is useful for design of stimuli-responsive gene delivery systems in the mammalian cell, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 58:205-19, **2007**.
- [53] Schatzlein A., Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress, *Anti-Cancer Drugs*, 12:275-304, **2001**.
- [54] Labhasetwar V., Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery, *Current opinion in biotechnology*, 16:674-80, **2005**.
- [55] Bouard D, Alazard-Dany N, Cosset FL, Viral vectors: from virology to transgene expression, *British journal of pharmacology*, 157:153-65, **2009**.
- [56] Walther W, Stein U, Viral vectors for gene transfer, *Drugs*, 60:249-71, **2000**.
- [57] Munier S, Messai I, Delair T, Verrier B, Ataman-Önal Y, Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 43:163-73, **2005**.
- [58] Templeton NS, Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo, *Bioscience reports*, 22:283-95, **2002**.
- [59] Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aranega A, Non-viral and viral vectors for gene therapy, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 51:3-22, **2004**.
- [60] Kircheis R, Wightman L, Wagner E, Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines, *Advanced drug delivery reviews*, 53:341-58, **2001**.
- [61] Li S, Huang L, Nonviral gene therapy: promises and challenges, *Gene therapy*, 7:31-4, **2000**.
- [62] Bergen JM, Park I-K, Horner PJ, Pun SH, Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids, *Pharmaceutical research*, 25:983-98, **2008**.

- [63] Gao X, Kim K-S, Liu D, Nonviral gene delivery: what we know and what is next, *The AAPS journal*, 9:E92-E104, **2007**.
- [64] Niidome T, Huang L, Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, *Gene therapy*, 9:1647-52, **2002**.
- [65] Dujardin N, Pr eat V, Delivery of DNA to skin by electroporation, *Gene Delivery to Mammalian Cells: Springer*, p. 215-26, **2004**.
- [66] Aihara H, Miyazaki J-i, Gene transfer into muscle by electroporation in vivo, *Nature biotechnology*, 16:867-70, **1998**.
- [67] Heller R, Jaroszeski M, Atkin A, Moradpour D, Gilbert R, Wands J, In vivo gene electroinjection and expression in rat liver, *Febs Letters*, 389:225-8, **1996**.
- [68] Jaroszeski MJ, Heller LC, Gilbert R, Heller R, Electrically mediated plasmid DNA delivery to solid tumors in vivo, *Gene Delivery to Mammalian Cells: Springer*, p. 237-44, **2004**.
- [69] Heller LC, Ugen K, Heller R, Electroporation for targeted gene transfer, *Expert opinion on drug delivery*, 2:255-68, **2005**.
- [70] Al-Dosari MS, Gao X, Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress, *The AAPS journal*, 11:671-81, **2009**.
- [71] Mehier-Humbert S, Guy RH, Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells, *Advanced drug delivery reviews*, 57:733-53, **2005**.
- [72] Yang N-S, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D, In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:9568-72, **1990**.
- [73] Wolff J, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W, Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo, *Biotechniques*, 11:474-85, **1991**.
- [74] Loehr B, Willson P, Babiuk L, Gene gun-mediated DNA immunization primes development of mucosal immunity against bovine herpesvirus 1 in cattle, *Journal of virology*. 74:6077-86, **2000**.
- [75] Ajiki T, Murakami T, Kobayashi Y, Hakamata Y, Wang J, Inoue S, Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site, *Cancer gene therapy*, 10:318-29, **2003**.
- [76] Zhang G, Budker V, Wolff JA, High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA, *Human gene therapy*, 10:1735-7, **1999**.

- [77] Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J, The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle, *Gene therapy*, 5:272-6, **1998**.
- [78] Suda T, Liu D, Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications, *Molecular Therapy*, 15:2063-9, **2007**.
- [79] Elaïssari A, Pichot C, Delair T, Cros P, Kuerfurst R, Adsorption and desorption studies of polyadenylic acid onto positively charged latex particles, *Langmuir*, 11:1261-7, **1995**.
- [80] Elaïssari A, Cros P, Pichot C, Laurent V, Mandrand B, Adsorption of oligonucleotides onto negatively and positively charged latex particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 83:25-31, **1994**.
- [81] Ganachaud F, Elaïssari A, Pichot C, Effect of Triton X-405 on the adsorption and desorption of single-stranded DNA fragments onto positively charged latex particles, *Langmuir*, 13:7021-9, **1997**.
- [82] Ganachaud F, Elaïssari A, Pichot C, Laayoun A, Cros P, Adsorption of single-stranded DNA fragments onto cationic aminated latex particles, *Langmuir*, 13:701-7, **1997**.
- [83] Gao H, Hui K, Synthesis of a novel series of cationic lipids that can act as efficient gene delivery vehicles through systematic heterocyclic substitution of cholesterol derivatives, *Gene therapy*, 8:855-63, **2001**.
- [84] Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 114:100-9, **2006**.
- [85] Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, Li Z, Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery, *Journal of controlled release*, 100:165-80, **2004**.
- [86] Edinger D, Wagner E, Bioresponsive polymers for the delivery of therapeutic nucleic acids, *Wiley interdisciplinary reviews: nanomedicine and nanobiotechnology*. 3:33-46, **2011**.
- [87] Wu GY, Wu CH, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo, *Journal of Biological Chemistry*, 263:14621-4, **1988**.
- [88] Chemin I, Moradpour D, Wieland S, Offensperger WB, Walter E, Behr JP, Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo, *Journal of viral hepatitis*, 5:369-75, **1998**.
- [89] Rudolph C, Lausier J, Naundorf S, Müller RH, Rosenecker J, In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers, *The journal of gene medicine*, 2:269-78, **2000**.

- [90] Rahman MM, Elaissari A, Multi-stimuli responsive magnetic core-shell particles: synthesis, characterization and specific RNA recognition, *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1:3-15, **2012**.
- [91] Delmas T, Fraichard A, Bayle P-A, Texier I, Bardet M, Baudry J, Encapsulation and release behavior from lipid nanoparticles: Model study with Nile red fluorophore, *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1:16-25, **2012**.
- [92] Doustgani A, Farahani EV, Imani M, Doulabi AH, Dexamethasone sodium phosphate release from chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method, *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1:42-50, **2012**.
- [93] Roveimiab Z, Mahdavian AR, Biazar E, Heidari KS, Preparation of magnetic chitosan nanocomposite particles and their susceptibility for cellular separation applications, *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1:82-8, **2012**.
- [94] Poletto FS, Fiel LA, Lopes MV, Schaab G, Gomes AM, Guterres SS, Fluorescent-labeled poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules: synthesis, physicochemical properties and macrophage uptake, *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 1:89-98, **2012**.
- [95] Ando S, Putnam D, Pack DW, Langer R, PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization, *Journal of pharmaceutical sciences*, 88:126-30, **1999**.
- [96] Vert M, Mauduit J, Li S, Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity, *Biomaterials*, 15:1209-13, **1994**.
- [97] Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R, Visual evidence of acidic environment within degrading poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres, *Pharmaceutical research*, 17:100-6, **2000**.
- [98] Wang D, Robinson DR, Kwon GS, Samuel J, Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery, *Journal of controlled release*, 57:9-18, **1999**.
- [99] Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, *Advanced drug delivery reviews*, 47:113-31, **2001**.
- [100] Tsumoto K, Nomura S-iM, Nakatani Y, Yoshikawa K, Giant liposome as a biochemical reactor: transcription of DNA and transportation by laser tweezers, *Langmuir*, 17:7225-8, **2001**.
- [101] Edwards KA, Baeumner AJ, DNA-oligonucleotide encapsulating liposomes as a secondary signal amplification means, *Analytical chemistry*, 79:1806-15, **2007**.
- [102] Shchukin DG, Patel AA, Sukhorukov GB, Lvov YM, Nanoassembly of biodegradable microcapsules for DNA encasing, *Journal of the American Chemical Society*, 126:3374-5, **2004**.

- [103] Zelikin AN, Li Q, Caruso F, Degradable polyelectrolyte capsules filled with oligonucleotide sequences, *Angewandte Chemie International Edition*, 45:7743-5, **2006**.
- [104] Panyam J, Labhasetwar V, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced drug delivery reviews*, 55:329-47, **2003**.
- [105] Cohen H, Levy R, Gao J, Fishbein I, Kouzaev V, Sosnowski S, Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles, *Gene therapy*, 7:1896, **2000**.
- [106] Safinya CR, Structures of lipid–DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery, *Current Opinion in Structural Biology*, 11:440-8, **2001**.
- [107] Liu Z, Fan AC, Rakhra K, Sherlock S, Goodwin A, Chen X, Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy, *Angewandte Chemie International Edition*, 48:7668-72, **2009**.
- [108] Bianco A, Kostarelos K, Prato M, Applications of carbon nanotubes in drug delivery, *Current opinion in chemical biology*, 9:674-9, **2005**.
- [109] Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery, *Angewandte Chemie*, 116:5354-8, **2004**.
- [110] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Galbis JA, Muñoz-Guerra S, Biodegradable Nanoparticles of Partially Methylated Fungal Poly (β -L-malic acid) as a Novel Protein Delivery Carrier, *Macromolecular bioscience*, 8:551-9, **2008**.
- [111] Barratt G, Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60:21-37, **2003**.
- [112] Gilding D, Reed A, Biodegradable polymers for use in surgery—polyglycolic/poly (actic acid) homo-and copolymers: 1. *Polymer*, 20:1459-64, **1979**.
- [113] Lockman P, Mumper R, Khan M, Allen D, Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier, *Drug development and industrial pharmacy*, 28:1-13, **2002**.
- [114] Eliaz RE, Nir S, Marty C, Szoka FC, Determination and modeling of kinetics of cancer cell killing by doxorubicin and doxorubicin encapsulated in targeted liposomes, *Cancer Research*, 64:711-8, **2004**.
- [115] Wagner V, Dullaart A, Bock A-K, Zweck A, The emerging nanomedicine landscape, *Nature biotechnology*, 24:1211-8, **2006**.
- [116] Federman N, Denny CT, Targeting liposomes toward novel pediatric anticancer therapeutics, *Pediatric research*, 67:514-9, **2010**.

- [117] Mangala LS, Han HD, Lopez-Berestein G, Sood AK, Liposomal siRNA for ovarian cancer, *Therapeutic Applications of RNAi: Springer*, p. 29-42, **2009**.
- [118] Tekade RK, Kumar PV, Jain NK, Dendrimers in oncology: an expanding horizon, *Chemical reviews*, 109:49-87, **2008**.
- [119] Gillies ER, Frechet JM, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug discovery today*, 10:35-43, **2005**.
- [120] Talanov VS, Regino CA, Kobayashi H, Bernardo M, Choyke PL, Brechbiel MW, Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging, *Nano letters*, 6:1459-63, **2006**.
- [121] Kwon GS, Naito M, Kataoka K, Yokoyama M, Sakurai Y, Okano T, Block copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drugs, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2:429-34, **1994**.
- [122] Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *Journal of pharmaceutical sciences*, 92:1343-55, **2003**.
- [123] Mikhail AS, Allen C, Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels, *Journal of Controlled Release*, 138:214-23, **2009**.
- [124] Kabanov AV, Chekhonin V, Alakhov VY, Batrakova E, Lebedev A, Melik-Nubarov N, The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles: micelles as microcontainers for drug targeting, *FEBS letters*, 258:343-5, **1989**.
- [125] Vega J, Ke S, Fan Z, Wallace S, Charsangavej C, Li C, Targeting doxorubicin to epidermal growth factor receptors by site-specific conjugation of C225 to poly (L-glutamic acid) through a polyethylene glycol spacer, *Pharmaceutical research*, 20:826-32, **2003**.
- [126] Leamon CP, Reddy JA, Folate-targeted chemotherapy, *Advanced drug delivery reviews*, 56:1127-41, **2004**.
- [127] Cormode DP, Jarzyna PA, Mulder WJ, Fayad ZA, Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging, *Advanced drug delivery reviews*, 62:329-38, **2010**.
- [128] Templeton AC, Wuelfing WP, Murray RW, Monolayer-protected cluster molecules, *Accounts of Chemical Research*, 33:27-36, **2000**.
- [129] Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles, *Advanced drug delivery reviews*, 60:1289-306, **2008**.
- [130] Alexis F, Pridgen EM, Langer R, Farokhzad OC, Nanoparticle technologies for cancer therapy, *Drug Delivery: Springer*, p. 55-86, **2010**.

- [131] Chen Y-H, Tsai C-Y, Huang P-Y, Chang M-Y, Cheng P-C, Chou C-H, Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model, *Molecular pharmaceuticals*, 4:713-22, **2007**.
- [132] Qiao G, Zhuo L, Gao Y, Yu L, Li N, Tang B, A tumor mRNA-dependent gold nanoparticle–molecular beacon carrier for controlled drug release and intracellular imaging, *Chem Commun.*, 47:7458-60, **2011**.
- [133] Bikram M, Gobin AM, Whitmire RE, West JL, Temperature-sensitive hydrogels with SiO₂–Au nanoshells for controlled drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 123:219-27, **2007**.
- [134] Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano letters*, 6:662-8, **2006**.
- [135] Khan JA, Kudgus RA, Szabolcs A, Dutta S, Wang E, Cao S, Designing nanoconjugates to effectively target pancreatic cancer cells in vitro and in vivo, *PloS one*, 6:e20347, **2011**.
- [136] Arvizo RR, Giri K, Moyano D, Miranda OR, Madden B, McCormick DJ, Identifying new therapeutic targets via modulation of protein corona formation by engineered nanoparticles, *PloS one*, 7:e33650, **2012**.
- [137] Lee P, Zhang R, Li V, Liu X, Sun RW, Che C-M, Enhancement of anticancer efficacy using modified lipophilic nanoparticle drug encapsulation, *International journal of nanomedicine*, 7:731-7, **2012**.
- [138] Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Epple M, Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles, *Biomaterials*, 27:3147-53, **2006**.
- [139] Morgan TT, Muddana HS, Altinoglu EI, Rouse SM, Tabakovic A, Tabouillot T, Encapsulation of organic molecules in calcium phosphate nanocomposite particles for intracellular imaging and drug delivery, *Nano letters*, 8:4108-15, **2008**.
- [140] Lu J, Liong M, Zink JI, Tamanoi F, Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs, *Small*, 3:1341-6, **2007**.
- [141] Balas F, Manzano M, Horcajada P, Vallet-Regí M, Confinement and controlled release of bisphosphonates on ordered mesoporous silica-based materials, *Journal of the American Chemical Society*, 128:8116-7, **2006**.
- [142] Liong M, Lu J, Kovochich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery, *ACS nano*, 2:889-96, **2008**.
- [143] Hudson SP, Padera RF, Langer R, Kohane DS, The biocompatibility of mesoporous silicates, *Biomaterials*, 29:4045-55, **2008**.

[144] Shen W, Xiong H, Xu Y, Cai S, Lu H, Yang P, ZnO– Poly (methyl methacrylate) Nanobeads for Enriching and Desalting Low-Abundant Proteins Followed by Directly MALDI-TOF MS Analysis, *Analytical chemistry*, 80:6758-63, **2008**.

[145] Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI, Tamanoi F, Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals, *Small*, 6:1794-805, **2010**.

[146] Dorfman A, Parajuli O, Kumar N, Hahm J-i, Novel telomeric repeat elongation assay performed on zinc oxide nanorod array supports, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8:410-5, **2008**.

[147] Nair S, Sasidharan A, Rani VD, Menon D, Nair S, Manzoor K, Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20:235-41, **2009**.

[148] Nie L, Gao L, Feng P, Zhang J, Fu X, Liu Y, Three-Dimensional Functionalized Tetrapod-like ZnO Nanostructures for Plasmid DNA Delivery, *Small*, 2:621-5, **2006**.

[149] Zhang P, Liu W. ZnO, QD@ PMAA-co-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and bioimaging, *Biomaterials*, 31:3087-94, **2010**.

[150] Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune J, Jallet P, Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution, *Journal of microencapsulation*, 13:245-55, **1996**.

[151] Schlorf T, Meincke M, Kossel E, Glüer C-C, Jansen O, Mentlein R, Biological properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging, *International journal of molecular sciences*, 12:12-23, **2010**.

[152] Salloum M, Ma R, Weeks D, Zhu L, Controlling nanoparticle delivery in magnetic nanoparticle hyperthermia for cancer treatment: experimental study in agarose gel, *International Journal of Hyperthermia*, 24:337-45, **2008**.

[153] Chen B, Wu W, Wang X, Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy, *Current cancer drug targets*, 11:184-9, **2011**.

[154] Mykhaylyk O, Antequera YS, Vlaskou D, Plank C, Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro, *Nature protocols*, 2:2391-411, **2007**.

[155] Shi Y, Zhou L, Wang R, Pang Y, Xiao W, Li H, In situ preparation of magnetic nonviral gene vectors and magnetofection in vitro, *Nanotechnology*, 21:115103, **2010**.

[156] Cornell RM, Schwertmann U, The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses: *John Wiley & Sons*, **2006**.

- [157] Kwei GH, Von Dreele RB, Williams A, Goldstone JA, Lawson II AC, Warburton WK, Structure and valence from complementary anomalous X-ray and neutron powder diffraction, *Journal of Molecular Structure*, 223:383-406, **1990**.
- [158] Gupta AK, Gupta M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26:3995-4021, **2005**.
- [159] Wu W, He Q, Jiang C., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies, *ChemInform.*, 40:i., **2009**.
- [160] Cheng C, Xu F, Gu H., Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes, *New Journal of Chemistry*, 35:1072-9, **2011**.
- [161] Hamley I., Nanotechnology with soft materials, *Angewandte Chemie International Edition*, 42:1692-712, **2003**.
- [162] Tepper T, Ilievski F, Ross C, Zaman T, Ram R, Sung S, Magneto-optical properties of iron oxide films, *Journal of applied physics*, 93:6948-50, **2003**.
- [163] Mendenhall GD, Geng Y, Hwang J., Optimization of long-term stability of magnetic fluids from magnetite and synthetic polyelectrolytes, *Journal of colloid and interface science*, 184:519-26, **1996**.
- [164] Hui C, Shen C, Tian J, Bao L, Ding H, Li C, Core-shell Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles synthesized with well-dispersed hydrophilic Fe₃O₄ seeds, *Nanoscale*, 3:701-5, **2011**.
- [165] IN DDR, DEL TITOLO TPIC, DI DOTTORE DR. Synthesis and bio-functionalization of nanoparticles for biosensing and biorecognition, Università degli Studi di MODENA e REGGIO EMILIA.
- [166] Özgen C., Preparation and Characterization of Silica Coated Magnetite Nanoparticles and Labeling with Nonradioactive Re as a Surrogate of Tc-99m for Magneticly Targeted Imaging: Middle East Technical University, **2010**.
- [167] McBain SC, Yiu HH, Dobson J., Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery, *International journal of nanomedicine*, 3:169, **2008**.
- [168] Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, *Chemical reviews*, 108:2064-110, **2008**.
- [169] Sahin F, Turan E, Tümtürk H, Demirel G., Core-shell magnetic nanoparticles: a comparative study based on silica and polydopamine coating for magnetic bio-separation platforms, *Analyst*, 137:5654-8, **2012**.

- [170] Deng Y, Cai Y, Sun Z, Liu J, Liu C, Wei J, Multifunctional mesoporous composite microspheres with well-designed nanostructure: a highly integrated catalyst system, *Journal of the American Chemical Society*, 132:8466-73, **2010**.
- [171] Niidome T, Nakashima K, Takahashi H, Niidome Y, Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells, *Chemical Communications*, 1978-9, **2004**.
- [172] Williams DB, Carter CB, The Transmission Electron Microscope: *Springer*, **1996**.
- [173] Schmitt J, Flemming H-C, FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41:1-11, **1998**.
- [174] Cosgrove T., Colloid science: principles, methods and applications: *John Wiley & Sons*, **2010**.
- [175] GÜLEŞ Ö, EREN Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78, **2008**.
- [176] Ma M, Zhang Y, Yu W, Shen H-y, Zhang H-q, Gu N, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 212:219-26, **2003**.
- [177] Deng Y, Qi D, Deng C, Zhang X, Zhao D, Superparamagnetic high-magnetization microspheres with an Fe₃O₄@ SiO₂ core and perpendicularly aligned mesoporous SiO₂ shell for removal of microcystins, *Journal of the American Chemical Society*, 130:28-9, **2008**.
- [178] Yang WJ, Lee JH, Hong SC, Lee J, Lee J, Han D-W, Difference between toxicities of iron oxide magnetic nanoparticles with various surface-functional groups against human normal fibroblasts and fibrosarcoma cells, *Materials*, 6:4689-706, **2013**.
- [179] Je J-Y, Cho Y-S, Kim S-K, Characterization of (aminoethyl) chitin/DNA nanoparticle for gene delivery, *Biomacromolecules*, 7:3448-51, **2006**.
- [180] Cui J, Cui H, Wang Y, Sun C, Li K, Ren H., Application of PEI-modified magnetic nanoparticles as gene transfer vector for the genetic modification of animals, *Advances in Materials Science and Engineering*, **2012**.
- [181] Osaka T, Nakanishi T, Shanmugam S, Takahama S, Zhang H., Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71:325-30, **2009**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Duygu Deniz Usta
Doğum Yeri : Şanlıurfa
Medeni Hali : Bekar
E-posta : duygu.deniz@hacettepe.edu.tr
Adresi : Ümitkent Sitesi A:8 Blok, No:8, Ümitköy/ANKARA

Eğitim

Lisans : 2006- 2011 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2011-2014 Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik
A.B.D.
2013- Halen Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik
A.B.D.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İyi), Almanca (Başlangıç)

İş Deneyimi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma
Görevlisi (2013- Halen)

Deneyim Alanları

Nanobiyomalzemeler, Nanopartikül Üretimi ve Karakterizasyonu, Hücre Kültürü
Uygulamaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tümör Hücre Hatlarına Plazmid DNA ve Antisense Oligonükleotid Aktarımı ve Görüntüleme İçin Akıllı İnorganik Nanopartikül Tasarım ve Üretimi

Bütçe: 310.103 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu İle Katıldığı Toplantılar

1- A.N. Dizaji, D.D. Usta, M. Yılmaz, T. Kutsal, M. Turk, E. Piskin. Magnetite-gold core/shell nanoparticles for delivery and imaging of plasmid DNA. *TERMIS–EU 2013*, Istanbul, Turkey, p.413, 2013.

2- D. D. Usta, M. Türk and E. Pişkin. Gold Coated Magnetite Nanoparticles Mediated p53-GFP Transfection in Colon Cancer Cells. ‘‘20th International Symposium on Biomedical Science and Technology ‘‘- *BIOMED 2014*, Koycegiz-Mugla, Turkey, 2014.