



T.C
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN PANKREAS KANSER
HÜCRE HATTINA ÖZGÜ DNA NANOPARÇACIKLARI İLE
MODİFİKASYONU YOLUYLA HÜCREYE
HEDEFLENDİRİLMESİ**

GİZEM KEÇELOĞLU

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. SULTAN SİBEL ERDEM

EŞ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi MEHMET HİKMET ÜÇİŞİK

İSTANBUL - 2020

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi

Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya

Tez Sahibi : Gizem KEÇELOĞLU

Tez Başlığı : Manyetik Nanoparçacıkların Pankreas Kanseri Hücre Hattına
Özgü DNA Nanoparçacıkları ile Modifikasyonu Yoluyla
Hücreye Hedeflendirilmesi

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Kampüsü

Sınav Tarihi : 25/12/2020

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Sultan Sibel ERDEM

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Elif Damla ARISAN

Gebze Teknik Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Gizem KEÇELOĞLU

TEŞEKKÜR

Öncelikle, yüksek lisans hayatım ve tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesini esirgmeden sunan, istediğim her zaman ulaşabildiğim ve her konuda danışabileceğim gerçek anlamıyla bir danışman olan Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM'e ve gerek bu tez çalışması kapsamında, gerekse yüksek lisans öğrenimim boyunca büyük bir özveri ile bana yol gösteren, kendisine ne zaman danışmak istesem bana zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen, çok saygı duyduğum ve ilerideki bilimsel hayatım boyunca kendime örnek alacağım değerli eş danışman hocam Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK'a en içten teşekkürlerimi sunmak ve minnetimi dile getirmek istiyorum. Saygıdeğer jüri üyelerimize (Prof. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI ve Prof. Dr. Elif Damla ARISAN) vermiş oldukları katkı ve destekten ötürü teşekkür ediyorum.

Manyetik nanoparçacık konusunda verdikleri destek için Dr. Cem Levent Altan ve ekibine, projemi ve tez çalışmamı tamamlarken başta SEM cihazı olmak üzere pek çok konuda büyük katkı sağlayan Sadık Bay'a, ZetaSizer kullanımı için bana vakit ayırdıkları ve vermiş oldukları destekten ötürü Zeynep İşlek ve Elif Lidya Şanverdi'ye, ne zaman ihtiyacım olsa teknik destek ve tavsiyelerini esirgemeyen Ezgi Karaca ve Erhan Demirel'e, çalışmam boyunca bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, her ihtiyacım olduğunda moral ve destek veren kıymetli arkadaşlarım Nihan Verimli ve Ayşegül Demiral'a, deney aralarımın ve tez yazım sürecimin çok güzel geçmesini sağlayan Hanife Pekel, Betül Kaymaz ve Cemran Toydemir'e,

Tezimi yazarken başından sonuna kadar verdikleri sınırsız destek ve gösterdikleri büyük sabır için çok sevdiğim arkadaşlarım Zeynep Begüm Durdu ve Harbiye Hacıbektaşoğlu'na, ortaokul, lise, üniversite ve yüksek lisans hayatım boyunca bana her konuda destek olan, beraber ağlayıp gülebildiğim dostlarım Hüseyin Enes Derya ve Gülsüm Yıldırım'a, yüzyüze yılda bir kereden bile daha az görüştüğüm halde akademik hayatımda desteklerini her zaman hissettiğim çok sevgili ortaokul ve lise arkadaşlarım Seray Şenay Çörekçi, Efsane Taşçı ve Cansu Karabulut'a,

Verdikleri paha biçilmez manevi destek için lisans eğitimimin bana katmış olduğu çok değerli dostlarım Demet Açıkgöz, Zehra Eskitütüncü, Kübra Nilüfer Aka ve Buse Keskin'e,

Yaptığım işi başından sonuna kadar büyük bir heyecanla takip eden ve destekleyen sevgili kuzenim Mehmet Yaşar Serçe'ye, her konuda bana güvenen ve inanarak destekleyen, verdiğim kararlara saygı duyan, sevgisinden hiç şüphe etmeyeceğim ve onlara sahip olduğum için çok şanslı olduğumu bildiğim, başta çok kıymetli annem Zeynep Keçeloğlu olmak üzere, babam Mehmet Yaşar Keçeloğlu, ablam Gamze Keçeloğlu ve abim Kadir Keçeloğlu'na,

Sevgi, saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gizem Keçeloğlu

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
SEMBOLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1 ÖZET.....	1
1 ABSTRACT.....	2
2 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
3 GENEL BİLGİLER	8
3.1 Kanser.....	8
3.1.1 Pankreas kanseri epidemiyolojisi.....	8
3.2 İlaç Taşıma Sistemleri	11
3.3 İlaç Taşıma Sistemlerinin Hedefli Gönderimi.....	17
3.4 Kanserde Nükleik Asit Bazlı Terapiler	23
3.4.1 RNA bazlı terapiler	24
3.4.2 DNA bazlı terapiler.....	28
3.4.3 DNA origami.....	33
3.4.4 DNA nanoparçacık.....	34
3.5 Manyetik Nanoparçacık	39
4 METOT VE MATERYAL	42

4.1	Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	42
4.2	DNA Nanoparçacığın (DeNAo) Hazırlanması.....	45
4.2.1	Birinci aşama: C39 DNA sekansının halkasal hale getirilmesi	46
4.2.2	İkinci aşama: DeNAo'nun sentezlenmesi	48
4.3	Saflaştırma.....	49
4.4	Karakterizasyon	51
4.4.1	DeNAo'nun nükleotit miktar tayini: NanoDrop	51
4.4.2	RCA ürün miktar ve verim hesabı: Oligreen DNA boyası	51
4.4.3	Molekül ağırlığı tespiti: Agaroz jel	52
4.4.4	Büyükük ve morfoloji analizi: SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)....	53
4.4.5	Dispersite Analizi: Konfokal mikroskobu	54
4.4.6	Büyükük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer.....	54
4.5	DeNAo'nun Konjugasyonu	55
4.5.1	DeNAo'nun floresan işaretli bağlayıcı sekans ile konjugasyonu: DeNAo/FAM	55
4.5.2	MagNP'lerin DeNAo'ya floresan işaretli bağlayıcı sekans ile konjugasyonu: MagNP/FAM	56
4.5.3	MagNP/FAM karakterizasyonu	58
4.5.4	DeNAo'nun MagNP ile FAM bağlı komplementar ara sekans yardımıyla konjugasyonu: DeNAo-MagNP/FAM	60
4.5.5	DeNAo-MagNP/FAM karakterizasyonu	61
4.6	Hücre Kültürü Deneyleri	62
4.6.1	Hücre canlılığı analizi	63
4.6.2	Hücre seçiciliği.....	65
5	BULGULAR.....	67

5.1	DeNAAno'yu Oluşturacak C39 Sekansının Halkasal Hale Getirilmesi	67
5.2	Halkasal Kalıp DNA Kullanılarak DeNAAno Üretimi.....	67
5.3	DNA Nanoparçacığının (DeNAAno) Saflaştırılması.....	69
5.4	DNA Nanoparçacığının (DeNAAno) Karakterizasyonu.....	69
5.4.1	Miktar tayini: Nanodrop.....	70
5.4.2	Miktar ve verim hesabı: Oligreen	71
5.4.3	Molekül ağırlığı tespiti: Agaroz jel elektroforezi.....	72
5.4.4	Büyüklik ve morfoloji analizi: SEM	74
5.4.5	Dispersite analizi: Konfokal mikroskopu.....	76
5.4.6	Büyüklik ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer.....	77
5.5	DeNAAno'nun Konjugasyonu	78
5.5.1	DeNAAno'nun FAM bağlı komplementar bağlayıcı sekans ile konjugasyonu: DeNAAno/FAM	78
5.5.2	MagNP'lerin DeNAAno'ya komplementer bağlayıcı sekans ile konjugasyonu: MagNP/FAM veya MagNP/BS	79
5.5.3	DeNAAno'nun MagNP ile komplementer bağlayıcı sekans yardımıyla konjugasyonu: DeNAAno-MagNP/FAM	84
5.6	Hücre Canlılığı Analizi	90
5.6.1	Yalın demir oksit parçacıkları ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının MTT canlılık testi	90
5.6.2	PAA kaplı MagNP'ler ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının MTT canlılık testi.....	92
5.6.3	DeNAAno-MagNP/FAM ve MagNP/BS ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının MTT canlılık testi	98
5.7	Hücre Seçiciliği	100

5.7.1 DeNA _{no} /FAM ve DeNA _{no} -MagNP/FAM konjugatlarının Panc02 hücrelerine seçiciliği	101
6 TARTIŞMA VE SONUÇ	104
KAYNAKLAR	119
ÖZGEÇMİŞ	131



KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BSA	: Bovin Serum Albumin
C39	: 39. Klon Sekansı
DeNA_{no}	: DNA Nanoparçacık
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat Karışımı
dsDNA	: Çift Zincirli DNA
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EtOH	: Etanol
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FCS	: Fetal Buzağı Serumumu
MagNP	: Manyetik Nanoparçacık
Mg²⁺	: Magnezyum
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl) -2,5-difenil-tetrazolyum bromit
NEB	: New England Biolabs
NF	: Nanoçiçek (Nanoflower)
NFW	: Nükleaz İçermeyen Su (Nuclease Free Water)
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PI	: Propidyum İyodür
PK	: Pankreas Kanseri
RCA	: Yuvarlanan Halka Çoğalması (Rolling Circle Amplification)
RNA	: Ribonükleik Asit
ssDNA	: Tek Zincirli DNA
TE	: Tris-HCl ve EDTA Tampon
Tris	: Tris-HCl (Tris Hidroklorik Asit)

SEMBOLLER LİSTESİ

%	: Yüzde
bp	: Baz çifti
cm²	: Santimetre kare
dk	: Dakika
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mV	: Milivolt
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nt	: Nükleotit
°C	: Santigrat derece
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
U	: Birim ünite
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.1. Moleküler tekniklerde kullanılan cihazlar	42
Tablo 4.1.2. Moleküler tekniklerde ve hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler	42
Tablo 4.1.3. Moleküler tekniklerde kullanılan tampon çözeltiler	43
Tablo 4.1.4. Hücre kültürü için kullanılan sarf malzemeler	43
Tablo 4.1.5. DeNAo üretimi için kullanılan oligonükleotitler	44
Tablo 4.2.1 RCA sentez metodunun birinci aşamasında DNA sekansının halkasal hale getirilmesi için kullanılan bileşenlerin miktarı, başlangıç ve son konsantrasyonları.....	47
Tablo 4.2.2. RCA sentez metodunun ikinci aşamasında DeNAo'nun sentezlenmesi için kullanılan bileşenlerin miktarı, başlangıç ve son konsantrasyonları.....	48
Tablo 4.4.1. Oligreen DNA boyası ile miktar tayini için gerekli bileşenlerin konsantrasyon ve miktarı	52
Tablo 4.5.1. MagNP/FAM konjugasyonu için gerekli bileşenlerin eklenme miktarları..	57
Tablo 4.5.2. MagNP/FAM konjugatının floresan spektroskopisi için kullanılan örneklerin miktar ve konsantrasyon değerleri	59
Tablo 5.4.1. Halkasal DNA ve RCA ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen Nanodrop sonuçları	70
Tablo 5.4.2. Oligreen ile işaretlenen DeNAo'nun miktar ve verim hesabı.....	72
Tablo 5.5.1. MagNP/FAM konjugatının spektroskopisi için kullanılan komponentlerin miktarı	80
Tablo 5.5.2. Distile su ile diyaliz edilen DeNAo parçacıklarının ortalama büyüklük, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	89
Tablo 5.5.3. Tris-Mg ²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNAo parçacıklarının ortalama büyüklük, PDI ve zeta potansiyel değerleri	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1.1. Adenokarsinoma ve nöroendokrin tümörlerin şekil üzerinde gösterimi	10
Şekil 3.2.1. Günümüzde kullanılan çeşitli organik ve inorganik (viral olmayan) nanotaşıyıcıların şematize edilmesi.....	14
Şekil 3.2.2. Modifiye edilen MSN'lerin EPR etkisiyle tedavi sürecinin şematik gösterimi	16
Şekil 3.3.1. Aktif ve Pasif Hedeflemenin şematik olarak gösterimi	18
Şekil 3.4.1. DNA üzerinde bulunan ekzon ve intronların transkripsiyon sürecinden geçerek, kodlanan (mRNA) ve kodlanmayan (ncRNA) RNA'ları üretim süreci	26
Şekil 3.4.2. siRNA kullanılarak gen susturma yönteminin şematize edilmesi	27
Şekil 3.4.3. DNA bazlı terapötiklerin hücre içerisindeki akıbetinin şematize edilmesi ..	31
Şekil 3.4.4. DeNANO'nun seçim sürecinin şematize edilmesi.....	38
Şekil 3.5.1. Manyetik nanoparçacıkların manyetik özelliğini belirleyen Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları arasında elektron geçişi.....	40
Şekil 4.2.1. DeNANO nanoparçacığının sentezlenme aşamalarının şematize edilmesi....	45
Şekil 4.2.2 Kalıp olarak kullanılacak sekansın yarı komplementer ara sekans yardımıyla halkasal hale getirilmesi.....	47
Şekil 4.5.1. DeNANO ve floresan işaretli bağlayıcı sekans konjugasyonunun şematize edilmesi	56
Şekil 4.5.2. MagNP ile BS veya floresan işaretli bağlayıcı sekansın EDC/NHS yöntemi kullanılarak konjugasyonunun şematik gösterimi.....	57
Şekil 4.5.3. DeNANO ve MagNP'nin, DeNANO'ya komplementer bağlayıcı ara sekans yardımı ile konjugasyonu	60
Şekil 5.1.1. Halkasal kalıp DNA üretiminin şematize edilmesi.....	67
Şekil 5.2.1. Halkasal kalıp DNA üzerinden RCA yöntemiyle sentezlenen DeNANO'nun şematize edilmesi	68
Şekil 5.4.1. RCA ürünlerinin agaroz jel üzerinde gösterimi	73
Şekil 5.4.2. Halkasal kalıp DNA ve bileşenlerinin agaroz jel üzerinde gösterimi.....	73
Şekil 5.4.3. Isı uygulaması öncesinde, çok sayıda DeNANO'nun bir araya gelerek oluşturduğu büyük yapılar.....	74

Şekil 5.4.4. Isı uygulaması sonrası farklı üretim sürelerine göre DeNA _{no} 'lar.....	75
Şekil 5.4.5. Hoechst DNA boyası ile işaretlenen DeNA _{no} ve kontrol olarak kullanılan distile su ile Hoechst DNA boyasının konfokal görüntüsü.....	76
Şekil 5.4.6. Farklı sürelerde üretilen DeNA _{no} 'ların büyüklük dağılım grafiği	77
Şekil 5.4.7. Farklı sürelerde üretilen DeNA _{no} 'ların zeta potansiyel dağılım grafiği	77
Şekil 5.5.1. DeNA _{no} /FAM konjugatının konfokal mikroskopta görüntülenmesi.....	79
Şekil 5.5.2. DeNA _{no} /FAM konjugatlarının zeta potansiyel dağılım grafikleri.....	79
Şekil 5.5.3. Değişen konsantrasyonlarda MagNP, floresan işaretli bağlayıcı sekans ve MagNP/FAM konjugatlarının floresan spektroskopisi.....	81
Şekil 5.5.4. MagNP nanoparçacığının ve MagNP/FAM konjugatının konfokal mikroskobu görüntüsü.....	82
Şekil 5.5.5. MagNP/FAM konjugatının SEM mikroskobunda görüntülenmesi.....	83
Şekil 5.5.6. MagNP ve MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve zeta potansiyel dağılım grafikleri.....	83
Şekil 5.5.7. DeNA _{no} -MagNP/FAM konjugatının 10X ve 20X konfokal mikroskobu görüntüsü.....	84
Şekil 5.5.8. DeNA _{no} ve konjugasyonlarının SEM görüntüleri	85
Şekil 5.5.9. Distile su ile diyaliz edilen DeNA _{no} ve konjugatlarının büyüklük dağılım grafikleri.....	87
Şekil 5.5.10. Distile su ile diyaliz edilen DeNA _{no} ve konjugatlarının zeta potansiyel dağılım grafikleri.....	87
Şekil 5.5.11. Tris-Mg ²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNA _{no} ve konjugatlarının büyüklük dağılım grafikleri.....	88
Şekil 5.5.12. Tris-Mg ²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNA _{no} ve konjugatlarının zeta potansiyel dağılım grafikleri.....	88
Şekil 5.6.1. Panc02 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan yalın demir oksit parçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	91
Şekil 5.6.2. Panc1 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan yalın demir oksit parçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	91

Şekil 5.6.3. Panc02 hücre hattına 24 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	92
Şekil 5.6.4. Panc1 hücre hattına 24 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	93
Şekil 5.6.5. Panc02 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	94
Şekil 5.6.6. Panc1 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	95
Şekil 5.6.7. Panc02 hücre hattına 72 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	96
Şekil 5.6.8. Panc1 hücre hattına 72 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	97
Şekil 5.6.9. Panc02 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan DeNAo-MagNP/BS ve MagNP/BS konjugatlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	99
Şekil 5.6.10. Panc1 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan DeNAo-MagNP/BS ve MagNP/BS konjugatlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi	99
Şekil 5.7.1. Kontrol (sadece Hoechst uygulanan hücreler), DeNAo/FAM konjugatı ve DeNAo-MagNP/FAM konjugatı grubunun uygulandığı Panc02 ve Panc1 hücrelerinin konfokal mikroskobunda 10X objektif ile elde edilen fotoğraf görüntüleri	101
Şekil 5.7.2. Kontrol (sadece Hoechst uygulanan hücreler), DeNAo/FAM konjugatı ve DeNAo-MagNP/FAM konjugatı grubunun uygulandığı Panc02 ve Panc1 hücrelerinin konfokal mikroskobunda 20X objektif ile elde edilen fotoğraf görüntüleri	103

1 ÖZET

MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN PANKREAS KANSER HÜCRE HATTINA ÖZGÜ DNA NANOPARÇACIKLARI İLE MODİFİKASYONU YOLUYLA HÜCREYE HEDEFLENDİRİLMESİ

Kanser türüne özel geliştirilmeye çalışılan kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları, aptamer, ligand ve antikor gibi ajanların afiniteye bağlı olarak aktif hedeflemede kullanılmasını içerir. Bu yaklaşım, spesifik bir hücre biyobelirtecine yönelik molekül-molekül etkileşimini içermekte, tedavideki başarı da ilacı kanser hücrelerine yönlendirebilme yeterliliğine bağlı olarak sınırlı kalmaktadır. Alternatif bir hedefleme yöntemi olarak çalışmamız, birden fazla etkileşim ile hücre hedefleme yetisine sahip DNA nanoparçacığının manyetik nanoparçacık ile birleştirilerek kanserli hücrelere hedeflendirilmesini konu alır. Çalışmanın amacı, hipertermide kullanılmak üzere manyetik nanoparçacıkların DNA nanoparçacık sistemi ile konjuge edilerek Panc02 pankreas kanser hücre hattına hedeflendirilmesidir. Bu amaçla, öncelikle Panc02 mürin pankreas kanseri hücre hattına özgü DNA nanoparçacık yuvarlanan halka çoğaltması (RCA) yöntemiyle sentezlenmiştir. DNA nanoparçacığının sekansına komplementer bir bağlayıcı sekans, amit bağı oluşumuyla manyetik demir oksit nanoparçacıklarının yüzeyine bağlanmıştır. Bağlayıcı sekans manyetik nanoparçacığının, DNA nanoparçacık ile konjugasyonunu mümkün kılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda DNA nanoparçacığının morfolojisinde (büyüklük ve yapısal) değişiklikler olmasına rağmen Panc02 hücre hattına seçici olarak bağlanma özelliğini koruduğu kontrollü hücre kültürü çalışmaları neticesinde belirlenmiştir. Elde edilen veriler, DNA nanoparçacığının antikor, aptamer ve ligandlara alternatif olarak manyetik nanoparçacık başta olmak üzere birçok farklı ilaç taşıma sistemini hücrelere hedeflemede kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca kendi başına taşıma sistemi olarak kullanıldığında DNA nanoparçacığının çeşitli terapi ajanlarını istenilen hücreye taşıyarak klasik tedavi yöntemlerine seçicilik kazandırabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: DNA Nanoparçacık, Manyetik Nanoparçacık, DeNAno, Hedefli İlaç Taşıma Sistemleri, Yuvarlanan Halka Çoğaltması

*Bu araştırma TÜBİTAK 2515 – Bilim ve Teknolojide Avrupa İş birliği – COST Programı tarafından 216Z004 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

2 ABSTRACT

TARGETING OF MAGNETIC NANOPARTICLES TO THE CELL BY MODIFICATION OF PANCREATIC CANCER CELL LINE SPESIFIC DNA NANOPARTICLES

One of the major obstacles to the success of cancer therapy is the fact that the therapeutic agents affect healthy cells almost equally as cancerous cells. Enabling the targeting of the cancerous tissue, personalized medicine applications are being developed for cancer types by the use of agents such as aptamers, ligand and antibodies where targeting base on single molecule-molecule interactions, or as named affinity. As a novel approach, our study focuses on cellular recognition and targeting by means of DNA nanoparticle, or so-named DeNAno, composed of repeatitive nucleotide sequences. Accordingly, DeNAno's achieve cell recognition through avidity rather than affinity, in other words through establishment of multiple interactions with the cell membrane. The aim of the studies to use the DNA nanoparticular system for targeting the magnetic nanoparticles to Panc02 murine pancreatic cancer cell line further to allow hyperthermia application selectively on cancer cells. For this purpose, DeNAno was synthesized by nanoparticle Rolling Circle Amplification (RCA) method from a nucleotide sequence that is specific to Panc02. To achieve conjugation of the magnetic nanoparticle with DeNAno, linker sequences that are complementary to the nucleotide sequence of DeNAno are attached to the surface of magnetic iron oxide nanoparticles by amide bonds. Characterization analysis confirmed the conjugation of DeNAno with magnetic nanoparticles through the complementray sequence. Cell culture studies proved that selectivity of DeNAno for Panc02 cells was preserved also after conjugation. The results suggest not only that DeNAno's to successfully target magnetic nanoparticles to Panc02 cells, but also highlight their potential to contribute the classical chemotherapy approaches as a targeted drug delivery system.

Keywords: DNA Nanoparticle, Magnetic Nanoparticle, DeNAno, Targeted Drug Delivery Systems, Rolling Circle Amplification

*This study was supported by TÜBİTAK 2515 – European Cooperation in Science and Technology – COST program under project number 216Z004.

3 GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, bir organizmanın sahip olduğu hücrelerdeki kontrolsüz çoğalma ve mutasyonlu hücre birikmesi olarak tanımlanabilen bir hastalıktır. Çevresel koşulların ve genetik mutasyonların etkisi altında meydana gelen kanserleşme, tek organı etkileyebileceği gibi anjiyogenez (damarlaşma) yoluyla diğer organlara da yayılabilmektedir. Kanserın kesin bir tedavisi olmamakla beraber, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi uygulamalar gibi bazı standart tedaviler belirlenmiştir. Bununla birlikte kanserin hangi organda olduğuna veya tipine (metastaz yapabilen agresif tip veya metastaz yapmayan tip gibi) bağlı olarak farklı yaklaşımlar uygulanmaktadır. Kişiyeye özel gen tedavisi, immünoterapi ve hormon terapisi bu yaklaşımlardan bazılarıdır. Bu uygulamaların dışında kemoterapide kullanılan kimyasal ajanların (kemoterapötikler) hedefli gönderimiyle ilgili çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Çünkü kemoterapötik tedavileri sırasında kullanılan kimyasal ajanların seçici olmaması sebebiyle sağlıklı hücrelerin de olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir. Bunun sonucu olarak hastalığın verdiği psikolojik ve fiziksel hasar ile mücadele eden hastanın yaşam kalitesi daha fazla düşmektedir. İlaç taşıma sistemleri kemoterapide yaşanan bu sorunların kısmen önüne geçebilmektedir.

İlaç taşıyıcı sistemler genel olarak, çeşitli organik veya inorganik nanoparçacıklar, viral sistemler ve rekombinant proteinlerden oluşmaktadır. Bu sistemler kullanılarak birçok başarı elde edilmesine karşın bazı dezavantajları nedeniyle tedavideki istenilen yerini alabilmesi için daha çok çalışma yapılması gerekmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin bağışıklık sistemi tarafından temizlenerek vücuttan atılmaları, toksik etkileri ve hedeflenen yere yeterli dozda ilacın salınmaması gibi dezavantajları nedeniyle, akıllı ilaç taşıma sistemlerine ihtiyaç duyulmuştur.

Akıllı ilaç taşıma sistemlerinde pasif hedefleme ve aktif hedefleme olmak üzere iki farklı uygulama kullanılmaktadır. Tümörlü dokular arası damar geçirgenliğinden faydalanılarak ilaç iletiminin yapıldığı pasif hedefleme bazı tümör türleriyle sınırlı olduğundan aktif hedefleme sistemine ihtiyaç duyulmuştur. Aktif hedefleme sistemi

antikor-antijen afinitesinde olduğu gibi moleküller arası etkileşime dayanmaktadır. Kullanılan organik veya inorganik nanotaşıyıcıları aktif hedefleme için modifiye etmek mümkündür. İnorganik nanoparçacıklar, fizyolojik koşullar altında termal, kimyasal ve mekanik stabilite ve iyi biyouyumlulukları açısından organik olanlara kıyasla önemli avantajlara sahiptirler. Nanotaşıyıcılara kazandırılan aktif hedefleme yeteneği yüzey kaplamaları ile mümkün olmaktadır. Antikorlar, proteinler, peptitler, aptamerler, karbonhidratlar ve küçük moleküller aktif hedefleme için kullanılan çeşitli ligandlar arasında yer almaktadır. Bu ligandları yüzeyinde bulunduran nanoparçacıklar hedeflerine yüksek afinite ile bağlanmaktadır.

Aptamerler, çeşitli biçimlere katlanabilen kısa DNA veya RNA oligonükleotitleridir. Kısa olmaları ve tümör hücrelerine kolayca nüfuz etmeleri onları hedefleme sisteminde potansiyel bir ligand haline getirmektedir (1). Bununla birlikte, rastgele nükleotit kütüphanelerinden doğru oligonükleotitlerin seçilmesi oldukça zordur. Aptamer sekanslarına bir alternatif olarak kullanılan DNA nanoparçacıklar (DeNAno) ortalama 100 bp'den oluşan nükleotit dizilerinden elde edilmektedirler. Aptamerlerde olduğu gibi seçim süreçleri; rastgele bir kütüphaneden sekansın seçimi ve bir hedefle inkübasyonunu içermektedir. Daha sonra hedeflere bağlanmayan sekanslar elenerek ortamdan uzaklaştırılmakta ve kalan sekanslar tanımlanan 3' ve 5' primer alanları kullanılarak asimetrik PCR yöntemiyle zenginleştirilmektedir. DeNAno hedefi olan hücreye bağlanmak için afinite ajanları gibi hücre yüzeyinde bulunan tek bir moleküle gösterdikleri çekim kuvveti ile değil, "avidite" olarak tabir edilen birden fazla etkileşimin bir arada olduğu bir çekim kuvvetini kullanmaktadır.

DeNAno'yu sentezlemek için kullanılan "yuvarlanan halka çoğalması (Rolling Circle Amplification, RCA)" yöntemi izotermik bir polimeraz reaksiyonunu içermektedir (2,3). RCA yöntemi ile üretilen DeNAno "konkatamer" adı verilen birbirinin aynı sekansların ard arda sıralanmasıyla oluşmaktadır (4,5). İşleme tabi tutulduğu süreye bağlı olarak yüzlerce kopyaya sahip olabilen DeNAno'nun yapısındaki ssDNA'nın birbiri

üzerine katlanarak oluşturduğu üç boyutlu yapı ortam koşulları (tampon içeriği, sıcaklık, vb.) ile doğrudan ilişkilidir (5).

DeNA_no'nun nükleotit uzunluğu ve dolayısıyla yoğunluğu, RCA işlemindeki primer/dairesel kalıp konsantrasyonu ve/veya üretim süresi değiştirilerek istenen şekilde ayarlanabilmektedir (3). Daha uzun RCA sentez süreleri ve phi29 DNA polimeraz enzimi ile bağlanan yüksek nükleotit konsantrasyonları zincirin uzunluğunu ve dolayısıyla oluşan DeNA_no'nun büyüklüğünü artırmaktadır. Bir başka alternatif olarak, tek zincir nükleotit diziliminden oluşan DeNA_no'ların sarmal yapılarının büyüklüklerini dizilimin uzunluğu üzerinden kontrol edebilmek mümkündür. DeNA_no'nun en önemli özelliklerinden biri ise çok yönlü oluşudur (avidite özelliği). Tekrar edilen nükleotit zincirinin yapısal karakteristik özelliklerini – afinite gibi – beraberinde taşıyabildiği gibi, nükleotitlerin gerek dizilim içindeki diğer nükleotitler ile olan etkileşimleri gerekse tampon çözeltide bulunan iyonik özellikteki mineraller ile etkileşimleri sonucunda kendi içlerinde katlanarak üç boyutlu kendine has bir yapı oluştururlar (6). Bu üç boyutlu yapı DeNA_no parçacıklarının fizikokimyasal özelliklerini tanımlar. Ruff ve ark. (2014) gerçekleştirdiği çalışmada, C39 nükleotit diziliminin tekrarından oluşan DeNA_no nanoparçacıklarının Panc02 pankreas kanser hattına hedefli olarak bağlanabildiği tespit edilmiş (7) ve bu seçiciliğin C39 dizilimine sahip DeNA_no'nun üç boyutsal özelliğinden kaynaklandığı gösterilmiştir (8). Literatürdeki bu yayın, bizim çalışmamıza da esas teşkil etmiştir. DNA tabanlı bir sistemin bu çalışmada seçilmesi, esas olarak nükleotit baz eşleşmesinin özgünlüğü, moleküller arası etkileşimlerin öngörülebilirliği, fizikokimyasal kararlılığı ve mekanik değişmezliği (rigidity) nedeniyle olmuştur. Ek olarak, DNA moleküllerinin, DNA polimeraz, ligaz ve endonükleazlar dahil olmak üzere çok çeşitli enzimler tarafından manipüle ve modifiye edilebilir olması onları ilaç taşıma sistemleri için kullanışlı hale getirebilmektedir (5).

Teze konu olan çalışmamızda kanser hücrelerine hedefli, seçici bir nanotaşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca uygun olarak, büyüklüğünün hassas bir şekilde kontrol edilebilmesi, fizikokimyasal olarak kararlı bir yapıya sahip olması ve düşük sitotoksitesi nedeniyle DNA tabanlı bir oligonükleotit kullanılması tercih edilmiştir. Hipertermi uygulamalarında kullanılmak üzere bu oligonükleotidin manyetik nanoparçacıklar ile konjuge edilmesi planlanmıştır. Nanotaşıyıcı sistemi oluşturmak için Panc02 mürin pankreas kanseri hücre hattına bağlandığı bilinen DeNAno nanoparçacığını oluşturan oligonükleotit C39 sekansı, DeNAno'nun sentezlendiği ve 100 bp uzunluğunda tek iplikli olan oligonükleotit ise C39 komplementer sekansı olarak isimlendirilmiştir (8). C39 komplementer oligonükleotit sekansı DeNAno'yu oluşturmak için halkasal hale getirilmiştir. Seçilen C39 sekansı, RCA yöntemiyle DeNAno haline getirilmiştir. Böylece Panc02 hücresine spesifik bir DeNAno elde edilmiş ve manyetik demir oksit nanoparçacıkları (MagNP) ile birleştirilmiştir. Çalışmalarımızın sonucu DeNAno'nun hücre seçiciliğinin yüzeyine bağlanan inorganik nanoparçacıkla (MagNP) değişmediğini göstermiştir.

Literatürde DeNAno benzeri yapıların siRNA gibi gen susturucu özellikteki RNA sekansları ile birleştirilerek, tedavi amaçlı (kanser, yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), Huntington hastalığı gibi) kullanımına yönelik çalışmalar mevcuttur (9). Ayrıca DNA nanoparçacıkları için hücre içine alınmasını irdeleyen çalışmalar da yapılmıştır (10). Bu çalışmalarda RCA yöntemiyle üretilen DNA nanoparçacıklarının pozitif yüklü gruplarla birleştirilerek hücre içi alımının artırılacağı gösterilmiştir. Amino grupları ile modifiye edilmiş nükleotitlerle elde edilen DNA nanoparçacıkların hücre alımı yüksekken, karboksilik asit grupları ile modifiye edilmiş DNA nanoparçacıklarda hücre alımı daha az olduğu tespit edilmiştir (10). Bu tez çalışmasında ise hazırlanan DNA nanoparçacığının hücre alımı değil, hücreye yönlendirilmesi amacıyla kullanımı planlanmıştır. Literatürde yapılan çalışmaların tümünde DNA nanoparçacığının sitotoksite göstermediği ve dolayısıyla biyoyumlu kabul edildiği vurgulanmıştır (1,4,11). Yine aynı şekilde biyoyumluluğunu kanıtlamak için DNase I ile muamele edilen nanoparçacıkların yüksek oranda yapısını koruyarak DNase enzimi tarafından

kesilmediği gösterilmiştir (10). RCA yöntemiyle hazırlanan DNA nanoparçacık dışında, nükleik asit tabanlı nanoparçacık sistemlerinin geliştirilmesiyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (12–17).

Bu çalışma ile hücre hedefleme özelliği olduğu bilinen DeNAno nanoparçacıkları ilk kez MagNP'lar ile konjuge edilerek; hipertermi uygulamaları için antikor, ligand ve aptamer uygulamalarına alternatif olmaktadır. Manyetik nanoparçacık ile modifiye edilen DeNAno, hipertermi uygulamalarının hedefe spesifik uygulanabilirliği açısından avantaj sağlamaktadır. Ayrıca DeNAno sayesinde hedef hücreye direkt olarak yönelecek olan tedavi sistemleri (DeNAno ve manyetik nanoparçacık konjugasyonu gibi) ile kombine tedavi uygulayacak ajanların taşınmasının da mümkün hale geldiğini göstermektedir. İstenilen büyüklükte üretilen DeNAno'nun nanotaşıyıcı sistem olarak kullanılacağı pek çok çalışma ilaç taşıyıcı sistemlerin geleceği için umut vaad etmektedir.

Çalışmamızda elde edilen veriler, RCA yöntemi ile sentezlenen DeNAno nanoparçacıklarının entegre nanoparçacık sistemleri ile hücre hedeflemede kullanılabilirliğini gösterecek ve klinikte kullanılabilirliğine ışık tutacaktır. Yapısı itibarıyla konjuge edildiği her sistemi (protein, küçük moleküllü ilaç, siRNA gibi) hedefli olarak taşıma yeteneğine sahip DeNAno nanoparçacığının klinikte kullanımı hedefli ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır. İleride üzerine entegre edilecek çeşitli terapi ajanlarını yalnızca istenilen hücreye (örneğin kanserli hücreye) taşıyarak klasik tedavi yöntemlerine seçicilik kazandırabilecektir.

4 GENEL BİLGİLER

4.1 Kanser

Dünya çapında ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada olan ve giderek daha da yaygın bir hastalık haline gelen kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization, WHO) verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde 18 milyondan fazla yeni kanser vakası tespit edilmiştir. 9,6 milyon kişinin de kanser sebebiyle öldüğü bildirilmiştir (18). Nedeni hala tam olarak bilinmemekle birlikte çevresel koşullardan (tütün ürünlerinin kullanımı, çeşitli kimyasallara maruz kalınması, obezite, uzun süreli diyabet vb.) ve/veya çevresel olmayan koşullardan (genetik mutasyonlar, bağışıklık sistemi sorunları gibi) kaynaklandığı bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur.

En sık kullanılan tedavi yöntemleri; cerrahi uygulamalar, kemoterapi ve radyoterapidir (19). İmmünoterapi, hedefe yönelik terapi ve hormon terapisi gibi seçenekler de umut verici yeni tedaviler arasında yer almaktadır (20). Ayrıca tüm dünyada çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Kullanılacak tedavi yöntemi kanserin türüne ve ilerlemişlik düzeyine bağlıdır. Yan etkilerinin getirdiği sonuçlar çok ağır olsa da hastaların çoğu; kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi uygulamaların bir kombinasyonu ile tedavi edilmektedir (21).

4.1.1 Pankreas kanseri epidemiyolojisi

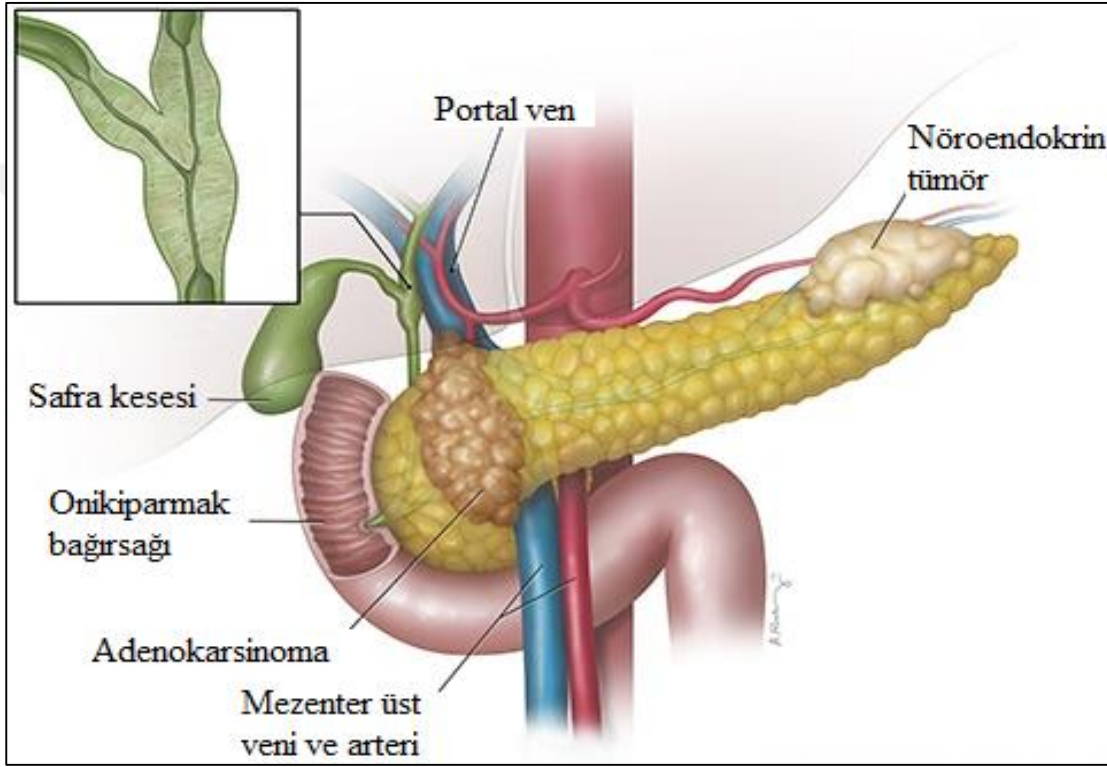
Pankreas, uzunluğu 15-18 cm olan, karın duvarında midenin arka bölümüne uzanan bir salgı bezidir (22). Hem endokrin hem de ekzoksin özelliği olan pankreas, kana insülin ve glukogan salgılar. Bu sayede şekerin dengede tutulmasını sağlar ve sindirime yardımcı olur (23).

Pankreatik kanserlerin %65'i pankreasın baş kısmında bulunmasına rağmen lenf nodlarına çok hızlı bir şekilde metastaz yapabilmektedir (24). Bu nedenle pankreas kanseri, en agresif kanser türlerinden biridir. Her yıl yaklaşık yarım milyon insan pankreas kanserine yakalanmaktadır (25). Batı dünyasında kansere bağlı ölümlerin dördüncü sırasında pankreas kanseri bulunmaktadır. 2030 yılına kadar kanser sebebiyle ölümlerin ikinci sırasında olacağı tahmin edilmektedir. (26). Pankreas kanseri Avrupa, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'nın birçok bölgesinde yılda 10.000 de 1 insidansa sahiptir (22). Pankreas kanserinden erkekler, kadınlara 1:1,5 oranla daha sık etkilenmektedir (27). Aynı şekilde siyah ırka sahip insanlar da beyaz ırka sahip olan insanlardan daha fazla etkilenmektedir (27). İnsidansın en yüksek olduğu yaş aralığı ülkeler arasında değişmektedir. Örneğin, Hindistan'da en sık ortalama 60 yaşındaki insanlarda görülürken, Amerika Birleşik Devletleri'nde bu yaş ortalaması 70 olarak tespit edilmiştir (28). Kısaca insidansın en yüksek olduğu yaş 60 ila 80 arasında değişmekle beraber, 45 yaşın altındaki insanlarda nadiren rastlanmaktadır (29).

Tanı aşamasında pankreas tümörlerinin sadece %15'i ameliyatla çıkarılabilir durumdadır. Hastaların beş yıllık sağkalımı ise %8 ile sınırlıdır. Pankreas kanseri prognozunu iyileştirmek için, tümör alınabilir olduğunda erken teşhis çok önemlidir. Ancak pankreas kanserine özgü erken semptomların olmaması bu durumu zorlaştırmaktadır. Örneğin, Birleşik Krallık'ta pankreas kanseri vakalarının %50'si acil serviste tanımlanmaktadır (30). Bu durum büyük ölçüde karın ağrısı ve sarılık belirtileri içeren pankreas kanseri patofizyolojisinden kaynaklanmaktadır (19). Tümörleşmenin pankreas ile sınırlı kaldığı (lokalize) hastalarda, cerrahi rezeksiyon küratif amaçlı tedavinin merkezinde kalır ancak tek başına cerrahi uygulamanın da yüksek nüks oranları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (21).

Akut pankreatit, yaklaşık %1'inin pankreas kanserine bağlı olması nedeniyle erken bir pankreas kanseri semptomu sayılmaktadır (31). Akut pankreatitin pankreas kanseri prognozu üzerindeki prognostik değeri belirsizken (26), kronik pankreatitte pankreas kanseri riskinin arttığı bilinmektedir (31–33).

Pankreas kanseri esas olarak iki tiptir. Birincisi, pankreasın ekzokrin bezlerinde ortaya çıkan en yaygın (%85) vakaların olduğu pankreatik adenokarsinomdur (PDAC) (Şekil 4.1.1). İkincisi ise daha az yaygın olan (% 5'ten az) pankreatik nöroendokrin tümördür (PanNET) ve pankreasın endokrin dokusunda görülmektedir (Şekil 4.1.1) (34).



Şekil 4.1.1. Adenokarsinoma ve nöroendokrin tümörlerin şekil üzerinde gösterimi (35).

Pankreas kanseri gelişimi, aile öyküsü ve genetik bozukluklar, hormonal faktörler, bazı komorbid (eşlik eden) hastalıklar, tütün ürünleri, aşırı alkol tüketimi, obezite, kötü beslenme (yağ oranı yüksek yiyecekler) ve mesleki maruziyet dahil olmak üzere bilinen birçok risk faktörüne sahiptir. Birinci derece akrabalarda görülen pankreas kanseri öyküsü, pankreas kanseri riskini 2,5-5,3 kat arttırdığı tespit edilmiştir (36). Ayrıca ailesel atipik multipıl mol melanoma, Peutz-Jeghers sendromu ve kistik fibroz dahil olmak üzere pankreas kanseri riskini arttıran genetik hastalıklar bilinmektedir (31). İnflamatuar bağırsak hastalığı ve uzun süredir devam eden diyabetes mellitus gibi çeşitli inflamasyon durumlarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Pankreas kanserinin agresif biyolojisi, genetik karmaşıklığı, hızlı ilerlemesi ve ilişkilendirilmiş biyobelirteçlerin sınırlı ve az güvenilir olması, tedavilerin başarı oranını düşürmektedir (33,37). Pankreas kanserinin erken teşhisi için henüz onaylanmış bir biyobelirteç bulunmamaktadır (38). Bununla birlikte; enzimler (örneğin, COX-2) (39) , sitokinler (örneğin, IL6) (20), glukoproteinler (örneğin, YKL-40) (23) ve proto-onkogenler (örneğin, Ras) (32) erken teşhis ve/veya tedavi amaçlı kullanım için araştırılmıştır. Belirlenen tüm biyobelirteç adayları tedavinin yanı sıra tümörün görüntülenmesinde de kullanılabilirler. Örneğin, gama sintigrafisi ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (BT) cihazı ile pankreas kanserinin görüntülenmesinde iyot-125 radyoaktif işaretli Klaudin-4 antikoru (anti-claudin-4) kullanılmaktadır (39).

4.2 İlaç Taşıma Sistemleri

En az bir boyutu 100 nm'den küçük olan mikroskobik koloidal parçacıklar “nanoparçacık” olarak tanımlanmaktadır (40). Nanoparçacıklar, diğer maddeler için taşıma modülleri olarak kullanıldıklarında bunlara nanotaşıyıcı adı verilmektedir (41). Nanoparçacıkların hücre içine alınmasında yüzey yükleri (zeta potansiyelleri) ve büyüklükleri önemli rol oynamaktadır (42). Negatif yüklü hücrel membranlar ile pozitif yüzey yüküne sahip nanoparçacıklar arasında elektrostatik bir etkileşim gerçekleşmektedir (43). Polikasyon-DNA gen verme sistemleri çoğunlukla hücreye endositoz veya pinositoz yolu ile girmektedir. Uygun koşullar sağlanan hücreler tarafından endositoz yapılabilmesi için hücreye gönderilecek nanotaşıyıcı sistemlerin büyüklüklerinin 100 nm'den daha küçük olmaları gerekmektedir (14).

Nanoparçacık ile ilaç iletim sistemleri, hem ilaç araştırmalarında hem de klinik ortamda son yıllarda kendini kanıtlamış birçok ilacın *in vivo* verimliliğini arttırmak için kullanılmaktadır (44). Örneğin lipozom, misel, nanokapsül, polimerik nanoparçacık, katı lipit partikül, niosom ve daha birçok farmasötik nanotaşıyıcıların normal biyolojik özelliklerini istenen bir şekilde kontrol etmek mümkündür. Aynı zamanda çeşitli terapötik açıdan önemli işlevler kazandırmak için uygulanan yüzey modifikasyonları halihazırda kullanılmaktadır (57,58).

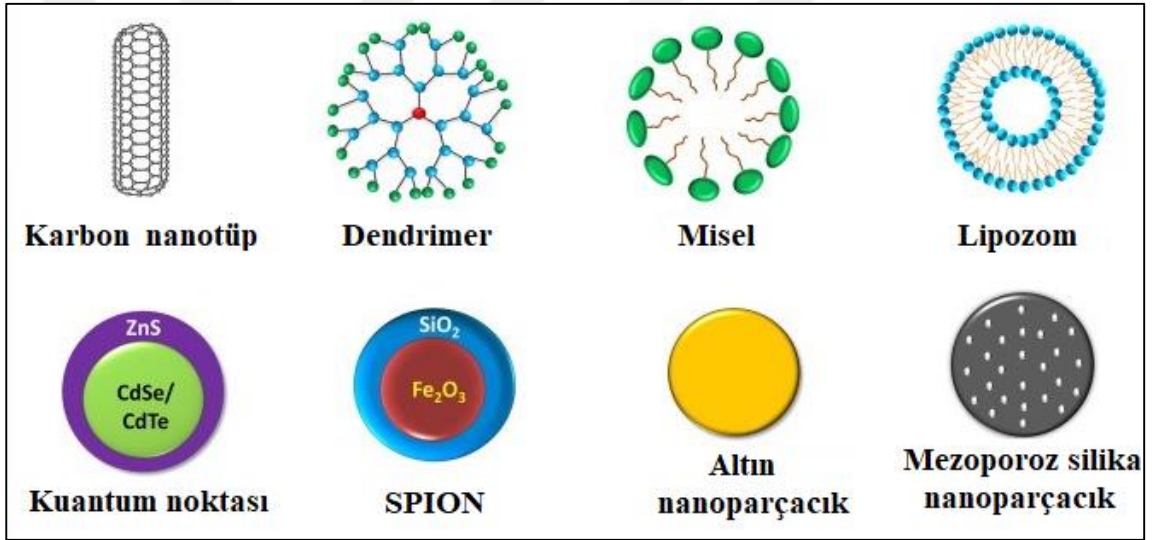
Klasik nanotaşıyıcılar, ilaç taşıma miktarları yönünden geliştirilmiştir. Bu nanotaşıyıcılar taşınan ilaç stabilitesi yönünden optimize edilmiş sistemlerdir ve yüzey modifikasyonlarını minimum derecede içerirler. Bu nedenle, klasik nanotaşıyıcılar harici veya dahili uyarılma ile hedeflenen hücre veya organa ilaç taşıma ve doğru konsantrasyonda hedefli ilaç salınımı yapma yeteneğine sahip değildir (41,47). Onların spesifik dağıtım ve kontrol edilebilir ilaç salınımı yapabilecek şekilde “akıllı” hale getirilebilmesi için değiştirilmelerine veya işlevselleştirilmelerine ihtiyaç duyulmuştur (48).

Çeşitli modifikasyonlarla akıllı hale getirilen nanotaşıyıcılar, ilaç iletimi sırasında yaşanan yan etkileri azaltabilmektedir. Şöyle ki, modifiye edilerek işlevsellik kazandırılmış akıllı nanoparçacıklar iletimini gerçekleştirdikleri kemoterapi ajanını hedef bölgelere taşıdıktan sonra sürekli olarak azaltılmış dozajlarda ve uzamsal olarak kontrolü sağlanan bir şekilde ilacın salınımını yapabilmektedir (44,49). Örneğin, modifiye edilmemiş “yalın” ilaç taşıyıcılar vücut savunma sistemi için genellikle yabancı partikülleri temsil ettiğinden, taşıdıkları ilacı hedef hücre veya organa taşıyamadan kan dolaşımından uzaklaştırılmaktadırlar (48). Dolayısıyla, akıllı nanotaşıyıcılarda temel özellik olarak uzun ömürlülük beklenmektedir. Bir nanotaşıyıcıda uzun ömürlülük beklenmesinin tek nedeni taşıdığı farmasötik ajanının kandaki miktarını uzun süre korumak değil, aynı zamanda hedef ile ilaç etkileşimleri için daha fazla zaman sağlamaktır (50). Akıllı hale getirmek için kullanılan çeşitli modifikasyonların dolaşımdaki nanotaşıyıcıların stabilitesini ve yarı ömrünü arttırma, gerekli biyolojik dağılımı ve istenilen patolojik bölgeye pasif veya aktif hedeflemeyi sağlama ya da lokal pH'ta/sıcaklıkta patolojiyle ilişkili değişikliklere ve yerel fizyolojik uyarılara yanıt verme gibi olumlu sonuçları, kalsik ilaç iletim sistemlerinin ve ilaçların yenilenebilir olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca halihazırda kullanılan ilaçlara çeşitli modifikasyonlarla gama-sintigrafi, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi ve ultra-sonografi için görüntüleme/kontrast ajanları olarak hizmet etme yeteneği de kazandırılabilir (43).

İlaç taşıyıcı sistemler viral taşıyıcılar ve viral olmayan taşıyıcılar olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirler (51). Viral olmayan sistemler de; organik katyonik bileşikler, rekombinant proteinler ve inorganik nanoparçacıklar olmak üzere kendi arasında üç ana gruba ayrılabilirler (51). Viral taşıyıcı sistemlerde orjinal gen segmentinin bir kısmı, eklenecek ve iletilecek gen için yer ayırmak üzere sistemden silinir. Böylece istenilen gen sisteme eklenerek viral taşıyıcı vasıtasıyla hücreye iletilir (51). Viral olmayan sistemlerin ilki olan katyonik bileşiklerden oluşan taşıyıcı sistemler arasında, katyonik lipidler, katyonik polisakaritler, polikatonik polimerler yer almaktadır (52,53). Viral vektörlerin, viral olmayanlar ile birleştirildiği hibrit sistemler de mevcuttur (54). Bu hibrit sistem, konakçının bağışıklık tepkisinden kaçınmak için viral epitop yüzeyinin korunmasını sağlar. Ayrıca hedefleme kabiliyetini arttırmak için reseptöre özgü ligandların yüzeyine konjugasyonunu sağlayan aktif bir platforma sahip olabilmektedir. Viral vektörlerin 2000'li yılların başında keşfedilen ve günümüzde hala geliştirilmekte olan bir diğer taşıyıcı sistem ise rekombinant proteinlerdir (52). Bu proteinler, günümüzde protein mühendisliği yoluyla verimli gen iletimi için kullanılmaktadırlar. Tek bir molekül üzerine gerekli olan çeşitli peptid segmentlerini ekleyerek viral özellikleri taklit ederler. Ayrıca, rekombinant protein olarak antikorlar hücre dağıtımını hedefleyen antikor segmentleri ve nükleer lokalizasyon sinyalleri olarak işlev gören bazı kısa peptid sekansları içerebilirler (51). Vektör-DNA komplekslerinin oluşumu normal katyonik bileşiklere benzer olsa bile protein vektörlerinin biyouyumluluğu daha yüksektir (52,53). Viral olmayan yeni taşıyıcı sistemler arasında yer alan bir diğer nanotaşıyıcı grup ise inorganik nanoparçacıklardır (51). Kalsiyum fosfat (CPNP), altın nanoparçacık (AuNP), karbon malzemeler, silikon oksit (SiO₂NP), demir oksit (manyetik nanoparçacık, maghemit nanoparçacık vb.) ve katmanlı çift hidroksit (Layered Double Hydroxide, LDH) gibi birçok inorganik malzeme nanoparçacık olarak kullanılmaktadır.

Viral taşıyıcılar en etkili taşıyıcı sistemler olsa da bağışıklık tepkisi, yüksek miktarda üretim, düşük yükleme kapasitesi ve yerleştirme mutagenezi gibi yan etkileri hücresel iletimdeki başarılı uygulamalarını sınırlandırmaktadır (51). Katyonik taşıyıcılar (lipidler ve polimerler) viral taşıyıcıların getirdiği sorunları önleyebilmekle beraber

genellikle hücreler için toksik olup (53) uzun vadede kararsız bir yapıya sahiptirler (55). Buna karşılık, inorganik ve organik nanoparçacıklar düşük toksisite ve kontrollü uygulama özellikleri ile viral taşıyıcılara ve katyonik taşıyıcılara yeni bir alternatif olarak umut verici nanoparçacıklar arasına girmiştir (51). En sık kullanılan viral olmayan inorganik nanotaşıyıcı sistemler Şekil 4.2.1’de görüldüğü gibi, karbon nanotüp (Carbon NanoTubes, CNT), dendrimer, misel, lipozom, kuantum noktası (Quantum Dot, QD), süper paramanyetik demir oksit nanoparçacık (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticle, SPION), altın nanoparçacık (Gold Nanoparticle, GNP) ve mezopoz silika nanoparçacık (MSN) olarak listelenebilir (49).



Şekil 4.2.1. Günümüzde kullanılan çeşitli organik ve inorganik (viral olmayan) nanotaşıyıcıların şematize edilmesi (49)

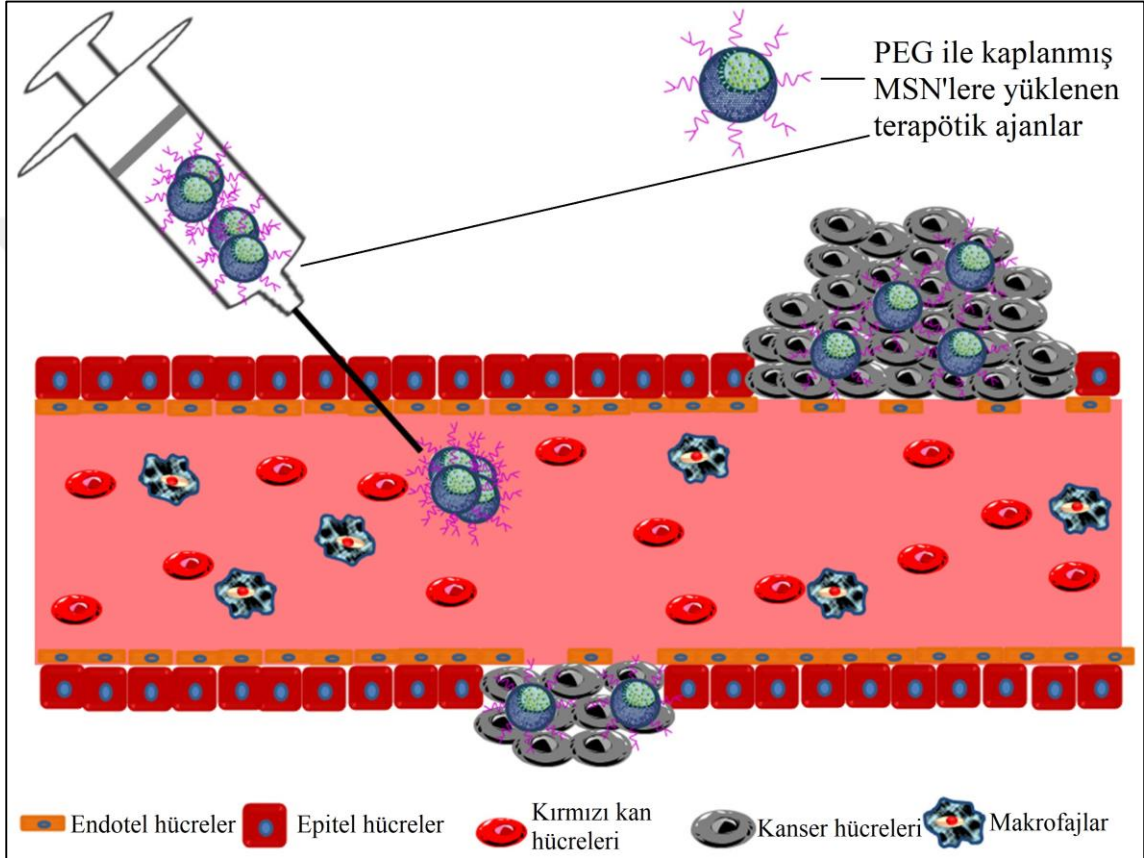
Kanser tedavisinde en yaygın olarak kullanılan yöntem kemoterapidir (56). Kemoterapi, saptanamayan kanser mikro-odakları ve serbest kanser hücrelerinin tedavisinde hayati bir rol oynamaktadır (57,58). Kanser hücreleri sağlıklı olanlardan daha hızlı büyürler ve hızlı büyüyen hücreler var olan çeşitli yapısal özellikleri ile kemoterapötiklerin ana hedefleridir (59). Aynı zamanda bu yapısal özellikleri taşıyan sağlıklı büyüyen hücreler de olabileceği için kemoterapötikler sağlıklı hücrelere de saldırır. Bu istenmeyen etki, klasik kemoterapinin başarısını azaltmakla birlikte, başarısız olmasına neden olabilmektedir (59). Farklı etkilere sahip kemoterapötiklerin kombine edilmesi daha düşük dozların kullanılmasına ve tolere edilemeyen yan etkilerin

azaltılmasına yardım edebilmektedir. Ancak kemoterapi uygulamalarındaki bir diğer önemli sıkıntı ise, çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance, MDR) şeklinde ifade edilen hücrelerin kullanılan ilaca direnç geliştirmeleri durumudur (49). Bu durum kemoterapi uygulamalarının başarısı önündeki diğer bir önemli engeldir.

MDR, kanser hücrelerinin tedavi sırasında veya tedaviden kısa bir süre sonra sitotoksik ilaçlara karşı direnç geliştirerek kemoterapötik ajanların etkilerinden kaçmalarını sağlamaktadır. Kanser tedavisinde en uygun yanıtı elde etmek ve hücrel direnç oluşumunun önüne geçmek için çeşitli stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Antikanser ajanın gerekli konumda hedeflenerek etkinliğini gösterebilmesi için akıllı ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Akıllı ilaç taşıma sistemleri kanser bölgelerini tanımlamak için kanser hücreleri ile sağlıklı hücreler arasındaki fizyokimyasal farklılıkları kullanmaktadır (60).

Nanotaşıyıcılar, hedeflenen bölgeye giderken retiküloendotelial sistem (RES) tarafından temizleme de dahil olmak üzere birçok biyolojik engelle karşılaşılır (48). Akıllı nanotaşıyıcılardan beklenen ilk özellik vücudun bağışıklık sisteminin temizleme işleminden kaçınmalarıdır (48,61). RES nanotaşıyıcıyı kısa bir süre içerisinde dolaşımdan uzaklaştırır ve karaciğer, dalak veya kemik iliğinde biriktirir. Polietilen glikol (PEG) ile kaplama, immün sistemin bu temizleme işleminden kaçınmak için kullanılan iyi bir çözümdür (Şekil 4.2.2) (48). İkinci olarak, nanotaşıyıcıların kanser hücrelerine karşı seçicilik kazanmaları adına modifiye edilmeleridir. Kanser hücreleri ile sağlıklı hücreler arasındaki fizikokimyasal farklılıklar, kanser hücrelerini ayırt etmek için kullanılabilir. Örneğin kanser hücrelerinin yüzeyi bazı proteinleri fazla miktarda üretir (62). Sağlıklı hücrelerdekine göre kanser hücrelerinde fazla miktarda üretilen bu proteinler, akıllı nanotaşıyıcıların ana hedefleridir (48,61–63). Nanotaşıyıcıların yüzeyi, bu proteinlerle eşleşme özelliğine sahip ligandlar ile modifiye edilerek, yüzeyinde reseptör proteinlerin çok olduğu kanser hücrelerine taşınırlar (44). İlacın hedef bölgeye taşınması, kemoterapinin başarıya ulaşması için yeterli olmayabilir (44,48). Akıllı bir nanotaşıyıcının harici veya dahili uyarım altında taşıdığı ilacı hedeflenen yerde doğru

konsantrasyonda salınımını gerçekleştirmesi beklenebilmektedir (44). Nanotaşıyıcıları, salınımı gerçekleştireceği ortam şartlarına duyarlı hale getirmek için, yüzeyine çeşitli kimyasal gruplar eklenebilmektedir (60).

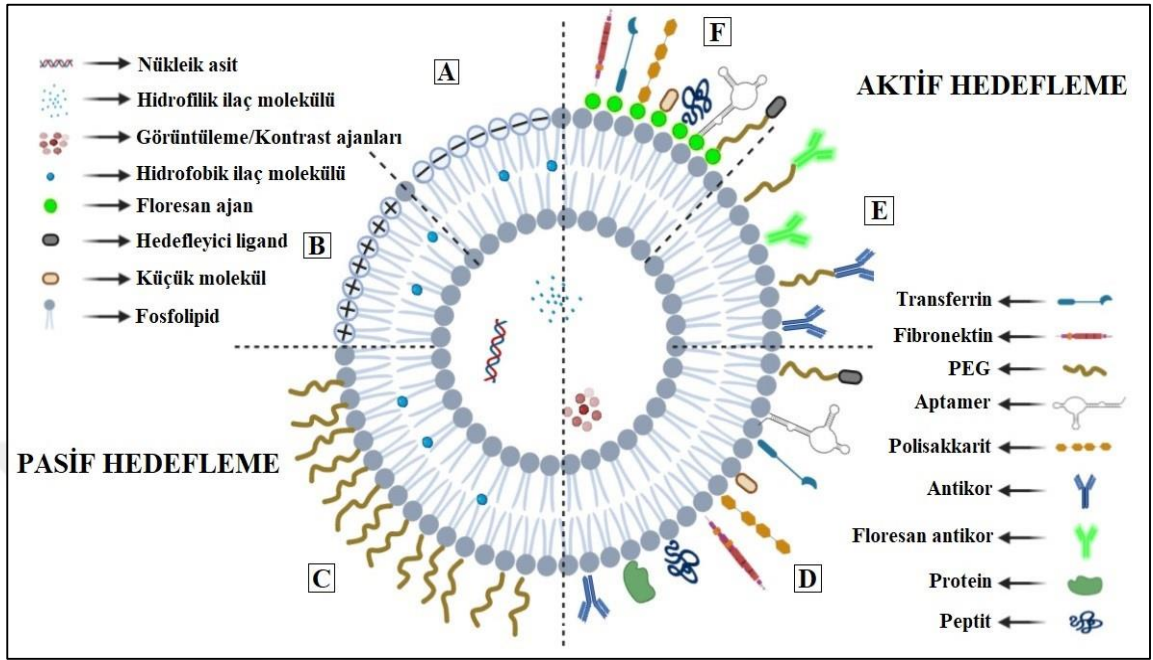


Şekil 4.2.2. Modifiye edilen MSN'lerin EPR etkisiyle tedavi sürecinin şematik gösterimi (64).

İdeal bir akıllı nanotaşıyıcı sistemin, vücudumuzun bağışıklık sisteminin temizleme işlemine dahil olmadan kanserli bölgeyi bularak taşıdığı kemoterapötik maddeyi iletmesi ve doğru konsantrasyonda kemoterapötik maddenin salınımını gerçekleştirmesi beklenmektedir (41). Akıllı nanotaşıyıcı sistemlerde pasif ve aktif hedefleme olmak üzere iki tür hedefleme sistemi esas alınmaktadır (48,49,60,64). Pasif hedefleme, kanserli dokunun yerini belirlemek için EPR etkisini (Bölüm 3.3'te detaylı olarak anlatılmaktadır) kullanmaktadır (65). Aktif hedefleme ise kanser hücrelerini bulmak için ligand-reseptör etkileşimini kullanmaktadır (44).

4.3 İlaç Taşıma Sistemlerinin Hedefli Gönderimi

Birçok tümör türünde artan besin ve oksijen ihtiyacı sebebiyle damarsal geçirgenlik daha yüksektir (66). Normal damar yapılarında 2 nm'den büyük moleküller endotel hücreler arasındaki hücreler arası bağın sıklığı nedeniyle bu hücreler arasından geçemezler (65,66). Tümör bölgesinde ise, endotel hücreler arasındaki bu sıkı yapı kanser vaskülarizasyonu nedeniyle bozulur: 10-500 nm arasındaki makromoleküller yapısı bozulan bu endotel hücrelerin arasından tümör dokusuna geçip tümörlü dokuda birikebilir (65). Bunun yanı sıra, bu bölgelerde bozulmuş lenfatik boşaltım nedeniyle de biriken moleküllerin sistem dışına çıkması zorlaşır (66). Pasif hedefleme (Şekil 4.3.1 A, B ve C) olarak da bilinen "EPR etkisi" bu geçirgenliğin bozulması durumu olup Matsumura ve Maeda tarafından ilk kez 1986 yılında tanımlanmıştır (65–67). Pasif hedefleme yöntemiyle etkinliğini kanıtlayan nanotaşıyıcılar 1996 yılında ticarileşmiştir (41). Doksorubisin (DOX) taşıyan PEG ile kaplanmış Lipozom olan Doxil/Caelyx buna örnektir (41,48). İlaç taşıyıcı sistemlere uygulanan PEG gibi sentetik polimerler ile kimyasal modifikasyon, ilaç taşıyıcı sistemlere *in vivo* uzun ömürlülük kazandırmanın en sık kullanılan ve en etkin yollarından biridir (48). Örneğin; klasik lipozomlar, fosfolipid çift katmanlarından oluşur ve intravenöz olarak uygulandıklarında RES tarafından yakalanırlar. Bir serum proteini olan opsonin hücreye giren lipozomları yabancı madde olarak algılar ve fagositler (RES'in bir parçası) tarafından yok edilmesini sağlar. Dolaşım süresini arttırmak için lipozomların yüzeyi, hidrofilik bir polimerle, yani PEG ile kaplanarak lipozomlar ile serum bileşenleri arasındaki parçacık-parçacık etkileşimlerine dayanan birbirini itici kuvvetler güçlendirilir (68). Klasik lipozomların 1.07 saatlik biyolojik yarılanma ömrünün yüzeyi PEG ile kaplanarak 57.8 saate yükseldiği görülmüştür (69). Bu şekilde hazırlanan uzun süreli dolaşım süresine sahip lipozomlar, kanser tedavisinin yanı sıra mantar enfeksiyonu, gen tedavisi ve aşı taşıyıcıları vb. olarak da kullanılmaktadır (60).



Şekil 4.3.1. Aktif (D, E ve F) ve Pasif Hedeflemenin (A, B ve C) şematik olarak gösterimi (A) Negatif yüklenmiş lipozom, (B) Pozitif yüklenmiş lipozom, (C) PEG ile kaplanmış lipozom, (D) Çeşitli hedefleme ajanları ile modifiye edilmiş lipozom, (E) Antikor ve floresan işaretli antikor ile modifiye edilmiş lipozom, (F) Floresan ile işaretlenmiş ligandlar kullanılarak modifiye edilmiş lipozom.

Pasif hedefleme sistemi klinikte heyecanla karşılanıp, hala uygulanan bir yöntem olmasına karşın bazı tümör türlerinde damar geçirgenliği farklı olabildiğinden EPR etkisi yeterli olmamaktadır. Bu nedenle farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur. Tümörlü hücrelerin besin ihtiyacı arttıkça, bazı reseptörlerin (Örneğin EGF (Epidermal büyüme faktörü)) sayısı da artmaktadır. Tümör bölgesinde genellikle kanserli ve sağlıklı hücrelerin bir arada karışık halde bulunmasından dolayı onları ayırt edebilen nanotaşıyıcıların geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Aktif hedefleme sistemlerinde nanotaşıyıcının yüzeyi, sağlıklı hücrelere göre daha fazla miktarda bulunan reseptörleri tanıyacak ligandlar ile kaplanarak işlevsel hale getirilmektedir (Şekil 4.3.1 D, E ve F)(64). Böylece kemoterapötiklerin sitotoksik olarak etkisi artırılırken, sağlıklı hücrelere olan yan etkiler ise en aza indirilmektedir (64,70). Bu durum MDR'yi de azaltmaktadır (70). Nanotaşıyıcıya bağlı ligand ile hücre yüzeyindeki reseptörünün bağlanmasıyla hücre içerisine alım gerçekleşmektedir. Bu olay reseptör-aracılı endositoz olarak

tanımlanmaktadır (64). Reseptör aracılı endositoz için kullanılan moleküler biyo-belirteçler; tümörlü hücrelerin yüzeyinde yüksek miktarda bulunan reseptörler ve tümörlü dokuyu beslemekte olan damarların ifade ettiği yüksek miktardaki reseptörler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (64). Tümör hücrelerinde yüksek miktarda üretilen yüzey reseptörleri tarafından spesifik olarak tanınabilen ve nanotaşıyıcılara aktif hedefleme kabiliyeti sağlayan ligandlar arasında antikolar, proteinler, peptitler, aptamerler, karbonhidratlar ve küçük moleküller bulunmaktadır (48,64,70). Bu ligandlar tek başlarına kullanılabilecekleri gibi birden çok ligand kullanılarak çok işlevli ilaç taşıyıcı sistemler de geliştirilebilmektedir (64).

Kanser tedavisi için kullanılan çeşitli ilaç veya DNA moleküllerinin hatta ilaç yüklü nanoparçacıkların hücre içine taşınmasına yönelik yeni bir yaklaşım da, bu moleküllerin hücrel membranlar yoluyla alımı kolaylaştırabilen proteinler ve peptitler (cell penetrating peptide, CPP) kullanılarak modifiye edilmeleridir (71). Peptitler, tıpkı antikolar gibi, tümör hücreleri üzerindeki ligand-reseptör etkileşimlerini bozarak hücrel proliferasyonun durmasına yol açmak için kullanılabilir. Antikorlardan çok daha ucuz ve daha karmaşık üretim yapma avantajına sahiptirler (70). Birçok protein ve peptidin, hücre içine alımda rol oynayan belirli ligandlarla (folat, transferrin) veya hücreye nüfuz eden peptitlerle (TAT veya polyArg gibi CPP'ler) etkileşime girerek hücrel zarlardan geçtiği, taşıdıkları molekülleri sitoplazma veya çekirdeğe kadar ilettiği gösterilmiştir (48). Hücrel membranlardaki bariyerler, hücrelerin içerisine makromoleküllerin verimli bir şekilde iletilmesi için büyük bir engeli temsil etse de bu yeni teknolojinin ışığında, CPP'ler çeşitli molekülleri *in vitro* ve *in vivo* olarak memeli hücrelerine taşıyabilmektedirler (61,72). Örneğin; transaktive edici transkripsiyonel aktivatör (TAT), tümör hücrelerinde p53 birikimini artıran ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tümör hücrelerinin seçici olarak öldürülmesi için apoptotik genleri aktive eden tümör baskılayıcı peptid p53'e bağlanmıştır (73).

Nanoparçacıklar, klasik etken madde olarak kullanılan ajanın çözünürlüğünü, farmakokinetiğini ve biyo-dağılımını geliştirme yeteneğine sahiptir (74). Nano düzeyde formüle edilmiş ilaçlar, geleneksel olarak formüle edilmiş muadillerine kıyasla geliştirilmiş etkinlik, düşük dozlama, alternatif uygulama yolları, azaltılmış toksisite, azaltılmış immünojenisite gibi pek çok avantaja sahiptir (74,75). Örneğin, DOX (76), paklitaksel (77,78) ve terapötik bir protein olan TNF-alfa (79,80) gibi küçük moleküllerin yapımında nanoteknolojiyle etkinleştirilmiş yeniden formülasyondan faydalanılmıştır.

Yaygın intravasküler pıhtılaşma sendromundan kaynaklanan komplikasyonlar, klasik DOX'un klinik uygulamasını sınırlamaktadır (81). Yalın halde kullanılan DOX molekülü pıhtılaşma sorunu için bir ön koşul görevi gören lökosit pro-pıhtılaşma aktivitesini indüklemektedir (76,81). Bununla birlikte, DOX molekülü bir PEG ile modifiye edilmiş lipozom içine kapsülleme yoluyla yeniden formüle edildiğinde bu sorun başarıyla çözülmüştür. Nanoformüle edilmiş Doksil adı verilen yeni molekül ile intravasküler pıhtılaşma semptomları ortadan kaldırılmıştır (76).

Basit hedefli nanotaşıyıcıları elde etmek için, taşıyıcı yüzeye karşılık gelen vektörleri (antikorlar, peptitler, karbonhidrat molekülleri, folat ve diğer ligandlar) bağlamak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (48). Bu yöntemler nispeten basittir ve nanotaşıyıcı bütünlüğünden, antikör afinitesinden veya spesifitesinden ödün vermeden yeterli sayıda antikör molekülünün bir nanotaşıyıcı yüzeyine bağlanmasına izin verir (48). Örneğin lipozomlara antikör bağlanması için rutin yöntemlerden biri, lipozom membranı üzerindeki reaktif bir gruba proteinlerin kovalent olarak bağlanmasıdır (82). Bu yöntem basit olmakla beraber verimliliği de yüksektir. Öte yandan, antikör gibi membrana sahip olmayan bir hidrofilik proteinin, fosfolipid içeren bir hidrofobik reaktifle (fosfolipid kalıntısı gibi) kimyasal modifikasyonu, modifiye edilmiş antikörün lipozoma (lipid membran) karşı afinitesini artırdığı gösterilmiştir (39,59). Spesifik antikörlerle modifikasyonun, lipozomal olmayan nanotaşıyıcılara da uygulanabilirliği, jelatin ve insan serum albümininden yapılan nanoparçacıkların, avidin-biyotin sistemi yoluyla HER2 reseptörüne spesifik antikör trastuzumab ile başarıyla modifiye edilmesiyle gösterilmiştir

(83). Yapılan çalışmalarda yüzey modifiyeli nanoparçacıkların, HER2'yi aşırı eksprese eden hücreler tarafından etkin bir şekilde endositozla içeri alındığı gösterilmiştir (83).

İnorganik nanotaşıyıcılar; kullanılabilir geniş yüzey alanları, işlevsellik, potansiyel hedefli iletim kapasitesi ve taşınan ilaçların kontrollü salımı dahil olmak üzere hücrel uygulamalar için çok yönlü özelliklere sahiptirler. Bu nedenle, son yıllarda viral olmayan taşıyıcılar olarak çeşitli inorganik malzemelerle yapılan çalışmalara ağırlık verilmiştir (51). Genler ve proteinler dahil olmak üzere çeşitli ilaçların hücrel taşınımı için potansiyel taşıyıcı olarak kullanılabilen çok sayıda inorganik nanoparçacık vardır (51,53). Bununla birlikte biyouyumluluk, taşıyıcılar ve biyomoleküller arasındaki güçlü afinite, nanohibritlerin yüksek yük yoğunluğu ve spesiflik vb. özellikler için büyük ölçüde fonksiyonelleştirme modifikasyonları gerekmektedir (84). Nanoparçacık için kaplama malzemesi seçiminde dikkatli olunmalıdır. Nanoparçacık kaplamalar, hem inorganik hem de polimerik materyaller dahil olmak üzere birkaç materyalden oluşabilir (85). Polimerik kaplama malzemeleri sentetik ve doğal olarak sınıflandırılabilir. Poli vinilpirolidon (PVP), poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), poli etilenglikol (PEG), poli vinil alkol (PVA), poli akrilik asit (PAA) vb. sentetik polimerik sistemlerin tipik örnekleridir. Jelatin, dekstran, kitosan, pullulan gibi polisakkaritler ise doğal polimerlere örnektir (84,85).

Metal nanoparçacıklar (nanoküreler, nanokabuklar ve nanorodlar dahil) hedefe yönelik hücrel iletim için başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar (51). Özellikle GNP'lerin, 0.8 ve 200 nm arasında istenen büyüklüğe kolayca uyarlanabilirliği ve biyouyumluluk sağlamak için yüzeylerinin kolayca değiştirilebilir olması onların hücreler için vektör olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca GNP'lerin görünür ışığa sahip olmaları hücrel takibini kolaylaştırmaktadır (51,86). Örneğin GNP'ler gen transfeksiyonunda kullanılmak üzere amin-alkil tiyollerle işlevselleştirilmiştir (86). 2002 yılında yapılan bu çalışmada modifiye edilmiş GNP'ler ile memeli hücrelerine yüksek verimle başarılı bir gen transferi yapılmıştır (86). Ayrıca GNP'ler hücre çekirdeğini hedeflemek için uygun proteinler/peptitler ile konjuge edilebilmektedirler (51).

CNT'ler, GNP'ler gibi biyoyumluluğu yüksek ve düşük sitotoksositeye sahip nanoparçacıklardır. CNT'ler kimya, elektrik, optik ve mekanikteki oldukça iyi fizikokimyasal özellikleri nedeniyle ilaçların, proteinlerin ve genlerin hedefli dağıtımı için viral olmayan vektör sistemlerine alternatif sağlamaktadır (49,51). Küçük biyomoleküllerin yüklenmesini sağlayan geniş iç hacimleri ve kimyasal modifikasyona açık dış yüzeyleri (proteinleri veya genleri yüklemek için kullanılabilir) CNT'leri biyomedikal ve biyolojik uygulamalar için küresel nanoparçacıklara göre daha avantajlı hale getirmektedir (51). Suda çözünür nanotüpler olacak şekilde modifiye edilen CNT'ler bir floresan işaretleyici ile bağlanarak hücre zarı boyunca hareketleri izlenmiş, bazı nanotüplerin hücre çekirdeğine kadar gittiği gözlenmiştir (87). Yapılan bir başka çalışmada ise CNT'ler, HeLa hücrelerine gen aktarımı için kullanılmıştır (88). Bu uygulamaya göre işlevselleştirilmiş CNT vektörleri ile yapılan gen aktarımı veriminin viral vektörlere göre 10 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte CNT'lerin *in vitro* çalışmalarda lipozomal sistemlerden daha az etkili olduğu gösterilmiştir (51).

SiO₂, Fe₂O₃, Fe₂O₄ gibi oksitler; nano ölçekli büyüklükler, kolay sentezlenebilirliği, değiştirilebilir yüzey yükleri ve düşük sitotoksiteleri nedeniyle biyoyumlu kabul edilmektedirler ve potansiyel ilaç dağıtımı için taşıyıcı olarak kullanılabilirler (85). Manyetik (Fe₃O₄) ve maghemit (Fe₂O₄) gibi süperparamanyetik oksitler mikro ve nanoparçacık olarak 1970'lerden bu yana iletim sistemlerinde kullanılmaktadır (89). Demir oksitlerden en sık kullanılan manyetik nanoparçacıklar ilk kez Widder ve ark. tarafından sıçan kuyruklarına implante edilen sarkom tümörlerine sitotoksik ilaçlar vermek için harici bir manyetik alan tarafından yönlendirilerek kullanılmıştır (90). Elde ettikleri sonuçlar, tümörün büyük oranda gerilediğini göstermiştir. Bu uygulama baz alınarak yapılan çalışmalarda manyetik nanoparçacıklar kullanılarak sitotoksik ilaç iletimi ve tümör küçülmesi üzerine yapılan birçok çalışma rapor edilmiştir (91). Bu çalışmaların hepsinde klasik intravenöz uygulamaya göre manyetik nanoparçacık ile iletimi yapılan ilaç veriminin yüksek olduğu ve uygulamaların sonunda tümör küçülmesinin de daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte son yıllarda manyetik nanoparçacıkların modifikasyonlar ile hedefe

yönelik iletim sistemleri olarak geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (51,91). Zhang ve ark. (2002) manyetik nanoparçacıkların yüzeyini sırasıyla metoksi-PEG-silan, 3-aminopropil-trimetoksisilan ve folik asit (FA) ile kovalent olarak kaplamışlardır. Modifiye edilmiş manyetik nanoparçacıkların, insan meme kanseri BT20 hücresi tarafından hücre alımı test edilmiştir (92). Yalın manyetik nanoparçacık ile karşılaştırıldığında modifiye olan manyetik nanoparçacığın önemli oranda daha yüksek verimle iletimi sağlandığı rapor edilmiştir (92). Ayrıca PEG ve FA zayıf bağlarla birbirine bağladıktan sonra manyetik nanoparçacık ile kovalent olarak bağlandığında oluşan modifiye manyetik nanoparçacığın BT20 hücrelerindeki iletiminin, yalnızca PEG ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacığa oranla 5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (92). Bunların dışında, manyetik nanoparçacıklar verimli gen iletimi için modifiye edilebilirler (51). Örneğin manyetik nanoparçacıklar poli L-lizin ile kaplandığında negatif yüklü DNA'ya elektrostatik olarak bağlanabilir (93).

İnorganik nanoparçacık sistemlerine bir diğer örnek olarak yüksek miktarda ışığa özelliklerine sahip QD'ler ise inorganik nanokristallerdir (94). Floresan emisyonları sabittir ve değişen partikül büyüklüğüne veya kimyasal bileşimine göre ayarlanabilirler. Ayrıca bu tür stabil inorganik nanoparçacıklar, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik malzemelerle birleştirilebilir. Bu nedenle, QD'lerin hem teşhis (görüntüleme) hem de terapötikler için yeni intravasküler problemler olma potansiyeli tespit edilmiştir (51,94).

4.4 Kanserde Nükleik Asit Bazlı Terapiler

Nükleik asitler, hücre bölünmesi (DNA replikasyonu) ve protein sentezi (transkripsiyon ve translasyon) gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynarlar. DNA, hücrenin replikasyonu ve DNA'nın RNA'ya transkripsiyonu ile RNA'nın proteinlere translasyonundan sonra işleyişi için gerekli genetik bilgileri içerir. Sağlıklı ve kanser hücrelerindeki biyolojik olaylar benzer şekilde gerçekleşmektedir (95). Nükleik asitlerin hücre içerisine gönderilmesi yoluyla hücresel gen ekspresyonunun kontrol edilebilmesi, klinik ve temel bilimdeki nükleik asit uygulamalarına olanak sağlamıştır (96).

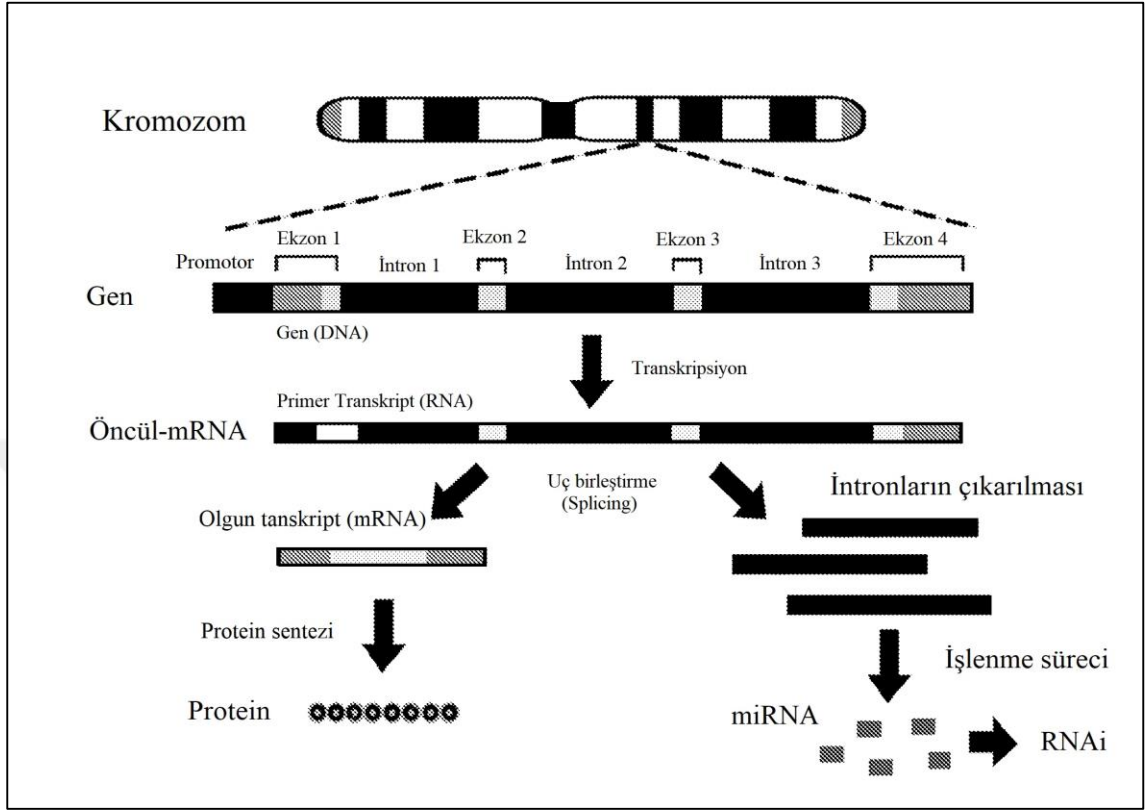
Nükleik asit bazlı terapilerin en fazla kullanıldığı alan gen iletimidir ve gen iletimi için hem viral hem de viral olmayan vektörler kullanır (96). Viral iletim stratejileri genel olarak viral olmayan sistemlerden daha etkili olsa da *in vivo* çalışmalarda viral vektörlere karşı verilen doğal immün yanıtlar gen terapisine giren hastalar için risk oluşturabilmektedir (14). Ayrıca viral olmayan iletim sistemlerinin formülasyon ve modifikasyon kolaylığı, viral iletim sistemlerinden daha çok tercih edilmelerinin bir diğer nedenidir (14).

Hastalıkların çoğu, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonundan kaynaklanan karmaşık ve çok faktörlü süreçleri içinde barındıran mutasyonlardır (95). Nükleik asit bazlı terapötiklerin klinik uygulamaları, formülasyonuna bağlı çeşitli zorluklar (immünotoksosite (immün sistem tarafından hedef bölgeden temizlenme), hematotoksosite (serum bileşenleri ile etkileşim), farmakokinetik (parçacık-parçacık etkileşimi)) nedeniyle engellenmektedir (75). Nükleik asit bazlı terapi ajanının endozomdan kaçışı ve nükleer alımı için çeşitli nanotaşıyıcılarla modifiye edilmesi gerekmektedir (96). Nanoteknoloji tabanlı platformların, nanoparçacıkların ilaç iletimini, stabilitesini, yarılanma ömrünü, uygulama yolunu ve dozajını değiştirebilmesinden dolayı bu zorlukların bazılarını çözüm getirdiği düşünülmektedir (75).

4.4.1 RNA bazlı terapiler

Günümüzde hücre içerisine protein ve RNA iletimindeki zorluklar hala devam etmektedir. Enzimler, antikorlar veya transkripsiyon faktörleri gibi çoğu protein terapötikleri, kırılabilir yapıları ve büyük moleküler boyutları nedeniyle düşük stabilite ve zayıf hücre-membran geçirgenliğine sahiptir. siRNA veya miRNA dahil olmak üzere RNA terapötiklerinin negatif yüklere sahip olmaları, onların hücre zarı boyunca yayılmasını engeller. RNA'ların endonükleaza duyarlılıkları nedeniyle bozulmalarını önlemek için genellikle kimyasal modifikasyon gereklidir. Bu nedenle, protein ve RNA'yı zararlı fizyolojik ortamdan korumak ve bunları aynı anda hücre çekirdeğine taşımak için uygun bir taşıyıcının tasarlanması önemlidir.

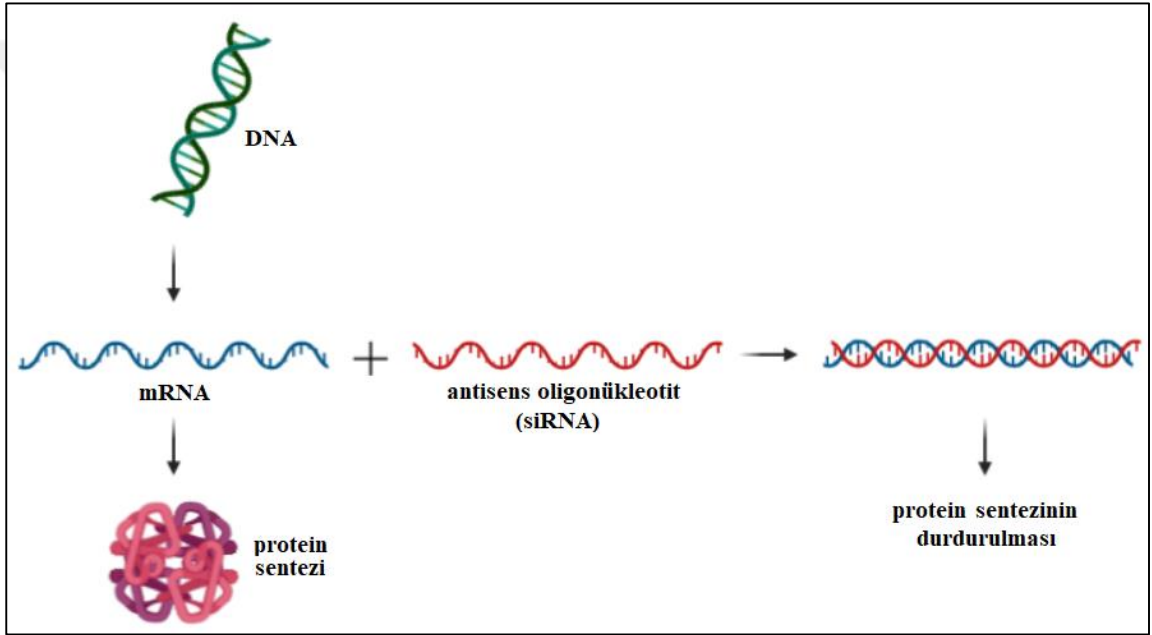
Ökaryot hücrelerin genom organizasyonu karmaşık yapıdadır. İnsan genomunun neredeyse % 98'i protein kodlamaz (97). İlk zamanlarda DNA'nın kodlanmayan kısmının, protein sentezinde hiçbir görünür işlevselliği olmadığı düşünülmüş hatta bu kısımlar gereksiz DNA (junk DNA) olarak adlandırılmıştır (98). Daha sonra DNA'nın kodlanmayan bu kısımlarının, nükleotid elementler (tekrarlayan, transpoze edilebilir, serpiştirilmiş elementler vb.) ve farklı kodlamayan RNA'lar (rRNA'lar, tRNA'lar, düzenleyici RNA'lar vb.) şeklinde düzenlenen büyük bir yapı olduğu ortaya çıkmıştır (99). RNA molekülü genel olarak protein sentezi için gerekli olan transkripsiyon ve translasyon aşamalarında görev alan bir nükleik asittir. Protein kodlama özelliği olmayan RNA molekülleri ise "kodlamayan RNA'lar (non-coding RNA, ncRNA)" olarak isimlendirilmektedir (98). 200 bazdan daha az ncRNA'lar "kısa kodlayıcı olmayan RNA (small non coding RNA, sncRNA)" olarak tanımlanmıştır. sncRNA'lar; tRNA, rRNA, miRNA, snoRNA, piwi proteinleri ile etkileşen RNA (piRNA)'dır (100). Sağlıklı bir ökaryotik hücrede rRNA (% 80-90) ve tRNA (% 10-15) dışındaki farklı ncRNA'ların toplam RNA miktarına oranı % 0,002-0,2 arasında değişen geniş bir aralığa sahiptir (101). Şekil 4.4.1'de çeşitli süreçlerden geçerek üretilen kodlanan ve kodlanmayan RNA'lar gösterilmektedir. Uzunluğu 200 bazdan fazla olan ncRNA molekülleri ise uzun kodlamayan RNA (long ncRNA, lncRNA) olarak adlandırılmıştır (102). ncRNA'lar, DNA'nın epigenetik modifikasyonunda ve transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (103). Ayrıca lncRNA'lar, nükleozomun yeniden şekillenme faktörleri ve kromatin değiştirici enzimlerle etkileşmekte ve kromatinin yapısal kontrolünü sağlamaktadırlar (104).



Şekil 4.4.1. DNA üzerinde bulunan ekzon ve intronların transkripsiyon sürecinden geçerek, kodlanan (mRNA) ve kodlanmayan (ncRNA) RNA'ları üretim süreci (105)

sncRNA grubunun içerisinde yer alan küçük müdahaleci RNA (Small interfering RNA, siRNA) RNA interferansı (RNAi) tabanlı terapötikler sınıfına aittir (15). Gen susturma özelliğine sahip siRNA'ların öncüsü 70-80 bp'lik çift zincirli RNA'lardan (Double strand, dsRNA) oluşan oligonükleotitlerdir. Guo ve ark. 1995 yılında *C. elegans* nematodu üzerinde yaptıkları çalışmalarda gen baskılama mekanizmasında hedef mRNA ile aynı baz dizisine sahip mRNA'nın antisens yani mRNA dizisini tamamlayıcı sekansa sahip RNA kadar etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Bunu takiben 1998 yılında Z. Fire ve ark. yaptıkları çalışmada ise, tek başına dsRNA'ların, yalnız hedef mRNA sekansı veya hedef mRNA'nın tamamlayıcı sekansına göre on kat daha etkili gen susturma özelliği olduğu keşfedilmiştir. Bu dsRNA'lara RNAi adı verilmiştir. Yaptıkları bu büyük keşif Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello'ya 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında nobel ödülü kazandırmıştır.

siRNA tedavisi, transkripsiyon sonrası gen susturma yöntemine dayanmaktadır (9). siRNA; yaşa bağlı makula hastalığı (Age-related macular disease, AMD), Huntington hastalığı, diyabet, hepatit ve kanser gibi günümüzde tedavi edilemeyen birçok hastalık için umut verici bir tedavi sınıfı olarak ortaya çıkmıştır (106). siRNA hedeflenen hastalıklı hücrelerde tamamlayıcı mRNA'nın enzimle katalize edilerek bozunmasına neden olmaktadır (99). Böylece üretilen mRNA miktarı değişmezken, sentez sonrası mRNA'lar degrede olduğundan gen işlevsiz kalarak susturulmuş olur (Şekil 4.4.2) (15,99).



Şekil 4.4.2. siRNA kullanılarak gen susturma yönteminin şematize edilmesi

siRNA tabanlı terapötiklerin hızlı bozunması, hidrolize duyarlılığı ve spesifik hücrel ve fizyolojik engelleri artıran polianyonik doğasından kaynaklanan sınırlayıcı dezavantajları mevcuttur (9). siRNA'nın negatif yüklü polianyonik yapısı nedeniyle hücre iletiminde kullanılmak üzere polimerler (107), lipozomlar (16) ve peptitlerle (108) kompleksleştirilmesi veya kapsüllenmesi için klasik yöntemler kullanılmıştır. Son zamanlarda, yüksek verimli siRNA iletim sisteminin geliştirilmesine yönelik yaklaşımlar, siRNA'nın kolesterol (109), N-asetillaktozamin (110) ve antikorlar (111) dahil olmak üzere bazı moleküller ile kimyasal modifikasyonunu kapsamaktadır.

siRNA tabanlı terapiyle ilgili önemli klinik sorunlardan biri de, onları "tek ilaç-tek hedef" modellemesiyle sınırlayan ve zamanla dirence karşı duyarlı hale getiren tek gen yönetimi yaklaşımıdır (15). Genellikle birçok hastalığı yok etmek için sadece bir geni baskılamak yeterli olmaz, gen susturmayı başka terapilerle birlikte uygulayarak birden fazla yolağı eş zamanlı olarak inhibe etmek gerekebilmektedir. Özellikle kanser tedavisinde tek gen baskılamaya dayalı terapi yöntemlerinin yetersiz kaldığı bilinmektedir. mikroRNA'lar (miRNA'lar), aynı anda birden fazla geni hedefleme yetenekleri sayesinde kanser tedavisini daha iyi yönetme açısından umut verici yeni müdahale araçları olarak ortaya çıkmıştır (112). Masato Nishimura ve ark. (2013), onkogenik etkisi olduğu bilinen EphA2 reseptör tirozin kinaz üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada miRNA ve siRNA kombinasyonunu kullanmışlardır. Bu sayede tek başına miRNA veya siRNA uygulamalarına kıyasla kombine tedavinin anti-tümör etkinliğini daha fazla artırdığı tespit edilmiştir (15).

4.4.2 DNA bazlı terapiler

DNA, insanlarda ve bazı canlı organizmalardaki kalıtsal materyal olan nükleik asitlerdir (113,114). Fosfodiester bağları ile bağlanmış deoksiribonükleotitlerden (deoksiadenozin, deoksiguanozin, deoksisitidin ve deoksitimidin) oluşan bir polimerdir. Fizyolojik pH'da (pH = 7) fosfodiester grupları anyonlar olarak iyonize olmaktadır. Bununla birlikte iyonize olan anyonlar magnezyum gibi katyonik iyonlarla bağlanabilmektedir (95). DNA, iki tamamlayıcı baz, adenin ve timin arasında iki hidrojen bağı ve diğer tamamlayıcı bazlar olan guanin ve sitozin arasında üç hidrojen bağı ile tutulan çift sarmal veya tek sarmal olarak bulunabilmektedir (95). Kalıtsal bilgi dört kimyasal bazdan oluşan bir kod olarak depolanmaktadır (114). DNA'nın büyük kısmı hücre çekirdeğinde bulunmakta ve nükleer DNA olarak adlandırılmaktadır. Ancak mitokondride de mitokondriyal DNA olarak adlandırılan az miktarda kalıtsal madde bulunmaktadır (114).

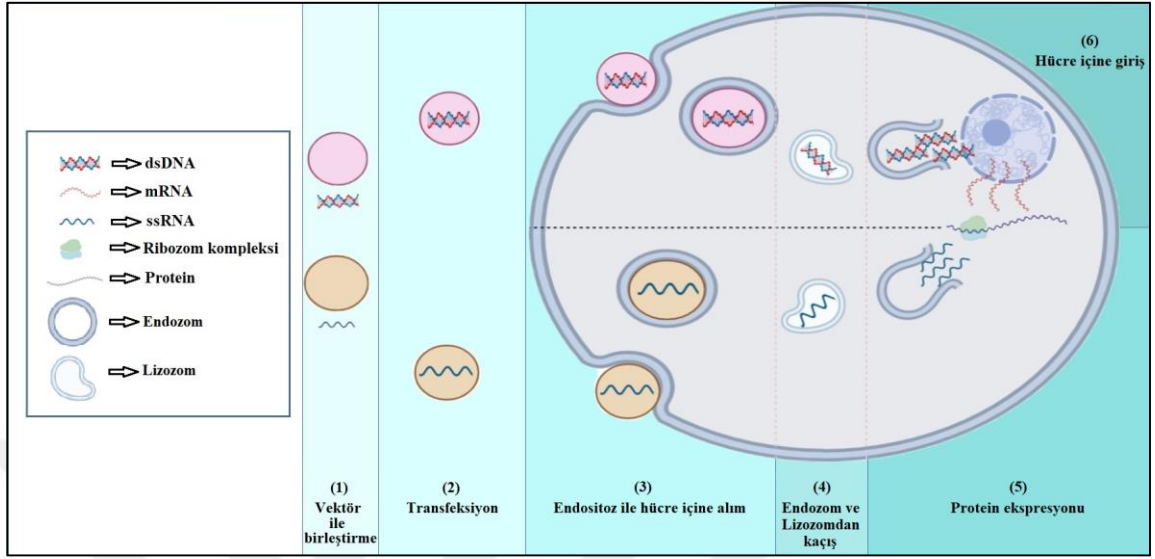
DNA bazlı terapötikler arasında gen terapisi, transgenler, oligonükleotitler, ribozimler, DNAzimler ve aptamerler kullanılmaktadır (115,116). DNA bazlı terapötiklerin çoğu klinik çalışmaların erken aşamalarında olmasına rağmen, son yıllarda Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik bozukluklar (117) da dahil olmak üzere kanser, AIDS ve kardiyovasküler hastalıkları da içeren birçok hastalık için son derece umut verici ilaç adayları olarak ortaya çıkmışlardır (115,116). İnsan genom projesinin tamamlanması ve hastalıklarda rol oynayan genlerin tanımlanması DNA bazlı terapötiklerin geliştirilmesine önemli bir katkı sağlamıştır (118).

DNA bazlı ilaçların günümüzde mevcut olan düşük moleküler ağırlıklı farmasötiklere göre önemli avantajlarından biri moleküler hedefleri seçici olarak tanımlamalarıdır. Örneğin, tipik bir gen terapisi, hatalı bir genin doğru kopyasının hücreye gönderilmesi ve hücre içerisinde eksprese edilmesi yoluyla hatanın düzeltilmesini içerir. Böylece tek ve doğru bir protein ürünü elde edilir (115–117). Benzer şekilde, gen ablasyonu için tasarlanan DNA bazlı terapötiklerde sadece seçilen genler silinir, böylece hastalık durumunun kontrolünde spesiflik sağlanır. Birçok ilaç adayı olan DNA bazlı bileşiğin insan üzerindeki etkileri henüz tam olarak araştırılmamış olduğundan, uzun süreli kullanımlarının fizibilitesi kesin olarak belirlenmemiştir. Ek olarak, hücresel alım, dağılım ve metabolizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir (116).

Günümüzde hastalarda kullanım için onaylanmış tüm gen terapisi denemelerinde yalnızca hastanın somatik hücreleri (çok hücreli organizmalarda üreme veya farklılaşma ile ilgili olmayan hücreler) hedeflenmiştir. Bu yaklaşım genetik tedavinin yalnızca bir neslin etkilemesini sağlamaktadır. Kullanılan terapötik genlerin germ hücrelerine (üreme ile ilgili hücreler) bir etkisi olmadığından, hastalığın genetik yapısını sonraki nesiller için değiştirmemektedir. Somatik gen tedavisi olarak bilinen bu tedavinin amacı tedavi edilen bireydeki hastalığı hafifletmektir. Hastalarda gen transferini içeren 300'den fazla klinik çalışma onay almıştır. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (USFDA) tarafından onaylanmış ilk nükleik asit ilacı, sitomegalovirüs retinitinin tedavisi için oligonükleotit olan fomivirsen (Vitravene)'dir (119). Hastalık potansiyeline sahip henüz

doğmamış bireylerin genetik profilini değiştirmek için doğrudan gametleri (sperm ve yumurta) hedeflemek de mümkündür. Embriyonik gelişimin erken bir aşamasında uygulanan gen tedavisi hem somatik hem de germ hattı hücrelerine gen aktarımı sağlayarak somatik gen tedavisine benzer etkilere sahip olabilmektedir. Bu yaklaşım germ hattı gen tedavisi olarak bilinmektedir (119). Gen aktarımı yoluyla germ hattını değiştirmenin uzun vadeli etkilerini tahmin edememenin yanı sıra, bu tekniği kapsayan birçok etik, sosyal ve maddi sorun mevcuttur. Bunların yanı sıra, germ hattı gen terapisi hakkındaki yetersiz bilgi ve gelecek nesiller için taşıdığı öngörülemez risk nedeniyle, birçok ülkede germ hattı gen terapileri yasaklanmıştır (54).

Tedavi stratejisinin seçimi ilgili hastalığın türü ve alınan klinik sonuçlar ile belirlenmektedir. Bununla beraber, oligonükleotitlerin ve diğer daha kısa DNA terapötiklerinin nükleaz bozunması, omurganın (backbone) kimyasal modifikasyonu yoluyla sunulan koruma ve stabilite ile engellenebilir (12). Plazmid DNA moleküllerinin hücre alımı sadece iletim sistemlerinin stabilitesiyle mümkün olmaktadır (120). Örneğin, metilfosfonat bağları içeren omurgaya sahip oligonükleotitler, fosforotioat analoglarına kıyasla önemli miktarda fazla biyolojik yarılanma ömrüne sahiptirler (120). Plazmid DNA, stabilize edilmiş plazmid-lipit partikülleri şeklinde uygulandığında yarılanma ömrü 6 saatten fazla arttığı görülmüştür (121). DNA bazlı terapötiklerin stabilitesini sağlayarak yarılanma ömrünü artırmanın yanı sıra, endozomal ve lizozomal bozulmadan korunmanın da olmasını sağlamak önemlidir (Şekil 4.4.3). Bu koruma, viral iletim vektörlerinin kullanılmasıyla veya pH'ye duyarlı ve 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE) gibi katyonik lipozom iletim sistemlerine füzojenik lipidlerin dahil edilmesiyle kısmen başarılmıştır (122,123). DOPE, lipit altıgen fazlarının oluşumu ile endozomal asidifikasyon üzerine endozomal membranı parçalayabilen yardımcı bir lipittir. Endozomal membranın bozulması, DNA bazlı terapötik ve bu terapötüğün iletim sistemini sitoplazmaya iletilmesini sağlayabilir (123). Ayrıca endosomal pH'yı bozarak asidifikasyonu artıran ve böylece lizozim aktivitesini inhibe eden monensin ve klorokin gibi lizozomatropik ajanlar da kullanılmıştır (124,125).



Şekil 4.4.3. DNA bazlı terapötiklerin hücre içerisindeki akıbetinin şematize edilmesi

Adenovirüslerden türetilen hemagglutinin HA2 gibi viral peptitlerin iletim sistemlerine dahil edilmesi DNA bazlı terapötiklerin endozomal bozunumunu engelleyebilmektedir (53,126,127). Hemagglutinin HA2 endozomun yok edilmesiyle konformasyonel geçişe yol açar. Böylelikle DNA içeren iletim sistemlerinin ilaç salımının kolaylaştırılmasını sağlar (126). Plazmidlerin nükleer alımı, nükleer lokalizasyonda bulunan sinyal peptitlerine, transkripsiyonel faktörlere (örn., GAL4, SV-40 ve SMGA), histonlara ve peptit nükleik asit yapılarına yönlendirilerek arttırılmıştır (63,126). Son zamanlarda, sitoplazmada plazmidleri eksprese ederek nükleer erişim ihtiyacını tamamen ortadan kaldıran yeni ektranükleer sitoplazmik ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir (53).

Pek çok olumlu özelliğe ve olası klinik başarı belirtilerine rağmen (115,116,128–131), insanlara uygulama açısından DNA bazlı ilaçlar en iyi şekilde “nadir başarılarla sınırlı” olarak tanımlanabilmektedir (116). Yavaş ilerleyen DNA bazlı ilaç geliştirilmesi süreci, kısmen *in vivo* olarak hücre alımının zayıf olmasından kaynaklanmaktadır (12). DNA'nın hücre içine alımı ve metabolizmasının anlaşılması için çalışmalar yapılmıştır ve bu çalışmalar sonucunda önemli bilgiler elde edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak DNA bazlı taşıyıcı sistemlerin ve terapötiklerin stabilitesini arttırmak ve bozulmasını en aza indirmek için çeşitli stratejiler uygulanmıştır (12). Örneğin nükleik asitler polianyonlar

olduklarından, negatif yüklü fosfat gruplarını nötralize etmek için karşı iyonlara ihtiyaç duyarlar (132). Mg^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar kullanılarak yapılan X-ışını kırınım çalışmalarında, DNA ipliğinin, tuz konsantrasyonuna, hidrasyon derecesine, metal iyonuna vb. bağlı olarak birden fazla konformasyonda bulunabileceği gösterilmiştir (132,133). Theophanides ve ark. yaptıkları çalışmadaki deneysel sonuçlar, metal iyonlarının in vitro olarak nükleik asitlerle etkileşime girdiğini ve çift sarmalı stabilize ettiğini göstermiştir (133). Modifiye edilmemiş DNA molekülleri negatif yüklü olduğundan, hücre alımları çeşitli fiziksel (örneğin elektroporasyon) ve kimyasal (örneğin katyonik lipid formülasyonları) taşıma stratejileriyle kolayca artırılabilirdiği tespit edilmiştir (134). Modifikasyon olmadan DNA bazlı ilaçların yalın halde hedef hücrelerin çekirdeğine ulaşması ve akabinde nuklear metabolizasyonu normal koşullar altında minimal düzeyde olabilecek bir durumdur. Ek olarak, zayıf biyolojik stabilite ve kısa yarılanma ömrü, öngörülemeyen farmakokinetik etkiler ile sonuçlanabilir. Ayrıca, hücreye girmeyi başaran DNA molekülleri için nuklear erişimin kısıtlanmış olduğu, hücre içerisinde enzimler tarafından kesilime maruz kaldığı bilinen bir gerçektir (12,116). Yalın DNA üzerine uygulanan kimyasal modifikasyonlarla DNA'nın yükünü değiştirerek bu durumun önüne geçilmek istenmiştir (12,116,134). En iyi bilinen kimyasal modifikasyonlar, DNA yapısındaki nükleotitlerin nötr hale getirilmesi ve daha hidrofobik bir omurga ile modifiye edilmesidir. Öte yandan, yüklerinin nötrlenmesinin DNA'nın hücre içine alımını kolaylaştırmadığı keşfedilmiştir (134). Bunların dışında plazmid DNA gibi yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler için hem sentetik hem de doğal iletim platformları kullanılarak geliştirilen stratejilerde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (116). Birincisi; Katyonik lipitler, dendrimerler, polimerler, siklodekstrinler ve karbon nanotüplerden oluşturulmuş taşıyıcı sistemler DNA'nın hücre alımını kolaylaştırmak için halihazırda kullanılmaktadır. Bu taşıyıcı sistemlerin hemen hepsinde endositoz yoluyla hücreye girişin sağlandığı tespit edilmiştir. İkinci bir strateji, DNA molekülünün 5 'veya' 3' ucunun çeşitli fonksiyonel biyo-organik moleküllerle konjuge edilmesidir. Örneğin peptitler (CPP) ile konjuge edilerek hücrelere hedeflendirilmesi için başarılı olarak gerçekleştirilmiş pek çok çalışma mevcuttur (48,61,71,135). Üçüncü olarak kolesterol, aminoglikositler, PEG ve akridin gibi lipofilik taşıyıcı moleküllerle

konjugasyonda hücre için DNA girişini artırmaya yönelik çalışmalar arasındadır (134). DNA taşıma sistemlerinin kullanımı sadece DNA bazlı terapötiklerin farmakokinetiğini iyileştirmekle kalmamış, aynı zamanda bu moleküllerin istenen dokulara etkili bir şekilde hedeflenmesini de sağlamıştır (116).

Geçtiğimiz yıllarda, ideal DNA iletim sisteminin geliştirilmesi için umut verici sonuçlar alınmıştır (12). Örneğin, 2018 yılında Ryan A Kelley ve ark. insan dışı primatlarda yaptığı çalışmada; PEG'e konjuge edilmiş polilisin içeren DNA nanoparçacıklar geliştirilmiştir. Kolay erişilebilirliği, genetik tedaviye yatkın olması ve görülebilir değişikliklerin çabuk fark edilmesi açısından göz içi oküler gen transferi tercih edilmiştir. Modifiye DNA nanoparçacığının babunlara göz içerisinden verilmesinden sonra babun gözünde önemli inflamatuvar yanıt veya nanoparçacık ile ilişkili görsel işlevlerde azalma olmadığı bildirilmiştir (136). Bu çalışma kayda değer bir yan etki olmaksızın, DNA nanoparçacıkları kullanılarak etkili oküler gen transferi yapılabildiğini göstermiştir.

4.4.3 DNA origami

Nanoteknolojinin ilerlemesiyle birlikte nükleik asitler kapsamlı olarak araştırılmış ve oluşturdukları kontrol edilebilir yapıları ile büyük ilgi görmüşlerdir. Nadrian Seeman 1982 yılında "DNA'nın yapısal nanoteknolojisi (DNA structural nanotechnology)" alanının temelini oluşturmuştur. Watson-Crick baz eşleşmesine dayalı oluşturulan bağlantı noktalarıyla spesifik ve tam sıralı nanoyapılar elde edilebileceğini göstermiştir (17). Bu yöntemde bir ssDNA yapı iskelesi olarak kullanılmaktadır. Yapı iskelesinin sekans dizilimi, üzerine zımba gibi eklenecek olan diğer diziler için bir bazal alan oluşturmaktadır. Seeman'in öncüsü olduğu DNA bazlı nanoyapılardan esinlenilerek nükleik asit bazlı fonksiyonel nanomateryaller (NAFN) üretilmiştir (137,138). NAFN parçacıkları biyoyumluluk, programlanabilir moleküler tanıma kapasitesi ve biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliklerine sahiptir (139). Bu özelliklerden yararlanılarak, NAFN parçacıkları ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, biyo-görüntüleme ve biyoalgılama yöntemlerinde kullanılmıştır ve biyomedikal uygulamalar için yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (139).

4.4.4 DNA nanoparçacık

Güçlü, kullanışlı ve spesifik uygulanabilen enzimatik manipülasyonlar, DNA'yı değişken nanoyapıların oluşturulması için oldukça kullanışlı bir yapı taşı yapmaktadır (4). Spesifik hedefleme, ilaçların hastalıklı bölgede birikimleri yoluyla terapötik etkisini artırabilir (13). Evrimsel olarak bakıldığında, DNA moleküllerinin hücreli bariyerler üzerinden transferinin zor olması, çeşitli kontaminasyonlardan uzak tutularak genomik bilginin korunması avantajını sağlamaktadır (116). Hücreli ortamın DNA bazlı girişler için elverişsiz olduğu açıktır (12). Bu nedenle, hücre içine DNA alım sürecinin genel verimsizliği, DNA bazlı terapötiklerin faydalarından tam olarak yararlanılmasının önüne geçmektedir. DNA terapötiklerinin etkinliğini arttırmak ve daha kullanışlı hale getirmek için hücre içerisine DNA girişinin önündeki doğal engellerden kaçınılmalı veya etkisiz hale getirilmelidir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak hücrelere DNA kullanılarak iletim sağlanması için stratejilerin geliştirilmesinde, DNA'yı bozulmaya karşı koruyabilen ve hedeflenen hücreli alımı kolaylaştıran adımlar atılmıştır (12).

Yuvarlanan halka çoğalması (Rolling Circle Amplification, RCA), oligonükleotit zincirlerinin daireselleştirilerek çoğaltılması için kullanılan izotermal ve enzimatik bir polimerizasyon yöntemidir (2,3). Bu biyokimyasal yöntem, tekrarlayan bir dizi birimiyle uzun tek iplikli DNA (ssDNA) üretmek için kullanılabilir (5). Daha düşük ölçeklerde primer kullanımı ve ısıtma-soğutma çevrimlerinin olmaması nedeniyle RCA yöntemi spesifik DNA dizilerini oluşturmak için PCR'a alternatif olabilen, belli avantajları ile farklı uygulamalara imkan tanıyabilen bir yöntemdir (4).

RCA yöntemi ile oligonükleotit zincir polimerizasyonu iki adımda gerçekleşmektedir. Birinci adım halkalaştırma olarak tabir edilebilen oligonükleotidin komplementer bir sekansa melezleştirilerek halkasal hale getirilmesi işlemidir. Melezleştirmede kullanılan kısa sekans, oligonükleotidin 5' ve 3' uçlarını bir araya getirme görevi dışında aynı zamanda bir sonraki adımda uzama için kullanılan "primer" yani birincil sekans olarak da görev yapmaktadır. Primer sekans; oligonükleotidin 5' kısmından 20 nükleotitlik ve 3' kısmından da 20 nükleotitlik bir bölüme komplementer

olarak tasarlanmıştır. İkinci adımda ise kalıp halkasal DNA, primer sekans üzerine bazlar eklenerek uzamayı başlatmaktadır. DNA polimeraz enzimlerinin görevi, Watson-Crick baz eşleşmesi ile bir kalıp DNA ipliği boyunca genetik bilginin doğru kopyalanmasını sağlamaktır. Polimeraz enzimi sayesinde primer adlı başlatıcı sekansa eklenerek uzamayı sağlayan trifosfatlar (Adenozin trifosfat (ATP), guanozin trifosfat (GTP), sitidin trifosfat (CTP) ve timidin trifosfat (TTP)), birleşerek oligonükleotitleri oluşturur (140). Yeni sentezlenen DNA iplikçiklerinin her bir nükleotidi doğru şekilde ekleme gücüne sahip olan, phi29 DNA Polimeraz gibi bir DNA polimeraz, kalıp olarak kullanılan kısa, dairesel ve tek iplikli DNA'yı sürekli nükleotit ilaveleriyle uzayan bir oligonükleotit zincirine dönüştürür (5). Böylece kalıp olarak kullanılan halkasal DNA'nın nükleotit dizilimine komplementer sekansın tekrarlanmasıyla uzayan doğrusal bir oligonükleotit üretilmektedir. Üretilen bu uzun, konkatamer ve doğrusal oligonükleotit zincirine DNA nanoparçacığı (DeNAno) adı verilmektedir (4,5).

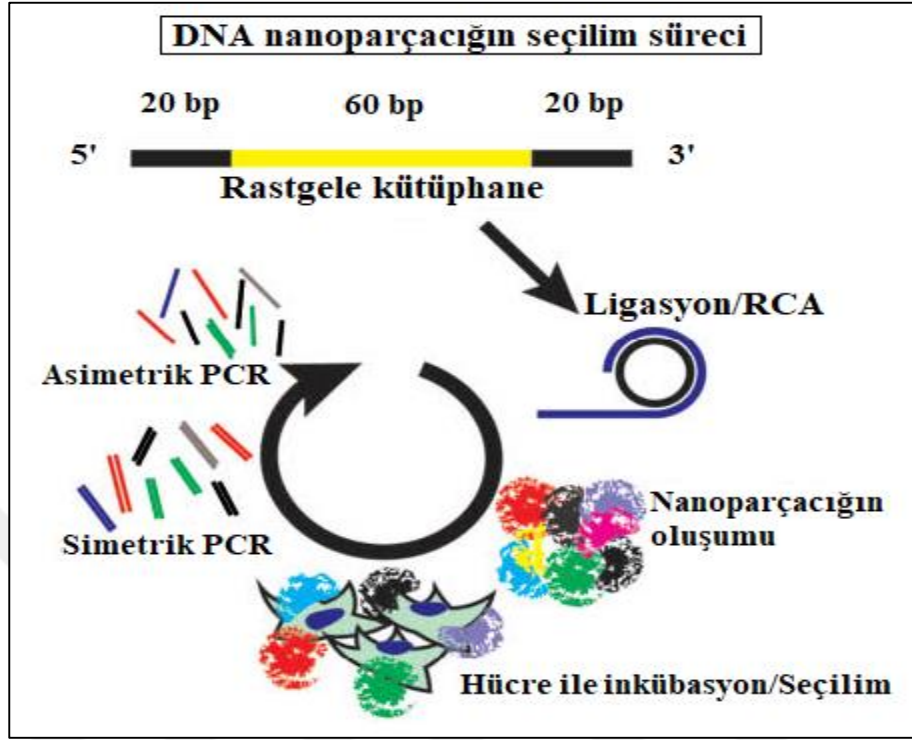
Dairesel oligonükleotit kalıplarından, RCA yöntemiyle oluşturulan DeNAno, rastgele kütüphanelerden hücre seçiciliği olan reaktiflerin seçilmesi için kullanılabilen yeni ve umut verici bir ajandır. DeNAno parçacıkları yüzlerce konkatemerdendir. Hücre gibi karmaşık yüzeylere bağlanmak için yapısını oluşturan çok değerlikten yararlanmaktadır. Kanser veya normal hücrelere özgü DeNAno kütüphanesi seçimi, belirli hücre yüzeyi molekülleri hakkında önceden bilgi sahibi olmadan yeni hücre bağlama ajanları oluşturabilmeyi sağlamaktadır (6). Ancak başarılı moleküler mühendislik yaklaşımının anahtarı, bir yapının bileşenlerini sadece ürünü üretebilecekleri şekilde değil, aynı zamanda mümkün olduğunca başka bir ürünün hedefle rekabetçi olmayacağından emin olacak şekilde tasarlamaktır (17). Nihayetinde, oluşabilecek tüm sekansların termodinamiğini tahmin etmek gerekmektedir. Bunu takiben istenilen ürünü elde etme olasılığına en yakın olanı aralarından seçmek gerekmektedir. DeNAno olarak kullanılacak sekansın seçimi de bu stratejiye benzer olarak, büyük bir rastgele kütüphane içerisinden hücre ile en uyumlu sekans olacak şekilde seçilmektedir.

Bağlanma ajanları olan monoklonal antikolar veya küçük moleküller gibi afinite ajanları hücreye özgü veya normalden fazla üretilmiş membran proteinleri gibi belirteçleri hedef alır. Ancak bunlar genellikle kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayırmak için yeterli değildir. Ayrıca, geleneksel afinite ajanlarını geliştirmek için moleküler hedefin önceden tanımlanması gerekmektedir (141).

Antikolar gibi nanoparçacıkların yüzeyine eklenen ve hücre zarında bulunan spesifik antijenleri hedef alan aptamerler, çeşitli biçimlere katlanabilen ve ligand bağlanmasına girebilen kısa RNA veya DNA oligonükleotidleridir (70). Bu tür dizilerin bulunması çok zordur; 10^{10} rastgele RNA dizisinden yalnızca biri ligand bağlanmasına katılabilen bir konfigürasyona katlanabilir (142). SELEX veya üstel amplifikasyon yoluyla ligandların sistematik evrimi, araştırmacıların, hedefleyici ligandlar olarak hareket edecek yeni aptamerler bulmak için geniş RNA ve DNA dizileri popülasyonlarını taradıkları bir süreçtir (142). Aptamer ile konjuge nanoparçacıklar, kanser ilacı iletim araçları olarak önemli potansiyele sahiptir (70). Aptamerlerin kullanışlı olmasını sağlayan özellikler arasında küçük boyutları (~15 kD), immünojenlik eksikliği ve tümör hücrelerine kolayca nüfuz etme ve onları hedefleme potansiyelleri yer almaktadır (70,142). Folat ve transferrin gibi aptamerlerin de hedefleme özgüllüğünün artmasına ve tümör hücrelerine daha etkili ilaç verilmesine yardım ettiği gösterilmiştir (62). Sisplatin, DNA transkripsiyonuna müdahale ederek işlev gören, ancak sistemik olarak uygulandığında prostat kanseri hücrelerine karşı normalde etkisiz olan platin bazlı bir kemoterapötiktir. Sisplatinin hedeflenerek verilmesinin terapötik etkinliğini artırabileceği düşünülmektedir. Dhar ve ark. tarafından 2008 yılında cisplatinin prostat kanseri hücrelerine verilmesi için aptamer ile konjuge bir nanoparçacık tasarlanmıştır. Hedef olarak seçilen membran proteini, prostat kanseri hücrelerinde oldukça fazla ifade edilen ve bir aptamer tarafından kolaylıkla hedeflenebilen prostata özgü membran antijenidir (PSMA). Sisplatin kapsüllemek için poli D, L-laktik-ko-glikolik asit ve poli etilen glikol bağlarından oluşan klasik bir nanoparçacık taşıyıcı kullanılmıştır. Serbest sisplatin ile karşılaştırıldığında, PSMA hedefli aptamer ile kapsüllenmiş PLGA-b-PEG

nanoparçacıkları, PSMA eksprese eden prostat kanseri hücreleri için 80 kat daha etkili sisplatin iletimi yaptığı tespit edilmiştir (141).

Aptamerler ve DeNANO için seçim süreci benzerdir, rasgele sekanslar içeren çeşitli DeNANO kütüphanesi bir hedefle (hücre, protein, küçük molekül) inkübe edilir, hedef bağlanmayan partikülleri çıkarmak için yıkanır, bağlı partiküllerin 5' ve 3' primer alanları kullanılarak simetrik PCR yöntemiyle çoğaltılmasının ardından asimetrik PCR yöntemi kullanılarak ürün zenginleştirilir. Daha sonra ligasyon ve RCA ile yeni parçacıklar üretilir. Bu işlem bağlanan parçacıklar havuzun çoğunluğunu oluşturuncaya kadar tekrarlanır (Şekil 4.4.4). Çok değerlikli çekim kuvvetleri, doğadaki birçok biyolojik etkileşimde anahtar bir ilkedir. Özellikle hücre yüzeyi reseptörleri ve bunların ligandları arasındaki bu çok değerlikli etkileşimler, fonksiyonel bağlanma afinitesini ve seçiciliği arttırmak ve/veya ligandla indüklenen reseptör kümelenmesi yoluyla biyolojik sinyalleme modüle etmek için kritiktir öneme sahiptir (143). Aptamerlerden farklı olarak DeNANO işlendiği süreye bağlı olarak birkaç yüz nanometre boyutlarda olabilen RCA yöntemi ile üretilmiş yüzlerce kopya uzunluğundaki konkatamerlerdir. Hedeflerine bağlanmak için yüksek afinite yerine birden fazla etkileşimin bir arada olduğu yüksek aviditeyi kullanan yeni bir reaktiftir. DeNANO'nun çok değerlikli formatıyla seçilen parçacıklar, bu çoklu modifiye edilmiş aptamerlerden farklı bir şekilde bağlanabilir, bu da farklı bağlanma moleküllerinin tanımlanmasına yol açar. Genel olarak, DeNANO'nun yapısındaki ssDNA'nın katlanması sıcaklık, tampon içeriği, baz eşleştirme ve elektrostatik etkileşimler gibi koşullara bağlıdır. Aptamerlerde olduğu gibi, DeNANO seçimi de hedef hakkında önceden bilgi gerektirmez. Bu nedenle hücreler gibi karmaşık hedefler üzerinde seçim yapması kolaylaşmaktadır. RCA yöntemi ile sentezlenen DNA nanoparçacıklar tasarlanabilir olduğu için modifikasyona açık olduğundan DNA origamiye benzetilebilmektedir. Ancak RCA yöntemiyle sentezlenen DNA nanoparçacıkların daha kararlı ve maliyeti bakımından ucuz olduğu ortaya konulmuştur (144).



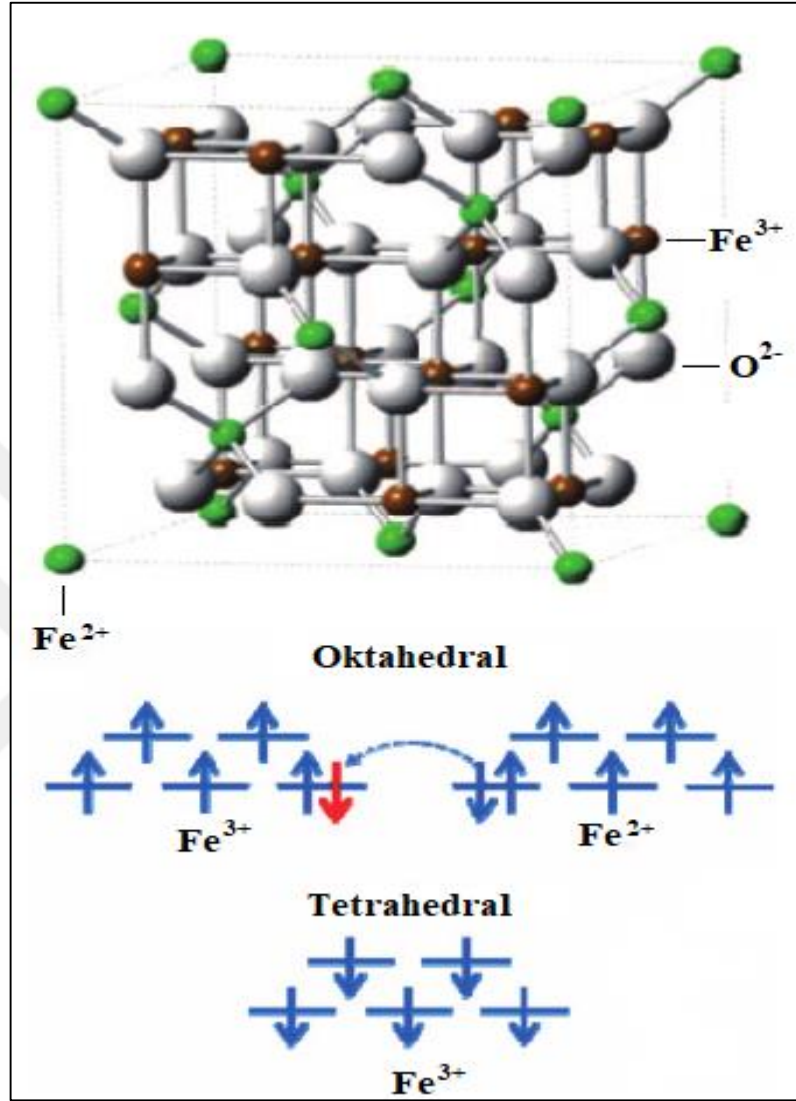
Şekil 4.4.4. DeNano'nun seçim sürecinin şematize edilmesi (6)

In vivo kullanım için nanopartikül uygulamalarından beklenen en önemli özellik hücreleri veya dokuyu seçici olarak hedefleme yeteneğidir (7). Monoklonal antikolar, aptamerler veya ligandlar ile başarılı çalışmalar yapılmasına rağmen immünotoksisiteleri ve afiniteye bağlı olarak tek bir moleküle karşı spesifik olmaları sebebiyle bu ajanların yeterli olmadığı görülmüştür. Bunun sonucu olarak çok değerlikli çekim kuvveti olan aviditeye ihtiyaç duyulmuştur (6,143). Nanopartikül sentezinde kullanılan diğer polimerlerle karşılaştırıldığında biyokimyasal, yapısal ve fonksiyonel aktiviteleri sayesinde DNA'nın çok iyi bir tamamlayıcı molekül olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (6). Örneğin; (i) DNA, metillenmemiş CpG motifleri içeriyorsa immünojenik olabilir (145). Bu özelliği kullanılarak hedefli immünojenite ile tedavi sağlanabilir. (ii) Başka oligonükleotit konjugatlarını hibridize etmek için bir yapı iskelesi olarak kullanılabilir. (iii) Spesifik biyomoleküllere ligand olarak kullanılabilir. (iv) Küçük molekül veya metal iyon bağlanmasına izin vermek için kolayca kimyasal olarak modifiye edilebilir veya (v) metaller doğrudan DNA üzerine yerleştirilebilir. (vi) Üzerine ilaç yüklenerek spesifik taşıyıcı olarak kullanılabilir.

4.5 Manyetik Nanoparçacık

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesiyle, biyomedikal uygulamalar ve teşhisler için fonksiyonel nanoparçacıklar üretmek, modifiye etmek ve onları karakterize etmek kolay bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (85). Bunun yanı sıra küçük demir oksit partiküllerinin diagnostik olarak *in vitro* uygulanması yaklaşık 40 yıldır kullanılmaktadır (146). Demir oksit türleri ile yapılan araştırmalar genellikle nano ölçekli büyüklüğe sahip manyetik parçacıklardır (çoğunlukla çapı yaklaşık 5-20 nm olan maghemit Fe_2O_3 veya manyetik Fe_3O_4) (85). Büyüklüklerine göre sıralandıklarında; çapı 50 nm'den daha büyük olan süper paramanyetik demir oksitler (SPION), çapı 50 nm'den küçük ultra küçük SPION ve mikron boyutlu demir oksitler olmak üzere üç çeşittir. Farklı kimyasal bileşenler ve manyetik özelliklerden oluşan SPION grubuna ait manyetik nanoparçacıklar; maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, manyetik Fe_3O_4 veya $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ (M:Co, Mn, Ni veya Cu) olmak üzere çeşitli formlarda bulunabilen demir oksitlerdir.

Manyetik Fe_3O_4 nanoparçacığında temel durumda Fe^{3+} beş tane eşleşmemiş elektrona ve Fe^{2+} bir tane eşleşmiş ve dört eşleşmemiş elektrona sahiptir. Fe_3O_4 manyetik parçacığı aynı anda Fe^{3+} ve Fe^{2+} 'yi içeren, düzenli olarak birbirine yakın paketlenmiş 32 tane O^{2-} iyonuna ve yüz merkezli kübik (face centered cubic, fcc) birim hücreye sahip ters spinal yapıdadır. Bu yapı oktahedral ve tetrahedral katmanlardan oluşur (89). Elektronlar, oda sıcaklığında oktahedral bölgelerdeki Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları arasında zıplayarak manyetik nanoparçacıkları (Fe_3O_4) önemli bir yarı metalik malzeme sınıfı haline getirebilir (**Şekil 4.5.1**) (85). Manyetik nanoparçacıklar (MagNP, Fe_3O_4) hem demir (II) hem de demir (III) iyonlarını barındıran ve doğal olarak oluşan en manyetik mineraldir (147).



Şekil 4.5.1. Manyetik nanoparçacıkların manyetik özelliğini belirleyen Fe²⁺ ve Fe³⁺ iyonları arasında elektron geçişi, yeşil toplar: Fe²⁺, beyaz toplar: O²⁻, kahverengi toplar: Fe³⁺ (148)

Saf metaller hücreler için toksik etkiye sebep olabileceği gibi agregasyona da yatkındırlar (148). Bu nedenle manyetik nanoparçacıkların biyoyoumluluğunu arttırmak, işlevsellik sağlamak (spesifik biyomolekülleri hedefleyebilen fonksiyonel gruplar aracılığıyla) ve agregasyon oluşturmalarını önlemek için yüzey aktif maddeler ve polimerler ile kaplanır (85,149). Bununla birlikte, kaplama, manyetik olmayan bir katman oluşturmak için manyetik çekirdeğin yüzey atomları ile etkileşime girebilir ve bunun etkili boyutunu ve toplam manyetik faz miktarını azaltabilir (149). Etkili boyut ve özellikle

manyetik fazın konsantrasyonu birçok biyomedikal uygulamada önemli faktörlerdir (85,149,150). Örneğin, MagNP aracılı kanser hipertermisinde, bu iki parametre ısı oluşum oranını kontrol eder ve bu da tedavinin etkinliğini belirler (149).

MagNP'ler, uygun yüzey kaplamasıyla ferrofluidler adı verilen homojen süspansiyonlar oluşturarak uygun çözücülere dağıtılabılır (151). Bu tür süspansiyonlar, harici bir manyetik alan ile etkileşime girebilir ve belirli bir alana konumlandırılarak, tıbbi teşhis ve manyetik alan destekli kanser tedavisi için manyetik rezonans görüntülemeyi (MRI) kolaylaştırır (85). Fiziksel, kimyasal, termal ve mekanik özellikleri ile hücre ortamına uygun mezoskopik (makroskopikten küçük mikroskopikten büyük) manyetik nanoparçacıklar; doku onarımı, ilaç taşıma, MRI, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, manyetofeksiyon ve hipertermi uygulamalarında kullanılmaktadır (85,152,153). MagNP'ler ayrıca hücre işaretleme, hedefleme, hücre popülasyonlarını ayırma ve saflaştırma için hücre biyolojisi araştırmalarında bir araç olarak da kullanılabilirler (91). MagNP'lerin biyomedikal uygulamadaki diğer avantajları, MRI'da olduğu gibi görüntüleme için kullanılabilirliği, harici bir manyetik alanın uygulanmasıyla belirli bir yere yönlendirilebilirliği ve ardından alternatif bir ısıtma sonucunda indüklenen ilaç iletimi veya hipertermi uygulamalarıdır (147). Genel olarak biyoyumluluğu ve düşük maliyeti demir oksit nanoparçacıklarını biyomedikal uygulamalar için çok kullanışlı hale getirmektedir (150).

MagNP'lerin biyomedikal uygulamalarda etkili kullanımı parçacıkların büyüklüğüne, morfolojisine ve en önemlisi manyetik özelliklerine bağlıdır (147). Sentez mekanizması bu özellikleri etkilediğinden, düşük aralıklı büyüklük dağılımı ile birlikte en uygun manyetizasyon değerlerini elde etmek için spesifik biyomedikal uygulamalarda kullanılacak MagNP'lerin hazırlanmasına yönelik en uygun sentez yöntemine karar vermek gerekmektedir (154).

5 METOT VE MATERYAL

5.1 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 5.1.1. Moleküler tekniklerde kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Firma	Model
Isıtıcı	Hangzhou MIU Instruments	MTC-100
NanoDrop	ThermoFisher Scientific	AZY1707714
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific	ST16R
Elektroforez Sistemi	Bio Rad	170-44-06
Taramalı Elektron Mikroskobu	ZEISS	EVO HD 15 LS
Konfokal Taramalı Lazer Mikroskobu	ZEISS	LSM 800
ZetaSizer	Malvern	Nano ZS
ZetaSizer	Malvern	Ultra ZS
Mikroplaka Okuyucu	Molecular Devices	Spectramax i3

Tablo 5.1.2. Moleküler tekniklerde ve hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemenin Adı	Firma	Katalog Numarası
100 bp DNA Ladder	NEB	N3231S
Agaroz	Merck	101236
AmpureXP	Beckman Coulter	A63880
DNA sekansları	Sentromer	-
dNTP Solüsyonu	New England Biolabs	N0447S
DMEM High Glucose (4,5 G/L)	CAPRICORN	DMEM-HPA
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Fisher BioReagents	67-68-5
Etanol (%99,8)	Sigma-Aldrich	64-17-5
FBS (Fetal Bovine Serum)	ThermoFisher Scientific	10270-106
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific	H3570
MTT	Sigma-Aldrich	CT01-5

Nuclease Free Water	Gibco	10977-035
Penisilin-Streptomisin	Biosera	XC-A4122/100
Phi29 DNA Polimeraz	New England Biolabs (NEB)	M0269S
Red Safe	İntonBio	24074
T4 DNA Ligaz	New England Biolabs (NEB)	M0202S
Tripsin-EDTA	Gibco	25200-056
Oligreen ssDNA kiti	ThermoFisher Scientific	O11492
3,5 kDa Diyaliz membranı	Spectra/Por	132111
Santrifüj tüp (0,2 mL)	Eppendorf	0030124332
Santrifüj tüp (0,1 mL)	Eppendorf	0030124928

Tablo 5.1.3. Moleküler tekniklerde kullanılan tampon çözeltiler

Tampon Çözeltinin Adı	Firma	Katalog Numarası
TBE (Tris-Borik Asit-EDTA)	ThermoFisher Scientific	15581044
Heparin Sodyum Tuzu	SIGMA-ALDRICH	H3393-10KU
HEPES	Multicell	600-032-CG
PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi)	Multicell	311-012-CL
Tris-HCl, ph 8.0	Multicell	809-128-CL

Tablo 5.1.4. Hücre kültürü için kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemenin Adı	Firma	Katalog Numarası
0,22 Filtre	AISIMO	20130813SCA1-16
15 mL Falkon	NEST Scientific	601002
35 mm Cam Tabanlı Petri Kabı	Cellvis	D35-20-0-N
50 mL Falkon	NEST Scientific	602002
96 Kuyucuklu hücre plakası	NEST Scientific	701201
2 ml santrifüj tüp	Corning Axygen	MCT-150-R
DPBS (+CaCl ₂ ve +MgCl ₂)	Gibco	14040-091
DPBS (-CaCl ₂ ve -MgCl ₂)	Gibco	14190-094

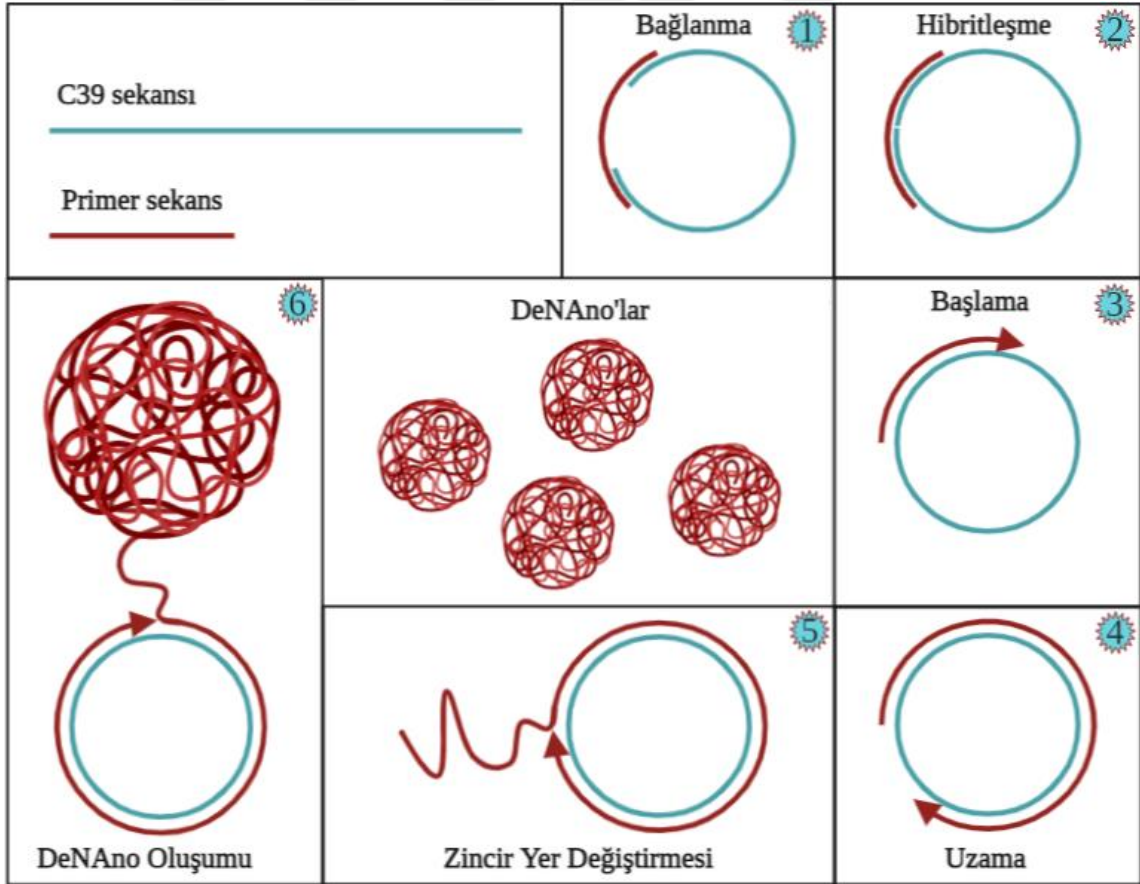
Tablo 5.1.5. DeNAo üretimi için kullanılan oligonükleotitler

Oligonükleotit İsimleri	Baz Sayısı	5' Modifikasyon	Kullanılan DNA Sekansları	3' Modifikasyon
C39 Sekansı (DeNAo)	100 nt	-	TGC TTT TTG GAA CTC CTG CTT AGC AGT AAG AAA GTA CAA TGG GGC GAT AAC CCC AAT CAT GAC TAA AAA TAT GAT TCG GAG <u>GTG ACG TTG AGT TGG ATC C</u>	-
C39 Sekansı'nın Komplementeri	100 nt	Fosfat	GGA TCC AAC TCA ACG TCA CCT CCG AAT CAT ATT TTT AGT CAT GAT TGG TGT TAT CGC CCC ATT GTA CTT TCT TAC TGC TAA GCA GGA GTT CCA AAA AGC A	-
Komplementer Ara Sekans	40 nt	-	GGT GAC GTT GAG TTG GAT CCT GC TTT TTG GAA CTC CTG CT	-
Bağlayıcı Sekans	20 nt	NH ₂ /C12	<u>CAACGTCACCTCCGGAATCAT</u>	-
Floresan İşaretli Bağlayıcı Sekans (FAM)	20 nt	NH ₂ /C12	<u>CAACGTCACCTCCGGAATCAT</u>	Floresan amidit (FAM)

5.2 DNA Nanoparçacığın (DeNAo) Hazırlanması

RCA yöntemine dayanan DeNAo'nun hazırlanması iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Birinci aşamada Panc02 hücre hattına spesifikliği bilinen 100 bp uzunluğuna sahip C39'a komplementer DNA sekansının (7), 40 bp uzunluğundaki yarı komplementer bir ara sekans yardımıyla iki ucu birleştirilerek halkasal hale getirildi. İkinci aşamada ise halkasal DNA sekansı kalıp olarak kullanıldı ve RCA metodu ile DeNAo sentezlendi.

Halkasal hale getirme işlemi, bağlanma ve hibritleşme süreçlerini içermektedir. RCA metodu ise; başlama, uzama, zincir yer değiştirme ve DeNAo oluşumu olmak üzere dört ayrı süreçten meydana gelmektedir. DeNAo'nun sentez aşamaları Şekil 5.2.1'de ayrıntılı olarak şematize edilmektedir.



Şekil 5.2.1. DeNAo nanoparçacığının sentezlenme aşamalarının şematize edilmesi

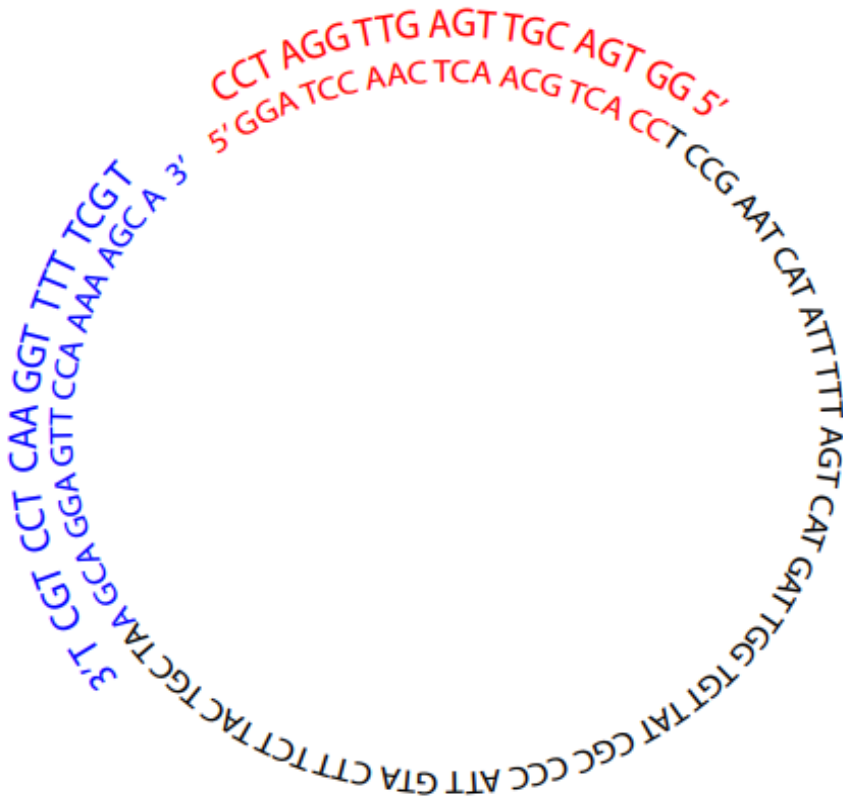
5.2.1 Birinci aşama: C39 DNA sekansının halkasal hale getirilmesi

Panc02 mürin pankreas kanseri hücre hattına spesifik olan C39 sekansından meydana gelen DeNAo, C39 komplementer sekansının kalıp olarak kullanılmasıyla sentezlenmektedir. C39 sekansının komplementeri 5' **GGA TCC AAC TCA ACG TCA CCT** CCG AAT CAT ATT TTT AGT CAT GAT TGG TGT TAT CGC CCC ATT GTA CTT TCT TAC TGC TAA **GCA GGA GTT CCA AAA AGC A** 3' olmak üzere 100 bp'den oluşan bir oligonükleotitdir (Ruff ve ark., 2014) (Tablo 5.1.5).

Uygulanan prosedürde kalıp olarak kullanılacak DNA sekansının halkasal hale getirilmesi için iki ucuna (5' ve 3') komplementer olarak bağlanabilecek 40 bp uzunluğunda 5' **GGT GAC GTT GAG TTG GAT CCT GC** TTT TTG GAA CTC CTG **CT** 3' ara sekansı tasarlanmıştır (Tablo 5.1.5) (Ruff ve ark., 2014). Bu iki sekansın birleştirilerek halkasal kalıp DNA'nın sentezlenmesi tampon çözelti içerisinde ve Ligaz enziminin çalışma sıcaklığı olan 25 °C'de gerçekleştirildi. Öncelikle Tablo 5.2.1'de listelenen; nükleaz içermeyen su (Nuclease-Free Water, NFW), C39 komplementer sekansı, ara sekans ve 1X T4 ligaz tamponu bir deney tüpü içerisine alınarak pipet veya vorteks yardımı ile karıştırıldı. Kullanılan oligonükleotitlerin birbirleri arasındaki istenmeyen hidrojen bağlarını kırmak için homojen hale getirilen karışım 95 °C'de 2 dakika ısıtıcı cihaz içerisinde bekletildi. Daha sonra deney tüpü içerisindeki karışım, enzimin çalışma sıcaklığı olan 25 °C'ye gelinceye kadar cihaz içerisinde soğutuldu. Cihaz ayarlanan sıcaklığa geldiğinde karışım içerisine T4 Ligaz eklendi ve pipet veya vorteks yardımı ile karıştırıldı. Karışım içerisindeki oligonükleotitlerin Ligaz yardımıyla halkasal hale gelmesi için 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda Nanodrop ile deney tüpü içerisindeki halkasal DNA miktarının tayini yapıldı. Bu prosedür ile elde edilen halkasal DNA miktarı ortalama 495 µg/µl olarak tespit edildi. **Şekil 5.2.2**'de C39 sekansının halkasal hale getirilmesi şematize edildi.

Tablo 5.2.1 RCA sentez metodunun birinci aşamasında DNA sekansının halkasal hale getirilmesi için kullanılan bileşenlerin miktarı, başlangıç ve son konsantrasyonları

Malzeme adı	Miktarı (µl)	Başlangıç konsantrasyonu	Son konsantrasyon
C39 komplementer sekansı	2	0.5 µM	0,02 µM
Primer ara sekans	1,5	1 µM	0,03 µM
T4 Ligaz tamponu	5	10X	1X
NFW	41	-	-
Ligaz enzimi	0,5	400,000 U/ml	4000 U/ml
Toplam	50		



Şekil 5.2.2 Kalıp olarak kullanılacak sekansın yarı komplementer ara sekans yardımıyla halkasal hale getirilmesi (Halkasal kalıp DNA)

5.2.2 İkinci aşama: DeNA_{no}'nun sentezlenmesi

DeNA_{no}'nun sentezlenmesinde ligaz enzimi kullanılarak halkasal hale getirilen C39 DNA sekansı kalıp olarak kullanıldı. Kalıp DNA'nın halkasal hale gelmesini sağlayan komplementer ara sekans aynı zamanda başlatıcı (primer) görevi görmektedir. Tablo 5.2.2'de listelenen Phi29 polimeraz tamponu, halkasal DNA, dNTP ve NFW deney tüpü içerisine alınarak pipet veya vorteks yardımı ile karıştırıldı. Karışımın içerisine BSA ve Phi29 polimeraz enzimi eklendi ve enzimin diğer bileşenlerle karışması için tekrar pipet veya vorteksten faydalandı. Deney tüpü içerisindeki örnek, RCA işleminin gerçekleşmesi için polimeraz enziminin çalışma sıcaklığı olan 30 °C'ye ayarlanan ısıtıcı içerisine alındı. Örnekler 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika olmak üzere üç farklı RCA süreleri boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda enzim aktivitesinin durdurulması için örnekler 10 dakika 65 °C'de bekletildi. RCA işlemi biter bitmez Nanodrop ile örneklerin içeriğindeki DNA miktarı tayin edildi.

Tablo 5.2.2. RCA sentez metodunun ikinci aşamasında DeNA_{no}'nun sentezlenmesi için kullanılan bileşenlerin miktarı, başlangıç ve son konsantrasyonları

Malzeme adı	Miktarı (µl)	Başlangıç konsantrasyonu	Son konsantrasyon
dNTP	1,5	2 mM	0,06 mM
Phi29 polimeraz tamponu	5	10X	1X
Halkasal DNA	5	450 ng/µl	2250 ng
NFW	37	-	-
Phi29 polimeraz enzimi	1	2500 U/ml	50 U/ml
BSA	0,5	20 mg/ml	0,2 mg/ml
Toplam	50		

5.3 Saflaştırma

DNA nanoparçacığın saflaştırılmasında en uygun yöntemin belirlenmesi için “Diyaliz” ve “Santrifüj” olmak üzere iki farklı yöntem uygulandı. Diyaliz yöntemi ile saflaştırılarak elde edilen DeNAno'nun içeriğindeki DNA miktarının daha yüksek olarak tespit edilmesi üzerine bu yöntem tercih edildi.

Santrifüj ile saflaştırma yöntemi için;5.2'de anlatıldığı şekilde üretilen DeNAno örnekleri santrifüj tüplerine alındı. Örnekler 14.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 50 µl 1X PBS eklendi ve pipetaj yapıldı. Tekrar 14.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 50 µl 1X PBS ile çözüldü. Nanodrop cihazı ile içeriğindeki DNA miktarı tayin edildi. Uzun süreli kullanım için -20 °C, kısa süreli kullanım için +4 °C'de muhafaza edildi.

DeNAno'nun diyalizi için Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ve distile su (dH₂O) kullanıldı. İlk olarak distile su içerisinde diyaliz ile saflaştırma yöntemi için; Bölüm 5.2'de anlatılan prosedür 10 kez tekrar edilerek üretilen DeNAno örnekleri (10 x 50 µl) birleştirilerek 500 µl hacminde DeNAno elde edildi. Örnek diyaliz membranı (3,5 kDa) içerisine yerleştirildi. Membranın her iki ucu klipsler ile sabitlendi. 500 ml'lik beher içerisine 250 ml distile su eklendi. Beherin içerisine manyetik karıştırıcı balık eklendi. Hazırlanan diyaliz membranları bu beherin içerisine yerleştirildi. Örnekler diyaliz işleminin gerçekleşmesi için bir gece +4 °C'de manyetik karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Örnekler 24 saat boyunca diyaliz edildi. Diyaliz işlemi sonlandırılana kadar, ortalama 6-8 kez örneğin diyalizi için kullanılan su değiştirildi. İlk 4-5 saatte saat başı diyaliz için kullanılan distile su uzaklaştırılıp, yeni distile su ortama eklendi. 12 saat sonra bu işlem tekrarlandı. Gün içerisinde aynı işlem 4 saatte bir tekrarlandı.

DeNAno'nun diyalizi için ikinci bir alternatif olarak Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi kullanıldı. Bu tampon için 1:1 oranda pH 8,5, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM Mg²⁺ kullanıldı. **Bölüm 5.2'** de anlatılan prosedür 10 kez tekrar edilerek üretilen DeNAno örnekleri (10 x

50 µl) birleştirilerek 500 µl hacminde DeNAno elde edildi. Örnek diyaliz membranı içerisine yerleştirildi. Membranın her iki ucu klipsler ile sabitlendi. 500 ml'lik beher içerisine 250 ml Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi eklendi. Beherin içerisine manyetik karıştırıcı balık eklendi. Hazırlanan diyaliz membranları da bu beherin içerisine yerleştirildi. Diyaliz işleminin gerçekleşmesi için örnekler bir gece +4 °C'de manyetik karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Örnekler 24 saat boyunca diyaliz edildi. Diyaliz işlemi sonlandırılana kadar, ortalama 6-8 kez örneğin diyalizi için kullanılan Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi değiştirildi. İlk 4-5 saatte saat başı diyaliz için kullanılan Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi uzaklaştırılıp, yeni Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ortama eklendi. 12 saat sonra bu işlem tekrarlandı. Gün içerisinde aynı işlem 4 saatte bir tekrarlandı.

Crick, Brenner ve arkadaşlarının 1961 yılında yaptıkları çalışma, genetik kodun üçlü kodon oluşumunu bize göstermiştir (113). 3 nükleotit 1 aminoasit kodlamaktadır. Buna göre 1000 bp yaklaşık 333 amino asite karşılık gelmektedir. Bu aminoasit değeri ise 37 kDa olarak hesaplanmaktadır (155). Buna göre büyüklüğü 100 bp olan kalıp halkasal DNA yaklaşık olarak 33 aminoasite karşılık gelmektedir. 33 aminoasitin değeri de 3,7 kDa'ya karşılık geldiğinden DeNAno'nun büyüklüğünün 10 kDa'dan daha fazla olduğu öngörülmektedir. 3,5 kDa diyaliz membranı kullanıldığında, DeNAno ve kalıp DNA membran içerisinde kalırken, diğer bileşenlerin (dNTP ve bağlanmayan küçük sekanslar) dışarı çıkması öngörüldü. Böylece DeNAno'nun saflaştırılması için 3,5 kDa por çapına sahip diyaliz membranının yeterli olacağı tespit edildi.

Örnekler diyaliz sonrası deney tüpü içerisinde toplandı. Deney tüpünün ağız kısmı kesilerek alüminyum folyo ile kapatıldı. Örnekler içerisindeki buzun süblimleşmesi için alüminyum folyoda delikler açıldı. İçerisinde diyalizden elde edilen örnek bulunan deney tüpü sıvı azot içerisinde bekletilerek donduruldu. Donmuş haldeki örnek Liyofilizatör cihazına yerleştirildi ve bir gün boyunca cihaz içerisinde bekletildi. Liyofilizasyon yöntemi, çözelti halindeki örneğin dondurulmasını takiben basıncın azaltılmasıyla buz kristallerinin süblimleşmesi, böylece istenilen örneğin kurutulmasını içermektedir.

İçerisindeki buzun süblimleşmesi sonucu toz hale gelen örnek kullanıma göre 100 µl distile su veya Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile çözüldü.

5.4 Karakterizasyon

DeNA^o'nun karakterizasyonu aşağıdaki aşamaları içermektedir:

1. DNA nanoparçacık nükleotit miktar tayini: NanoDrop
2. RCA ürün miktar ve verim hesabı: Oligreen DNA boyası
3. Molekül ağırlığı tespiti: Agaroz jel
4. Büyüklük ve morfoloji analizi: SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)
5. Dispersite analizi: Konfokal mikroskobu
6. Büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

5.4.1 DeNA^o'nun nükleotit miktar tayini: NanoDrop

DeNA^o üretimi ve saflaştırılması sonrasında Nanodrop kullanılarak miktar tayini yapıldı. 1 µl örnek alınarak cihaza yüklendi. Analiz için "ssDNA" seçeneğinde okutularak ng/µl cinsinden örneklerin miktarı tayin edildi. Okuma öncesi cihaza referans değeri olarak kullanılmak üzere 1 µl NFW okutuldu.

5.4.2 RCA ürün miktar ve verim hesabı: Oligreen DNA boyası

Oligreen ssDNA reaktifi, bir çözeltideki oligonükleotitleri ve tek iplikli DNA'yı (ssDNA) ölçmek için kullanılan hassas bir floresan nükleik asit boyasıdır. Bu reaktif 100 pg/ml'ye kadar düşük miktardaki konsantrasyonları ölçmeye imkan tanımaktadır (156). UV spektrofotometre ile yapılan 260 nm absorbanstaki ölçümlerde, serbest nükleotitler ve tepkime sırasında bulunan kirletici maddeler ölçüm hassasiyetini azaltmaktadır. Oligreen boyası ile yapılan kantitatif analiz, 6 bazdan daha kısa olan oligonükleotitler ve buna bağlı olarak serbest nt'lerden gelebilecek sinyallerden etkilenmemektedir. Böylece yüksek hassasiyet ile ölçüm sağlanmaktadır (156).

Bu yöntem için öncelikle halkasal kalıp DNA üretimi için kullanılan 40 nt primer sekans ile 0,005-50 ng/ml aralığında bir standart eğri hazırlandı. Standart eğri ve ölçümü yapılacak örnekler belirlenen mikarlarda TE tamponu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) içerisine alındı ve üzerlerine hesaplanan miktarlarda Oligreen reaktifi eklendi. Eklenen TE tamponu, Oligreen reaktifi ve oligomer miktarları Tablo 5.4.1’de detaylı olarak gösterildi.

Tablo 5.4.1. Oligreen DNA boyası ile miktar tayini için gerekli bileşenlerin konsantrasyon ve miktarı

Oligomer konsantrasyonu (ng/ml)	TE tamponu (µl)	Oligreen reaktifi (µl)	50 ng/ml Oligomer (µl)
0,005	299,88	300	0,12
0,01	299,4	300	0,6
0,05	298,8	300	1,2
0,1	294	300	6
0,5	240	300	60
Oligomer konsantrasyonu (ng/ml)	TE tamponu (µl)	Oligreen reaktifi (µl)	100 ng/ml Oligomer (µl)
50	0	300	300

Hazırlanan örnekler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine yerleştirildi. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 480 nm uyarılma/520 nm emisyon altında spektrofotometre cihazında ölçümleri yapıldı. Elde edilen kantitatif sonuçlar analizi yapılmak üzere kaydedildi.

5.4.3 Molekül ağırlığı tespiti: Agaroz jel

%2’lik agaroz jel ile tampon sıvı içerisinde, oluşturulan bir elektriksel alan yardımıyla örnekler yürütülerek örneklerin molekül ağırlığının karakterizasyonu yapıldı. Elektroforez yöntemi, elektriksel alan içerisinde, ortamdaki çözülmüş moleküllerin

elektrik yüklerinin fazlalığına göre hızlarının belirlenmesiyle hareket etmeleri prensibine dayanmaktadır. Elektriksel yükler, moleküllere ağırlık kazandırdığından, büyük moleküller jel üzerinde hızlı ilerlemekte zorluk çekerken, küçük moleküller daha rahat hareket edebilmektedir. Bu nedenle büyük moleküller, küçük moleküllerin daha gerisinde kalmaktadır. Molekülün artı kutup olan anot tarafına doğru mu yoksa eksi kutup olan katot tarafına doğru mu hareket edeceği moleküllerin üzerindeki net yük miktarı ile belirlenmektedir. Serbest fosfat gruplarını üzerlerinde barındıran nükleik asitler eksi yüklü moleküllerdir. Bu nedenle DNA ve RNA molekülleri jel üzerinde eksi kutuptan (katottan) artı kutba (anoda) doğru hareket ederler. RCA ürünü olan DeNANO ve halkasal kalıp DNA ürününün başarı ile yapılıp yapılmadığı, agaroz jeldeki bant sayısı ve bantın bulunduğu değer göz önüne alınarak tespit edildi. Buna göre; DeNANO, halkasal DNA, C39 sekansı ve primer ayrı ayrı agaroz jel kuyucuklarına yüklenerek 100 V ile 40 dk yürütülmüştür. Bu örnekler ek olarak bir de halkasal DNA'yı oluşturan C39 sekansı ile primer sekans ligaz enzimi eklenmeden aynı deney tüpü içerisinde birleştirilip agaroz jel üzerinde yürütüldü. Jel içerisindeki RedSafe, oluşan bantların UV altında görüntülenmesini sağladı.

5.4.4 Büyüklük ve morfoloji analizi: SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

SEM mikroskobu kullanılarak DeNANO ve konjugatları (DeNANO/FAM ve DeNANO-MagNP/FAM) ile MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve morfoloji analizi yapıldı. DeNANO örneği hazırlanırken iki farklı uygulama kullanıldı. (i) Öncelikle, DeNANO nanoparçacıklardan 10 µl alındı ve üzerine bakır plaka yerleştirilmiş SEM için örnek yerleştirme aparatının yüzeyine bırakıldı. 1 gece kuruması için +4 °C'de buzdolabı içerisinde bekletildi. Kurutulan örnek 15 saniye boyunca altın ile kaplanarak iletkenliğinin artırılması sağlandı. (ii) İkinci olarak, DeNANO nanoparçacıklardan 10 µl yeni bir ependorf içerisine alındı. Bu örnek 70 °C'de 20 dakika bekletildi. Böylece oligonükleotit yapıdaki DeNANO nanoparçacığının nükleotitleri arasında oluşan moleküler etkileşimler ile diğer nanoparçacıkları birbirine çekerek agregasyon oluşturması engellendi. Isıtma sonrasında örneğe pipetaj yapılarak homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Örnek ependorfтан alınarak üzerine bakır plaka yerleştirilmiş SEM için örnek yerleştirme

aparatinın üzerine bırakıldı. Daha sonra bu örnek vakumlanarak kurutulmak üzere bir gece desikatör cihazı içerisinde bekletildi. Kurutulan örneğin iletkenliğinin artırılması için yüzeyi 15 saniye boyunca altın ile kaplandı. İki farklı şekilde hazırlanan örnekler SEM mikroskobu ile görüntülendi. Uzun süreli saklamalar için, örnekler toz ve nemden korunacak şekilde kapaklı bir petri kabına alındı ve +4 °C’de muhafaza edildi.

5.4.5 Dispersite Analizi: Konfokal mikroskobu

Hoechst floresan mikroskopi ve akış sitometresin yöntemlerinde kullanılan, 350 nm uyarılma/461 nm emisyon’a sahip bis-benzimid türü bir floresan DNA boyasıdır. 30 µl DeNA_o (1500-2000 ng) örneği alınarak yeni bir ependorf içerisine aktarıldı. 70 oC’de 20 dakika ısıtılarak oligonükleotit yapısına bağlı olarak oluşan birkaç nanoparçacık arasındaki geçici hidrojen bağlarının açılması sağlandı. 30 µl DeNA_o, 100 µl’ye tamamlanacak şekilde üzerine 70 µl NFW eklendi. 100 µl’lik örneğe, 1µl Hoechst DNA boyası eklendi ve boyanın homojen dağılması için pipetaj yapıldı. DeNA_o örneği Hoechst ile 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 35 mm’lik tabanı cam petri kabına aktarıldı. Hoechst ile boyanan DeNA_o, Hoechst 33342 kanalı (350 nm uyarılma ve 461 nm emisyon) kullanılarak konfokal mikroskopta görüntülendi.

5.4.6 Büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

ZetaSizer cihazı, örneğin büyüklüğünü parçacık içerisinden geçebilen lazer ışınlarının saçılım açısına bağlı olarak belirlemektedir. Parçacık büyüklüğü arttıkça saçılım açısı logaritmik bir şekilde düşerken saçılan ışının şiddeti artmaktadır. Küçük parçacıkların saçılım açıları daha fazla, saçılan lazer şiddeti ise daha düşüktür. Örneğe kırmızı ve mavi ışık gönderildiğinde örnek üzerinden yansıyan ve kırılan ışık dedektör tarafından algılanarak saçılma bilgileri yazılıma yönlendirilmektedir. Zeta potansiyel değeri ise; cihaz tarafından, parçacıklar arasındaki itme ve çekme kuvvetleri baz alınarak çeşitli formüllerle hesaplanmaktadır. Metod olarak tavsiye edilen Smoluchowski modeli bu hesaplamada cihaz ve yazılım sistemi tarafından otomatik olarak kullanılmaktadır. Sıvı içerisinde bulunan aynı yüke sahip tanecikler birbirini iterken, farklı yüke sahip tanecikler

birbirini çekmektedir. Bu itme ve çekme kuvveti zeta potansiyeli değerine bağlı olmakla beraber, parçacığın içinde bulunduğu sıvının pH değeri ile de değişebilmektedir. Parçacıkların büyüklük ölçümü için standart bir kuartz küvet yeterliyken, zeta potansiyeli için kılcal küvetler kullanılmaktadır.

İki farklı ortamda diyaliz edilerek saflaştırılan DeNA_{no} örnekleri ve konjugatları (DeNA_{no}/FAM ve DeNA_{no}-MagNP/FAM), MagNP nanoparçacığı ve MagNP/FAM konjugatı ZetaSizer cihazında ayrı ayrı ölçüldü. Bunun için öncelikle deney tüpü içerisine, 995 µl distile su alındı. Distile suyun üzerine 5 µl ölçümü yapılacak örnek eklenip, vorteks ile karıştırıldı. Homojen hale gelen örnekler sırayla kuartz küvete ve kılcal küvete alınarak ZetaSizer cihazında büyüklük ve zeta potansiyel ölçümleri yapıldı.

5.5 DeNA_{no}'nun Konjugasyonu

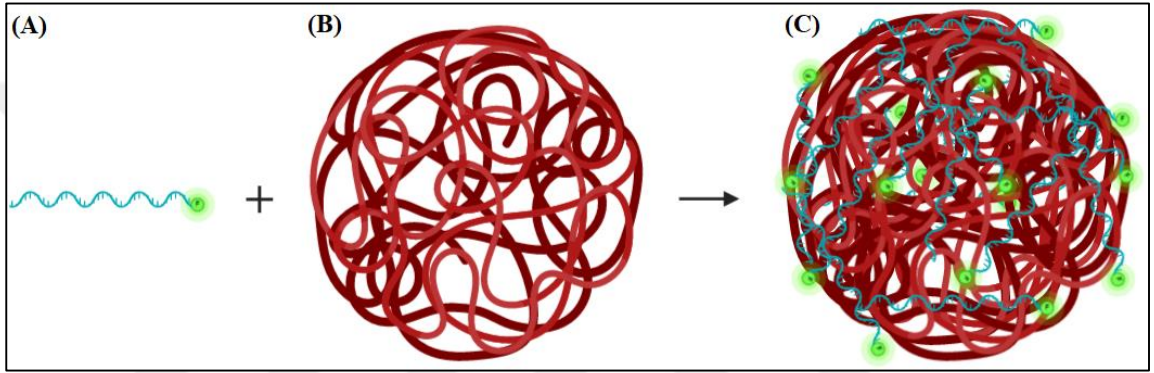
DeNA_{no}'nun MagNP ile konjugasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. (i) Birinci aşamada DeNA_{no}'ya bağlanacak olan MagNP ile DeNA_{no}'ya komplementer bir floresan işaretli bağlayıcı sekansın (FAM) konjugasyonu yapıldı. (ii) İkinci aşamada ise bu ara sekans aracılığıyla DeNA_{no}'ya MagNP'nin bağlanması sağlandı. Ayrıca bu konjugasyonun öncesinde DeNA_{no} ile komplementer ara sekansın bağlandığı da gösterildi.

5.5.1 DeNA_{no}'nun floresan işaretli bağlayıcı sekans ile konjugasyonu:

DeNA_{no}/FAM

DeNA_{no} ve floresan işaretli bağlayıcı sekansın (FAM) konjugasyonu, (1) Denatürasyon ve (2) Tavlama olmak üzere PCR reaksiyonunun ilk iki basamağı taklit edilerek oluşturulan bir sistemle yapıldı. Buna göre; 50:1 oranda kullanılan DeNA_{no} ve floresan işaretli bağlayıcı sekans yeni bir deney tüpü içerisine alındı. Pipetaj ile örneklerin homojen olarak karışması sağlandı. 95 °C'de 1 dakika tutularak denatürasyonu sağlandı. Örnekler cihaz içerisinde 55 °C'ye soğutularak tavlama aşamasının gerçekleştirilmesi için 3 dk bu sıcaklıkta bekletildi. Bu iki işlemin sonunda, örneklerin oda sıcaklığına gelmesi için cihaz 26 °C'ye soğutuldu. Ara Sekans, 5' CAACGTCACCTCCGAATCAT 3' olmak

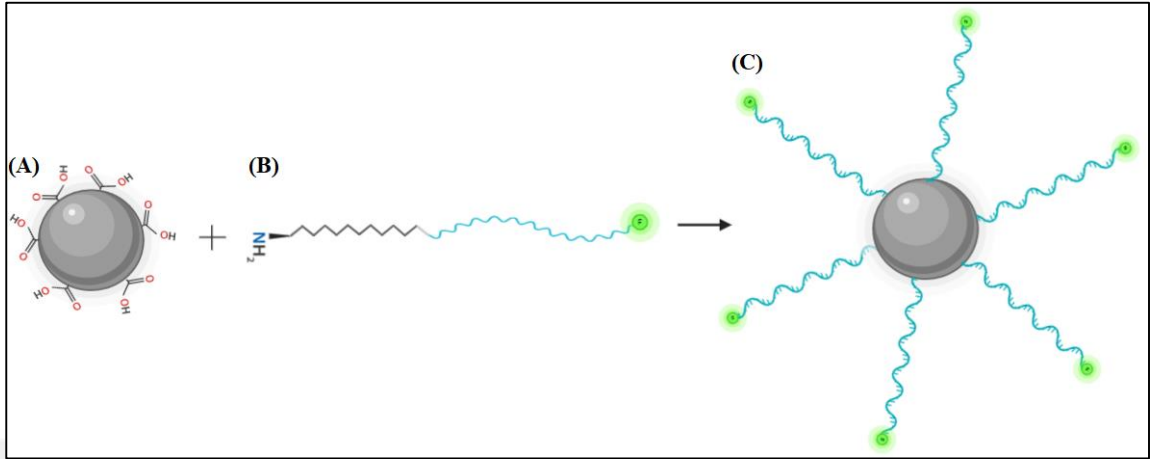
üzere 20 nt'ten oluşmaktadır (Tablo 5.1.5). Bu sekans DeNA_{no}'yu oluşturan oligonükleotit sekansının belirli bir bölgesine komplementer olarak dizayn edildi. Sekansın 5' ucu NH₂/C12, 3' ucu ise FAM ile modifiye edildi. Komplementer ara sekansın yüzeyine bağlı FAM ajanı sayesinde floresan ışımaya sahip olan DeNA_{no}/FAM konjugatı (Şekil 5.5.1) konfokal mikroskopta 495 nm uyarılma/520 nm emisyon'da görüntülendi.



Şekil 5.5.1. DeNA_{no} ve floresan işaretli bağlayıcı sekans konjugasyonunun şematize edilmesi (A) Floresan işaretli bağlayıcı sekans, (B) DeNA_{no}, (C) DeNA_{no}/FAM konjugatı

5.5.2 MagNP'lerin DeNA_{no}'ya floresan işaretli bağlayıcı sekans ile konjugasyonu: MagNP/FAM

DeNA_{no}'ya komplementer bağlayıcı ara sekansın (BS veya FAM) MagNP nanoparçacığına entegrasyonu EDC/NHS kimyasına dayanmaktadır. Bu kimyasal yöntem, komplementer ara sekansın 5' ucunda bulunan NH₂ grubunun, poliakrilik asit (PAA) kaplı MagNP'lerin yüzeyinde bulunan karboksil grup (COOH) ile bağlanması sonucu bir su molekülünün (H₂O) ortamdaki uzaklaşarak bu iki grubun arasında amit bağı oluşmasını içermektedir (Şekil 5.5.2)



Şekil 5.5.2. MagNP ile BS veya floresan işaretli bağlayıcı sekansın EDC/NHS yöntemi kullanılarak konjugasyonunun şematik gösterimi (A) PAA ile kaplanarak yüzeyinde birçok COOH grubu bulunduran MagNP nanoparçacıkları (B) 5' ucundan 12 karbon atomuyla bağlanmış NH₂ grubuna ve floresan özelliğe (FAM) sahip DeNA'ya komplementer bağlayıcı sekans (C) Yüzeyine birçok komplementer bağlayıcı sekans bağlanan MagNP'nin (MagNP/FAM veya MagNP/BS) şematik olarak gösterimi.

Konjugasyon için 60 µg (0,26 µmol) MagNP için 10 kat daha az miktarda (6 µg) bağlayıcı ara sekans, 40 kat fazla (10,4 µmol) EDC ve 80 kat fazla (20,8 µmol) NHS kullanıldı. Konjugasyonda kullanılan kimyasalların detayları Tablo 5.5.1'de gösterildi.

Tablo 5.5.1. MagNP/FAM konjugasyonu için gerekli bileşenlerin eklenme miktarları

	Konsantrasyon (µg)	Mol miktarı (µmol)	Miktar (µl)
MagNP	60	0,26	47,62
DNA sekansı	6	0,00086	8,6
EDC	1920 (2 mg)	10,4	100
NHS	2415 (2,4 mg)	20,8	300
dH ₂ O	-	-	1.044
Toplam			1500

EDC ve NHS hazırlanırken malzemeler ayrı ayrı tartıldıktan sonra çözücü olarak DMSO kullanıldı. Bu nedenle ilk etapta konjugasyon içerisindeki DMSO miktarı %87'dir. DMSO oranının %30'a düşürülebilmesi için gerekli distile su miktarının 1.044 µl olduğu belirlendi. Distile su, MagNP, EDC ve NHS pipetaj yardımı ile homojen hale

getirilmesi için karıştırılarak 15 dk ısıtıcı cihaz içerisinde 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. 15 dakikalık inkübasyonun sonunda karışıma FAM veya BS sekansı eklendi (Tablo 5.1.5). Çözeltinin pH’sı 1M Trietilamin (11 µl) kullanılarak ayarlandı. Çözelti pH ayarlamasından sonra tepkimenin gerçekleşmesi için gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün elde edilen konjugat, Amicon Filtre (3,5 kDa) içerisinde 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Filtrenin alt kısmına sıvı geçişi olduğu için, üzerine alta geçen sıvı miktarı kadar distile su eklendi. Filtrede kalan konjugatın çözünmesi için pipetaj yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Üçüncü olarak, 5 dk boyunca 4000 rpm’de santrifüj edildi. Filtrede kalan yaklaşık 200 µl konjugata pipetaj yapıldı ve 4000 rpm’de 5 dk daha santrifüj edildi. Dördüncü santrifüjün sonunda filtrede kalan 110 µl kadar konjugat pipetaj yapıp homojen olarak dağıtıldıktan sonra yeni bir deney tüpüne aktarıldı. Son olarak konjugatın pH’sı 7,5 olarak belirlendi. pH’sının daha yüksek veya daha düşük çıkması halinde, 7-7,5 olarak sabitlenmesi gerekmektedir.

5.5.3 MagNP/FAM karakterizasyonu

MagNP/FAM konjugatının karakterizasyonu aşağıdaki aşamaları içermektedir:

1. Floresan özelliği: Spektrofotometre
2. Dispersite Analizi: Konfokal mikroskobu
3. Büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer
4. Büyüklük ve morfoloji analizi: SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

5.5.3.1 MagNP/FAM konjugasyonunun floresan incelemesi: Spektrofotometre

MagNP/FAM konjugatı, MagNP nanoparçacığı ve floresan işaretli bağlayıcı sekans Tablo 5.5.2’de belirlenen miktarlarda alınarak distile su ile seyreltildi. Referans değer (Blank) olarak sadece distile su kullanıldı. Kullanılan konjugatın içeriğinde FAM floresan ajanı bulunduğu için 495 nm uyarılma/520 nm emisyon’da spektrofotometre cihazında floresan okuması yapıldı ve çıkan kantitatif sonuçlar kaydedildi.

Tablo 5.5.2. MagNP/FAM konjugatının floresan spektroskopisi için kullanılan örneklerin miktar ve konsantrasyon değerleri

Örnek adı	dH ₂ O hacmi (µl)	Örnek hacim (µl)	Konsantrasyon
MagNP (1,26 mg/ml)	184,13	15,87	20 (µg)
MagNP (1,26 mg/ml)	168,26	31,74	40 (µg)
MagNP (1,26 mg/ml)	152,39	47,61	60 (µg)
MagNP (1,26 mg/ml)	136,52	63,48	80 (µg)
MagNP (1,26 mg/ml)	120,65	79,35	100 (µg)
MagNP/FAM	199	1	1:199
MagNP/FAM	195	5	1:39
MagNP/FAM	175	25	1: 7
MagNP/FAM	150	50	1:4
FAM (100 nmol/ml)	199,8	0,2	0,02 (nmol)
FAM (100 nmol/ml)	199,6	0,4	0,04 (nmol)
FAM (100 nmol/ml)	199,4	0,6	0,06 (nmol)
FAM (100 nmol/ml)	199,2	0,8	0,08 (nmol)
FAM (100 nmol/ml)	198	2	0,2 (nmol)

5.5.3.2 MagNP/FAM konjugasyonunun dispersite analizi: Konfokal mikroskobu

10 µl konjugasyon örneği tabanı cam olan 35 mm'lik petri kabına aktarıldı. Yüzeyine bağlanan floresan işaretli bağlayıcı sekans sayesinde konfokal mikroskopta 495 nm uyarılma/520 nm emisyon'da görüntüledi. Örnek uzun süreli kullanımlarda floresan etkinliğini kaybetmemesi için ışıktan korunarak +4 °C buzdolabında muhafaza edildi.

5.5.3.3 MagNP/FAM konjugasyonunun büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

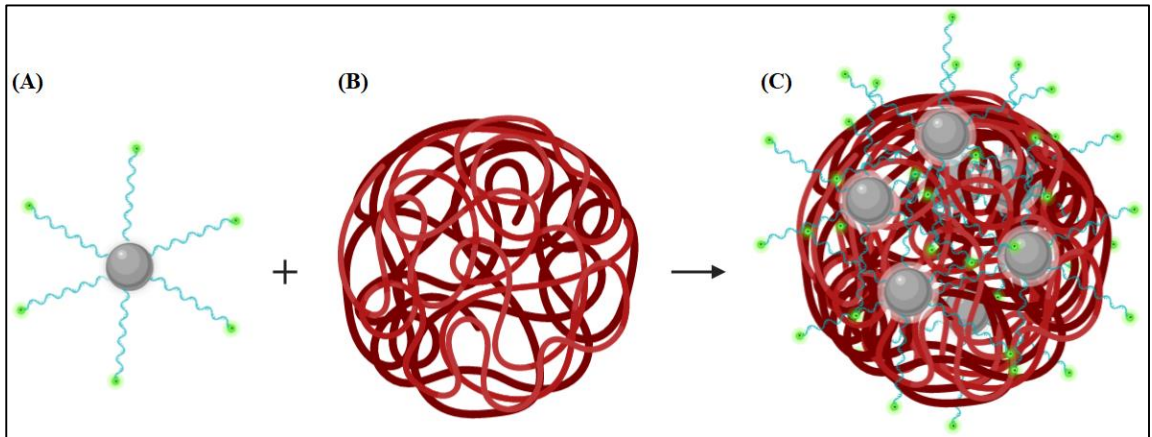
MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve yüzey yükü analizinin yapılabilmesi için ZetaSizer cihazından faydalanıldı. 5 µl konjugat örneği 195 µl distile su ile seyreltildi ve vorteks ile karıştırıldı. Seyreltilen örnek sırası ile kuartz küvete ve kılcal küvete alınarak ZetaSizer cihazında analiz edildi.

5.5.3.4 MagNP/FAM konjugasyonunun büyüklük ve morfoloji analizi: SEM

10 µl MagNP/FAM konjugatı bakır plaka yerleştirilmiş SEM için örnek yerleştirme aparatı üzerine alındı. Örnek kuruması için bir gece desikatör cihazı içerisinde vakumlandı. Kuruyan örnekler 15 saniye boyunca altın ile kaplanarak iletkenliği artırıldı. SEM mikroskobu ile görüntüledi.

5.5.4 DeNAno'nun MagNP ile FAM bağlı komplementer ara sekans yardımıyla konjugasyonu: DeNAno-MagNP/FAM

DeNAno-MagNP/FAM konjugasyonu DeNAno/FAM konjugasyonuna benzer olarak PCR'ın ilk iki aşamasının taklit edilmesiyle hazırlanan prosedür ile yapıldı. 1:1 hacim oranında MagNP/FAM konjugatı (30 µg) ve DeNAno (2000 ng) deney tüpü içerisine alındı. Denatürasyon aşaması için ısıtıcı cihaz içerisinde 95 °C'de 1 dakika tutuldu. Cihaz örnekler içerisindeyken 55 °C'ye soğutuldu. Tavlama aşaması için örnekler 55 °C'de 3 dk tutuldu. Cihaz 26 °C'ye soğütularak örneklerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Böylece floresan işaretli bağlayıcı sekansa bağlı MagNP nanoparçacıkları DeNAno ile birleşerek DeNAno-MagNP/FAM konjugatı elde edildi (Şekil 5.5.3). Bu işlem floresan işaretli olmayan bağlayıcı sekans (BS) için de aynı şekilde yapıldı.



Şekil 5.5.3. DeNAno ve MagNP'nin, DeNAno'ya komplementer bağlayıcı ara sekans yardımı ile konjugasyonu (A) MagNP/FAM konjugatı, (B) DeNAno, (C) DeNAno-MagNP/FAM konjugatı

5.5.5 DeNano-MagNP/FAM karakterizasyonu

DeNano-MagNP/FAM karakterizasyonu aşağıdaki aşamaları içermektedir:

1. Floresan özelliğinin incelenmesi ve dispersite analizi: Konfokal mikroskobu
2. Büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer
3. Büyüklük ve morfoloji analizi: SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)

5.5.5.1 DeNano-MagNP/FAM konjugasyonunun floresan özelliğinin incelenmesi ve dispersite analizi: Konfokal mikroskobu

Hazırlanan DeNano-MagNP/FAM örneğinden 10 µl alınarak tabanı cam olan 35 mm'lik petri kabına aktarıldı. Yüzeyine bağlanan MagNP/FAM konjugatı sayesinde floresan özellik kazanan DeNano-MagNP/FAM konjugatı konfokal mikroskopta 495 nm uyarılma/520 nm emisyon'da görüntüledi. Örnek uzun süreli kullanımlarda floresan etkinliğini kaybetmemesi için ışıktan korunarak +4 °C buzdolabında muhafaza edildi.

5.5.5.2 DeNano-MagNP/FAM konjugasyonunun büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

DeNano-MagNP/FAM konjugatından 5 µl alınarak 195 µl distile su ile seyreltildi. Vorteks ile homojen olarak dağılması sağlandı. Seyreltilen konjugat örneği sırası ile kuartz küvete ve kılcal küvete alınarak ZetaSizer cihazında büyüklük ve zeta potansiyel ölçümleri yapıldı.

5.5.5.3 DeNano-MagNP/FAM konjugasyonunun büyüklük ve morfoloji analizi: SEM

Üzerine bakır plaka eklenmiş SEM için örnek yerleştirme aparatına 10 µl DeNano-MagNP/FAM konjugatı eklendi. Konjugat kuruması için bir gece desikatör cihazı içerisinde vakumlandı. Kuruyan örnekler 15 saniye boyunca altın ile kaplanarak iletkenliği artırıldı. Hazırlanan konjugat SEM mikroskobu kullanılarak görüntüledi.

5.6 Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre kültürü deneyleri için Panc02 mürin pankreas kanseri (Mus musculus, pankreatik duktal adenokarsinoma, epitel) ve Panc1 insan pankreas kanseri (Homo sapiens, pankreatik duktal karsinoma, epitel) hücre hatları kullanıldı. Panc02 hücre hattı Greifswald Üniversitesi'nden (Almanya) Prof. Dr. Lars Ivo Partecke ve Dr. Christine Hackbarth tarafından elimize ulaştırıldı. Panc1, hücre hattı ise Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden temin edildi.

Panc02 hücre hattı; ATCC firmasından temin edilen DMEM W/GLUTAMAX-I, PYR, 4.5G GLU hücre medyası içerisine %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımı ve %10 FCS (Fetal buzağı serum) eklenerek oluşturulmuş tam medya ile büyütüldü. Panc1 hücre hattı; ATCC firmasından temin edilen DMEM için formüle edilmiş hücre medyası içerisine %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotik karışımı ve %10 FBS (Fetal sığır serum) eklenerek oluşturulmuş tam medya ile büyütüldü. FBS ve antibiyotik eklenerek hazırlanan besiyerleri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi ve 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklandı.

25 ve 75 cm² 'lik hücre kültürü petrilere ekimleri yapılan hücreler etüv (%5 CO₂ içeren 37 °C) içerisinde inkübe edilerek büyütüldü. Hücre canlılığı testleri için 96 kuyucuklu hücre kültürü petrilere, konfokal mikroskopu için yapılan çalışmalarda ise 35 mm'lik cam tabanlı petri kaplarına hücrelerin ekimleri gerçekleştirildi. Hücrelerin bir gece boyunca hücre kültürü petrilere tutunup morfoloji almaları beklendi. Daha sonra istenilen uygulamaya göre yalın demir oksit, MagNP, DeNANO veya konjugasyonlar belirlenen miktarlarda ve sürelerde hücrelere uygulandı ve etüv içerisinde inkübe edildi.

Gerçekleştirilecek deneyler doğrultusunda veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda hücre pasajlama işlemi yapıldı. Bu işlem için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırıldı. 75 mm² 'lik hücre kültürü petrisi içerisi 2 ml 1X PBS ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. Petri kabı içerisine 2 ml Tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (%0,25) eklenerek etüvde 5 dakika boyunca bekletildi.

İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml DMEM besiyeri eklenecek tripsinin aktivitesi durduruldu. Hücreler 15 ml hacimdeki santrifüj tüpüne alındı. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelere 1 ml taze besiyeri eklendi. Hücrelerin besiyeri içerisinde homojen bir şekilde dağılması için pipetaj yapıldı. Hücre sayımı için hazır hale gelen homojen hücre süspansiyonu içerisinde 10 µl alınarak 1:1 oranda tripan mavisi ile karıştırıldı. Neubauer hemositometresinin kanalına 10 µl tripan mavisi ile karıştırılan hücre süspansiyonu aktarıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10^4 ile çarpıldı. Daha sonra 1:1 oranda seyreltildiği için 2 ile çarpıldı. 25 cm²'lik petri kaplarına 7×10^5 hücre veya 75 cm²'lik petri kaplarına $1,5 \times 10^6$ hücre, ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi tamamlandı. Her hücre pasajlama işlemi sonrasında hücrenin pasaj numarası bir sayı artırıldı.

5.6.1 Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığının belirlenmesi için yapılan deneylerde MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromit) ajanı kullanıldı.

MTT ajanı kullanılarak yapılan canlılık testi kolorimetrik bir analizdir. Canlı hücrelerde dehidrogenaz enzimi bulunurken, ölü hücrelerde bulunmaz. MTT testinin temel prensibi; petri kabında canlılığını kaybetmeyerek çoğalabilen hücrelerdeki dehidrogenaz enziminin aktivitesini ölçmeye dayanmaktadır. Dehidrogenaz enzimleri, bir tetrazolyum tuzu olan MTT ajanını suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgemektedir. Formazan kristalleri %100 DMSO kullanılarak çözündürülebilirken su içerisinde çözünmemektedir. DMSO ile çözülen formazan kristallerinin konsantrasyonuna bağlı olarak artan mor renk kolorimetrik bir analiz yapılmasını sağlamaktadır. Hücre kültürü petrisinde oluşan mor renkli sıvıdan, ELISA okuyucu veya spektrofotometre cihazı kullanılarak kantitatif sonuçlar elde edilmektedir.

MTT testi için öncelikle, 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine sayıları 5×10^4 olacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Ekimi gerçekleştirilen hücreler, petri kabına tutunmaları ve morfoloji almaları için etüv içerisinde bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben hücrelere; yalın demir oksitler, PAA ile kaplanmış demir oksitler (MagNP) ve DeNA_{no}'ya bağlayıcı ara sekans (BS) ile konjuge edilmiş MagNP'ler (DeNA_{no}-MagNP/BS) çeşitli konsantrasyonlarda uygulandı (MTT testi sonrasında okumaları etkilememesi için MagNP'ler ara sekans olarak floresan ajanı bulunmayan BS ile konjuge edildi). Negatif kontrol olarak hücrelere sadece hücre besi yeri uygulandı. Uygulama sonrasında MagNP'lerin, yalın demir oksit parçacıklarının ve konjugatların 24, 48 ve 72 saat boyunca hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri gözlemlendi. Her 24 saat sonrasında hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak yeni besi yeri içerisinde 10'ar µl MTT ajanı hücrelere uygulandı. MTT ajanı uygulanan hücreler 4 saat boyunca etüv içerisinde inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonunda hücre petrisinin altına çöken formazan tuzlarının üzerindeki besi yerleri uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 200 µl %100 DMSO uygulanarak formazan tuzlarının çözünmesi için 10 dakika oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak bekletildi. Referans değer (blank) olarak %100 DMSO kullanıldı ve 570 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbans değerlerinin ölçümleri yapıldı. Alınan kantitatif sonuçlar kaydedildi.

5.6.1.1 Yalın demir oksit parçacıkları ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücrelerinde hücre canlılığı testi

Bölüm 5.6 ve Bölüm 5.6.1'de anlatıldığı gibi 96 kuyucuklu hücre petrisinin her kuyucuğuna aynı miktarda ve üçer tekrar olacak şekilde ekimleri yapılan Panc02 ve Panc1 hücreleri bir gece etüv içerisinde bekletildi. İnkübasyon sonrası MagNP yapımında kullanılan demir oksit parçacıkları 10-250 µg/ml konsantrasyon aralığında (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 200, 250 µg/ml) hücrelere uygulandı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda petri kapları içerisindeki hücre besi yeri uzaklaştırıldı. Yeni besi yeri içerisine MTT ajanı eklendi ve hücrelere uygulandı. Hücre canlılıklarının tespiti için Bölüm 5.6.1'de anlatıldığı gibi spektrofotometre cihazında 570 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri ölçüldü.

5.6.1.2 PAA kaplı MagNP'ler ile muamele edilen Panc02 mürin pankreas kanseri ve Panc1 insan pankreas kanseri hücrelerinde hücre canlılığı testi

96 kuyucuklu hücre petrisinin her kuyucuğuna eşit miktarda ve üçer tekrar olacak şekilde Bölüm 5.6 ve Bölüm 5.6.1'de anlatıldığı gibi ekimleri yapılan Panc02 ve Panc1 hücrelerine, 10-250 µg/ml konsantrasyon aralığında PAA ile kaplanarak hazırlanan MagNP'ler 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. MagNP uygulanan hücrelerin canlılık analizi **Bölüm 5.6.1**'de anlatıldığı gibi MTT ajanı ile yapıldı.

5.6.1.3 MagNP'ler ile konjuge edilmiş DeNA_{no}'lar ile Muamele Edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarında hücre canlılığı testi

Bölüm 5.6 ve Bölüm 5.6.1'de ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi 96 kuyucuklu hücre petrilere Panc02 ve Panc1 hücreleri ekildi. Bölüm 5.5.4'te anlatıldığı gibi konjugasyonları gerçekleştirilen 2000 ng DeNA_{no} ve 30 µg MagNP/BS nanoparçacıklarının (DeNA_{no}-MagNP/BS) hücre canlılığı testi Bölüm 5.6.1'de anlatıldığı gibi MTT ajanı kullanılarak gerçekleştirildi. MTT testi, floresan işaretli bağlayıcı sekansın spektrofotometre ölçümleri sırasında absorbansı etkilememesi için MagNP ile floresan işaretli olmayan bağlayıcı sekansın (BS) birleştirilmesi ile elde edilen konjugat (MagNP/BS) ve bu konjugata bağlanan DeNA_{no} (DeNA_{no}-MagNP/BS) ile gerçekleştirildi.

5.6.2 Hücre seçiciliği

C39 sekansı ile üretilen DeNA_{no}'nun Panc02 hücre hattına olan seçiciliğinin gösterilmesi için Panc02 mürin pankreas kanseri hücre hattı ve Panc1 insan pankreas kanseri hücre hattı ile çalışmalar yapıldı. Buna göre 35 mm'lik cam tabanlı hücre kültürü petrilere Panc02 hücre hattından 10.000 hücre ve Panc1 hücre hattından 15.000 hücre olacak şekilde Bölüm 5.6'da anlatıldığı gibi ekildi (Hücrelerin petri kaplarına yayılım oranlarına göre Panc02 ve Panc1 hücrelerinin miktarı 10.000 ve 15.000 olarak ayarlandı). Hücre hatları, DeNA_{no}/FAM ve DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatları ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol olarak 35 mm'lik cam tabanlı petrilere ekilen hücrelere sadece hücre besi yeri uygulandı. 24 saatin sonunda hücreler 3 kez 1X PBS ile yıkandı. Daha

sonra hücrelere yeni besi yeri içerisinde 1:1000 oranında Hoechst boyası eklendi. 15 dakika etüv içerisinde inkübe edildi. Petri kapları -ışıkta korunarak- FAM floresanı için 495 nm uyarılma/520 nm emisyon ve Hoechst boyası için 350 nm uyarılma/461 nm emisyon'da LSM-800 konfokal mikroskobu altında görüntüledi.

5.6.2.1 Floresan işaretli bağlayıcı sekans ile konjuge DeNAo'ların (DeNAo/FAM) Panc02 hücrelerine seçiciliği

DeNAo'nun Panc02 hücre hattına seçici olduğunun gösterilmesi için DeNAo'ya floresan özellikli bir ara sekans bağlanarak konfokal mikroskop altında incelenmesi sağlandı. Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının Bölüm 5.6'da anlatıldığı gibi 35 mm'lik cam tabanlı petrilere ekimi yapıldı. Hücre hatları, Bölüm 5.6.2'de anlatıldığı gibi DeNAo/FAM konjugatı ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubuna yalnızca hücre besi yeri uygulandı. 24 saatin sonunda hücre petrilere 3'er kez 1X PBS ile yıkandı. İçerisine 1 µl Hoechst boyası bulunan 1 ml yeni besi yeri hücrelere uygulandı ve hücreler 15 dakika etüv içerisinde inkübe edildi. Petri kabı içerisindeki örnek uygulanmış hücreler konfokal mikroskobu altında görüntüledi.

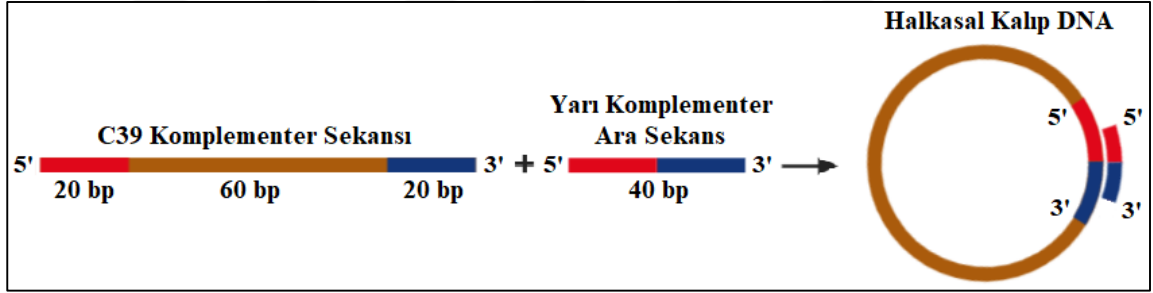
5.6.2.2 MagNP ile konjuge DeNAo'ların (DeNAo-MagNP/FAM) Panc02 hücrelerine seçiciliği

MagNP'nin DeNAo ile konjugasyonundan sonra, DeNAo'nun 3 boyutlu konformasyonunu değiştirerek seçiciliğini engelleyip engellemediğinin gösterilmesi için DeNAo-MagNP/FAM ile muamele edilen hücreler konfokal mikroskop kullanılarak incelendi. Bölüm 5.6'da anlatıldığı gibi 35 mm'lik cam tabanlı petrilere ekimi yapılan Panc02 ve Panc1 hücre hatları Bölüm 5.6.2'de anlatıldığı gibi DeNAo-MagNP/FAM konjugatı ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol gruplarına yalnızca yeni besi yeri uygulandı. 24 saatin sonunda 3'er kez 1X PBS ile yıkanan hücrelere 1 µl Hoechst boyası eklenmiş 1 ml yeni hücre besi yeri uygulandı. Hücreler 15 dakika süre ile etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda petri kabı içerisindeki DeNAo-MagNP/FAM ve Hoechst uygulanmış hücreler konfokal mikroskobu altında görüntüledi.

6 BULGULAR

6.1 DeNAno'yu Oluşturacak C39 Sekansının Halkasal Hale Getirilmesi

Şekil 6.1.1'de şematize edildiği gibi 100 nükleotitten oluşan C39 komplementer sekansı 5' ve 3' kısımlarına kısmi komplementer olan 40 nükleotitlik bir birleştirici ara sekans ile ortama eklenen T4 ligaz enzimi ve uygun ortam sıcaklığı sayesinde birleştirilerek halkasal kalıp DNA üretildi. Şekil 6.4.1'de görüldüğü gibi halkasal DNA'nın agaroz jel üzerinde gösterilmesi mümkün olurken, bu işlem T4 ligaz enzimi eklenmeden tekrarlandığında, karışımın aynı miktarda C39 komplementer sekans ve birleştirici ara sekans içermesine rağmen soluk bir bant ile tespit edildi (K sütunu). Ligaz enzimi eklenerek oluşturulan halkasal DNA ise L sütunu üzerinde daha parlak bir bant olarak tespit edildi. Bu sonuç karakterizasyon bölümünde ayrıntılı olarak işlendi.

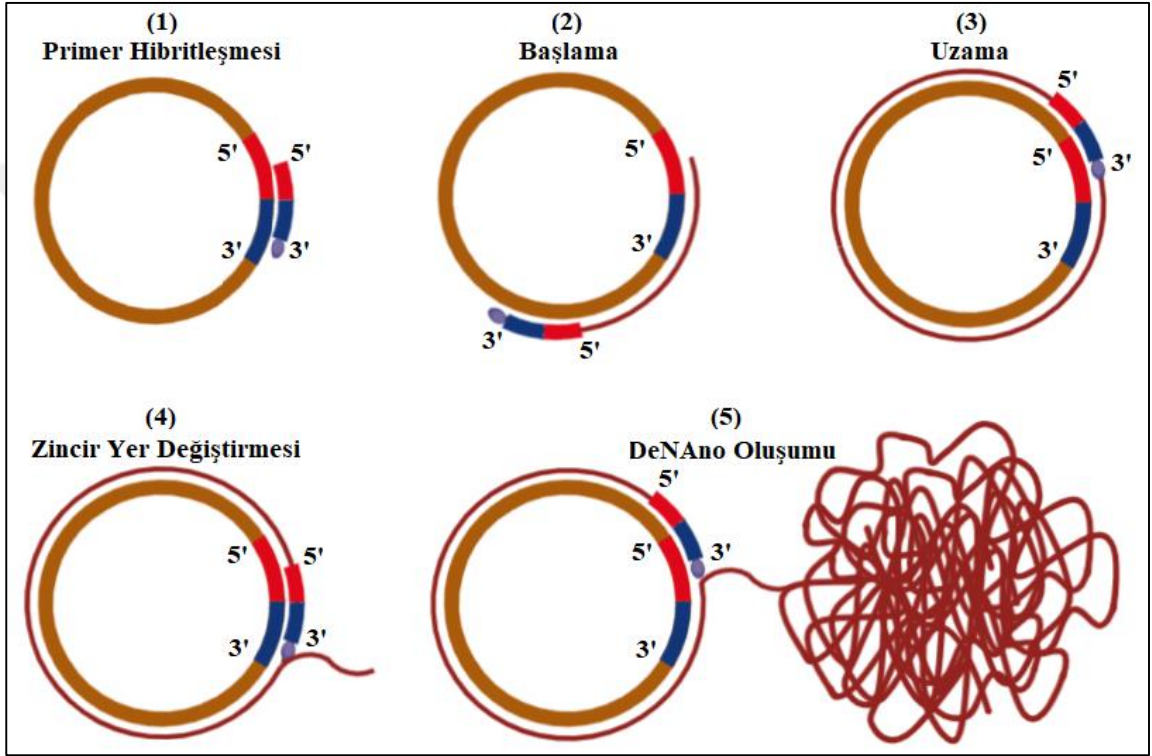


Şekil 6.1.1. Halkasal kalıp DNA üretiminin şematize edilmesi

6.2 Halkasal Kalıp DNA Kullanılarak DeNAno Üretimi

RCA metodu adı verilen ve Şekil 6.2.1'de şematize edilen DeNAno'nun üretimi dört basamaktan oluşmaktadır; primer melezleşmesi, başlama ve uzama, zincirin yerinden çıkması ve DeNAno oluşumu. Birinci basamak olan primer melezleşmesi, birleştirici ara sekansın aynı zamanda primer yani başlangıç sekansı olarak kullanıldığından Şekil 6.1.1'de şematize edilen halkasal hale getirme işlemidir. İkinci basamak başlama, phi29 polimeraz enziminin 5'-3' boyunca eklediği dNTP'ler ile oligonükleotidin sentezlenmeye başlaması aşamasıdır. Üçüncü basamak uzama, halkasal kalıp DNA boyunca oligonükleotit sentezinin devam etmesi aşamasıdır. Dördüncü basamak zincirin yerinden

çıkması, phi29 polimeraz enziminin zincir üzerinde bir tam tur atmasının ardından sentezlenen DeNAno'yu zincirden çıkararak dNTP'leri eklemeye devam etmesini kapsar. Beşinci ve son basamakta DeNAno, zincirin dışında bir makara gibi sarılarak kendi nükleotitleri üzerine katlanır ve yumak halindeki karakteristik yapısını oluşturur.



Şekil 6.2.1. Halkasal kalıp DNA üzerinden RCA yöntemiyle sentezlenen DeNAno'nun şematize edilmesi

Enzim aktivitesi devam ettiği sürece DeNAno'nun sentezlenmesi de uygulanan süre boyunca devam eder. Bu nedenle enzim aktivitesinin durdurulması için DeNAno'lar 65 °C sıcaklıkta 10 dakika bekletilir. Kalıp halkasal DNA üzerinden DeNAno üretildikten sonra saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi (Bölüm 6.3). RCA ürünlerinin moleküler ağırlığı büyük olduğu için agaroz jel üzerinde görüntülenemedi. Diğer karakterizasyon uygulamaları Bölüm 6.4'te ayrıntılı olarak incelendi.

6.3 DNA Nanoparçacığın (DeNA_{no}) Saflaştırılması

RCA yöntemi ile sentezlenen DeNA_{no}'nun saflaştırılması için santrifüj ve diyaliz olmak üzere iki farklı yöntem kullanıldı. Elde edilen ürün miktarının daha yüksek olması sebebiyle diyaliz yöntemi tercih edildi. Nanodrop sonucu dikkate alındığında, diyaliz yöntemiyle saflaştırılan DeNA_{no} miktarı (49,3 ng/μL) santrifüj yöntemine (0,6 ng/μL) kıyasla ortalama 80 kat daha fazla olarak tespit edildi. DeNA_{no} üretimi için alınan Nanodrop sonuçları Tablo 6.4.1'de ayrıntılı olarak gösterildi.

DeNA_{no}lar iki farklı sıvı ile diyaliz edilerek karşılaştırma yapıldı. İlk olarak distile su ile diyaliz edilerek saflaştırılan DeNA_{no} nanoparçacığının, iyonsuz bir ortamda olduğu için diğer nanoparçacıklar ile etkileşime girerek büyük partikülleri oluşturduğu gözlemlendi. İçerisinde Mg²⁺ katyonları bulunan Tris tamponu hazırlandı ve DeNA_{no}'lar bu tampon çözelti ile diyaliz edildi.

6.4 DNA Nanoparçacığın (DeNA_{no}) Karakterizasyonu

DeNA_{no} nanoparçacıklarının karakterizasyonu çalışması sırasıyla aşağıdaki analiz ve deneyleri içermiştir:

1. DeNA_{no}'nun karakterizasyonu için, üretim sonrası Nanodrop cihazı ile nükleotit miktar tayini analizleri, üretimin verimi ve tekrarlanabilirliği.
2. Agaroz jel elektroforezi yöntemiyle DeNA_{no} ve DeNA_{no}'yu oluşturan halkasal DNA ile oligonükleotit sekanslarının moleküler büyüklüklerinin araştırılması.
3. Oligreen boyası kullanılarak DeNA_{no}'nun miktar ve verim hesabı.
4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak DeNA_{no}'nun büyüklük ve morfolojik analizi.
5. DeNA_{no}'ya bir DNA boyası olan Hoechst uygulanarak LSM-800 Konfokal mikroskobu ile görüntülenmesi.
6. ZetaSizer cihazında, iki ayrı tampon kullanılarak diyaliz edilen DeNA_{no} nanoparçacıklarının büyüklük ve zeta potansiyel değerlerinin karşılaştırılması.

6.4.1 Miktar tayini: Nanodrop

Bölüm 5.2.1’de ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi sentezlenen DeNA’no’yu oluşturacak halkasal kalıp DNA’nın ve Bölüm 5.2.2’de anlatıldığı gibi üretilen DeNA’no’nun içeriğindeki DNA miktarı her üretim sonrası Nanodrop kullanılarak tayin edildi. Bu aşama halkasal kalıp DNA ve RCA ürünlerinin kendi arasındaki tutarlılığının hızlı takibi açısından önemlidir. Buna göre; halkasal kalıp DNA miktarı ortalama 495 ng/μL olarak ölçüldü. RCA ürünleri saflaştırma öncesi ortalama olarak 160 ng/μL olarak ölçülürken diyaliz ile saflaştırma sonrası (distile su ile) 49,3 ng/μL olarak ölçüldü. Tablo 6.4.1’de halkasal kalıp DNA ve RCA ürünlerinin Nanodrop sonuçları paylaşıldı.

Tablo 6.4.1. Halkasal DNA ve RCA ürünlerinin saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen Nanodrop sonuçları

		Saflaştırma Öncesi	Saflaştırma Sonrası
	Örnek	ng/μL	ng/μL
1. Örnek Serisi	Halkasal DNA	519,1	Santrifüj Yöntemi
	RCA ₁₅	137,0	0,1
	RCA ₃₀	165,7	0,4
	RCA ₆₀	109,1	0,6
2. Örnek Serisi	Halkasal DNA	483,5	Diyaliz Yöntemi (distile su ile)
	RCA ₁₅	158,4	18,9
	RCA ₃₀	152,5	26,8
	RCA ₆₀	149,1	49,3
3. Örnek Serisi	Halkasal DNA	478,8	Diyaliz Yöntemi (Tris-Mg ²⁺ tampon çözeltisi ile)
	RCA ₆₀	170,4	52,4

Tablo 6.4.1'de saflaştırılmamış RCA ürünleri tek üretim olarak ölçülürken, diyaliz ile saflaştırma sonrası ürünler 10 tane üretim bir arada olacak şekilde ölçüldü. Ancak yine de her bir sonuç 1 µl'de bulunan DNA miktarını göstermektedir. Santrifüjle saflaştırılan RCA ürünleri üretimdeki son hacim değişmeyecek şekilde 50 µl 1X PBS içerisinde çözülürken, diyaliz ile saflaştırılan RCA ürünleri son hacminin 5'te 1'i olan 100 µl NFW içerisinde çözüldü. Buna göre; santrifüjle saflaştırılmış 1. Örnek serisinde en yüksek 0,6 ng/µL olarak ölçülen DNA örneği 50 µL içerisinde 5 ng olarak hesaplanırken, 2. Örnek serisinde 49,3 ng/µL olarak ölçülen diyaliz yöntemiyle saflaştırılmış örnek 100 µL içerisinde 1890 ng olarak hesaplandı. İki saflaştırma yöntemi arasındaki bu büyük fark diyaliz ile saflaştırma yönteminin daha verimli olduğunu gösterdi. Bu nedenle çalışmalara diyaliz yöntemi ile devam edildi.

6.4.2 Miktar ve verim hesabı: Oligreen

DeNA'ların miktar ve verim hesabı için Oligreen nükleotit boyası kullanıldı. Öncelikle standart eğri ve DeNA için alınan absorban değerlerinin ortalaması için bir tablo oluşturuldu (Tablo 6.4.2). Buna göre 15, 30 ve 60 dk üretime sahip DeNA'ların konsantrasyonları sırasıyla 333,1, 403,1, 603,1 ng/mL olarak tespit edildi. Bu değerler toplam hacime bölüldüğünde DeNA'ların içeriğindeki DNA miktarı 16,7, 20,2, 30,2 ng olacak şekilde tayin edildi. RCA reaksiyonu için kullanılan C39 sekansı ve primer ara sekans konsantrasyonu da hesaplanarak DeNA'nun konsantrasyonundan çıkarıldı. Reaksiyon sırasında kullanılan dNTP'nin katkısı da hesaplanarak toplam DeNA konsantrasyonuna bölüldü, böylece reaksiyonun verimliliği sırasıyla şu şekilde bulundu: 15,1, 18,6, 28,6 ng. Verimliliğe yüzdeler olarak bakıldığında sırasıyla; %34,4, %42,4 ve %65,2 olarak tespit edildi.

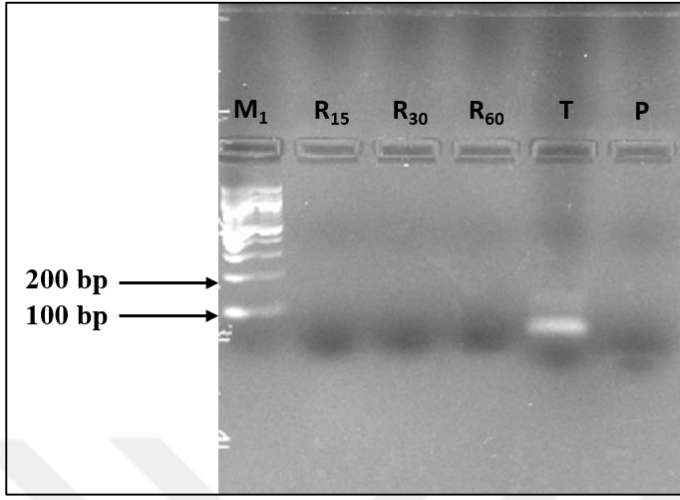
Tablo 6.4.2. Oligreen ile işaretlenen DeNA_{no}'nun miktar ve verim hesabı

Örnek	DeNA _{no} 15	DeNA _{no} 30	DeNA _{no} 60	5 ng/mL	50 ng/mL
Absorbans	129609	167448	276548	92883	1513724
Konsantrasyon (ng/ml)	333,1	403,1	603,1		
Miktar (ng)	16,7	20,2	30,2		
C39 miktarı (ng)	1,10	1,10	1,10		
Primer ara sekans miktarı (ng)	0,47	0,47	0,47		
dNTP (ng)	43,83	43,83	43,83		
DeNA _{no} 'nun toplam miktarı (ng)	15,1	18,6	28,6		
Verim (%)	34,4	42,4	65,2		

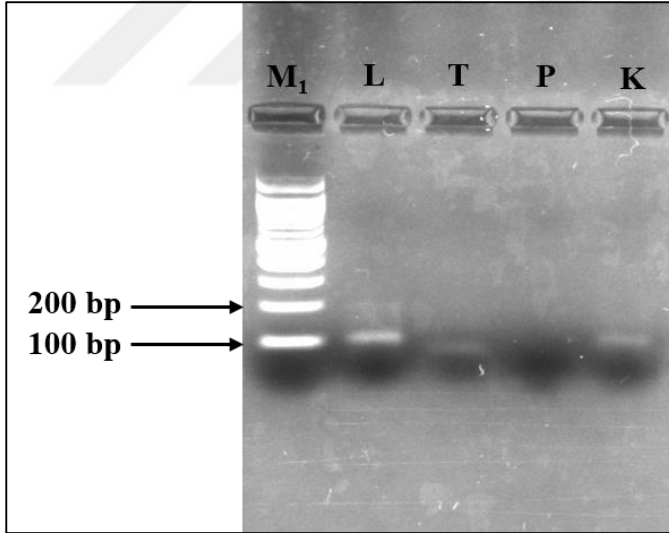
6.4.3 Molekül ağırlığı tespiti: Agaroz jel elektroforezi

Şekil 6.4.1’de RCA ürünlerinin agaroz jel elektroforezinin UV altında çekilmiş görüntüsü bulunmaktadır. RCA ürünlerinin molekül ağırlıkları büyük olduğundan (2 kb’nin üzeri) agaroz jel elektroforezi sisteminde ilerleyemedi. Bu nedenle R₁₅, R₃₀ ve R₆₀ sütunları üzerinde bant olarak görüntülenemedi. C39 komplementer sekansı 100 bp markıra karşılık gelerek görüntülenirken (T sütunu), 40 nükleotitlik komplementer ara sekans 100 bp’nin altında kaldığı için görüntülenemedi (P sütunu). Halkasal kalıp DNA 100 bp markır üzerinde parlak bir bant olarak görüldü (L sütunu).

RCA ürünleri agaroz jel üzerinde görüntülenemese de halkasal hale getirilen kalıp DNA ve onun bileşenleri görüntüledi. UV altında görüntülenen agaroz jel resmi Şekil 6.4.2’de gösterildi. Halkasal kalıp DNA üretilirken kullanılan miktarlarda C39 komplementer sekansı ve birleştirici ara sekans karıştırılarak kuyucuğa yüklendiğinde (K sütunu) ve ayrıca yine aynı miktarda C39 komplementer sekans farklı bir kuyucuğa yüklendiğinde (T sütunu) 100 bp markır’a denk gelen referans değer üzerinde tespit edildi. Komplementer ara sekans ise 100 bp’den daha kısa bir oligonükleotit olduğu için agaroz jel üzerinde görüntülenemedi (P sütunu).



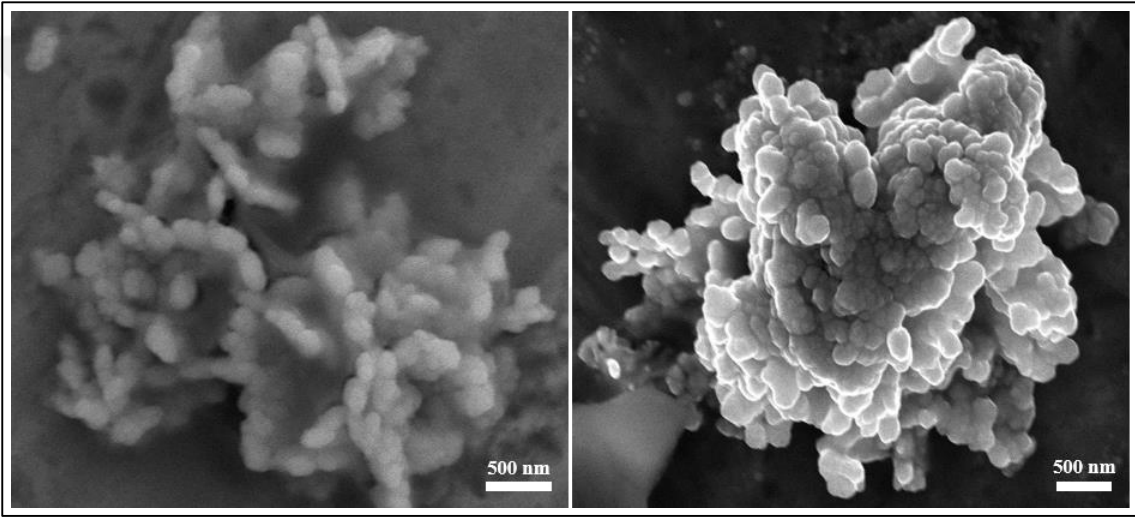
Şekil 6.4.1. RCA ürünlerinin agaroz jel üzerinde gösterimi, **M1:** 100 bp DNA markır, **R₁₅:** 15 dakikalık RCA ürünü, **R₃₀:** 30 dakikalık RCA ürünü, **R₆₀:** 60 dakikalık RCA ürünü, **T:** 100 nt C39 sekansının komplementer dizisi, **P:** C39 sekansının 3' ve 5' uçlarını birleştirmek için tasarlanan ve aynı zamanda primer olarak kullanılan 40 nt DNA sekansı



Şekil 6.4.2. Halkasal kalıp DNA ve bileşenlerinin agaroz jel üzerinde gösterimi, **M1:** 100 bp DNA markır, **L:** Halkasal hale getirilmiş DNA ürünü, **T:** 100 nt C39 sekansının komplementer dizisi, **P:** C39 sekansının 3' ve 5' uçlarını birleştirmek için tasarlanan ve aynı zamanda primer olarak kullanılan 40 nt DNA sekansı, **K:** T ve P'nin ligaz enzimi olmadan bir araya getirilmiş hali

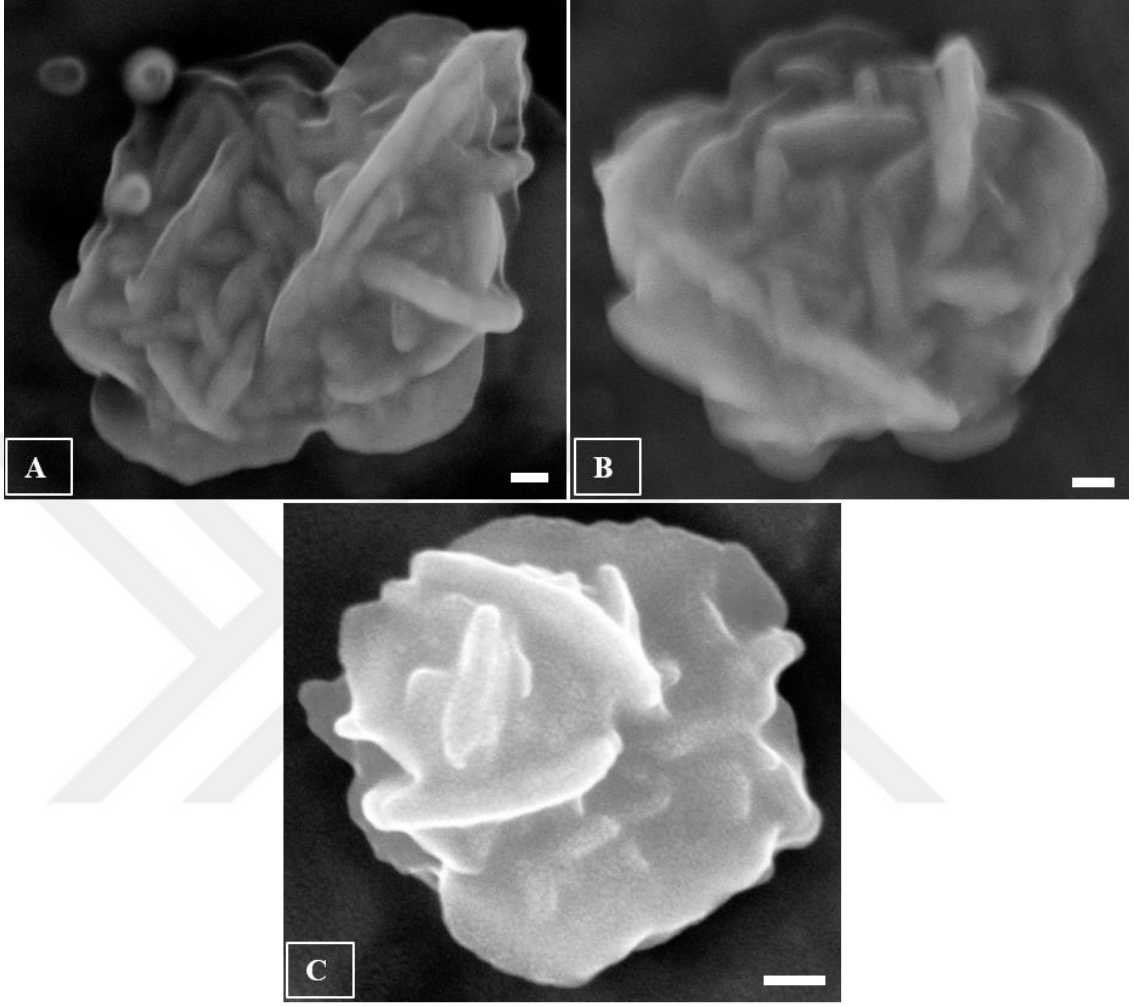
6.4.4 Büyüklük ve morfoloji analizi: SEM

Distile su ile diyaliz edilerek saflaştırılan DeNA_{no}'nun büyüklük ve yapısal karakterizasyonunun yapılabilmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı. DeNA_{no}'yu oluşturan oligonükleotitlerin bazları arasındaki çekim kuvvetleri nedeniyle birbiri üzerine katlanarak bir yumak haline geldiği tespit edildi. Şekil 6.4.3'de görüldüğü gibi DeNA_{no} nanoparçacığının diğer nanoparçacıklar ile de birleşerek çok daha büyük yapılar oluşturduğu gözlemlendi.



Şekil 6.4.3. Isı uygulaması öncesinde, çok sayıda DeNA_{no}'nun bir araya gelerek oluşturduğu büyük yapılar

Bu durumun önüne geçebilmek için, DNA nanoparçacıklarına ısı uygulanarak diğer parçacıklarla spesifik olmayan hidrojen bağlarının kırılması hedeflendi. DeNA_{no} örnekleri ısıtıcı içerisinde 20 dakika boyunca 70 °C'de tutuldu. 20 dakika sonunda ısıtıcıdan alınan nanoparçacıklar bakır plakaların üzerine yerleştirilerek desikatör cihazında bir gece vakumlandı. Isı uygulaması sonrasında alınan SEM görüntülerinde Şekil 6.4.4'te görüldüğü gibi DeNA_{no}'nun diğer nanoparçacıklarla daha az etkileşerek daha küçük nanoparçacıklar halinde kaldığı tespit edildi.

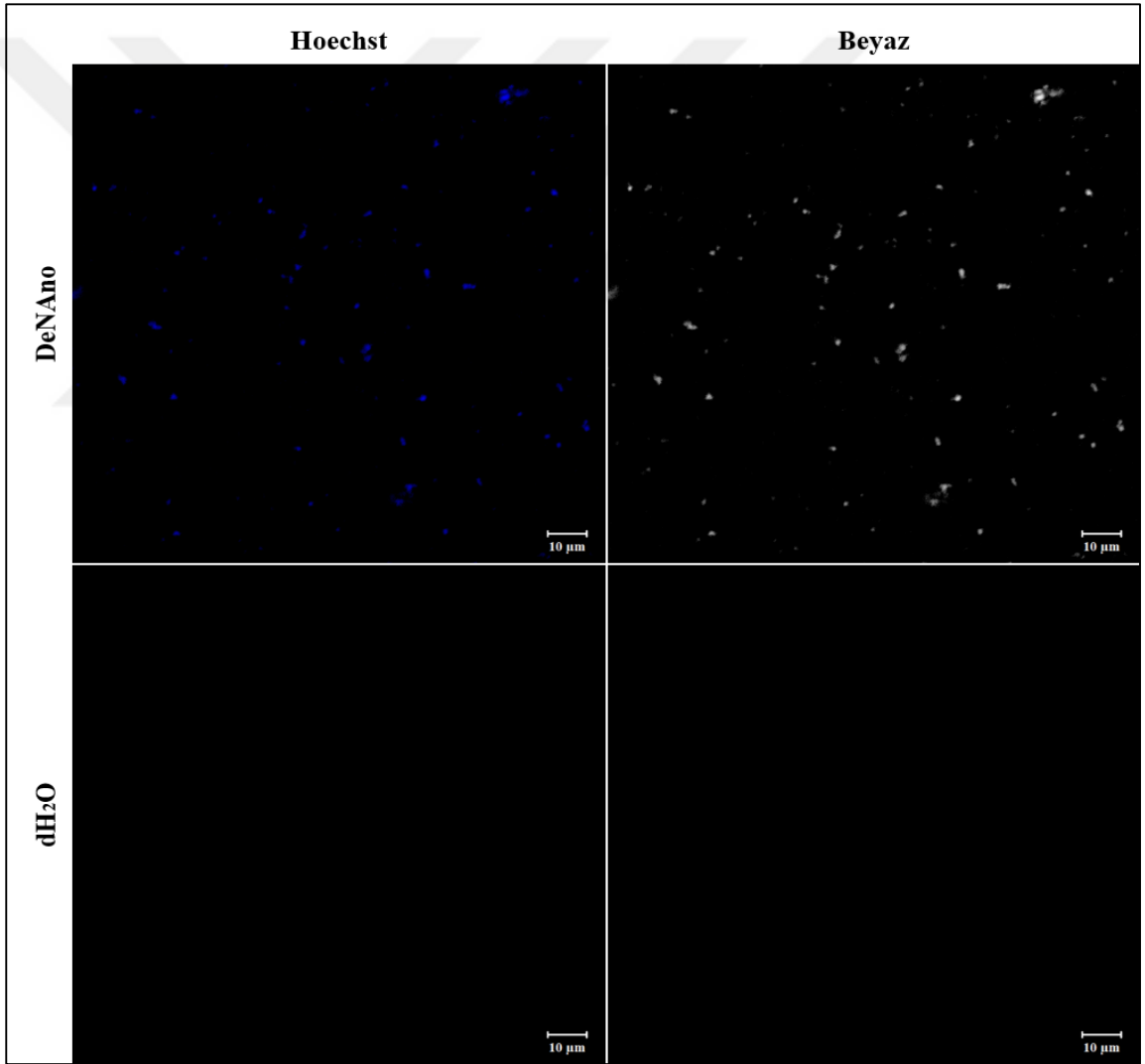


Şekil 6.4.4. Isı uygulaması sonrası farklı üretim sürelerine göre DeNAno'lar (A) 15 dakikalık RCA ürünü olan DeNAno (B) 30 dakikalık RCA ürünü olan DeNAno (C) 60 dakikalık RCA ürünü olan DeNAno, bar uzunluğu: 50 nm

Isı uygulaması öncesinde ve sonrasında, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakika olarak ayrı ayrı üretim süreleri olan DeNAno'ların büyüklükleri arasında fark görülmedi. Tris- Mg^{2+} tampon çözeltisi ile diyaliz edilerek saflaştırılan ve büyüklüğünün daha küçük olması beklenen DeNAno'lar yoğun tuz tabakalarının sebep olduğu kirliliğe maruz kalan ve görüntüsü nedeniyle SEM cihazında görüntülenemedi.

6.4.5 Dispersite analizi: Konfokal mikroskobu

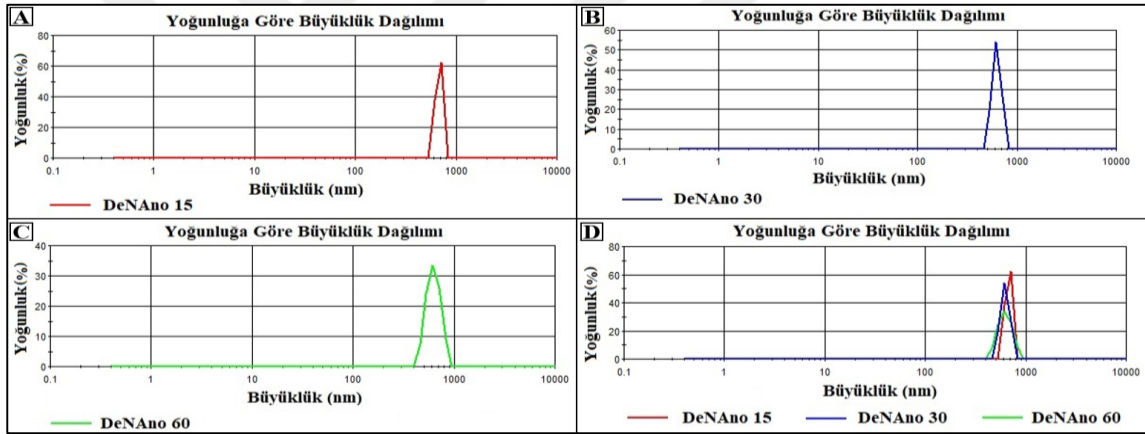
DeNAo nanoparçacıkları dispersite analizi için Hoechst DNA boyası ile boyanarak konfokal mikroskopta görüntüledi. Parçacıkların daha net görülebilmesi için Hoechst boyasının mavi kanalı beyaz renge dönüştürülerek görüntüledi (Şekil 6.4.5). Ayrıca DeNAo'nun tampon çözeltisi olan distile suyun içerisine aynı miktarda Hoechst boyası eklenerek alınan görüntülerde 350 nm uyarılma/461 nm emisyon altında floresan sinyal alınmadı (Şekil 6.4.5).



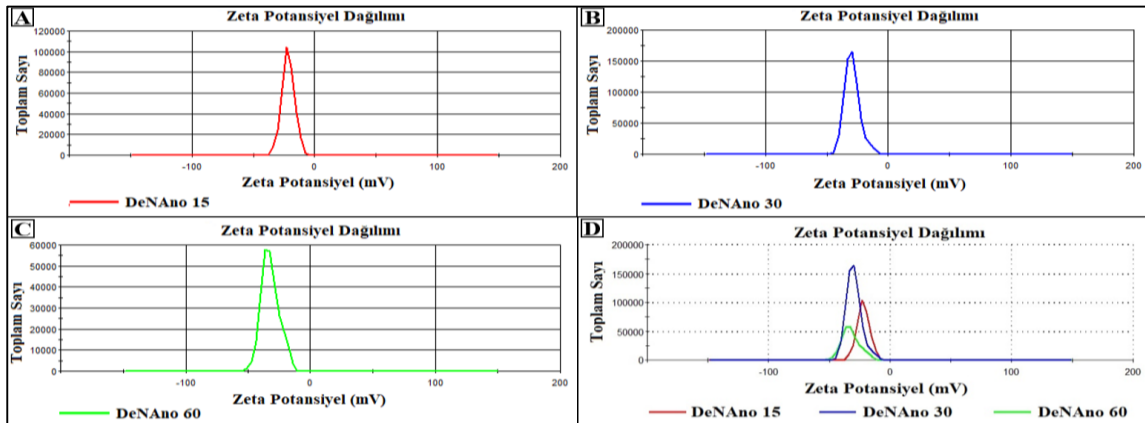
Şekil 6.4.5. Hoechst DNA boyası ile işaretlenen DeNAo ve kontrol olarak kullanılan distile su ile Hoechst DNA boyasının konfokal görüntüsü, Hoechst: 350 nm uyarılma/461 nm emisyon altında floresan görüntü, Beyaz: Hoechst kanalının beyaz görüntüsü, bar uzunluğu: 10 µm

6.4.6 Büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

15, 30 ve 60 dakika olarak farklı sürelerde üretilen ve distile su ile diyaliz edilerek saflaştırılan DeNA^o’ların büyüklükleri ve zeta potansiyel değerleri arasında anlamlı bir fark görülmedi. Şekil 6.4.6’da verilen distile su ile diyaliz edilerek saflaştırılan DeNA^o nanoparçacıklarının büyüklüklerinin 350-1000 nm olarak geniş bir aralıkta olduğu ve ortalama büyüklüklerinin 650 nm olduğu tespit edildi (Sırasıyla 675,6, 624,8 ve 627,7 nm). Şekil 6.4.7’de verilen zeta potansiyel değerlerinin sırasıyla $-21,5 \pm 2,7$ mV, $-31,8 \pm 3,3$ mV ve $-31,1 \pm 1,5$ mV olduğu ve ortalama değerlerinin ise $-28,1 \pm 2,5$ mV olduğu tespit edildi. Bu değerler Tablo 6.5.2’de listelendi ve Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilerek saflaştırılan DeNA^o ile karşılaştırıldı.



Şekil 6.4.6. Farklı sürelerde üretilen DeNA^o’ların büyüklük dağılım grafiği (A) 15 dk’lık RCA ürünü (B) 30 dk’lık RCA ürünü (C) 60 dk’lık RCA ürünü (D) 15, 30, ve 60 dk’lık RCA ürünleri



Şekil 6.4.7. Farklı sürelerde üretilen DeNA^o’ların zeta potansiyel dağılım grafiği (A) 15 dk’lık RCA ürünü (B) 30 dk’lık RCA ürünü (C) 60 dk’lık RCA ürünü (D) 15, 30, ve 60 dk’lık RCA ürünleri

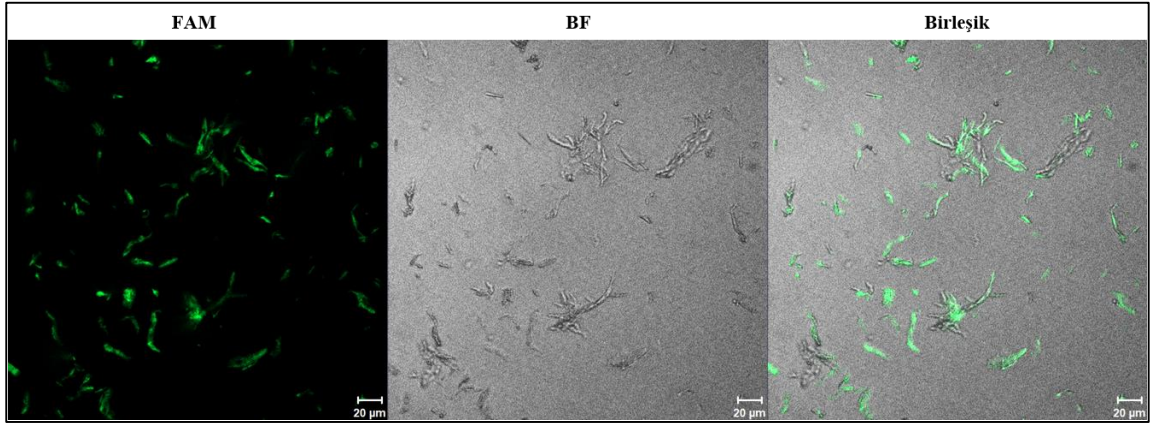
6.5 DeNAno'nun Konjugasyonu

DeNAno ile floresan işaretli bağlayıcı sekans (FAM) konjuge edilerek konfokal mikroskopta incelendi. DeNAno'nun MagNP ile konjugasyonu ise iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada MagNP nanoparçacıkları, DeNAno'yu oluşturan oligonükleotit sekansına komplementer olduğu bilinen bir bağlayıcı sekans (FAM veya BS) ile EDC-NHS kimyası kullanılarak kovalent olarak bağlandı. İkinci aşamada ise DeNAno bu konjugasyona dahil edilerek komplementer ara sekansa zayıf hidrojen bağları ile bağlanması sağlandı. Elde edilen DeNAno-MagNP/FAM konjugatı, MagNP ile konjuge edilen komplementer ara sekans üzerinde bulunan FAM sayesinde floresan özellik kazandı.

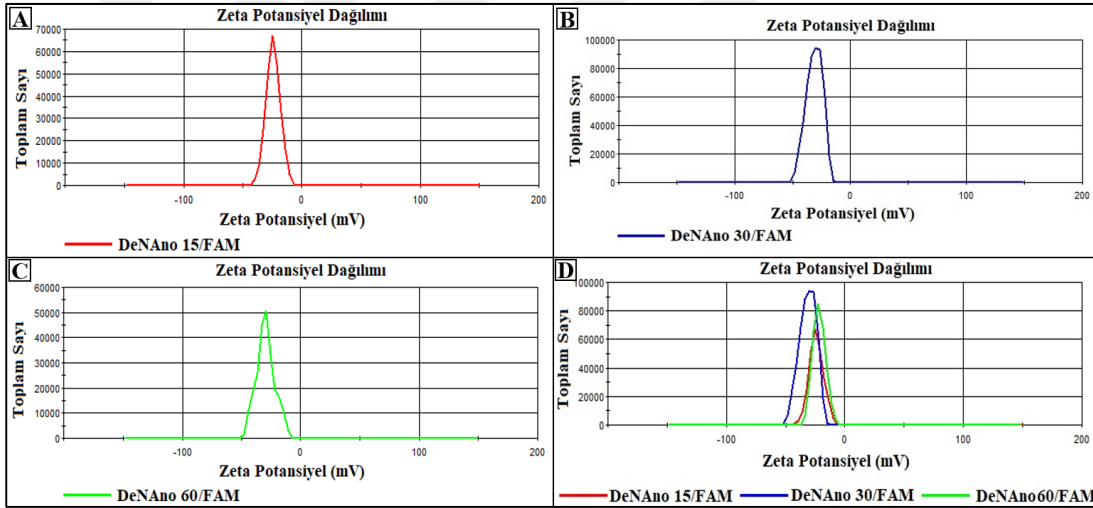
6.5.1 DeNAno'nun FAM bağlı komplementer bağlayıcı sekans ile konjugasyonu:

DeNAno/FAM

DeNAno'yu oluşturan oligonükleotit sekansının belirli bir kısmına komplementer olarak dizayn edilen 20 nükleotitlik kısa oligonükleotit sekansına (Tablo 5.1.5) eklenen FAM ajanı sayesinde DeNAno'nun konfokal mikroskobunda görüntülenmesi mümkün oldu. Şekil 6.5.1'de konfokal mikroskop görüntüleri paylaşılan DeNAno/FAM konjugatı, DeNAno nanoparçacığının bağlayıcı sekans (BS veya FAM) ile bağlanabildiğini göstermiş oldu. Şekil 6.5.2'de ise DeNAno/FAM konjugatının ZetaSizer ile yapılan yüzey yükü analizinin DLS grafikleri verildi. Farklı üretim sürelerine sahip DeNAno'lar ile yapılan floresan işaretli bağlayıcı sekans konjugasyonları arasında anlamlı bir fark görülmemekle birlikte üçünün ortalaması $-26,3 \pm 3,2$ mV olarak tespit edildi (DeNAno₁₅/FAM, DeNAno₃₀/FAM ve DeNAno₆₀/FAM konjugatları sırasıyla $-23,2 \pm 3,7$ mV, $-31,1 \pm 1,5$ mV, $-24,6 \pm 4,5$ mV). DeNAno/FAM konjugatının büyüklük dağılım grafikleri elde edilemedi. Ancak bu konjugasyon zeta potansiyel değerleri üzerinden incelendi.



Şekil 6.5.1. DeNano/FAM konjugatının konfokal mikroskopta görüntülenmesi, FAM: 495 nm uyarılma/520 nm emisyon için floresan görüntü, BF: Aydınlık alan, Birleşik: FAM ve BF fotoğraflarının birleşimi, bar uzunluğu: 20 µm



Şekil 6.5.2. DeNano/FAM konjugatlarının zeta potansiyel dağılım grafikleri, (A) DeNano₁₅/FAM konjugatı (B) DeNano₃₀/FAM konjugatı (C) DeNano₆₀/FAM konjugatı (D) DeNano₁₅/FAM, DeNano₃₀/FAM ve DeNano₆₀/FAM konjugatları

6.5.2 MagNP'lerin DeNano'ya komplementer bağlayıcı sekans ile konjugasyonu: MagNP/FAM veya MagNP/BS

MagNP ile FAM ajanı eklenmiş C39 dizisine komplementer olan bağlayıcı sekansın (MagNP/FAM) veya FAM ajanı olmayan C39 sekansına komplementer bağlayıcı sekansın (MagNP/BS) EDC-NHS kimyasıyla kovalent olarak bağlanması; kantitatif olarak spektrofotometre cihazında floresan ölçümlerle gösterildi. Konfokal mikroskopta dispersite analizi yapıldı. Büyüklük ve yüzey yükü ZetaSizer cihazında, büyüklük ve morfoloji analizi SEM mikroskobunda analiz edildi.

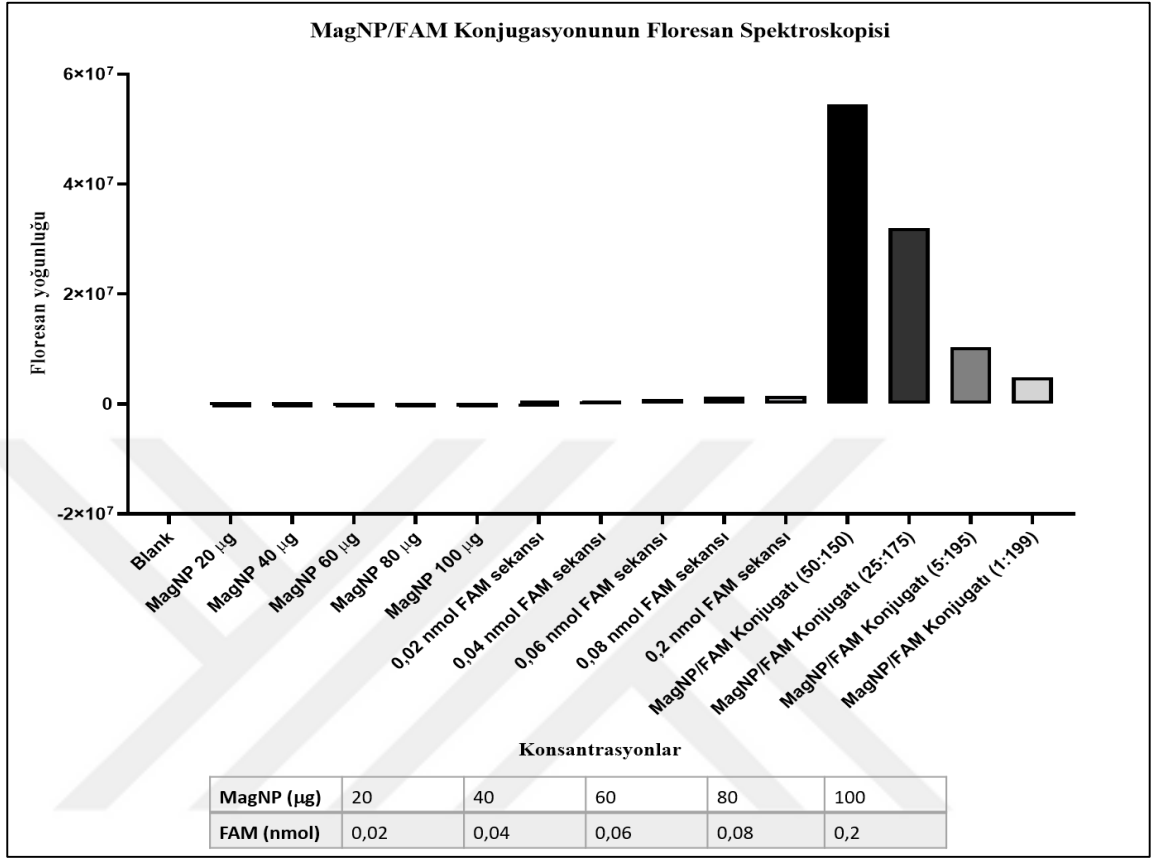
6.5.2.1 MagNP/FAM konjugasyonunun floresan incelemesi: Spektrofotometre

Tablo 5.5.2’de belirtilen dört farklı miktar ve konsantrasyonda MagNP/FAM konjugatı, beş farklı konsantrasyonda floresan işaretli bağlayıcı sekans ve beş farklı konsantrasyonda MagNP nanoparçacıkları 495 nm uyarılma/520 nm emisyon altında spektrofotometre cihazında okutuldu. Alınan kantitatif sonuçlar Graphpad Prism 8 programında grafik haline getirildi (Şekil 6.5.3). MagNP/FAM konjugatının konsantrasyona bağlı olarak floresan ışımaya miktarının arttığı tespit edildi.

Elde edilen 110 µl MagNP/FAM konjugatının içeriğinde 260 nmol MagNP ve 0,86 nmol floresan işaretli bağlayıcı sekans olduğu düşünüldüğünde spektrofotometrede ölçülen konjugatın içeriğindeki MagNP ve floresan işaretli bağlayıcı sekans miktarı Tablo 6.5.1’de listelendi. Tek başına MagNP veya floresan işaretli bağlayıcı sekansın MagNP/FAM konjugatında kullanılan miktarlarına yakın değerlerde spektrofotometrede floresan okuma yapılmasına rağmen konjugasyonda olduğu gibi floresan ışımaya vermediği tespit edildi (Şekil 6.5.3).

Tablo 6.5.1. MagNP/FAM konjugatının spektroskopisi için kullanılan komponentlerin miktarı

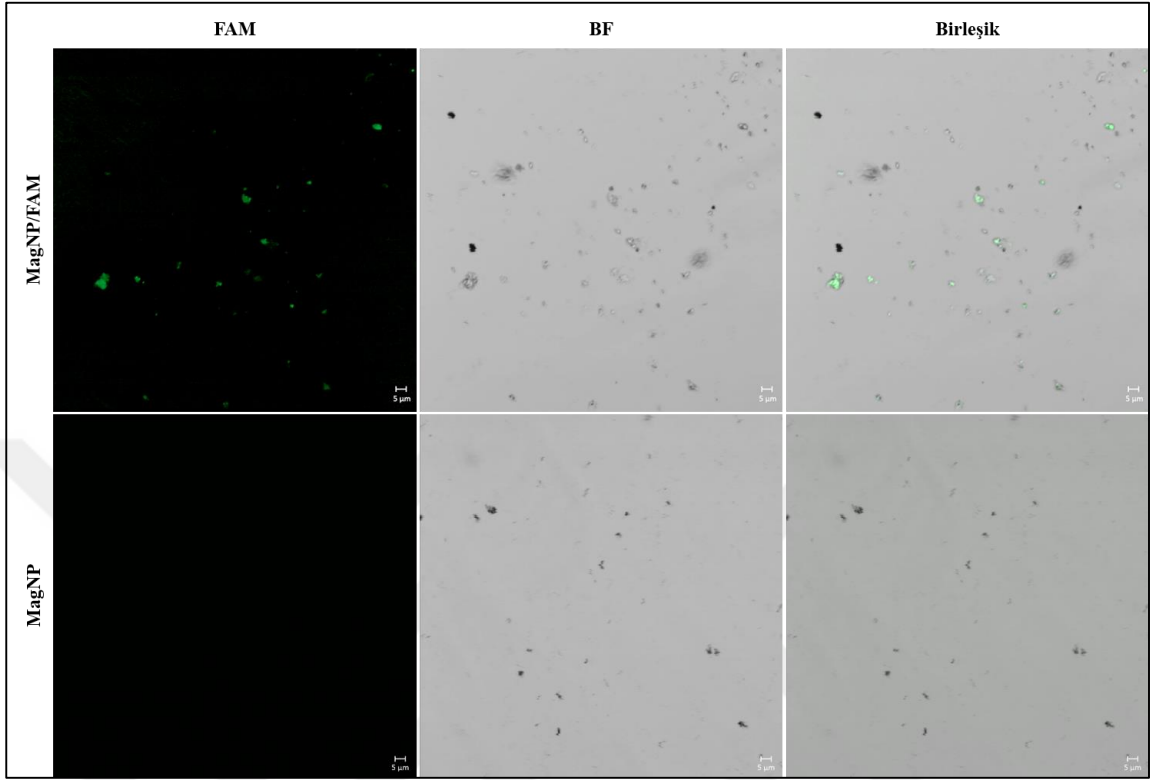
MagNP/FAM Hacmi (µl)	MagNP (µg)	FAM (nmol)	MagNP/FAM
1	0,54	0,0078	1:199
5	2,72	0,04	5:195
25	13,63	0,2	25:175
50	27,27	0,4	50:150



Şekil 6.5.3. Değişen konsantrasyonlarda MagNP, floresan işaretli bağlayıcı sekans ve MagNP/FAM konjugatlarının floresan spektroskopisi

6.5.2.2 MagNP/FAM konjugasyonunun dispersite analizi: Konfokal mikroskobu

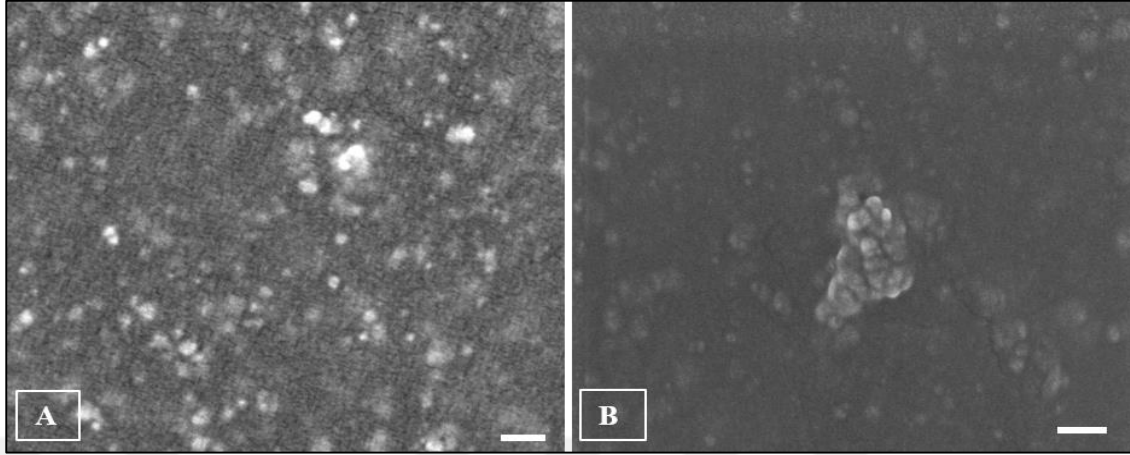
MagNP/FAM konjugasyonu dispersite analizi için FAM ajanının dalga boyu olan 495 nm uyarılma/520 nm emisyon kullanılarak konfokal mikroskofta görüntülendi. Şekil 6.5.4’de verilen konfokal mikroskop görüntüsünde yüzeyine bağlanan floresan işaretli bağlayıcı sekans sayesinde floresan özellik kazanan MagNP nanoparçacığının homojen bir şekilde dağıldığı görüldü.



Şekil 6.5.4. MagNP nanoparçacığının ve MagNP/FAM konjugatının konfokal mikroskobu görüntüsü, FAM: 495 nm uyarılma/520 nm emisyon için floresan görüntü, BF: Aydınlık alan, Birleşik: FAM ve BF fotoğraflarının birleşimi, bar uzunluğu: 5 µm

6.5.2.3 MagNP/FAM konjugasyonunun büyüklük ve morfoloji analizi: SEM

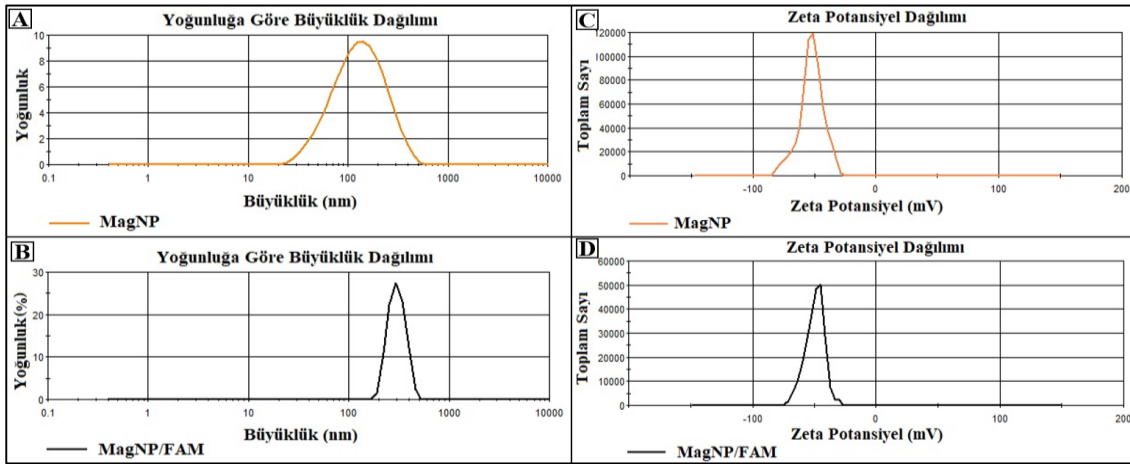
MagNP/FAM konjugatı morfoloji ve büyüklük analizi için SEM mikroskobu altında görüntülendiSEM görüntüsü ile MagNP/FAM konjugatının agregasyon oluşturmada birleştiği tespit edildi (Şekil 6.5.5A). Şekil 6.5.5B’de ise bir araya gelen MagNP/FAM nanoparçacıklarının en yüksek 200-300 nm büyüklükte olduğu görüldü.



Şekil 6.5.5. MagNP/FAM konjugatının SEM mikroskopunda görüntülenmesi (A) 100K yakınlaştırma (B) 200K yakınlaştırma, bar uzunluğu: 100 nm

6.5.2.4 MagNP/FAM konjugasyonunun büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

MagNP/FAM konjugasyonu büyüklük ve yüzey yükü dağılımı için ZetaSizer cihazında analiz edildi. Elde edilen sonuçlar Zetasizer Nano software v3.30 programında grafik haline getirildi. Şekil 6.5.6A’da MagNP nanoparçacığının 20-500 nm olarak geniş bir büyüklük aralığında olduğu, Şekil 6.5.6B’de ise floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleşince aralığın 200-500 nm’ye daraldığı gözlemlendi. Şekil 6.5.6C’te MagNP nanoparçacığının zeta potansiyel değerinin $-58,4 \pm 2,8$ mV olduğu ve grafiğin sol tarafa (negatif) dönük olduğu ve Şekil 6.5.6D’de ise $-46,3 \pm 3,1$ mV zeta potansiyel değerine sahip olan MagNP/FAM konjugatının sağ tarafa (pozitif) doğru olduğu tespit edildi.



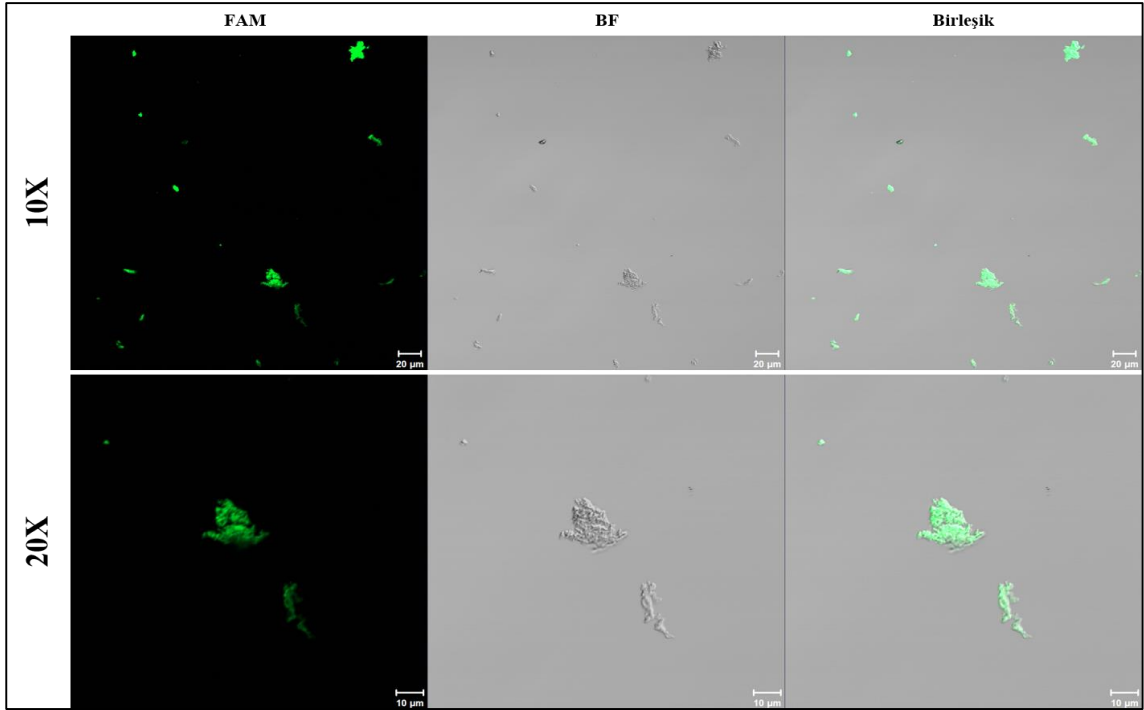
Şekil 6.5.6. MagNP ve MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve zeta potansiyel dağılım grafikleri, (A) MagNP’lerin büyüklük grafiği (B) MagNP’lerin yüzey yükü grafiği (C) MagNP/FAM konjugatının büyüklük grafiği (D) MagNP/FAM konjugatının yüzey yükü grafiği

6.5.3 DeNAno'nun MagNP ile komplementar bağlayıcı sekans yardımıyla konjugasyonu: DeNAno-MagNP/FAM

DeNAno nanoparçacığının MagNP nanoparçacığına bağlı komplementer ara sekans ile bağlanması iki oligonükleotitin arasındaki zayıf hidrojen bağları ile sağlandı. Elde edilen DeNAno-MagNP/FAM konjugasyonu floresan özellikte olduğundan konfokal mikroskopta görüntülendi. SEM mikroskobu ile görüntülenerek büyüklük ve morfoloji analizi yapıldı. Konjugatın ayrıca ZetaSizer ile büyüklük ve yüzey yükü analizi yapıldı.

6.5.3.1 DeNAno-MagNP/FAM konjugatının dispersite analizi: Konfokal

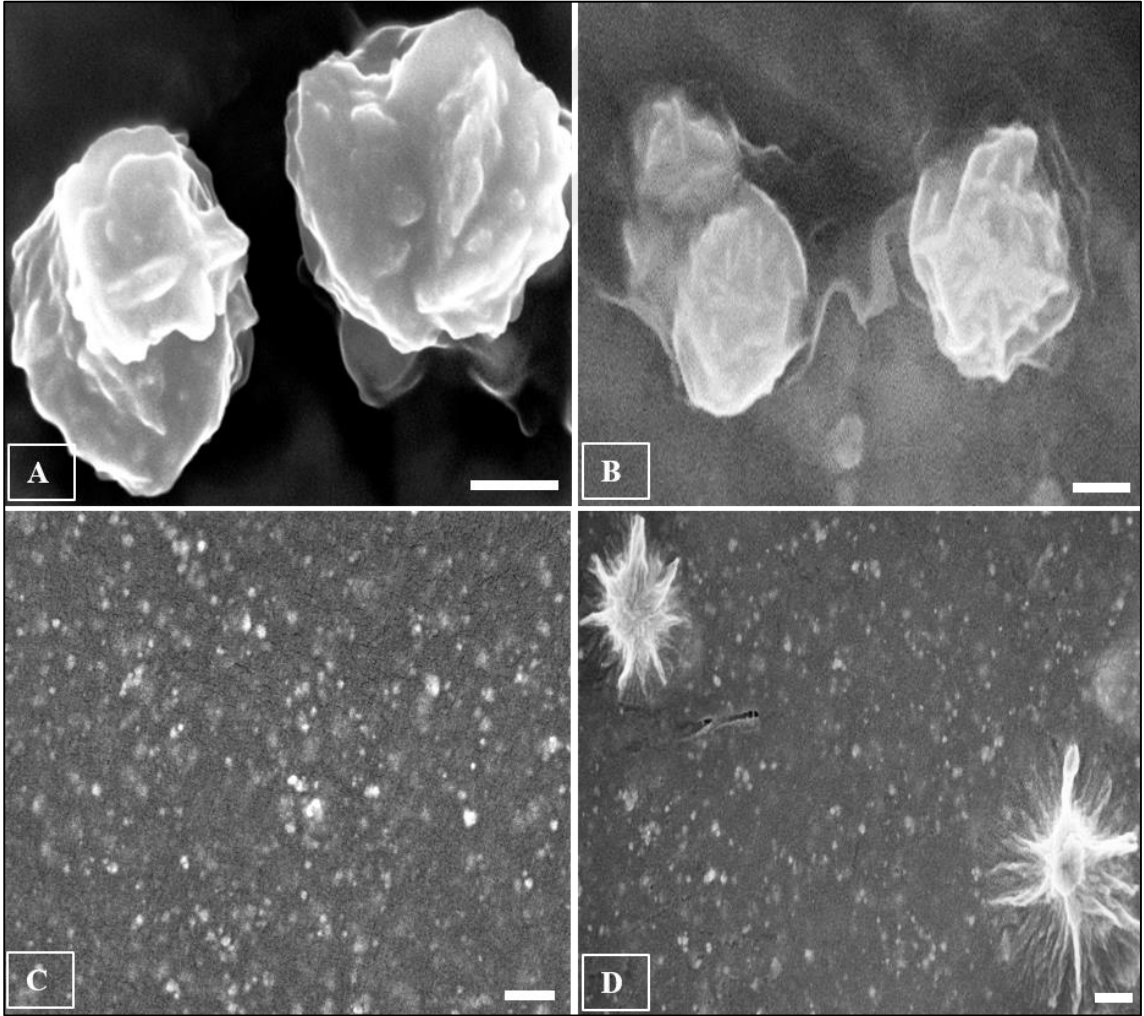
Konfokal mikroskopta dispersite analizi yapılan DeNAno-MagNP/FAM konjugatı Şekil 6.5.7'de gösterildi. Görüntülerde DeNAno'nun MagNP ile birleştiğinde homojen bir dağılım gösterdiği tespit edildi. 495 nm uyarılma/520 nm emisyon'da floresan ışık veren FAM ajanı sayesinde görüntülenebilen DeNAno-MagNP/FAM konjugatı ayrıca floresansız olarak görüntülendi (BF) ve bu iki görüntünün birleştirilmiş hali de (Birleşik) Şekil 6.5.7'ye dahil edildi.



Şekil 6.5.7. DeNAno-MagNP/FAM konjugatının 10X ve 20X konfokal mikroskobu görüntüsü, FAM: 495 nm uyarılma/520 nm emisyon için floresan görüntü, BF: Aydınlanma alanı, Birleşik: FAM ve BF fotoğraflarının birleşimi, 10X için bar uzunluğu: 20 µm, 20X için bar uzunluğu: 10 µm

6.5.3.2 DeNano-MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve morfoloji analizi: SEM

DeNano-MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve morfoloji analizi için SEM mikroskobu ile görüntüledi. Alınan görüntüler Şekil 6.5.8’de ayrıntılı olarak verildi. Şekil 6.5.8A’da DeNano nanoparçacıklarının büyüklüğü ortalama 600 nm olarak tespit edildi. Şekil 6.5.8B’de floresan işaretli bağlayıcı sekans ile konjuge edilmiş DeNano parçacıklarının da yaklaşık 600 nm olduğu tespit edildi. MagNP/FAM konjugatının ise Şekil 6.5.8C’de homjen olarak dağılım gösterdiği tespit edildi. DeNano’nun MagNP ile birleştikten sonra morfolojisinin değiştiği ve büyüklüğünün 300-350 nm olduğu tespit edildi (Şekil 6.5.8D).

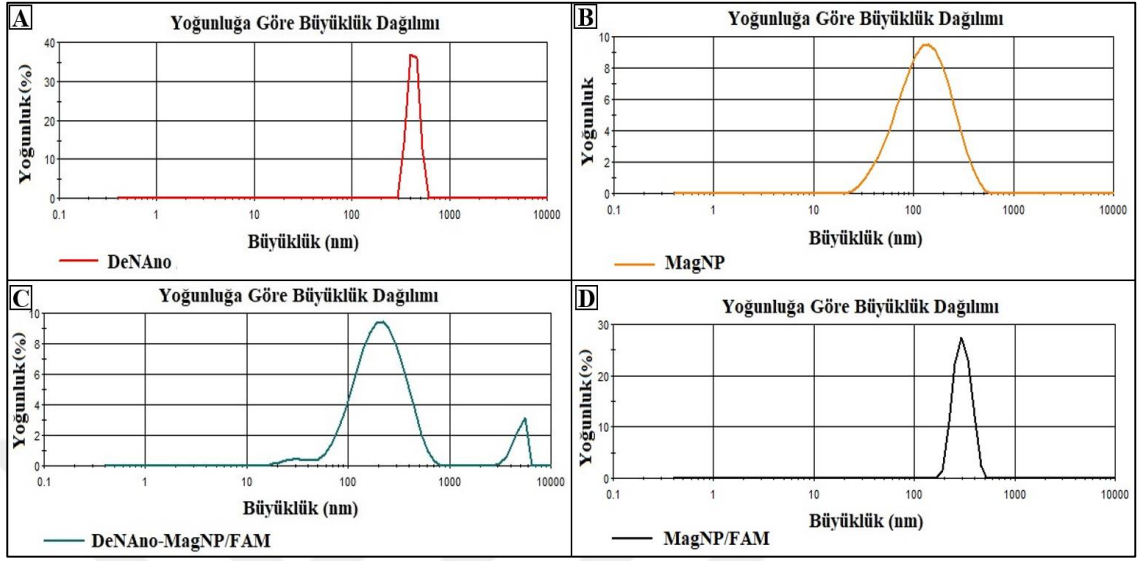


Şekil 6.5.8. DeNano ve konjugasyonlarının SEM görüntüleri (A) DeNano (B) DeNano/FAM konjugatı (C) MagNP/FAM konjugatı (D) DeNano-MagNP/FAM konjugatı, bar uzunluğu: 200 nm

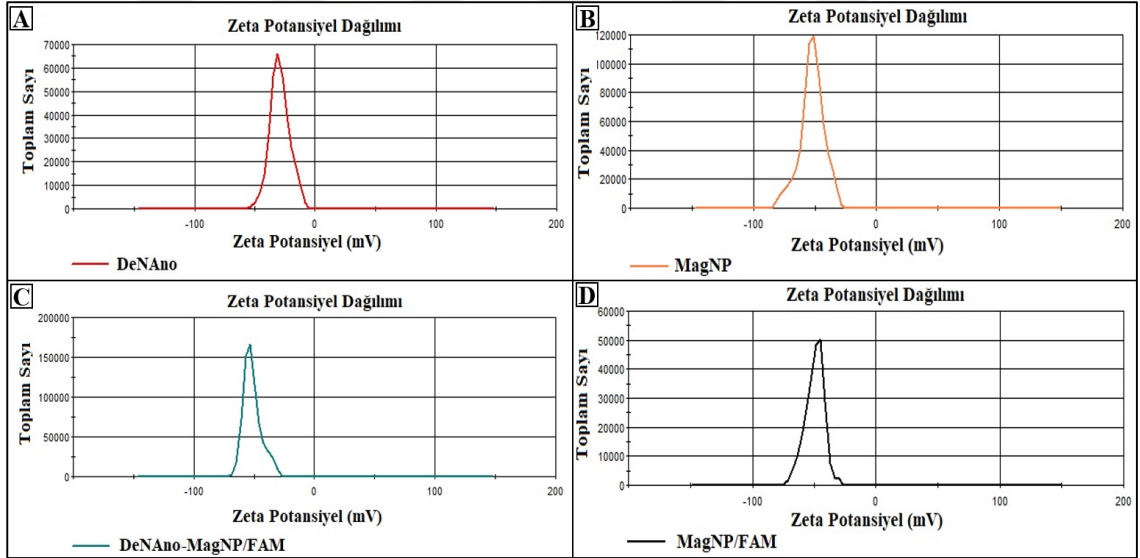
6.5.3.3 DeNAno-MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve yüzey yükü analizi: ZetaSizer

DeNAno-MagNP/FAM konjugatının büyüklük ve yüzey yükü analizi ZetaSizer cihazında yapıldı ve elde edilen sonuçlar DeNAno, MagNP ve MagNP/FAM değerleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlarda MagNP büyüklüğünün 20-500 nm aralığında geniş bir grafiğe dağıldığı ve ortalama büyüklüğünün 110-150 nm arasında değiştiği tespit edildi (Şekil 6.5.9B ve Şekil 6.5.11Şekil 6.5.11. B). MagNP yüzey yükünün ise ortalama $-55,4 \pm 2,1$ mV olduğu tespit edildi (Şekil 6.5.10B ve Şekil 6.5.12B). MagNP/FAM konjugatının büyüklüğü ortalama 250-280 nm arasında değiştiği (Şekil 6.5.9D ve Şekil 6.5.11C) yüzey yükü ise ortalama $51,3 \pm 2,3$ mV olduğu tespit edildi (Şekil 6.5.10D ve Şekil 6.5.12D). Ayrıca farklı iki sıvı ile saflaştırılan DeNAno'nun büyüklük ve yüzey yükleri karşılaştırıldı (Tablo 6.5.2 ve Tablo 6.5.3). Buna göre distile su ile diyaliz edilerek saflaştırılan farklı üretim sürelerine sahip DeNAno'ların büyüklükleri ortalama 650 nm olarak tespit edildi ve elde edilen grafiğin 300-600 nm aralığında olduğu görüldü (Şekil 6.5.9A). Yüzey yükleri ise ortalama $-28,1 \pm 2,5$ mV olarak tespit edildi (Şekil 6.5.10A).

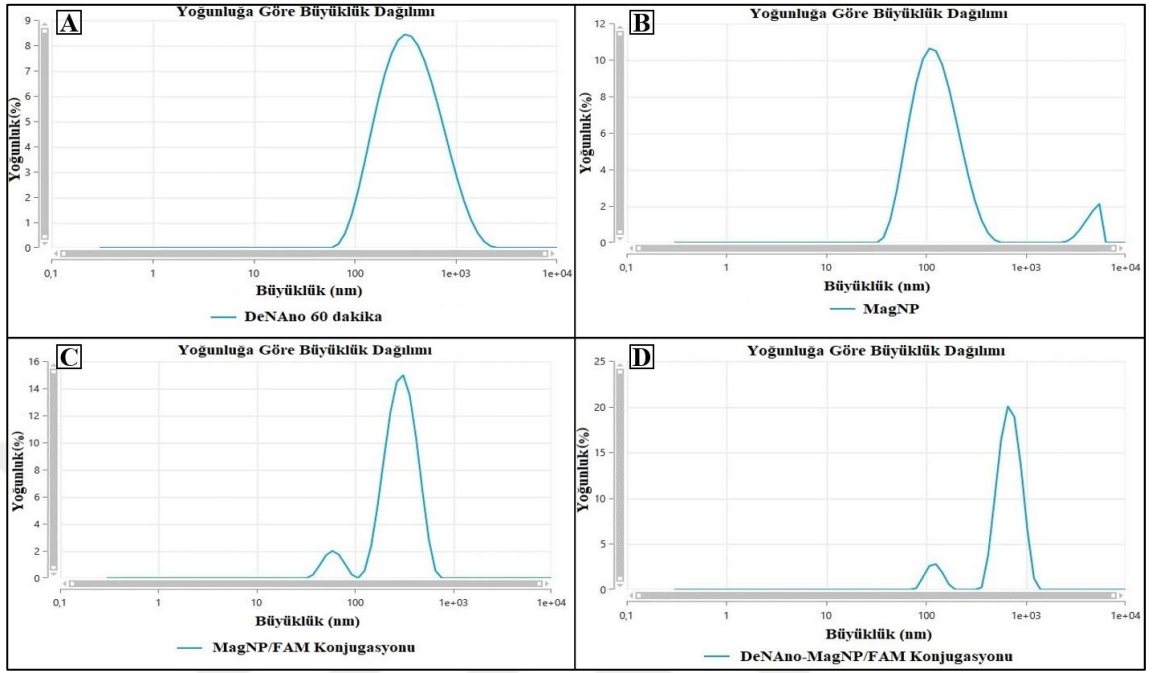
Tablo 6.5.2'de distile su ile diyaliz edilen DeNAno ve konjugatları için tüm değerler ayrıntılı gösterildi. Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNAno'nun büyüklüğü ortalama 341,2 nm olarak tespit edilirken (Şekil 6.5.11A), yüzey yükü $-1,1 \pm 1,2$ mV olarak tespit edildi (Şekil 6.5.12A). Distile su ile diyaliz edilen DeNAno ile elde edilen DeNAno-MagNP/FAM konjugatının büyüklüğü 50-800 nm gibi geniş bir aralıkta olduğu (ortalama 246,7 nm) (Şekil 6.5.9), yüzey yükünün ise $-53,3 \pm 2,7$ mV olduğu tespit edildi (Şekil 6.5.10). Tris-M tamponu ile saflaştırılan DeNAno ile elde edilen DeNAno-MagNP/FAM konjugatının büyüklüğü 500-1000 nm aralığında olduğu (ortalama 666,2 nm) (Şekil 6.5.11D) ve yüzey yükünün $-21,0 \pm 1,1$ mV olduğu tespit edildi (Şekil 6.5.12C).



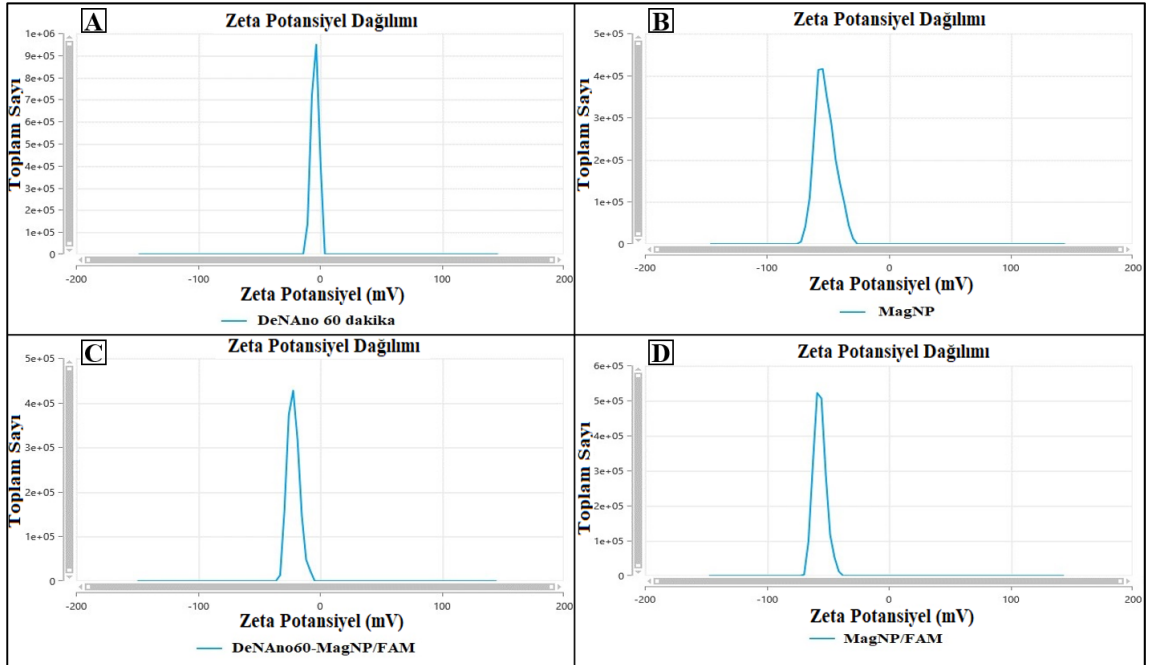
Şekil 6.5.9. Distile su ile diyaliz edilen DeNANO ve konjugatlarının büyüklük dağılım grafikleri (A) DeNANO (B) MagNP (C) DeNANO-MagNP/FAM konjugatı (D) MagNP/FAM konjugatı



Şekil 6.5.10. Distile su ile diyaliz edilen DeNANO ve konjugatlarının zeta potansiyel dağılım grafikleri (A) DeNANO (B) MagNP (C) DeNANO-MagNP/FAM konjugatı (D) MagNP/FAM konjugatı



Şekil 6.5.11. Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNANO ve konjugatlarının büyüklük dağılım grafikleri (A) DeNANO (B) MagNP (C) MagNP/FAM konjugatı (D) DeNANO-MagNP/FAM konjugatı



Şekil 6.5.12. Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNANO ve konjugatlarının zeta potansiyel dağılım grafikleri (A) DeNANO (B) MagNP (C) DeNANO-MagNP/FAM konjugatı (D) MagNP/FAM konjugatı

Tablo 6.5.2. Distile su ile diyaliz edilen DeNA_{no} parçacıklarının ortalama büyüklük, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Örnek	Ortalama Büyüklik (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
DeNA _{no} 15	675,6	0,890	-21,5±2,7
DeNA _{no} 30	624,8	0,999	-31,8±3,3
DeNA _{no} 60	627,7	0,983	-31,1±1,5
MagNP (dH ₂ O içerisinde)	145,5	0,285	-58,4±2,8
MagNP/FAM (dH ₂ O içerisinde)	276,9	0,299	-46,3±3,1
DeNA _{no} 15-MagNP/FAM	265,0	0,897	-51,1±1,0
DeNA _{no} 30-MagNP/FAM	257,9	0,940	-50,3±5,1
DeNA _{no} 60-MagNP/FAM	246,7	0,470	-53,3±2,7

Tablo 6.5.3. Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilen DeNA_{no} parçacıklarının ortalama büyüklük, PDI ve zeta potansiyel değerleri

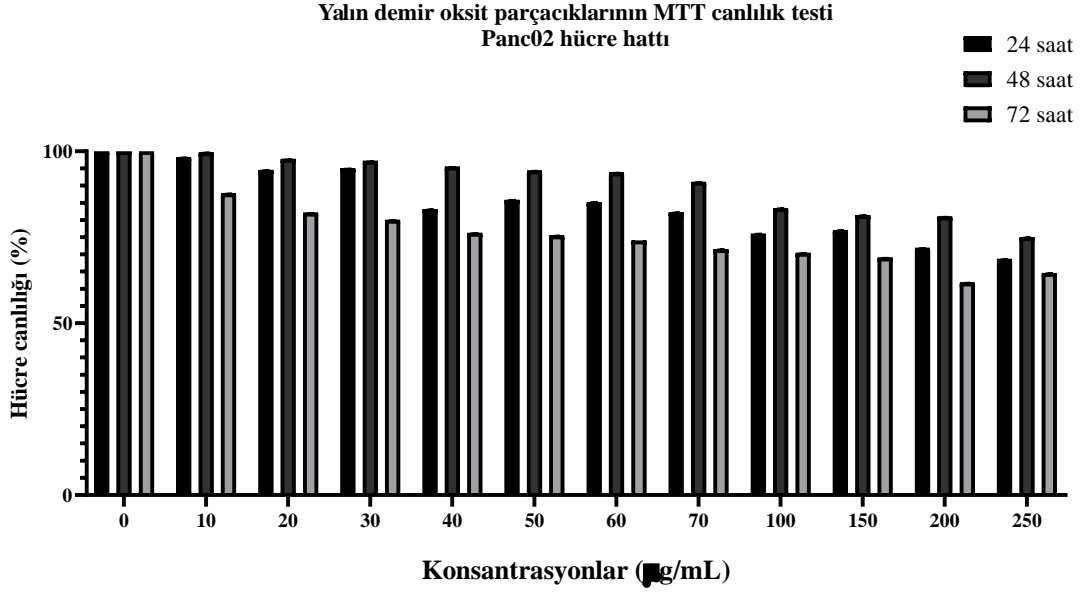
Örnek	Ortalama Büyüklik (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
DeNA _{no} (Tris-Mg ²⁺ tampon çözeltisi içerisinde)	341,2	0,437	-1,1±1,2
MagNP (dH ₂ O içerisinde)	117,2	0,313	-52,4±1,5
MagNP/FAM (dH ₂ O içerisinde)	252,2	0,410	-56,2±1,5
DeNA _{no} 60-MagNP/FAM (Tris- Mg ²⁺ tampon çözeltisi içerisinde)	666,2	0,599	-21,0±1,1

6.6 Hücre Canlılığı Analizi

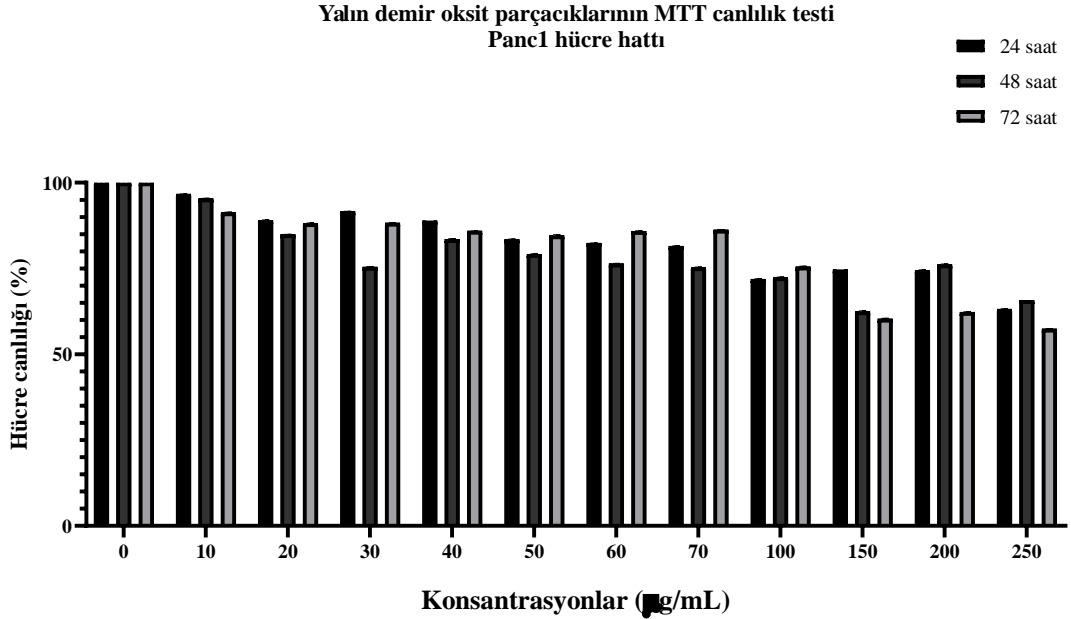
Kaplamasız yalın demir oksitlerin, PAA kaplamalı (250 ve 450 kDa) demir oksitlerin (MagNP), MagNP/BS konjugatının ve DeNAo-MagNP/BS konjugatının Panc02 ve Panc1 hücreleri üzerine etkileri Bölüm 5.6.1’de anlatıldığı gibi yapılan MTT testi ile değerlendirildi ve elde edilen kantitatif veriler Microsoft Excel programı ile düzenlendikten sonra (ortalama değerleri ve standart sapmaları belirlendikten sonra), Graphpad Prism 8 programında grafikleri çizildi.

6.6.1 Yalın demir oksit parçacıkları ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının MTT canlılık testi

Üzerinde kaplama bulunmayan, yalın haldeki demir oksit parçacıklarının *in vitro* hücre kültürü canlılık testi Bölüm 5.6.1.1’de anlatıldığı gibi yapıldı. Belirtilen dozlarda uygulanan yalın demir oksit parçacıklarının Panc02 ve Panc1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmesi için 24, 48 ve 72 saat aralıklarla uygulanan MTT testi ile incelendi. Kontrol olarak sadece hücre besi yeri uygulanan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek hazırlanan grafikte Panc02 hücre hattına uygulanan yalın demir oksit parçacıklarının 0-70 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarına bakıldığında 24 ve 48 saatlerde konsantrasyona bağlı bir azalış olsa da anlamlı bir fark gözlenmediği ve canlılığın %99-82 arası olduğu tespit edildi. Demir oksit parçacıklarının 70 µg/ml konsantrasyonun üstüne çıktığında hücre canlılığının %80’in altına düştüğü tespit edildi. Özellikle 250 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığının minimuma indiği ve sırasıyla 24 ve 48 saatte %68 ve %64 olduğu tespit edildi. 72 saatte ise 0-150 µg/ml konsantrasyon aralığına kadar %70’lerde olan canlılığın 150-250 µg/ml konsantrasyon aralığında %69-61 arası olduğu tespit edildi (Şekil 6.6.1). Panc1 hücrelerinde 24 ve 48 saatleri arasında anlamlı bir fark görülmemekle birlikte konsantrasyona bağlı hücre canlılığında azalma görüldü. En düşük hücre canlılığının 24 saatte 250 µg/ml demir oksit uygulamasında olduğu ve bu oranın %63 olduğu tespit edildi. 48. saatte elde edilen verilerde ise 150 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığının %62 olduğu gözlemlendi. 48-72 saatleri arasında ise canlılığın %57’ye kadar düştüğü gözlemlendi (250 µg/ml) (Şekil 6.6.2).



Şekil 6.6.1. Panc02 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan yalın demir oksit parçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

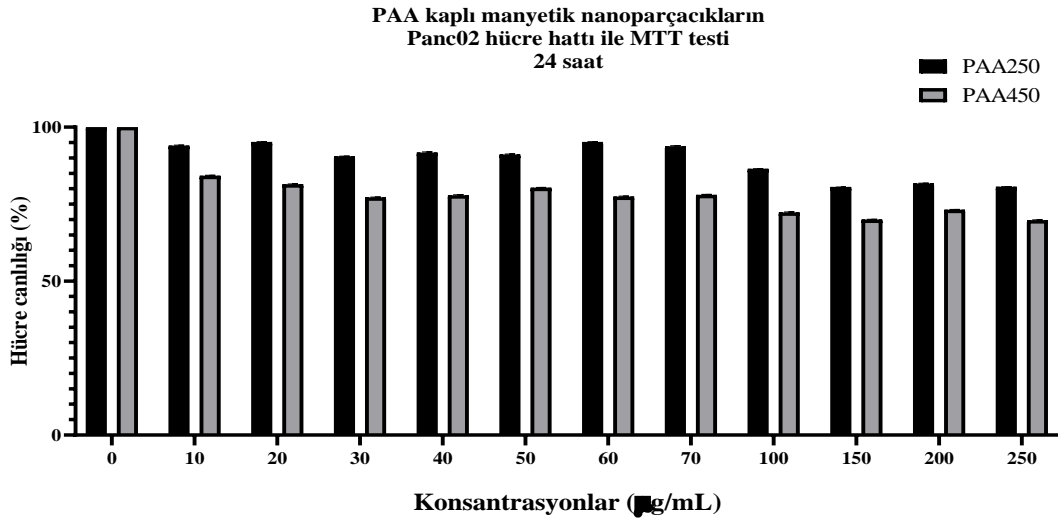


Şekil 6.6.2. Panc1 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan yalın demir oksit parçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

6.6.2 PAA kaplı MagNP'ler ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının MTT canlılık testi

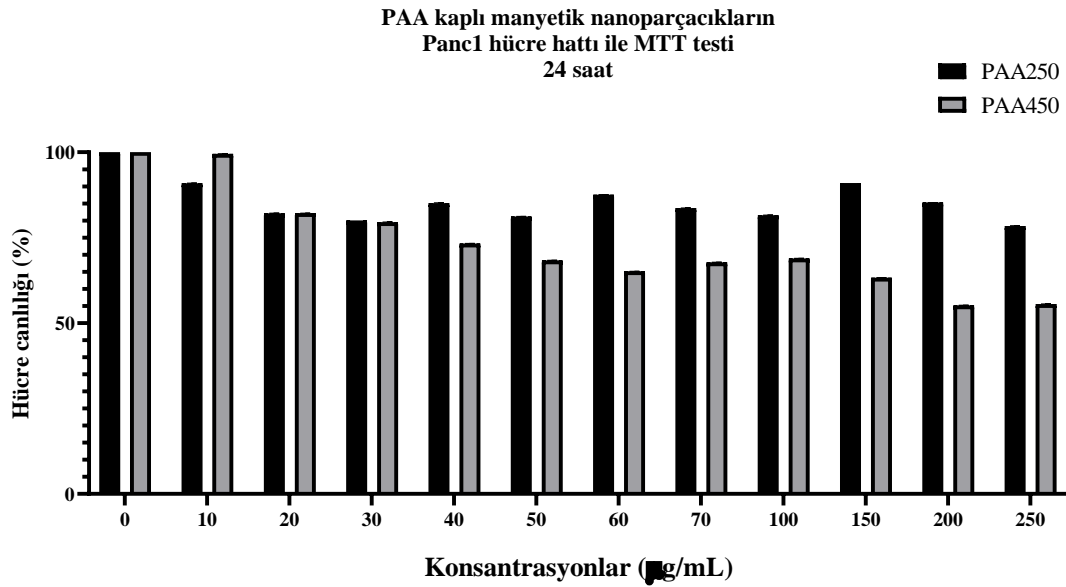
250 kDa ve 450 kDa olmak üzere iki farklı PAA kaplaması bulunan, MagNP nanoparçacıklarının *in vitro* hücre kültürü canlılık testi yalın demir oksit parçacıklarında olduğu gibi MTT canlılık testi kullanılarak yapıldı. Bölüm 6.6.2'de anlatıldığı gibi belirlenen dozlarda Panc02 ve Panc1 hücrelerine uygulanan MagNP'ler 24, 48 ve 72 saat olmak üzere incelendi. Alınan kantitatif sonuçlarda kontrol olarak kullanılan sadece hücre besi yeri uygulanmış hücrelerin canlılık değerleri %100 olarak kabul edildi. Buna göre uygulanan MagNP nanoparçacıklarının her bir konsantrasyonu için iki hücre hattında da canlılık yüzdeleri belirlendi.

Panc02 hücreleri için hazırlanan canlılık grafiğinde 250 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin 0-70 µg/ml konsantrasyon aralığında uygulandığı hücrelerdeki canlılığın %95-90 aralığında sabit kaldığı ve 100-150 µg/ml konsantrasyon aralığında canlılığın %86-80 olduğu tespit edildi. 450 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerde ise 10 µg/ml konsantrasyonda %84 ile başlayan canlılık oranının giderek azaldığı ve ara konsantrasyonlarda %77 oranında seyrederken, %69'a (150 µg/ml) kadar düştüğü gözlemlendi (Şekil 6.6.3).



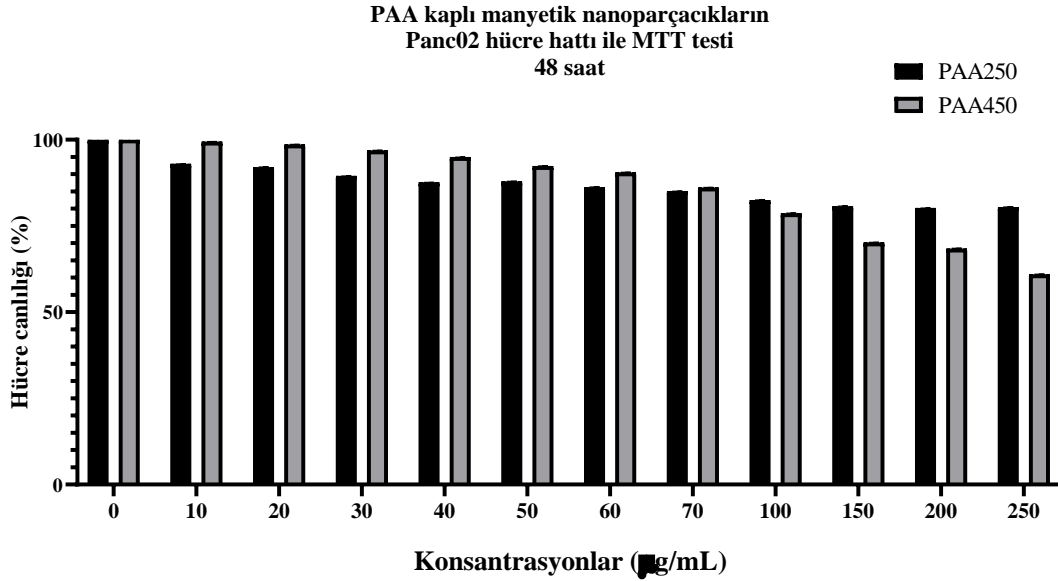
Şekil 6.6.3. Panc02 hücre hattına 24 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Panc1 hücrelerine 24 saat uygulanan 250 kDa PAA ve 450 kDa PAA ile kaplanan MagNP'ler incelendiğinde 250 kDa ile kaplanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerdeki canlılık %90-78 aralığında iken, 450 kDa ile kaplanan MagNP'lerin 0-40 µg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerdeki canlılığın %99-73 arasında olduğu gözlemlendi. 50-250 µg/ml konsantrasyonlarında ise bu değerlerin %70'in altına; 200 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarında canlılığın %55'e düştüğü gözlemlendi (Şekil 6.6.4).



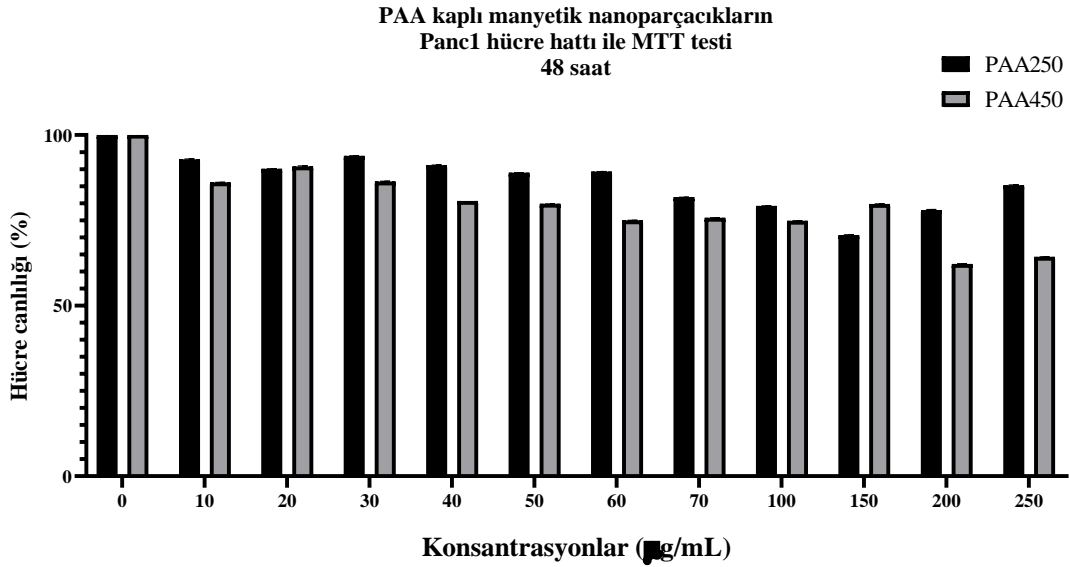
Şekil 6.6.4. Panc1 hücre hattına 24 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Panc02 hücre hattına uygulanan 250 kDa ve 450 kDa PAA kaplamalı MagNP'ler 48. saatte incelendiğinde 250 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin hücre canlılığını %80'in altına düşmediği tespit edildi. Konsantrasyona bağlı olan bu azalma %92-80 aralığında seyrederken, minimum hücre canlılığının (%80) bulunduğu dozun 150 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde olduğu görüldü. 200-250 µg/ml konsantrasyonlarında da aynı şekilde canlılığın %80 olduğu gözlemlendi (Şekil 6.6.5). 10 µg/ml konsantrasyonda uygulanan 450 kDa'lık PAA kaplamasına sahip MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde 48 saatin sonunda hücre canlılığının %99 olduğu tespit edildi. Konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı azalsa da 60 µg/ml konsantrasyondan sonra canlılığın %90'ın altına düştüğü gözlemlendi. 70-250 mg/ml konsantrasyon aralığında ise canlılığın daha da düşerek %60'lara kadar indiği gözlemlendi (Şekil 6.6.5).



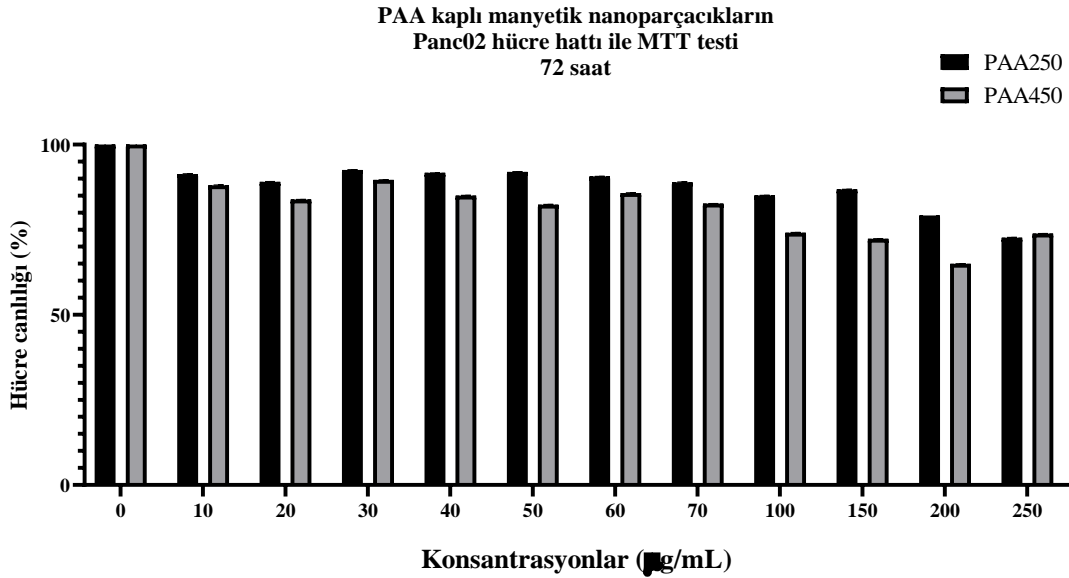
Şekil 6.6.5. Panc02 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Panc1 hücre hattına uygulanan 0-250 µg/ml konsantrasyon aralığında 250 kDa ile kaplanarak hazırlanan MagNP'ler ile elde edilen sonuçlarda 24 ve 48 saatleri arasında hücre canlılığının %92 ile %70 aralığında olduğu gözlemlendi. 10 µg/ml konsantrasyonda %92 ile başlayan canlılığın konsantrasyona bağlı olarak düştüğü ve 50 mg/ml konsantrasyonda uygulanan hücrelerde %90'ın altına indiği görüldü. Canlılığın %70 olarak en düşük görüldüğü konsantrasyonun ise 150 µg/ml olduğu tespit edildi. 450 kDa PAA ile kaplanarak hazırlanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde ise 24-48 saatleri arasında canlılığın doza bağlı olarak azaldığı ve 10 mg/ml konsantrasyon uygulamada canlılık oranı %86 ile başlarken, minimum değer %62 canlılık ile 200 µg/ml konsantrasyonda olduğu gözlemlendi (Şekil 6.6.6).



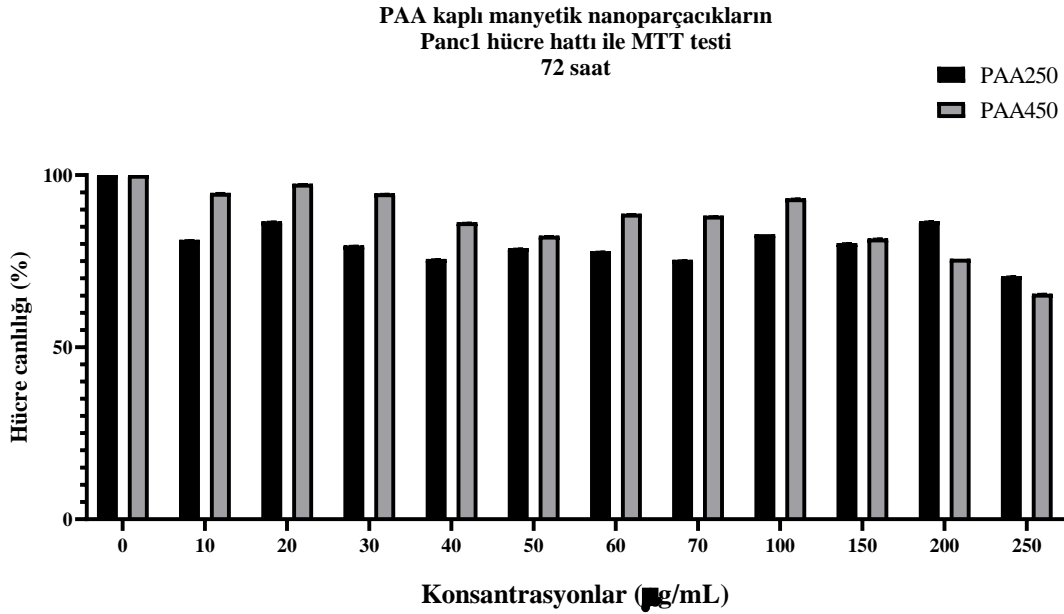
Şekil 6.6.6. Panc1 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Panc02 hücrelerine 72 saat boyunca uygulanan 250 kDa ve 450 kDa PAA kaplanarak hazırlanan MagNP'lerin hücre canlılığına etkisine bakıldığında, her iki kaplamanın da uygulandığı hücrelerde canlılığın konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görüldü. 250 kDa PAA ile kaplanarak hazırlanan MagNP'lerin uygulandığı Panc02 hücreleri %91 ve %72 arasında canlılık gösterdi. Minimum canlılık yüzdesinin (%72) 250 µg/ml konsantrasyonda MagNP uygulanan hücreler olduğu tespit edildi. 450 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde ise canlılık oranının %88 ve %64 aralığında konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görüldü. Minimum hücre canlılığının (%64) olduğu konsantrasyon 200 mg/ml iken, 250 mg/ml konsantrasyona bakıldığında canlılık oranının tekrar %73'e çıktığı görüldü (Şekil 6.6.7).



Şekil 6.6.7. Panc02 hücre hattına 72 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

250 kDa ve 450 kDa PAA ile kaplanarak hazırlanan MagNP'ler Panc1 hücrelerine 72 boyunca uygulandığında, her iki kaplama ile hazırlanan örneklerin de hücre canlılığına etkisinin doza bağlı olmadığı ancak canlılığa en fazla etki eden konsantrasyonun her iki kaplama için de (250 kDa kaplama için %70, 450 kDa kaplama için %65) 250 µg/ml olduğu görüldü. 250 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde canlılık oranının en yüksek olduğu (%81) konsantrasyon 10 µg/ml iken, 450 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde en yüksek canlılık oranı hem 10 µg/ml konsantrasyonda hem de 40 µg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde görüldü. (Şekil 6.6.8).



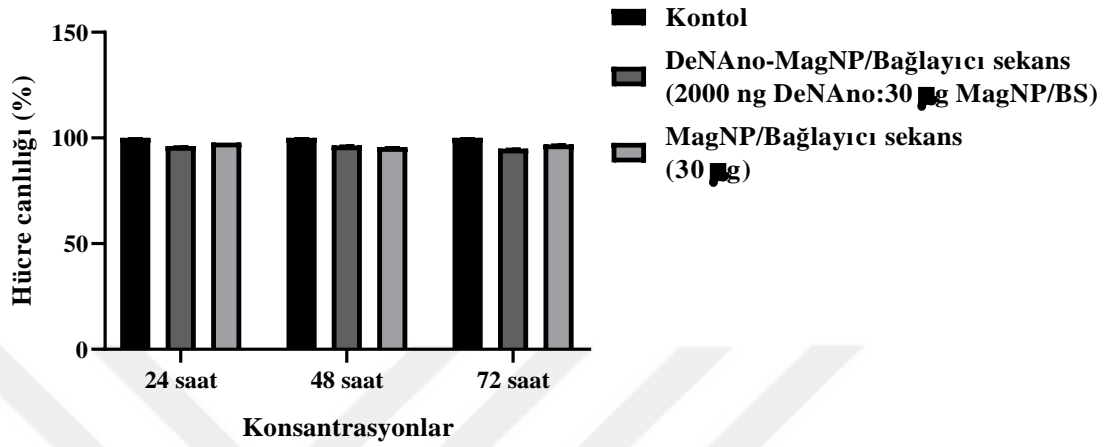
Şekil 6.6.8. Panc1 hücre hattına 72 saat boyunca uygulanan PAA ile kaplanmış MagNP nanoparçacıklarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

6.6.3 DeNano-MagNP/FAM ve MagNP/BS ile muamele edilen Panc02 ve Panc1 hücre hatlarının MTT canlılık testi

Konjuge edilen DeNano ile MagNP/BS ve yalnızca MagNP/BS'nin Panc02 ve Panc1 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisine bakılması için Bölüm 5.6.1'de anlatıldığı gibi MTT testi uygulandı. 24, 48 ve 72 saat boyunca 2000 ng DeNano ve 30 µg MagNP ile hazırlanan konjugasyonun uygulandığı hücrelerde canlılık oranının tespit edilebilmesi için sadece hücre besi yeri uygulanan hücreler kontrol olarak kullanıldı ve hücre canlılıkları %100 olarak kabul edildi. Microsoft Excel programında düzenlenen canlılık ve standart sapma değerleri grafiği çizilmek üzere Graphpad Prism 8 programına aktarıldı.

Panc02 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan MagNP/BS ve DeNano-MagNP/BS konjugatlarının 72 saat boyunca hücreler üzerindeki canlılığa etki etmediği, canlılığın her saat ve her konjugat uygulaması için benzer olarak %97-94 arasında olduğu görüldü. MagNP/FAM konjugatının uygulandığı hücrelerdeki canlılık oranı maksimum %97 ile ilk 24 saat içerisinde alınan sonuçlarda görüldü. Minimum değer olan %95 ise 24-48 saatleri arasında elde edilen sonuçlarda alınırken, 48-72 saatleri arasında alınan sonuçlarda canlılığın %95'ten %97'ye çıktığı görüldü (Şekil 6.6.9.). DeNano-MagNP/FAM konjugatında minimum hücre canlılığı %94 olarak 72 saatlik uygulamanın ardından elde edilen sonuçlarda görüldü. 0-48 saatleri arasında alınan iki sonuçta ise değerler benzer olarak %96 canlılık oranı tespit edildi (Şekil 6.6.9.).

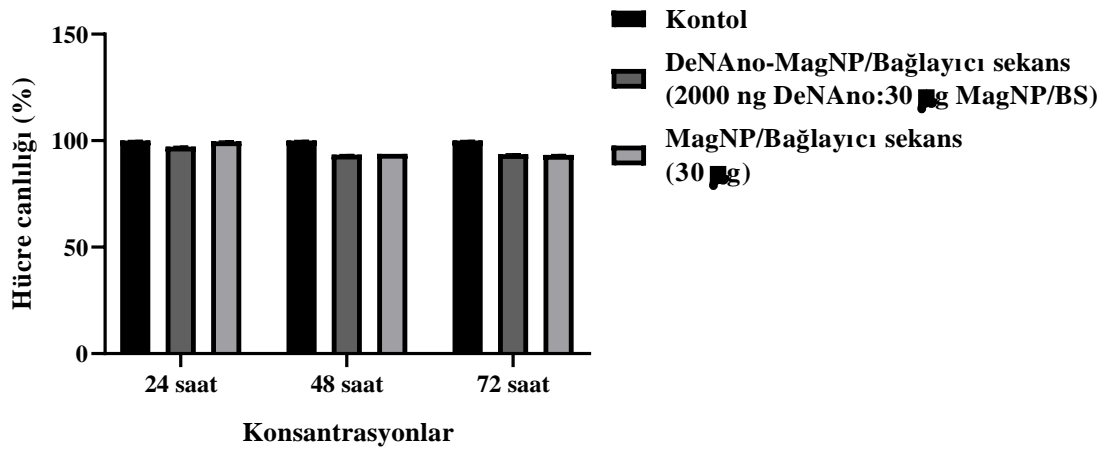
Konjugatların Panc02 hücre hattı ile MTT testi



Şekil 6.6.9. Panc02 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan DeNANO-MagNP/BS ve MagNP/BS konjugatlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

Panc1 hücresine uygulanan konjugatların da Panc02 hücrelerindeki uygulamaya benzer olarak hücre canlılığını %93'ün altına düşürmediği gözlemlendi. MagNP/FAM ve DeNANO-MagNP/FAM konjugatlarında ilk 24 saatte elde edilen verilerde en yüksek canlılık oranı sırasıyla %99 ve %97 olarak belirlendi. 48 ve 72. saatlerde elde edilen verilerde ise canlılık oranının her iki konjugat uygulamasını içeren hücreler için de %93 olduğu görüldü (Şekil 6.6.10).

Konjugatların Panc1 hücre hattı ile MTT testi

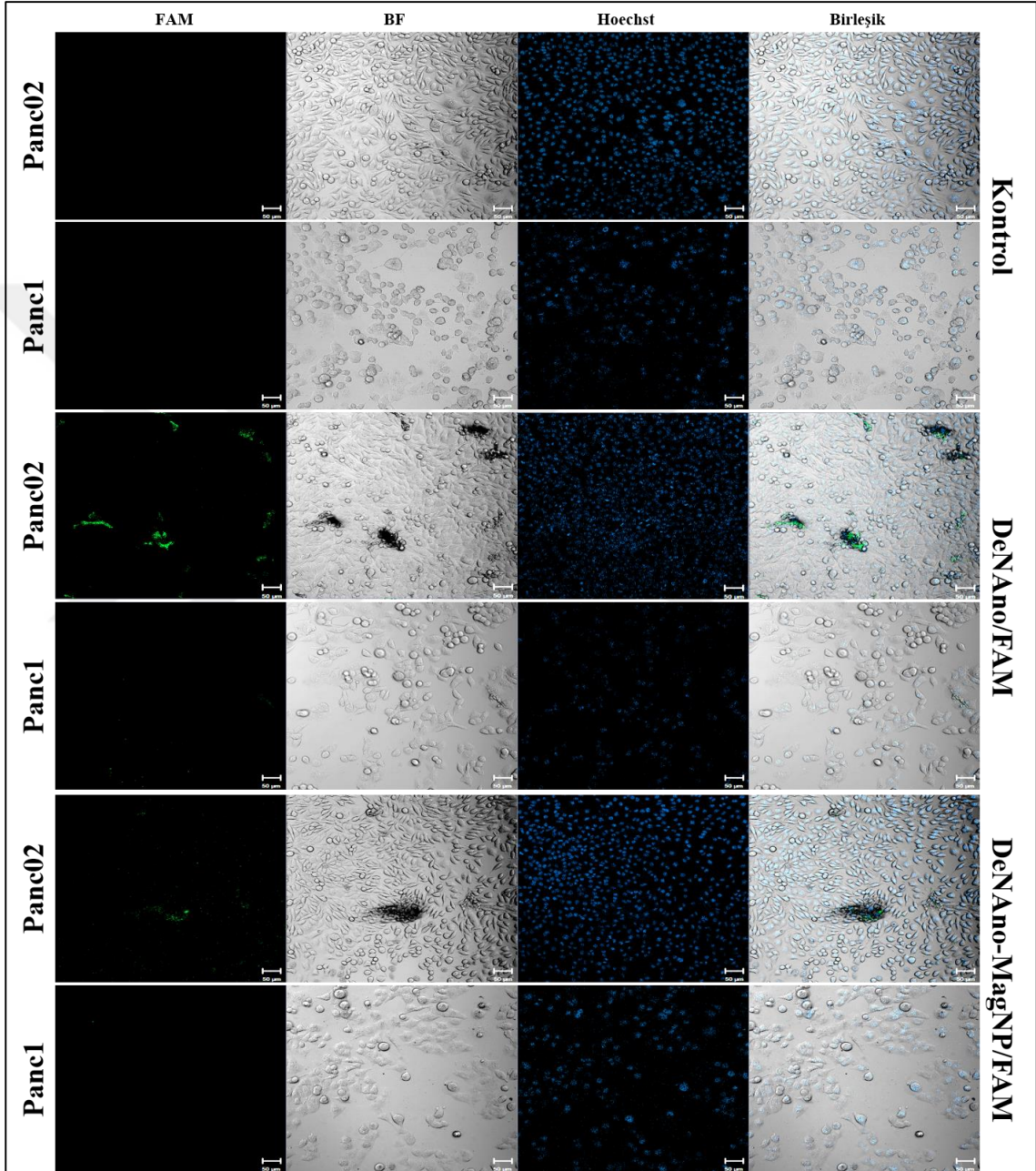


Şekil 6.6.10. Panc1 hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan DeNANO-MagNP/BS ve MagNP/BS konjugatlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi

6.7 Hücre Seçiciliği

C39 sekansı kullanılarak üretilen DeNA^o'nun Panc02 hücre hattına seçiciliği bilinmektedir. DeNA^o'nun üzerine floresan işaretli bağlayıcı sekans (Tablo 5.1.5) ve MagNP nanoparçacıkları bağlandıktan sonra seçiciliğini kaybetmediğinin gösterilmesi için konfokal mikroskobu kullanıldı. Bunun için hücelere 24 saat boyunca DeNA^o/FAM ve DeNA^o-MagNP/FAM konjugatları uygulandı. 24 saatin sonunda hücelere üçer kez 1X PBS ile yıkanarak bağlanmayan konjugatların uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra hücelere yeni besi yeri içerisinde Hoechst DNA boyası uygulanarak çekirdeklerinin konfokal mikroskop altında floresan ışımaya ile görüntülenmesi sağlandı. Elde edilen fotoğraflar üzerinden DeNA^o/FAM ve DeNA^o-MagNP/FAM konjugatlarının Panc02 hücre hattına seçiciliği Panc1 hüceleri ile karşılaştırıldı. Kontrol olarak Panc02 ve Panc1 hücelere yalnızca yeni besi yeri içerisinde Hoechst DNA boyası uygulandı.

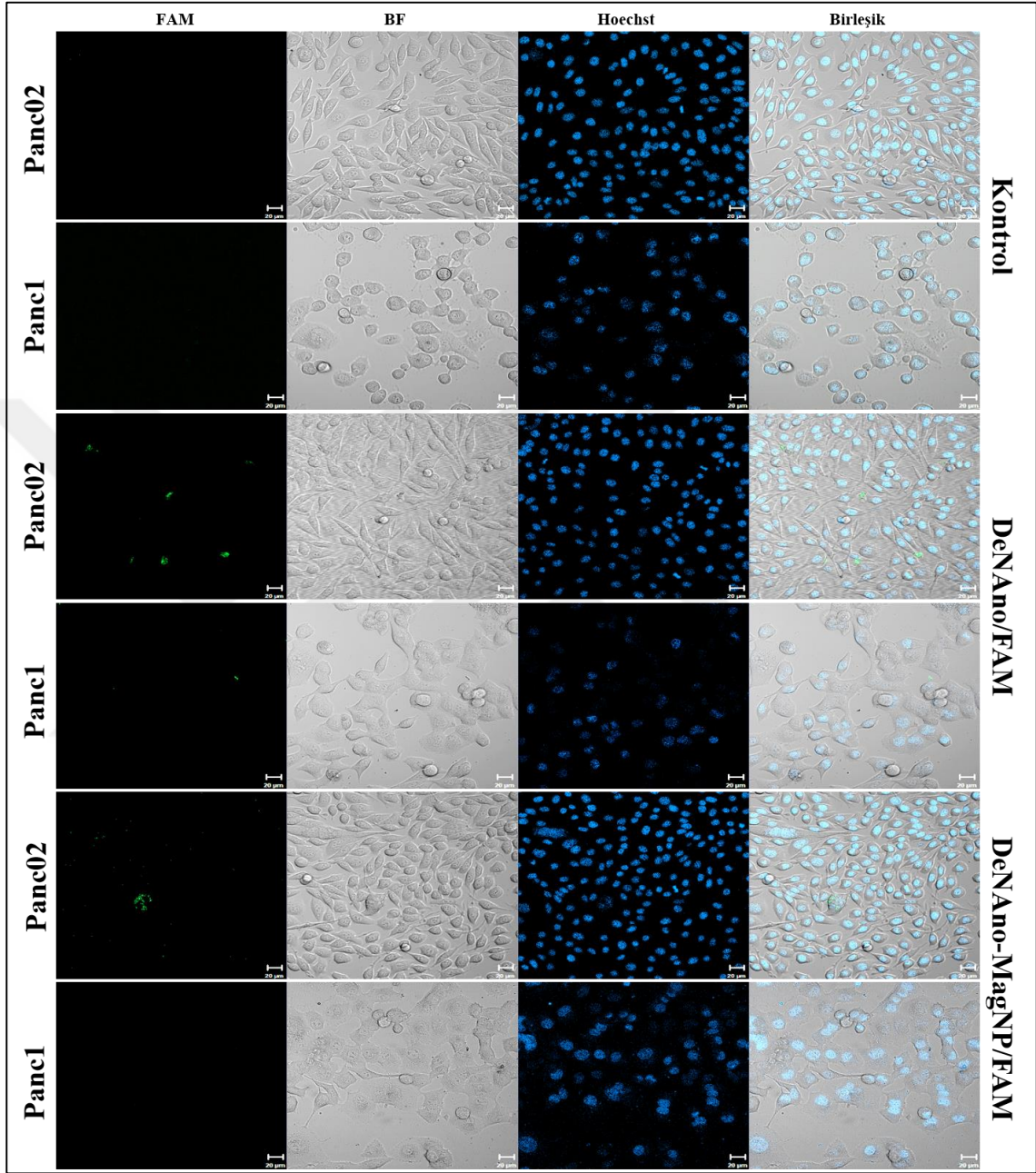
6.7.1 DeNano/FAM ve DeNano-MagNP/FAM konjugatlarının Panc02 hücrelerine seçiciliği



Şekil 6.7.1. Kontrol (sadece Hoechst uygulanan hücreler), DeNano/FAM konjugatı ve DeNano-MagNP/FAM konjugatı grubunun uygulandığı Panc02 ve Panc1 hücrelerinin konfokal mikroskopunda 10X objektif ile elde edilen fotoğraf görüntüleri, FAM: 495 nm uyarılma/520 nm emisyon altında floresan görüntü, BF: Aydınlık alan, Hoechst: 350 nm uyarılma/461 nm emisyon altında floresan görüntü, Birleşik: FAM, BF ve Hoechst görüntülerinin birleştirilmesi ile elde edilen görüntü, bar uzunluğu: 50 μ m

10X objektif ile elde edilen konfokal görüntülerinde Panc02 hücreleri daha agresif olduğu için Panc1 hücrelerinin sayıca daha az olduğu görüldü. 24 saat süre ile uygulanan DeNAo/FAM konjugatı 495 nm uyarılma/520 nm emisyon'da floresan ışıma veren FAM ajanı sayesinde konfokal mikroskopta görüntüledi. Şekil 6.7.1'de paylaşılan görüntülerde hem DeNAo/FAM konjugatının hem de DeNAo-MagNP/FAM konjugatının yalnızca spesifik olduğu bilinen Panc02 hücrelerine bağlanarak PBS yıkamalarında sistemden ayrılmadığı tespit edildi. Panc1 hücrelerinde ise spesifikliği olmadığı için PBS ile yıkamalar sonucu petri kabından uzaklaştığı görüldü. DeNAo/FAM konjugatının Panc02 üzerindeki görüntüde kümeleşerek daha büyük yapıdaki nanoparçacıklar oluşturduğu ancak DeNAo-MagNP/FAM konjugatının daha homojen dağılım gösterdiği gözlemlendi.

Bu sonuçlara ek olarak, aynı hücreler 2 kat daha fazla yakınlaştırma için 20X objektif altında görüntüledi (Şekil 6.7.2). Elde edilen sonuçlarda Panc02 hücrelerinin yüzeyinde görülen DeNAo/FAM konjugatının, Panc1 hücre hattında çok daha az olmak üzere hücrelerin yüzeyine spesifik olmadığı görüntüledi. Panc02 hücrelerinin yüzeyinde DeNAo/FAM konjugatından daha homojen dağılım gösteren DeNAo-MagNP/FAM konjugatı ise Panc1 hücre hattında tespit edilmedi.



Şekil 6.7.2. Kontrol (sadece Hoechst uygulanan hücreler), DeNano/FAM konjugatı ve DeNano-MagNP/FAM konjugatı grubunun uygulandığı Panc02 ve Panc1 hücrelerinin konfokal mikroskopunda 20X objektif ile elde edilen fotoğraf görüntüleri, FAM: 495 nm uyarılma/520 nm emisyon altında floresan görüntü, BF: Aydınlık alan, Hoechst: 350 nm uyarılma/461 nm emisyon altında floresan görüntü, Birleşik: FAM, BF ve Hoechst görüntülerinin birleştirilmesi ile elde edilen görüntü, bar uzunluğu: 20 µm

7 TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda DNA-tabanlı bir nanopartiküler sistem olan DeNAo kullanılarak Panc02 mürin pankreas kanser hücre hattının hedeflenebilirliği ve bu sistemin manyetik nanoparçacıklar gibi başka sistemler ile entegre edilebilirliği araştırılmıştır. Tek zincir DNA sentezinde kullanılan RCA yöntemi ile Panc02 hücre hattına spesifik C39 sekansının konkatamer olarak art arda dizilmesi ile oluşan DeNAo nanoparçacıkları (Ruff ve ark., 2014) elde edilmiş (Şekil 5.2.1), elde edilen nanoparçacıkların karakteristik özellikleri ve Panc02 hücre hattı için seçiciliği, malzeme bilimi ve karakterizasyonu, moleküler biyoloji, biyokimya ve hücre kültürü teknikleri ile araştırılmıştır. Elde edilen DeNAo'ların başka nanopartiküler sistemlerin hücreye yönlendirilmesinde hedefleyici olarak kullanım uygunluğu moleküler biyoloji ve biyokimya teknikleri kullanılarak komplementer sekansların fonksiyonel gruplarının DeNAo'ya entegre edilebilirliği üzerinden çalışılmıştır.

DNA nanoparçacıklar oluşturulurken öncelikle bir kalıp DNA'ya ihtiyaç duymaktadır. Kalıp DNA, istenilen sekansın bir komplementeri olarak dizayn edilen oligonükleotidin halkasal hale getirilmesiyle oluşturulmaktadır. Çalışmamızda bu işlem sentetik olarak üretilen 100 bp'ye sahip olan C39 komplementer sekansının (Tablo 5.1.5) 5' ve 3' uçlarının 40 bp'lik bir primer sekans (Tablo 5.1.5) ile bir araya getirilmesini kapsamaktadır (Şekil 6.1.1). Buna göre; halkasal kalıp DNA üzerindeki primer sekansına dNTP'lerin eklenmesiyle DeNAo elde edilmiştir (Şekil 6.2.1). Lei Mei ve ark. NF'leri oluştururken kullandıkları kalıp DNA'yı ve NF'leri %2 konsantrasyondaki agaroz jel üzerinde gösterebilmişlerdir. Buna göre kullanılan komplementer sekans ve primer sekans jel üzerinde görünürken RCA ürünleri olan NF nanoparçacıkları büyüklüklerinden ötürü agaroz jel üzerinde ilerleyememiş ve yerleştirildikleri kuyucuklarda parlaklıkları ile tespit edilmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızda %2 konsantrasyonda agaroz jel kullanılmış, C39 sekansının komplementeri (Şekil 6.4.1T) ve halkasal kalıp DNA (Şekil 6.4.2L) jel üzerinde görüntülenebilmiştir. Ancak RCA ürünü olan DeNAo kuyucukta görüntülenememiştir (Şekil 6.4.1-RCA₁₅, RCA₃₀, RCA₆₀). C39 sekansının komplementeri olan sekansın 5' ve 3' uçlarının enzimatik aktivite ile bir araya gelerek halkasal kalıp

DNA'yı oluşturduğunun agaroz jel üzerinde gösterilmesi için C39 sekansının komplementeri (Şekil 6.4.2T) ve primer sekans (Şekil 6.4.2P) ayrı ayrı ve birleştirilerek (Şekil 6.4.2K) sistem üzerindeki kuyucuklara yüklenmiştir. Elde edilen sonuçlarda halkasal kalıp DNA ürününün, C39 sekansının komplementeri ve primer sekansının karışımından farklı olarak daha parlak bir bant ile tespit edilmesi C39 sekansının 5' ve 3' uçlarının enzimatik olarak bir araya getirildiğini göstermiştir. Halkasal kalıp DNA ve C39 sekansının komplementeri 100 bp hizasında bulunan markır üzerinde görünürken, primer sekansı (40 bp) 100 bp'nin altında kaldığı için tespit edilememiştir (Şekil 6.4.2).

Nanodrop ile gerçekleştirilen nükleotit miktar tayininde elde edilen sonuçlar serbest nükleotitlerden (dNTP'ler) gelen sinyali de içerdiğinden bu yöntem DeNA^o'daki nükleotit miktarının kesin değerini saptamada yeterli olmamıştır. Tablo 6.4.1'de gösterilmiş olan nanodrop sonuçları, sentez ve saflaştırma sonrası her DeNA^o üretiminin kendi içerisinde değersel tutarlılığı ve tekrar edilebilirliğinin hızlı takibi için kullanılmıştır. Oligreen ile boyama yönteminin 6 nükleotitten daha uzun ssDNA'ların miktar tayininde hassas bir yöntem olduğu bilinmektedir (156). Bu nedenle DeNA^o'daki nükleotit miktarının daha hassas tespiti için Oligreen ssDNA boyası kullanılmıştır. Ayrıca Oligreen yöntemi kullanılarak alınan değerler ile RCA sentez yönteminin verimliliği de hesaplanabilmiştir. RCA sentez yöntemi verimliliği hesaplanırken 0,005 ile 0,1 ng/ml konsantrasyon aralığından ziyade, 0,5 ve 50 ng/ml konsantrasyonları aralığındaki değerlerde tutarlılık gösterdiği görülmüştür (Tablo 6.4.2). Çalışmamızda Oligreen ile boyanan DeNA^o'ların 480 nm uyarılma/520 nm emisyon'da verdiği absorbans değerleri ölçülmüştür (Tablo 6.4.2). Alınan absorbans değerlerinden C39 komplementer sekansının ve primer ara sekansının katkısı çıkartılarak 15, 30 ve 60 dakikalık RCA sentez prosedürlerine göre DeNA^o nükleotit miktarları sırasıyla 15,1 ng, 18,6 ng, 28,6 ng; RCA ile DeNA^o sentez verimi yüzdeleri ise sırasıyla %34,4, %42,4 ve %65,2 olarak tespit edilmiştir.

DNA nanoparçacığın büyüklüğünün RCA süresi, dNTP konsantrasyonu ve enzim miktarı ile doğru orantılı olması beklenmektedir. Yifan Lv ve ark. yaptığı çalışmada

NF'ler için 0,5-30 saate kadar üretimi gerçekleştirilen örnekler mevcuttur (11). Bu çalışmada üretim süresi arttıkça nanoparçacığın büyüklüğünün arttığı, SEM analizleri ile gösterilmiştir. Benzer şekilde Steiner ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada 15, 30, 45 ve 60 dk'lık sentez prosedürleri ile üretilen DeNA_{no}'ların üretim süresi arttıkça büyüklüklerinin de arttığı DLS sonuçları ile gösterilmiştir. Çalışmamızda 15, 30 ve 60 dk sentez prosedürleri ile üretilen DeNA_{no}'ların SEM ile büyüklük ve morfoloji analizi yapılmıştır. SEM ile alınan görüntülerde, farklı üretim süreleri olan DeNA_{no}'lar arasında anlamlı bir fark olmadığı, ortalama büyüklüklerinin 200-500 nm arasında ölçüldüğü görülmüştür (Şekil 6.4.4). DLS sonuçları SEM ile alınan görüntülere paralel olarak farklı sentez sürelerine sahip DeNA_{no} nanoparçacıklarının büyüklükleri arasında anlamsal bir fark oluşmadığını ve ortalama büyüklüklerinin 600 nm olduğunu göstermiştir (Şekil 6.4.6). Nanodrop ve Oligreen boyası kullanılarak elde edilen DeNA_{no}'nun nükleotit miktarı analizindeki üretim süresine bağlı olan artış, SEM ve DLS sonuçlarında görülmemiştir. Bu sonuçlar, DeNA_{no} üretim süresi arttıkça daha fazla nükleotide sahip olsa da bu nükleotitlerin moleküler etkileşimlerle kendi içerisinde katlanarak yumağa benzer yuvarlak bir yapı içinde sıkılaşması ile neticelendiği (Şekil 6.4.4) için büyüklüğü değişmeyen yoğun bir DNA nanoparçacık elde edildiğini göstermektedir. Farklı üretim sürelerine sahip DeNA_{no}'ların Şekil 6.4.7'de gösterilen zeta potansiyel değerlerine (-21 ile -32 mV aralığında) bakıldığında ise yüzey yükleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. dNTP miktarı, Yifan Lv ve ark. çalışmasında 1,9 mM iken çalışmamızda 0,06 mM olarak kullanılmıştır. 2015 yılında Yifan Lv ve ark. tarafından yapılan NF nanoparçacığı üretimi çalışmasında kullanılan 952 U/ml phi29 polimeraz konsantrasyonu, Ruff ve arkadaşlarının çalışmalarındaki sistemi baz alan çalışmamızda uygulanan phi29 polimeraz miktarının (50 U/ml) (Ruff ve ark., 2014; Steiner ve ark., 2010) çok üzerindedir.

DeNA^o'nun saflaştırılması için santrifüj ve diyaliz olmak üzere iki farklı yöntem tecrübe edilmiştir. İlk yöntem olarak Yifan Lv ve ark. (2015) uyguladığı santrifüj yöntemi kullanılmıştır. Santrifüj ile saflaştırma sonucu 0,1-0,6 ng/ml arası gibi düşük miktarda ürün elde edildiği için santrifüjün uygun bir yöntem olmadığı neticesine varılmıştır (Tablo 6.4.1). İkinci olarak diyaliz yöntemi için Ruff ve ark. uyguladığı metod kullanılmıştır (Ruff ve ark., 2014). Tablo 6.4.1'de gösterildiği gibi diyaliz ile elde edilen ürün miktarının, santrifüj ile elde edilen ürün miktarından daha fazla olması santrifüj ile saflaştırma sırasında DNA nanoparçacık kaybı olduğunu düşünürmüştür. Bu sebeple çalışmalara diyaliz yöntemi ile elde edilen DeNA^o'lar ile devam edilmiştir.

DeNA^o'nun saflaştırılması için distile su ve Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ayrı ayrı kullanılmıştır. İki farklı ortamda yapılan diyaliz ile ssDNA'nın oluşturduğu sıkı bağlar anlaşılma^{ya} çalışılmıştır. İlk olarak distile su ile diyaliz edilerek saflaştırma işlemi yapılmış ve alınan SEM görüntülerinde yoğun ve sıkı bir şekilde birbiri üzerine katlanan ssDNA yapısı gözlemlenmiştir (Şekil 6.4.3). Görüntülerdeki büyük parçacıkların -küresel yapıların yan yana gelmesi ile oluşan yuvarlak konveks yüzey hatları- birkaç DeNA^o'nun birleşmesiyle oluştuğu anlaşılmaktadır. Bu durumun önüne geçilebilmesi ve moleküler etkileşimin oluşturduğu bazlar arasındaki bağların kırılabilmesi için Yifan Lv ve ark. uyguladığı metod olan yüksek sıcaklıkta ısıtma (70 °C) ve sonra soğumaya bırakma yöntemi DeNA^o'lara uygulanmıştır (Yifan Lv ve ark., 2015). Çalışmamızda elde edilen ve Şekil 6.4.4'te ayrıntılı olarak verilen SEM görüntüleri, yüksek sıcaklık ile -kendi içerisindeki karakteristik yapıyı koruyarak- birleşik nanoparçacıkların birbirlerinden ayrılmasının sağlanmasının mümkün olduğunu göstermiştir. Uygulanan ısıtma ve soğutma yöntemi ile ZetaSizer cihazı kullanılarak alınan farklı üretim sürelerine sahip DeNA^o'ların büyüklük değerlerinin de SEM görüntülerini destekler şekilde birbirlerinden farklı olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.4.6). Bu sonuçlara göre DeNA^o SEM görüntülerinde ortalama 200-500 nm olarak görüntülenmiş ve DLS sonuçlarında da her bir DeNA^o'nun 400-800 nm arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu durum DLS öncesi ısıtma işlemi uygulansa da DLS sırasında geçen süre içerisinde sıcaklığın tekrar düşmesi ile termodinamik olarak parçacıklar arası etkileşimlerin zamanla tekrar oluşabildiğini

göstermiştir. Bu sebeple herhangi bir uygulama öncesi DeNAno'ların ısıya maruz bırakılarak monodispers hale getirilmeleri ve ardından kullanılmalarının, hedefleme için gerekli partiküler seçiciliklerini korumaları için gerekli olduğu düşünülmektedir. Sıcaklık artışının DeNAno üzerindeki etkisi nükleotit zinciri içerisindeki intramoleküler etkileşimlerle -hidrojen bağları, elektrostatik ve van der Waals etkileşimleri- etkisi olurken, nükleotit omurga yapısındaki kovalent bağlara etkisinin olması ve DeNAno'lara yapısal bir zararı söz konusu değildir.

Pozitif değerlikli metal iyonlarının polianyonik yapıda olan nükleik asitleri stabilize ettiği bilinmektedir (Theophanides ve ark., 1986; Anastassopoulou ve ark., 2002). Katyon içeren çözeltilerin tampon olarak kullanılması yoluyla DeNAno'yu oluşturan oligonükleotitlerin kendi aralarındaki moleküler etkileşimleri kırmanın mümkün olabileceği düşünülmüştür. Bu bilgi ışığında, Tris-Mg²⁺ içeren bir tampon çözelti hazırlanarak DeNAno bu tampon çözelti ile diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonunda elde edilen örneklerin büyüklükleri ZetaSizer cihazında analiz edilmiştir (Şekil 6.5.11). Şekil 6.5.11A'da verilen DLS grafiğinde DeNAno'nun ortalama büyüklüğü 341,2 nm olarak yani distile suda diyaliz edilen DeNAno'nun ortalama büyüklüğünden (yaklaşık 627,7 nm) daha küçük tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Mg²⁺ katyonlarının DeNAno'yu oluşturan uzun oligonükleotidin bazıları arasına girerek iki veya daha fazla DeNAno nanoparçacığının etkileşimini engellediğine işaret etmektedir. Bu çıkarımı destekleyen bir diğer sonuç, Şekil 6.5.12A'da verilen Mg²⁺ katyonu içeren Tris tampon çözeltisi ile diyaliz edilmiş DeNAno'nun zeta potansiyel değeridir. Bu değer Şekil 6.4.7'de verilen distile su ile diyaliz edilerek saflaştırılmış DeNAno'nun zeta potansiyel değerine (-31,1±1,52 mV) kıyasla nõtreye yakın bir negatif değer (-1,1±1,20 mV) ile tespit edilmiştir. Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile diyaliz edilmiş DeNAno'nun tüm DLS verileri bir tablo halinde toplanmıştır (Tablo 6.5.3).

DeNAno'nun görüntülenmesi ve sudaki dispersitelerinin değerlendirilmesi için saflaştırılmamış DeNAno örnekleri Hoechst DNA boyası ile işaretlenerek konfokal mikroskopta görüntülenmiştir (Şekil 6.4.5). Hoechst DNA boyasının verdiği ışığa ile DeNAno'ların görüntülenmesi mümkün olmuştur. Bu nanoparçacıkların homojen olarak dağılım gösterdikleri gözlemlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan distile su içerisine Hoechst boyası eklenerek alınan görüntülerde (Şekil 6.4.5) floresan sinyal olmadığı tespit edilmiştir. Alternatif olarak, distile su içerisinde saflaştırılan DeNAno'ya "FAM" olarak kısaltılan "floresan özellikteki komplementer ara sekans" eklenerek DeNAno/FAM konjugasyonu yapılmış ve konjugatın başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin gösterilmesi için konfokal mikroskopta görüntüler alınmıştır (Şekil 6.5.1). Bu sonuçlar DeNAno'nun homojen bir şekilde dağıldığını gösterse de saflaştırıldığı sıvının iyon içermeyen distile su olması nedeniyle DeNAno nanoparçacıklarının bir araya gelmesinin termodinamik açıdan desteklendiği ve sayıca birden çok DeNAno nanoparçacığının bir arada olduğu görülmüştür. İyon miktarı ile dengelenme yapıp konfokal analizlerinin tekrar edilmesi istenmiş olsa da Tris-Mg²⁺ tampon çözeltisi ile saflaştırılan DeNAno'nun içeriğindeki mineral yoğunluğunun sebep olduğu kirliliği arka plan görüntüsü, SEM görüntülerinin alınmasını engellemiştir.

Kim ve ark. RCA metodu ile sentezledikleri ve DNF adını verdikleri DNA nanoparçacıkları negatif yüklü (örneğin, RNAase A) veya pozitif yüklü (örneğin, BSA) proteinler ile konjuge edildiklerinde DNF'in zeta potansiyel değerlerinin benzer tespit etmişler. Yalnız başına DNF'in zeta potansiyel değeri -42.7 ± 1.8 mV iken RNAase ile bağlandığında bu değer -42.5 ± 1.0 mV, BSA ile birleştiğinde ise -43.0 ± 1.8 mV olduğu gözlemlenmiş (Kim ve ark., 2017). Çalışmamızda DeNAno₆₀/FAM konjugatının ZetaSizer ile analiz edilmesi sonucu zeta potansiyel değerinin ortalama $-24,6 \pm 4,48$ mV olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.5.2C). Bu sonuca sahip DeNAno/FAM konjugatının, yalnız DeNAno'dan ($-31,1 \pm 1,52$ mV, Şekil 6.4.7C) daha az negatif zeta potansiyel içerdiği görülmektedir. Ancak $-21,5 \pm 2,7$ mV zeta potansiyeli olan DeNAno₁₅'in (Şekil 6.4.7A) floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleştiğinde (DeNAno₁₅/FAM konjugatı, Şekil 6.5.2A) zeta potansiyel değerinin $-23,2 \pm 3,74$ mV olduğu ve zeta potansiyel değeri -

31,8±3,3 mV olan DeNAno₃₀'un (Şekil 6.4.7B) floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleştiğinde (DeNAno₃₀/FAM konjugatı, Şekil 6.5.2B) zeta potansiyel -31,1±1,48 mV olduğu ve bu iki nanoparçacıkta anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Sadece, RCA süresinin en daha fazla olduğu dolayısıyla en çok oligonükleotit içeren DeNAno60'ta görülen bu durum daha fazla araştırma gerektirdiğinden açıklanamamıştır.

MagNP'ler, DeNAno'ya konjuge edilebilmesi için öncelikle C39 sekansına komplementer floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleştirilmiştir. Konjugasyonun başarılı olup olmadığının anlaşılması için bağlayıcı sekansa bağlı FAM'ın floresan özelliğinden faydalanılmıştır. Çeşitli konsantrasyonlarda MagNP/FAM konjugatlarının, MagNP nanoparçacığının ve floresan işaretli bağlayıcı sekansın floresan miktarı spektrofotometre cihazında ölçüldüğünde MagNP/FAM konjugatlarının verdiği floresan miktarının diğer örneklerle göre fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.5.3). Şekil 6.5.3'te grafik haline getirilen değerlerde MagNP/FAM konjugatlarının floresan miktarının konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda floresan analizi yapılan MagNP nanoparçacıkları ve floresan işaretli bağlayıcı sekans örneği yalnız olarak incelendiğinde ise önemli bir floresan ışımaya tespit edilmemiştir (Şekil 6.5.3). Bu bulgulardan yola çıkılarak MagNP/FAM konjugasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği düşünülmüştür. Konfokal görüntüleri floresan spektroskopisi sonucunu destekler şekilde MagNP nanoparçacıklarının yüzeyine bağlanan floresan işaretli bağlayıcı sekans sayesinde floresan ışımaya yaptığını göstermiştir (Şekil 6.5.4). MagNP/FAM konjugatına kontrol olarak kullanılan MagNP nanoparçacıklarının Şekil 6.5.4'te görüldüğü gibi aynı dalga boyunda floresan ışımaya vermemesi konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini desteklemekte ve ışımaya konjugasyon ile manyetik nanoparçacıkların yüzeyine bağlanan floresan işaretli bağlayıcı sekansın kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca, Şekil 6.5.5A'deki 100K SEM görüntüsüne bakarak MagNP/FAM konjugatının su içerisinde homojen dağıldığını söylemek mümkündür. Şekil 6.5.5B'deki 200K görüntüde MagNP/FAM konjugatlarının zaman zaman toplam büyüklüğü 300 nm'den daha küçük olacak şekilde kümelenmediği görülmekle beraber, yüksek

konsantrasyon değerine rağmen (20 µg/ml MagNP/FAM) ciddi bir agregasyon oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

MagNP nanoparçacığının floresan işaretli bağlayıcı sekans ile bağlandığında ortalama büyüklüğünün artması ve yüzey yükünün değişmesi beklenmektedir. MagNP/FAM konjugatlarının büyüklük ve zeta potansiyel analizi yapılmak üzere ZetaSizer cihazından faydalanılmıştır. Şekil 6.5.6A'da MagNP nanoparçacığının 20-500 nm arasında değişen geniş bir dağılıma sahip olan büyüklük grafiğinin, Şekil 6.5.6C'de floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleştiğinde 185-500 nm aralığına kaydığı görülmüştür. MagNP nanoparçacığı (Şekil 6.5.9B ve Şekil 6.5.11B) ve MagNP/FAM konjugatı (Şekil 6.5.9D ve Şekil 6.5.11C) iki farklı zamanda ölçülmüş ve ortalama büyüklüklerinin iki farklı ölçüm için benzer olduğu gözlemlenmiştir. Buna göre ortalama büyüklüğü yaklaşık 130 nm olarak tespit edilen MagNP nanoparçacığın, floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleştiğinde oluşturduğu MagNP/FAM konjugatının ortalama büyüklüğü ise yaklaşık 260 nm olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular da spektrofotometre sonucuna paralel olarak, MagNP/FAM konjugasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğine işaret etmektedir. Aynı şekilde MagNP nanoparçacığının $-58,4 \pm 2,80$ mV (Şekil 6.5.6B) olan zeta potansiyel değerinin MagNP/FAM konjugatında $-46,3 \pm 3,15$ mV'a (Şekil 6.5.6D) yükselerek pozitif tarafa kaydığı tespit edilmiştir.

DeNAo'nun MagNP ile konjuge edilebilmesi için MagNP'ye bağlanan floresan işaretli bağlayıcı sekansın C39 oligonükleotit dizisine bağlanma özelliği kullanılmıştır. Konjugasyon işlemi, DeNAo'nun kendi içinde katlanmış tersiyer yapısının açılarak MagNP'lerin yüzeyindeki komplementer sekansa bağlanma miktarını artırmak amacı ile yüksek sıcaklık (95 °C) uygulanmıştır. Daha sonra ise ısı bağlanma sıcaklığı olan 55 °C'ye getirilmiş ve konjugasyon bu sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde konjugasyonun verimliliğinin artırılması hedeflenmiştir. Tersiyer yapısı açılan DeNAo'nun yüzeyine, komplementer bağlayıcı sekans sayesinde bağlanan MagNP nanoparçacıklarının DeNAo'nun morfolojisinde büyük bir değişime sebep olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.5.8D). DeNAo'nun sıkı bağlantılarını içeren pürüzsüz yuvarlak formunu kaybedip,

yüzeyinin daha pürüzlü hale geldiği görülmüştür. Şekil 6.5.8D'deki DeNAno-MagNP/FAM konjugatının SEM görüntüsünde arka plandaki nanoparçacıklar, Şekil 6.5.8C'deki MagNP/FAM konjugatının SEM görüntüsü ile benzerlik göstermektedir. Arka plandaki nanoparçacıkların DeNAno ile bağlanmamış MagNP'ler olduğu düşünülmüştür. Buradan yola çıkılarak bağlayıcı sekans ile konjuge edilen MagNP'lerin hepsinin DeNAno'ya bağlanmadığı görülmektedir. Buna bağlı olarak DeNAno konsantrasyonu artırılarak bu sorunun önüne geçilebileceği düşünülmüştür. SEM görüntüsü üzerinde DeNAno'ların büyüklüğü yaklaşık 600 nm ölçülürken (Şekil 6.5.8A), DeNAno-MagNP/FAM konjugatının büyüklüğü 300-350 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 6.5.8D). Ayrıca DeNAno/FAM konjugatının SEM görüntülerine bakıldığında (Şekil 6.5.8B) floresan işaretli bağlayıcı sekansın bağlanmasıyla DeNAno'nun büyüklüğü değişmese de DeNAno'nun moleküller arası etkileşimlerin oluşturduğu sıkı bağlarının açıldığı ve floresan işaretli bağlayıcı sekansın bu kısımlara bağlandığı düşünülmüştür. Elde edilen DLS sonuçları da SEM görüntülerini destekler şekilde, distile su ile diyaliz edilen DeNAno'nun MagNP ile birleştiğinde büyüklüğünün küçüldüğünü göstermiştir (Şekil 6.5.9). Bu sonuçlara göre DeNAno'nun ortalama 300-600 nm aralığında ölçülen büyüklüğünün (Şekil 6.5.9A), MagNP ile birleştiğinde 60-800 nm arasında değişen geniş bir aralığa dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 6.5.9C). DeNAno'nun negatif zeta potansiyel değerinin, MagNP konjugasyonu sonrası değişimi araştırılmıştır. MagNP $-58,4 \pm 2,8$ mV zeta potansiyel değeri ile DeNAno'dan $(-31,1 \pm 1,5)$ daha negatif zeta potansiyel değerine sahiptir. Şekil 6.5.10'da örneklerin zeta potansiyel grafikleri karşılaştırılmış ve MagNP nanoparçacığı (Şekil 6.5.10B), floresan işaretli bağlayıcı sekans ile birleştiğinde (Şekil 6.5.10D) grafiğin pozitif yöne kaydığı görülmüştür. Bunu takiben Şekil 6.5.10A'da gösterilen DeNAno'nun zeta potansiyel değerinin $(-31,1 \pm 1,52$ mV) kendinden daha negatif yüzey yüküne sahip MagNP/FAM (Şekil 6.5.10D, $-46,3 \pm 3,15$ mV) ile konjuge edildiğinde tekrar negatif tarafa kaydığı ve $-53,3 \pm 2,71$ mV olarak ölçüldüğü gözlenmiştir (Şekil 6.5.10C).

DNA'nın viral kapsitlerde veya hücre çekirdeklerinde sıkıca paketleniği bilinmektedir. *In vitro* ortamda DNA yapısındaki nanoparçacıkların yoğunlaşarak paketlenmesine yardım etmek için katyonlar, pozitif yüklü yüzey aktif maddeler ve nötr zayıf çözücüler kullanılmaktadır. Yuan ve ark. RCA metodu ile DNA nanoparçacık üretimi sırasında ortama ekledikleri Mg^{2+} iyonlarının DNA'yı yoğunlaştırdığını ve sıkı paketlenen bu DNA nanoparçacığın daha stabil olduğunu elde ettikleri SEM görüntüleri ile gözlemlenmişler (Yuan ve ark., 2018). Poliaminlerin hücresel DNA'nın yoğunlaşarak paketlenmesine yardımcı oldukları bilinmektedir. Bu bilgi ışığında Vijayanathan ve ark. bir poliamin olan sipermin ve homologlarını kullanarak yaptıkları çalışmada DNA'nın poliaminler varlığında daha yoğun paketleniğini lazer ışığı saçılımı verileri ile göstermişler (Vijayanathan ve ark., 2001). Bu bilgilere dayanılarak saflaştırıldııkları tampon çözeltileri farklı olan DeNA_{no}'lar ile yapılan konjugatlarının büyüklükleri ve zeta potansiyel değerleri ZetaSizer cihazı kullanılarak karşılaştırılmıştır (Tablo 6.5.2 ve Tablo 6.5.3). Buna göre Tris- Mg^{2+} tampon çözeltisi ile saflaştırılan DeNA_{no} ile elde edilen DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının büyüklüğü (666,2 nm, Şekil 6.5.11D), distile su içerisinde saflaştırılarak elde edilen DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının büyüklüğünden (246,7 nm, Şekil 6.5.9C) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Mg^{2+} katyonlarının şelat ajanı görevi görerek DeNA_{no}'nun oligonükleotitleri arasındaki sıkı bağları engellediği ve yüzey yükünü değiştirdiği düşünölmüştür. Buna göre distile su içerisinde saflaştırılan DeNA_{no}'nun ortalama zeta potansiyel değeri -31,1 mV olarak tespit edilirken (Tablo 6.5.2) Mg^{2+} katyonlarını içeren Tris tamponu ile saflaştırılan DeNA_{no}'nun ortalama zeta potansiyel değeri -1,132 mV olarak (Tablo 6.5.3) tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak iki farklı sıvı ile saflaştırılan DeNA_{no}'nun MagNP ile konjugasyonunun da yüzey yükünün farklı olacağı düşünölmüştür. Distile su içerisinde saflaştırılan DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının ortalama zeta potansiyel değeri -53,3 mV olarak ölçölürken (Tablo 6.5.2), Mg^{2+} tampon çözeltisi ile saflaştırılan DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının ortalama zeta potansiyel değeri -20,97 mV olarak ölçölümüştür. ZetaSizer kullanılarak alınan büyüklük ve yüzey yükü sonuçları, Mg^{2+} katyonlarının DeNA_{no}'yu oluşturan oligonükleotitler ile iyonik etkileşimi sonucu yapıyı stabilize ettiğini desteklemektedir.

DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının dispersite analizi floresan işaretli bağlayıcı sekansın floresan özelliği sayesinde yapılmıştır. Şekil 6.5.7’de distile su içerisinde saflaştırılmış DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının konfokal mikroskobu görüntüleri verilmiştir. Şekil 6.5.1. ’deki DeNA_{no}/FAM görüntüsüne kıyasla daha homojen bir dağılım gösteren DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının konfokal görüntüsü (Şekil 6.5.7) SEM (Şekil 6.5.8D) ve ZetaSizer (Şekil 6.5.9C) verilerine ek olarak DeNA_{no}’nun MagNP ile birleştiğinde daha sıkı paketlenerek büyüklüğünün küçüldüğünü göstermiştir. Şekil 6.5.4’de verilen MagNP/FAM konjugatında görülen MagNP’ye özgü yuvarlak formun ve BF görüntülerindeki MagNP olduğu düşünülen içi siyah yapı, DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatında (Şekil 6.5.7 10X) yalnızca bir tane nanoparçacığın BF görüntüsünde tespit edilmiş ancak o nanoparçacığın da floresan sinyalini az olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum DeNA_{no}-MagNP/FAM konjugatının konfokal mikroskop görüntüsünde tespit edilen floresan sinyali az olan MagNP nanoparçacığının, DeNA_{no}’ya bağlanmasını sağlayan ve aynı zamanda floresan işaretleyici taşıyan sekans ile yeterli miktarda bağlanamaması ile ilişkilendirilmiştir.

PAA ile kaplanmış demir oksitlerin (MagNP), MagNP’leri oluşturan yalın demir oksitlerin, DeNA_{no}-MagNP/BS ve MagNP/BS konjugatlarının Panc02 ve Panc1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin anlaşılması için MTT testinden faydalanılmıştır. Gholami ve ark. Hep-G2 (insan karaciğer kanseri) hücre hattı üzerinde 1-500 µg/ml konsantrasyon aralığında yalın demir oksit parçacıklarının hücre canlılığına etkisini incelemişler. Bunun sonucunda elde ettikleri verilerde 24 ve 48 saatlerinde inceledikleri hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığını ve her iki zaman dilimi için de benzer olduğunu görmüşler. Elde ettikleri sonuçlara göre 200-500 µg/ml konsantrasyonda canlılığın %70-60 arasına düştüğü ve yalın demir oksit parçacıklarının 100 µg/ml’ye kadar toksisite göstermediği tespit edilmiş (Gholami ve ark., 2015). Bir başka çalışma ise yüzey kaplaması olmayan (yalın) demir oksit parçacıklarının LDH artışına sebep olduğunu ve hücre tipine bağlı olarak farklı toksik etkileri olabileceğini göstermiş (Choi ve ark., 2009). Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilerde Gholami ve ark. sonuçlarına benzer olarak 0-250 µg/ml konsantrasyonlarda uygulanan yalın demiroksitlerin ilk 24 saat içerisinde

Panc02 hücrelerine toksik etki gösterdiği ve bu toksik etkinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 6.6.1). Buna göre Panc02 hücrelerine ilk 24 saatte uygulanan en yüksek konsantrasyon (250 µg/ml) ile canlılık oranı %68'e düşmüş ve 0-48 saatleri arasında benzer olarak seyretse de 72 saat sonunda canlılık oranının %61'e düştüğü gözlenmiştir (Şekil 6.6.1). Yalın demir oksitlerin Panc1 hücre hattında yine aynı şekilde ilk 24 saatte toksik etki göstermeye başladığı görülmüştür. 48 ve 72. Saatlerdeki ölçümlerde de toksik etkinin benzer olarak konsantrasyona bağlı azaldığı gözlenmiştir (Şekil 6.6.2). 24, 48 ve 72. saatlerdeki ölçümlerden elde edilen verilerde her iki hücre hattı için de ortak olarak toksik etkinin arttığı konsantrasyonun 100 µg/ml yalın demir oksit uygulaması olduğu görülmektedir (Şekil 6.6.1 ve Şekil 6.6.2).

Demir oksitlerin yüzey kaplamaları olmadan stabil olmayacağını ve hücreler için toksik olabileceğini gösteren birçok çalışma vardır (Choi ve ark., 2009; Sun ve ark., 2014). Çalışmamızda stabilitesini artırmak ve toksik etkilerini en aza indirmek için demir oksitler PAA ile kaplanmıştır. İki farklı molekül ağırlıklı PAA kullanılmakla beraber hangisinin daha stabil olabileceği karşılaştırılmıştır. 250 kDa ve 450 kDa PAA ile yapılan çalışmalar sonucunda 450 kDa PAA ile kaplanan demir oksitlerin agregasyon oluşturmaya yatkın olduğu görülmüştür. Agregasyon oluşturmaya hücre kültüründe de çalışmaları etkileyebileceği için 250 kDa PAA ile kaplanan demir oksitler ile çalışmalara devam edilmiş ancak yine de 450 kDa PAA ile kaplanarak hazırlanan demir oksitlerin sitotoksikite testleri bulgulara eklenmiştir. Elde edilen sonuçlarda 250 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin uygulandığı hücrelerde canlılık oranının 450 kDa PAA ile kaplanarak hazırlanan MagNP'lerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 24 (Şekil 6.6.3) ve 48. saatlerde (Şekil 6.6.5) alınan ölçümler ile elde edilen sonuçlarda Panc02 hücreleri için 250 kDa PAA ile kaplanan MagNP'lerin hücre canlılığına etkisinin benzerlik gösterdiği ve hücrelerdeki canlılık oranının %90-80 arası olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık 72. saatin sonunda elde edilen verilere bakıldığında hücre canlılığının %70'lere düştüğü gözlenmiştir (Şekil 6.6.7). 450 kDa PAA ile kaplanarak elde edilen MagNP'lerin uygulandığı Panc02 hücrelerinde ise canlılığın ilk 48 saat içerisinde %60'a düştüğü gözlenmiştir (Şekil 6.6.5). Panc1 hücrelerine 250 kDa ve 450 kDa PAA ile kaplanmış

MagNP uygulamasının canlılığa etkisinin Panc02 hücrelerindeki etkiye benzer olduğu gözlenmiştir. Panc02 hücrelerinde olduğu gibi Panc1 hücrelerinde de 24 (Şekil 6.6.4) ve 48. saatlerde (Şekil 6.6.6) az görülen toksik etkinin, 72. saatteki (Şekil 6.6.8) ölçümlerle elde edilen sonuçlarda en fazla olduğu görülmüştür. 450 kDa PAA ile kaplanan MagNP nanoparçacıklarının 250 kDa PAA ile kaplanan MagNP nanoparçacıklarından daha toksik etkiye sahip olduğu Panc1 hücrelerinde de gözlenmiştir.

Yuan ve ark. MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine 12 saat süre ile RCA yöntemiyle üretilen DNA nanoparçacıkları uygulamışlar ve MTT testi sonucu sitotoksik etkisinin bulunmadığını bildirmişler (Yuan ve ark., 2018). Çalışmamızda demir oksit uygulamalarında kullanılan iki hücre hattına (Panc02 ve Panc1) MagNP/FAM ve DeNAno-MagNP/FAM konjugatları 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanarak hücre canlılığına etkileri gözlemlenmiştir. DeNAno-MagNP/FAM konjugasyonunda 30 µg/ml MagNP ve 2000 ng DeNAno kullanılmıştır. MTT uygulaması sonucunda elde edilen verilerde her iki konjugatın da sitotoksik etkisinin olmadığı gözlemlenmiş ve Şekil 6.6.9 ve Şekil 6.6.10'da bu veriler grafik halinde gösterilmiştir. Buna göre konjugatların uygulandığı her iki hücre hattında da canlılık oranı benzer olarak %97-93 aralığında tespit edilmiştir.

Aptamerlerin RCA metoduyla multimerik hale getirildiklerinde spesifik bağlanma özelliklerini kaybetmedikleri, hatta hedeflerine primer aptamerlerden daha iyi bağlandıkları gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2012). RCA ile DNA nanoparçacık haline getirilen aptamerlere DOX ilacı yüklendiğinde yine spesifikliğini kaybetmediği, yalın halde kullanılan DOX ilacına göre daha verimli ilaç iletimi yapıldığı gösterilmiştir. Ruff ve ark rastgele kütüphanelerden seçtikleri sekanslar ile hazırladıkları DNA nanoparçacıkları Panc02 hücreleri ile inkübe ettikten sonra hücrelere en fazla bağlanan sekansın C39 adını verdikleri 100 bp'den oluşan bir oligonükleotit olduğunu tespit etmişlerdir (Ruff ve ark., 2014). DeNAno'ların hücrelere bağlandığını FACS cihazı kullanarak analiz etmişlerdir. Çalışmamızda, RCA yöntemi ile sentezlenen DeNAno'nun Panc02 hücre hattına spesifikliğinin gösterilmesi ve ardından yüzeyine bağlanan MagNP

nanoparçacıklar veya FAM işaretli kısa bir DNA dizisi ile bu spesifikliğin değişip değişmediğinin gösterilmesi için konfokal mikroskobundan faydalanılmıştır. Şekil 6.7.1’de kontrol olarak kullanılan Panc1 hücrelerine bağlanmayan DeNAno/FAM ve DeNAno-MagNP/FAM konjugatlarının Panc02 hücrelerine spesifik olarak bağlandığı görülmektedir. Bağlanmayan DeNAno konjugatları hücre kültürü ortamından yıkamalar ile uzaklaştırılmış olsa da Panc1 hücrelerinde de bir miktar floresan sinyal olduğu görülmüştür. Ancak floresan sinyalin hücrelere bağlanan DeNAno parçacıklarından değil, petri kabı üzerinde hücrelere spesifik olmayan bir DeNAno parçacığından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Panc02 hücreleri üzerinde görülen DeNAno/FAM konjugatının, DeNAno-MagNP/FAM konjugatından daha yoğun bir kümeleşme olduğu ve DeNAno-MagNP/FAM konjugatlarında ise kümeleşmenin çok az olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak DeNAno/FAM konjugatının oligonükleotit yapısından kaynaklı olan moleküler etkileşimlerin onları bir araya gelerek agregasyona eğilimli hale getirdiği düşünülmektedir. DLS ve SEM sonuçlarına paralel olarak, ortama eklenen MagNP’lerin DeNAno nanoparçacıklarının nükleotitleri arasına girdiğinde, birkaç nanoparçacığın bir araya gelip agregasyon oluşturmasını engellediği konfokal görüntüleri ile gösterilmiştir. DeNAno/FAM konjugatındaki bu kümeleşmenin daha net incelenmesi için Şekil 6.7.2’de daha yakından alınan konfokal görüntüleri bulunmaktadır. Aynı şekil üzerinde bulunan DeNAno-MagNP/FAM konjugatının ise daha homojen olan bir dağılım göstermesi, konjugatın agregate olmadığına işaret etmektedir. Bu sonuç ileride yapılacak çalışmalar için umut vaad edici niteliktedir.

Sonuç olarak DeNAno’nun MagNP nanoparçacıklar ile bağlandığında değişen morfolojisiyle birlikte sahip oldukları aviditeyi kaybetmediği ve Panc02 hücresine spesifik olarak bağlanabildiği gösterilmiştir. Distile su içerisinde bulunduğu diğer nanoparçacıklar ile etkileşime girerek agregasyon oluşturan DeNAno’nun, Mg^{2+} katyonu içeren Tris tampon çözeltisi ile diyaliz edilerek saflaştırıldığında veya MagNP gibi metalik bir nanoparçacık ile birleştirildiğinde agregasyon oluşturmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamız monoklonal antikolar, aptamerler veya ligandlar ile yapılan hedefleme sistemlerine DeNAno’nun bir alternatif olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, literatürde

sınırlı sayıda olan DNA-tabanlı nanoparçacıklar ile spesifik taşıma sistemlerine bir katkı olarak MagNP'ler ile ilk kez birleştirilerek ileride yapılacak hipertermi gibi uygulamalar için DeNANO-MagNP konjugatının kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Bunun sonucu olarak DeNANO'nun (i) spesifik hedeflemede kullanılan aptamer, antikor ve ligand gibi biyomoleküllere alternatif olabileceği, (ii) küçük moleküllerin veya metal iyonlarının bağlanması için kimyasal modifikasyona açık olduğu, (iii) MagNP gibi inorganik nanopartiküllerle entegre edilebildiği gösterilmiştir.



8 KAYNAKLAR

1. Mei L, Zhu G, Qiu L, Wu C, Chen H, Liang H, et al. Self-assembled multifunctional DNA nanoflowers for the circumvention of multidrug resistance in targeted anticancer drug delivery. *Nano Res.* 2015;8(11):3447–3460.
2. Marciniak JY, Kummel AC, Esener SC, Heller MJ, Messmer BT. Coupled rolling circle amplification loop-mediated amplification for rapid detection of short DNA sequences. *Biotechniques.* 2008;45(3):275–80.
3. Zhao W, Cui CH, Bose S, Guo D, Shen C, Wong WP, et al. Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(48):19626–31.
4. Steiner JM. Nanoparticle “Theranostic” Platforms for Applications in Cancer. Univ California, San Diego [Internet]. 2011; Available from: <https://escholarship.org/uc/item/46b8093m>
5. Zhao W, Gao Y, Kandadai SA, Brook MA, Li Y. DNA polymerization on gold nanoparticles through rolling circle amplification: Towards novel scaffolds for three-dimensional periodic nanoassemblies. *Angew Chemie - Int Ed.* 2006;45(15):2409–13.
6. Steiner JM, Sartor M, Sanchez AB, Messmer D, Freed A, Esener S, et al. DeNano: Selectable deoxyribonucleic acid nanoparticle libraries. *J Biotechnol.* 2010;145(4):330.
7. Ruff LE, Sapre AA, Plaut JS, De Maere E, Mortier C, Nguyen V, et al. Selection of DNA nanoparticles with preferential binding to aggregated protein target. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(10):96.
8. Ruff LE, Marciniak JY, Sanchez AB, Esener SC, Messmer BT. Targeted and reversible cancer cell-binding DNA nanoparticles. 2014;3(6):569–78.
9. Yao Q, Chen YY, Wu F, Wu F, Liu C, Hong T, et al. Efficient Self-Assembled DNA Nanoparticles through Rolling Circle Amplification for siRNA Delivery in vitro. *Chinese J Chem.* 2019;37(6):588–92.
10. Kim KR, Röthlisberger P, Kang SJ, Nam K, Lee S, Hollenstein M, et al. Shaping rolling circle amplification products into DNA nanoparticles by incorporation of modified nucleotides and their application to in vitro and in vivo delivery of a photosensitizer. *Molecules.* 2018;23(7):1833.
11. Lv Y, Hu R, Zhu G, Zhang X, Mei L, Liu Q, et al. Preparation and biomedical applications of programmable and multifunctional DNA nanoflowers. *Nat Protoc.* 2015;10(10):1508–24.
12. Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS J.* 2005;61–77.

13. Loutfy H, Madkour. Biotechnology of Nucleic Acids Medicines as Gene Therapeutics and Their Drug Complexes. *Chronicles Pharm Sci.* 2017;1(4):204–53.
14. Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res.* 1998;15(1):1332–1339.
15. Nishimura M, Jung EJ, Shah MY, Lu C, Spizzo R, Shimizu M, et al. Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment. *Cancer Discov.* 2013;3(11):1302–15.
16. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nat Biotechnol.* 2010;28(1):172–6.
17. Seeman NC, Kallenbach NR. Design of immobile nucleic acid junctions. *Biophys J.* 1983;44(2):201–9.
18. World Health Organisation. Latest global cancer data. *Int Agency Res cancer.* 2018;1–3.
19. Tobias J, Hochhauser D. *Cancer and its Management: Sixth Edition.* Cancer and its Management: Sixth Edition. 2009.
20. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(7):904–10.
21. Xiang M, Heestand GM, Chang DT, Pollom EL. Neoadjuvant treatment strategies for resectable pancreas cancer: A propensity-matched analysis of the National Cancer Database. *Radiother Oncol.* 2020;143(101–107).
22. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2018;24(43):4846–61.
23. Johansen JS, Schultz NA, Jensen B V. Plasma YKL-40: A potential new cancer biomarker? *Futur Oncol.* 2009;5(7):1065–82.
24. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2002;16:553–65.
25. Obón-Santacana M, Luján-Barroso L, Freisling H, Naudin S, Boutron-Ruault MC, Mancini FR, et al. Consumption of nuts and seeds and pancreatic ductal adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2020;146(1):76–84.
26. Kirkegård J, Gaber C, Lund JL, Hinton SP, Ladekarl M, Heide-Jørgensen U, et al. Acute pancreatitis as an early marker of pancreatic cancer and cancer stage, treatment, and prognosis. *Cancer Epidemiol.* 2020;64:101647.

27. Cancer incidence in five continents. Volume V. IARC Sci Publ. 1987;5:85–332.
28. Midha S, Chawla S, Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* 2016;381(1):269–77.
29. Memba R, Duggan SN, Ni Chonchubhair HM, Griffin OM, Bashir Y, O’Connor DB, et al. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology.* 2017;17(6):867–74.
30. Wu JW, Azoulay L, Huang A, Paterson M, Wu F, Secretst MH, et al. Identification of incident pancreatic cancer in Ontario administrative health data: A validation study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2020;29(1):78–85.
31. Singh S, McDonald JT, Ilie G, Adishes A. An examination of the association between lifetime history of prostate and pancreatic cancer diagnosis and occupation in a population sample of Canadians. *PLoS One.* 2020;15(2):0227622.
32. Kirkegård J, Lund JL, Mortensen FV, Cronin-Fenton D. Statins and pancreatic cancer risk in patients with chronic pancreatitis: A Danish nationwide population-based cohort study. *Int J Cancer.* 2020;146(3):610–6.
33. Chen IM, Johansen AZ, Dehlendorff C, Jensen B V., Bojesen SE, Pfeiffer P, et al. Prognostic Value of Combined Detection of Serum IL6, YKL-40, and C-reactive Protein in Patients with Unresectable Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29(1):176–84.
34. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Löhr JM, Neoptolemos J, et al. Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes. *Pancreatology.* 2015;15(1):8–18.
35. Center TP. Pancreatic Cancer [Internet]. Columbia University. 2016 [cited 2020 Oct 29]. p. THE PANCREAS CENTER. Available from: <https://columbiasurgery.org/conditions-and-treatments/pancreatic-cancer>
36. Hart AR, Kennedy H, Harvey I. Pancreatic Cancer: A Review of the Evidence on Causation. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(3):275–82.
37. Pothula SP, Pirola RC, Wilson JS, Apte M V. Pancreatic stellate cells: Aiding and abetting pancreatic cancer progression. *Pancreatology.* 2020;20(3):409–18.
38. Hasan S, Jacob R, Manne U, Paluri R. Advances in pancreatic cancer biomarkers. *Oncol Rev.* 2019;13(1):410.
39. Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, et al. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med.* 2009;6(4):1000046.
40. koraychy E El, Meddad M, Badawi M, Mazroui M. Sintering and deposition of homo- and heteronanoparticles of Aluminum and Nickel on Aluminum (100) substrate. *Chem Phys.* 2020;541:111037.

41. Din FU, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:7291–7309.
42. Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials*. 2006;27(9):2060–5.
43. Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*. 2001;70(3):399–421.
44. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:813–27.
45. Flandroy, P. M. J. Grandfils, Christian; Jérôme R. *Pharmaceutical Particulate Carriers in Medical Applications* [Internet]. A. Rolland, editor. New York: Marcel Dekker, Inc; 1993. 448 p. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE2014115805>
46. Alonso MJ. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(3):168–72.
47. Khanmohammadi M, Elmizadeh H, Ghasemi K. Investigation of size and morphology of chitosan nanoparticles used in drug delivery system employing chemometric technique. *Iran J Pharm Res*. 2015;14(3):665–75.
48. Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:302–15.
49. Hossen S, Hossain MK, Basher MK, Mia MNH, Rahman MT, Uddin MJ. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *J Adv Res*. 2019;15:1–18.
50. Torchilin VP. How do polymers prolong circulation time of liposomes? *J Liposome Res*. 2008;15(1):99–116.
51. Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci*. 2006;61(3):1027–40.
52. Arís A, Villaverde A. Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends Biotechnol*. 2004;22(7):1–7.
53. Brown MD, Schätzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm*. 2001;1(2):1–21.
54. Mahato M, G. R. J, P. K. V. Viral- and Non-viral-Based Hybrid Vectors for Gene Therapy. *Gene Cell Ther Biol Appl*. 2018;111–30.

55. Bai Z, Wei J, Yu C, Han X, Qin X, Zhang C, et al. Non-viral nanocarriers for intracellular delivery of microRNA therapeutics. *J Mater Chem B*. 2019;7:1209–25.
56. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019. p. 1–11.
57. Chabner BA, Roberts TG. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(1):65–72.
58. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 2008;68(21):8643–53.
59. Ahmad SS, Reinius MA, Hatcher HM, Ajithkumar T V. Anticancer chemotherapy in teenagers and young adults: managing long term side effects. *BMJ*. 2016;354(4567):1–7.
60. Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong KH, Chen X, et al. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1):195.
61. Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J*. 2007;9(2):28–47.
62. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S, et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today*. 2007;2(3):14–21.
63. Uherek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;44(2–3):153–66.
64. Martínez-Carmona M, Colilla M, Vallet-Regí M. Smart mesoporous nanomaterials for antitumor therapy. *Nanomaterials*. 2015;5(4):1906–37.
65. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J Control Release*. 2000;65(1–2):271–84.
66. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(3):136–51.
67. Matsumura Y, Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res*. 1986;46(12):6387–92.
68. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. The polyethyleneglycol dilemma: Advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(6):892–9.

69. Yu RZ, Geary RS, Leeds JM, Watanabe T, Fitchett JR, Matson JE, et al. Pharmacokinetics and tissue disposition in monkeys of an antisense oligonucleotide inhibitor of Ha-ras encapsulated in stealth liposomes. *Pharm Res.* 1999;16(8):1309–15.
70. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(3):416–27.
71. Tkachenko AG, Xie H, Liu Y, Coleman D, Ryan J, Glomm WR, et al. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug Chem.* 2004;15(3):482–90.
72. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science (80-).* 1999;285(5433):1569–72.
73. Harbour JW, Worley L, Ma D, Cohen M. Transducible peptide therapy for uveal melanoma and retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(10):1341–6.
74. Estanqueiro M, Amaral MH, Conceição J, Sousa Lobo JM. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015;126:631–48.
75. Dobrovolskaia MA, Mcneil SE. Strategy for selecting nanotechnology carriers to overcome immunological and hematological toxicities challenging clinical translation of nucleic acid-based therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(7):1163–75.
76. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. In vitro assays for monitoring nanoparticle interaction with components of the immune system. In: *Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials: Second Edition.* 2016.
77. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(31):7794–803.
78. de Leon MCB, Bolla S, Greene B, Hutchinson L, Del Priore G. Successful treatment with nab-paclitaxel after hypersensitivity reaction to paclitaxel and docetaxel. *Gynecol Oncol Reports.* 2013;5(70):1.
79. Steinmetz T, Schaadt M, Gähl R, Schenk V, Diehl V, Pfreundschuh M. Phase I study of 24-hour continuous intravenous infusion of recombinant human tumor necrosis factor. *J Biol Response Mod.* 1988;7(5):417–23.

80. Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, Alexander HR, Gannon WE, Walker M, et al. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res*. 2010;16(24):6139–49.
81. Schneider P, Dreden P Van, Rousseau A, Kassim Y, Legrand E, Vannier JP, et al. Increased levels of tissue factor activity and procoagulant phospholipids during treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010;148(4):582–92.
82. Torchilin VP, Omel'Yanenko VG, Klibanov AL, Mikhailov AI, Gol'Danskii VI, Smirnov VN. Incorporation of hydrophilic protein modified with hydrophobic agent into liposome membrane. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1980;602(3):511–21.
83. Wartlick H, Michaelis K, Balthasar S, Strebhardt K, Kreuter J, Langer K. Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. *J Drug Target*. 2004;12(7):461–71.
84. Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, Schiestel T, Schirra H, Schmidt H, et al. A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug Chem*. 2000;11(6):926–32.
85. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005;26(18):3995–4021.
86. Sandhu KK, McIntosh CM, Simard JM, Smith SW, Rotello VM. Gold nanoparticle-mediated transfection of mammalian cells. *Bioconjug Chem*. 2002;13(1):3–6.
87. Pantarotto D, Partidos CD, Graff R, Hoebeke J, Briand JP, Prato M, et al. Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *J Am Chem Soc*. 2003;125(20):6160–4.
88. Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun*. 2004;7(1):16–7.
89. Schwertmann U, Cornell RM. *Iron Oxides in Laboratory. Soil Science*. 1993.
90. Widder KJ, Morris RM, Poore GA, Howard DP, Senyei AE. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: Total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1983;19(1):135–9.
91. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2003.
92. Zhang Y, Sun C, Kohler N, Zhang M. Self-assembled coatings on individual monodisperse magnetite nanoparticles for efficient intracellular uptake. *Biomed Microdevices*. 2004;6(1):33–40.

93. Xiang JJ, Tang JQ, Zhu SG, Nie XM, Lu H Bin, Shen SR, et al. IONP-PLL: A novel non-viral vector for efficient gene delivery. *J Gene Med.* 2003;5(9):803–17.
94. Åkerman ME, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):12617–21.
95. Madkour LH. Chronicles of Pharmaceutical Science Review Article Biotechnology of Nucleic Acids Medicines as Gene Therapeutics and Their Drug Complexes. *Pharm Sci.* 2017;1(4):204–53.
96. Segura T. Formulations and Delivery Limitations of Nucleic-Acid-Based Therapies. In: *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology.* 2006. p. 1013–59.
97. Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 2009;23(13):1494–504.
98. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: Past, present, and future. *Genetics.* 2013;193(3):651–69.
99. Dhanoa JK, Sethi RS, Verma R, Arora JS, Mukhopadhyay CS. Long non-coding RNA: Its evolutionary relics and biological implications in mammals: A review. *J Anim Sci Technol.* 2018;60(25).
100. Kiss T. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J Cell Sci.* 2004;117(25):5949–51.
101. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012;22(9):1775–89.
102. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* 2011;1(5):391–407.
103. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: Multi-tasking molecules in the cell. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16010–39.
104. Han P, Chang CP. Long non-coding RNA and chromatin remodeling. *RNA Biol.* 2015;12(10):1094–8.
105. Lin S-L, Ying S-Y. NOVELTRANSGENIC METHODS USING INTRONIC RNA [Internet]. USA, USA; 11/278,143, 2006. p. 45. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/95/3b/6b/3d41fe52882715/US20060228800A1.pdf>
106. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):657–85.
107. Sun CY, Shen S, Xu CF, Li HJ, Liu Y, Cao ZT, et al. Tumor Acidity-Sensitive Polymeric Vector for Active Targeted siRNA Delivery. *J Am Chem Soc.* 2015;137(48):15217–24.

108. Gandioso A, Massaguer A, Villegas N, Salvans C, Sánchez D, Brun-Heath I, et al. Efficient siRNA-peptide conjugation for specific targeted delivery into tumor cells. *Chem Commun.* 2017;53(19):2870–3.
109. Wong SC, Klein JJ, Hamilton HL, Chu Q, Frey CL, Trubetskoy VS, et al. Co-injection of a targeted, reversibly masked endosomolytic polymer dramatically improves the efficacy of cholesterol-conjugated small interfering RNAs in vivo. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(6):380–90.
110. Matsuda S, Keiser K, Nair JK, Charisse K, Manoharan RM, Kretschmer P, et al. siRNA Conjugates Carrying Sequentially Assembled Trivalent N-Acetylgalactosamine Linked Through Nucleosides Elicit Robust Gene Silencing In Vivo in Hepatocytes. *ACS Chem Biol.* 2015;10(5):1181–7.
111. Cuellar TL, Barnes D, Nelson C, Tanguay J, Yu SF, Wen X, et al. Systematic evaluation of antibody-mediated siRNA delivery using an industrial platform of THIOMAB-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(2):1189–203.
112. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
113. Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature.* 1961;192:1227–1232.
114. Loperfido M, Jarmin S, Dastidar S, Di Matteo M, Perini I, Moore M, et al. PiggyBac transposons expressing full-length human dystrophin enable genetic correction of dystrophic mesoangioblasts. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2):744–760.
115. Stull RA, Szoka, FC. Antigene, Ribozyme and Aptamer Nucleic Acid Drugs: Progress and Prospects. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci.* 1995;12(4):465–83.
116. Patil SD, Burgess DJ. DNA-based Biopharmaceuticals: therapeutics for the 21st Century. *AAPS Newsmag.* 2003;19(8):1109–13.
117. Baekelandt V, De Strooper B, Nuttin B, Debyser Z. Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Mol Ther.* 2000;2(5):540–54.
118. Baker BF. The role of antisense oligonucleotides in the wave of genomic information. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2001;20(4–7):397–9.
119. Saraswat P, Soni RR, Bhandari A, Nagori BP. DNA as therapeutics; An update. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(5):488–98.
120. Agrawal S, Zhang R. Pharmacokinetics of oligonucleotides. *CIBA Found Symp.* 1997;(209):60–75.
121. Tam P, Monck M, Lee D, Ludkovski O, Leng EC, Clow K, et al. Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy. *Gene Ther.* 2000;7(21):1867–74.

122. Kunisawa J, Nakagawa S, Mayumi T. Pharmacotherapy by intracellular delivery of drugs using fusogenic liposomes: Application to vaccine development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(3):177–86.
123. Hope MJ, Mui B, Ansell S, Ahkong QF. Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs. *Mol Membr Biol.* 1998;15(1):1–14.
124. Akhtar S, Juliano RL. Cellular uptake and intracellular fate of antisense oligonucleotides. *Trends Cell Biol.* 1992;2(5):139–44.
125. Wu-Pong S. Alternative interpretations of the oligonucleotide transport literature: Insights from nature. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;44(1):59–70.
126. Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(3):153–64.
127. Lou D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol.* 2000;18(1):33–7.
128. Johnston SA, Talaat AM, McGuire MJ. Genetic immunization: What's in a name? *Arch Med Res.* 2002;33(4):325–9.
129. Bentires-Alj M, Hellin AC, Lechanteur C, Princen F, Lopez M, Fillet G, et al. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(1):20–6.
130. Denny WA. Prodrugs for gene-directed enzyme-prodrug therapy (suicide gene therapy). *J Biomed Biotechnol.* 2003;2003(1):48–70.
131. Anderson WF. Human gene therapy. *Science* (80-). 1992;256(5058):808–13.
132. Anastassopoulou J, Theophanides T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;42(1):79–91.
133. Theophanides T, Polissiou M. Magnesium-nucleic acid conformational changes and cancer. *Magnesium.* 1986;5(5–6):221–33.
134. Debart F, Abes S, Deglane G, Moulton H, Clair P, Gait M, et al. Chemical Modifications to Improve the Cellular Uptake of Oligonucleotides. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(7):727–37.
135. Zaro JL, Shen WC. Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(2):241–7.

136. Akelley RA, Conley SM, Makkia R, Watson JN, Han Z, Cooper MJ, et al. DNA nanoparticles are safe and nontoxic in non-human primate eyes. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:1361–79.
137. Park SY, Lytton-Jean AKR, Lee B, Weigand S, Schatz GC, Mirkin CA. DNA-programmable nanoparticle crystallization. *Nature*. 2008;451(7178):553–6.
138. Li J, Zheng C, Cansiz S, Wu C, Xu J, Cui C, et al. Self-assembly of DNA nanohydrogels with controllable size and stimuli-responsive property for targeted gene regulation therapy. *J Am Chem Soc*. 2015;137(4):1412–5.
139. Yuan Y, Gu Z, Yao C, Luo D, Yang D. Nucleic Acid–Based Functional Nanomaterials as Advanced Cancer Therapeutics. *Small*. 2019;15(26):1900172.
140. Liu D, Daubendiek SL, Zillman MA, Ryan K, Kool ET. Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J Am Chem Soc*. 1996;118(7):1587–94.
141. Dhar S, Gu FX, Langer R, Farokhza OC, Lippard SJ. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA - PEG nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(45):17356–61.
142. Wilson DS, Szostak JW. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:611–47.
143. Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang DK, Ankrum JA, et al. Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem Soc Rev*. 2014;43(10):3324–41.
144. Yuan X, Xiao F, Zhao H, Huang Y, Shao C, Weizmann Y, et al. High-yield method to fabricate and functionalize DNA nanoparticles from the products of rolling circle amplification. *ACS Appl Bio Mater*. 2018;1(2):511–9.
145. Kim E, Zwi-Dantsis L, Reznikov N, Hansel CS, Agarwal S, Stevens MM. One-Pot Synthesis of Multiple Protein-Encapsulated DNA Flowers and Their Application in Intracellular Protein Delivery. *Adv Mater*. 2017;29(26):1–20.
146. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg*. 1957;146(4):596–606.
147. Bucak S, Altan CL. Magnetic nanoparticles and cancer. In: *Nanotechnology in Cancer* [Internet]. Istanbul: Elsevier; 2017. p. 105–37. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323390804000069>
148. Sun SN, Wei C, Zhu ZZ, Hou YL, Venkatraman SS, Xu ZC. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Phys B*. 2014;23(3):037503.

149. Yuan Y, Rende D, Altan CL, Bucak S, Ozisik R, Borca-Tasciuc DA. Effect of surface modification on magnetization of iron oxide nanoparticle colloids. *Langmuir*. 2012;28(36):13051–9.
150. Amstad E, Zurcher S, Mashaghi A, Wong JY, Textor M, Reimhult E. Surface functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted Magnetic resonance imaging. *Small*. 2009;5(11):1334–42.
151. Babincová M, Babinec P, Bergemann C. High-gradient magnetic capture of ferrofluids: Implications for drug targeting and tumor embolization. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2001;56(9–10):909–11.
152. Gholami A, Rasoul-Amini S, Ebrahimezhad A, Seradj SH, Ghasemi Y. Lipoamino acid coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles concentration and time dependently enhanced growth of human hepatocarcinoma cell line (Hep-G2). *J Nanomater*. 2015;2015(451405):1–9.
153. Choi SJ, Oh JM, Choy JH. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J Inorg Biochem*. 2009;103(3):463–71.
154. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007;46(8):1222–44.
155. New England BioLabs. Nucleic acid data, version 1.0.0.3885 [Internet]. 2013. Available from: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/nucleic-acid-data>
156. Thermo Fisher. Quant-iT™ OliGreen™ ssDNA Reagent [Internet]. thermofisher.com. [cited 2020 Nov 14]. p. 1–7. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Quant_iT_OliGreen_ssDNA_Reagent_UG.pdf