T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİBROBLAST HÜCRELERİNDEN OKTADESİLAMİN BAZLI KATI LİPİD NANOPARTİKÜL İLE UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN ELDESİ

HANİFE SEVGİ VARLI

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

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NELİSA TÜRKOĞLU LAÇİN

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİBROBLAST HÜCRELERİNDEN OKTADESİLAMİN BAZLI KATI LİPİD NANOPARTİKÜL İLE UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN ELDESİ

Hanife Sevgi VARLI tarafından hazırlanan tez çalışması 16.04.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK

Hacettepe Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince engin bilgi ve deneyimi ile ilerlememdeki en büyük yardımcım olan danışman hocam Doç. Dr. Melisa TÜRKOĞLU LAÇİN'e sonsuz saygılarımı sunar ve en içten teşekkürü borç bilirim.

Yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, ilgi ve anlayışını eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Yrd. Doç. Engin KAPLAN ve Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK'e saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Laboratuvarda beni hiç yalnız bırakmayan başım sıkıştığında yanlarına koştuğum çok değerli ekip arkadaşlarım Funda ALKAN ve Volkan YALMAN'a bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlandığım Hatice Nur AYDIN'a,

Nerede olursa olsun her zaman desteğini yanımda hissettiğim arkadaşım Fulya ERENDOR'a,

Mesafelerin bizi ayıramadığı çok kıymetli yıllanmış dostlarım Beyza TÜRKDÖNMEZ, Nihansu Banu ALBAYRAK, Dilara Sena KILIÇ, Orçun ALTINUÇ, Yunus Emre TÜTÜNEKEN'e çok teşekkür ediyorum.

En büyük teşekkürü zor zamanlarımda bana sabırlı olmayı öğütleyen, moralimi hep yüksek tutan, maddi ve manevi her türlü desteği ile yanımda olan canım aileme ve bana olan güveni, sevgisi ve ilgisi için Jun MA'ya sunuyorum.

Nisan 2018

Hanife Sevgi VARLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 4
1.3 Hipotez 4

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER 6

2.1 Kök Hücre 6
2.1.1 Kök Hücrelerin Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması 10
2.1.1.1 Embriyonik Kök Hücreler 10
2.1.1.2 Yetişkin Kök Hücreler 12
2.1.2 Kök Hücreler Farklılaşma Kapasitesine Göre Sınıflandırılması 13
2.1.2.1 Totipotent Kök Hücreler 13
2.1.2.2 Multipotent Kök Hücreler 14

2.1.2.3 Unipotent Kök Hücreler 14
2.1.2.4 Pluripotent Kök Hücreler 15
2.1.2.5 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler 17
2.2 Gen Aktarımı 21
2.2.1 Viral Vektörler 23
2.2.1.1 Adenovirüs 24
2.2.1.2 Adeno-assosiye virüs 25
2.2.1.3 Retrovirüs 26
2.2.1.4 Herpesvirüs 27
2.2.2 Non-Viral Vektörler 27
2.2.2.1 Fiziksel Yöntemler 28
2.2.2.2 Kimyasal yöntemler 30
2.3 Doku Mühendisliği 31
2.4 Fibroblast Hücreleri 32
2.5 Yara Tedavisi 33
2.5.1 Yara Örtü Malzemeleri 34
2.5.1.1 Aljinat örtüler 36
2.5.1.2 Hidrokolloid örtüler 36
2.5.1.3 Köpükler 37
2.5.1.4 Hidrojel örtüler 38
2.6 Bakteriyal Selüloz Ve Yara Örtüsü Olarak Kullanılması 38

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD 40

3.1 Kullanılan Sarf Mazlemeler 40
3.2 Kullanılan Kitler 42
3.3 Kullanılan Cihazlar 42
3.4 Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc Gen Bölgelerini İçeren Plazmidin Çoğaltılması Ve Saflaştırılması 47
3.5 Plazmidlerin Hücrelere Transfeksiyonu 48
3.5.1 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu 48
3.5.2 Plazmidlerin sentezlenen nanopartikül ile hücrelere aktarımı 49
3.6 Plazmid-Nanopartikül Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi 50
3.6.1 Floresan mikroskop ile transfekte hücrelerin incelenmesi 50
3.6.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi 50
3.7 Transfekte Hücrelerin Matrijele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi 51
3.8 Upk Hücrelerinin Dialdehit Selüloz Membrana Yüklenmesi 52

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 53

4.1 Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc Gen Bölgelerini İçeren Plazmidin Çoğaltılması Ve Saflaştırılması 53
4.1 Nanopartikül Ve Nanopartikül/Plazmit Dna Konjugatlarının Yük Ve Partikül Boyutlarının Ölçülmesi 55
4.1.1 OLN in vitro sitotoksisitesinin değerlendirilmesi 58
4.2 Saflaştırılan Plazmidlerin L929 Fibroblast Hücre Hattına Transfeksiyonu 59
4.2.1 Nanopartikül ile Transfeksiyon 59
4.3 Plazmid Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi 60
4.3.1 Transfeksiyon Sonrası GFP Işımasının Takip Edilmesi 60
4.3.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi 63
4.3.3 cDNA eldesi ve RT-qPCR 64
4.4 Transfekte Hücrelerin Matrigele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi 66
4.5 UPK Hücrelerinin Dialdehit Selüloz Membrana Yüklenmesi..... 68
4.6 Tartışma 71
KAYNAKLAR 73
ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGE LİSTESİ

g	Gram
L	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
◦C	Santrigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

AAV	Adeno-assosiye virüs
BKH	Bağırsak Kök Hücre
c-DNA	Tamamlayıcı DNA
DABS	Dialdehit bakteriyal selüloz
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medyum
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	Di ThioThreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
GFP	Yeşil Floresan Protein
HKH	Hematopoietik Kök Hücre
KLN	Katı Lipid Nanopartikül
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	Metil Tiazolil Difeniltetrazolium Bromid
m-RNA	Mesajcı RNA
NKH	Nöral Kök Hücre
OLN	Oktadesilamin Bazlı Lipid Nanopartikül
PBS	Fosfat Buffered Saline
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medyum
UPKH	Uyarılmış Pluripoten Kök Hücre

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 simetrik ve asimetrik bölünme 8
Şekil 2.2 Embriyonik Kök Hücre Eldesi 11
Şekil 2.3 Pluripotent kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri 15
Şekil 2.4 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyelleri 18
Şekil 2.5 (2012-günümüz) Gen Terapisi ile klinik uygulamalar 22
Şekil 2.6 Gen aktarımında kullanılan vektörler ve kullanım yüzdeleri 24
Şekil 2.7 Adenovirüs yapısı 25
Şekil 2.8 Adeno-assosiye virüs yapısı 26
Şekil 2.9 Retro virüs yapısı 26
Şekil 2.10 Viral vektör çeşitleri 27
Şekil 2.11 Mikro enjeksiyon 28
Şekil 2.12 Gen tabancası (biyolistik) 29
Şekil 2.13 Elektroporasyon 29
Şekil 2.14 Sonikasyon 30
Şekil 2.15 L929 Fibroblast Hücreleri 33
Şekil 2.16 Aljinat yara örtüsü 36
Şekil 2.17 Hidrokolloid yara örtüsü 37
Şekil 2.18 Köpük yara örtüsü 37
Şekil 2.19 Hidrojel yara örtüsü 38
Şekil 3.1 Plazmid haritası 47
Şekil 3.2 Oktadesilamin kimyasal yapısı 49
Şekil 4.1 Seçici besiyerinde çoğalan bakterileri kolonileri 54
Şekil 4.2 Plazmid DNA agaroz jel görüntüsü 55
Şekil 4.3 Oktadesilamin Bazlı Lipid Nanopartikül in-vitro ortamda sitotoksisite sonuçları 58
Şekil 4.4 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan amikroskop görüntüleri 60
Şekil 4.5 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri 62
Şekil 4.6 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri 62

Şekil 4.7 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri 63
Şekil 4.8 mRNA jel görüntüsü 64
Şekil 4.9 Klf4(Turuncu) , Sox2(Mavi), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri amplifikasyon grafiği ... 65
Şekil 4.10 Klf4(Turuncu) , Sox2(Mavi), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri erime eğrisi..... 66
Şekil 4.11 Oct4, Sox2, Klf4 v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan plazmid ile konjuge edilmiş oktadesilamin bazlı nanopartikül (OLN) ile transfekte edilmiş L929 Fibroblast hücrelerin matrigel üzerindeki mikroskop görüntüleri 67
Şekil 4.12 Dialdehit bakteriyal selüloz membran 68
Şekil 4.13 Selüloz membran elektron mikroskop görüntüsü..... 69
Şekil 4.14 DABS membranlarda UPK hücre tutunması analizi için hazırlanan 24 well plate 69
Şekil 4.15 DABS membran üzerinde UPK hücrelerinin tutunması..... 70

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Pluripotent Kök Hücre Kaynakları 16
Çizelge 2.2 Farklı yeniden programlama faktörleri ile yürütülen UPKH çalışmaları 20
Çizelge 4.1 Oktadesilamin nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyeli. 56
Çizelge 4.2 Nanopartikül/plazmid DNA konjugatının partikül büyüklükleri ve zeta potansiyeli 56

ÖZET

FİBROBLAST HÜCRELERİNDEN OKTADESİLAMİN BAZLI KATI LİPİD NANOPARTİKÜL İLE UYARILMIŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRELERİN ELDESİ

Hanife Sevgi VARLI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH), laboratuvar koşullarında yetişkin somatik hücrelerin çeşitli transkripsiyon faktörleri kullanılarak genetik olarak yeniden kodlanması ile elde edilen pluripotent özellik kazandırılmış hücrelerdir. Sahip olduğu pluripotens özelliği sayesinde hemen hemen tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Rejeneratif tıpta kullanımı etik sorunları ortadan kaldıran ve embriyonik kök hücreye alternatif bir kaynak olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilecek hücre kaynağıdır.

Bu çalışmada fibroblast hücrelerden pluripotent kök hücreler elde edilmiştir. Hücrelere pluripotent kök hücre özelliği kazandıran Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc transkripsiyon faktörleri ile birlikte yeşil floresan protein (GFP) geni içeren plasmid *E.coli* JM109 suşunda çoğaltılıp saflaştırılmıştır.

Laboratuvarımızda önceki çalışmalarda sentezlediğimiz oktadesilamin bazlı katyonik lipid nanopartikülün (OLN) karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve sitotoksisitesi L929 hücre hattı üzerinde yapılan MTT deneyi ile ölçülmüştür. OLN ile etkileştirilen plazmidler

L929 hücre hattına aktarılmış, fibroblast hücrelerdeki transfeksiyon süreci invert mikroskopta GFP ışımasının takip edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerdeki Oct4, Sox2, Klf4 ve v-Myc genlerinin ekspresyon varlığı RT-qPCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Elde edilen UPK hücreleri, yara iyileşmesinde kullanılmak üzere, laboratuvarımızda önceki çalışmalarda elde edilen selüloz bazlı hidrojel özellikte yara örtü malzemesi üzerine yüklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: UPKH, Gen transferi, Fibroblast, Yeniden programlama, Non viral

ABSTRACT

OBTANING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM FIBROBLAST CELLS VIA OCTADECYLAMINE BASED SOLID LIPID NANOPARTICLE

Hanife Sevgi VARLI

Department of Molecular Biology and Genetic

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN

Induced pluripotent stem cells (IPSC) are pluripotent cells that obtained from adult somatic cells by genetic reprogramming in vitro via transcription factors. Due to its pluripotency, it has the ability to differentiate into almost many cell types. The use of the IPSc cell source for regenerative purpose removes ethical problems about embryonic stem cells.

In this study, pluripotent stem cells were obtained from fibroblast cells via for main transcription factors. The plasmid containing green fluorescent protein (GFP) gene with Oct4, Sox2, Klf4 and v-Myc transcription factors was amplified in E. coli JM109 strain and purified. Fibroblast cells were transfected with plazmid by using a lipid-based nano vehicle. Characterization studies of octadecylamine-based cationic lipid nanoparticle

(OLN) synthesized in our laboratory were performed by zeta-sizer. The cytotoxicity of the nanoparticle was determined by MTT assay (ISO 10993-5) OLN- plasmid conjugates were transferred into the L929 cell line, and the transfection process in fibroblast cells was evaluated via screening GFP expression. Expression of the Oct4, Sox2, Klf4 and v-Myc genes in the cells were determined by the RT-qPCR. Then, the obtained UPS cells were loaded to a cellulose-based hydrogel wound dressing biomaterial which was designed in our previous studies.

Keywords: IPSC, Gene transfer, Fibroblast, Reprogramming, Non-viral

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Organ veya doku naklinin tek tedavi seçeneği olduğu hastalıklarda verici bulunmasındaki zorluk tedaviyi engelleyen en önemli etmendir. Kök hücreler, bulunduğu nişte farklılaşmamış halde bulunan, kendini yenileyen ve başka hücrelere dönüşebilme kapasitesindeki hücre tipidir. Kök hücreler üzerinde günümüzde önemli araştırmalar yapılmaktadır ve araştırmaların istenildiği doğrultuda geliştirilmesiyle nakil için yeni bir kaynağı oluşturabilecektir. Buna ek olarak kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesi zayıf olan doku ve organların tedavisi amacıyla kullanımı ile ilgili çalışmalar da yürütülmektedir. Buna erişkin tip diabetes mellitus, Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalıkları örnek olarak verilebilinir [1], [2], [3].

Çok yönde farklılaşabilen iki tür kök hücre bulunmaktadır:

Totipotent kök hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğindeki kök hücrelerin tanımıdır. Yumurtanın döllenmesiyle oluşan zigot ve zigotun bölünmesi sonucu oluşan ilk birkaç hücre tipi totipotent hücre tipine örnektir. Pluripotent kök hücreler ise embriyonik gelişimde, blaskositin oluştuğu evredeki iç hücre kitlesi örnek olarak verelibilir. Ya da Laboratuvar ortamında somatik hücrelere pluripotens kazandırılarak elde edilen UPK hücreler örnek verilebilir [4].

Erişkin kök hücreler ise, erişkin dokularda bulunan ve birçok hücreye dönüşebilen kök hücrelerdir [5]. Embriyonik kök hücre ise, embriyoda erken evrede bulunan totipotent kök hücreyi ifade eder [6]. In vitro olarak çok sayıda hücre serilerine farklılaşma kapasitesine sahip pluripotent insan embriyonik kök (iEK) hücrelerinin izolasyonu rejeneratif tıp alanında kullanımda büyük potansiyele sahiptir. Embriyonik kök hücreler embriyonun blaskokist evresinden elde edilmektedir, erişkin bireylerde bulunmaz [7]. İnsan embriyonik kök hücrelerin in-vitro olarak döllenmiş ve ihtiyaç fazlası embriyolardan ya da istemli sonlandırılan gebeliklerden elde ediliyor olması, kök hücre araştırmalarında etik tartışmalara neden olmuştur. Ortaya çıkan bu etik ve politik tartışmalar nedeniyle, farklı hücre hatlarını çalışmaya yönelik yöntem ve protokoller geliştirilmektedir [8].

Gelişen teknoloji ve gen aktarımı yöntemleri kullanılarak erişkin kişinin somatik hücrelerinden kök hücre özelliklerine sahip uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) elde edilebilmektedir. Uyarılmış pluripotent kök hücreler insan ya da hayvan somatik hücrelerinin genetik olarak yeniden programlanmasıyla elde edilen yeni tip kök hücrelerdir [9]. Etik sorun oluşturmayan bu hücreler hastaya özel tedavi geliştirmede ve hastalık modellemesi çalışmalarında önemli bir kaynak oluşturmaktadır [10].

Bu alanda altın standart olarak kabul edilen çalışma 2006 yılında Yamanaka ve Takahashi tarafından yapılmıştır. Japon bilim adamları yaptıkları çalışmada embriyonal dönemde önemli olan dört transkripsiyon faktörünün genlerini (Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc) erişkin somatik hücrelere aktarmış, erişkin hücreleri tekrar programlamlayarak embriyonik kök hücre benzeri fonksiyonlara sahip olan hücreler elde etmişlerdir [9]. Hücreleri yeniden programlamak ve pluripotens özellik kazandırmak için transkripsiyon faktörü genlerinin hücrelere aktarılması gereklidir. Bu yaklaşımın yanı sıra UPK hücre elde etmek için bilim adamları tarafından kullanılan birçok method bulunmaktadır. Bu methodlar Gen ürünlerinin direkt hücrelere transferi, RNA ve DNA bazlı yeniden programlama olarak üç gruba ayrılır.

RNA bazlı yeniden programlanma, sentetik mRNA'ların, mikroRNA'ların veya RNA virüslerinin veya sentetik RNA genetik materyalin transfeksiyonu ile sağlanır. DNA bazlı

teknolojiler en yaygın kullanılanlardır ve bunlar kendi içinde ayrıca üç gruba ayrılır: virüs, transpozonlar ve plazmidler. Gen ürünlerinin direkt hücrelere transferi günümüzde yavaş ve verimsiz bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir [11]. İlk fare ve insan iPSC hatları virüs tabanlı genom sistemleri kullanılarak üretilmiştir.

Hücreleri yeniden programlamak ve pluripotens özellik kazandırmak için bir başka yöntemde ilgili transkripsiyon faktörü genlerinin hücrelere aktarılmasıdır. Hücrelere gen aktarımı yapmak için taşıyıcı vektörler kullanılmaktadır. Bu vektörler viral ve non-viral olarak sınıflandırılmaktadır.

Hücrelere gen aktarımı yapmak için taşıyıcı vektörler kullanılmaktadır. Bu vektörler viral ve non-viral olarak sınıflandırılmaktadır.

Günümüzde başarılı gen aktarım sistemlerinde kullanılan viral vektörler retrovirüs, adenovirüs, adeno ilişkili virüs, herpes virüstür. Genomlarının bazı lokusları silinerek, uygulamalarda lullanılmak üzere güvenli hale gelecek şekilde değiştirilerek kullanılmıştır [12]. Duverger, V. ve arkadaşları (2002) adeno assosiye vektörleri insan tümör hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara karşı hassaslaşlaştırmak için kullanmıştır. Blaese, R.M. ve arkadaşları (1995) adenosin deaminaz (ADA) eksikliğinin tedavisi amacıyla yaptığı çalışmalarada retroviral vektörleri kullanarak hastalarda gen terapi ile klinik deyeler yürütmüştür. Kanser tedavisinde klinik uygulamalarda onaylanmış ilk gen terapisi ürünü Gendicine rekombinant adenovirüs çalışmalarının bir sonucudur.

Non viral vektörler sentez kolaylığı, hücre/doku hedefleme, düşük immünojenite ve büyük ölçekli üretim kolaylığı gibi birçok avantajı nedeniyle gen transferinde viral vektörlere oranla son yıllarda daha çok tercih edilmektedir. Nörojenik hastalıkların ve beyin tümörlerinin gen terapisi ile tedavisinde sıklıkla tercih edilen vektörlerdendir. Caplen NJ ve arkadaşları (1995) non viral vektörlerden katyonik lipid / DNA kompleksleri (lipopleksler) kanser ve kistik fibrozisin tedavisi için çeşitli klinik uygulamalarda kullanılmıştır. Benzer şekilde, Banerjee ve arkadaşları insan prostat kanseri hücrelerine hedeflenen ilaç iletiminde kullanmak üzere lipozomlar tasarlamıştır. Brown ve arkadaşları (2007) tarafından formüle edilmiş kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaç

türü olan doksorubisin yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) nanopartiküller hazırlayarak meme kanseri hücrelerine pH bağımlı bir şekilde doksorubisinin kontrollü salımını başarmıştır.

Somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücrelere (UPKH) yeniden programlanması kalıtsal cilt bozuklukları da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirme imkânı sunmaktadır [13].

Son yıllarda, keratinosit, fibroblast ve melanosit gibi epidermal hücreler uyarılmış insan pluripotent kök hücreleri elde etmek için sıkça kullanılmaktadır. Deri biyopsilerinden kolaylıkla izole edilebilmeleri, kültür koşullarının karmaşık olamaması ve kolay çoğalması nedeniyle fibroblastları, uyarılmış pluripotent kök hücrelerinin (UPKH) üretimi için yaygın olarak kullanılan primer somatik hücre tipidir [14]. Elde edilen UPK hücreleri, in vitro 3D deri ekuvalent kültüründe, çeşitli biyolojik araştırmalarda ve rejeneratif tıpta kullanılabilmektedir [15].

1.2 Tezin Amacı

Önerilen çalışmada amacımız, Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan plazmidin çoğaltıp saflaştırılarak laboratuvarımızda sentezlenecek olan biyouyumlu lipid-nanopartikül aracılığıyla sağlıklı bağ doku hücrelerine aktarılmasıyla, yeniden programlamlanan fibroblast hücrelerinden uyarılmış pluripotent kök hücreler elde edilmesi ve elde UPK hücrelerin hidrojel yapıdaki yara örtü malzemesi üzerine yüklenmesidir.

1.3 Hipotez

Çalışma ile yapılacak gen transferi sonucu fibroblast hücrelerinden uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) elde edilecek ve elde edilen kök hücreler iyileşmeye dirençli yaraların tedavisinde kullanılmak amacıyla selüloz bazlı, hidrojel özellikte yara örtü malzemesi üzerine yüklenerek kişiye özel yara örtüsü sentezlenmesiyle iyileşmeye dirençli yaraların iyileşme sürecinin hızlanmasında önemli olacaktır. Hatta kullanılan biyomalzemenin biyobozunur özellikte olması sebebi ile daha sonra hastanın yara

dokusu tamamen iyileştikten sonra malzemede kendiliğinden vücuttan uzaklaştırılacaktır. Aynı zaman da ileride yapılacak farklı dokuların onarımında kullanılacak doku iskeleleri içinde model olan bir çalışma özelliğiini taşıyacaktır. Böylece, yapılan çalışma birçok kalıtsal hastalık, diyabet, kardiyolojik hastalıklar, sinir doku mühendisliği gibi biyomühendislik ve tıp alanlarında karşılaşılan ciddi problemlere çözüm olma potansiyeli taşıyacaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücre

Kök hücreler, bulunduğu nişte farklılaşmamış halde bulunan, kendini yenileyen ve başka hücrelere dönüşebilme kapasitesindeki hücrelerdir. İlk kök hücre çalışmaları 1960'lı yıllarda hematopoietik kök hücrenin keşfi ile başlamış, sonrasında mezenkimal kök hücreler bulunmuştur. 1990'larda memeli beyninde, karaciğer ve epidermis gibi farklı doku ve organlarda kök hücrenin bulunduğu saptanmıştır [16]. İnsan vücudundaki organlar, olgunlaşmış ve özelleşmiş hücrelere sahip dokulardan ve özel kök hücrelerden oluşmaktadır. Organa özgü kök hücreler doku hemostazının korunmasını sağlayan spesifik özelliklere sahiptir.

Kök hücreler kendini yenileme kapasitesine sahip hücrelerdir [17]. Bu hücreler canlı vücudundaki birçok farklı hücre tipine dönüşme potansiyeline sahiptir. Ayrıca birçok dokuda onarım sistemi olarak çalışarak canlı hayatta olduğu sürece, tramva yada yaralanma durumlarında ilgili hücreleri yenilemek için olarak bölünürler ve çoğalırlar [18].

Kök hücreler sahip oldukları sınırsız bölünebilme, çeşitli hücrelere farklılaşabilme ve doku onarımı sağlaması, kolay elde edilebilmeleri gibi özellikler nedeniyle bilimsel çalışmalarda büyük bir araştırma alanı oluştumakta, klinik uygulamalarda ve rejeneratif tıpta çokça tercih edilmektedir [16].

Bir hücrenin kök hücre olarak adlandırılabilmesi için sahip olması gereken özellikler şunlardır;

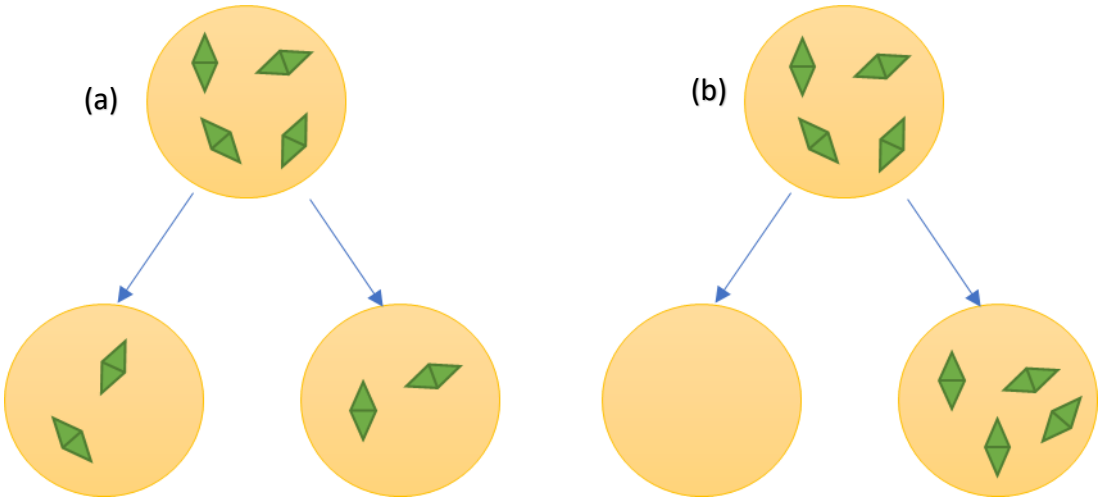
1. Farklılaşmadan Çoğalma Ve Kendini Yenileme:

Kök hücrelerin sahip olduğu en önemli özelliklerden birisi, farklılaşmadan sınırsız olarak çoğalabilme ve kendini yenileme işlevidir. Kök hücreler farklılaşmadığı dönemde kendi sayısını korumak ve farklılaşacağı hücrenin öncüsünü üretmek için çoğalmasına kendini yenileme işlevi denir [19]. Kök hücrelerin sınırsız olarak kendilerini yenileme özelliği vardır. Diğer hücrelerden farklı olarak birçok kez çoğalabilir veya prolifere olurlar. Bu özelliği kanser hücresine benzer olsa da normal kök hücre yenilenmesi ile kanser hücresinin çoğalma mekanizması farklıdır. Kanser, hücrenin düzensiz kendini yenileme hastalığı olarak kabul edilirken, kök hücrenin kendini yenilemesini büyüme faktörleri, hücreler arası etkileşim, mikro çevre, ekstraselüler matriks bileşenleri gibi iç mekanizmalarla kontrol edilerek sınırlandırılır [20].

Kök hücrelerin sınırsız olarak kendini yenileme özellikleri erken embriyonik dönemde en yüksek seviyededir. Kendini yenileme ve sınırsız çoğalma özelliği sonraki nesillere aktarılabilir. Bu özellik kök hücrelerde farklılaşmanın ilerlemesiyle kaybedilmeye başlar [21].

2. Kök hücrelerde bölünme

Farklı hücrelere özelleşebilen ve kendini yenileyebilen kök hücrelerde iki çeşit hücre bölünmesi görülür. Bunlar simetrik ve asimetrik hücre bölünmesidir. Kök hücreler uzun vadede büyümenin sağlanması, kendini yenileme yeteneğini korumak ve sayılarını arttırmak amacıyla asimetrik veya simetrik hücre bölünmesi geçirebilmektedir. [22].



Şekil 2.1 simetrik ve asimetrik bölünme

a) Simetrik hücre bölünmesi:

Tüm kök hücreler kendi özdeş kopyalarını üretme yeteneğindedir. Hasarlı bir dokunun onarılması gibi yeni hücrelere gereksinim duyulan durumlarda kök hücreler yeni hücreler oluşturmak için simetrik olarak bölünür. Simetrik bölünme sonucu kaynak hücreye özdeş iki hücre yada iki eş progenitor hücre oluşur (Şekil 2.1 (a)) [23].

b) Asimetrik hücre bölünmesi:

Asimetrik hücre bölünmesi, farklı yollara sahip iki kardeş hücre oluşumuna neden olan bir bölünme olarak tanımlanır. Kök hücreler kendilerini yenilerken aynı zamanda farklılaşacağı hücrenin öncüsünü oluşturmak için asimetrik bir hücre bölünmesi geçirirler. Asimetrik hücre bölünmesi ile kaynak hücreye özdeş bir hücre ve özelleşerek farklı bir hücreyi oluşturacak bir öncül hücreyi oluşmaktadır (Şekil 2.1 (b)) [24]. Öncül hücre birkaç bölünme geçirerek ve çeşitli farklılaşmalara uğrayarak özelleşmiş olgun hücreyi oluşturur [23]. Kök hücreler kendini yenilemek ve farklılaşmak arasındaki dengeyi asimetrik bölünme geçirerek sağlar. Çevresel koşullar (pH), ortam şartları (iyonik ortam), hücreler arası ilişkiler, büyüme faktörleri, sitokinler gibi iç ve dış faktörler asimetrik bölünmeyi etkileyen iç ve dış faktörlerdir [16].

3. Farklı tip hücrelere özelleşebilme (Plastisite) ve farklanma:

   Farklanma, bir kök hücrenin hangi özellişmiş hücreyi meydana getireceği ile ilgili bir süreçtir. Farklanmada önce hücre kararlanma aşamasına girer ve daha sonra özelleşeceği kök hücreye uygun transkripsiyon faktörlerinin devreye girmesi ile nihai hücreye farklanır. Plastisite ise geniş anlamda bir hücrenin farklı bir doku veya organdan başka bir hücreye dönüşebilme yeteneğidir [25]. Kök hücreler dokulara özgü özelleşmiş fonksiyonlara sahip değillerdir ancak canlı vücudunki birçok farklı hücre tipine farklılaşabilme potansiyele sahiplerdir. In-vivo ya da in-vitro koşullar altında uygun sinyallerle uyarılmaları sonucu başka hücrelere farklılaşabilirler. Farklılaşma hücrenin asimetrik bölünme geçirmesi, gen metilasyonlarının meydana gelmesi, epigenetik kontrol mekanizmalarındaki değişimler gibi geçirmiş olduğu biyokimyasal olayların sonucunda gerçekleşir [19]. Kök hücrelerin farklılaşmasında çevresel koşullarında etkisi vardır. Hücredeki plastisite potansiyelinin kök hücrenin maruz kaldığı çevre koşullarının bir yansıması olduğu öne sürülmüştür [25].

4. Pluripotensi

Kök hücrelerin bir canlıyı oluşturan özelleşmiş hücre tiplerinden ne kadarına farklılaşabileceği ile ilgili sayısal bir değerdir. Kök hücreleri, normal hücrelerden ayırd eden en önemli özelliklerden birisidir. Pluripotens bir hücrede transkripsiyon faktörleri ve epigenetik düzenleyiciler ile hücreye sağlanmaktadır [26].

5. Telomeraz enzim aktivitesi gösterme

Telomeraz enzimi DNA'da üretilen ve kromozom uçlarında bulunan telomer bölgelerin boyunun ayarlanmasından sorumlu enzimdir. Somatik hücrelerde telomeraz aktivitesi hücreler yaşlandıkça azalır ve hücre her bölündüğünde telomer uzunluğu kısalır. Kök hücreler hücre bölünmeleri sırasında telomer uzunluğunu koruyan bir mekanizmaya sahiptirler. Kök hücreler gibi sürekli bölünen hücreler yüksek telomeraz enzim aktivitesi ile sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olurlar [27].

6. Bir dokunun in vivo fonksiyonel yapılanmasını ve devamlılığını sağlama

Kök hücreler amaca yönelik bölünmeler geçirerek dokularda oluşan hasarın özelleşmiş hücrelerle onarılması, doku hücrelerinin yenilenerek doku devamlılığının sağlanması ve dokunun fonksiyonel özelliklerini kazanmasında etkili hücrelerdir.

7. Dokuda sessiz fazda bulunurken bir sinyal geldiğinde aktifleşme

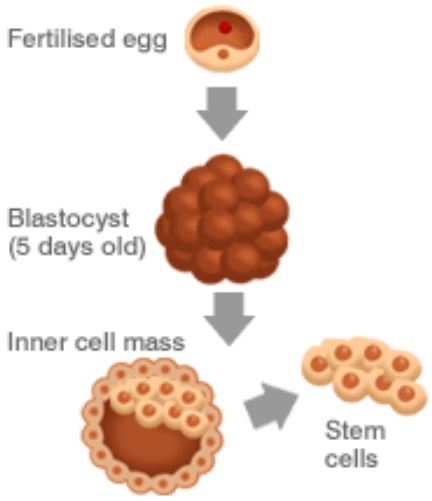
Sessiz faz kök hücrelerin minimum bazal aktivite gösterdiği fazdır. Yetişkin kök hücreler uzun süre sessiz fazda kalabilirler. Bu durum uyarıcı sinyallerle uyarılana kadar devam edebilir. Uyarıcı sinyallere yanıt olarak hücre döngüsüne tekrar girerek kendilerini yenilerler veya öncül hücrelere farklılaşırlar [28].

2.1.1 Kök Hücrelerin Kaynaklarına Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler için çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Bunlardan ilki elde edildiği gelişim aşamasına bağlı olarak yapılan sınıflandırmadır. Kök hücreler kaynaklarına göre embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak ikiye ayrılır.

2.1.1.1 Embriyonik Kök Hücreler

Zigotun ardı ardına 5-6 kez bölünme geçirmesiyle blastokist oluştur. Blastosist embriyoyu oluşturan iç hücre kitlesi ve plasentayı oluşturan trofoektoderm olmak üzere 2 hücre tabakasından meydana gelmektedir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Embriyonik Kök Hücre Eldesi

Embriyonik kök hücre, blastosist aşamasında iç tabakada bulunan sınırsız yenilenme özelliğindeki hücrelere verilen isimdir. Bu hücreler sahip oldukları yüksek farklılaşma kapasitesi ile ektoderm, endoderm ve mezoderm kaynaklı tüm hücre tiplerine kaynak oluşturabilir, çeşitli doku ve organlara farklılaşabilirler [29].

Embriyonik kök hücreler ile ilgili yapılan ilk çalışmalar 1970li yıllara dayanır. Kahan ve arkadaşları farede gelişen testis kanserinden embriyo karsinoma hücreleri (EKaH) elde etmiştir [30]. Evans ve arkadaşları 1981 yılında fare blastokist iç hücre kütlesinden izole edilen hücreleri in vitro ortamda fare fibroblastaları üzerinde çoğaltılarak embriyonik kök hücre elde etmiştir [31]. Fare embriyosu üzerindeki çalışmaların ardından implantasyon öncesi insan blastokist iç hücre kütlesinden izole edilen hücrelerin in vitro çoğaltılması ile insan embriyonik kök hücreleri tesbit edilmiştir. Thomson ve arkadaşları yaptıkları bu çalışma ile embriyonik kök hücrelerin morfolojisini ve pluripotens genlerin ekspresyonunu analiz etmiştir [32]. Embriyonik kök hücreler kültür ortamında farklılaşmalarını engelleyen bir etken olmadığı durumda sırasıyla ekdodermal ve nöral hücre hatlarına farklılaşır. Kültür ortamına çeşitli büyüme faktörleri ve serum ilave edilirse hücreler endodermal veya mezodermal kaynaklı hücrelere de farklılaşma sağlanabilmektedir [33]. Embriyonik kök hücreler, gelişimden sorumlu hücrelerdir bu sebeple embriyonik kök hücrelerin pluripotent özelliği ve kendini yenilemesinde rol oynayan moleküler mekanizmaları anlamak, hücrelerin temel biyolojisi anlamayı ve

gelişim hatalarıyla ortaya çıkan birçok farklı hastalığa yeni tedavi yöntemleri bulunmasını sağlayabilir [34].

Embriyonik kök hücrelerin elde edilmesi için günümüzde üç farklı kaynak kullanılmaktadır.

Tüp bebek merkezlerinde in vitro fertilizasyon sonrası elde edilen kullanılmayan, düşük gebelikler sonucu oluşan veya bilimsel araştırmalar için bağışlanan embriyonik kök hücreler birinci kaynağı oluşturmaktadır. Bu yolla elde edilen embriyonik kök hücreler birçok etik problemi de beraberinde getirmektedir [21]. Embriyoların kök hücre olarak kullanılmasında karşılaşılan etik problemlerin başında embriyoların canlı birer birey olarak değerlendirilmesi gerektiği düşüncesi gelmektedir. Yaşama hakkı olan bir canlının araştırmalar için öldürülmesi kabul edilemez bir uygulama olarak değerlendirilmektedir. Diğer yandan embriyonik kök hücre çalışmaları birçok dinde ahlaki açıdan kabul edilemez olarak nitelendirilmektedir [35].

İkinci kaynak somatik nükleer transfer metoduyla elde edilen embriyonik kök hücrelerdir. Bu yöntemde nukleusu çıkarılmış yumurta hücresine gelişim potansiyeli engellenmiş somatik hücre nukleusu yerleştirilerek bir embriyo elde edilir [36]. Farklı memelilerin yumurta kaynağı olarak kullanımıyla oluşacak insan-hayvan kimerik yapı kaygısı ve bu yapıdan elde edilecek insan embriyonik kök hücrelerin ne derece güvenli olabileceği sorusunu gündeme getirmiştir.

Üçüncü kaynak ise sperm ile döllenme yapılmadan yumurta hücrelerinden doğrudan parthenogenez ile elde edilen embriyonik kök hücrelerdir [21]. Günümüzde bu teknik ile elde edilen embriyonik kök hücrelerde homozigotluk nedeniyle yaşanabilecek sorunlar tartışılmaktadır.

2.1.1.2 Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücre tanımı erken embriyogelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler için kullanılır. Yetişkin kök hücrelerin olgun dokularda sessiz fazda bulunurlar ancak kök hücre klonunu arttırmak ve öncü hücresi olduğu

dokularda oluşan bir hasar sonucu hasarlı bölgenin onarılması için seyrek olarak bölünürler [37].

Hematopoietik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), nöral kök hücreler (NKH), bağırsak kök hücreler (BKH) ve epitel kök hücreler günümüzde bilimsel araştırmalarda en çok çalışılan yetişkin kök hücre tipleridir [19].

En iyi karakterize edilmiş yetişkin kök hücreler kan kök hücreleri olarak da adlandırılan hematopoietik kök hücrelerdir. Olgun kanda bulunan bu hücre grubu kan üretiminden sorumludur. Kendi kendini yenileyebilir ve uygun koşullarda tüm kan dokusuna farklılaşabilir [38].

Somatik dokularda bulunan yetişkin kök hücreler kolay erişilebilir bir kök hücre kaynağıdır. Araştırmalarda ve klinik uygulamalarda embriyonik kök hücreye kıyasla etik kısıtlama bulundurmaması ve dokuya spesifik olması nedeniyle önemlidir [39].

2.1.2 Kök Hücreler Farklılaşma Kapasitesine Göre Sınıflandırılması

Kök hücreler daha fonksiyonel olarak farklılaşma kapasitesine göre totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent ve uyarılmış pluritotent olarak 5 grupta sınıflandırılır. [5]

2.1.2.1 Totipotent Kök Hücreler

Yumurtanın döllenmesinden sonra oluşan zigot ve zigotun bölünmesiyle oluşan 8 hücreli morula safhasına kadar oluşan hücreler totipotent hücrelerdir. Totipotent hücreler canlı bir organizma vücudunda bulunan tüm hücre tiplerine özelleşebilme potansiyeline sahip oldukları için, en önemli kök hücre türlerinden biridir [40]. Totipotent hücreler özellikle gen ve hücre terapilerinde, doku mühendisliğinde en çok tercih edilen hücre grubudur. Bölünme sürecinin incelenmesiyle hastalığın hangi aşamada oluştuğu anlaşılabilir böylece hastalıklı hücrenin bölünmesi ve çoğalması önlenebilir [41]. Uygun koşullar, büyüme faktörleri ve destek materyali sağlandığında her bir totipotent hücre sahip olduğu sınırsız farklılaşma yeteneği ile tam bir embriyo oluşturabilir [19].

2.1.2.2 Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler in vitro koşullarda farklılaşma yetenekleri sınırlı olan ancak ex vivo koşullarda gerekli sinyaller verildiğinde daha çeşitli hücre tipine dönüşebilen kendilerini yenileme özelliğine sahip hücrelerdir. Multipotent kök hücreler, hemen birçok hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir [42].

Kemik iliği ve plasenta multipotent kök hücreleri içeren organlardır. Multipotent hücreler, ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiş, daha sonra kemik, kas, kıkırdak, yağ gibi birçok yetişkin dokudan elde edilmişlerdir. Yetişkin kök hücreler multipotent kök hücre olarak kabul edilir, çünkü farklılaşma potansiyelleri bir ya da daha çok hücre ile sınırlıdır. Kemik iliğinden elde edilen hematopoetik kök hücreler tüm kan hücresi tiplerini üretebilen ancak diğer hücreleri üretmeyen kök hücrelerdir [43].

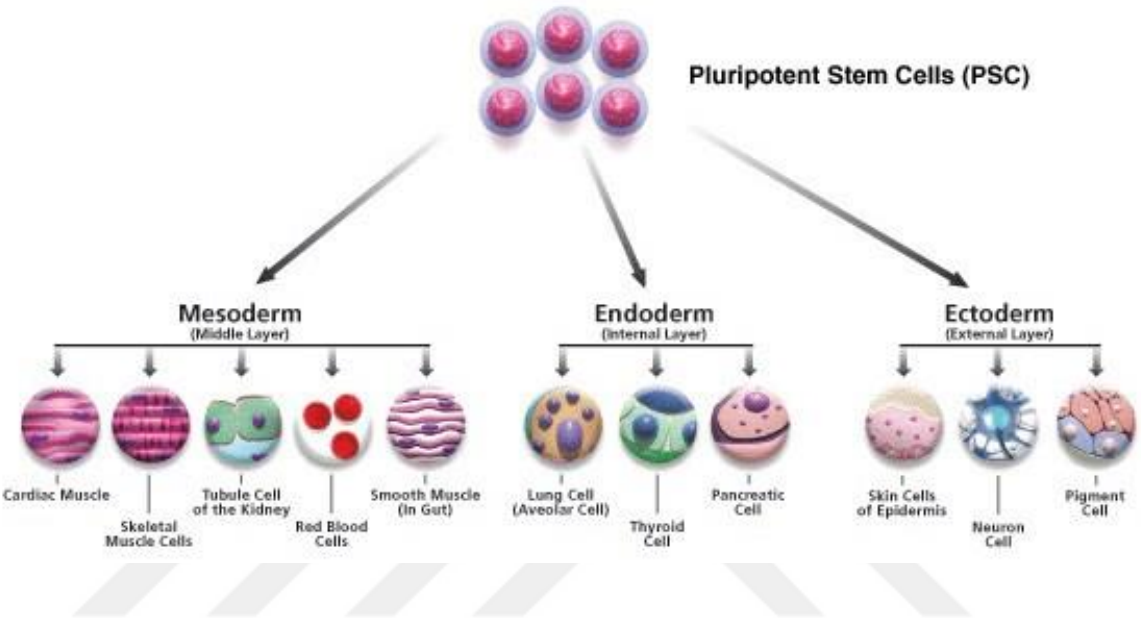
Multipotent kök hücreler, farmakolojik çalışmalarda ve tıpta kullanılabilecek hücre kaynağıdır. Birçok araştırmada kullanılan hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler multipotent kök hücre grubuna girer [44].

2.1.2.3 Unipotent Kök Hücreler

Unipotent kök hücreler yetişkin dokularda bulunan ve sadece bir hücre türüne farklılaşabilen kök hücre grubudur. Diğer kök hücre gruplarının geniş farklılaşma yelpazesiyle kıyaslandığında çok daha düşük farklılaşma kapasitesine sahiptir [45]. Farkılılaşma kapasitesinin sınırlı olmasına rağmen sahip olduğu önemli ölçüdeki terapötik potansiyel ile hastalıkların tedavisi ve yaralanmalarda kullanılmak üzere geliştiriebilecek bir adaydır. Bununla birlikte, her kök hücrenin sahip olduğu kendilerini yenileme özelliği ile unipotent kök hücreler organ nakilleri için sağlıklı ve canlı doku üretimi amacıyla kullanılabilir [46]. Epitel dokuda bolca bulunan deri hücreleri unipotent kök hücreye verilebilecek en güzel örnektir.

2.1.2.4 Pluripotent Kök Hücreler

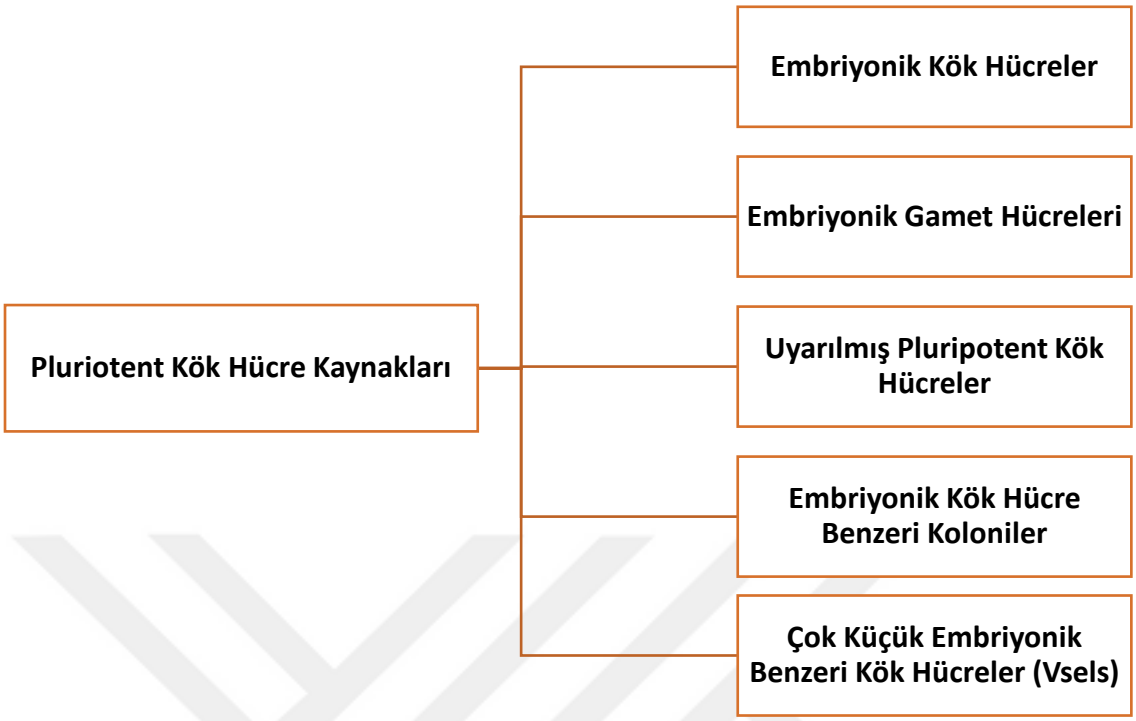
Pluriotent kök hücreler, embriyo farklılaşmasının başlangıç aşamasında oluşan endoderm, mezoderm ve ektoderm germ tabakalarına ve bu tabakalardan türetilen neredeyse tüm hücre tiplerine farklılaşma kapasitesinde olan kök hücre tipidir [47]. Pluripotent kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Pluripotent kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri

Embriyonik kök hücreler olarak da adlandırılan pluripotent kök hücreler, gelişen embriyonun 5-6. gününde hücrenin blastosist evresine gelmesiyle iç hücre kitlesinden elde edilmektedir [29]. Sınırsız çoğalma yeteneği ile doku yenilenmesinde ve geniş doku hasarının tamir edilmesinde kullanılırlar. Bunun yanı sıra pluripotent kök hücreler rejeneratif tıp için oldukça önemlidir [21]. Pluripotent kök hücre kaynakalrı Çizelge2.1'de gösterilmiştir [48].

Çizelge 2.1 Pluripotent Kök Hücre Kaynakları



Pluripotent kök hücreler gelişmekte olan embriyodaki tüm somatik ve germ hattı hücrelerin kökenidir. İlk pluripotent hücreler Hogan ve arkadaşları tarafından 1976 yılında teratokarsinom olarak bilinen gamet hücrelerinde oluşan bir tür tümöründen izole edilmiştir [37].Thomson ve arkadaşlarının insan embriyonik kök hücrelerini (hESCs) başarılı bir şekilde kültüre etmesinin ardından bu hücrelerin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, omurilik yaralanmaları gibi zor hastalıkların tedavi edilmesine yönelik beklentilerini ortaya çıkmıştır [49].

Embriyonik kök hücreler, kök hücre grupları arasında en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Bu özellikleri onları hücre tabanlı terapiler için büyük bir kaynağa dönüştürmektedir. Ancak embriyonik kök hücre izolasyonu sırasında canlı blastosistlerin tahrip edilmesiyle ilgili etik ve dini kaygılar araştırmalara sosyal ve politik kısıtlamalar getirmiştir. Araştırmalar bu etik sorunları ortadan kaldırmak ve alternatif kaynaklardan pluripotent kök hücrelerin türetilmesi yönünde ilerlemeye başlamıştır [50].

Yamanaka ve arkadaşları 2006 yılında 4 transkripsiyon faktörünün yardımıyla somatik hücrelerin embriyonik duruma yeniden programlanması ve embriyonik kök hücre elde edilmesi protokolü ile Nobel ödülüne layık görülmüştür. Günümüzde yamanaka faktörleri olarak da adlandırılan bu 4 faktör, hücrelerin yeniden programlanması için altın standart olarak kabul edilmektedir.

2.1.2.5 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

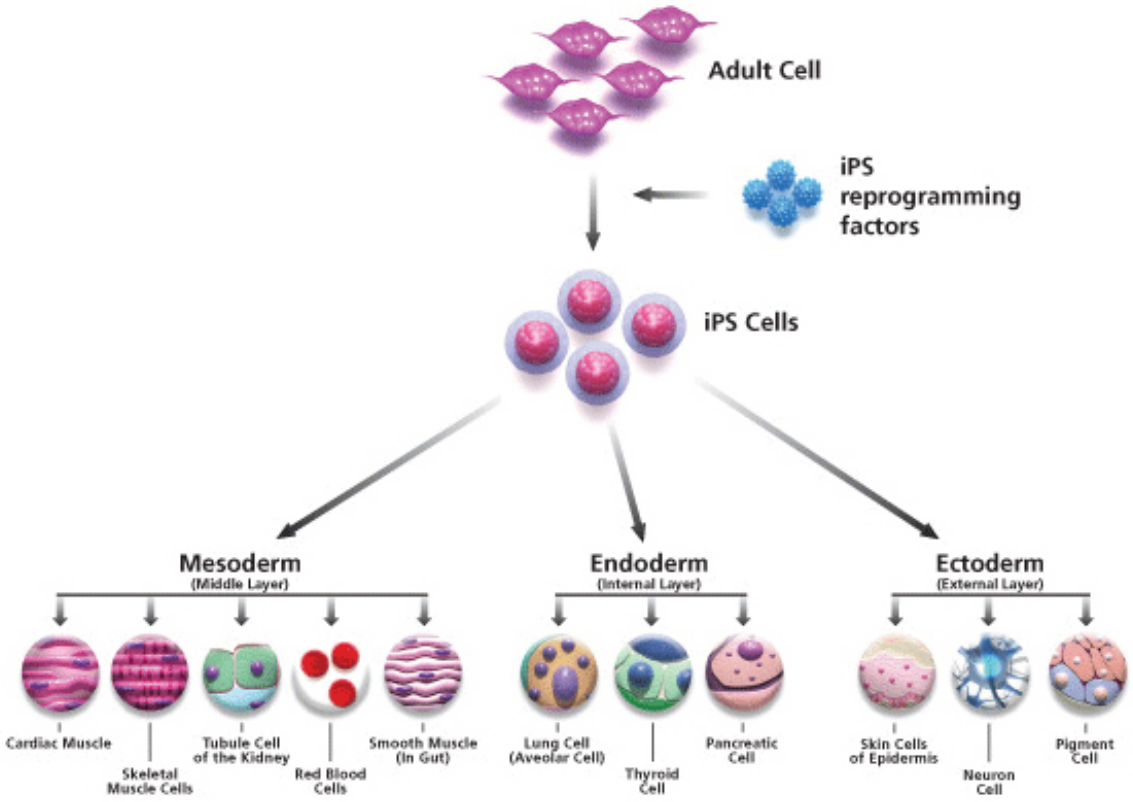
Blastosist aşamalı embriyoların iç hücre kütlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler sahip oldukları yüksek farklılaşma kapasitesi ile hücre bazlı tedavilerle birçok hastalığa umut olmuştur. Ancak, embriyonik kök hücrelerinin ilk olarak izole edilmesinden bu yana 20 yıldan fazla bir süre geçmiş olmasına rağmen, embriyonik kök hücre teknolojisi hala emekleme aşamasındadır ve klinik denemelerin başlayabilmesi için önce birçok teknik ve etik engelin ortadan kaldırılması gerekmektedir [51].

Embriyonik kök hücrelerin karşılaştığı etik sorunlara karşı kullanılabilecek alternatif kaynak bir hücreye yönelik araştırmalar yapılmıştır. Döllenmiş yumurtadan oluşan embriyonik kök hücreler çeşitli somatik hücrelere farklılaşabilmektedir ancak somatik hücreler, diğer somatik hücre türlerine ayrılmamakta ve farklılaşmamaktadır. Bunu açıklamak için araştırmacılar tarafından iki olasılık ortaya atılmıştır. Birincisi, somatik hücreler, gelişme sırasında başka türdeki hücrelere farklılaşma potansiyellerini tamamen kaybedebilir ya da ikinci seçenek olarak potansiyellerini koruyabilirler, ancak bu potansiyel gelişme sonrasında bastırılabilir [52].

2006'da ortaya çıkan indüklenmiş pluripotent kök hücre tekniği, yetişkin hücre pluripotensine yönelik araştırmalarda dönüm noktası olmuştur. Bu alanda ilk çalışma Yamanaka ve Takahashi tarafından yapılmıştır. Japon bilim adamları yaptıkları çalışmada embriyonal dönemde önemli olan dört transkripsiyon faktörünün genlerini (Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc) erişkin somatik hücrelere aktarmış, erişkin hücreleri tekrar programlamlayarak embriyonik kök hücre benzeri fonksiyonlara sahip olan hücreler elde etmişlerdir [9].

Pluripotent hücreler, canlıyı oluşturan tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğindeki farklılaşmamış hücrelere verilen isimdir. Uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) olarak

adlandırılan bu hücreler aynı embriyonik kök hücreler gibi kendini çoğaltma (self renewing), farklı dokulara değişebilme özelliklerine (pluripotensi) ve üç embriyonik germ tabakasına (ektoderm, endoderm ve mezoderm) farklılaşma potansiyeline sahiptir (Şekil 2.4) [8]. Pluripotent kök hücreler temel olarak insan embriyo (embriyonik kök hücreler) ya da birincil indüklenen somatik hücreler (uyarılmış pluripotent kök hücreler)'den köken alabilir. Uyarılmış pluripotent kök hücreler insan ya da hayvan somatik hücrelerinin genetik olarak yeniden programlanmasıyla elde edilen yeni tip kök hücrelerdir. Etik sorun oluşturmayan bu hücreler hastaya özel tedavi geliştirmede ve hastalık modellemesi çalışmalarında önemli bir kaynak oluşturmaktadır [10].



Şekil 2.4 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyelleri

Somatik hücrelerin yeniden programlanarak uyarılmış pluripotent kök hücreye farklılaşmasını sağlayan programlama faktörleri sahip oldukları aktiviteye göre seçilmelidir;

Nanog protein: Nanog proteini embriyonik kök hücrelerin, pluripotent özelliğini etkileyen, in vitro olarak farklılaşmanın engellenmesinde önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür.

Oct4: Embriyonik kök hücrelerin, pluripotensi özelliğinin korunmasında en önemli rolü oynayan proteindir. Bu nedenle bu hücrelerin teşhisinde en iyi bilinen ve en çok kullanılanılan programlama faktörüdür. Oct-4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasında etkili olmaktadır.

Sox2: Bu ailenin en önemli görevlerinden birisi Oct4 ekspresyonunu düzenlemesidir. Yapılan çalışmalar Sox2 ve Oct4'ün birbirinin ifadesini etkileyerek kök hücrelerin pluripotent karakterinin oluşturulmasında görev aldıkları göstermiştir.

Klf: Klf ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, gelişimi ve apoptozisi olmak üzere pek çok biyolojik aktivitenin sürdürülmesini sağlamaktadır. Klf gen ailesi tek başlarına embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileme kapasitelerinde etkin rol oynamamaktadır. Ancak diğer transkripsiyon faktörlerinin (Nanog, Myc, Oct4) ekspresyonlarını düzenleyerek pluripotenside dolaylı olarak rol oynar.

Myc ailesi: V-Myc, genomda yaklaşık 4.000 bölgeye bağlanıp genomun gevşemesini sağlayarak diğer transkripsiyon faktörlerinin genoma bağlanmasını kolaylaştırır. UPKH çalışmalarında transfeksiyon verimliliğini arttırmak amacıyla aktarılan gen bölgeleri arasına dahil edilmektedir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda farklı hücre kaynakları ve farklı kombinasyonlarda yeniden programlama faktörleri seçilerek UPKH çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalara Çizelge 2.2'de yer verilmiştir.

Çizelge 2.2 Farklı yeniden programlama faktörleri ile yürütülen UPKH çalışmaları

O: Oct4 S: Sox2 K: Klf4 N: Nanog L: Lin28

Hücre Tipi	**Yeniden Programlama Faktörleri**	**Referans**
Fibroblast	OSKM	Takahashi ve Yamanaka 2006
	OSLN	Yu ve arkadaşları, 2007
Keratinosit	OSKM	Aasen ve arkadaşları, 2008
Kordon kanı endotel Hücresi	OSLN	Haase ve arkadaşları, 2009
Kordon kanı kök hücre	OSKN	Ye ve arkadaşları, 2009
Sinir kök hücre	O	Kim ve arkadaşları, 2009
Melanosit	OSKM	Utikal ve arkadaşları, 2009
Amniyon hücre	OSKM	Li ve arkadaşları, 2009
Adipoz kaynaklı kök hücre	OSKM	Sugii ve arkadaşları, 2010
Hepatosit	OSKM	Liu ve arkadaşları, 2010
T hücreleri	OSKM	Seki ve arkadaşları, 2010
Astrositler	OSKM	Ruiz ve arkadaşları, 2010
Periferik kan	OSKM	Kunisato ve arkadaşları, 2011
Böbrek mezangial hücre	OSKM	Song ve arkadaşları, 2011
İdrardan alınan hücreler	OS	Zhou ve arkadaşları, 2012

Hücreleri yeniden programlamak ve pluripotens özellik kazandırmak için transkripsiyon faktörü genlerinin hücrelere aktarılması gereklidir. Gelişen teknoloji ve gen aktarımı yöntemleri kullanılarak erişkin kişinin somatik hücrelerinden kök hücre özelliklerine sahip uyarılmış pluripotent kök hücre (UPKH) elde edilebilmektedir [9].

Rejeneratif tıpta, UPKH kullanımı önemli bir yere sahiptir. Yaralanmış veya dejenere olmuş dokuların tedavisi, UPKH hücrelerin laboratuvar koşullarında üretimi ve hasarlı bölgeye verilmesi ile sağlanmaktadır. Organ nakillerinde uygun dönorun bulunması oldukça zaman alır ve dokular arası uyumun sağlanması en önemli sorundur. Bağışçıların azlığı ve uygun dönor bulunamaması nedeniyle birçok hasta nakil beklerken ölmektedir. Günümüzde artan organ nakli ihtiyacı karşısında UPKH teknolojisinin kullanımı birçok organ nakli bekleyen hastaya çözüm sunmaktadır. Organ bekleyen hastanın vücuduna nakledilecek hücreler, hastanın kendi somatik hücrelerden üretilen onarılmış UPKH'lerden farklılaşacağından uyum sorunu yaşanmaksızın hastaya tam uyumlu sağlıklı doku nakli gerçekleştirilir [53]. Liu ve arkadaşları 2011 yılında insan UPKH'lerinden türetilen hepatik hücrelerin çeşitli farklılaşma aşamalarda karaciğer dokusunda rejeneratif potansiyelini göstermiştir. Suziki ve arkadaşları 2013 yılında UPKH'lerin hematolojik ve immünolojik hastalıkların tedavisinde pratik olarak uygulanması için yararlı bir araç olacağını çalışmalarıyla ortaya koymuştur.

2.2 Gen Aktarımı

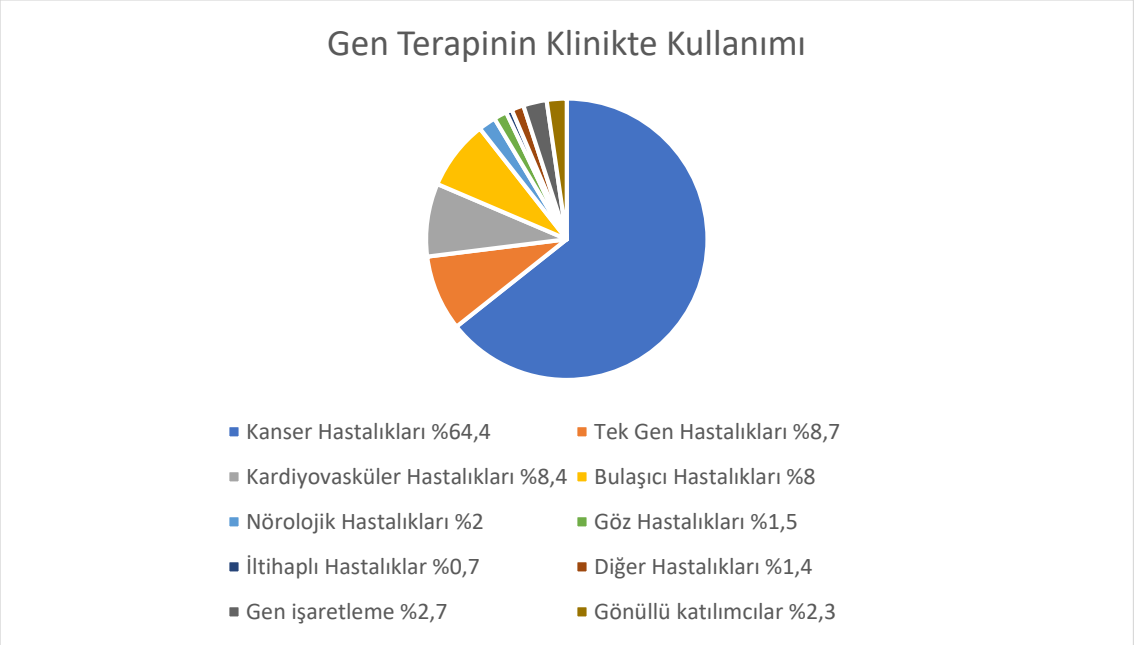
Moleküler biyolojideki son gelişmeler ve genetik mühendisliğinde kaydedilen önemli gelişmeler ile genlerin hücresel sürece ve hastalık patogenezine olan etkileri daha net anlaşılmaya başlanmıştır. Hastalığa neden olan ve hücresel süreçlere dahil olan çok sayıda gen, terapötik yaklaşımlar için hedef haline gelmiştir. Genlerin tanımlanması ile bilim insanları gen aktarım yöntemleri kullanarak hücreye istenilen özellikler kazandırmayı hedeflemiştir. Gen terapisi, genetik mühendisliği çalışmalarında bir hastalığın tedavisi ya da hücreye yeni bir fonksiyon kazandırmak için kullanılan bir stratejidir [54]. Gen terapisi amaçlarından bazıları;

i. Hastalığa neden olan mutasyona uğramış bir genin sağlıklı bir kopya ile değiştirilmesi,

ii. Uygun olmayan bir şekilde işlev gören mutasyona uğramış bir genin etkisiz hale getirilmesi,

iii. Bir hastalıkla mücadele edebilmek için yeni bir genin vücuda verilmesidir.

Gen terapi hemofili, kistik fibrozis gibi genetik hastalıkları, kanser, AIDS gibi edinilmiş hastalıkları ve kardiyovasküler, nörolojik hastalıklar gibi metabolik bozukluklarının tedavisi için ümit vaat etmektedir [55]. 2012 yılından günümüze kadar gen terapinin klinik uygulamalarda kullanım oranları aşağıda verildiği gibidir. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 (2012-günümüz) Gen Terapisi ile klinik uygulamalar

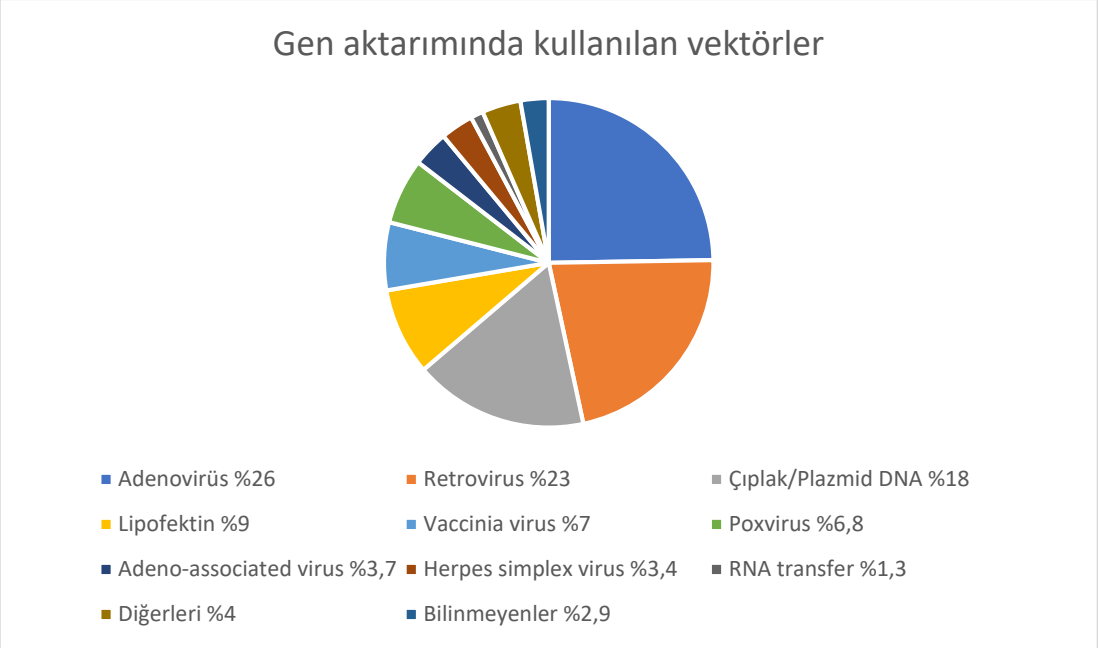
Gen terapisinde kullanılan iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan ilki ex vivo gen terapi yöntemidir. Bu yöntemde hastalardan canlı hücreler alınarak in vitro koşullarda hücrelere gen transferi yapılır. Transfekte olan hücreler uygun belirteçler yardımı ile seçilerek izole edilir. Seçilen hücreler uygun besin ortamlarında amplifiye edilerek tekrar hastaya verilir. Bu yöntem sadece kültürlenebilir hücrelerde kullanıbilmektedir. İkinci yöntem olan in vivo gen terapisi ise kültürlenemeyen hücreler için hastaya doğrudan teröpatik etkisi olan genetik materyalin uygun bir taşıyıcı yardımı ile hastaya verilmesiyle gerçekleştirilir [56]. İki yöntemde de esas olan terapötik olarak kullanılmak üzere aktarılacak olan genetik materyalin verimli bir şekilde hücrelere aktarımıdır. Bu nedenle hücre dışı engelleri aşabilecek, hedef hücre yada dokuya spesifik, genetik materyali bozunmadan koruyabilen, kolay tasarlanan, klinik uygulamalar için imünolojik etkilerin olmayan biyobozunur güvenli vektör sistemlerinin kullanılması gerekmektedir [57]. Gen

transferinde kullanılan vektör sistemleri viral ve non viral vektör sistemleri olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.2.1 Viral Vektörler

Virüsler, bir hücreye genetik bilgi verebilen en basit biyolojik ajanlardan biridir. Sahip oldukları genetik materyali canlı hücrelere enfekte ederek çoğalırlar. Genetik materyalin etkili ve güvenli bir şekilde taşınımı için yapılan araştırmalarda virüslerin sahip olduğu doğal enfeksiyon özellikleri birçok terapötik materyalin taşınımında kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Bilim insanları, virüs genomundan hastalık yapıcı gen bölgelerini çıkararak ve terapötik olanları ekleyerek viral vektörleri tasarlamıştır. Vektörlerin tasarlanmasındaki amaç, virüs bileşenlerini kullanarak ve üretim verimliliğini koruyarak transgenin ifadesinin sağlanmasıdır [58].

Tasarlanan bu vektörler, insan vücudu boyunca genetik materyali güvenli bir şekilde taşır ve stabilitesini korur. Yüzeyinde bulunan reseptörler virüsün hangi hücrelere gireceğini belirler. Enfekte olmuş hücrede virüsün replikasyonunun engellenmesi çeşitli genetik modifikasyonlar ile sağlanmaktadır. Birçok virüs hastalığa neden olmaktadır ve bunlardan türetilen vektörler patojenik olma potansiyeline sahiptir [59]. Gen aktarımında kullanılan vektörler ve kullanım yüzdeleri Şekil 2.6'da verildiği gibidir.

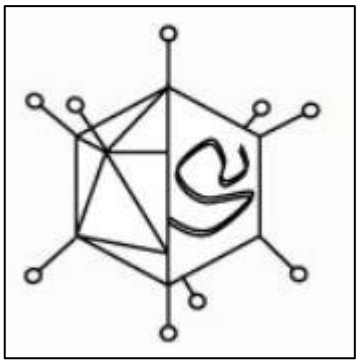


Şekil 2.6 Gen aktarımında kullanılan vektörler ve kullanım yüzdeleri

2.2.1.1 Adenovirüs

Adenovirüsler zarsız çift iplikli DNA virüsleridir. Adenoviral genom, 36 kb'lik çift sarmal doğrusal bir DNA molekülü içerir, genomu protein bir kapsid çevreler. Adenovirüs ilk olarak 1953'te insan adenoidlerinden izole edilmiştir. Bilinen 50'den fazla serotipi bulunmaktadır. Genellikle gen aktarımında kullanılan serotipleri Ad2 ve Ad5'dir.Yüksek transfeksiyon etkinliği ve yüksek hücre hedefleme kapasitesine sahip olması taşıyıcı vektör olarak geliştirilmesinde etkili olmuştur [59].

Hücreleri transfekte ettiklerinde konak genomuna entegre olmaz hücrenin çekirdeğinde doğrusal bir epizomal olarak kalırlar. Çoğalan ya da çoğalmayan hücreleri transfekte edebilirler. İnsan adenovirüsü yüksek derecede immünojeniktir, akut solunum yolu hastalıklarına ve çeşitli salgın hastalıklara neden olur. Gen transferinin yüksek verimle gerçekleştirmesine rağmen bu immünojenisite, ekspresyon süresini sınırlamakta ve klinik uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır [60]. Adenovirüs yapısı Şekil 2.7'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.7 Adenovirüs yapısı

2.2.1.2 Adeno-assosiye virüs

Adeno-assosiye virüs (AAV) zarfsız, tek-iplikli DNA taşıyan parlovirüs ailesine ait virüs çeşitidir. İlk olarak 1966'da solunum yolu hastalıklarına neden olan patojen çalışmalarında oluşan bir kontaminasyonda keşfedilmiştir. Replike olmaları için adenovirüs (Ad) ve herpes simpleks virüs (HSV) gibi yardımcı vektörlere ihtiyaç duyar [61]. Gen aktarımında genellikle AAV-2 serotipi tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra AAV-5, AAV-6, AAV-8 serotipleri de hücreye ya da dokuya göre tercih edilen çeşitleri arasındadır.

AAV'lerin uzun süredir incelenmesine rağmen, bu virüsün doğal enfeksiyonu hakkında çok az şey bilinmektedir[62]. Gen transferinde kullanılmak üzere modifiye edilmesinde viral genomun %96'sı tamamen silinir ve sadece viral kapsid içine genomun paketlenmesi için sinyal görevi gören ters terminal tekrarlarını korunur. AAV genomu çok küçük olduğundan sadece 4.5 kb uzunluğunda bir genetik materyal taşıyabilir. Genomu 5 ’ ve 3 ’ uçlarında ters terminal tekrarı bulundurmaktadır. Bu tekrarlar dizi içindeki tamamlayıcılığa bağlı olarak transfekte olduğu hücrede ‘T’ şeklinde sekonder yapılar meydana getirebilir ve enzimatik reaksiyonlar gerektirebilir [63]. Adeno-assosiye virüs yapısı Şekil 2.8’de gösterildiği gibidir.

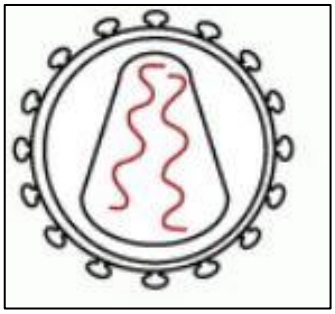


Şekil 2.8 Adeno-assosiye virüs yapısı

2.2.1.3 Retrovirüs

Retrovirüsler genomunda (ss)RNA bulunduran zarflı virüslerdir. Taşıdıkları revers transkriptaz enzimleriyle viral RNA genomunu çift iplikçikli viral DNA'ya çevirerek konakçı DNA'ya sabit bir şekilde entegre olurlar. Bazı retrovirüsler virüs-konak etkileşiminde rol oynayan küçük düzenleyici proteinleri kodlarlar. Retroviral vektörler günümüzde gen aktarımında ikinci en yaygın kullanılan viral vektörlerdir [64].

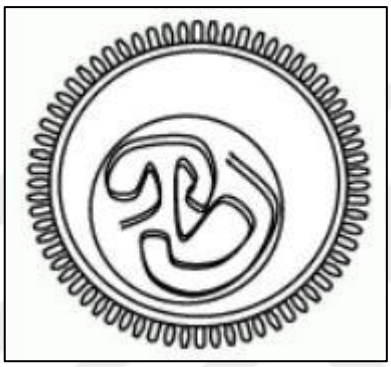
Birçok hücre tiplerini hedeflemek için kullanılabilir ve makul boyutlarda yabancı genleri taşıma yeteneğine sahiptir. Retroviral vektörler, enfekte olduğu hücrenin genomuna kalıcı olarak entegre olabilir, ancak transdüksiyon için mitotik hücre bölünmesi gerektirmektedir. Bu nedenle retroviral vektörler sadece bölünebilen hücreleri enfekte etmek için kullanılabilir. Ancak retroviral vektörlerin entegrasyonu için hücrenin bölünmesi bazı hücre tiplerini viral enfeksiyona karşı dirençli hale getirebilir [65]. Retro virüs yapısı Şekil 2.9'da gösterildiği gibidir.



Şekil 2.9 Retro virüs yapısı

2.2.1.4 Herpesvirüs

Herpesvirüs, genomunda 150 kb'lik çift iplikçikli lineer DNA ve yaklaşık 80 gen bölgesi bulunduran bir virüsdür. 30 ila 50kb arası yabancı DNA'yı konak hücreye taşıma kapasitesine sahiptir. Kromozoma entegre olmaz ancak uyku haline geçerek uzun süreli ekspresyon sağlar. Uyku halinde yapısında bulunan terapötik genlerde dahil olmak üzere tüm genlerin ekspresyonu durur. Herpesvirüs tabanlı vektörlerin klinik uygulamalara geçişteki en önemli engeli, birçok hücre tipindeki vektörün toksisitesi oluşturmuş olmasıdır [66]. Herpesvirüs yapısı şekil 2.10 gösterildiği gibidir.



Şekil 2.10 Viral vektör çeşitleri

2.2.2 Non-Viral Vektörler

Gen aktarımında kullanılmak üzere tasarlanan modifiye vektör sistemlerinin sahip olduğu immünolojik etkiler, sitotoksik etkiler, kısıtlı genetik materyal taşıyabilme kapasitesi, bölünmeyen hücreleri enfekte edememe, üretim ve kalite kontrolünün zor olması gibi dezavantajlara kıyasla non-viral vektörlerin üretiminin kolay ve daha düşük maliyetli olması, virüslere oranla çok daha düşük immünjeniteye sahip olması ve DNA boyutu sınırlamaması gen aktarımında non-viral vektörlerin cazip bir aracı olmasını sağlamıştır.

Non-viral vektörlerin viral vektörlere kıyasla tek dezavantajı daha düşük transfeksiyon verimliliğidir, ancak hala devam eden çalışmalarla yeni stratejiler geliştirilmiş ve non-viral vektörlerin kullanımının yaygınlaşması ile klinik çalışmalara giren ürün sayısı

artmıştır [67]. Non-viral vektör sistemlemleri fiziksel yöntemler ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki grupta incelenebilir.

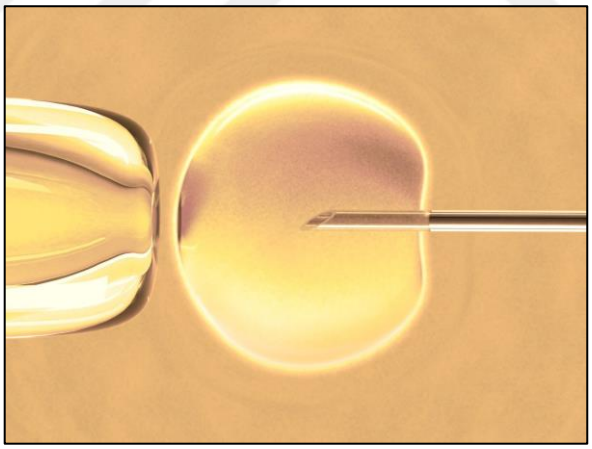
2.2.2.1 Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yaklaşımlar, aktarılmak istenilen genetik materyalin hücre membranından geçişini kolaylaştımak için çeşitli fiziksel ve mekanik yöntemlerin kullanılmasıdır.

Mikro Enjeksiyon, gen tabancası, elektroporasyon ve sonikasyon en çok kullanılan fiziksel yöntemlerdendir.

1. Mikro Enjeksiyon:

Genetik materyal mikro boyutlu iğneler taşıyan bir şırıngadan doğrudan lokal dokulara enjekte edilmesidir. Bu yöntemle deri, kas, karaciğer vb. birkaç doku transfekte edilmiştir. Nükleazların hızlı degredasyonu nedeniyle çıplak DNA enjeksiyonundan sonra enjeksiyonun etkinliği düşüktür ve transfeksiyon sadece iğne çevresine sınırlıdır [68]. Şekil 2.11'de mikroenjeksiyon yöntemi gösterilmektedir.



Şekil 2.11 Mikro enjeksiyon

2. Gen Tabancası (Biyolistik):

Bu yöntemde DNA önce metal mikroparçacıklar ile kaplanır sonrasındagen tabancasına yüklenir. Yüksek basınçlı helyum ya da küçük altın parçacıkları ile hızlandırılarak

hücrelere bombardıman edilir. Mikropartiküller hücre membranından içinden geçerek DNA hücreye ulaştırılır. Geçici ekspresyon sağlar ve bombardımanın gerçekleştiği dokuda ciddi hücre hasarı meydana gelir [69]. Şekil 2.12'de gen transferi için kullanılan gen tabancalarından biri gösterilmektedir.



Şekil 2.12 Gen tabancası (biyolistik)

3.Elektroporasyon

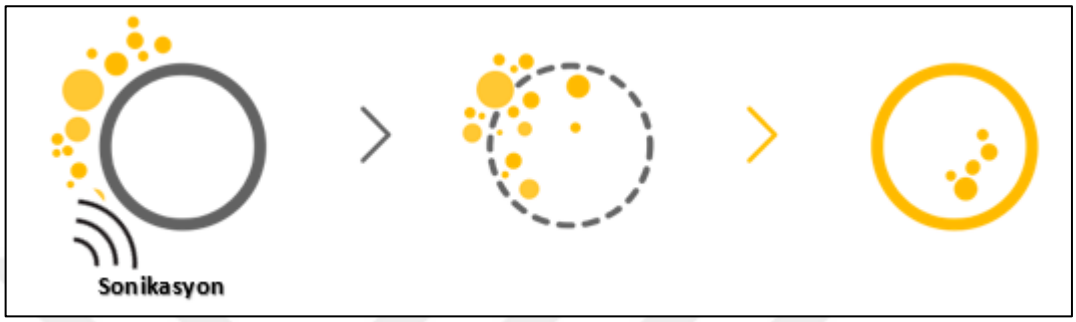
Hücre membranından DNA geçişine olanak sağlamak için elektrik akımı ile porlar oluşturulması esasına dayanır. Elektroporasyon, hücre membranına geçici geçirgenlik sağlar. (Şekil 2.13) Membrana verilen elektirik akımının yoğunluğu, sıklığı ve süresi transfeksiyonun verimini belirler. Başlangıçta gen transferi için geliştirilen elektroporasyon günümüzde ilaçların, antikorların, RNA ve DNA'nın aktarımı için kullanılmaktadır. Dezavantaj olarak, hücrelerde hasar oluşumu gözlenir ve iç organlara ulaşmak için ameliyat gereklidir [70].



Şekil 2.13 Elektroporasyon

4.Sonikasyon

Ses dalgaları ile hücre membranındaki porların geçici olarak açılması ve DNA'nın hücreye alınımını sağlar. (Şekil 2.14) Bu yöntem diğer yöntemlerden farklı olarak beyin, kas, kalp ve korneaya gen transferi için tercih edilmiştir. Transfeksiyon hedeflenen organda gözlenir hedeflenmemiş organları etkilemeden kalır.



Şekil 2.14 Sonikasyon

2.2.2.2 Kimyasal yöntemler

Kimyasal yöntemler inorganik taşıyıcılar, sentetik veya doğal biyobozunur taşıyıcılar olarak incelenebilir.

1.İnorganik Taşıyıcılar

Kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat, silika, altın ve çeşitli manyetik bileşikler (Fe_3O_4, MnO_2) kullanılarak genellikle retikülоendotelyal sistemden kaçmak için ya da bir molekülü bozulma veya denatürasyondan korumak amacıyla tasarlanan nanoyapılardır. Kalsiyum fosfat elde edilen nanopartiküller biyouyumlu ve biyobozunurdur ancak taşıma kapasitesi sınırlıdır. Silika partiküller düşük tosisiteye sahiptir ancak serum içeren ortamlarda transfer verimi etkilenir. Manyetik nanopartiküller küçük parçacık boyutuna sahip olmasıyla fizyolojik ve hücresel bariyerlerin çoğundan geçerek ve daha yüksek transfeksiyon verimliliği sağlayar. Klinik uygulamalarda uzun süreli kullanımı için çalışmalar devam etmektedir [55].

2. Sentetik Veya Doğal Biyobozunur Taşıyıcılar

Kimyasal nonviral taşıyıcı sistemler genellikle DNA / Katyonik lipit (Lipoplexes), DNA / katyonik polimer (Poliplexler) ve DNA/katyonik peptidler olarak adlandırılır.

Sahip olduğu pozitif yük sayesinde DNA ile eloktrostatik etkileşim sonucu daha verimle DNA taşıma kapasitesine sahip olmaları nedeniyle çalışmada katyonik lipid nanopartikül tercih edilmiştir.

2a. Katyonik lipidler

Katı lipid nanopartiküller toksik olmayan fosfolipitler ve kolesterolden oluşan, hazırlama yöntemine bağlı olarak 25 nm ila 10 mm arasında değişen boyutlara sahip partiküllerdir. Hepsinde ortak olan yapılar pozitif yüklü hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruktur. Katyonik hidrofilik başın nükleik asitlerde negatif yüklü fosfat grubu ile bağlanmasıyla lipopleks adı verilen yapılar oluştur. Pozitif yüklü olmaları negatif yüklü glikoproteinler ve hücre zarının proteoglikanları ile elektrostatik olarak etkileşirek nükleik asitlerin hücresel alımını kolaylaştırır. Genetik materyali çevreleyen pozitif yüklü lipitler, taşınım sırasında hücre içi ve hücre dışı nükleazlara karşı materyalin korunması sağlar [71]. Geliştirilmiş fiziksel stabilitesi, toksik olmaması, kontrollü salıma olanak sağlaması ve biyouyumluluğu nedeniyle ilaç salınım sistemlerinde tercih edilmektedir. Nano ölçekli boyutta üretilebilir olmaları vücutta makrofajları uyarmadan ilerlemelerini sağlar. Katyonik grupları taşıyan katı lipid nanopartiküller kolay üretimi, yüksek yükleme kapasitesi ile son zamanlarda DNA taşıyıcıları olarak da kullanılmaktadır. Plasmid DNA'sını in vitro olarak memeli hücrelerine verimli bir şekilde aktardığı ve transfekte ettiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Günümüzde, terapötik ilaç yüklü lipozomlar, kansere karşı hedefli dağıtım için test edilmekte olan çalışmalardandır [72].

2.3 Doku Mühendisliği

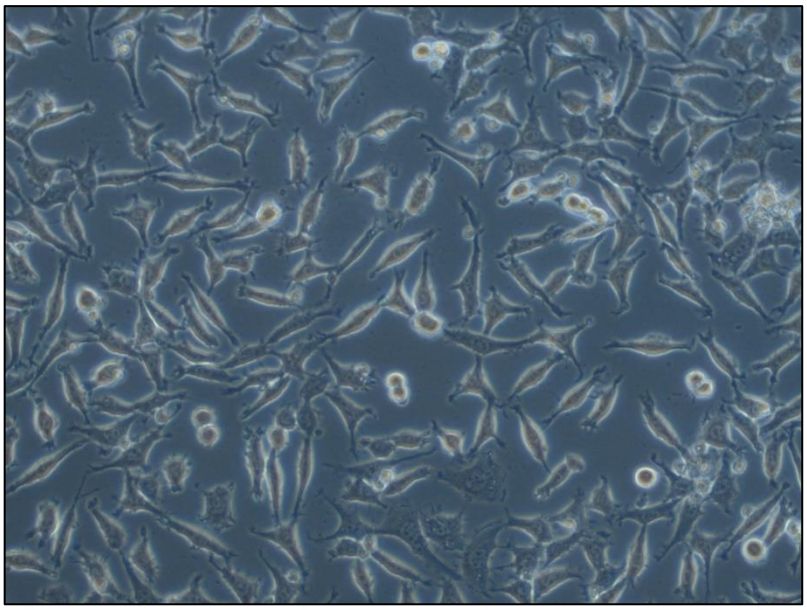
Doku mühendisliğinin amacı hasarlı dokuların veya organların yerine kullanılmak üzere laboratuvar koşullarında biyomateryal tasarlamaktır. Doku mühendisliğinin uygulamalarındaki temel yöntemlerden biri, insan hücrelerinin bir iskele üzerine in vitro

ekimi ve bu hücrelerin dokuyu oluşturmak için, çoğalması, göç etmesi ve spesifik dokuya farklılaşmasıdır. Doku mühendisliği uygulamalarında hücre kaynağı olarak genellikle primer hücreler veya kök hücreler kullanılmaktadır. Kullanılacak hücrelerin elde edilmesi ardından, hücreler uygun kültür koşullarında çoğaltılır, taşıyıcı biyouyumlu hücre iskelesi üzerine ekilir ve burada istenilen 3 boyutlu yapıyı kazanması beklenir. Kültür ortamında 3 boyutlu yapıyı kazanan dokular hastalara aktarılır. Suni deri ve kıkırdak FDA tarafından onaylanmış doku mühendisliği uygulamalarındandır [73].

2.4 Fibroblast Hücreleri

Fibrobastlar bir ya da iki büyük çekirdeğe sahip, yassı veya oval şekilde bulunan, sitoplazmik uzantılar yapan bağ doku temel hücrelerindendir. En önemli görevi bağ dokunun ana bileşenlerinden olan ve yara iyileşmesinde etkili hücreler arası boşluklarda bulunan kollajen proteini ve temel işlevi dokulara esneklik sağlamak olan önemli bir hücre dışı matris proteini olan elastinin üretimidir.[74]

L929 hücreleri 100 günlük erkek C3H/A türü bir farenin deri altı bağ dokusundan izole edilerek çoğaltılmış fibroblast hücreleridir.[75] L929 fare fibroblast hücreleri DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) + 2mM Glutamin + %10 fetal bovine serum (FBS) besiyerinde 37°C'de %5 CO^2 içeren ortamda inkübe edilerek kültüre edilir. Hücreler yapışkan (adherent) özelliktedir ve hücrelerin çoğalma süresi yaklaşık 24 saattir. L929 hücre hattı fibroblast hücreleri monolayer olarak büyüyerek 2 günde bulunduğu flaskı %90 oranında kaplar. Haftada 2-3 kez pasajlanarak subkültüre edilebilir. [76] L929 hücre hattı günümüzde yeni anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesinde, hücre toksisite testlerinde ve transfeksiyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.15 sağlıklı L929 fibroblast hücrelerinin invert mikroskop altında görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.15 L929 Fibroblast Hücreleri

2.5 Yara Tedavisi

Yara, çevreden gelen çeşitli dış etkenlerle (fiziksel, kimyasal, biyolojik vb.) dokuda oluşan hasar ve vücudun yapı bütünlüğünün bozulması durumudur. Genel olarak yaralar akut ve kronik olmak üzere iki çeşittir.

Yara iyileşmesi, hücrelerin oluşan hasarlı dokuya karşı verdiği cevaptır ve yeniden vücut homeostazi oluşturmak için hücre proliferasyonu ile kaybedilen, hasarlı doku yerine yeni, sağlıklı doku oluşumu prensibi ile çalışır. [77] Yara iyileşmesi 4 ana başlık altında incelenebilir. Bunlar hemostaz aşaması, enflamasyon aşaması, hücre proliferasyonu ve tamir aşaması, yeniden şekillenme aşamasıdır. [78]

Yetişkin bir insanda insanlarda optimal yara iyileşmesi aşamaları sırasıyla şu şekilde gerçekleşir:

1. Hızlı hemostaz: Yaranın oluştuğu bölgeye pıhtılaşmada görevli trombositlerin ulaştırılması ile fibrin oluşumu ve yaranın dış ortamdan izole edilmesi.

2. Uygun enflamasyon: Yaralı bölgeye lökositlerin ulaşması, hasarlı bölgenin monositlerin makrofaja dönüşümü ile patojenlerden temizlenmesi ve yeni damar oluşumunun başlaması.

3. Mezenkimal hücre farklılaşması: Kollejen sentezinin artması, hücrelerin çoğalması ve yara bölgesine taşınımı

4. Uygun anjiyogenez oluşumu: Hasarlı bölgede yeni damar yolunun gelişmesi

5. Re-epitelizasyonun: Yaralanma sonucu hasarlı bölge yüzeyindeki epitel dokunun keratinosit ve fibroblast hücrelerinin etkisiyle yeniden büyümesi

6. Yara iyileşmesi için uygun kollajen sentezi, çapraz bağlanması ile yeni dokunun meydana gelmesi. [77], [79]

Yara iyileşme süresi yaralanmanın şiddeti ve yaraya neden olan kaynağa göre değişmesinin yanı sıra kişinin yaşı, metabolizma hızı, sağlık durumu, sahip olduğu sistematik hastalıklar (sarılık, obesite vb.), genetik sorunlar, ilaç kullanımı, vitamin eksiklikleri (VitC-A-E-B1-B2-B6-D) gibi faktörlerden de etkilenmektedir. [80]

Hasar görmüş dokuların yenilenmesi, yara iyileşmesinin hızlandırılması amacıyla son yıllarda birçok araştırmacı ek tedavi yöntemlerinin uygulanması gerektiğini önermektedir. Özellikle doku hasarın büyük olduğu yaralarda iyileşme sürecini hızlandırmak amacıyla dışarıdan hücre tutunmasını destekleyici olarak büyüme faktörü ve proteinler kullanılmaktadır. Yara iyileşmesi için metionin, sistin, sistein ve arjinin gibi aminoasitler oldukça önemlidir. [81] Bunların yanı sıra açık yaralarda havayla temas sonucu oluşan sulanma, ardından kabuk oluşumu gözlenir. Oluşan bu sert yapı epitel hücrelerin hasarlı dokuya taşınımını zorlaştırır sonuçta iyileşme süreci uzar. [82]

2.5.1 Yara Örtü Malzemeleri

Yara örtüleri, vücutta oluşan açık yaraları örtmek için kullanılan biyolojik ya da sentetik materyallerdir. Günümüze kadar gelişen teknoloji ile birlikte nemli bir ortam oluşturmak, uygun ph ve ısı sağlamak, çevreden gelecek toksik maddelere karşı yarayı korumak ve

yaralı bölgede oluşabilecek enfeksiyonları önlemek böylece iyileşme sürecini hızlandırmak amacıyla birçok yara örtü materyali sentezlenmiştir. [83] Yara örtü materyalleri ilk zamanlarda sadece kanamanın önlenmesi ve hasarlı dokuyu çevresel etkilerden korumayı hedeflemiştir. Günümüzde iste homeostasinin tekrar kurulması için destek olarak, istenen durumlarda yara üzerine ilaç salınımı yaparak ağrıyı azaltmada ve yarayı mikroorganizmalara, enfeksiyona karşı korumada önemli rol oynamaktadır. [84]

İdeal bir yara örtüsünde bulunması gereken başlıca özellikle şunlardır; [83], [85], [86]

Yara örtüsü, ısı kaybını önlemeli, yaradan sızan sıvıyı absorblayarak sıvı konrolü sağlamalı, yara yüzeyini nemli tutmalıdır. Yaralı bölgede oluşan istenmeyen kokuları kontrol altına alabilmelidir. Bakteri ve mikroorganizmalara karşı yarayı örterek fiziksel bir bariyer görevi görmelidir. Yaralı dokuda bulunan enfekte olmuş hasarlı ve ölü dokuların yaradan uzaklaştırılmasını sağlamalıdır.

Yara örtü malzemesinin yara yüzeyine tamamen yapışması materyalin çıkarılması sırasında zorluklara ve yara iyileşmesinde sorunlara neden olmaktadır. Bu sebeple yara örtüleri yara yüzeyine yapışmamalı, yaranın iyileşmesini desteklerken yara izi oluşumunu azaltmalıdır. Toksik ve alerjik olmamalı, biyobozunur olmalı, Hücresel destek sağlayarak yara iyileşmesini desteklemelidir.

Günümüzde kullanılan yara örtü malzemeleri için yapıdıkları malzemeye göre (hidrokolloidler, aljinat, hidrojeller) fiziksel yapılarına göre (transparan filmler, köpükler), aktif substurat içeriklerine göre (vitaminler ve minareller, büyüme faktörleri, antibakteriyel moleküller) şeklinde sınıflandırmalar yapılmıştır. Kullanılan bu malzemeler yaranın türüne, iyileşme sürecine etkilerine göre tek olarak ya da malzemelerin çeşitli kombinasyonlarıyla elde edildikten sonra kullanılabilir. [83] Gelişen teknoloji ve doku mühendisliğindeki ilerlemeler ile nanoliflerden elde edilen ağsı yara örtüleri ve bakterilerden elde edilen selülozik örtülerde literatürdeki yerini almıştır.

Genel olarak yara örtüleri 4 ana grupta sınıflandırılabilir.

2.5.1.1 Aljinat örtüler

Alginat, kahverengi alglerden elde edilen anyonik bir biyopolimerdir. Nemli bir ortam sağlaması ve yara lezyonuyla iyon alışverişi yapması gibi özelliklere sahip olmasıyla yara örtü malzemesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [87]. Doğal bir hemostat olan kalsiyum aljinat, pansuman gerektiren yaraları için uygundur. Aljinatın jel olma özelliği, pansumanı travma olmaksızın çıkarmaya yardımcı olur ve pansuman değişiklikleri sırasında hastanın yaşadığı acıyı azaltır. Hızlı granülasyon sağlar ve re-epitelizasyon sürecini kolaylaştırır [78]. Şekil 2.16'da yaralarda kullanılan bir aljinat yara örtüsü gösterilmektedir.



Şekil 2.16 Aljinat yara örtüsü

2.5.1.2 Hidrokolloid örtüler

Hidrokolloid yara örtüleri iç koloidal tabaka ve dış hidrofilik tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. İçeriğinde bulunan çeşitli yapışkanlar ve hidrofilik polimerler, yara ile temas ederek jel formunda yarayı kaplayan bir yapı oluşturur [88]. Bu yapı yaraya iyileşmesi için gerekli nemli ortamı sağlarken antibakteriyal bir tabaka oluşturarak dışarıdan gelebilecek enfeksiyonları önler [89]. Sıklıkla yanık yaraları ve travmatik yaralar gibi pansuman gerektiren yaraların tedavisinde kullanılır [90]. Şekil 2.17'de yaralarda kullanılan bir hidrokolloid türü bir yara örtüsü gösterilmektedir.



Şekil 2.17 Hidrokolloid yara örtüsü

2.5.1.3 Köpükler

Su emme kapasitesi yüksek, oksijen geçirgenliği fazla, yara çevresindeki dokulara uyum sağlayan silikon veya poliüretandan elde edilen yara örtü malzemeleridir. (Şekil 2.18) Sahip olduğu antimikrobiyal etki ile enfeksiyonu önler ve yara iyileşmesine katkıda bulunur. Yaradan sızan sıvıyı emerek istenmeyen koku oluşunu engeller. Köpük yara örtüleri daha çok kısmi yanıklarda ve diyabetik ülserde kullanılmaktadır. Gümüş salınımlı köpük, yara tedavisinde etkili bir yara örtü materyalidir ancak maliyetli oluşu kullanımını sınırlamaktadır [91].



Şekil 2.18 Köpük yara örtüsü

2.5.1.4 Hidrojel örtüler

Hidrojeller iki veya daha çok bileşenin çapraz olarak bağlanması sonucu oluşan, yüksek su tutma kapasitesine sahip polimerlerdir. Hidrojeller hasarlı dokuya ve doku çevresine sağladıkları çeşitli avantajlar nedeniyle yara örtü malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bir hidrojel örtüsü, yaraya nemli ortam sağlar, yaradan sızan sıvıyı emerek kötü koku oluşumunu engeller, yarayı izole ederek oksijene nüfuz etmesini engeller ve aynı zamanda dış çevreden gelebilecek ek kontaminasyonaları önler. Yaraya yapışmadığı için yeni oluşan epidermisi tahrib etmeden sargıyı rahat ve ağrısız bir şekilde değiştirilmesini sağlar. Saydam olması sayesinde yaralı bölgenin durumunun sürekli kontrol edilmesine olanak verir (Şekil 2.19). Hidrojel yara örtüleri mekanik olarak dayanıklı ve elastiktir, bu sayede doku şekline kolayca uyum sağlar. Hidrojel yara örtüleri yanık yaraları, yatak yaraları, deri ülserleri ve ameliyat sonrası oluşan yaralar gibi ciddi ve kalıcı cilt hasarlarının giderilmesi için günümüzde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bakteriyal selüloz kullanılarak üretilen yara örtüleri hidrojel yara örtü malzemelerine bir örnektir [92], [93].



Şekil 2.19 Hidrojel yara örtüsü

2.6 Bakteriyal Selüloz Ve Yara Örtüsü Olarak Kullanılması

Seluloz nanofiber yapıda bulunması, bulunduğu ortama nemli tutabilme yeteneği ve doğada en fazla bulunan organik maddelerden biri olması nedeniyle çeşitli araştırmalara

konu olmaktadır. Üretimindeki kolaylık, toksik olmama ve nanofiber yapısı gereği sahip olduğu mekanik özellikler mikrobiyal selülozu yara iyileşmesinde kullanılabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Hidrojeller, yüksek miktarlarda su tutma kapasitesi, saydam olması ve sahip olduğu mekabik özellikler ile yara iyileşmesinde tercih edilen yara örtü malzemeleridir. Bakteriyal selüloz *Acetobacter xylinum* bakterisi tarafından ekstraselüler olarak sentezlenen doğal bir hidrojeldir. Laçin ve arkadaşları 2014 yılında *Acetobacter xylinum* bakterisinin ekstraselüler selüloz sentezi ile elde selüloz membrana (Şekil 2.9) sodyum metaperyiodat ile 55°C'de 4 saat boyunca karanlık bir ortamda çalkalanarak, selüloz membranlara oksidasyonu yolu biyobozunur özellik kazandırmıştır. Membranlar, %10 'luk AMP çözeltisi içerisinde 24 saat boyunca bekletilerek memranlara antimikrobiyal özellikte olmalarını sağlanmıştır. Membranlar üzerinde yapılan analiz sonucunda ilacın membrandan salınımı %99.5 olarak ölçülmüş ve membranlarda *S. pneumonie*, *S. aureus* ve *E. Coli* karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir. Biyolojik olarak bozunabilir yapısı gereği ilaç dağıtım sistemlerinde kullanımı membranın yaralı bölgeden çıkarılmasını gerektirmeden iyileşme sürecine yardımcı olacaktır. Tüm bu özellikler bakteriyal selüloz bazlı yara örtü malzemelerini rejeneratif tıpta ve doku tercih edilen bir materyal haline getirmiştir [86].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Sarf Mazlemeler

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- DMEM F-12
- TRİPSİN EDTA
- FETAL BOVİNE SERUM (FBS)
- KNOCKOUT SERUM
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Fenol
- Tripan blue
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
- 75 cm^2 flask
- 25 cm^2 flask
- GlutaMax

- Bazik fibroblast büyüme faktörü
- Non-essential amino asitler
- B-merkaptoetanol
- Ditiotreitol (DTT)
- Ethanol
- İzopropil alkol
- Fosfat Buffered Saline (PBS)
- Agaroz
- Amfisilin
- Luria-Bertani (LB) broth
- Luria-Bertani (LB) agar
- TBE Buffer
- DNA loading dye
- RNA loading dye
- DNA ladder
- RNA ladder
- 96 well plate
- 24 well plate
- 6 well plate
- Serolojik pipet

- Petri kabı
- Plastik öze
- Pastor pipeti
- 15mL ve 50mL falkon tüp

3.2 Kullanılan Kitler

QIAGEN Mini Plasmid Kit (25)

Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit

Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis Kit

Sigma Aldrich Taq Polymerase from Thermus aquaticus

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

3.3 Kullanılan Cihazlar

- Esco, CelCulture CO_2 inkübatörü

Ayarlanan sıcaklıkta sabit kalarak homojen şekilde ısıyı dağıtır. Sensör sistemi ile karbondioksitin istenilen oranda kalmasına imkan verir, nem oranını sabit kalmasını ve izolasyonu sağlar.



- Esco, Sentinel PLATINUM, Class II Flow kabin

Havayı bir HEPA filtreden geçirir ve çalışma materyallerinin hava kaynaklı toz, partikül ve mikroorganizmalardan korunmasını temiz ortam sağlayarak karşılar.



- Hermle, Z 206 A Santrifüj

Elektrikli motor yardımıyla sabit eksen üzerinde, dairesel dönme hareketi yaparak içerisine yerleştirilen karışımların birbirinden ayrılmasına yarar.



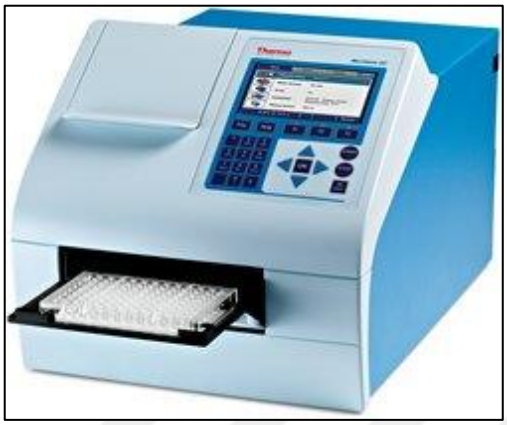
- Zeiss invert mikroskop

Mikroskop hücre ve doku kültürü çalışmalarına uygun özellikte alttan objektifli ve çeşitli büyüklüklerde fokus ayarı olan, örnek görüntüleme cihazıdır.



- Multiskan GO Microplate Spektrofotometre

Örneklerdeki farklı dalga boylarındaki optik yoğunluğu tayin ederek örnekte aranan maddenin miktarı hakkında bilgi verir.



- Thermo Scientific µDrop Plate

2-10µl arası örneklerde optik yoğunluk hesaplaması için kullanılır.



- AriaMx Real-time PCR System

Nükleik asit çoğalmasıyla birlikte artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen cihazdır.



- WNB 29 - Memmert su banyosu

İçerisindeki suyun istenilen sıcaklıkta kalmasını sağlayan ve gerekli aparatlar ile çalkalama özelliği kazandırabilen cihazdır.



- Malvern Zetasizer

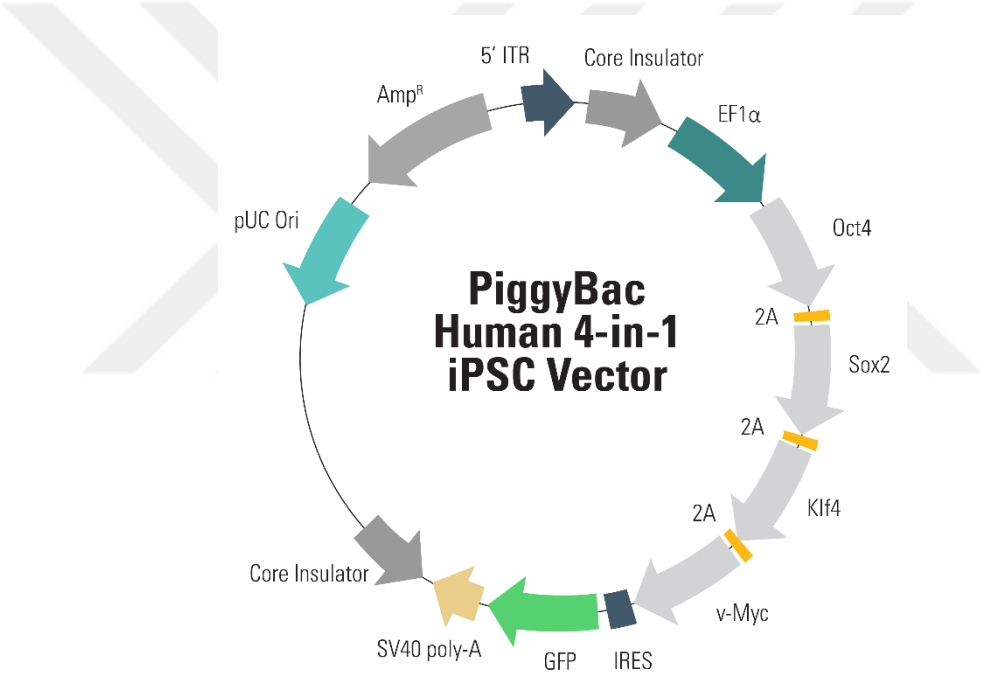
Partiküllerde boyut, elektrik yük ve molekül ağırlığı tayini yapmak için kullanılan cihazdır.



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

Çalışmada fibroblast hücrelerini yeniden programlamak ve pluripotens özellik kazandırmak amacı ile, Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc gen bölgelerini taşıyan, amfisilin antibiyotiğine duyarlı, transfeksiyon veriminin tayini için GFP gen bölgesini de üzerinde bulunduran plazmid tercih edilmiştir. Jellfish Aequorea victoria'dan izole edilen GFP floresan protein in vitro ve in vivo gen aktarımlarında gen ekspresyonunun takibi için kullanılmaktadır.

Plazmi haritası şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.1 Plazmid haritası

Plazmidlerin çoğaltılması ve saflaştırılması için öncelikle bir bakteriye transforme edilmesi gerekmektedir. Plazmid transformasyonu için *E.coli JM109* suşu tercih edilmiştir. Bakteri kültüründen tek koloni alınıp, glikoz içeren LB besiyerine ekim yapılır. Bakteri konsantrasyonu belli bir seviyeye ulaşıncaya kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık olarak 3-4 saat inkübe edilir. 600 nm'deki optik yoğunluğu yaklaşık 0,4-0,5 aralığındayken 2500 g'de +4˚C'de 15 dakika santrifüjlenerek bakteri peleti elde edilir ve

daha sonra elde edilen pelet 1,5 mL TSS (transformation storage solution) çözeltisinde çözülür. *E. coli* çözeltiden 300 µL alınır ve üzerine 20 µL plazmit çözeltisinden ilave edilir. 30 dakika buzda, 90 saniye 42˚ C'de ve daha sonra 2 dakika buzda bekletilir. Üzerine 1 mL LBG çözeltisi ilave edilerek 37˚ C'de 1 saat 250 rpm'de inkübe edilir. 100 µg amfisilin/ mL'de içeren LB agar bulunduran petri kaplarına ekimi yapılır. Antibiyotikli ortamda çoğalan bakteriler vektörü genomunda bulunduran bakterilerdir. Agar üzerinden seçilen koloniler antibiyotiksiz LB ortamında aktarılarak overnight inkübasyona bırakılır. Ertesi gün spektrofotometri ile 625 λ dalga boyunda absorbans değeri ölçülür. 0D625= 0.4-0.6 arası optimal kabul edilmektedir.

Alkali liziz, adsorpsiyon, yıkama, desorpsiyon aşamalarından oluşan saflaştırma işlemi Qiagen Inc® firmasından temin edilen tampon çözeltileri kullanılarak kit prosedürüne göre yapılır. Saflık tayinlerinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak 260/280 optik yoğunluk değerlerine bakılmaktadır.

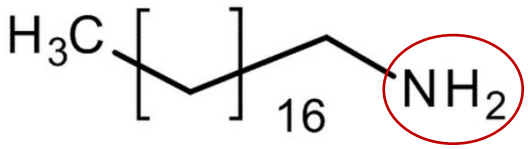
3.5 Plazmidlerin Hücrelere Transfeksiyonu

Başarılı bir transfeksiyon için DNA kalitesi kritiktir. 260/280 nm'de ölçülen absorbans değeri 1.8-2.0 arasında olmalıdır. Büyüme ortamı için besi yeri serumsuz DMEM, RPMI veya diğer besiyerlerinden seçilebilir. L929 hücre hattına transfeksiyon için DMEM besi yeri tercih edilmiştir. Transfeksiyon için, optimum hücre yoğunluğu adherent hücreler için %70-90'dır. Hücreler transfeksiyon anında logaritmik büyüme evresinde olmalıdır. Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc ve GFP genlerini taşıyan plazmidin, fibroblast hücrelerine transfeksiyonu için laboratuvarımızda oktadesilamin bazlı lipid nanopartikül sentezlenmiştir.

3.5.1 Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Katı lipid nanopartiküllerin sentezi, çözücü difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Nano boyutlarda, üzerlerinde yüksek miktarlarda katyonik yük bulunduran partiküller elde edilmiştir. Nanopartikül sentezi için; bir lipid olan ve Şekil 3.2 gösterildiği gibi yapısındaki amin gruplarının protonlanmasıyla pozitif yüklenebilen ve bu sayede DNA ile

elektrostatik etkileşim yardımıyla konjugat oluşturacak Oktadesilamin kullanılmıştır. Katyonik oktadesilamin bazlı nanopartiküller su içerisinde tekli emülsiyon hazırlanarak aşağıda verilen koşullarda üretilmiştir.



Şekil 3.2 Oktadesilamin kimyasal yapısı

Oktadesilamin (0.2 M), kloroform (2 ml) içerisinde çözdürülerek lipid çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti %6'lık Tween 80'nin sulu çözeltisine manyetik karıştırıcı üzerinde 100 µl'lik pipet yardımıyla damla damla damlatılmıştır. Daha sonrasında lipid çözeltisinin sulu faz içerisinde sonik prob altında (%30 ampl., 50sn) homojenize edilmesiyle tekli emülsiyon hazırlanmıştır. Emülsifikasyon sonrası organik çözücünün ortamdan uzaklaştırılması için beherin üzeri alüminyum folya ile kapatılıp delikler açılmış ve manyetik karıştırıcı üzerinde 4 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda nanopartikül çözeltisi santrifüj edilerek sulu faz ortamdan uzaklaştırılmış ve nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküller liyofilizatör yardımıyla kurutularak +4°C'de saklanmıştır.

3.5.2 Plazmidlerin sentezlenen nanopartikül ile hücrelere aktarımı

L929 hücre hattına transfeksiyon için %10 FBS ilaveli DMEM besiyeri ve 6 well plate kullanılmıştır. Hücreler transfeksiyon anında logaritmik büyüme evresinde olması için 24 saat önceden kuyucuklara ekilir. Her bir kuyucuğa 4 mL besiyeri içerisinde $8x10^4$ hücre ekimi yapılarak etüvde overnight inkübasyona bırakılır. Transfeksiyondan bir saat önce serum içeren besiyeri, serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile değiştirilir. Sonrasında her well için 80 µg (80 µl) nanopartikül: 4 µg (8 µl) plazmid DNA olacak şekilde nanopartikül(OLN)-plazmid konjugat çözeltileri hazırlanır. Konjugat çözeltileri 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra kuyulara aktarılır. Transfekte edilmiş hücreler karbondioksit inkübatöründe uygun atmosfer koşullarında 4 saat süre ile plazmid taşıyan nanopartikül ile etkileştirilir. 4 saat sonunda nanopartikül içeren besiyeri

%10 FBS içeren DMEM besiyeri ile değiştirilir. Plate 37°C %5 CO_2 ihtiva eden etüvde inkübasyona bırakılır. Transfeksiyon tayini hücrelerin GFP genini eksprese etmesiyle yaydığı GFP ışıması ile, floresan ataçmanlı inverted mikroskopta 3 gün boyunca takip edilir.

3.6 Plazmid-Nanopartikül Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyon etkinliği, transfekte olan hücrelerdeki plazmid genlerinin transkripsiyonu RT-qPCR yöntemi ve sentezlenen GFP (green fluorescent protein) bağlı proteinlerin varlığı ise floresan mikroskop yöntemiyle 24-72 saat boyunca incelenir.

3.6.1 Floresan mikroskop ile transfekte hücrelerin incelenmesi

Yeşil floresan proteini (GFP) kullanımı yaygınlaşmış raportör genler arasındadır. Eksprese edildiği lokalizasyonda yeşil ışıma saçar. Yeşil floresan protein(GFP) ekspresyonu sağlayan plazmid DNA'ların hücre içine girişi GFP ekspresyonunun floresan atmaçlı invert mikroskop ile 3 gün süreyle takip edilir ve transfeksiyon verimi transfekte olmuş hücrelerin sayımı ile hesaplanır.

3.6.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi

RNA izolasyonu

Transfekte edilen hücrelerden total RNA izolasyonu için kolon temelli GeneJET RNA purification kiti kullanılmıştır. Kullanılan bütün pipet uçları ve ependorf tüpler RNAse free olmalıdır. Hücreler PBS veya tripsinli ortamda kültür plaklarından kaldırılarak alındıktan (1×10^6 hücre) sonra mikrosantrifüj tüplerine alınır 5 dk 250 × g'de santrifüj edilerek supernatant atılır. Elde edilen hücreler 600 µL lizis tampon (14.3M β-mercaptoethanol ya da 2M DTT içeren) eklenerek 10 s vorteklenir. Daha sonra 360 µL etanol (%96-100) eklenip ve pipetlenerek karıştırılır ve bu solüsyondan izolasyon kolonlarına 700 µL alınarak 1 dk ≥12000 × g'de santrifüj edilir. Kolon tarafından tutulan RNA molekülleri 600 µL yıkama solüsyonu I ve 200 µL yıkama solüsyonu II eklenerek

yıkanır, her yıkama aşaması sonrasında 2 dk ≥12000 × g'de santrifüj edilir. RNA moleküllerini kolondan ayırmak için 100 µL su (nükleaz-free) eklenerek 1 dk ≥12000 × g'de santrifüj edilir. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C ya da -70°C'de saklanır.

cDNA eldesi

RNA'dan cDNA eldesi için First Strand cDNA sentez kiti kullanılmıştır. 1 µL dsDNAz tamponuna (10X), 1 µL dsDNAz ve RNA (1 pg – 5 µg) eklenerek 10 µL'ye su (nükleaz-free) ile tamamlanır. Yavaşça çalkalandıktan sonra 2 dk 37°C' de inkübe edilir. Örnek buza alınarak solüsyon II eklenerek (4 µL 5X reaksiyon karışımı, 2 µL enzim karışımı ve 4 µL nükleaz-free su) 10 dk 25°C'de ve 15 dk 50°C'de sornasında 5 dk 85°C'de inkübe edilir. cDNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20°C ya da -70°C'de saklanır.

Kantitatif PCR (RT-qPCR)

cDNA örneklerinden Oct3/4, Sox2, Klf4 ve v-Myc gen bölgeleri, Eun Young ve arkadaşları tarafından kullanılan primerler ile hedeflenmiştir. RT-qPCR reaksiyonu için SYBR Green temelli qPCR kiti kullanılamıştır. Reaksiyonda pozitif kontrol olarak GAPDH mRNA bölgesi hedeflenmiştir.

3.7 Transfekte Hücrelerin Matrijele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi

Özellikle birincil kök hücreler, hücrelerin farklılaşmamış bir halde muhafaza edilebilmesi için spesifik kültür ortam koşulları ile birlikte özel büyüme matrislerinin kullanımını gerektirir. Fare fibroblast hücrelerinden türetilmiş ve Matrigel olarak ticarileştirilmiş jelatinimsi bir protein karışımı, kök hücreleri farklılaşmamış bir halde koruduğu için kök hücreler için bazal membran matrisi olarak kullanılmaktadır. Transfeksiyon sonrası fibroblast hücreleri uyarılmış pluripotent kök hücre oluşumunu desteklemek için tripsin ile plakadan kaldırılarak matrigel ile kaplanmış plate ekilir.

UPK hücreleri için %10 KnockOut Serum ve 1X GlutaMax içeren DMEM-F12 (Dulbecco's modified Eagle's) besiyerinde 10 ng / mL bazik fibroblast büyüme faktörü, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler ve 100 mM b-merkaptoetanol içeren besiyeri hazırlanır.

Matrigel kullanılmadan önce buz üzerinde 2 saat tavlanarak eritilir. 24 well plate ekim için kullanılır. Her bir kuyuya erimiş matrigel 500µl olarak ekilir. 10dk 37˚C'de bekletilir. Transfekte hücreler tripsin ile plakalardan kaldırılarak 2.000rpm 5dk santrifüjlenir. Oluşan supernatant aatılır hücre pelleti üzerine hazırlanan UPK medium 1mL eklenerek pellet çözülür. 10 dk 37˚C'de bekletilen matigel üzerine 1 mL UPK besiyerinde çözülen hücreler yavaşça ekilir. Hücreler, steril koşullar altında 37˚C'de, %5 CO_2 ihtiva eden etüvlerde konflue oluncaya kadar kültüre edilir. Matrijel üzerindeki hücrelerin morfolojik değişimleri 15 gün boyunca invert mikroskop ile takip edilir.

3.8 Upk Hücrelerinin Dialdehit Selüloz Membrana Yüklenmesi

Laboratuvarımızda önceden sentezlenen biyobozunur seluloz-bazlı membranlara (DABS), UPK hücrelerinin yüklenmesi yapılmış ve in-vitro hücre tutunması MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

DAB selüloz bazlı biyobozunur membranlar 1x1 kare şeklinde kesilmiş, 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilir. DABS membranların sterilizasyonu için plaklar 2 saat süre ile UV ışık altında bekletilir. Matrijelden tripsin ie kaldırılan UPK hücreleri 2.000 rpm 5dk santrifüjlenir. Oluşan pellet 1mL UPK medium ile çözülür. DABS membranları üzerine 100µl hacimde yaklaşık 500 UPK hücre ekilir. DABS membranlar 2 saat süre boyunca hücreler ile inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri 500µl'ye tamamlanır. Hücrelerin ekiminden sonra 24 saat sonra DABS membranların üzerine steril PBS ile yıkanmış ve MTT çözeltisi (1:9) içeren taze besi yeri pipetlenir. 24 kuyucuklu plaklar MTT boyası ile 3 saat süre ile etüvde inkübe edilir, inkübasyon sonrası 24 kuyucuklu plaklardaki besi yerleri 96 kuyucuklu plaklara pipetlenir ve 570 nm'de optik yoğunlukları elisa okuyucu kullanılarak tespit edilmektedir.

BÖLÜM 4

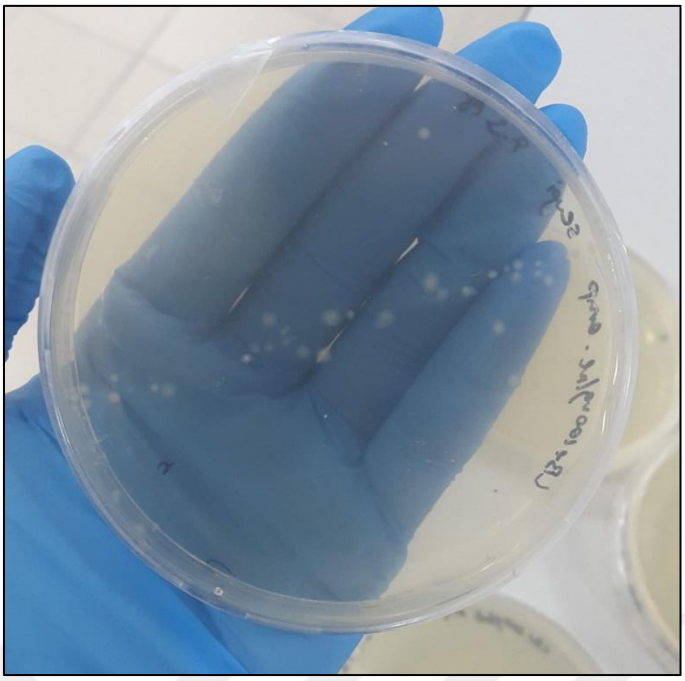
SONUÇ VE ÖNERİLER

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

Çalışmada hücrelere aktarımda kullanılmak üzere, Oct3/4, Sox2, Klf4, v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan, amfisilin antibiyotiğine duyarlı plazmid tercih edilmiştir. Plazmidleri çoğaltmak amacıyla *E.coli JM109* kompetan hücre kullanılmıştır.

E.coli JM109 suşu bakteri kültüründen tek koloni alınıp, glikoz içeren LB besiyerine ekim yapılmıştır. Bakteri konsantrasyonu belli bir seviyeye ulaşıncaya kadar çalkalamalı inkübatörde yaklaşık olarak 4-5 saat inkübe edilmiştir. 600 nm'deki optik yoğunluğu 0,4-0,5 aralığındayken 2500 g'de +4˚C'de 15 dakika santrifüjlenerek bakteri peleti elde edilmiş ve daha sonra elde edilen pelet 1,5 mL TSS (Transformation and Storage Solution) çözeltisinde çözülmüştür. *E.coli* çözeltiden 300 µL alınarak üzerine 20 µL plazmit çözeltisinden ilave edilmiştir. 30 dakika buzda, 90 saniye 42˚ C'de ve daha sonra 2 dakika buzda bekletilmiş, üzerine 1 mL LB besiyeri ilave edilerek 37˚ C'de 1 saat 250 rpm'de inkübe edilmiştir.

100µg/mL amfisilin içeren LB agar bulunduran petri kaplarında koloni oluşumu gözlenmiştir. Seçici besiyerinde çoğalan bakteri kolonileri vektörü genomunda bulundurmaktadır. Şekil 4.1 Seçici besiyerinde çoğalan bakterileri göstermektedir.



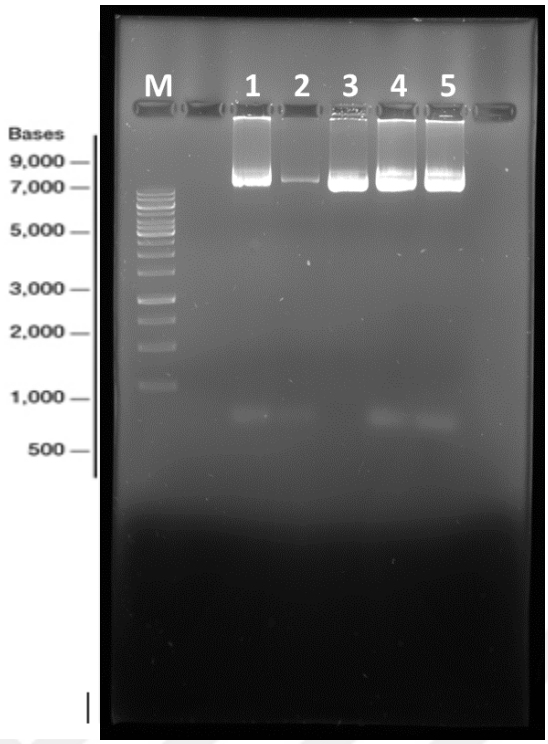
Şekil 4.1 Seçici besiyerinde çoğalan bakterileri kolonileri

Tek koloni olarak bulunan bakterilerden bir koloni seçilerek LB sıvı besi yerine aktarılmış, gece boyunca inkübasyon sonrası spektrofotometre ile 625 nm'de yapılan ölçüm sonucu optik yoğunluğu 1.702 bulunmuştur. Dilue edilen besiyerinin spektofotometre ile yapılan 2. ölçüm sonucu absorbans değeri 0.507 elde edilmiştir.

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

Elde edilen plazmid DNA'lar Thermoscientific mikroDrop ile 260nm ve 280nm dalga boyundaki optik yoğunlukları ölçülmüş, saflık analizi için 260/280 değerleri tespit edilerek DNA saflıkları ve konsantrasyonları hesaplanmıştır. İzole edilen beş plazmidin 260/280 değerleri sırasıyla 1.8, 1.8, 1.9, 2.0, 1.9 olarak bulunmuştur. Tüm izole plazmid örnekleri transfeksiyonda kullanılmaya uygun saflık değerlerindedir.

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



Şekil 4.2 Plazmid DNA agaroz jel görüntüsü

Saflık değerleri ve agaroz jel görüntüleri değerlendirilen plazmitler transfeksiyon çalışmalarında kullanılmaya uygun bulunmuştur

4.1 Nanopartikül Ve Nanopartikül/Plazmit Dna Konjugatlarının Yük Ve Partikül Boyutlarının Ölçülmesi

Çalışmada gen transferinde kullanılması amacıyla lipid yapıda katyonik nanopartiküller sentezlenmiştir. Yapının pozitif yüklü olması negatif yüklü DNA ile etkileşerek transfeksiyonda avantaj sağlayacağı düşünülmüştür. Elde edilen nanopartikül ve nanopartikül/plazmit DNA konjugatlarının Zeta-Sizer (Malvern) ölçümleri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Oktadesilamin nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyeli

OLN	Oktadesilamin	Tween 80	Parçacık Boyutu (nm)	Polydispersity index	Zeta Potansiyel (mV)
OLN 12	% 0.125	% 3	493.0±21.44	2.78±0.12	22.8±2.37
OLN 14	% 0.125	% 6	158.0±20.36	0.307±0.10	23.1±0.781
OLN 23	% 0.125	% 6	139,5±26,03	0.276±0.018	36.2±0.352
OLN 28	% 0.125	% 6	100.3±7.302	0.367±0.0	19.9+1.56
OLN 32	% 0.125	% 6	118.3±3.05	0.421±0.02	29.7±3.16

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

OLN-DNA Konjugat	OLN	DNA	Parçacık Boyutu (nm)	Polydispersity index	Zeta Potansiyel (mV)
Konjugat 1	25 µg (OLN 14)	1 µg DNA	408.2±31.1	0,276±0.11	2.64±0.0
Konjugat 2	15 µg (OLN 28)	1 µg DNA	404.2±8.20	0.420±0.09	0.530±0.28
Konjugat 3	40 µg (OLN 32)	1.2 µg DNA	200.7±14.05	0.275±0.04	0.44±0.27

Nanopartikülden 100 µg/mL distile su içerisinde stok çözeltiler hazırlanmıştır. 25 ºC'de ZetaSizer (Malvern, NanoZS) cihazı kullanılarak boyutları ve yükleri ölçülmüştür.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi nanopartiküller oda koşullarında pozitif yüklüdür. Bilindiği üzere plazmit DNA ise negatif yüklüdür. Nanopartikül/plazmid DNA konjugatları ise nanopartikülün pozitif yüküne ve nanopartikül/plazmit oranına göre farklı yüklenmektedir. Nanopartikülün yükü yüksek olduğunda konjugat pozitif

yüklenmektedir, düşük olduğunda negatif yüklendiği gözlenmiştir. Ayrıca nanopartikül/plazmid DNA konjugatında nanopartikül oranı yüksek olduğunda konjugat pozitif yüklenirken, nanopartikül oranı azaltıldığında konjugat negatif yüklenmektedir.

OLN12 katyonik nanopartikülünde tween 80 miktarı %3 iken bu oran OLN14 nanopartikülünde 2 katına çıkarıldığında nanopartikül boyutu 1/3 oranında küçültülmüştür. OLN23 nanopartikülünde, partikül boyutlarını küçültmek amacıyla santrifüj işleminde yüksek rpm değerinde çöktürme yapılarak büyük boyutlu nanopartiküller ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylece monosize yapılı nanopartiküller elde edilmiştir. OLN28 ve OLN32 nanopartiküllerde parçacık boyutunu daha da küçültmek için sonik probun çalıştırılma süresi 40 sn'den 50 sn'ye uzatılmıştır.

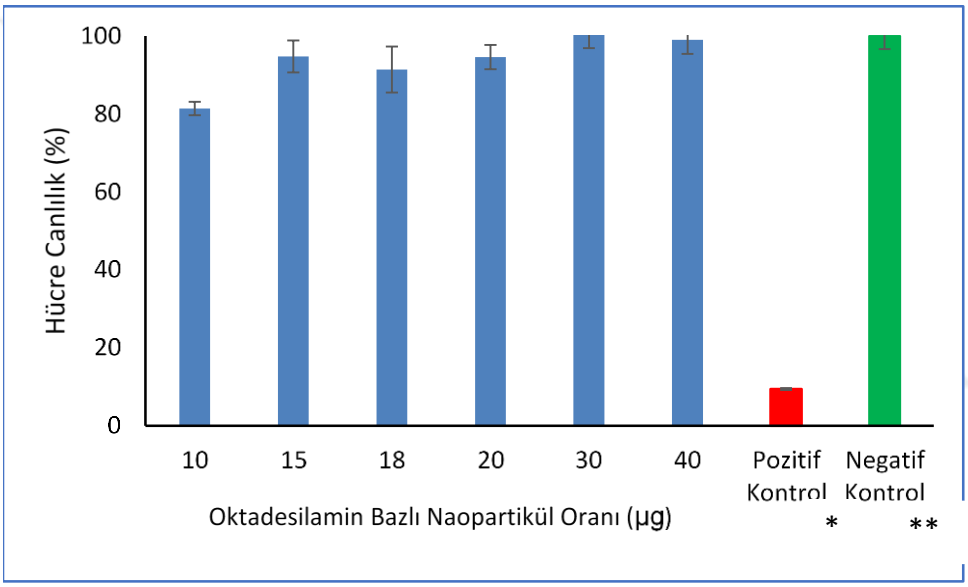
Gen aktarımında konjugatın negatif yüklü hücre zarını geçebilmesi için pozitif yüklü olması gerekmektedir. Plazmit DNA/nanopartikül kompleksinin transfeksiyon verimliliğinin yüksek olabilmesi için boyutun küçük olması ve zeta potansiyelinin yüksek pozitif değerde olması beklenir. Bu çalışmada Çizelge 4.1'de gösterilen ve boyutu 118.3±3.05 nm, zeta potansiyeli 29.7±3.16 mV olan OLN 32 nanopartikülü kullanılmıştır.

Demirbilek ve arkadaşları (2017) vitaminD3 Yüklü katı lipid nanopartiküller sentezlemiş, yaptıkları analizler ile sentezlenen ve D3 vitamini yüklenen nanopartiküllerin zeta potansiyelin -9.37 ± 2.04 ve -28.13 ± 1.21 arasında değerler olarak ölçmüştür. Praveen ve arkadaşları (2013) 116.3 ± 4.3-137.6 ± 6.23 nm arasında partikül büyüklüğüne sahip stearik asit nanopartikülleri üretmiştir. Fàbregas ve arkadaşları (2014) DNA'ya iyi bağlanması için gerekli özelliklerini korurken, oktadesilamin ve yüzey aktif maddenin neden olduğu muhtemel toksik etkileri azaltmak için kullanılan materyal miktarını en aza indirerek Katı Lipid Nanopartikül (KLN) bileşimini optimize etmeye çalışmışlardır. Bu hedef, 600 mg oktadesilamin ve 100 mg Poloksamer 188 içeren formülle elde etmiştir. KLN'lerin en az miktarda bileşen kullanıldığında insan hücrelerine sitototoksisistesinin olmadığını ve DNA bağlama kapasitesinin etkilediğini göstermişlerdir [94]. Çalışmada

125 mg oktadesilamin ile OLN hazırlanarak bileşen miktarı daha aza indirilmiş ve DNA bağlama kapasitesinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir.

4.1.1 OLN in vitro sitotoksisitesinin değerlendirilmesi

OLN'nin, L929 fibroblast hücreleri üzerindeki in-vitro sitotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda alınan OLN ile L929 hücreleri üzerinde MTT deneyi yapılmıştır. 96 well plate üzerinde beş tekrarlı gerçekleştirilen deney için her kuyuya 100.00 hücre ekilmiş üzerlerine farklı konsantrasyonlarda OLN ile 24 saat boyunca etkileştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3'de verildiği gibidir.



Şekil 4.3 Oktadesilamin Bazlı Lipid Nanopartikül in-vitro ortamda sitotoksisite sonuçları

(*) Pozitif kontrol olarak %1 DMSO, (**) negatif kontrol olarak DMEM besi yeri kullanılmıştır.

Tez kapsamında yapılan MTT test sonuçlarında (Şekil 4.3) negatif kontrolün 570 nm'de ölçülen optik absorbans değeri %100 hücre canlılığı olarak alınmıştır. Buna göre 100.000 L929 fibroblast hücresi ile yapılan MTT analizinde hücrelerin 24 saat boyunca, 10 µg OLN ile etkileştirildiğinde %81, 15 µg OLN ile etkileştirildiğinde %94, 18 µg OLN ile etkileştirildiğinde %91, 20 µg OLN ile etkileştirildiğinde %94, 30 µg OLN ile etkileştirildiğinde %100, 40 µg OLN ile etkileştirildiğinde %98 hücre canlılığı tespit

edilmiştir. OLN'nin 40 µg kullanımına kadar hücreler üzerinde toksik etki bulundurmadığı belirlenmiştir.

Sentezlenen nanopartiküller ile literatürde çeşitli sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. Gordon ve arkadaşları (2008) gümüş nanopartiküllerin HaCat (insan keratinosit) ve HeLa (insan adenokarsinoma) hücreleri üzerinde yaptıkları deney gümüş partiküllerle etkileştirilen HACAT hücrelerinin %51.8, HELA hücrelerinin ise %56.4 canlılıkla sağ kaldıklarını göstermiştir. Battaglia ve arkadaşları (2015) kanser tedavisinde kullanılan ticari bir ilaç olan bevacizumab yüklü katı lipid nanopartiküllerin 72 saat sonrasında HUVEC (İnsan Umblikal Ven Endotel Hücreleri) hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksisitesini incelemiştir. 72 saat boyunca, 5uM ve 0.5 uM bevacizumab yüklü katı lipit nanopartiküller HUVEC hücrelerinde %50 ve %30'luk sağkalım sağlayarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Wightman ve arkadaşları (2001) konjugatlardaki pozitif yükün, negatif yüklü DNA ile etkileşmesi sonrası azalmasıyla hücreler üzerindeki toksisitesinin de azaldığını belirtmiştir.

4.2 Saflaştırılan Plazmidlerin L929 Fibroblast Hücre Hattına Transfeksiyonu

4.2.1 Nanopartikül ile Transfeksiyon

Aktarım için 6 well plate kullanılmış, transfeksiyondan bir gün önce her kuyuya 4mL %10 FBS içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium içerisinde $8x10^4$ hücre ekimi yapılarak etüvde overnight inkübasyona bırakılmıştır.

Serum proteinlere bağlanarak transfeksiyon veriminin ve gen ekspresyonunun düşmesine sebep olduğu için transfeksiyonda serumsuz besiyeri tercih edilmiştir. Transfeksiyondan bir saat önce serum içeren besiyeri, serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile değiştirilmiştir. Her well için 80µg (80 µl) nanopartikül: 4 µg (8 µl) plazmid DNA ile pcr tüpleri içinde etkinleştirilerek nanopartikül-plazmid konjugat çözeltileri hazırlanmış ve konjugat çözeltileri 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kuyulara aktarılmıştır. Hücreler karbondioksit 37°C de %5 CO_2 ihtiva eden inkübatörde 4

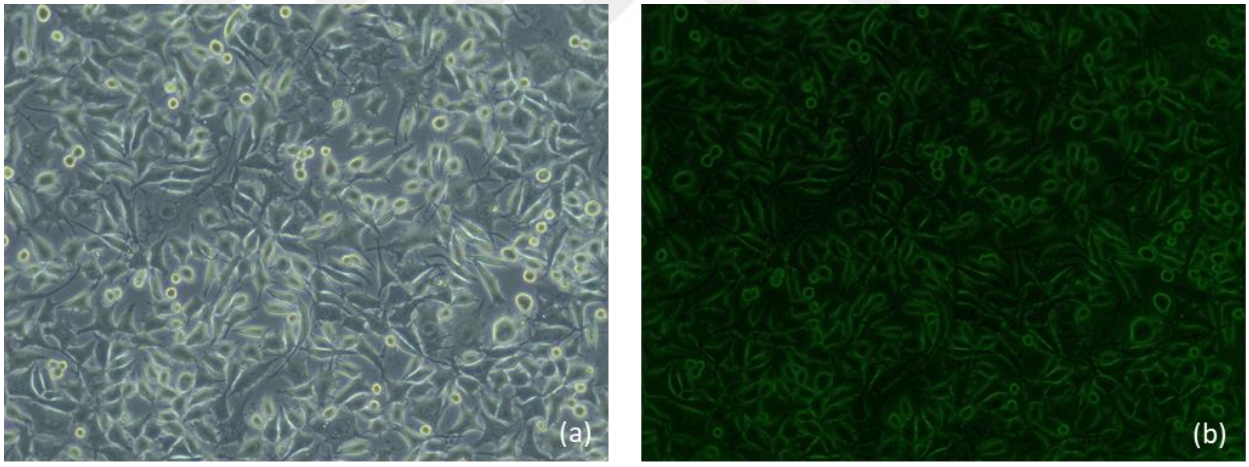
saat süre ile plazmid taşıyan nanopartikül ile etkileştirilmiş, 4 saat sonunda nanopartikül içeren besiyeri %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile değiştirilmiştir.

4.3 Plazmid Konjugatlarının Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

4.3.1 Transfeksiyon Sonrası GFP Işımasının Takip Edilmesi

Gen aktarımının başarılı olarak değerlendirilebilmesi için taşıyıcı vektörün geni hücrelere aktarması ve genin hücrede eksprese olarak istenilen proteini sentezlemesi gerekmektedir. Gen ekspresyonunun takibi plazmit üzerinde bulunan GFP gen bölgesinin hücrelerde eksprese olmasıyla takip edilir.

Floresan mikroskop ile takip edilen hücrelerde GFP ekspresyonunun 24. saatte en fazla olduğu saptanmıştır. Şekil 4.4 transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin 24. Saatte çekilmiş faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.4 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri

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

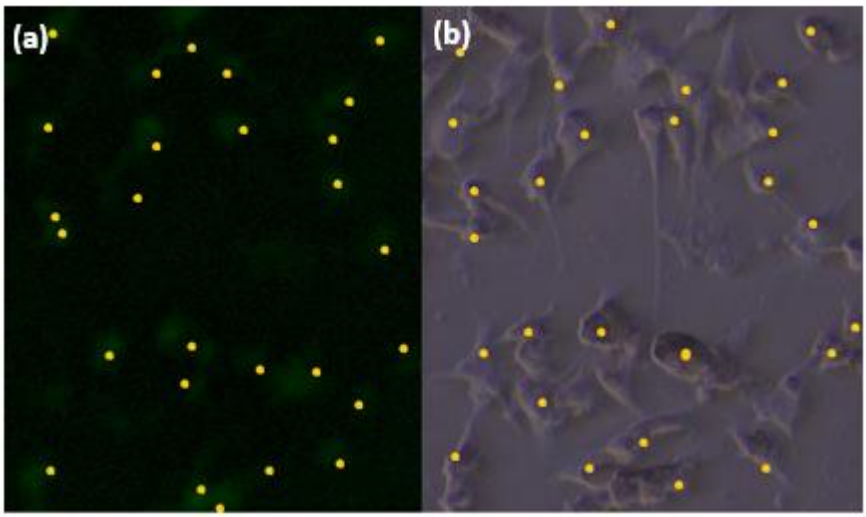
Yapılan literatür taramasında Godbey ve arkadaşları (2001) Endotel hücre hattının transfekte edilmesi için poli (etilenimin) (PEI) kullanılmıştır. PEI/Plazmit DNA komplekslerinin transfeksiyon verimini %10 olarak bulunmuş iken, polikatyonik peptid

mellitin ile kovalent olarak bağlanan mellitin/PEI/Plazmit DNA komplekslerinin gen ekspresyon oranı %40 olarak hesaplanmıştır. Prabha ve arkadaşları (2004) PLGA bazlı nanopariküllerin MCF-7 (insan meme kanseri) ve PC-3 (insan prostat kanseri) hücre hatlarına transfeksiyon için kullanmıştır. DNA'nın sıkı bir şekilde bağlandığını ve komplekslerin aktarımdan 3 gün sonra ayrılarak hücreleri transfekte ettiğini belirtmiştir.

Bu çalışmada Üç gün boyunca takip edilen GFP ekspresyonu 24.saatte %75, 48. saatte %72, 72. saatte %60 olduğu saptanmıştır. Üç gün boyunca invert mikroskop alınan floresan mikroskop ve faz konstrast görüntüleri üzerinden yapılan hücrele sayımı ile transfeksiyon verimi hesaplanmıştır. Mikroskop görüntüleri üzerinde üç farklı bölgede üç tekrar ile yapılan sayım ile transfeksiyon verimi formül 1 kullanılarak hesaplanmıştır. OLN ile üç tekrarlı yapılan gen aktarımı sonuçlarının (%75, %75, %66) ortalaması alınarak L929 fibroblast hücrelerin tranfeksiyon verimi %72 olarak bulunmuştur. Transfekte hücrelerin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7' de verilmiştir.

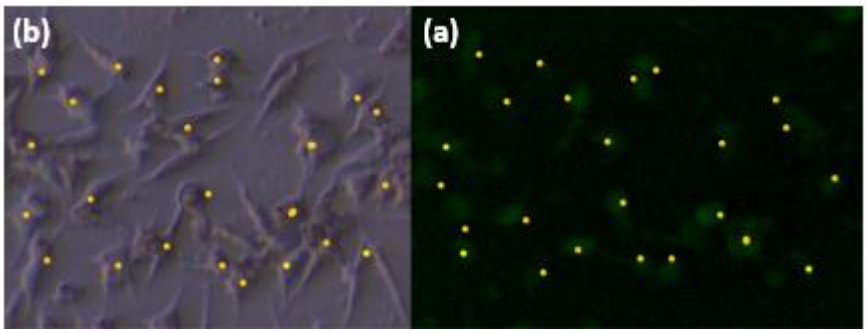
Formül 1:

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



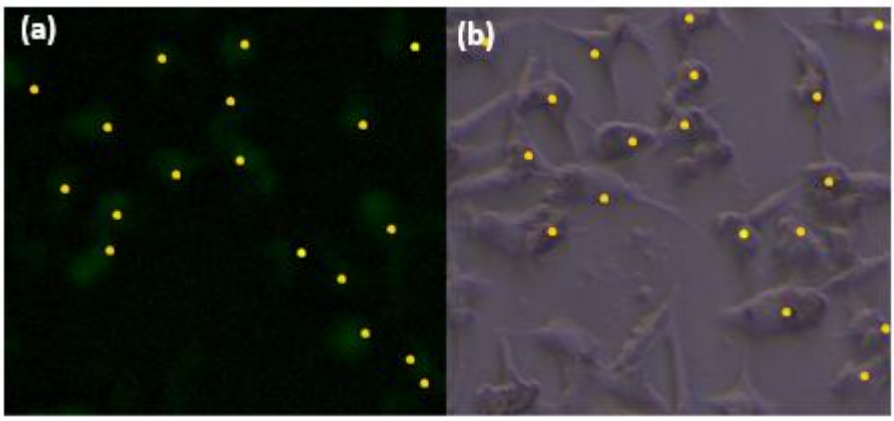
Şekil 4.5 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri

(a): Floresan mikroskop 10x büyütme(b): Faz kontrast 10x büyütme



Şekil 4.6 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri

(a): Floresan mikroskop 10x büyütme(b): Faz kontrast 10x büyütme



Şekil 4.7 Transfekte edilen L929 Fibroblast hücrelerinin faz kontrast ve floresan mikroskop görüntüleri

(a): Floresan mikroskop 10x büyütme(b): Faz kontrast 10x büyütme

4.3.2 mRNA seviyelerinin belirlenmesi

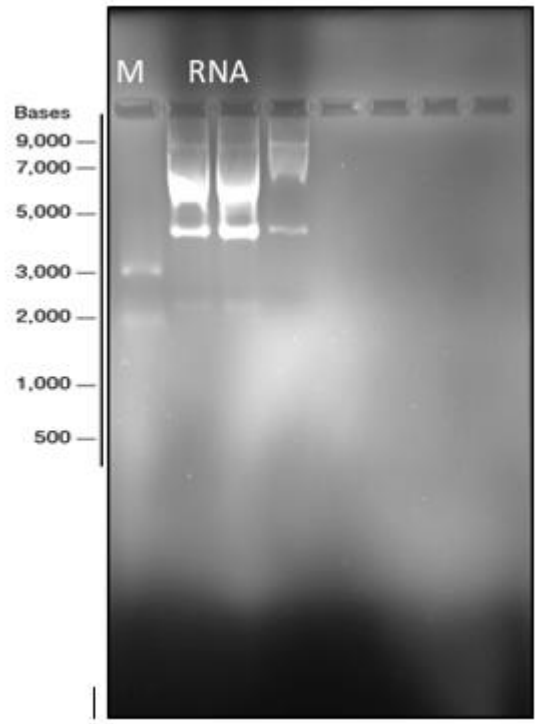
Transfekte hücrelerden kolon temelli GeneJET RNA purifikasyon kiti presedürüne göre total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen mRNA'lar mikroDrop plate üzerine 3 µl alınarak 230nm, 260nm ve 280nm optik yoğunlukları ölçülmüş, saflık ve konsantrasyon tayini yapılmıştır. Negatif örnek olarak distile su kullanılmış, iki tekrarlı yapılan ölçümün ortalaması alınarak sonuçlar hesaplanmıştır. RNA saflık analizi için, 260/280 ve 260/230 oranları hesaplanmalıdır. Saf olarak değerlendirilen nükleik asitlerde 260/280 oranı genellikle ~1.8, DNA ve RNA için 260/280 oranı ~2.0 olması verimli olarak değerlendirilir. İkinci bir ölçüt olarak 260/230 oranının 1.8-2.2 aralığında olması saf olarak değerlendirilir. Elde edilen mRNA'lar (Thermo scientific) mikroDrop plate üzerinde 3 µL ile yapılan optik yoğunluk tayini yapılmıştır. mRNA konsantrasyonu formül 2 ile hesaplanır.

Formül 2:

RNA konsantrasyonu (µg/mL) = OD260 x 100 (dilüsyon faktörü) x 40 µg/mL

mRNA 260/280 değeri 2.1, 260/230 değeri 2.1 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre izole mRNA'lar uygun saflıkta bulunmuştur.

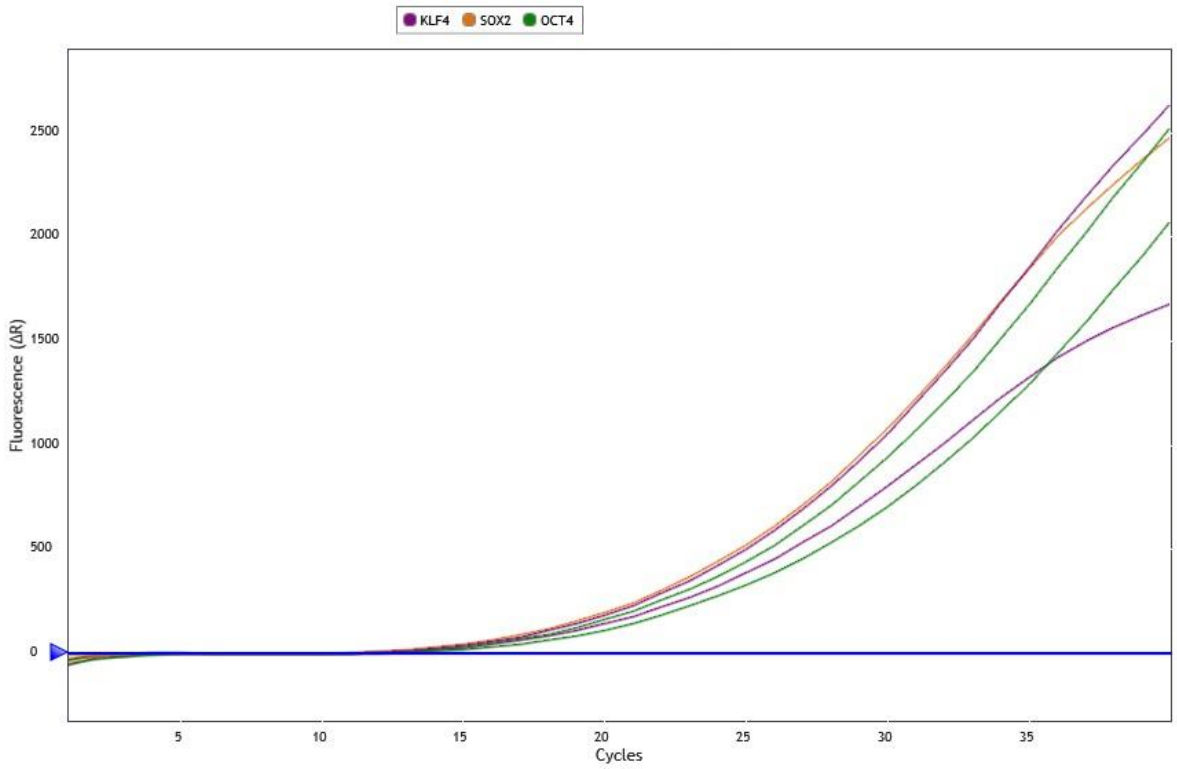
Elde edilen mRNA örnekleri ikincil tayin için %1.5'luk jelde 70V 1 saat süreyle yürütülmüştür. Jel görüntüsü Şekil 4.8'de verildiği gibidir.



Şekil 4.8 mRNA jel görüntüsü

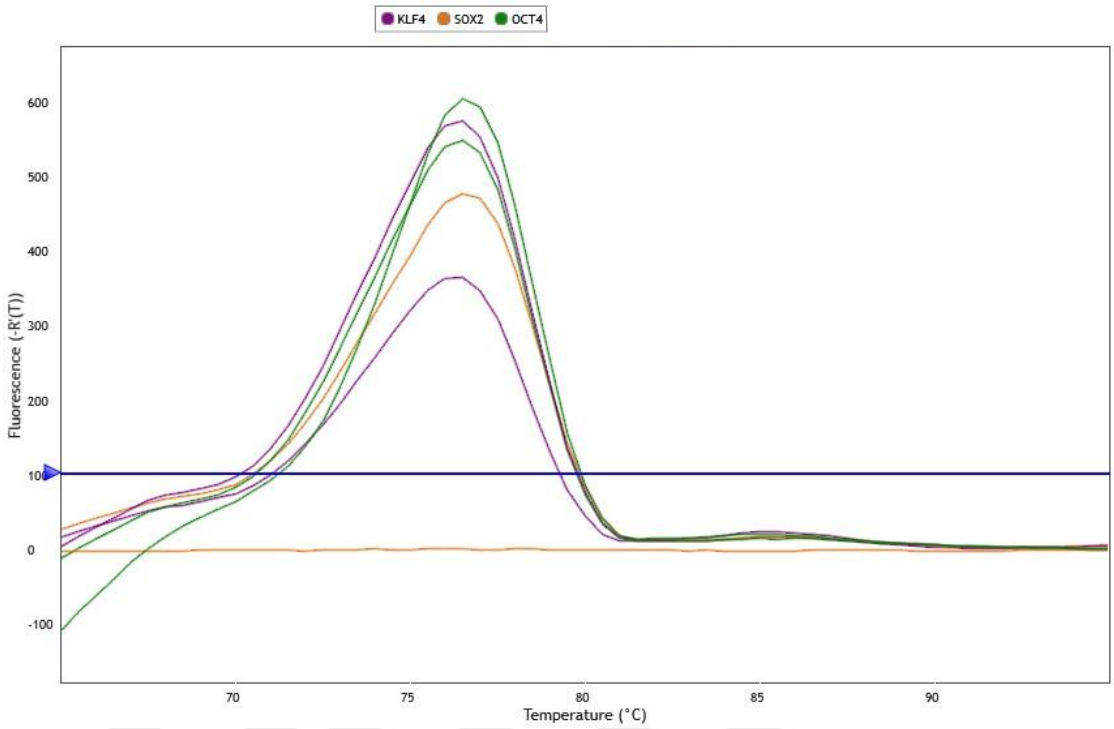
4.3.3 cDNA eldesi ve RT-qPCR

Elde edilen mRNAlardan Thermo Scientific First Strand cDNA sentez kiti presedürüne uygun olarak cDNA sentezlenmiştir. Klf4, Oct4, Sox2 gen bölgeleri, özel primer çiftleri ve SYBR Green temelli qPCR kiti ile Real-Time PCR(AriaMx) cihazında iki tekrarlı çoğaltılarak analiz edilmiştir. Pozitif kontrol için GAPDH mRNA bölgesi hedeflenmiştir. Amplifikasyon grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. Mrna düzeyinde ekprese olan KLF4, OCT4 ve SOX2 gen bölgelerinin Şekil 4.10'da erime grafiği verilmiştir.



Şekil 4.9 Klf4(Turuncu) , Sox2(Mavi), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri amplifikasyon grafiği

Gen bölgelerinin ikili tekrarları aynı renklerle gösterilmiştir. Mavi ile gösterilen çizgi eşik değer çizgidir. Klf4 (Ct ort: 14,9) , Sox2 (Ct ort: 13,9), Oct4 (Ct ort:15,5) gen bölgelerinde 13. döngüden sonra artış gözlenmiştir. Şekil 4.9'da verilen amplifikasyon grafiği yeniden programlama faktörleri olan Klf4, Oct4, Sox2 transfekte hücrelerde mRNA düzeyinde eksprese olduğunu göstermektedir.

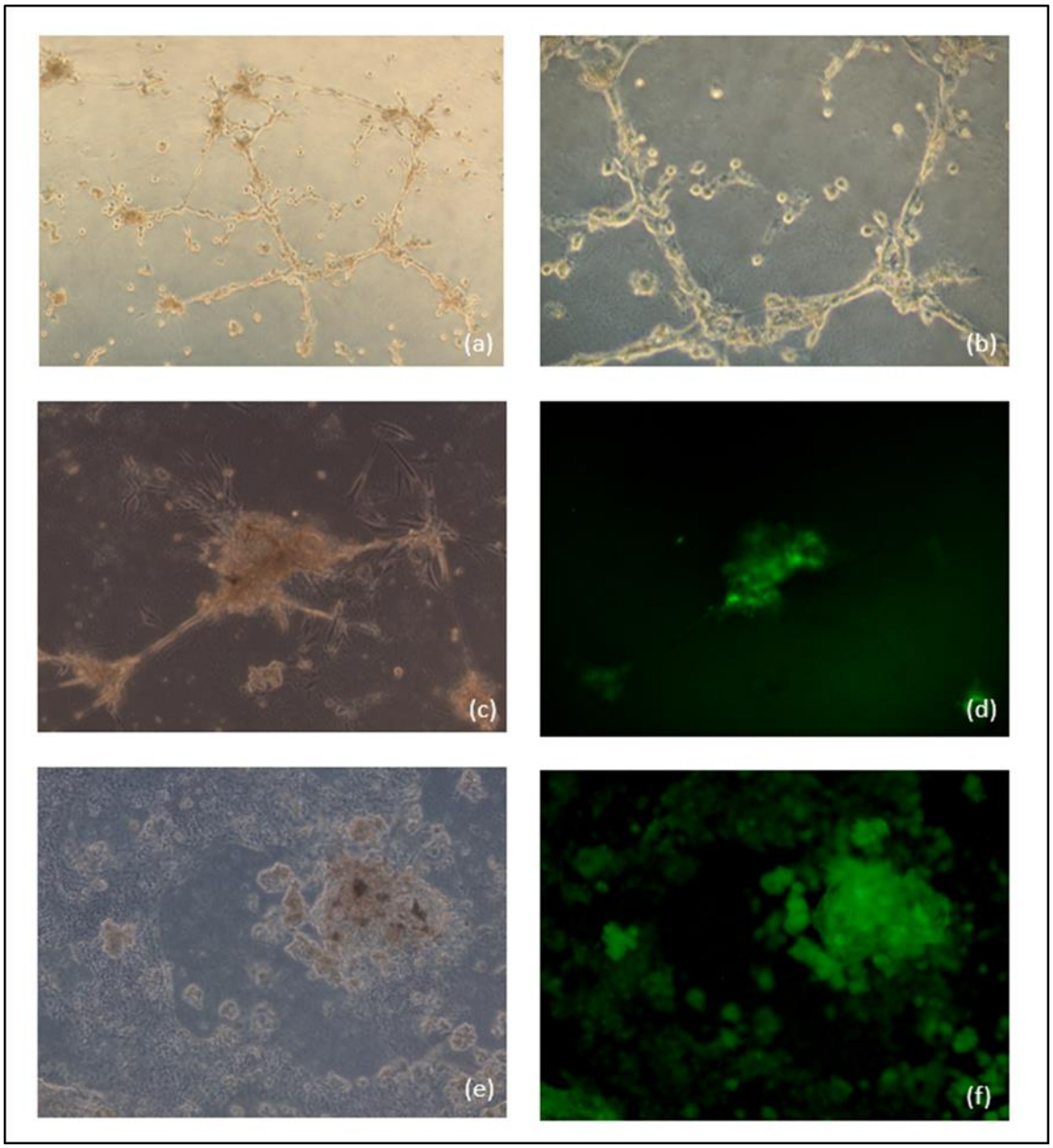


Şekil 4.10 Klf4(Turuncu) , Sox2(Mavi), Oct4(Yeşil) gen bölgeleri erime eğrisi

Klf4 , Sox2, Oct4 genlerinin erime sıcaklığı (Tm) 76.5 °C olarak saptanmıştır. Grafikte oluşan tek pik, amplifikasyonda tek bir ürünün çoğaldığını göstermektedir.

4.4 Transfekte Hücrelerin Matrigele Aktarımı Ve Upk Hücrelerinin Elde Edilmesi

Matrijel üzerine aktarılan transfekte hücrelerdeki morfolojik değişimler 15 gün boyunca invert mikroskop altında incelenmiştir. Hücrelerde matrijele aktarım sonrası 24. Saatten itibaren başlayan kolonileşme eğilimi gözlenirken GFP ekspresyonunun devam ettiği floresan atmaçlı invert mikroskop ile tayin edilmiştir. 15. Günde hücrelerde daha yuvarlak ve bağımsız koloni oluşumları tespit edilmiştir. Literatürde yapılan UPKH çalışmalarında benzer fotoğraflara rastlanmıştır. Şekil 4.12'de 15 gün boyunca matrijel üzerinde hücrelerin morfolojik değişimleri fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.11 Oct4, Sox2, Klf4 v-Myc ve GFP gen bölgelerini taşıyan plazmid ile konjuge edilmiş oktadesilamin bazlı nanopartikül (OLN) ile transfekte edilmiş L929 Fibroblast hücrelerin matrigel üzerindeki mikroskop görüntüleri

(a): 1. Gün (5x Faz kontrast)

(b): 4. Gün (5x Faz kontrast)

(c): 7. Gün (10x Faz kontrast)

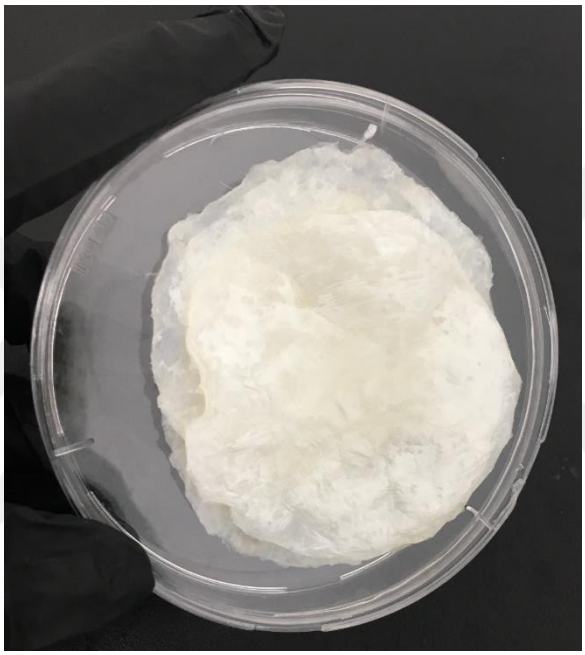
(d): 7. Gün (10x floresan mikroskop)

(e): 15. Gün (10x Faz kontrast)

(f): 15. Gün (10x floresan mikroskop

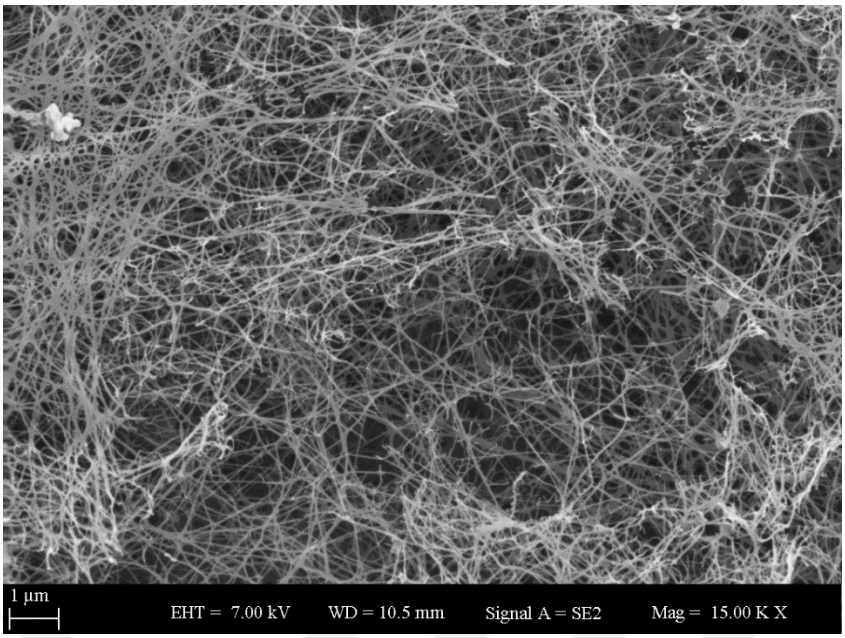
4.5 UPK Hücrelerinin Dialdehit Selüloz Membrana Yüklenmesi

UPK hücrelerinin membrana yüklenmesi için, önceki çalışmalarda elde edilen DABS membranlar 1x1 kare şeklinde kesilmiş ve UV ile 2 saat steril edilmiştir. Şekil 4.13'de Dialdehit bakteriyal selüloz membran gösterilmektedir.



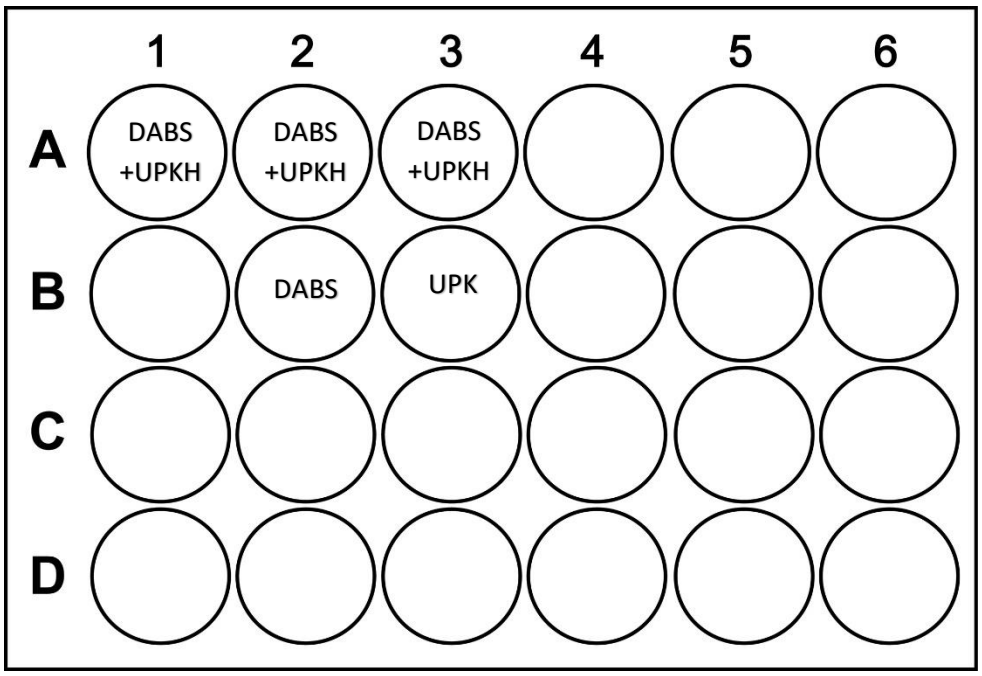
Şekil 4.12 Dialdehit bakteriyal selüloz membran

Selüloz membranların morfolojisi ve mikroyapıları taramalı 1.500 büyütme ile elektron mikroskobu kullanılarak karakterize edilmiştir. Elektron mikroskobunda alınan görüntü Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.13 Selüloz membran elektron mikroskop görüntüsü

UPK hücrelerinin DABS membrana yüklenmesinin ardından hücrelerin membrana tutunma oranının belirlenmesi için steril edilen membranlar plate üzerinde 4 kuyuya yerleştirilerek üzerlerine 500µl besiyeri içerisinde UPK hücreleri eklilmiştir. Plate yapılan ekim şekil 4.15'de gösterildiği gibidir.

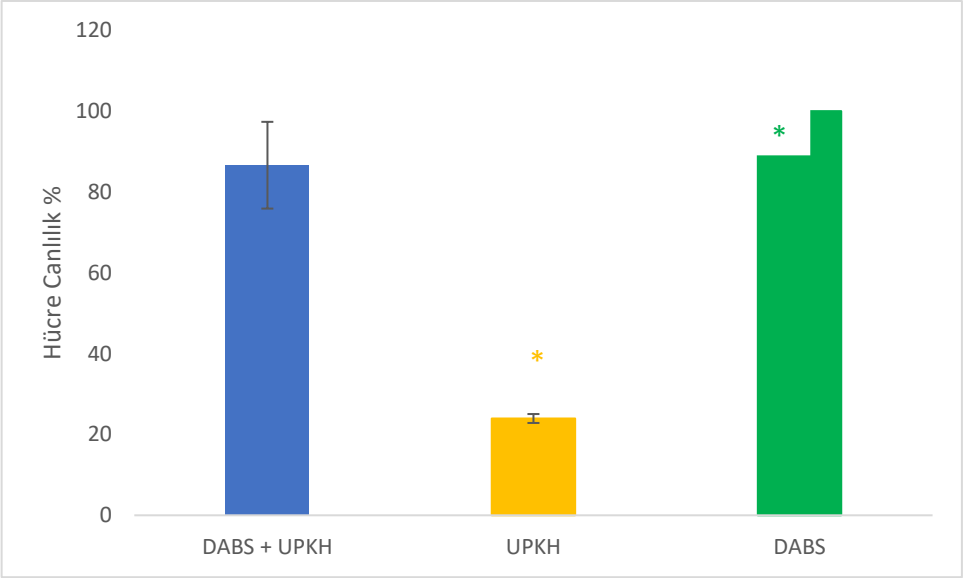


Şekil 4.14 DABS membranlarda UPK hücre tutunması analizi için hazırlanan 24 well plate

A1, A2, A3 kuyuları DABS membran ve UPK hücre içermektedir. 2B kuyunda yalnızca DABS membran, 3B kuyusunda yalnızca UPKH hücreleri bulunmaktadır.

Matrijelden tripsin ile kaldırılan UPK hücreleri 2.000 rpm 5dk santrifüj edildi ve üzerine 2mL medium eklenerek pellet çözüldü. 2B kuyusu hariç her kuyuya 500 µL hücre ekildi ve 37°C'de %5 CO_2 İhtiva eden etüvde 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonrasında DABS membranların üzerine steril PBS ile yıkanmış ve MTT çözeltisi (1:9) içeren taze besi yeri pipetlendi. 24 kuyucuklu plaklar MTT boyası ile 3 saat süre ile etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 24 kuyucuklu plaklardaki besi yerleri 96 kuyucuklu plaklara aktarılmış ve 570 nm'de optik yoğunlukları elisa okuyucu kullanılarak tespit edilmiştir.

Yapılan ölçümler sonucu DABS membranlar üzerindeki UPKH tutunma oranları hesaplanmıştır.



Şekil 4.15 DABS membran üzerinde UPK hücrelerinin tutunması

Pozitif kontrol (*) olarak UPK hücreleri, negatif kontrol (*) olarak DABS membran kullanılmıştır.

MTT test sonuçlarına şekil 4.16'e göre; DABS membran üzerindeki hücre tutunması % 86,6 (standart hata = ± 0,08) olarak belirlenmiştir.

4.6 Tartışma

Günümüzde hala pek çok hastalık mekanizması tam olarak açıklanamadığından uygun tedavilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yavaş ilerlemektedir. Kök hücreler, hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasında ve klinik olarak tedavilerde kullanılması için üstesinden gelinmesi gereken bazı zorluklar vardır. Bunlardan en önemlisi embriyonik kök hücrelerin tüm hücre çeşitlerine dönüşebilme potansiyeli ve yeni tedaviler için kullanımına karşın ortaya çıkan etik sorunlar ve politik tartışmalardır. Bilim adamları, gelişen teknolojiyi ve gen aktarım yöntemleri kullanılarak kök hücreler gibi davranacak şekilde yeniden programlanmış olan uyarılmış pluripotent kök hücreleri embriyonik kök hücreler elde etmişlerdir. Hücrelerin yeniden programlanmasını sağlayan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin hücrelere aktarımında genellikle viral yöntemler tercih edilmektedir.

Bu çalışmada amacımız yeniden programlama faktörlerinin, bağ doku hücrelerinden olan L929 fibroblast hücrelerine aktarmı için oktadesilamin bazlı non-viral taşıyıcı sentezlenmek ve hücrelerin gen transferi ile uyarılmış kök hücreye dönüşümlerini sağlamaktır. Oktadesilamin, yağ asidi özelliğinde olması ve içerdiği amin grubunın yapıya kazandırdığı pozitif yük nedeniyle tercih edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin Zeta-Sizer ile yapılan ölçüm sonrası boyutları 118.3±3.05 nm, elektrik yükü 29.7±3.16 mV olarak bulunmuştur. L929 fibroblast hücre hattı ile yapılan sitotoksisite çalışmasında 40 µg/mL konsantrasyona kadar hücre canlılığının korunduğu ve hücreler üzerinde toksik bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.

Hücrelere gen taşınımı için uygun görülen nanopartiküller, yeniden programlama faktörleri olan Klf4, Sox2, Oct4, v-Myc üzerinde bulunduran plazmid DNA'sı ile etkileştirilerek L929 fibroblast hücrelerinin transfeksiyonunda kullanılmıştır. İnvert mikroskop ile takip edilen hücrelerde yapılan sayım sonrası transfeksiyon verimi %72 olarak hesaplanmıştır.

Transfekte edilen hücrelerin özel büyüme ortamı ile matrigel üzerine aktarılmasını takiben 15.güne kadar hücrelerde morfolojik değişimler gözlenmiştir. Bu sonuçlara

dayanarak, yüksek transfeksiyon verimi ve toksik etki bulundurmayan oktadesilamin bazlı katyonik nanopartiküllerin gelecek çalışmalarda gen aktarımı için ve yeniden programlama ile uyarılmış pluripotent kök hücrelerin eldesinde kullanılmak için etkili bir araç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Lindvall, O. ve Kokaia, Z., (2006). "Stem cells for the treatment of neurological disorders", nature, 441: 1094.

[2] Urban, V.S. Kiss, J. Kovacs, J. Gocza, E. Vas, V. Monostori, Ė. ve Uher, F., (2008). "Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes", Stem cells, 26: 244-253.

[3] Sugaya, K. Alvarez, A. Marutle, A. Kwak, Y. ve Choumkina, E., (2006). "Stem cell strategies for Alzheimer's disease therapy", Panminerva medica, 48: 87-96.

[4] Weissman, I.L., (2000). "Stem cells", Cell, 100: 157-168.

[5] Kansu, E., (2005). "Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar", Hacettepe Tıp Dergisi, 36: 191-197.

[6] KÖSE, O. ve ÖZDOĞAN, S., (2010). "Epidermal Kök Hücreler ve Klinik Kullanımları", Turkiye Klinikleri Journal of Dermatology, 20: 74-80.

[7] Güran, Ş. ve Çoban, Z., (2012). "The use of induced pluripotent stem cells in medicine", Erciyes Medical Journal, 34: 184-187.

[8] TÜRKŞEN, K., "İnsan Embriyonik Kök Hücreleri İzolasyon, İdame ve Farklılaşma (diferansiyasyon)".

[9] Takahashi, K. ve Yamanaka, S., (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", Cell, 126: 663-676.

[10] Piao, Y. Hung, S.S.-C. Lim, S.Y. Wong, R.C.-B. ve Ko, M.S., (2014). "Efficient Generation of Integration‐Free Human Induced Pluripotent Stem Cells From Keratinocytes by Simple Transfection of Episomal Vectors", Stem cells translational medicine, 3: 787-791.

[11] Hu, K., (2014). "All roads lead to induced pluripotent stem cells: the technologies of iPSC generation", Stem cells and development, 23: 1285-1300.

[12] Lundstrom, K., (2003). "Latest development in viral vectors for gene therapy", Trends in biotechnology, 21: 117-122.

[13] Bilousova, G. ve Roop, D.R., (2013). Generation of functional multipotent keratinocytes from mouse induced pluripotent stem cells, ed. Molecular Dermatology. Springer, 337-350.

[14] Raab, S. Klingenstein, M. Liebau, S. ve Linta, L., (2014). "A comparative view on human somatic cell sources for iPSC generation", Stem cells international, 2014.
[15] Kim, E.Y. Jeon, K. Park, H.Y. Han, Y.J. Yang, B.C. Park, S.B. Chung, H.M. ve Park, S.P., (2010). "Differences between cellular and molecular profiles of induced pluripotent stem cells generated from mouse embryonic fibroblasts", Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells"), 12: 627-639.
[16] Tekeli, S. Arısu Naghavi, E. Gökçe, B. Sır, G. Yiğittürk, G. Çavuşoğlu, T. ve Uyanıkgil, Y., (2016). "Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları".
[17] Oliveira, L.R. de Castilho Fernandes, A. ve Ribeiro-Silva, A., (2011). Stem cells and cancer stem cells, ed. Cancer Stem Cells-The Cutting Edge. InTech.
[18] Health, N.I.o., (2009). "Stem cell basics", Stem Cell Information, available at http://stemcells. nih. gov/info/basics/basics6. asp.
[19] Biyolojisi, C.A.K.H., (2014). "Türleri ve Tedavide Kullanımları", Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Akademisyen A.
[20] Reya, T. Morrison, S.J. Clarke, M.F. ve Weissman, I.L., (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells", nature, 414: 105-111.
[21] Avcılar, H. Saraymen, B. Özturan, O.Ö. ve Köker, M.Y., (2017). "Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells", Asthma Allergy Immunology.
[22] Zabala, M. Lobo, N. Qian, D. van Weele, L. Heiser, D. Clarke, M. Liu, H. ve Lathia, J., (2016). Overview: Cancer Stem Cell Self-Renewal: Elsevier Cambridge, MA, USA.
[23] Ateş, U., (2016). "Kök hücreyi tanıyalım".
[24] Knoblich, J.A., (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division", Cell, 132: 583-597.
[25] Martin-Rendon, E. ve Watt, S.M., (2003). "Stem cell plasticity", British journal of haematology, 122: 877-891.
[26] Strauss, R. Hamerlik, P. Lieber, A. ve Bartek, J., (2012). "Regulation of stem cell plasticity: mechanisms and relevance to tissue biology and cancer", Molecular Therapy.
[27] Hiyama, E. ve Hiyama, K., (2007). "Telomere and telomerase in stem cells", British journal of cancer, 96: 1020-1024.
[28] Cheung, T.H. ve Rando, T.A., (2013). "Molecular regulation of stem cell quiescence", Nature reviews Molecular cell biology, 14: 329-340.
[29] Kolios, G. ve Moodley, Y., (2013). "Introduction to stem cells and regenerative medicine", Respiration, 85: 3-10.
[30] Kahan, B.W. ve Ephrussi, B., (1970). "Developmental Potentialities of Clonal In Vitro Cultures of Mouse Testicular Teratoma 2", Journal of the National Cancer Institute, 44: 1015-1036.
[31] Evans, M.J. ve Kaufman, M.H., (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos", nature, 292: 154-156.
[32] Thomson, J.A. Itskovitz-Eldor, J. Shapiro, S.S. Waknitz, M.A. Swiergiel, J.J. Marshall, V.S. ve Jones, J.M., (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts", science, 282: 1145-1147.

[33] Coles‐Takabe, B.L. Brain, I. Purpura, K.A. Karpowicz, P. Zandstra, P.W. Morshead, C.M. ve Van der Kooy, D., (2008). "Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies", Stem cells, 26: 2938-2944.
[34] Young, R.A., (2011). "Control of the embryonic stem cell state", Cell, 144: 940-954.
[35] McLaren, A., (2001). "Ethical and social considerations of stem cell research", nature, 414: 129-131.
[36] Hurlbut, W.B., (2007). "Ethics and Embryonic Stem Cell Research", BioDrugs, 21: 79-83.
[37] Ng, T.K. Pelaez, D. Fortino, V.R. Greenberg, J. ve Cheung, H.S., (2013). Pluripotent Adult Stem Cells: A Potential Revolution in Regenerative Medicine and Tissue Engineering, ed. Pluripotent Stem Cells. InTech.
[38] Kondo, M. Wagers, A.J. Manz, M.G. Prohaska, S.S. Scherer, D.C. Beilhack, G.F. Shizuru, J.A. ve Weissman, I.L., (2003). "Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application", Annual review of immunology, 21: 759-806.
[39] Ramathal, C. Pera, R.R. ve Turek, P., (2011). Embryonic stem cells and the germ cell lineage, ed. Embryonic Stem Cells-Basic Biology to Bioengineering. InTech.
[40] Fortier, L.A., (2005). "Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications", Veterinary Surgery, 34: 415-423.
[41] Kalra, K. ve Tomar, P., (2014). "Stem Cell: Basics, Classification and Applications", Am. J. Phytomdicine Clin. Ther: 919-930.
[42] Rodriguez, A.-M. Elabd, C. Amri, E.-Z. Ailhaud, G. ve Dani, C., (2005). "The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells", Biochimie, 87: 125-128.
[43] Phinney, D.G. ve Prockop, D.J., (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views", Stem cells, 25: 2896-2902.
[44] Miki, T. ve Strom, S.C., (2006). "Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells", Stem cell reviews, 2: 133-141.
[45] Wagers, A.J. ve Weissman, I.L., (2004). "Plasticity of adult stem cells", Cell, 116: 639-648.
[46] Ko, K. Tapia, N. Wu, G. Kim, J.B. Bravo, M.J.A. Sasse, P. Glaser, T. Ruau, D. Han, D.W. ve Greber, B., (2009). "Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells", Cell stem cell, 5: 87-96.
[47] Kalra, K. ve Tomar, P., (2014). "Stem Cell: Basics, Classification and Applications", American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 27: 919-930.
[48] Bhartiya, D. Nagvenkar, P. Sriraman, K. ve Shaikh, A., (2013). An overview of pluripotent stem cells, ed. Pluripotent Stem Cells. InTech.
[49] Yeo, R.W.Y. ve Lim, S.K., (2011). Embryonic Stem Cells for Therapies–Challenges and Possibilities, ed. Embryonic Stem Cells-Basic Biology to Bioengineering. InTech.
[50] Poon, E. Kong, C.-w. ve Li, R.A., (2011). Human Pluripotent Stem Cells in Cardiovascular Research and Regenerative Medicine, ed. Embryonic Stem Cells-Differentiation and Pluripotent Alternatives. InTech.

[51] Rippon, H. ve Bishop, A., (2004). "Embryonic stem cells", Cell proliferation, 37: 23-34.
[52] Tanabe, K. ve Takahashi, K., (2011). The Past, Present and Future of Induced Pluripotent Stem Cells, ed. Embryonic Stem Cells-Differentiation and Pluripotent Alternatives. InTech.
[53] Singh, V.K. Kalsan, M. Kumar, N. Saini, A. ve Chandra, R., (2015). "Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery", Frontiers in cell and developmental biology, 3: 2.
[54] Lin, C. Zhong, Z. Lok, M.C. Jiang, X. Hennink, W.E. Feijen, J. ve Engbersen, J.F., (2007). "Novel bioreducible poly (amido amine) s for highly efficient gene delivery", Bioconjugate chemistry, 18: 138-145.
[55] Gascón, A.R. del Pozo-Rodríguez, A. ve Solinís, M.Á., (2013). Non-viral delivery systems in gene therapy, ed. Gene Therapy-Tools and Potential Applications. InTech.
[56] Fumoto, S. Kawakami, S. Hashida, M. ve Nishida, K., (2013). Targeted gene delivery: importance of administration routes, ed. Novel Gene Therapy Approaches. InTech.
[57] Zhang, Y. Satterlee, A. ve Huang, L., (2012). "In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles?", Molecular Therapy, 20: 1298-1304.
[58] Kotterman, M.A. ve Schaffer, D.V., (2014). "Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy", Nature Reviews Genetics, 15: nrg3742.
[59] Giacca, M. ve Zacchigna, S., (2012). "Virus-mediated gene delivery for human gene therapy", Journal of controlled release, 161: 377-388.
[60] Crystal, R.G., (2014). "Adenovirus: the first effective in vivo gene delivery vector", Human gene therapy, 25: 3-11.
[61] Lentz, T.B. Gray, S.J. ve Samulski, R.J., (2012). "Viral vectors for gene delivery to the central nervous system", Neurobiology of disease, 48: 179-188.
[62] Mingozzi, F. ve High, K.A., (2013). "Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy", Blood, 122: 23-36.
[63] Weitzman, M.D. ve Linden, R.M., (2012). Adeno-associated virus biology, ed. Adeno-Associated Virus. Springer, 1-23.
[64] Le, H.T. Rao, G.A. Hirko, A.C. ve Hughes, J.A., (2010). "Polymeric nanoparticles containing conjugated phospholipase A2 for nonviral gene delivery", Molecular pharmaceutics, 7: 1090-1097.
[65] Walter, W. ve Stein, U., (2000). "Viral vectors for gene transfer a review of their use in the treatment of human disease", Drugs, 60: 249-271.
[66] Günel Özcan, A., "Gene Therapy and Biosafety", Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, 64: 35-50.
[67] Yang, N., (2012). "Nonviral gene delivery system", International journal of pharmaceutical investigation, 2: 97.
[68] Prausnitz, M.R. Mikszta, J.A. Cormier, M. ve Andrianov, A.K., (2009). Microneedle-based vaccines, ed. Vaccines for Pandemic Influenza. Springer, 369-393.
[69] Salem, A.K. Searson, P.C. ve Leong, K.W., (2003). "Multifunctional nanorods for gene delivery", Nature materials, 2: 668.

[70] Gehl, J., (2003). "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research", Acta Physiologica, 177: 437-447.
[71] Ramamoorth, M. ve Narvekar, A., (2015). "Non viral vectors in gene therapy-an overview", Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 9: GE01.
[72] Laçin, N.T. ve Kızılbey, K., (2016). Nanoparticles as Nonviral Transfection Agents, ed. Handbook of Nanoparticles. Springer, 891-921.
[73] Sachlos, E. ve Czernuszka, J., (2003). "Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds", Eur Cell Mater, 5: 39-40.
[74] Kristensen, J. ve Karsdal, M., (2016). Elastin, ed. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin. Elsevier, 197-201.
[75] Karapınar-Kazandağ, M. Bayrak, Ö. Yalvaç, M. Ersev, H. Tanalp, J. Şahin, F. ve Bayırlı, G., (2011). "Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells", International endodontic journal, 44: 626-634.
[76] Ersöz, M., (2007). İnsan meme kanseri (MCF 7) ve fare fibroblast (L-929) hücre kültürlerinde poliakrilik asidin toksisitesinin incelenmesi, ed^eds.: YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
[77] EKMEKÇİ, P. ve BOSTANCI, S., (2002). "Yara iyileşmesi", Turkiye Klinikleri Journal of Dermatology, 12: 114-120.
[78] Anderson, J.M., (2013). Inflammation, wound healing, and the foreign-body response, ed. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition. Elsevier Inc.
[79] Guo, S.a. ve DiPietro, L.A., (2010). "Factors affecting wound healing", Journal of dental research, 89: 219-229.
[80] KURTOĞLU, A.H., (2009). "YARA TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR: MODERN YARA ÖRTÜLERİ".
[81] Kahraman, E. Demirci, E.A. Tanyolaç, Z.G. Yaralı, Z.B. ve Karaman, O., "RGD Peptid Dizisinin in vitro Yara İyileşme Modelinde Kullanım Etkinliğinin Belirlenmesi The efficacy of using RGD Peptide Sequence on in vitro Wound Healing".
[82] Paul, W. ve Sharma, C.P., (2004). "Chitosan and alginate wound dressings: a short review", Trends Biomater Artif Organs, 18: 18-23.
[83] Bulu, H. Morkavuk, B. ve Koyuncu, A., (2012). "PİLONİDAL SİNÜS CERRAHİSİ SONRASI SEKONDER YARA İYİLEŞMESİNDE LİYOFİLİZE TİP I KOLLAJEN MATRİKS KULLANIMI İLE KONVANSİYONEL TEDAVİNİN ETKİNLİĞİNİN", CEP, 41: 48.
[84] Jayakumar, R. Prabaharan, M. Kumar, P.S. Nair, S. ve Tamura, H., (2011). "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications", Biotechnology advances, 29: 322-337.
[85] KOYUTÜRK, A. ve SOYASLAN, D.D., (2016). "Yara ve Yanık Tedavisinde Kullanılan Örtüler", Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi: 58-65.
[86] Laçin, N.T., (2014). "Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing", International journal of biological macromolecules, 67: 22-27.
[87] Pires, A.L.R. ve Moraes, Â.M., (2015). "Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the

addition of a biocompatible silicone rubber", Journal of Applied Polymer Science, 132.

[88] Jin, S.G. Yousaf, A.M. Kim, K.S. Kim, D.W. Kim, D.S. Kim, J.K. Yong, C.S. Youn, Y.S. Kim, J.O. ve Choi, H.-G., (2016). "Influence of hydrophilic polymers on functional properties and wound healing efficacy of hydrocolloid based wound dressings", International journal of pharmaceutics, 501: 160-166.

[89] Dhivya, S. Padma, V.V. ve Santhini, E., (2015). "Wound dressings–a review", Biomedicine, 5.

[90] Boateng, J.S. Matthews, K.H. Stevens, H.N. ve Eccleston, G.M., (2008). "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review", Journal of pharmaceutical sciences, 97: 2892-2923.

[91] Payne, W.G. Posnett, J. Alvarez, O. Brown-Etris, M. Jameson, G. Wolcott, R. Dharma, H. Hartwell, S. ve Ochs, D., (2009). "A prospective, randomized clinical trial to assess the cost-effectiveness of a modern foam dressing versus a traditional saline gauze dressing in the treatment of stage II pressure ulcers", Ostomy/wound management, 55: 50.

[92] Hoffman, A.S., (2012). "Hydrogels for biomedical applications", Advanced drug delivery reviews, 64: 18-23.

[93] Mozalewska, W. Czechowska-Biskup, R. Olejnik, A.K. Wach, R.A. Ulański, P. ve Rosiak, J.M., (2017). "Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique", Radiation Physics and Chemistry, 134: 1-7.

[94] Fàbregas, A. Sánchez-Hernández, N. Ticó, J.R. García-Montoya, E. Pérez-Lozano, P. Suñé-Negre, J.M. Hernández-Munain, C. Suñé, C. ve Miñarro, M., (2014). "A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid", International journal of pharmaceutics, 473: 270-279.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hanife Sevgi VARLI

Doğum Tarihi ve Yeri : 24.09.1993, SAMSUN

Yabancı Dili : İngilizce, Çince

E-posta : hsevgivarli@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

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

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017	Yıldız Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı	Kısmi zamanlı asistan öğrenci

YAYINLARI

Bildiri

1. Varlı, H. S., Turkoglu, L. N (2018) ‘‘Fibroblast Hücrelerinden Oktadesilamin Lipid-Bazlı Non-Viral Taşıyıcı Kullanılarak Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin Elde Edilmesi’’ 3. Yaşam Bilimleri Kongresi, 23-24 Şubat, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye