

EMRE ŞEFİK ÇAĞLAR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

HUNTINGTON HASTALIĞI'NIN TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE BİYOTEKNOLOJİK İLAÇ
İÇEREN FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI,
İN VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

EMRE ŞEFİK ÇAĞLAR

DANIŞMAN
PROF. DR. ERDAL CEVHER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2021

BEYAN



İTHAF

Destekleri her daim yanımda olan kıymetli aileme ve kurtarılmayı bekleyen tüm
çocuklara ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca yanımda olan ve bilgilerini cömertçe benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Erdal Cevher'e, akademik hayatım boyunca bana annelik, ablalık ve en çok da hocalık yapan, beni büyüten ve bilgilerini cömertçe benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Neslihan Üstündağ Okur'a, her daim yanımda olduğunu hissettiren kıymetli hocam Doç. Dr. Mehmet Evren Okur'a, tez çalışmalarımın en önemli kısımlarından olan polimer sentez ve analizlerinde bana vaktini ayıran ve bilgisini paylaşan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Saadet Kevser Pabuccuoğlu'na, Doç. Dr. Mehmet Koray Gök'e ve değerli Büşra Eker Fidan'a, hücre kültürü çalışmalarımда emeklerini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya ve Ezgi Keske'ye, deney hayvanlarında yaptığım çalışmalarda benden emeklerini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a, Dr. Öğr. Üye. Burak Çağlayan'a, Arş. Gör. Serdar Altunay'a ve Mehmet Özgen Altıntaş'a, bana kitap okumayı öğreten, her derdimde yanımda olan ve bana vizyon katan değerli ağabeyim Ecz. Eyüp Süzgün'e, çok kıymetli dostum, yol arkadaşım ve dert ortağım Ecz. Z. Sümeyye Özkul'a, beni her zorlukta destekleyen dostum Ecz. Büşra Aşar'a, her şekilde yanımda olan, neşesi ile tüm dertleri unutturan kıymetli arkadaşım Dr. Sevilay Sitrava'ya, kıymetli arkadaşlarım Ecz. Hüseyin Kaymak'a, Ecz. A. Emre Işık'a, Ecz. Salim Onur Turunç'a, Ecz. Güray Öztürk'e, maddi ve manevi her şekilde yanımda olan çok kıymetli dostum, yol arkadaşım Av. Mehmet Emin Uçbağlar'a ve bu zorlu süreçte bir gün olsun desteklerini esirgemeyen canım annem Şükran Çağlar'a, kıymetli babam Mustafa Çağlar'a ve biricik ablam Bilge Şen'e sonsuz teşekkür ederim

Bu çalışma, TÜBİTAK 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 217S628

İÇİNDEKİLER

DOKTORA TEZİ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XXİİ
ÖZET	XXİV
ABSTRACT.....	XXV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	26
2. GENEL BİLGİLER	27
2.1. Beyin Yapısı ve Fonksiyonları.....	27
2.2. Beyne İlaç (Gen) Hedeflendirme	28
2.2.1. Beyin Bariyerleri.....	28
2.2.1.1. Beyne İlaç Taşıma Stratejileri	29
2.3. Nanopartiküller	34
2.4. Huntington Hastalığı ve Genetik Temelleri	39
2.4.1. Huntington Hastalığı'nın Klinik Değerlendirmesi.....	41
2.4.2. Huntington Hastalığı'nda Kullanılan Terapötikler	43
2.4.2.1. Mevcut Terapötikler	43
2.4.2.2. Deneysel Terapötikler	44
2.5. siRNA'nın Farmakolojik Özellikleri ve Etki Mekanizması	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler	50
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	51
3.2. Yöntem ve Deneyler	52
3.2.1. Polimer Sentezi	52
3.2.1.1. Kitozanın PEGlenmiş Aminli Bileşiklerinin Sentezi	52

3.2.1.2. Poli Beta Aminoester Polimerlerinin Sentezi	56
3.2.1.3. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılacak Polimerlerin N-metil D-Aspartik Asit (NMDA) ile Modifikasyonu.....	74
3.2.2. Sentezlenen Polimerlerin Karakterizasyonu	83
3.2.2.1. Polimerlerin Molekül Ağırlığının Tayini	83
3.2.2.2. Polimerlerin Yapısal Özelliklerinin Tayini	84
3.2.2.3. Termal Analizler	85
3.3. Formülasyon Çalışmaları	85
3.3.1. siRNA Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması	85
3.3.2. siRNA Yüklü Poli Beta Aminoester Nanopartiküllerinin Hazırlanması	89
3.3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	106
3.3.3.1. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımının İncelenmesi	106
3.3.3.2. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerinin Yüzey Yüklerinin İncelenmesi	106
3.3.3.3. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerinin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	106
3.3.4. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerin Stabilite Çalışmaları	107
3.3.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları	110
3.3.6. Yüklü Nanopartiküllerin Serum Stabilitelerinin İncelenmesi.....	113
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	114
3.4.1. Sitotoksikite Çalışmaları	114
3.4.2. Hücrelerin htt Ekspresyon Vektörü ile Transfeksiyonu.....	115
3.4.3. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin htt Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması	117
3.4.4. Western Blottlama ile Hücrelerde Ekspresyon Tayini.....	119
3.5. Flow Sitometri Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hedef Hücrelerdeki Reseptörlere Bağlanma Çalışmaları.....	122
3.6. <i>İn Vivo</i> Çalışmalar.....	123
3.6.1. Huntington Hastalığı Hayvan Modeli	125
3.6.1.1. Vücut Ağırlığı Tayini	126
3.6.1.2. Tail Suspension Testi	126
3.6.1.3. Rotarod Testi	127
3.6.1.4. Open Field Analizleri	128
3.6.1.5. Fare Beyinlerinin Çıkarılması ve Analizler için Beyin Kesitlerinin Alınması	129

3.7. qRT-PCR ile Ekspresyon Tayini	131
3.8. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi	132
4. BULGULAR.....	133
4.1. Polimer Sentezine Ait Bulgular	133
4.2. Sentezlenen Polimerlerin Karakterizasyonu Bulguları	133
4.2.1. Polimerlerin Molekül Ağırlığının Tayini Bulguları.....	133
4.2.2. Polimerlerin Yapısal Özelliklerinin Tayini Bulguları.....	134
4.2.2.1. Fourier Transform Infrared Spektrofotometresiskopisi (FTIR).....	134
4.2.2.2. Nükleer Manyetik Rezonans (HNMR ve CNMR) Bulguları.....	152
4.2.3. Termal Analizler	168
4.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	173
4.3.1. Boş ve siRNA Yüklü Nanopartiküllerinin Hazırlanmasına Ait Bulgular.....	173
4.3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular	173
4.3.2.1. Boş ve siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	195
4.3.3. Boş ve siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları	199
4.3.3.1. Liyofilizasyon Çalışması için Formülasyonlara İlave Edilmesi Gereken Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu ve Stabilité Çalışmaları	200
4.3.3.2. Liyofilize Toz Formülasyonların % Nem Tayinine Ait Bulgular	236
4.3.4. Agaro Jel Elektroforez Çalışmalarına Ait Bulgular	236
4.3.5. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Serum Stabilitelerinin İncelenmesine ait Bulgular.....	241
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	251
4.4.1. Sitotoksisite Çalışmaları	252
4.4.2. Hücrelerin htt Ekspresyon Vektörü ile Transfeksiyonu.....	258
4.4.3. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin htt Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması	261
4.4.4. Western Blottlama ile Hücrelerde Ekspresyon Tayini.....	270
4.5. Flow Sitometri Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hedef Hücrelerdeki Reseptörlere Bağlanma Çalışmaları.....	278
4.6. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	282
4.6.1. Huntington Hastalığı Hayvan Modeli	288
4.6.1.1. Vücut Ağırlığı Tayini	288
4.6.1.2. Tail Suspension Testi	290

4.6.1.3. Rotarod Testi.....	291
4.6.1.4. Open Field Analizleri.....	292
4.6.1.5. qRT-PCR ile Ekspresyon Tayini.....	293
5. TARTIŞMA.....	296
5.1. Genel Değerlendirme.....	296
5.2. Polimer Sentezi ve Sentezlenen Polimerlerin Karakterizasyonu.....	296
5.3. Formülasyon Çalışmaları.....	304
5.3.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	304
5.4. Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları.....	307
5.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....	309
5.6. Nanopartiküllerin Serum Stabilitesi Çalışmaları.....	309
5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	311
5.8. Flow Sitometri Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hedef Hücrelerdeki Reseptörlere Bağlanma Çalışmaları.....	314
5.9. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	315
5.10. Sonuç.....	318
KAYNAKLAR.....	319
ETİK KURUL KARARI.....	334
PATENT HAKKI İZNİ.....	335
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	337
ÖZGEÇMİŞ.....	346

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: PEGli ve PEGlenmemiş boş kitozan nanopartiküllerinin hazırlama metodu...	85
Tablo 2: NMDA ile modifiye edilmiş ve edilmemiş ürünlerden hazırlanan nanopartikül formülasyonları.....	87
Tablo 3: PBAE _{BAEDED} nanopartiküllerinin hazırlanma yöntemi	91
Tablo 4: PBAE _{BAEDPA} nanopartiküllerinin hazırlama yöntemi.....	95
Tablo 5: PBAE _{HDAAP} , PBAE _{DEGDAAP} , PBAE _{PEGDMEDA} , PBAE _{PEGDMEDA-2} , PBAE _{PEGEDA} , PBAE _{PEGAP} , PBAE _{PEGDTA} , PBAE _{PEGMAP} , PBAE _{PEGAP-2} , PBAE _{PEGAP-3} , PBAE _{PEGAP-4} nanopartiküllerinin hazırlama metodu	100
Tablo 6: PBAE esaslı nanopartikül formülasyonlarının içerikleri ve formülasyon parametreleri.....	103
Tablo 7: PBAE esaslı nanopartikül formülasyonlarının vortex ile hazırlanması için kullanılan parametreler	104
Tablo 8: siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş PBAE nanopartikül formülasyonlarının içerik miktarları ve hazırlama parametreleri	106
Tablo 9: qRT-PCR reaksiyon koşulları	118
Tablo 10: PCR cycle değerleri.....	124
Tablo 11: Modifiye kitosan ve PBAE ürünlerine ait molekül ağırlığı sonuçları.....	133
Tablo 12: Modifiye kitosan ve PBAE ürünlerine ait molekül ağırlığı sonuçları.....	133
Tablo 13 : PBAE polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları.....	135
Tablo 14 : Chi, K2, PEG, PEG-K2 polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları.....	136
Tablo 15: Chi-GA, K1, PEG, PEG-K1 polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları.....	137
Tablo 16: Chi-GA, K3, PEG, PEG-K3 polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları.....	138
Tablo 17: K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG) ve K1-PEG-NMDA (Chi-GA-DAPC-PEG-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu	140
Tablo 18: K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ve K2-PEG- NMDA (Chi- HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu	143

Tablo 19: K3-PEG (Chi-GA-HE-EDA-PEG) ve K3-PE- NMDA (Chi-GA-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu	146
Tablo 20: D1 (PBAE _{BAEDED}) ve D1-NMDA (PBAE _{BAEDED} -NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu	149
Tablo 21: F1 (PBAE _{BAEDAP}) ve F1-NMDA (PBAE _{BAEDAP} -NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu	151
Tablo 22: D1 ve D1-NMDA ürünlerine ait ¹ H-NMR açıklamaları	157
Tablo 23: F1 ve F1-NMDA ürünlerine ait ¹ H-NMR açıklamaları	159
Tablo 24: F2 ve F3 ürünlerine ait ¹ H-NMR açıklamaları	160
Tablo 25: ME1 ve ME2 ürünlerine ait ¹ H-NMR açıklamaları	162
Tablo 26 :PBAE ve Kitosan ürünlerine ait TGA eğrilerinden tespit edilen çeşitli sıcaklıklarda ağırlık kaybı ve nihai bozunma sıcaklıkları	168
Tablo 27: PBAE-NMDA (D1-NMDA ve F1-NMDA) ve PEG-Kitosan-NMDA (PEG-K1-NMDA, PEG-K2-NMDA ve PEG-K3-NMDA) ürünlerine ait TGA eğrilerinden edilen % ağırlık kayıpları ve son bozunma sıcaklıkları	171
Tablo 28: PEG-Kitosan-NMDA (K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA) ve PBAE-NMDA (D1-NMDA ve F1-NMDA) polimerlerine ait bozunma kademeleri.....	172
Tablo 29: Boş kitosan nanopartiküllerinin partikül boyutu ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli sonuçları	174
Tablo 30: PEGlenmemiş optimum kitosan (K1, K2, K3) nanopartikül formülasyonlarına ait örneklerin partikül boyutu ve zeta potansiyelini gösteren grafikler	176
Tablo 31: PEGlenmiş boş kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve dağılımı, zeta potansiyeli sonuçları.....	178
Tablo 32: PEGlenmiş optimum kitozan (K1-PEG, K2-PEG, K3-PEG) nanopartikül formülasyonlarına ait örneklerin partikül boyutu ve zeta potansiyelini gösteren grafikler	180
Tablo 33: Boş PBAE nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli sonuçları	183
Tablo 34: PBAE polimerlerine ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafikleri	185
Tablo 35: PEGlenmiş, PEGlenmiş, NMDA ile modifiye edilmiş ve siRNA yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değeri sonuçları .	190

Tablo 36: PBAE nanopartiküllerinin partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve iletkenlik sonuçları.....	192
Tablo 37: Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının bir aylık fiziksel stabilite sonuçları.....	199
Tablo 38: Farklı konsantrasyonlarda trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	200
Tablo 39: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	202
Tablo 40: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	204
Tablo 41: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	206
Tablo 42: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	208
Tablo 43: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	209
Tablo 44: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	211
Tablo 45: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	213
Tablo 46: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	214

Tablo 47: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	216
Tablo 48: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	218
Tablo 49: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	219
Tablo 50: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	221
Tablo 51: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	223
Tablo 52: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	224
Tablo 53: F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA formülasyonlarının iki aylık stabilite çalışmasının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilmesi.....	228
Tablo 54: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-mannitol içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	230
Tablo 55: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-mannitol içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	232
Tablo 56: F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA kodlu formülasyonların dokuz aylık stabilite çalışmasının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilmesi	234
Tablo 57: K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının içerik nem miktar yüzdeleri	236

Tablo 58: Jel elektroforez çalışmasında kullanılan polimer:gen oranları ve elde edilen sonuçlar.....	237
Tablo 59: %0,5 ve %1 (a/a) FBS varlığında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli değerleri	241
Tablo 60: %5 FBS varlığında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli değerleri	243
Tablo 61: Neuro-2A hücrelerinde MTT testi sonuçları	256
Tablo 62: SH-SY5Y hücrelerinde MTT testi sonuçları.....	257
Tablo 63: Htt ile transfekte edilmiş Neuro-2A hücrelerinde MTT testi sonuçları	261
Tablo 64: RNA konsantrasyonları	264
Tablo 65: cDNA konsantrasyonları	265
Tablo 66: Farklı siRNA konsantrasyonlarının ve karıştırılmış siRNA'nın gen ekspresyonuna etkisine dair qPCR sonuçları.....	267
Tablo 67: siRNA yüklü nanopartiküllerin HTT gen ekspresyonuna etkisinin qRT-PCR ile belirlenmesi ve ve kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) hesaplanması.....	269
Tablo 68: Neuro-2A hücrelerine siRNA yüklü nanopartikül uygulaması sonrasında endojen HTT ekspresyonunun qRT-PCR ile belirlenmesi	270
Tablo 69: BSA standart eğrisi üzerinden örneklerin protein konsantrasyonlarının hesaplanması.....	273
Tablo 70: Küpe numaralarına göre genotipleme sonucu	282
Tablo 71: Küpe numaralarına göre genotipleme sonucu	285
Tablo 72: Dokulardan elde edilen RNA ve cDNA konsantrasyonları.....	294
Tablo 73: qRT-PCR koşulları	294
Tablo 74: siRNA yüklü nanopartiküllerin in vivo HTT gen ekspresyonuna etkisinin qRT-PCR ile belirlenmesi.....	295

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Chi-GA Sentezi	53
Şekil 2: Chi-GA-DPAC Sentezi	53
Şekil 3: Chi-HE-EDA Sentezi Şematik Gösterimi	54
Şekil 4: Chi-GA-HE-EDA Sentezi Şematik Gösterimi	55
Şekil 5: G polimerinin sentezinin şematik gösterimi.....	56
Şekil 6: H polimerinin sentezinin şematik gösterimi.....	57
Şekil 7: L polimerinin sentezinin şematik gösterimi	58
Şekil 8: A1-2 polimerinin sentezinin şematik görünümü	58
Şekil 9: A1-3 polimerinin sentezinin şematik görünümü	59
Şekil 10: A1-5 polimerinin sentezinin şematik görünümü	59
Şekil 11: A1-4 polimerinin sentezinin şematik görünümü	60
Şekil 12: E1 polimerinin sentezinin şematik görünümü	65
Şekil 13: D1 bileşiğinin sentezinin şematik görünümü	66
Şekil 14: F1 polimerinin sentezinin şematik görünümü	69
Şekil 15: F2 polimerinin sentezinin şematik görünümü	69
Şekil 16: F3 polimerinin sentezinin şematik görünümü	70
Şekil 17: D1-1 polimerinin sentezinin şematik görünümü	71
Şekil 18 : Y polimerinin sentezinin şematik görünümü	72
Şekil 19 : Z polimerinin sentezinin şematik görünümü.....	73
Şekil 20: NMDA-Chi-GA-DAPC (K1-PEG-NMDA) polimerinin sentezi.....	75
Şekil 21:NMDA-Chi-HE-EDA (K2-PEG-NMDA) polimerinin sentezi.....	76
Şekil 22: NMDA-Chi-GA-HE-EDA (K3-PEG-NMDA) polimerinin sentezi.....	77
Şekil 23: F1-NMDA Polimerinin Sentezi.....	78
Şekil 24: D1-NMDA polimerinin sentezi	79
Şekil 25: F2-NMDA polimerinin sentezi.....	80
Şekil 26: F3-NMDA Polimerinin Sentezi.....	81
Şekil 27: M1-NMDA Polimerinin Sentezi	82
Şekil 28: ME1-NMDA Polimerinin Sentezi	83
Şekil 29: Agaroz Jel Elektroforez sistemi.....	111

Şekil 30: FL25Q ve FL90Q htt dizileri pEYFP-C1 ekspresyon vektörünün (Living Colors Fluorescent Vectors, Clontech) MCS bölgesine daha önceki bir çalışmada klonlanmıştır (Ersoy Tunalı, 2012).....	115
Şekil 31: SDS-PAGE elektroforez ünitesi	120
Şekil 32: Elektroforez sonrası jel görüntüsü ve Opti-Protein XL protein markörünün kontrolü (Kırmızı bant: 75 kDa, yeşil bant: 25 kDa	120
Şekil 33: Çalışmada kullanılmak üzere üretilen YAC128 transgenik fareler.....	123
Şekil 34: Hayvanlara küpe takılması işlemi	125
Şekil 35: Tail suspension testi	127
Şekil 36: Rota Rod testi	128
Şekil 37: Open Field testi görünümü A: Open-Field arenası B: elektronik görüntüleme sistemi.....	129
Şekil 38: Sakrifiye edilen hayvanlarda beyin çıkarılması	130
Şekil 39: Kesitlerin alındığı beyinlerin başlangıç ve bitiş görüntüleri ⁹⁴	130
Şekil 40: Kreyostat kullanarak beyin kesitlerinin alınması	131
Şekil 41: K2-PEG-NMDA ürününün GPC görüntüsü.....	134
Şekil 42: D1-NMDA ürününün GPC görüntüsü.....	134
Şekil 43: F1, F2, F3, ME1, ME2, D1 numunelerine ait FTIR spektrumları.....	135
Şekil 44: Chi, K2, PEG, PEG-K2 numunelerine ait FTIR spektrumları	136
Şekil 45: Chi-GA, K1, PEG, PEG-K1 numunelerine ait FTIR spektrumları	137
Şekil 46: Chi-GA, K3, PEG, PEG-K3 numunelerine ait FTIR spektrası	138
Şekil 47: K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG) ve NMDA-K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri	139
Şekil 48: K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ve K2-PEG- NMDA (Chi- HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri	143
Şekil 49: K3-PEG (Chi-GA-HE-EDA-PEG) ve K3-PE- NMDA (Chi-GA-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri	146
Şekil 50: D1 (PBAE _{BAEDED}) ve D1-NMDA (PBAE _{BAEDED} -NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri.....	149
Şekil 51: F1 (PBAE _{BAEDAP}) ve F1-NMDA (PBAE _{BAEDAP} -NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri.....	151
Şekil 52: PBAE ait ¹ H-NMR spektrumu	153
Şekil 53 : K2'ye ait ¹ H-NMR spektrumu.....	154

Şekil 54: K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu	155
Şekil 55: K2-PEG- NMDA (Chi-HE-EDA-PEG-NMDA) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu.....	155
Şekil 56: D1 (PBAE _{BAEDED}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu	156
Şekil 57: D1-NMDA (PBAE _{BAEDED} -NMDA) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu	157
Şekil 58: F1 (PBAE _{BAEDDAP}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu	158
Şekil 59: F1-NMDA (PBAE _{BAEDDAP} -NMDA) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu.....	158
Şekil 60: F2 (PBAE _{HDA}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrum.....	159
Şekil 61: F3 (PBAE _{DEGDAAP}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu.....	160
Şekil 62: ME1 (PBAE _{PEGDMEDA}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu	161
Şekil 63: ME2 (PBAE _{PEGDMEDA1.1}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu.....	161
Şekil 64: A) Kitosan; B) K1-PEG, C) K1-PEG-NMDA polimerlerine ait ^1H -NMR Spektrumu.....	164
Şekil 65: K1-PEG-NMDA polimerine ait ^{13}C -NMR Spektrumu.....	164
Şekil 66: A) Kitosan; B) K2-PEG, C) K2-PEG-NMDA polimerlerine ait ^1H -NMR Spektrumu.....	165
Şekil 67: K2-PEG-NMDA polimerine ait ^{13}C -NMR Spektrum.....	165
Şekil 68: A) Kitosan; B) K3-PEG, C) K3-PEG-NMDA polimerlerine ait ^1H -NMR Spektrumu.....	166
Şekil 69: K3-PEG-NMDA polimerine ait ^{13}C -NMR Spektrumu.....	166
Şekil 70: A) F1-NMDA; B) D1-NMDA ürünlerine ait ^{13}C -NMR Spektrumu	167
Şekil 71: D1 ürününe ait termal oksidatif bozunma eğrisi	168
Şekil 72: PBAE ürünlerine ait termal oksidatif bozunma eğrileri.....	169
Şekil 73: Kitosan ürünlerine ait Termal Oksidatif Bozunma Eğrileri	170
Şekil 74: PEG-Kitosan-NMDA ürünlerine ait Termal Oksidatif Bozunma Eğrileri....	171
Şekil 75: PBAE-NMDA ürünlerine ait Termal Oksidatif Bozunma Eğrileri.....	173
Şekil 76: siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş PEG- kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelini gösteren grafikler.....	192
Şekil 77: siRNA yüklü PBAE nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli grafikleri.....	195
Şekil 78: D1 nanopartikül ürününe ait SEM görüntüsü.....	196
Şekil 79: K2 ürününe ait SEM görüntüsü.....	196

Şekil 80: D1-NMDA, F1-NMDA, K1-NMDA, K2-NMDA, K3-NMDA polimerlerinden elde edilen nanopartiküllerine ait SEM ve TEM görüntüleri	198
Şekil 81: İdeal miktarda kriyoprotektan içeren F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının zamana bağlı partikül boyutu ve poli dispersite indeksi değişimi	204
Şekil 82: İdeal miktarda kriyoprotektan içeren K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının zamana bağlı partikül boyutu ve poli dispersite indeksi değişimi	226
Şekil 83: Stabilite çalışması için liyofilize olarak elde edilen formülasyonların görünümü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 84: siRNA'nın spektrofotometrik konsantrasyon eğrisi.....	237
Şekil 85: F1-NMDA, D1-NMDA, K1-NMDA, K2-NMDA, K3-NMDA polimerlerinden elde edilen nanopartikül formülasyonlarının jel elektroforez görüntüleri	240
Şekil 86: %5 (h/h) FBS varlığında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli değerleri	244
Şekil 87: %5 FBS içerisindeki çıplak siRNA'nın agaroz jelde elektroforetik hareketi	245
Şekil 88: F1-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşim ve enkapsülasyon ile yüklenmiş siRNA'nın agaroz jelde elektroforetik hareketi	246
Şekil 89: D-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşim ve enkapsülasyonla, K1-PEG-NMDA ve K2-PEG-NMDA formülasyonlarına iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın agaroz jeldeki elektroforetik hareketi	247
Şekil 90: K3-PEG-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın agaroz jeldeki elektroforetik hareketi	248
Şekil 91: %5 FBS içerisinde çıplak siRNA, F1-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşimle ve enkapsülasyonla D-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın poliakrilamid jelde elektroforetik hareketi.....	249
Şekil 92: %5 FBS içerisinde D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarına iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın poliakrilamid jelde elektroforetik hareketi	250
Şekil 93: Neuro-2A hücreleri (10x)	252
Şekil 94: SH-SY5Y hücreleri (10x).....	252
Şekil 95: Kitosan ürünlerinin HEK293 ve POF hücre hatlarındaki sitotoksosite grafikleri	254

Şekil 96: PBAE ürünlerinin HEK293 ve POF hücre hatlarındaki sitotoksosite grafikleri	255
Şekil 97: N2A hücrelerinde nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığına etkisi	256
Şekil 98: SH-SY5Y hücrelerinde nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığına etkisi.....	258
Şekil 99: XL2 Blue hücrelerinin FLhtt25Q-YFP ile transformasyonu sonucu oluşan koloniler	259
Şekil 100: pEYFP-C1 ekspresyon vektörüne klonlanan FL htt dizisindeki CAG tekrar bölgesi.....	259
Şekil 101: SH-SY5Y hücrelerinde a) FLhtt25Q-YFP ve b) FLhtt-90Q-YFP ekspresyonu (20x).....	260
Şekil 102: Neuro-2A hücrelerinde a)FL htt25Q-YFP ve b) FLhtt-90Q-YFP ekspresyonu (20x).....	260
Şekil 103: Htt ile transfekte edilmiş Neuro-2A hücrelerinde hücre canlılığı	261
Şekil 104: SH-SY5Y hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında (A) 5X, (B) 10X, (C) 20X ışık mikroskobu görüntüleri.....	262
Şekil 105: HTT90Q ile transfekte hücrelerin floresan mikroskopta 10X (A) ve 20X görüntüsü (B); HTT90Q ve siRNA ile ko-transfeksiyon sonrasında hücrelerin 5X (C) ve 20X görüntüsü (D).....	263
Şekil 106: %2'lik agaroz-formaldehit jelde izole edilen RNA'ların elektroforez görüntüsü	265
Şekil 107: Nanopartiküllerin hücre içine alınması. HTT90Q transfeksiyonu (A) ve HTT90Q transfeksiyonu ile birlikte siRNA yüklü K1-PEG-NMDA (B), K2-PEG-NMDA (C), K3-PEG-NMDA (D), F1-NMDA-iyonik (E) ve D-NMDA-iyonik (F) nanopartiküllerinin hücre içinde görüntülenmesi	268
Şekil 108: SDS-PAGE jelinde protein ekspresyonunun gösterilmesi.1) FLhtt25Q, 2) FLhtt90Q.....	271
Şekil 109: Neuro-2A hücrelerinde pEYFP antikoru ile western blotlama	272
Şekil 110: SDS-PAGE jelinin Coomassie boyaması sonrasında protein ekspresyonlarının gösterilmesi. 350kDa'luk protein bantı, htt ekspresyonunu göstermektedir. (1: Opti-protein XL Marker. 2:Transfekte edilmemiş kontrol hücreler, 3: 90Q, 4:90Q+K1-PEG-NMDA-siRNA, 5: 90Q+K2PEG-NMDA-siRNA. 6: 90Q+K3-PEG-NMDA-siRNA, 7: 90Q+F1-NMDA-iyonik-siRNA, 8: 90Q+F1-NMDA-	

enkapsüle-siRNA, 9: 90Q+D-NMDA iyonik-siRNA, 10: 90Q+D-NMDA-enkapsüle-siRNA	274
Şekil 111: Transfer sonrasında Coomassie ve Ponceau solüsyonları ile boyanmış jel ve membran	275
Şekil 112: Membran üzerinde A: β -actin (45kDa); B: GAPDH (36kDa)'e ait kemilüminesans görüntü	276
Şekil 113: Membran üzerinde GFP'ye ait kemilüminesans görüntü	277
Şekil 114: Transfer sonrası Coomassie ile boyanan jeller. (A) Protein aktarımının gerçekleşmediği (B) yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin jelde kaldığı örnekler....	277
Şekil 115: SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinin görünümü	279
Şekil 116: SH-SY5Y hücrelerinde flowsitometri grafikleri A) P1 kapısının belirlenmesi B) FITC bandındaki tüm hücreler C) P1 kapısında ve FITC bandındaki tüm hücreler D) Formülasyonların ışına grafiklerinin karşılaştırılması	280
Şekil 117: Neuro-2A hücrelerinde flowsitometri grafikleri A) P1 kapısının belirlenmesi B) FITC bandındaki tüm hücreler C) P1 kapısında ve FITC bandındaki tüm hücreler D) Formülasyonların ışına grafiklerinin karşılaştırılması	281
Şekil 118: Küpe numaraları 400 ile 429 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü PK: Pozitif kontrol NK: Negatif Kontrol	283
Şekil 119: Küpe numaraları 430 ile 446 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü	284
Şekil 120: Küpe numaraları 614 ile 643 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü PK: Pozitif Kontrol NK: Negatif Kontrol	284
Şekil 121: Küpe numaraları 644 ile 665 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü	285
Şekil 122: Küpe numaralarına göre farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü PC: Pozitif kontrol NC: Negatif Kontrol	286
Şekil 123: Küpe numaralarına göre farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü PC: Pozitif kontrol NC: Negatif Kontrol	287
Şekil 124: Küpe numaralarına göre farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü PC: Pozitif kontrol NC: Negatif Kontrol	287
Şekil 125: Farelerin vücut ağırlıklarının her uygulama sonrası değişimi (Ortalama Vücut Ağırlığı (g) $\pm$ Standart Hata). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 0. güne göre tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark	289

Şekil 126: 15. ve 30. Gün tail suspension testi grafiği (Hareketsizlik süresi (sn) $\pm$ Standart Hata). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; SF-IN grubuna göre tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark.	290
Şekil 127: 15. ve 30. gün Rota Rod testi grafiği (Düşme Zamanı (sn) $\pm$ Standart Hata). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; SF-IN grubuna göre tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark.	291
Şekil 128: Open field analiz grafikleri (Zaman (sn) $\pm$ Standart Hata).....	292



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KBB: Kan beyin bariyeri
SSS: Santral sinir sistemi
KSSSB: Kan-serebrospinal sıvı bariyeri
ISF: İnterstisyel sıvı
CSF: Serebrospinal sıvı
TfR: Transferrin reseptörü
PAMAM: Poliamidoamine
PEG: Polietilenglikol
LDLR: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
ApoE: Apolipoprotein E
IGFR: İnsüline benzer büyüme faktörü reseptörü
DTR: Difteri toksini reseptörü
SR-BI: Sınıf B tip I
cBSA: Katyonik sığır serum albümin
NGF: Sinir büyüme faktörünün
HTT: Huntingtin protein
SBMA: Spinal Bulbar Müsküler Atrofi
GABAerjik: Gamma-amino-bütirik asit
BDNF: Beyinden türetilmiş nörotrofik faktör
EPA: Etil-eikosapentoneik asit
ASO: Antisense Oligonükleotid
RNAi: RNA interference
miRNA: mikroRNAlar
dsRNA: Çift zincirli RNA
RISC: RNA temelli susturucu kompleks
Chi: Peglenmemiş kitozan
GA: Gallik asit
PBAE: Polibeta aminoester

PEGDA: Polietilenglikol diakrilat

EtOH: Etanol

DMSO: Dimetilsülfoksid

BAED: Bisfenol A etoksilat diakrilat

TEGDMA: Tetraetilen glikol dimetakrilat

DCC: Disikloheksilcarbodiimid

FT-IR: Fourier Transform Infrared

TGA: Termogravimetrik analiz

TPP: Tripolifosfat

TEM: Transmisyon elektron mikroskobu

ÖZET

Çağlar, E.Ş. (2021). Huntington Hastalığı'nın Tedavisinde Kullanılmak Üzere Biyoteknolojik İlaç İçeren Formülasyonların Hazırlanması, *İn Vitro-İn Vivo* Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Huntington hastalığı, patogenezi iyice anlaşılmış santral sinir sistemine özgü nörodejeneratif bir hastalıktır. Genelde 30'lu yaşlarda etkisini göstermeye başlayan, IT15 geninde CAG trinüklotid sayısının miktarıyla ters orantılı olarak başlangıç yaşı değişen bu hastalık, önce psikiyatrik ardından motor ve nihayetinde bilişsel faaliyetleri bozmaktadır. Hastalığın en belirgin patolojik özelliği beynin bazal ganglia bölümündeki strial nöronların ölümüdür. Hastalığın ilerlemesiyle beraber neredeyse beynin tüm bölümlerinde nöron ölümü gözükmemektedir. Hastalığın mevcut tedavi yöntemleri sadece semptomatiktir ve bu yüzden geçici bir süre tercih edilebilir. Huntington hastalığının ilerleme sürecini modifiye edecek tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda beyindeki strial nöronlara hedeflenmiş kitozan ve poli beta aminoester nanopartiküllerine hastalığa spesifik siRNA'lar yükleyerek hastalığın patogenezinin modifiye edilmiştir. Gerek siRNA yüklü gerekse siRNA yüklenmemiş formülasyonların karakterizasyonu yapılmıştır. İdeal formülasyonlar F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA, SH-SY5Y ve Neuro-2A hücre hatlarında denenmiştir ve YAC128 transgenik fareler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar intranazal ve intraperitoneal uygulanarak *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. F1-NMDA formülasyonunun yapılan çalışmalar neticesinde %60'ın üzerinde gen susturduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Huntington Hastalığı, siRNA, Hedefleme, Kitosan, Poli beta aminoester

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 217S628

ABSTRACT

Çağlar, E.Ş. (2021). Preparation And *In Vitro- In Vivo* Evaluation of Biotechnological Drug Compound Loaded Formulation for the Treatment of Huntington's Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. Doktora Tezi. İstanbul.

Huntington's disease is a neurodegenerative disease specific to the central nervous system, the pathogenesis of which is well understood. This disease, which generally begins to show its effects in the 30s, and whose age of onset changes inversely with the amount of CAG trinucleotides in the IT15 gene, first impairs psychiatric, then motor and finally cognitive activities. The most prominent pathological feature of the disease is the death of strial neurons in the basal ganglia of the brain. With the progression of the disease, neuron death appears in almost all parts of the brain. Current treatment methods of the disease are only symptomatic and therefore may be preferred for a temporary period. There is a need for treatments that will modify the progression of Huntington's disease. In our study, the pathogenesis of the disease was modified by loading disease-specific siRNAs on chitosan and poly beta aminoester nanoparticles targeted to strial neurons in the brain. Both siRNA-loaded and blank formulations were characterized. Ideal formulations (F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA and K3-PEG-NMDA) were tested on SH-SY5Y and Neuro-2A cell lines, and *in vivo* studies have been carried out YAC128 transgenic mice. Mice were administered intranasally and intraperitoneally. As a result of studies, the F1-NMDA formulation was found to silence more than 60% of genes.

Key Words: Huntington's Disease, siRNA, Targeting, Chitosan, Poly beta amino ester

The present work was supported by TÜBİTAK. Project No. 217S628

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Huntington hastalığı (HH), ilk kez 1872'de Amerikalı bir doktor olan George Huntington tarafından tanımlanmıştır. George Huntington HH'yi, bazı ailelerin kore ve psikiyatrik semptomlarla işaretlenmiş kalıtsal bir durumdan etkilendiğini ve hastalığın “tedavisi olmayanlardan biri” olduğunu kaydetmiştir. HH, motor, bilişsel ve psikiyatrik özellikler üçlüsü ile karakterize otozomal dominant nörodejeneratif bir hastalıktır. HH'nin, 10-15 yıl boyunca semptomların geri dönüşümsüz ilerlemesi ile tipik olarak erişkin başlangıcı en çok görülmektedir^{1,2}. Fakat artık HH'nin genetiği ve patobiyojisi hakkında çok şey bilinmektedir, bu da araştırmacılara potansiyel terapötik ajanları tasarlamak için sağlam bir temel sağlamaktadır.

Tez çalışmamızda amaçlarımız; siRNA içeren ve içermeyen çeşitli taşıyıcı sistemlerin (kitozan ve poli beta aminoester bazlı nanopartikül) hazırlanması ve geliştirilen bu formülasyonların karakterizasyon ve stabilite çalışmaları yapılması, hücre kültürü çalışmaları ile formülasyonların transfeksiyon ve sitotoksik etkilerinin araştırılması, yapılan *in vitro* çalışmalar ile 2 farklı formülasyon şekli karşılaştırılarak ideal formülasyonların seçilmesi, YAC128 hayvanlarda ideal olarak seçilen formülasyonların *in vivo* olarak etkinliğinin araştırılması ve etkinliğinin karşılaştırılmasıdır.

Kısaca tez kapsamında hedeflenen yararlar, siRNA yüklü kitozan ve poli beta aminoester bazlı nanopartiküller ile Huntington hastalığının tedavisine hem yeni bir tedavi şekli hem de piyasada halihazırda kullanılan tedavinin etkinliğinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılması ve siRNA'nın huntington tedavisinde intraperitoneal ve nazal kullanımındaki etkinliğinin karşılaştırılmalı olarak gösterilmesidir.

Yukarıda bahsettiğimiz gibi çalışmalarımız polimer sentezi, formülasyon geliştirme, *in-vitro*, ve *in-vivo* olmak üzere dört aşamada planlanmıştır. Günümüzde, daha çok maliyetlerin çok yüksek olması nedeniyle yeni bir ilaç molekülü keşfetmektense var olan ve tedavide kullanılan siRNA'nın etkinliğinin artırılması amaçlanmaktadır. Bu sayede HH tedavisi için daha etkin olabilecek alternatif bir dozaj şeklini önermeyi planlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin Yapısı ve Fonksiyonları

Merkezi sinir sisteminin (MSS) vücuttaki tüm organlardan gelen duyuşal uçlardan verileri birbiriyle ilişkilendiren ve öğrenme, hafıza gibi aktif işlevi sürdürmek amacıyla tüm onarımları yürüten beyindir ³. Beyin, insanlara duyuşal uyarınları işleme, modüle etme ve yorumlama kapasitesini sağlayan bir çekirdeğin ve sinir yolunun karmaşık düzenlemesidir. Viseral (içorgansal), endokrin ve kas-iskelet sistemi fonksiyonlarının aktivitesini düzenler ve hafıza, hayal gücü ve yaratıcı düşünceyi içeren daha yüksek zihinsel işlevleri yerine getirir. Yetişkin bir insan beyninin ağırlığı, ortalama vücut ağırlığının yaklaşık %2'si olan ortalama 1400 gramdır⁴. Beyin bu işlemleri yaparken yüksek enerji gereksinimine ihtiyaç duymaktadır. Vücudun dinlenme zamanındaki enerjisi harcanması toplam vücut ağırlığının %2' sine sahip olsa dahi %20 ' sini oluşturmaktadır ⁵. Enerji ihtiyacı beynin kendi hücresel bölümlerinde paylaştırılmaktadır⁶. İnsan beynindeki hücrelerinde başlıca olanı nöronlardır ve nöronlar 86 milyar nöron bulunmakatadır ⁷. Nöronlar, beyindeki toplam enerjinin %70 oranında kullanırken kalan kısımları glial hücreler tarafından kullanılmaktadır. Yüksek metabolik talepleri ve çok küçük miktarda içsel enerji depoları göz önünde bulundurulduğunda kandan sürekli olarak bir substrat akışı gözlenmektedir ⁶. Bu akışın kontrolü beynin kendi koruma mekanizması ile sağlanmakatdır. İnsanlar da dahil olmak üzere tüm memeliler bir kan beyin bariyerine (BBB) sahiptir. Bu engel kılcal damarların endotel hücreleri tarafından oluşturulur. Bu mikrodamarların oluşturduğu ara yüzey alını kan beyin geçişinde en büyük ara yüzeyidir. Anatomik bölgeye bağlı olarak yüzey alanı 150-200 cm² g⁻¹ doku arasındadır yaklaşık olarak bir yetişkin beyninde 12 ile 15 m² değişim alanı sunmaktadır. İkinci bir arayüz enegeli ise kan beyin omurilik sıvısı bariyerini oluşturan beyin omurilik sıvısına bakan koroid pleksusun epitel hücreleri tarafından oluşturulur ⁸.

2.2. Beyne İlaç (Gen) Hedeflendirme

2.2.1. Beyin Bariyerleri

Modern tıbbın bugün karşı karşıya kaldığı en büyük problemlerden bir tanesi, diğer bölgelerden saklayarak, verilen ilacın spesifik olarak istenilen bölgeye taşınmasıdır. Örneğin santral sinir sisteminde oldukça etkili olan ilaçlar periferik organlarda oldukça ağır yan etkilere sebebiyet vermektedir. Bu yüzden her açıdan korunan beyne hedefli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek oldukça önem arz etmektedir. İlacın beyne hedeflenmesindeki en büyük zorluk kan beyin bariyeridir. Kan beyin bariyeri (KBB), omurgalı hayvan beyinlerinin kapiller endotellerinin içinde sıkı birleşme noktalarından (tight junction) oluşan bir yapıdır. KBB, beyni, kan yolu ile geçen zararlı maddelerden koruyan, iyon ve sıvı hareketlerini kısıtlayan, bu esnada besinlerin geçişine izin veren ve beynin fonksiyonları için optimum çevreyi sağlamakla görevli olan yapıdır. Bariyer olma özelliklerinden kaynaklı olarak da haliyle ilaçların geçmesinde de aşılması gereken bir zorluk olarak önümüze çıkmaktadır. Küçük molekülü ilaçların %98'i, büyük molekülü ilaçların ise %100'ü kan beyin bariyerini geçemez. Büyük molekülü; rekombinant proteinleri ve enzimleri, monoklonal antikorları, antisense ilaçları, siRNA'ları ve gen terapisi araçları da dahil tüm biyoteknolojik ürünleri kapsamaktadır. Kan beyin bariyeri, fonksiyonu sebebi ile santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarının tedavisini oldukça zora sokmaktadır ^{9,10}.

SSS iyi gelişmiş tüm organizmalarda kan beyin bariyeri mevcuttur. Bu bariyer, kapillerin duvarlarını oluşturan endotelial hücreler tarafından oluşturulmuştur. Bu mikrodamarların kombine yüzey alanları kan-beyin değişiminde açık ara en geniş ara yüzü oluşturmaktadır. Bu yüzey alanı, anatomik bölgesine göre, $150-200 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ arasında ortalama bir yetişkin için beyinde $12-18 \text{ m}^2$ 'lik değişim için toplam alan oluşturan dokuyu vermektedir ¹¹.

Diğer bir ara yüz ise, koroid pleksusun serebrospinal sıvıya dönük epitelyal hücreleri tarafından oluşturulan ve kan-serebrospinal sıvı bariyeri (KSSSB) olarak adlandırılan bariyerdir. Beyin ekstraselüler sıvısının ve interstisyel sıvısının (ISF) kalanları KBB'nin kapiller endoteli boyunca sekresyonunun bir kısmından türevlenmişken, serebrospinal sıvı, koroid plexus epitel hücreleri boyunca beyin ventriküllerine salınan sıvıdır. ISF ve serebrospinal sıvı birçok farklı bölge ile iletişim kurmakta serbesttir ve birçok farklı çalışma interstisyel sıvının serebrospinal sıvıya

(CSF) katkısının %10-60 arasında olduğunu söylemektedir. ISF ve CSF'nin sekresyonu KBB'nin endotelyumunun abluminal membranında ve koroid plexus epitelyumunun apikal membranında eksprese edilen Sodyum-Potasyum-ATPaz tarafından gerçekleştirilen iyon ve osmotik gradient ile yönetilir. Bu işlemin neticesinde su hareketi ve hacim akışı görülür ¹².

Üçüncü arayüz ise SSS'yi tamamen çevreleyen ve duranın altında bulunan avasküler araknoid epitelyum tarafından sağlanır. Bu sistem, santral sinir sisteminin ekstraselüler sıvıları ile diğer vücut sıvıları arasında tam anlamıyla sızdırmazlık oluşturan bir yapıdır ¹³. Her ne kadar araknoid de bir bariyer oluştursa da avasküler yapısı ve nispeten küçük yüzey alanı santral sinir sistemi ile kan arasında değişim için belirgin bir yüzey alanı temsil etmez ¹⁴.

Bu üç arayüzde, bariyer fonksiyonu fiziksel bariyerlerin (interselüler boşluklar ya da paraselüler yollar ile akışı azaltan hücreler arasındaki sıkı birleşme noktaları), transport bariyerlerinin (çözünmüş maddelerin akışını yöneten spesifik transport mekanizmaları) ve metabolik bariyerin (taşınan molekülleri metabolize eden enzimler) kombinasyonu sonucu oluşmaktadır.

2.2.1.1. Beyne İlaç Taşıma Stratejileri

İlaçların beyne taşınması için penetrasyonu arttıracak çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en çok tercih edilenleri farmakolojik teknolojiler ya da reseptör, adsorbatif, taşıyıcı ile yönetilen sistemler kullanılarak beyin hedeflendirmede kullanılan metotlar ya da burundan beyne taşıma sistemleridir.

Beyin kapiller endotelyumunda pek çok reseptör çeşidi olması sebebiyle, reseptör aracılı endositoz beyne hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça etkili yöntemlerden bir tanesidir. Bu reseptörlerden bazıları, transferrin reseptörü, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, insülin reseptörü ve insüline benzer büyüme faktörü reseptörü, difteri toksini reseptörü, nikotinik asetilkolin reseptörü, çöpçü reseptör sınıf B tip I, Tmem30a olarak sıralanabilir ¹⁵.

Transferrin reseptörü (TfR) tüm çekirdekli hücrelerde eksprese edilen bir reseptördür. TfR'nin ekspresyonu malign hücrelerin ve beyin kapiller endotelyum hücrelerinin yüksek seviyede demire ihtiyaç duyduklarında artan bir reseptördür. Li ve ark. yaptığı çalışmada transferrini beyin hedefleme ligandı olarak tercih etmiş ve onu poliamidoamine (PAMAM) biyofonksiyonel polietilenglikol (PEG) aracılığı ile

konjuge etmişlerdir ve böylece PAMAM-PEG-transferrin içeren gen taşıyıcı vektör elde etmişlerdir. Bu vektör, konsantrasyona bağlı selüler uptake; PAMAM ve PAMAM-PEG vektörlerine karşı *in vivo*da 2.5 kat daha fazla beyin uptake'ı göstermiştir ¹⁶. Ancak TfR'yi beyin-hedefleme reseptörü olarak tercih etmenin bazı sınırlayıcı özellikleri vardır. Bunlardan en belirginini kandaki yüksek konsantrasyondaki endojen transferrin, reseptöre bağlanma konusunda yarışa girebilir ve bu da hedeflenme etkinliğinin düşmesine sebep olabilir.

KBB'de eksprese edilen düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) ailesi, LDLR, lipoprotein reseptör-İlgili protein 1, 11 bağlanma tekrarı olan lipoprotein reseptörü, apolipoprotein E (ApoE) reseptör 2, çok düşük dansiteli lipoprotein reseptöründen oluşmaktadır. Laktoferrin, ApoB, ApoE gibi pek çok ligand beyin hedefli ilaç taşıma sistemleri için karakterize edilmiş ve kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda beyin hedeflemesi için laktoferrinin transferrine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir ¹⁷. Yapılan çalışmalarda beyne terapötik proteinlerin hedeflenmesi için ApoB'nin oldukça elverişli bir alan olduğu belirtilmiştir ¹⁸. Bazı çalışmalar ise polisorbata 80 ile modifiye edilmiş nano-ilaç taşıyıcı sistemlerin beyinde akümüle olduğunu göstermiştir. Polisorbat ile çevrelenmiş nanopartiküllerin kana verildikten sonra ApoB ve/veya ApoE adsorbladığı düşünülmektedir. Böylece nanopartiküller lipoprotein partiküllerini taklit edebilir ve bu yüzden beyin kapiller endoteli tarafından reseptör aracılı endositoz ile alındığı düşünülür ^{19,20}.

İnsülin reseptörü ve insüline benzer büyüme faktörü reseptörü (IGFR) beyin pek çok bölgesinde KBB'de dahil eksprese edilir. Difteri toksini reseptörü (DTR), temel olarak KBB'de, nöronlarda ve glial hücrelerde sentezlenen bir reseptördür. Beyin hastalıklarında bu reseptörün upregüle oluşu onun beyin hedeflemede etkinliği arttıracağını düşünülmesine sebebiyet vermiştir. DTR için endojen ligandlar olmadığından dolayı herhangi bir yarışmaya da girmeyeceği görülmüştür. DTR'nin diğer bir avantajı ise, kendinden endozoma sahip olduğu için lizozomal degradasyon sistemine maruz kalmaz. Bu reseptör aracılı taşımada modifikasyon ajanı olarak difteri toksini toksik olduğu için tercih edilmez ancak Gaillard ve ark. geliştirdikleri toksik olmayan difteri toksini CRM197 proteinleri KBB'den geçirmişlerdir ²¹.

Daha önceden yapılan çalışmalarda nikotinik asetilkolin reseptörünün, nörotropik virüslerin SSS'ye girişini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yapılan çeşitli

çalışmalarda siRNA yüklü kuduz virüslerinin bu reseptör üzerinden beyne hedeflendiği gösterilmiştir ²².

p reseptör sınıf B tip I (SR-BI), özellikle yüksek miktarda kolesterol ve steroid hormon sentezinde kullanılmak üzere kolesterol sentezleyen dokularda yüksek seviyede sekrete edilen lipid transfer proteinidir. SR-BI'in ApoB ve ApoE'ye afinitesi oldukça yüksektir ²³.

Adsorbatif olarak yönetilen endositoz ile ilaçların beyne taşınması, temelde pozitif yüklü ilaç taşıyıcı sistemler ile KBB'deki negatif yüklü hücre membranları ile elektrostatik etkileşimini ifade etmektedir. Katyonik albümin ve katyonik peptidler kan beyin bariyerinden absorbtif yönetilen endositoz ile geçer. Katyonik özelliklerinden dolayı beyne gen hedeflenmesinde ve transkripsiyonunda tercih edilen yöntemlerden biridir. Lu ve ark. yaptıkları çalışmada TRAIL genini katyonik sığır serum albümin (cBSA) ile modifiye edilmiş nanopartiküllere enkapsüle ederek bu genin beyne taşınmasını hedeflemişlerdir. alışmalarının sonucunda C6 glioma hücrelerinde yüksek tedavi edici etkinlik görmüşlerdir.

cBSA'nın haricinde, katyonik immunoglobnler, katyonik monoantikorlar ve histon da absorptif yönetilen beyin hedefleme özelliklerine sahiptir. Bu yöntemin en büyük zorluklarından biri ise dokuya özel hedefleme imkanının olmamasıdır. Örneğin cBSA ile yapılan hedeflemede, partiküller ağırlıklı olarak beyinde görülmüş olsalar da karaciğer ve böbreklerde de grlmştir ¹⁵.

Transporter aracılı beyne hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemlerde ise KBB'nin eksprese ettiği taşıyıcılardan faydalanılır. KBB, gerekli miktarda besinin beyne alınması için çok fazla, spesifik transporter aracılı içeri doğru taşıma mekanizması eksprese eder ²⁴. Beynin fizyolojik fonksiyonlarının sağlanması için çeşitli esansiyal besinlerin, vitaminlerin, peptid ve hormonların beyne alınmasını yöneten KBB'nin serebral kapillerinde 30'dan fazla transporter aydınlatılmıştır. Bu transporterlar, eğer kendi özellikleri ilacın taşınmasına engel değilse ve eğer ilaç taşıyıcı sistem tarafından transporterca tanınması ve taşınması için modifiye edilebiliyorsa, potansiyel geçitler olarak düşünülebilir ^{25,26}. Bu taşıyıcılar, aminoasit taşıma sistemleri, heksoz taşıyıcı sistemler, monokarboksilat taşıma sistemleri olarak temelde e ayrılabilirler ¹⁵.

Aminoasitlerin KBB'den geçerek beyne taşınması, protein sentezi ve nörotransmitter üretimi gibi serebral metabolizmanın tüm regülasyonu için önemli bir

kontrol noktasıdır. Bu proseste ise mevcut amino asit taşıyıcıları çok önemli bir role sahiptir. Bu taşıyıcılar özelliklerine göre kabaca 3 gruba ayrılırlar. Bunlar; büyük nötral, esansiyel ve anyonik amino asitler olarak sıralanabilir. Amino asit taşıyıcılarının içinde KBB’de bulunan sodyum iyonundan bağımsız Sistem L’nin oldukça ehemmiyetli görevi mevcuttur.

Glukozun beyne sürekli alımı heksoz taşıyıcılarına bağlıdır. Glukoz taşıyıcıları KBB’yi oluşturan endotelial hücrelerin hem abluminal hem de luminal taraflarında eksprese edilir. KBB’de mevcut taşıyıcıların en yüksek taşıma kapasitesine sahip olması nedeniyle, glukoz taşıyıcıları, beyne ilaç taşıma için ilaç moleküllerinin glikozil deriveleri için etkileyici taşıyıcılar olduğu düşünülmektedir ²⁴. Yapılan bir çalışmada 7-klorokinurenik asitin D-glukoz ve D-galaktoz esterlerinin KBB’yi geçen önilaçlar olduğu gösterilmiş ve akut/kronik nörodejeneratif hastalıklarda ve epilepsinin deneysel tedavilerinde potansiyel olarak ilgi görmüştür ²⁷.

KBB’deki monokarboksilat taşıma sistemlerinin fizyolojik rolü, primer olarak, prüvat, laktat, asetoasetat ve b-hidroksibutirat gibi endojen monokarboksilatların beyne taşınmasını sağlamaktır ²⁶. Aynı zamanda eksojen bileşiklerin ve ilaçların taşınmasında da oldukça önemli bir role sahiptir. Yapılan bir çalışmada, pravastatin uyku bozukluklarına yol açmazken, simvastatinin önilaç uyku bozukluklarına yol açmaktadır. Bu bulgu da, bu ilaç moleküllerinin KBB’ye permabilitesinin farklı olduğunu ortaya koymaktadır ²⁸.

İlacın beyne taşınmasında diğer önemli yollardan biri de burun kavitesini kullanmaktır. Son yıllarda araştırmacılar ilacın beyne hedeflendirilmesi için intranazal uygulamayı araştırmaya başlamıştır. Modern fizyolojik ve anatomik çalışmalar nazal mukozanın hem olfaktör hem de respiratör mukozaya sahip olduğunu göstermiştir. Olfaktör mukoza beyin dokusundan nasal kaviteyi ayıran ince bir membrandır. Tüm nazal mukoza alanının %5-10 arasında bir kısmını kapsar ve KBB’ye göre daha az kısıtlayıcı bariyer özelliği gösteren genel biyolojik membrandır. Bu yüzden, SSS ile dış çevre arasında muhtemel bir yolak olarak görülmektedir. İntranazal uygulamadan sonra ilaçların büyük bir bölümü respiratör membran üzerinden sistemik dolaşıma geçmektedir ve daha sonra bir kısmı buradan KBB’yi aşarak beyne ulaşabilmektedir. Fakat dozun küçük bir kısmı olfaktör mukoza üzerinden direkt olarak beyne geçebilir, beyin dokularındaki ilaç konsantrasyonunu arttırabilir. Bu da beyne hedeflemeye dikkati çekmektedir. Sakane ve ark. yaptığı çalışmada, sülfü grubu ilaçları intranasal

ve intravenöz uyguladıklarında beyne hedeflenmenin intravenöz uygulamaya göre intranasal uygulamada 10 kat daha da arttığını keşfetmişlerdir. Yarım saat sonra sefalesinin CBF'de konsantrasyonunun intravenöz uygulamaya göre 30 kat daha fazla olduğu da keşfedilmiştir ^{29,30}. 5-florourasil ²⁹, estradiol ³¹, dihidroergotamin ³², dopamin ³³ gibi farklı ilaçların intranasal uygulaması araştırılmış ve serebrospinal sıvıdaki konsantrasyonları intravenöz uygulamaya göre farklı derecelerde daha yüksek bulunmuştur.

İntranasal uygulama sadece küçük boyuta sahip ilaç molekülleri için değil, aynı zamanda büyük moleküller için de avantajlı bir yoldur. İntranasal uygulamadan 1 saat sonra olfaktör soğanda ve hipokampüsteki sinir büyüme faktörünün (NGF) konsantrasyonu intranasal uygulamaya göre belirgin oranda yüksek olduğu keşfedilmiştir ³⁴. İntranasal yol aynı zamanda gen transfeksiyonu çalışmalarında da tercih edilmiş bir yolak olmuştur. Draghia ve ark. replikasyon yeteneği olmayan viral bir sistemi çalışmalarında kullanmış ve bu yolak ile transfeksiyon etkinliklerinin arttığını ve gen terapisi için kullanılabilir olduğunu keşfetmişlerdir ³⁵.

Burundan beyne taşıma için ana yollar temelde olfaktör epitelyum, olfaktör sinir ve kan sirkülasyonundan oluşmaktadır. İlk iki yolak olfaktör mukoza aracılığı ile beyne direkt olarak absorblanma ile alakalıdır. Olfaktör duyu sinirlerinin aksonları olfaktör mukozada olfaktör sinir yolu oluşturmak için birleşmiştir. Olfaktör sinir yolu, etmoid kemiğin kalbur şeklindeki delikli bölümünden kraniyel kaviteye kadar gider ve burada nihayetinde olfaktör soğandaki epipleksus hücreleri ve mitral hücreler ile birlikte sinaptik birleşmeler yaparlar. İlaç molekülleri, intranasal uygulamadan sonra olfaktör mukozada kalır ve devamında ise difüzyon ya da endositoz ile olfaktör epitelyum hücreleri içinden geçer ve beyindeki Bowman's gland hücrelerinde ve sertoli hücrelerinde akümüle olur. Aynı zamanda, onlar hücrelerarası açıklık bağlantılarından da (gap junctions) geçer ve beyin dokularındaki hücreler arası sıvıda akümüle olurlar. Bu iki yolak, olfaktör epitelyum yolağını oluşturmaktadır. İlaç moleküllerinin olfaktör nöronlar (alıcı nöronlar) tarafından olfaktör mukozadan uptake edilip, ön beyinin büyük kısmını, limbik sistemi ve olfaktör soğanı içeren olfaktör beyne olfaktör yol aksoplazması boyunca geçmesi ise olfaktör sinir yolağını oluşturmaktadır.

Diğer beyin hedefleme stratejileri ile karşılaştırıldığında, intranasal ilaç taşıma, güvenli, uygun ve acısız olmasının yanında ekstrasvasküler bir yoldur. Ancak

nazal kavite sınırlı hacme sahiptir ve çoğu organik solvent nazal silialara karşı toksik etki göstermektedir. En önemlisi ise ilacın fizikokimyasal özellikleri intranazal taşımada büyük etkiye sahiptir.

2.3. Nanopartiküller

Son yıllarda küçük partikül boyutuna sahip biyoyaralanım ve biyouyumluluk açısından belirgin özelliklerde bulunan nanopartiküller etkili bir ilaç dağıtım sistemi olarak sıkça araştırılan konular arasındadır. Nanopartiküllerin uzun süreli stabil kalmaları, tedavi bölgesine hedeflenebilmeleri ve ilgili alanda ilaç etkinlik verimliliğini arttırmaları sayesinde tedavi, teşhis ve eczacılık alanında oldukça kullanılmaktadır. Özellikle immünojenisite, aglütinasyon ve zayıf stabil özellik göstermelerine rağmen biyolojik olarak uyumlu ve yüksek biyoyaralanım gösteren peptit, protein yapısındaki kimyasal maddelere göre daha az toksik olan terapötik ajanların ilgili hastalık bölgesine ulaştırılması açısından gösterdikleri sınırlamaların üstesinden nanopartiküller aracılığıyla gelinmektedir ³⁶. Ayrıca nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kan beyin bariyeri gibi serebral endotel hücreleri arasında sıkı bağlantı noktaları bulunan engeli aşmada pek çok geleneksel ilaca kıyasla nanopartiküller oldukça başarılı bulunmuştur. Gen tedavisiyle bulaşıcı hastalıklar, kanser tedavisi ve kalıtsal genetik hastalıklar gibi çeşitli üstesinden gelinmesi zorlu hastalıkların tedavisinde yüksek tedavi potansiyeline sahiptir ve verimli bir şekilde gen meteyalini iletmek amacıyla viral ve viral olmayan taşıyıcılar geliştirilmesine oldukça önem verilmektedir. Yüksek tedavi potansiyeline sahip olmasına rağmen immünojenisite, kuvvetli yan etkiler ve insersiyonel mutajenez gibi güvenli kullanımı açısından endişelerin bulunmasının yanı sıra üretim sürecinin karmaşık olması, gen materyalinin taşınmasında sınırlı kalması ve üretim ve stabilite problemlerinin zorlu olması nedeniyle viral tedavilerinin sürdürülebilir bir şekilde kliniğe çevrilmesinde kilit sınırlamalar halen bulunmaktadır ³⁷. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde gen dağıtımına alternatif olarak kabul edilen bir yaklaşım olan viral olmayan nanopartiküller ³⁸ katyonik lipidler ve katyonik polimerlere dayalı olarak kullanılmaktadır. Kullanılan bu katyonik özellikteki polimerler anyonik özellikteki DNA yapıları ile elektrostatik etkileşim yoluyla kompleksler oluşturur. Oluşan kompleks yapılar negatif yüklü hücre yüzeyi ile verimli bir etkileşim sağlayarak hücre içine alınmaktadır. Ancak transfeksiyon etkinliğinin yetersiz kalması, güçlü sitotoksikite etkinlik göstermesi ve serum inhibisyonuna bağlı stabilitesinin olmaması

açısından bu özellikteki taşıyıcı sistemlerde üstesinden gelinmesi gereken sorunlar arasındadır ³⁹. Belirli bir vücut bölgesinde ki hücre ve dokulara ulaşmak viral olmayan taşıyıcılar bilinen viral vektörlere kıyasla daha düşük verimliliktedir ancak daha az yan etkiye sahip olması, üretim maliyetinin uygunluğu ve immün yanıt oluşturmamakta ki başarısıyla beraber daha etkili bir tedavi sağlamaktadır. Genlerin taşınması ve tasarımı için lipit bazlı sistemler, siklodekstrinler, peptitler ve çeşitli polimerler kullanılmaktadır. Ancak katyonik özellikteki polimerler hücrelere alımlarının verimli olması ile birlikte, negatif yüklü nükleik asitlerle elektrostatik olarak etkileşime girme yeteneklerinden dolayı, özellikle uygundur. Gen aktarımı için kullanılan polimerler arasında, suda düşük çözünürlüğe sahip olması gibi karakteristik kimyasal özelliğe sahip ancak düşük toksisitesi ve biyoyoumlu, doğal bir malzeme olan kitozan gibi polisakkaritlere dayalı olanlar yer alır. Diğer bir taraftan Poli(β -amino ester) ler (P β AE) moleküler ağırlık, hidrofobiklik, bozunabilirlik ve lineer veya dallı yapısı gibi kimyasal özellikler, plazmit DNA, mRNA, siRNA, immünostimülatör RNA (isRNA) ve siklikdinükleotitler (SDN) dahil olmak üzere farklı nükleik asitlerin verilmesinin benzersiz zorluklarını ele almak için kullanılabilir ³⁷. Etkili bir gen taşıma sisteminde nanopartiküllerin katyonik özellik olması dışında fizyolojik sistemde entegrasyon yeteneğinin düşük olması ve materyalin inert olması, hedefe özgü ligandlar ile modifiye edilebilir olması, toksisite ve immünojisiteye neden olmamasına bağlı olarak uygulama açısından tekrarlanabilirliği yüksek olmalı, invazif olmayan olarak uygulanabilen ve hedef bölgeye ulaşmaya kadar geçen süre içinde genetik materyali enzimlere karşı koruyabilmelidir ³⁸. Kitosan, onu farmasötik formülasyonlar için ilginç bir malzeme yapan çeşitli özellikler sergiler. Düşük sitotoksisiteye neden olur, biyoyoumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve mukoadesiftir ⁴⁰. Tipik olarak kabuklular ve mantarlardaki kitinin, deasetilasyonu sonucunda elde edilen lineer ve sert bir yapıya sahiptir. Karakteristik olarak yapısında β -(1,4)-bağlı N-asetil-glukozamin birimleri bulunmaktadır ve hidrojen bağlarına yatkınlığı oldukça yüksektir. Ayrıca yapısında bulunan reaktif amino grupları yüksek kristalize özelliğe sahip agregatların oluşmasına yol açar. Farklı kitozan yapıları ile biyolojik aktiviteye etki eden çözünürlük özelliklerinin değişmesine, partikül boyutu, şekil ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikler sunmaktadır. Konformasyonel dinamiği pH' dan etkilenir ve genel olarak 6,5 değerinin altındaki pH' larda amino gruplarının protonlanması gerçekleşir. Ek olarak sahip oldukları amino grupları genlerle veya proteinlerle elektrostatik etkileşimler oluşturmaya olanak tanımaktadır

⁴¹. Kitosan nanopartikülleri, pulmoner, nazal, mukozal, oral ilaç dağıtımı, kanser tedavisi, aşı dağıtımı ve ayrıca beyin ve gastrointestinal hastalıklara ilaç dağıtımı gibi parenteral olmayan ilaç dağıtımında çok sayıda uygulamaya sahiptir. Protein veya peptit bazlı kitosan ilaç dağıtım sistemi, düşük immünojenisite, reseptörlere özgüllük, kolay çapraz bağlanma ve yüzey modifikasyonu gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Kitosan nanoparçacıkları, emülsifikasyon, nanoçöktürme ve iyonotropik jelasyon yöntemi gibi çeşitli yöntemlerle hazırlanır. Jelleşme yöntemi düşük kayma kuvvetleri ve çalkalama gibi hafif hazırlama koşulları kullanır ve sert organik çözücü ve ısı uygulamasını önler. Protein, peptit ve genetik yapılar enzimatik bozunmaya eğilimli olmalarından kaynaklı olarak taşınmaları ve çevresel uyaranlardan etkilenmelerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanması oldukça zordur. Kitosan taşıma sistemi, biyoadhesif özellikleri ve farklı pH'larda sulu çözelti içinde çözünürlüğü nedeniyle proteinleri spesifik bölgeye kolayca iletebilir. Kitozanın yapısında bulunan reaktif fonksiyonel gruplar polimeri esterifikasyon, alkilasyon veya karboksilasyon gibi kontrol edilebilir modifikasyonlara uygun hale getirerek ilaç taşıyıcı sistemler için benzersiz olanak sunar. Yapılan değişiklikler ile birlikte ilaç tasarımı açısından anyoniklik veya katyoniklik özellikleri yeniden düzenlenmesini kolaylaştırır ³⁶. Kitosanın DNA'yı kompleks hale getirmek ve bunu bir plazmit için viral olmayan bir dağıtım sistemi olarak değerlendirmek için kullanılmasına ilişkin ilk rapor 1995 yılına dayanmaktadır. Elektrostatik etkileşimler tarafından yönlendirilen kitosan-DNA kompleksleri, memeli hücrelerinin hem in vitro hem de in vivo transfeksiyonu için kullanılmıştır ⁴⁰. Rja vd. (2015) yılında yaptığı bir çalışmada nöronal kök hücresinde yaptıkları gen taşıyıcı sistemde kitozan nanopartiküllerinin tek başına PEI veya DNA ile karşılaştırılmasında, kitozan nanokürenin in vitro ve in vivo olarak daha yüksek gen transfeksiyon verimliliğine, daha az toksisite ve daha fazla kalış süresi ile sonuçlandığını bulmuşlardır. Bu sonuçlar kitozan kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin nöral kök hücrelere gen aktarımı için uygun bir taşıyıcı olduğunu göstermiştir ⁴².

Son yıllarda, sentetik polimerlerle tasarlanan nanotaşıyıcılı sistemler ile peptit, protein, enzim ve genetik materyallerin iletilmesi yönünden önemli bir terapötik potansiyel göstermiştir. Çeşitli modifikasyonlara uygunluğu, biyobozunur olmaları ve hidrofobik yapıların dahil edilebilmesiyle beraber nanoüretimde yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu polimerlerin bazıları klinik uygulamalara da ulaşmıştır.

Poli(etilenimin) (PEI) ve poli(L-lisin) (PLL) gibi sentetik yapıdaki katyonik polimerler plazmit deoksiribonükleik asit (pDNA) gibi yapıları yüklenmesini destekler; hücre alım, endozomal kaçış, hücre içi taşınma ve salımı gibi özellikleri paylaşırlar. Bununla birlikte, PEI biyolojik olarak parçalanmamakta ve hücre toksisiteyi indükleyebilir özellik göstermektedir. Oysa PLL hücre içi dağılımı başarılı bir şekilde yapmasına rağmen endozomal kaçışı atlayamaz. Nötr pKa değerinde PEI daha etkili olmasına rağmen etkinliği PLL' ye oranla daha düşüktür. Pek çok nanometeryal ve polimerin etkinliklerini arttırmaya yönelik sayısız çalışma arasından doğal biyouyumlulukları, pH duyarlılığı, üretim kolaylığı açısından katyonik sentetik polimer ailesinin merkezi üyesi olarak kabul edilen Poli(beta-amino) esterleri (P β AE) ortaya çıkarmıştır. P β AE 'ler, transfeksiyon etkinliklerinin mükemmel performansı nedeniyle gen taşıma sistemleri olarak viral vektörlere en güçlü alternatif aday olarak kabul edilmektedir. Genetik malzemeler ile etkileşimden sonra kendiliğinden oluşan nanopartiküller, P β AE' yi diğer polikasyonik polimerlere göre üstün kılan iyi biyobozunur ve hidrofilik özellik göstermesidir. P β AE' ler gösterdiği güçlü transfeksiyon etkinliğinn arttırmak amacıyla çeşitli yapısal blokları ve konjugatları bağlayarak üretilen farklı kinetik profiller ve ayarlanabilir yük yoğunluğu sergiler ⁴³. Bu katyonik polimerler, negatif yüklü DNA' ya elektrostatik etkileşim ile güçlü bağlanması ve hücre alımı indüklemesinin yanı sıra endozomların düşük pH ortamını tamponlayarak DNA' nın endozomal kaçışını kolaylaştırır. Ayrıca P β AE 'ler kararlı ve depolanabilir nanoparçacıkların üretilmesine olanak sağlayan diğer polimerlerle hibrit yapılar oluşturma yeteneğine de sahiptir. Örneğin, P β AE 'nin PLGA ile hibrit oluşturmaya beraber yüksek oranda yüklenmiş DNA mikropartiküllerinin üretimini sağlamıştır. P β AE ve PLGA'nın harmanlanması, fagositik hücrelere yönelik mikron boyutlu parçacıklar için araştırılmış olsa da, henüz hiçbir çalışma bu polimer kombinasyonunun mikron altı ölçeklerdeki potansiyelini keşfetmemiştir ⁴⁴. Birçok araştırmayla beraber etkili transfeksiyon verimi göstermesini sağlamak amacıyla 2350 lineer P β AE 'ler sentezlenmiştir. P β AE' ler sıklıkla Michael reaksiyonu veya halka açma polimerizasyonu yoluyla sentezlenir, ancak Micheal reaksiyonu, çeşitli diakrilatlar, aminoalkoller ve uç kapatma monomerleri kullanılarak P β AE' lerin farklı yapılarını sentezlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ⁴³. Bu polimerlerin yüzlercesi kombinatorial kimya ile sentezlenebilir ve birçoğu Lipofectamine 2000 (Invitrogen) gibi önde gelen ticari ajanlara kıyasla üstün transfeksiyona neden olurken, aynı zamanda hücreler için daha

az toksiktir ⁴⁵. P β AE' lerin kullanımını zorlaştıran birkaç sınırlama bulunmaktadır ³⁷. P β AE 'ler, hafif asidik, sulu süspansiyon içinde DNA ile elektrostatik olarak kompleksme oluşturduğundan, partiküller, polimerlerin hidrolitik bozunması nedeniyle hızlı salınım özelliklerine sahiptir. Bu serbest bırakma özellikleri hücre içi gen aktarımı için avantajlı olmakla birlikte, klinisyenler veya büyük ölçekli üretim tarafından pratik kullanım için elverişli değildir. Bu nedenle, polimer-DNA nanoparçacıklarının uzun süre saklanabilen ve kullanımdan hemen önce kolayca yeniden oluşturulabilen kurutulmuş bir formunun hazırlanması için bir yol geliştirmek gereklidir. Bu partiküllerin liyofilize edilmesinin ve depolanmasının etkili bir yolu, bu teknolojinin nihai çevirisi için esastır. Tzeng vd. (2011) liyofilizasyon sonrası stabilite ve transfeksiyon etkinliği araştırılmıştır. Yaptıkları çalışmada kriyo ve liyoprotektan olarak sakaroz kullanılarak P β AE /DNA en az iki yıllık soğuk depolamadan sonra transfeksiyon etkinliğinde herhangi bir kayıp olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca, P β AE ' lerin bir kez DNA ile kompleks haline getirildiğinde, 4°C'de liyofilize formda tutulabildiği ve fonksiyon ve boyutunu en az 3 ay koruyarak, uzun süreli depolamaya ve kullanım kolaylığına izin veren, her ikisi de mümkün olabilen formülasyonları da belirlemişlerdir. Sentezlenen polimerlerin glioblastoma (GB) astrositleri beyin tümörü kök hücrelerinin ve her ikisinin sağlıklı (kansersiz olmayan) versiyonlarındaki transfeksiyon verimliliklerinin bir karşılaştırması da ilgi çekicidir, çünkü yakın zamanda hücre tipi özgüllüğünün basitçe polimer yapısının kendisi tarafından belirlenebileceğini bulunmuştur. Burada, normal (%10) serum koşullarında düşük spesifik olmayan toksisite ve %60,6 'ya varan transfeksiyon verimlilikleri ile in vitro olarak birincil GB hücrelerine ve GB tümör kök hücrelerine gen verebilen biyolojik olarak parçalanabilen polimerleri açıklanmıştır ⁴⁵. Aynı DNA bağlanmasını ve aynı tamponlama kapasitesini elde etmek için PEI ile karşılaştırıldığında daha küçük bir P β AE kütlesine ihtiyaç olduğunu bulan; bununla birlikte, test edilen P β AE 'lerin daha düşük toksisitesinden dolayı, P β AE grupları tarafından PEI' den daha fazla transfeksiyon etkinliği elde edilmiştir. P β AE aracı ve nükleik asit yükü arasındaki bağlanma, küçük ve kararlı nanopartiküller halinde kendi kendine bir araya gelmesi için önemlidir; bu, uygulama sonrasında nükleik asidin bozulmasını önler ve katyonik iken yüksek hücre alım verimliliği sağlayan P β AE 'ler diğerlerinden daha düşük yük yoğunluğuna sahiptir. PEI ve PLL dahil olmak üzere gen aktarımı için geleneksel olarak kullanılan polimerler bu nedenle diğer polimerlerle aynı derecede nükleik asit bağlanmasını sağlamak için sıklıkla daha yüksek miktarlarda kullanılmalıdır. Önemli

olarak P β AE' ler kimyasal modifikasyonlar için kullanılabilecek birçok fonksiyonel grup içerir ve birkaç araştırmacı, belirli hücre tiplerine teslim için uyarlanmış veya geleneksel P β AE yapılarının belirli sınırlamalarının üstesinden gelmek için optimize edilmiş P β AE 'ler geliştirmek için bundan faydalanmıştır. Bu kimyasal modifikasyon kolaylığı, olumlu bir güvenlik profilini korurken, PBAE'lerin tasarımının etkinlik için sürekli olarak iyileştirilmesine olanak tanır ve alan, gen teslim uygulamaları için giderek daha uygun olan P β AE 'lere dayalı yeni malzemeler geliştirmeye devam etmektedir ³⁷.

Kitosan, doğal katyonik bir polimerdir ve bugüne kadar düşük molekül ağırlıklı ilaçların, peptit ve proteinlerin kontrollü salım formülasyonlarının hazırlanmasında sıkça kullanılmıştır ve hala kullanılmaktadır. Kitosan ve kitosan türevleri ile hazırlanmış mikro- ve nanopartikül formülasyonları, biyouyumluluk, biyoparçalanırlık, düşük toksisite, kolay hazırlanma ve hidrofilik ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesi elde edilmesi gibi birçok avantajlar sunmaktadır. Kitozan, bu güne kadar plasmid DNA, siRNA, oligodinükleotidler ile sislartin ve doksorubisin gibi kanser ilaçları için taşıyıcı olarak kullanılmıştır ⁴⁶. Malhotra vd. (2013), 5nm boyutunda hazırladıkları siRNA ile kompleks oluşturmuş TAT protein bağlı PEGlenmiş kitozan nanopartiküllerinin ilgili hastalık genini sitotoksiste göstermeden susturduğunu Neuro-2A hücreleri üzerinde göstermiştir ³⁸.

Nonviral gen taşıyıcı vektörler arasında poli beta aminoesterler, geniş aralıkta monomer mevcudiyeti, yüksek polimer fleksibilitesi, üst düzey gen transfeksiyon performansı olması nedeniyle çok yönlü bir aday olarak görülmektedir. Zhou vd. (2016) yaptıkları çalışmada poli beta aminoesterleri gen taşıyıcı ajan olarak kullanmış ve hücre hatları, primer ve kök hücreler üzerinde yaptıkları deneylerde transfeksiyon etkinliğinin oldukça yüksek oranda arttığını gözlemlemişlerdir ⁴⁷.

2.4. Huntington Hastalığı ve Genetik Temelleri

Huntington Hastalığı yaklaşık 25 yıl önce huntingtin protein (HTT) geninin bulunmasıyla keşfedilmiş ve o günden bu güne patojenezi iyice anlaşılmış bir hastalıktır ^{48,49}. Huntington hastalığı (HH), huntingtin proteinin N-ucunda poliglutamin kodlayan CAG tekrarlarının ekspansiyonunun neden olduğu progresif nörodejeneratif bir bozukluktur ^{50,51}. Dördüncü kromozoma lokalize edilmiş Huntington hastalığı geni (IT-15), 67 eksondan oluşan 180 kb uzunluğunda büyük bir

gendir. CAG tekrar sayısına göre hastalık dört kategoriye ayrılır. IT-15 geninde 26 ve daha az tekrar bulunan bireyler sağlıklıdır, 27-35 CAG tekrarı bulunan aleller nesiller arası instabilite gösterir. 36-39 tekrar taşıyan bireylerin bir bölümü hastalığa yakalanırken 40 ve üzeri tekrar taşıyan bireyler uzun yaşadığı takdirde muhakkak hastalığa yakalanacak olarak tanımlanır ⁵¹. CAG tripletleri bulundukları proteinde glutamin amioasidini (Gln veya Q) kodladığından dolayı, bu hastalıklar "Poliglutamin Hastalıkları (PoliGln veya Poli Q) " adı altında toplanır. Poliglutamin hastalıklar X kromozomuna bağlı kalıtım gösteren SBMA (Spinal Bulbar Müsküler Atrofi) hariç, otozomal dominant geçişlidir ve bir takım ortak özellikleri paylaşırlar. Bunlar polimorfik ve instabil CAG tekrarları, ebeveyn çelişkisi, yeni mutasyonlar, antisipasyon ve tekrar sayısı-hastalık başlangıç yaşı arasındaki ters orantı olarak sıralanabilir. Polimorfik CAG tekrarlarının instabilite göstermesi, nesiller arasında aktarılan CAG tekrar sayısının azalması ya da artması olarak tanımlanır. İnstabilitenin en çok görüldüğü beyin bölgesi, bu hastalıklara özgün dejenerasyona uğrayan striyatumdur. CAG tekrarlarının artması ya da azalması, alelli aktaran ebeveynin cinsiyetine göre değişmesi durumuna ebeveyn çelişkisi denir ve bu hastalıkta daha çok babadan geçişte arttığı gözlemlenmiştir ⁵¹.

HTT, HEAT tekrarı diye adlandırılan yaklaşık 50 aminoasit birimlerinin tekrarından oluştuğu düşünülen, glutamin sayısına bağlı olarak değişen ve toplamda 3144 aminoasit biriminden oluşan ve 348 kilodaltonluk (kDa) oldukça büyük bir proteindir ^{1,52}. Bu tekrarlar, kesintisiz hidrofobik bir çekirdeğe sahip süpersarmal (superhelical) yapı olacak şekilde kümeleşen sarmal toka (hairpin) konfigürasyonlu iki tane birbirine paralel olmayan alfa zincir eğrilerinden (helices) oluşur. HTT'nin hücresel fonksiyonları hala tam olarak anlaşılmamıştır. Bu protein, sistein 214 üzerinde palmitolleşme sayesinde membrana bağlanma özelliğine sahip, ağırlıklı olarak sitoplazmik bir proteindir. Hücre çekirdeğine taşınan HTT veziküler transportta bir role sahiptir, gen transkripsiyonunu da regüle edebilir. Aynı zamanda, RNA değişiminde de (trafficking) görev aldığı düşünülmektedir. Yapılan yayınlar (Bunların içerisinde baskın genetik aktarım, anormal agrege proteinlerin varlığı, biyokimya, hücre ve hayvan çalışmalarındaki bulgular vardır) HH'nin, mutant HTT'nin anormal konformasyonundan toksik fonksiyon kazanımında ağırlıklı olarak arttığını gösterir. Aynı zamanda RNA da toksik özelliklere sahip olabilir ve HTT'nin fonksiyon kaybı hastalığın patogenezeine sebebiyet verebilir. HH'nin patogenezinde

önem teşkil eden anahtar özellikler vardır. Bunlardan birincisi, mutant HTT'nin beta yaprak (beta sheet) yapılarını da içeren anormal konfigürasyonlar oluşturma eğiliminde olmasıdır. İkincisi, Huntington hastalarında bu anormal proteinler ile baş etme sistemleri hastalardan ya da modellerden elde edilen hücrelerde ve dokularda bozulurlar. Üçüncüsü, HTT uç kısmından kesilmiştir ve bu yüzden toksik olan N-ucu fragmanları verir. Dördüncüsü, HTT'nin translasyon sonrası modifikasyonları, konformasyonel değişiklikler, agregasyona eğilim hücresel lokalizasyon ve klirens aracılığı ile toksisite üzerinde etkilidir. Beşincisi, mutant HTT'nin çekirdeğe translokasyonu gen ifadelerinin değişmesi yoluyla proteinin toksik etkilerini artırır. Son olarak ise, Huntington hastalarından veya modellerinden alınan örneklerde hücresel metabolik yollar bozulmuştur ¹. HTT'nin hücrede mikrotübül, vesikül ve sinaptik yapılarla ko-lokalize olması, bu proteinin hücre içi transportta ve nörotransmisyonunda rolü olduğunu düşündürür ⁵³.

2.4.1. Huntington Hastalığı'nın Klinik Değerlendirmesi

Santral sinir sistemine (SSS) özgü olan HH, istemsiz hareketler, motor koordinasyon bozukluğu, hafıza kaybı ve çeşitli psikiyatrik rahatsızlıklar ile karakterize edilir. Hastalığın en belirgin patolojik özelliği beyin bazal ganglia bölümündeki selektif nöron ölümüdür ⁵¹. HH'nin klinik belirtileri santral sinir sistemine (SSS) özgü olsa da bazı belirtileri SSS'nin dışında da ortaya çıkar. Bunlar arasında kilo kaybı, kas güçsüzlüğü, metabolik disfonksiyonlar, endokrin bozuklukları sayılabilir. Beyinde ise, yoğun striatal nöron ölümü, %95'e kadar globus pallidus ve substansiya nigra bulunan GABAerjik (gamma-amino-bütirik asit) orta boy dikensi nöron kaybı görülür. Aynı zamanda, serebral kortekste, subkortikal beyaz maddede, talamusta, spesifik hipotalamik çekirdekçikte ve diğer beyin bölgelerinde striatumdan daha ağır olmayacak şekilde atrofi gözlemlenir. İlerlemiş vakalarda, özellikle juvenil başlangıçlarda, daha yaygın bir beyin atrofisi görülür. HH'nin patognomonik patolojik belirtisi çekirdek içindeki ara maddelerden oluşur. Bu ara maddeler nöron çekirdeklerindeki büyükçe agregat olmuş anormal HTT'lerdir. Bu agregatlar hücrenin sitoplazmasında, dendritlerinde, akson terminallerinde de oluşabilir. HTT ifadesinin bütün beyin bölümlerinden ziyade striatal bölgeye daha seçici olmasının temel sebebini hipotezler şu şekilde açıklar; beyinden türetilmiş nörotrofik faktör (BDNF) kaybı, kortikostriatal bölgelerden nörotrofik desteğin azalması ve kortikal glutamaterjik bölgede artan eksitotoksisite olarak değerlendirilebilir. Striatal

seçicilikte ise HTT ve Rhes proteinleri arasındaki etkileşimin önemli rol oynadığı söylenmektedir. Rhes tercihen striatumda eksprese edilir ve diğer Huntington hastalığından etkilenmiş önbeyin alanlarına göre seviyesi azalmıştır ¹.

Huntington hastalığında daha önce de bahsedildiği gibi beynin striatum bölgesinde nöron kaybı görülür. Substansiya nigra ve globus pallidus'a uzanan ve striyatal nöronların %80'ini oluşturan GABAerjik orta boy dikensi projeksiyon nöronları, bu hastalıkta özgün olarak etkilenen nöron grubudur. Hastalığın ilk klinik belirtileri, bu dikensi nöronlara lokalize olmuş striyatal dopamin D1 ve D2 reseptörlerinin %30-40'ının kaybıyla açıklanabilir. Huntington hastalığının son evrelerinde, yani kaudat-putamen nöronlarının %90'ından fazlası kaybedildiğinde ve striatumda atrofi ve gliyoz başladığında, serebral korteks, globus pallidus ve daha az oranda talamus, subtalamik çekirdek, akumbens çekirdeği, substansiya nigra, serebellum ve beyaz maddede de dejenerasyona rastlanabilir.

Gerek normal gerekse mutant huntingtin tüm hücre ve dokularda yaygın olarak sentezlenir, bu nedenle mutant proteinin sadece striatuma özgü nöronlarda dejenerasyona sebep olması dikkat çekici bir konudur. Nöronlar gibi post-mitotik hücrelerde hücre bölünmesi olmadığından, agregatlar hücre çekirdeğinde yüksek konsantrasyonda sabit kalıyor olabilmektedirler. Bu hipotez ile, mitoz inhibitörleri ve hücre farklılaşmasına yol açan faktörler uygulandığında poliQ toksisitesinin artışı gösterilmiştir, bu sebeple neden sadece nöronların zarar gördüğü açıklanabilmektedir ⁵⁴.

Otozomal dominant olan HH; Amerika, Avrupa ve Avustralya toplumlarında, beyaz ırkta her 100,000 kişiden yaklaşık 5-10'unu etkilemektedir ^{55,56}. Buna karşın Japonya'da prevalansı beyaz ırka göre yüzde 5-10 daha düşüktür. Hastalığın klinik tanımında, temelde motor, kognitif ve psikiyatrik sıkıntılar görülür. Daha az bilinen fakat sık görülen belirtileri ise, istenmeyen kilo kaybı, uyku ve sirkadyan ritimdeki bozukluklar ve otonom sinir sistemindeki deformasyonlar olarak görülür ⁵⁶. Motor fonksiyon bozukluğu belirtileri her yeni vakanın %60'ında, davranışsal problemler ise %15'inde, her ikisinin kombine olması ise vakaların %2-25'inde görülür. Hastalığın başlangıç yaşı çocukluktan seksen yaşın sonuna kadar çeşitlik gösterebilir ⁵⁷. Ancak hastalığın en sık görüldüğü yaş aralığı ise 30-50 arasındır ⁵⁶. Hastalığın oluşması ile ölüm arasında geçen ortalama süre 17-20 yıl arasındadır ^{56,57}. Hastalığın

ilerlemesi günlük yaşamda birine bağımlı yaşamaya kadar gider ve sonunda ölümle sonuçlanır⁵⁷.

Huntington hastalarındaki motor fonksiyon bozuklukları oldukça engelleyicidir. İstemsiz hareketleri, oküler hareketlerin anormal kontrolünü ve istemli hareketlerin ayarlanmasında zorluklar olarak görülür⁵⁷. Bu hareket bozuklukları önce parmaklar gibi distal ekstremitelerde ve fasyal kaslarda görülür. Daha sonra vücudun tamamına yayılır. Günlük yaşamlarında, yürüme stabil olmayan bir hal alır ve hastalar nispeten sarhoş görünümü sergilerler⁵⁶. HH'de kore en belirgin istemsiz hareket olarak ortaya çıkar^{56,57}.

Psikiyatrik semptomlar, motor semptomlar çıkmadan çok daha önce hastalarda görülmeye başlar. Hastalarda asabilik ve agresif davranışlar motor fonksiyon bozukluklarından uzun yıllar önce görülmeye başlar (Ross, 2010; Videnovic, 2013). Hastalarda en sık görülen bozukluk ise depresyondur. Bununla beraber kişilikte değişme, ajitasyon, düşünmeden hareket etme, anksiyete, mania, apati, sosyalleşememe ve seksüel bozukluklar da görülür⁵⁷.

Bilişsel gerileme HH'de görülen diğer önemli belirtilerden biridir. İlk motor semptomlar ortaya çıkmadan önce görülür. Bilişsel gerilemenin ise özellikle frontostriyal ağda anormalliklerden kaynaklandığı tespit edilmiştir⁵⁷. Normalde bireyler ayırım yapabilme ve gerekli görülmeyen şeyi göz ardı edebilme yeteneğine sahipken Huntington hastalarında bu ayırımı yapabilme kabiliyeti ortadan kalkar. Hastalar hayatlarını organize edebilme ve önceden çok kolay olarak adlandırdıkları şeyleri planlama kabiliyetlerini de kaybederler. Zihnin esnekliğinin kaybı neticesinde, mental düzenlemeler yapamazlar. Tüm psikomotor prosesler ağır bir şekilde gerileme gösterir⁵⁶. Huntington hastalarında visuospatial (görsel-mekansal) işlem de etkilenir ve hafızadan daha hızlı bir bozulma gösterir⁵⁷.

2.4.2. Huntington Hastalığı'nda Kullanılan Terapötikler

2.4.2.1. Mevcut Terapötikler

Huntington hastalığı tanısı, pozitif aile geçmişi ve doğrulayıcı genetik testin, klinik tablo ile birleştirilmesiyle koyulur. Tedavisi ise motor, davranışsal ve psikiyatrik bozuklukların semptomatik tedavisi ile gerçekleştirilir. Hala hastalığı modifiye eden bir ilaç bulunmamıştır. Huntington hastalığında görülen korenin tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından bu semptomun tedavisi için onay almış tek

ilaç tetrabenazindir. Kore, aynı zamanda antidopaminerjik ilaçlarla da tedavi edilebilir. Agresif davranışların ve HH ile seyreden psikozların tedavisinde nöroleptikler kullanılır. Huntington hastalığı ile ortaya çıkan depresyonda standart depresyon tedavisi ile oldukça iyi yanıt alınır^{56,57}. Huntington hastalığının en belirgin semptomlarından biri olan korenin tedavisinde antidopaminerjik ajan olarak tetrabenazin; antipsikotik ajan olarak haloperidol, pimozide, klozapin, olanzapin, ziprasidon, aripiprazol, risperidon, quetiapin; N-metil-D-Aspartik asit reseptör antagonisti olarak amantadin, memantin; Omega-3- yağ asidi olarak etil-eikosapentoneik asit (EPA) kullanılır. HH kaynaklı kognitif disfonksiyonun tedavisinde rivasitigmin ve donezepil tercih edilir. HH kaynaklı davranışsal bozukluklarda depresyon tedavisinde fluoksetin, venflaksin, mirtazapin, klozapin; psikozun tedavisinde risperidon; asabiyet ve ajitasyonda olanzapin, quetiapin, sertalin, buspiron, valproat ve propranolol tercih edilen ilaç etkin maddeleridir⁵⁷. Huntington hastalığının tedavisinde özellikle korenin giderilmesi için kullanılan cerrahi prosedürler pek tavsiye edilmez ve klinikte de uygulanabilirliği oldukça düşüktür. Bazı durumlarda derin beyin stimülasyonu (deep brain stimulation) da yine korenin tedavisi için kullanılmıştır^{56,57}.

2.4.2.2. Deneyisel Terapötikler

Huntington hastalığında mevcut farmakoterapi maalesef semptomlarda geçici rahatlamanın ötesinde bir şey sunamamakta ve hastalığın hem altında yatan sebebi hem de ilerleyişini durdurma konusunda başarısız kalmaktadır. Bu yüzden Huntington hastalarının standart bakımını daha iyi gerçekleştirmek hastalığın ilerlemesini durduracak yeni bir tedavi stratejisi geliştirmek oldukça önem arz etmektedir¹. Bu bağlamda hastalığın semptomlarını gidermekten ziyade hastalığı modifiye edici tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hastalığı modifiye edici tedavi yöntemleri, temelde dört başlık altında toplanabilir ve bu başlıklar alt başlıklarıyla beraber şu şekilde sıralanabilir: a) Patolojik mekanizmaların önlenmesi [Eksitotoksisite (Örn: Riluzol), BDNF parçalanması (Örn: BDNF gen taşınması), Kaspaz aktivasyonu (Örn: Minosiklin), Agregat formasyonu (Örn: Kongo Kırmızısı), Agregat Akümüasyonu (Örn: Trehaloz), Mitokondriyal Disfonksiyon (Örn: Koenzim Q10), Transkripsiyonel disregülasyon (HDAC inhibitörleri)], b) mutant HTT'ye müdahale [Genom düzenleme metotları (Örn: Çinko parmak proteinleri/Zinc Finger Proteins), Post-transkripsiyonel gen susturma (Örn: siRNA), Post-translasyonel

hedefleme (Örn: scFV-C4 intrabody)], c) Hücre yerine koyma (Fötal striyatal alograflar, insan embriyonik kök hücreleri, insan kaynaklı pluripotent kök hücreleri, d) Hücrelerin Çevresel Zenginleştirilmesi ⁵⁵.

Patolojik mekanizmaların önlenmesi, nöronal disfonksiyonun ve nöron kaybının engellenmesi için HH'nin altında yatan temel patolojik mekanizmaların engellenmesini hedeflemektedir. Hücre yerine koyma, ağırlıklı olarak striatunda oluşan nöronal hücre kaybının mevcut eksikliği gidermesi için dışarıdan hücrelerin yerine koymasını amaçlamaktadır. Çevresel faktörlerin zenginleştirilmesi de hayvan deneylerinde Huntington hastalığının gelişimini yavaşlattığı keşfedilmiştir ve bu yüzden farmakoterapiye tamamlayıcı tedavi şekli olarak ilave edilebilir. Strial bölgedeki hücre kaybını önlemek için geliştirilen gerek nöroprotektif yöntemler ve hücre yerine koyma tedavileri gerekse çevresel faktörlerin iyileştirilmesi hastanın yaşam kalitesini arttırmak için oldukça elverişli yöntemler olmalarına rağmen hastalığın altında yatan temel sebebin tedavisi olmadığı için yine de eksik kalan tedavi yöntemleridir (Imarisio vd., 2008). Buna karşın, oligonükleotid ihtiva eden terapötik yaklaşımlar, mutant HTT (muHTT)'in ekspresyonunu durdurarak veya azaltarak direkt olarak muHTT'ye müdahale ettiği için daha umut vaat eden tedavi yöntemleri olarak görülmektedir ve yapılan çalışmalardan alınan sonuçlar da bu fikri desteklemektedir. Bu stratejiler arasında bulunan, ribozomlar ve DNA enzimleri, RNAi ve Antisens Oligonükleotidler (ASO) aracılığı ile gerçekleştirilen genom-düzenleme teknikleri ve post-transkripsiyonel gen susturma yaklaşımları hepsi mutant HTT'nin sentezinde spesifik azalmalara sebebiyet vermektedir. Aslında bu yaklaşımların çoğu hastalığın ilerleyişini hedefler ve hücresel bozulmalar görülmeden önce bile terapötik müdahaleyi yapılabilir hale getirir ⁵⁸.

HH için post-transkripsiyonel gen susturma üzerine oldukça çalışma yapılmıştır. Katalitik yetkinliklere sahip nükleik asitleri (ribozomlar, DNA enzimleri), ASoları, ve RNAi barındıran oldukça dikkat çekici ve gelişen bir yöntemdir ^{58,59}. Bu nükleik asitler, hedef messenger RNA'nın (mRNA) translasyonel süpresyonunu, degradasyonunu ya da bölünmesini ihtiva eden bir proses boyunca translasyonel etkinliğini modüle ettiği gösterilmiştir. Her ne kadar ortak konsept olan muHTTmRNA (ve böylece muHTT protein yükünü etkilenmesi) indirgenip HH'nin nöropatolojisini ve semptomlarını durdurmak ya da geriletme mantığını paylaşırsa da, etki etme mekanizması belirgin bir şekilde farklıdır ⁵⁵.

Katalitik nükleik asitler, ribozomlar ve DNA enzimlerini içerirler ve hedef mRNA transkriptlerinin onarımını ya da eliminasyonunu hedeflemektedir ⁵⁵.

Antisense Oligonükleotid (ASO) yaklaşımı, 20-25 baz çifti uzunluğunda hedef mRNA'ya tamamlayıcı sekans içeren tek dizili DNA molekülünden oluşur. ASO'lar nükleustaki pre-mRNA'lar ile melezleşir (hybridise) ve 5' ucu formasyonu inhibisyonuna, zincir yapma inhibisyonuna (inhibition of splicing), ve/veya RNaz H degradasyonun aktivasyonuna sebebiyet verir ⁶⁰. Fakat, hibridizasyon sitoplazmada gerçekleşirse, translasyon mRNA transkriptinin yapısal engellemesi (steric hindrance) veya RNaz H degradasyonu ile inhibe edilir. Bu işlem sadece bir mRNA kopyasının inhibisyonu ile sınırlıdır ⁶¹.

Temel biyolojik araştırmalarda çok kısa bir sürede önemli bir devrime yol açan RNA interference (RNAi), şimdi de bazı hastalıklar için potansiyel bir tedavi olanağı gibi görülmektedir. Moleküler biyolojinin ana dogmasına göre, genetik bilgi DNA-RNA-protein yönünde aktarılır. Son buluşlar, RNA'nın bu bilgi akışını her iki yönde regüle ettiği doğrultusundadır. Doğal ortamdaki RNAların gerek beyinde gerekse diğer organlardaki gen ekspresyonunu kontrol ettikleri bilinmektedir. RNAi'de, hedef genlere komplementer olan küçük RNA dupleksleri, protein yapımını, mRNA translasyonunu engelleyerek ya da mRNA'yı degrade ederek bloke ederler ⁵¹. Bu intraselüler yolak, mikroRNAlar (miRNA) aracılığı ile hücrelere gen ekspresyonunu otoregüle edebilme yetisi verir ve gelişimde oldukça önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir ^{62,63}. Özet olarak, bu yolak çift zincirli RNA (dsRNA) ile nükleusta başlayan ve daha sonra endoribonükleaz enzimi (Drosha) ile devam eden bir yolaktır. Daha sonrasında nüklear exportin-5 ile sitoplazmaya taşınır ⁶³. Diğer bir sitoplazmik endoribonükleaz enzimi (Dicer) mikroRNA'ları yaklaşık 21-15 nükleotidli small interfering RNA (siRNA) lara böler ⁶⁴. siRNA'lar, antisense zincirin ve/veya kılavuzun termodinamik seçilimi ve siRNA'nın açılımı ile aktive olan RNA temelli susturucu kompleks (RISC) üzerine yüklüdür. Aktive olmuş RISC, spesifik komplementar mRNA transkriptonlarını arar. Böylece onların degradasyonu için hedefleyecek ve protein üretilmesine engel olacaktır ^{65,66}. Aktive olmuş RISC'ler, pek çok zincir reaksiyonu katalizleme yetisine sahiptir ve ASO'lar ile karşılaştırıldığında gen susturma yaklaşımına potansi artırır.

Wang vd. (2005) yaptığı çalışmada 2 günlük R6/2 tür transgenik farelerde lipid ile enkapsüle edilmiş siRNA'yı tek doz intravenöz vermişlerdir ve çalışmanın

sonunda mutant huntingtin geninin belirgin seviyede sentezinin tedaviden 7 gün sonraya kadar düştüğünü gözlemlemişlerdir. Fakat susturma özelliği tedaviden tam 1 hafta sonra ortadan kalkmıştır. Her ne kadar susturma işlemi bir hafta sonunda sonlanmış olsa da uzun süreli davranışsal iyileşmeler gözlemlendiği rapor edilmiştir⁶⁷.

Diğer bir çalışmada, DiFiglia M. ve ark (2007), kimyasal açıdan modifiye edilmiş ve kolestrol konjüge edilmiş siRNA'ların *in vivo* stabiliteelerini ve hücresel alımlarını arttırmak için, zarar veren lipozom enkapsülasyonunu kullanmadan, geliştirmişlerdir. Viral sistemi taşıyıcı olarak kullandıkları bu yöntemde insan geninin %65 oranında susturulduğu, protein agregasyonunda azalma olduğu ve tedaviden sonra bir hafta boyunca da motor fonksiyonların iyileştiği görülmüştür⁶⁸.

Wong vd. (2010) yaptığı çalışmada, yeni geliştirdikleri taşıyıcı sistem ile *in vitro* şartlarda siRNA'yı sinir hücrelerine uygulamışlar ve nöronal gen ekspresyonunun efektif olarak susturulduğunu gözlemlemişlerdir⁶⁹.

2.5. siRNA'nın Farmakolojik Özellikleri ve Etki Mekanizması

Gen tedavisi, yaşamı tehdit eden çeşitli hastalıkların daha kesin ve kişiselleştirilmiş tedavisini sağlayan, hastalığa neden olan genleri diziye özgü bir şekilde hedeflediği için umut verici bir terapötik platformdur⁷⁰. Gen terapisi sayesinde hastanın istenen dokusuna belirli bir nükleik asit modalitesi ekleyerek, gen ekspresyonu azaltılabilir, artırılabilir veya düzeltilebilir. Küçük enterferans yapan RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) ve inhibitör antisens oligonükleotitler (ASO'lar), gen inhibisyonunu tetiklemek için kullanılan temsili moleküllerken plazmit DNA, haberci RNA (mRNA), küçük aktive edici RNA (saRNA), ekleme modülatör ASO'lar ve CRISPR (kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrarlar)/Cas (CRISPR ile ilişkili protein) sistemleri genellikle hedef gen ekspresyonunu artırmak veya düzeltmek için kullanılmaktadır⁷¹⁻⁷³. Bugüne kadar, belirli hastalıkları tedavi etmek için birçok terapötik program araştırılmıştır.

RNA interferansı (RNAi), eksojen genlerin istilası için doğal bir savunma mekanizmasıdır. RNAi modaliteleri, örneğin siRNA ve miRNA, hedeflenen mRNA bozulmasına (siRNA ve miRNA için) veya mRNA translasyon baskısına (miRNA için) aracılık ederek hedef genlerin ekspresyonunu diziye özgü bir şekilde devre dışı bırakabilmektedir⁷⁴. siRNA ve miRNA arasındaki küçük farklılıkların bir sonucu

olarak, siRNA tipik olarak miRNA'dan daha verimli ve spesifik gen susturmayı tetikleyebilirken, bir miRNA aynı anda birkaç farklı hedef genin ekspresyonunu tehlikeye atabilir. Bu nedenle, siRNA ve miRNA'nın farmasötik uygulamada farklı rolleri vardır.

1998'de RNAi konseptinin kurulmasından bu yana, siRNA terapötikleri birçok iniş ve çıkış yaşamıştır. 2001'de Tuschl ve ark.⁷⁵ kimyasal olarak sentezlenmiş siRNA'yı memeli hücrelerine sokarak belirli bir genin ekspresyonunu başarılı bir şekilde susturdu ve gelişimsel bir artışın ortaya çıkmasına neden olmuştur. siRNA tedavisi bir zamanlar stabilitesi, özgüllüğü ve taşınması engelleri nedeniyle zarar görmüş olsa da, kimyasal modifikasyon ve taşınmasındaki ilerlemeler, alanı son yıllarda yeniden sağlam ve hızla gelişen bir araştırma alanına getirmiştir. 20 yıllık bir yolculuktan sonra, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu (EC), 2018'de yetişkinlerde kalıtsal polinöropatili amiloidoz olan amiloidojenik transtiretin tedavisi için ilk ticari RNAi bazlı terapötik olarak ONPATRO®'yu (patisiran, ALN-TTR02) onaylamıştır. Yakın zamanda, FDA akut hepatik porfirili (AHP) yetişkinlerin tedavisi için GIVLAARI™ (givosiran, ALN-AS1) adıyla bir RNAi bazlı terapötik ajanı da onaylamıştır^{71,76-78}.

siRNA, küçük moleküler terapötikler ve monoklonal antikor ilaçlarına göre doğuştan gelen avantajlara sahiptir, çünkü siRNA, işlevini mRNA ile tam Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla yürütürken, küçük molekül ve monoklonal antikor ilaçlarının belirli proteinlerin karmaşık uzamsal yapısını tanıması gerekmektedir. Sonuç olarak, yüksek aktivite, afinite ve özgüllüğe sahip bir hedef molekül tanımlanamadığı için küçük molekül ve monoklonal antikor ilaçları ile tedavi edilemeyen birçok hastalık vardır. Tersine, teorik olarak, hedeflenen mRNA boyunca yalnızca doğru nükleotid dizisinin seçilmesi gerektiğinden, ilgili herhangi bir gen siRNA tarafından hedeflenebilir. Bu avantaj, özellikle bu tür stratejilerle geliştirilmesi mümkün olmayan genler için, küçük molekül veya antikor ilaçlarından daha kısa bir araştırma ve geliştirme süresi ve daha geniş bir terapötik alan ile siRNA modalitesini verir⁷⁹.

siRNA, ilaç geliştirmede umut verici beklentilere sahip olsa da, çeşitli hücre içi ve hücre dışı engeller, kapsamlı klinik uygulamasını sınırlamaktadır. Çıplak ve değiştirilmemiş siRNA, (1) yetersiz stabilite ve zayıf farmakokinetik davranış ve (2) hedef dışı etkilerin olası indüksiyonu gibi bazı dezavantajlara sahiptir. siRNA'nın

fosfodiester bağı, RNazlara ve fosfatazlara karşı savunmasızdır. Sistemik olarak dolaşıma verildikten sonra, vücuttaki endonükleazlar veya eksonükleazlar, siRNA'yı hızla parçalara ayıracak ve böylece amaçlanan dokuda bozulmamış terapötik siRNA'nın birikmesini önleyecektir. Teoride siRNA, yalnızca antisens zinciri hedef mRNA ile tamamen baz eşlendiğinde işlev görür. Bununla birlikte, birkaç uyumsuzluk, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) tarafından tolere edilir ve bu, birkaç nükleotit uyumsuzluğu ile bu genlerin istenmeyen susturulmasına yol açabilir. Ek olarak, siRNA'nın RISC yüklü sens zinciri, diğer alakasız genlerin ekspresyonunu da bozabilir. Ayrıca, formüle edilmemiş ve değiştirilmemiş siRNA, Toll-like reseptör 3'ün (TLR3) aktivasyonuna yol açabilir ve kan ve lenfatik sistemleri olumsuz etkileyebilir⁸⁰. siRNA'nın bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için çeşitli kimyasal modifikasyonlar ve taşıyıcı sistemler geliştirilmeye devam etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kitozan	: Sigma, Almanya
Gallik asit	: Sigma, Almanya
Asetik asit	: Sigma, Almanya
3-dimetilamino-1-propilklorür hidroklorür (DAPC)	: Sigma, Almanya
N-(2-hidroksietil)etilendiamin (HE-EDA)	: Sigma, Almanya
EDAC	: Sigma, Almanya
Metoksi-PEG ₂₀₀₀	: Sigma, Almanya
Neopentil glikol diakrilat (NPGDA)	: Sigma, Almanya
Polibeta aminoester (PBAE)	: Sigma, Almanya
Dietil eter	: Sigma, Almanya
NPGDA diakrilat	: Sigma, Almanya
Tetrahidrofuran (THF)	: Merck, Almanya
Polietilenglikol diakrilat (PEGDA)	: Merck, Almanya
Etanol (EtOH)	: Merck, Almanya
Dimetilsülfoksitde (DMSO)	: Sigma, Almanya
Tetraetilen glikol dimetakrilat (TEGDMA)	: Sigma, Almanya
N,N-Disikloheksilcarbodiimid (DCC)	: Sigma, Almanya

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Liyofilizatör	: Lyovac GT2E, Steris, Almanya
TSK-jel GMPWXL kolonu	: Tosoh Bioscience; Japonya
DAWN çok açılı ışık saçılımı (MALS) detektörü:	Wyatt, ABD
FTIR cihazı Cary 630 model	: Agilent; ABD
Nükleer manyetik rezonans spektrofotometresi	: Varian, Kanada
Termogravimetrik analiz cihazı	: Linseis, STA PT 1750 model, ABD
Vortex	: IKA Vortex, Genius 3, Almanya
Foton korelasyon spektroskopisi	: Malvern Zetasizer, Nano-ZS, İngiltere
Buzdolabı	: Siemens, Almanya
PCR cihazı	: SimpliAmp-ThermoFischer, Almanya
Kreyostat cihazı	: Leica, Almanya
Pozitif yüklü cam	: Isotherm, Almanya
-20°C Soğutucu	: Siemens, Almanya
Emitech K550 Sputter Coater	: Quorum Technologies Ltd, İngiltere
TEM/SEM	: ThermoFisher Scientific, ABD
Agaroz jel elektroforez	: Cleaver Scientific Ltd., İngiltere
BIORAD CFX Connect Real Time System	: ABD
Anymaze, Stoelting Europe	: ABD
Florasan Mikroskop	: Zeiss Axiovert, Almanya

3.2. Yöntem ve Deneyler

3.2.1. Polimer Sentezi

Polimer sentezi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü'nde Prof. Dr. Saadet Pabuccuoğlu'nun ve Doç. Dr. Mehmet Koray Gök'ün yardımları ile sentezlenmiştir.

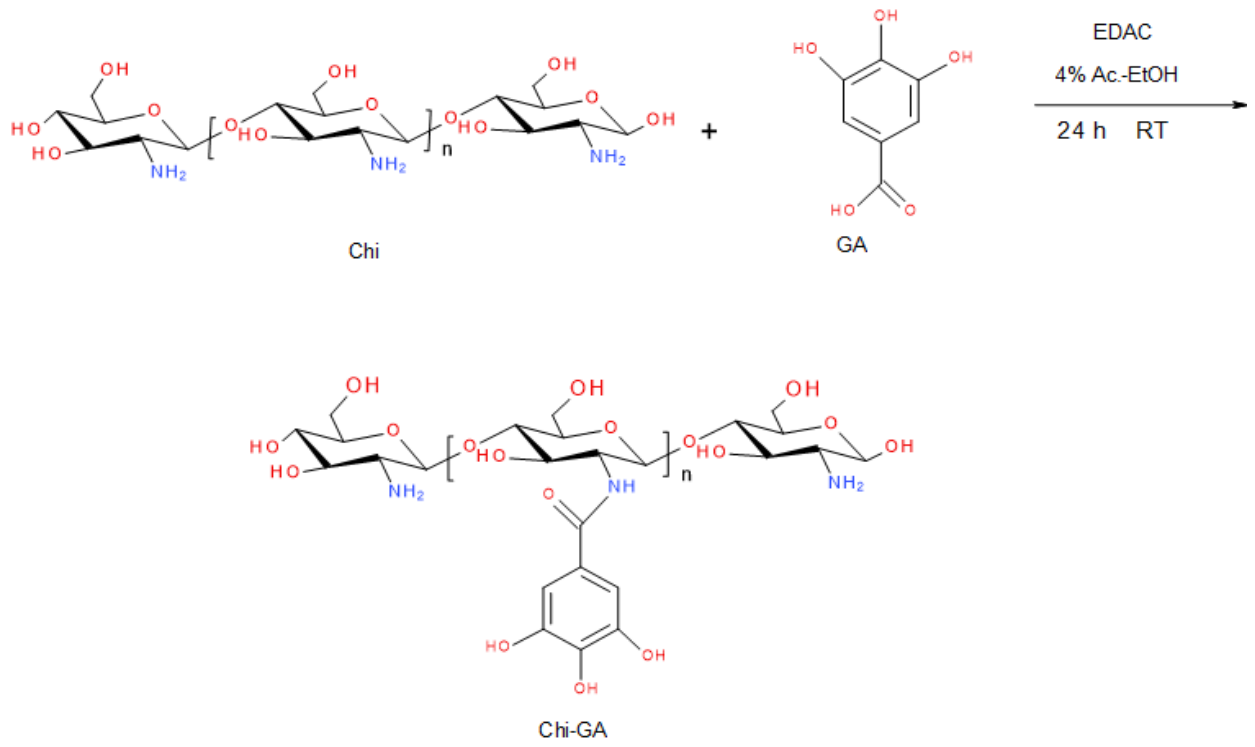
3.2.1.1. Kitozanın PEGlenmiş Aminli Bileşiklerinin Sentezi

Peglenmemiş kitozanların (Chi) sentezinde gallik asit (GA), 3-dimetilamino-1-propilklorür hidroklorür (DAPC), N-(2-hidroksietil)etilendiamin (HE-EDA) kullanılmıştır. Bu bağlamda Chi-GA-DAPC (K1), Chi-HE-EDA (K2) ve Chi-GA-HE-EDA (K3) modifiye kitozanları sentezlenmiştir. Bununla beraber K1, K2, K3 modifiye kitozanları PEGlenmiştir (PEG-K1, PEG-K2, PEG-K3). Sentez yöntemleri aşağıda anlatılmıştır.

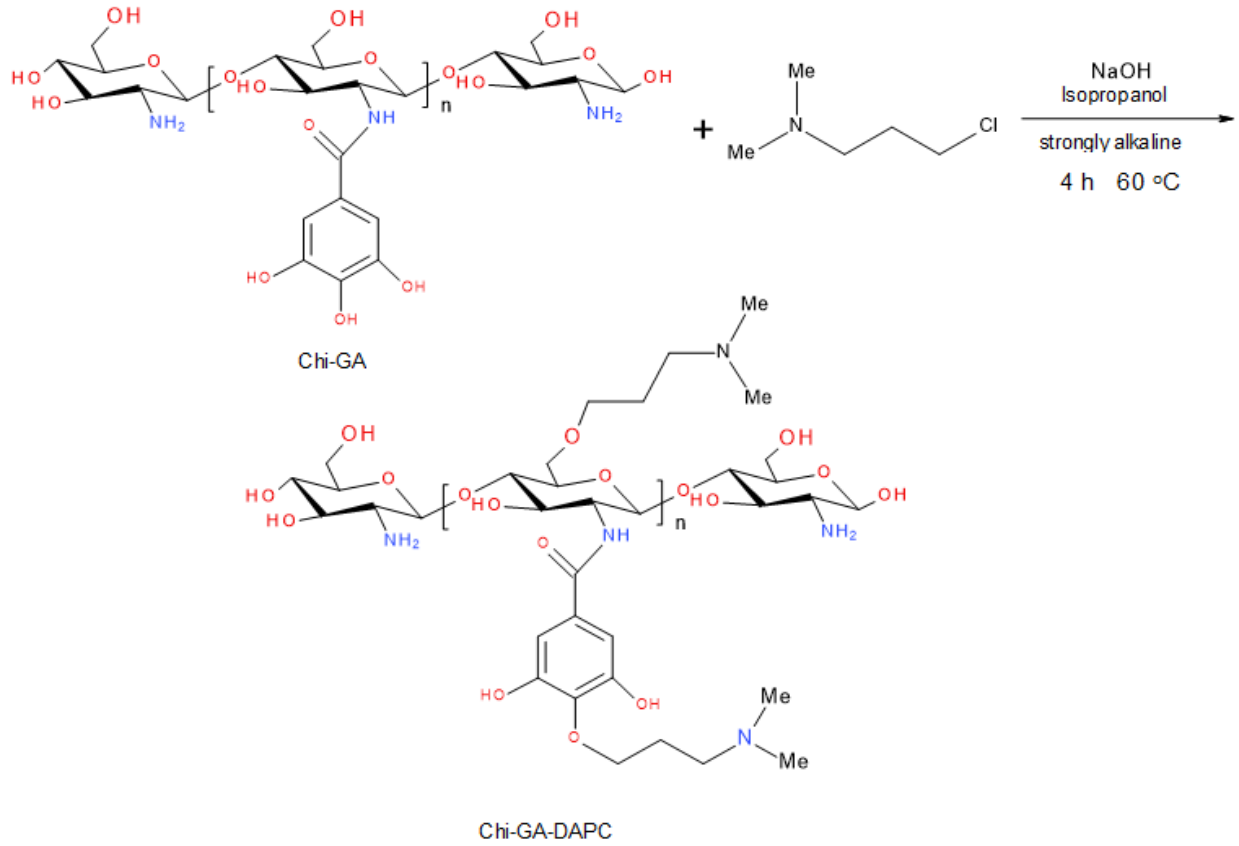
Chi-GA-DAPC (K1) Sentezi

Kitosan, %4'lük asetik asit içerisinde %1 (a/h) olacak şekilde çözüldü. Gallik asit (GA) (1 mol glukozamin ünitesi başına 1 mol GA olacak şekilde) 10 mL etanol içinde çözüldü ve GA'nin karboksilik asit gruplarını aktive etmek için EDAC kullanıldı. EDAC ile aktive edilmiş GA çözeltisi kitosan çözeltisi üzerine damla damla katılarak 24 saat oda sıcaklığında 250 rpm hızla karışmaya bırakıldı. Reaksiyon süresi sonunda, 1 N NaOH ile pH 8,5-9 aralığına ayarlanarak Chi-GA çökmesi sağlandı. Saflandırma için Chi-GA 9000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi ve her santrifüj işleminden sonra deiyonize su ile yıkanarak işlem 3 kere tekrar edildi. Saflaştırma sonrası ürün 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C'de liyofilize edildi (Lyovac GT2E, Steris, Almanya) ve +4 °C'de saklandı.

Chi-GA-DAPC'nin sentezi için, 1 g Chi ve 5 g NaOH, 40 mL çözücü (32 mL izopropanol, 8 mL su) içinde 60°C'de 1 saat boyunca alkalize etmek üzere karıştırıldı. Bunun yanında DAPC (1 mol GA modifiye glukozamin ünitesi başına 0,5 mol DAPC olacak şekilde), 1,176 mL izopropanol içinde çözüldü ve bu çözelti her 5 dakikada bir 168 µL olacak şekilde Chi çözeltisi üzerine ilave edilerek 30 dakikalık bir süre boyunca karıştırıldı. Karışım 4 saat boyunca 500 rpm'de karıştırıldı ve inkübasyon süresinin sonunda, reaksiyonu durdurmak için 60 mL teknik etanol ilave edildi. Daha sonra karışım 5 dakika 5000 rpm'de santrifüjlendi ve teknik etanol ve %99 saf etanol kullanılarak iki kez yıkandı. Daha sonra, ürün bir cam Petri kabı üzerine toplandı ve 50°C'de vakum altında kurutuldu. Ürün +4°C'de saklandı.



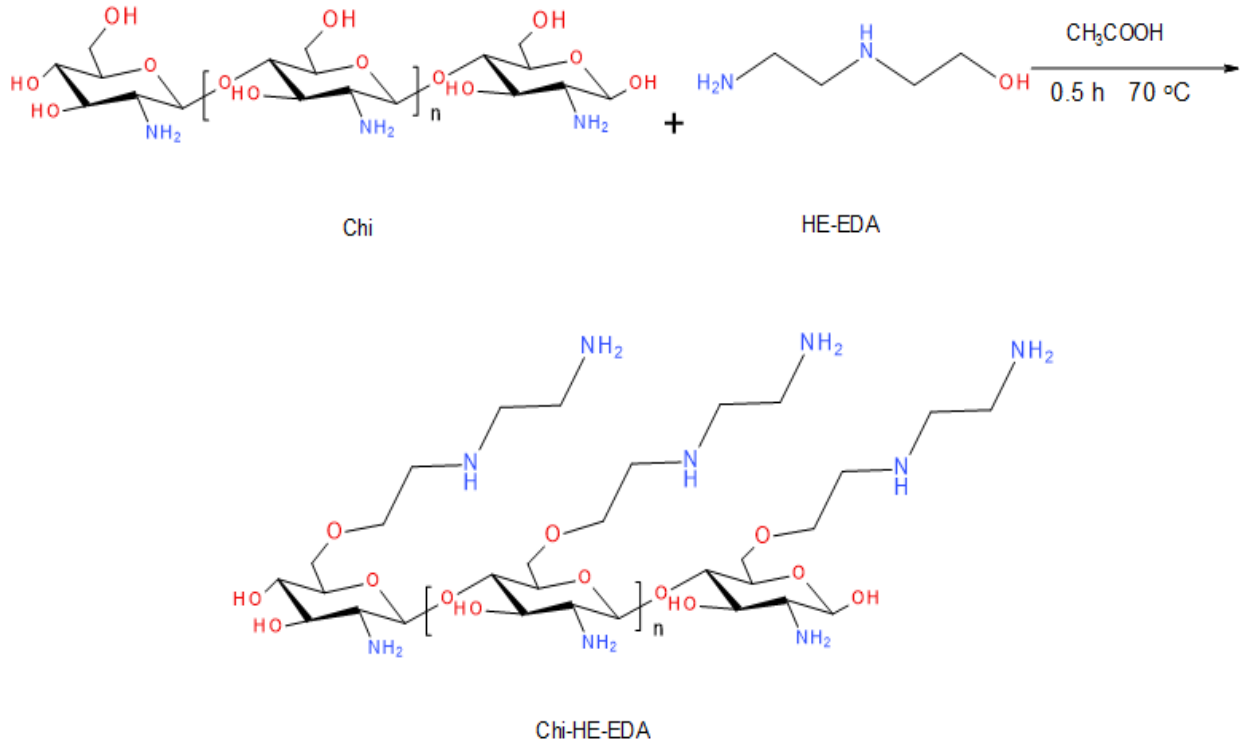
Şekil 1: Chi-GA Sentezi



Şekil 2: Chi-GA-DPAC Sentezi

Chi-HE-EDA (K2) Sentezi

Chi-HE-EDA bileşiğinin sentezi, kitosanın moleküler yapısındaki metilol gruplarının amin bileşiği ile modifikasyonu yapılarak gerçekleştirildi. Kitosan bileşiği %4'lük asetik asit çözeltisi içinde ısıtılarak (50-55°C) çözündürüldükten sonra, 1 mol glukozamin ünitesi başına 0,5 mol N-(2-hidroksietil) etilendiamin olacak şekilde amin bileşiği katılarak 70°C'de 30 dak karıştırıldı. Takiben saflaştırma işlemi için çözelti soğuk aseton içerisinde çöktürüldü, süzüldü ve 40°C'de vakum altında kurutularak +4°C'de saklandı.



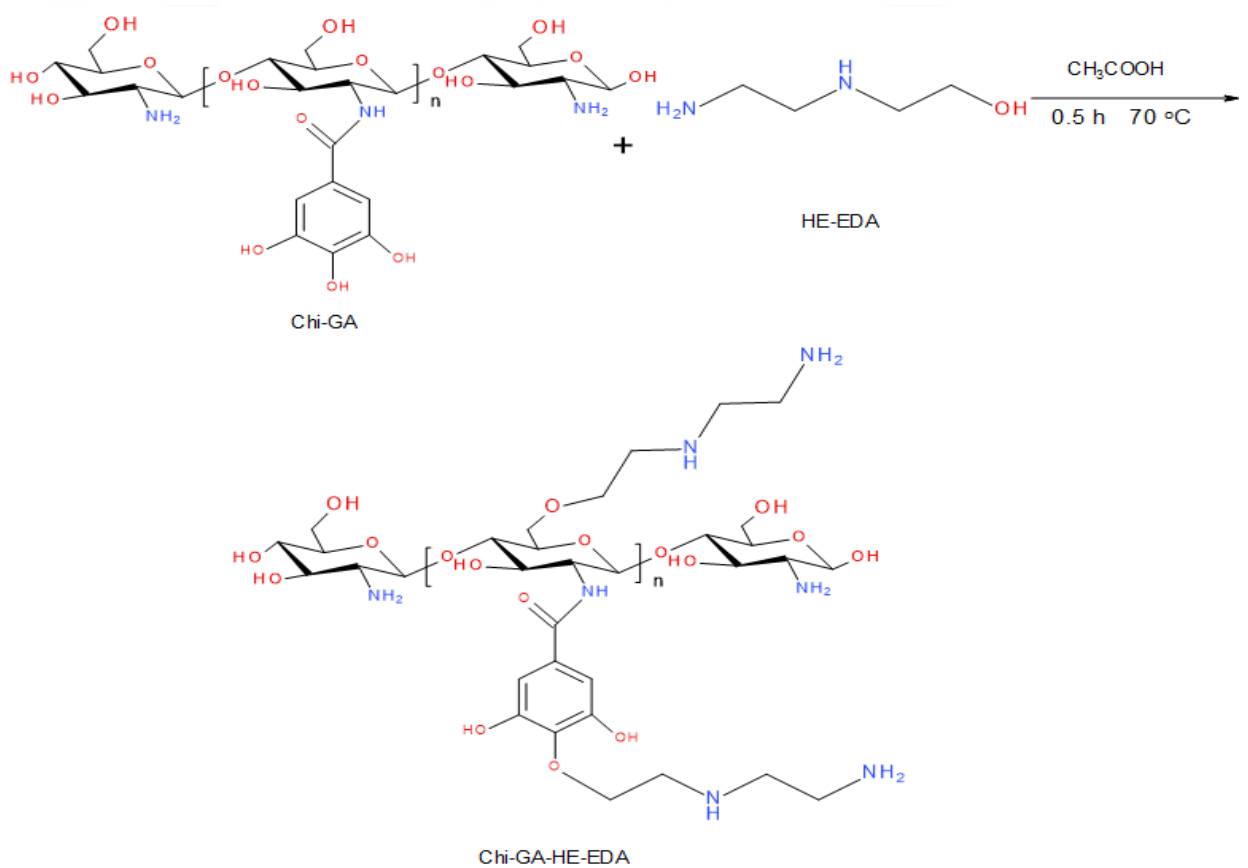
Şekil 3: Chi-HE-EDA Sentezi Şematik Gösterimi

Chi-GA-HE-EDA (K3) Sentezi

Kitosan, %4'lük asetik asit içerisinde 1% (a/h) olacak şekilde çözündürüldü. Gallik asit (GA) (1 mol glukozamin ünitesi başına 1 mol GA olacak şekilde) 10 mL etanol içinde çözüldü ve GA'nin karboksilik asit gruplarını aktive etmek için EDAC kullanıldı. EDAC aktiviteli GA çözeltisi kitosan çözeltisi üzerinde damla damla katılarak 24 saat oda sıcaklığında 250 rpm hızla karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda, 1 N NaOH ile pH 8.5-9 aralığına ayaralanarak Chi-GA çökmesi sağlandı. Saflaştırma için Chi-GA 9000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi ve her santriüj işleminden sonra deiyonize su ile yıkanarak işlem 3 kere tekrar edildi. Saflaştırma

sonrası ürün 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C’de liyofilize edildi (Lyovac GT2E, Steris, Almanya) ve $+4$ °C’de saklandı.

Chi-GA-HE-EDA bileşiğinin sentezi, ürünün moleküler yapısı üzerindeki metilol grupları ve gallik asit üzerindeki hidroksil gruplarının amin bileşiği ile modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Chi-GA bileşiği %4’lük asetik asit çözeltisi içinde ısıtılarak ($50-55$ °C) çözündürüldükten sonra, 1 mol glukozamin ünitesi başına 0,5 mol N-(2-hidroksietil)etilendiamin olacak şekilde amin bileşiği katılarak 70°C ’de 30 dak karıştırıldı. Takiben saflaştırma işlemi için çözelti soğuk aseton içerisinde çöktürüldü, süzüldü ve 40°C ’de vakum altında kurutularak $+4^{\circ}\text{C}$ ’de saklandı.



Şekil 4: Chi-GA-HE-EDA Sentezi Şematik Gösterimi

PEG ile Modifikasyon İşlemi

K1, K2 ve K3 ürünleri %1’lik asetik asit içerisinde çözüldü. Metoksi-PEG₂₀₀₀ ürününden 10:1 mol (K1, K2, K3: Metoksi-PEG₂₀₀₀) olacak şekilde alınarak ve ürünleri içeren çözelti içerisine katılarak 48 saat 50°C ’de karıştırıldı.

Reaksiyon süresi sonunda PEG ile ürünler deiyonize suya karşı 24 saat boyunca dializ edildi ve 0,01 mbar basınçta $-50 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de liyofilize edildi (Lyovac GT2E, Steris, Almanya). Elde edilen ürünler $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

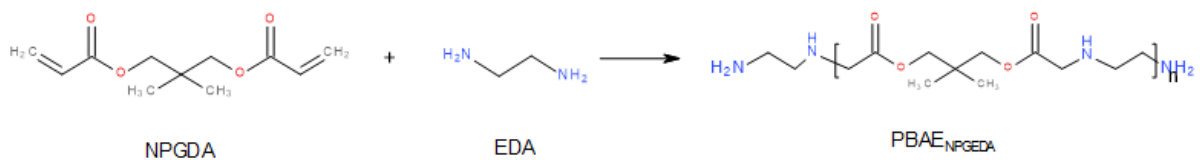
3.2.1.2. Poli Beta Aminoester Polimerlerinin Sentezi

Polimerlerin sentezinde negatif yüklü akrilatlar (dietilenglikol diakrilat, tetraetilenglikol dimetakrilat, trimetiloilpropan etoksilat metileter diakrilat, neopentilglikol diakrilat, polietilenglikol diakrilat, bisfenol A etoksilat diakrilat, 1,6-hekzandiol diakrilat, dietilen glikol diakrilat) ve amin yapısındaki monomerler (etilendiamin monomerleri) kullanılmıştır. Polimerlerin sentez yöntemleri aşağıda belirtilmiştir.

PBAE_{NPGDA} (G) Polimerinin Sentezi

Sentez optimizasyonu çalışmaları kapsamında Neopentilglikol etilen diamin polibeta aminoester (PBAE_{NPGDA}) polimerinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında neopentil glikol diakrilat (NPGDA) bileşiği ve etilendiamin (EDA) monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{NPGDA} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı.

Polibeta aminoester (PBAE) ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı^{81,82}.

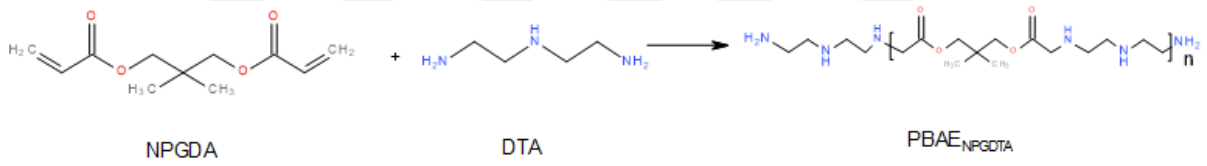


Şekil 5: G polimerinin sentezinin şematik gösterimi

Elde edilen ürün dietileterde çöktürülemediği için $\text{PBAE}_{\text{NPGDA}}$ bileşiğinin diğer analizleri gerçekleştirilmemiştir.

$\text{PBAE}_{\text{NPGDTA}}$ (H) Polimerinin Sentezi

Sentez optimizasyonu çalışmaları kapsamında Neopentilglikol dietilen triamin polibeta aminoester ($\text{PBAE}_{\text{NPGDTA}}$) polimerinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında NPGDA diakrilat bileşiği ve N-(2-hidroksietil)etilendiamin (DTA) monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen $\text{PBAE}_{\text{NPGDTA}}$ ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı 81,82.



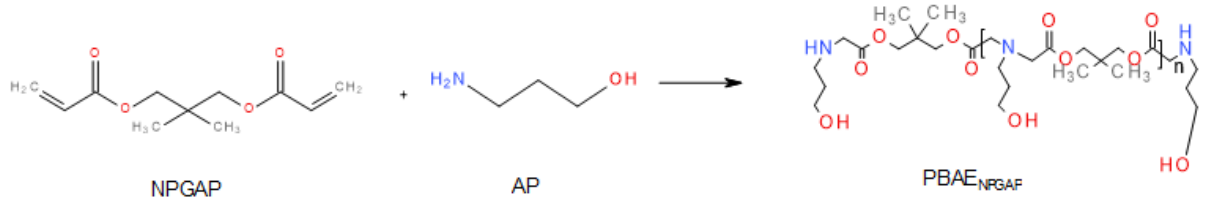
Şekil 6: H polimerinin sentezinin şematik gösterimi

Elde edilen ürün dietileterde çöktürülemediği için $\text{PBAE}_{\text{NPGDTA}}$ bileşiğinin diğer analizleri gerçekleştirilmemiştir.

$\text{PBAE}_{\text{NPGAP}}$ (L) Polimerinin Sentezi

Sentez optimizasyonu çalışmaları kapsamında $\text{PBAE}_{\text{NPGAP}}$ bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında NPGDA diakrilat bileşiği ve 3-amino-1propanol (AP) monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen $\text{PBAE}_{\text{NPGAP}}$ ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz

dietil eter içerisinde damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak +4 °C’de saklandı ^{81,82}.

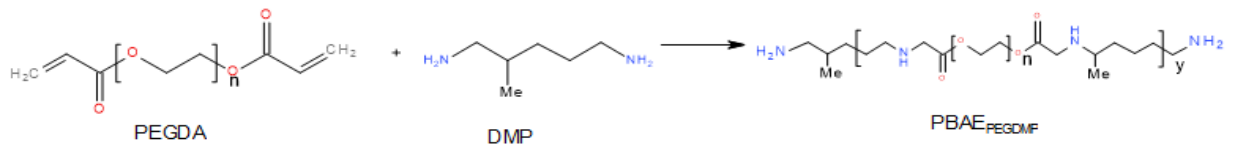


Şekil 7: L polimerinin sentezinin şematik gösterimi

Elde edilen ürün dietileterde çötürülemediği için PBAE_{ENGPAP} bileşiğinin diğer analizleri gerçekleştirilmemiştir.

PBAE_{PEGDMP} (A1-2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında tetrahidrofuran (THF) çözücüsü içerisinde polietilenglikol diakrilat (PEGDA) bileşiği ve 1,5-diamino-2-metilpentan (DMP) monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C ’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{PEGDMP} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisinde damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak $+4^\circ\text{C}$ ’de saklandı ^{81,82}.

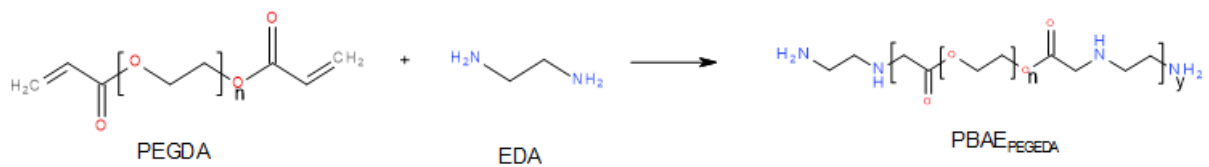


Şekil 8: A1-2 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{PEGEDA} (A1-3) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde polietilenglikol diakrilat (PEGDA) bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin,

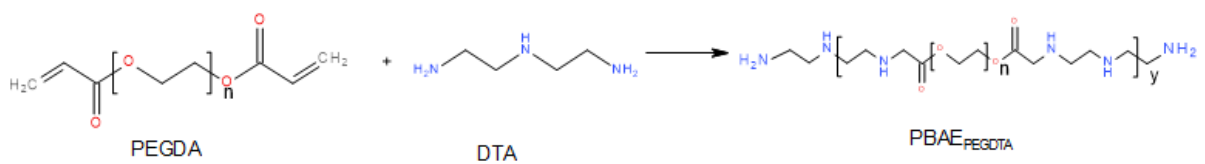
oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{PEGEDA} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak +4 °C’de saklandı^{81,82}.



Şekil 9: A1-3 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{PEGDTA} (A1-5) Polimerinin Sentezi

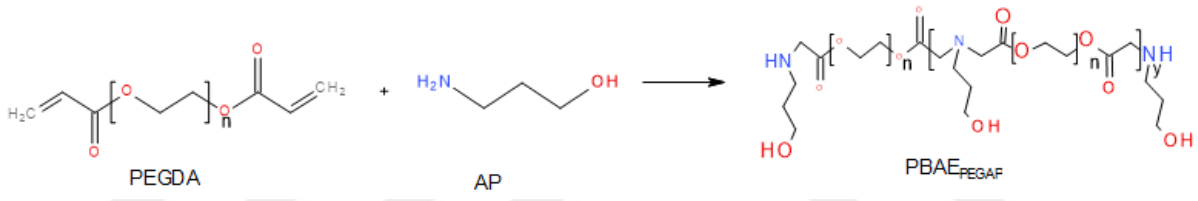
PBAE_{PEGDTA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde PEGDA diakrilat bileşiği ve DTA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{PEGDTA} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak +4 °C’de saklandı^{81,82}.



Şekil 10: A1-5 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{PEGAP} (A1-4) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{PEGAP} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 11: A1-4 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{PEGDMP} (B1-2) Polimerinin Sentezi (Azot Ortamı)

PBAE_{PEGDMP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve DMP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGDMP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 8'de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMP} (B1-2) Polimerinin Sentezi (Atmosfer)

PBAE_{PEGDMP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, atmosferde PEGDA diakrilat bileşiği ve DMP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1

mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 8’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGEDA} (B1-3) Polimerinin Sentezi (Azot Ortamı)

PBAE_{PEGEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4 °C’de saklandı. PBAE_{PEGEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 9’da gösterilmiştir.

PBAE_{PEGEDA} (B1-3) Polimerinin Sentezi (Atmosfer)

PBAE_{PEGEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, atmosfer PEGDA diakrilat bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 9’da gösterilmiştir.

PBAE_{PEGAP} (B1-4) Polimerinin Sentezi (Azot Ortamı)

PBAE_{PEGAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGAP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGAP} (B1-4) Polimerinin Sentezi (Atmosfer)

PBAE_{PEGAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, atmosfer altında PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli

karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGAP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGAP-1} (X1) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGAP-1} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,2 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGAP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11’de gösterilmiştir.

Elde edilen ürün etanol (EtOH) ve dimetilsülfoksitte (DMSO) çözünmediği/disperse olmadığı için ileri deneylerde kullanılmamıştır.

PBAE_{PEGAP-2} (X2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGAP-2} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,3 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGAP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11’de gösterilmiştir.

Elde edilen ürün etanol (EtOH) ve dimetilsülfoksitte (DMSO) çözünmediği/disperse olmadığı için ileri deneylerde kullanılmamıştır.

PBAE_{PEGAP-3} (X3) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGAP-3} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25 °C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,4 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGAP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11’de gösterilmiştir.

Elde edilen ürün etanol (EtOH) ve dimetilsülfoksitte (DMSO) çözünmediği/disperse olmadığı için ileri deneylerde kullanılmamıştır.

PBAE_{PEGAP-4} (X4) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGAP-4} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:2,0 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGAP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11'de gösterilmiştir.

Elde edilen ürün etanol (EtOH) ve dimetilsülfoksitte (DMSO) çözünmediği/disperse olmadığı için ileri deneylerde kullanılmamıştır.

PBAE_{PEGDTA} (B1-5) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDTA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA diakrilat bileşiği ve DTA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGDTA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 10'da gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDTA} (B1-5) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDTA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, atmosfer altında PEGDA diakrilat bileşiği ve DTA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGDTA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 10'da gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMP} (C1-2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında 2 mL DMSO çözücüsü içerisinde PEGDA diakrilat bileşiği ve DMP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de

saklandı. PBAE_{PEGDMP} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 8’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGEDA} (C1-3) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında 2 mL DMSO çözücüsü içerisinde PEGDA diakrilat bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C ’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ ’de saklandı. PBAE_{PEGEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 9’da gösterilmiştir.

PBAE_{PEGAP} (C1-4) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında 2 mL DMSO çözücüsü içerisinde PEGDA diakrilat bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C ’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ ’de saklandı. PBAE_{PEGEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 11’de gösterilmiştir.

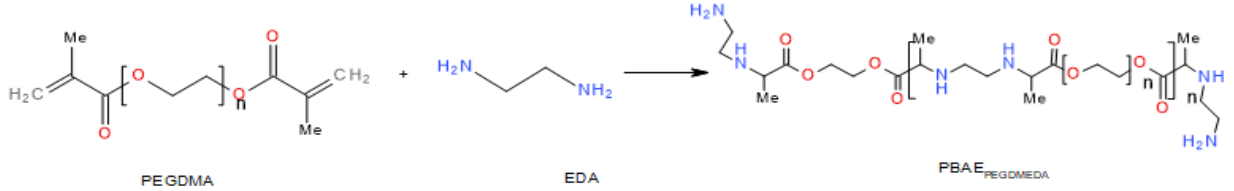
PBAE_{PEGDTA} (C1-5) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDTA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında 2 mL DMSO çözücüsü içerisinde PEGDA diakrilat bileşiği ve DTA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C ’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ ’de saklandı. PBAE_{PEGEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 10’da gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMEDA} (E1) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında polietilenglikol dimetakrilat (PEGDMA) bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda

sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,2 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı.



Şekil 12: E1 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{PEGDMEDA} (E2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,3 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 12’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMEDA} (E3) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,4 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 12’de gösterilmiştir.

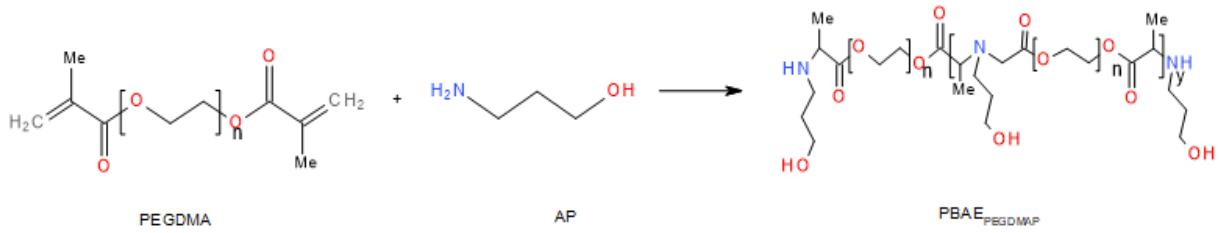
PBAE_{PEGDMEDA} (E4) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:2 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli

karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 12’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMA} (D1) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:2 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı.



Şekil 13: D1 bileşiğinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{PEGDMA} (D2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,3 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 13’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMA} (D3) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,4 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 13’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMA} (D4) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi için öncelikle; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:2 mol) damla damla katılması şeklinde çalışıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 13'de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMA} (P1) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 13'de gösterilmiştir.

Elde edilen ürün etanol ve dimetilsülfoksitte çözünmediği/disperse olmadığı için ileri deneylerde kullanılmamıştır.

PBAE_{PEGDMA} (M1) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 13'de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMA} (M2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli

karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 13’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMEDA} (ME1) Polimerinin Sentezi

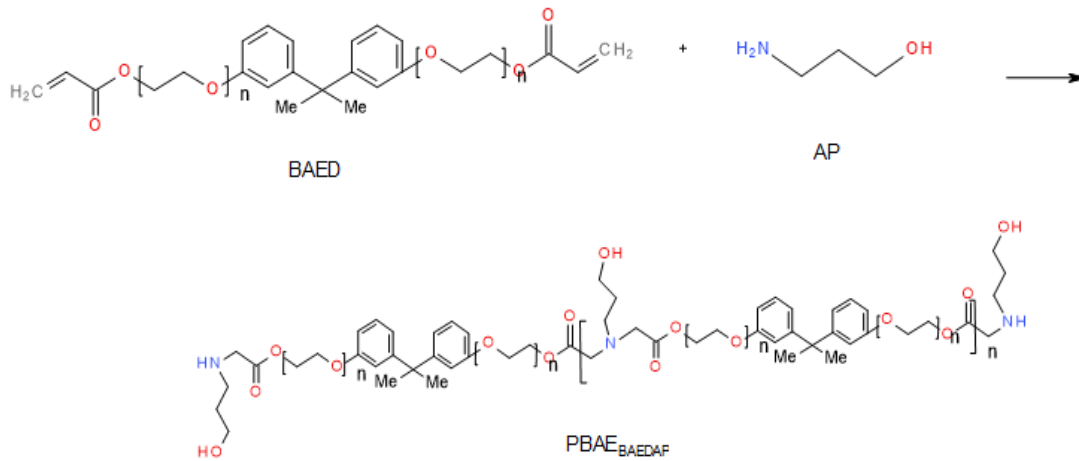
PBAE_{PEGDMEDA} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 12’de gösterilmiştir.

PBAE_{PEGDMEDA-2} (ME2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{PEGDMEDA-2} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında PEGDMA bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,1mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı. PBAE_{PEGDMEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 12’de gösterilmiştir.

PBAE_{BAEDAP} (F1) Polimerinin Sentezi

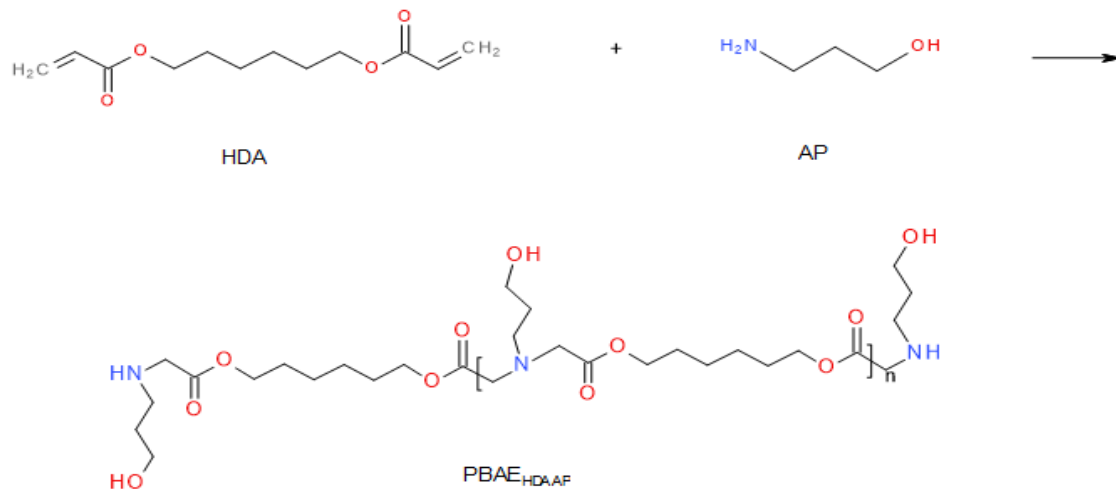
PBAE_{BAEDAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında bisfenol A etoksilat diakrilat (BAED) bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,3 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C’de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün +4°C’de saklandı.



Şekil 14: F1 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{HDAAP} (F2) Polimerinin Sentezi

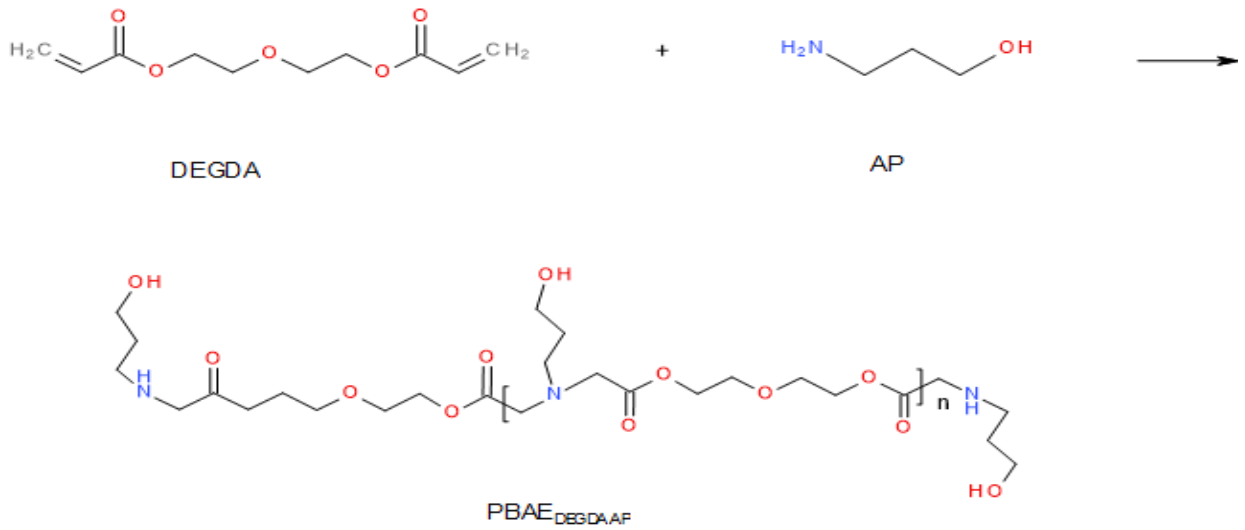
PBAE_{HDAAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında 1,6-hekzandiyl diakrilat (HDA) bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,3 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 15: F2 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{DEGDAAP} (F3) Polimerinin Sentezi

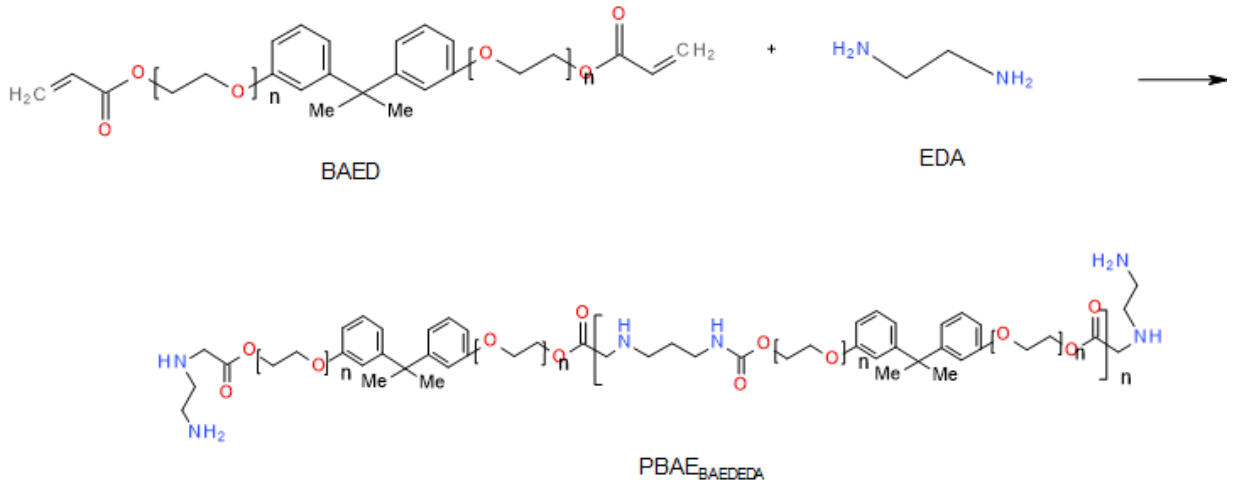
PBAE_{DEGDAAP} bileşiğinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında di(etilenglikol) diakrilat (DEGDA) bileşiği ve AP monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat monomeri üzerine amin monomerinin (diakrilat : amin = 1:1,3 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 60°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. Ürün $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.



Şekil 16: F3 polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{BAEDED-2} (D1-1) Polimerinin Sentezi

PBAE_{BAEDED-2} polimerinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde BAED bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{BAEDED} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutulularak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı^{81,82}.



Şekil 17: D1-1 polimerinin sentezinin şematik görünümü

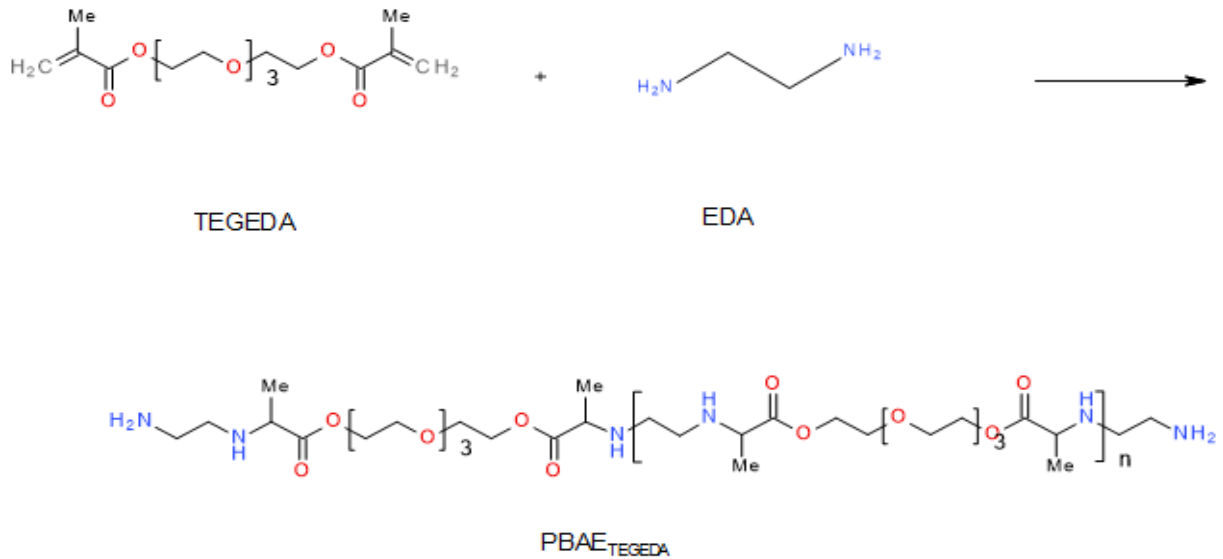
PBAE_{BAEDEDA} (D1-2) Polimerinin Sentezi

PBAE_{BAEDEDA} polimerinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde BAED bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{BAEDEDA} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı^{81,82}. PBAE_{BAEDEDA} polimerinin sentezinin şematik görünümü Şekil 17'de gösterilmiştir.

PBAE_{TEGEDA} (Y) Polimerinin Sentezi

PBAE_{TEGEDA} polimerinin sentezi; $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde tetraetilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat : diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{TEGEDA} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş

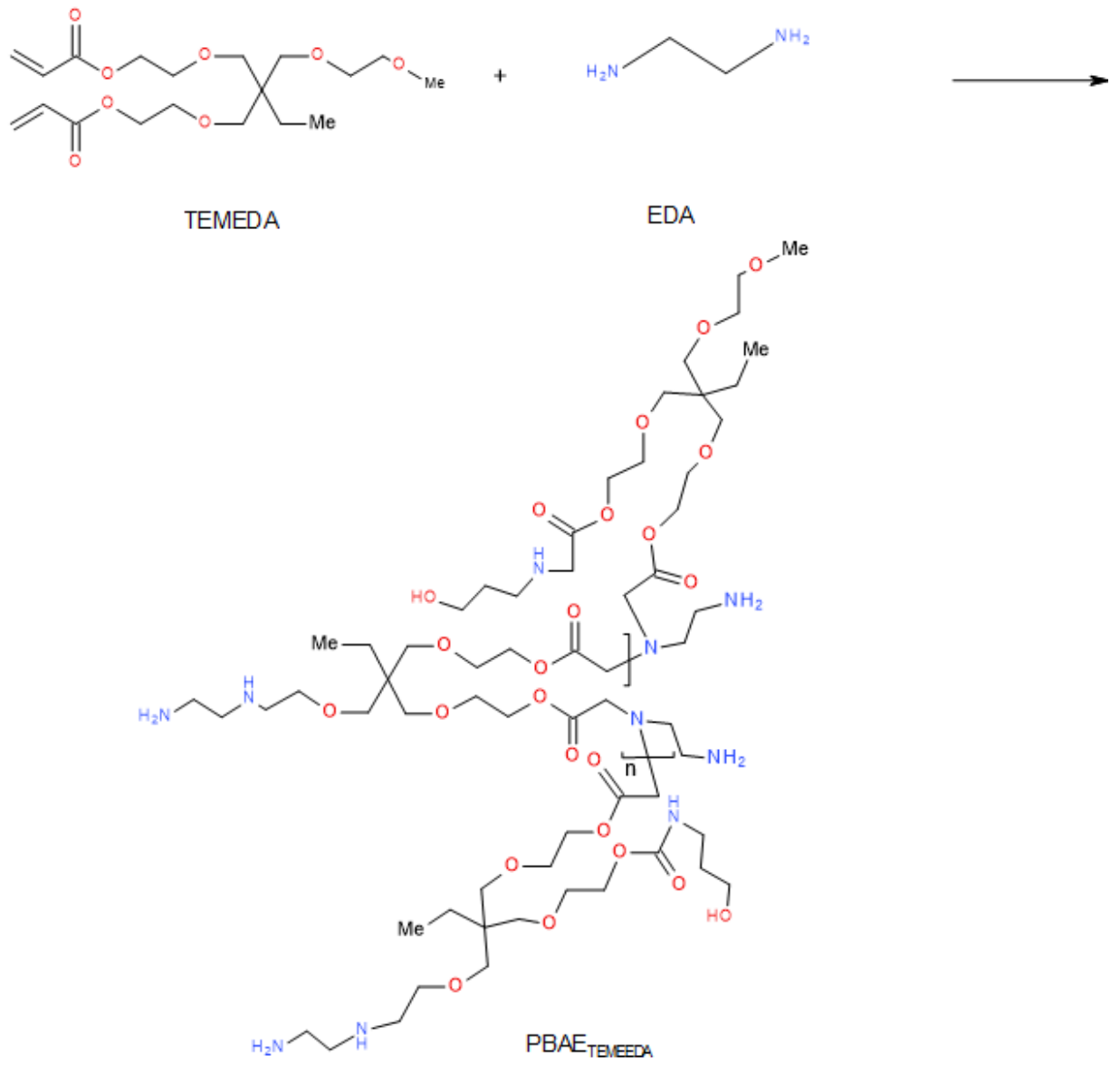
monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak +4°C’de saklandı ^{81,82}.



Şekil 18 : Y polimerinin sentezinin şematik görünümü

PBAE_{TEMEEDA} (Z) Polimerinin Sentezi

PBAE_{TEMEEDA} polimerinin sentezi; $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyetle ısı kontrolü yapılabilen inkübatör içerisinde, azot gazı akımı altında THF çözücüsü içerisinde trimetiloilpropan etoksilat metil eter diakrilat (TEMEDA) bileşiği ve EDA monomerleri kullanılarak, diamin çözeltisinin, oda sıcaklığında (25°C), reaksiyon kabı içerisindeki diakrilat çözeltisine (diakrilat:diamin = 1:1,1 mol) damla damla katılarak yapıldı. Takiben, 50°C 'de, 48 saat boyunca sürekli karıştırma işlemi ile reaksiyon gerçekleştirildi. 48 saatlik reaksiyon süresi sonunda elde edilen PBAE_{TEMEEDA} ürününü saflaştırmak için uygun bir çöktürücü olan susuz dietil eter kullanıldı. PBAE ürününden reaksiyona girmemiş monomerleri ayırmak için reaksiyon karışımı, karıştırılmakta olan susuz dietil eter içerisine damla damla ilave edildi. Üst faz mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve çöken ürün 48 saat vakum altında oda sıcaklığında kurutularak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı^{81,82}.

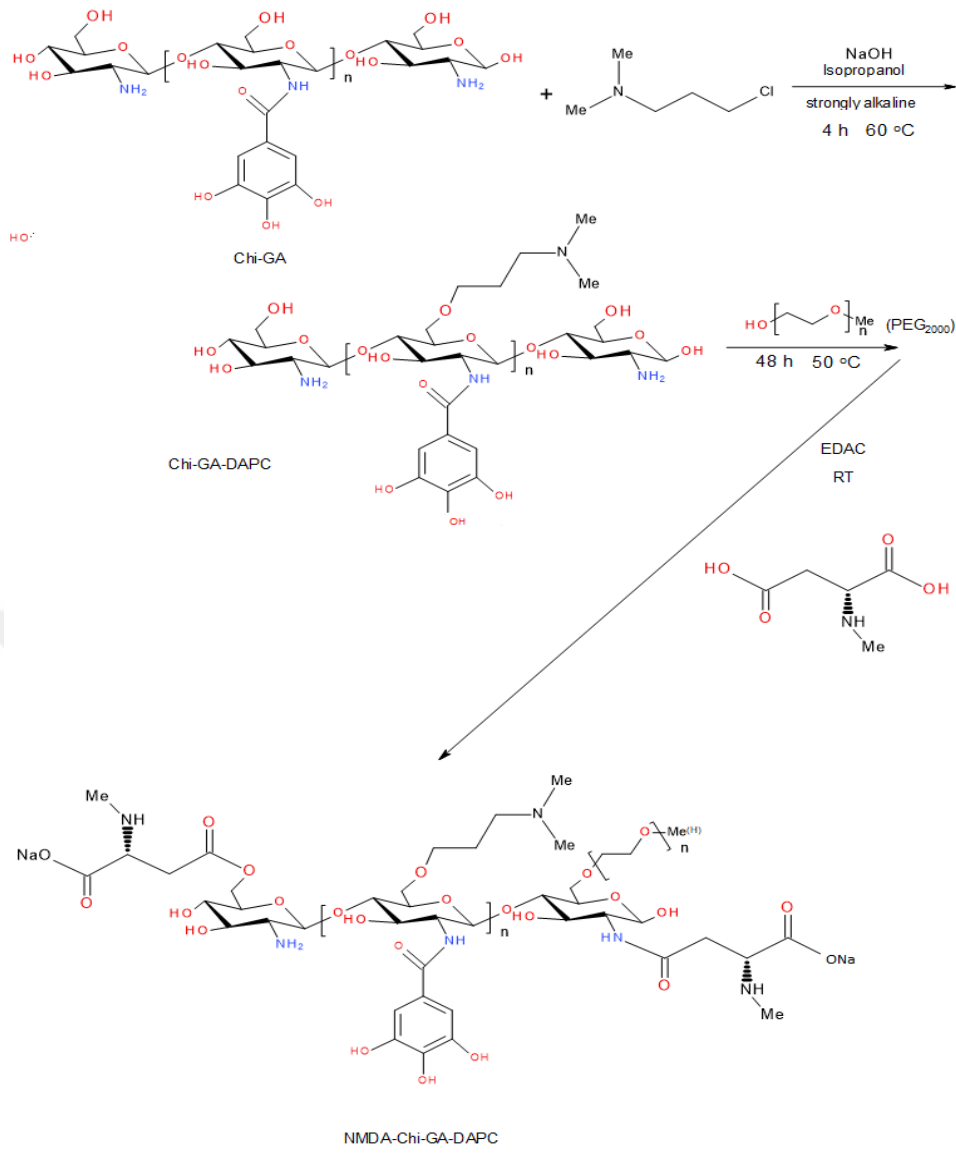


Şekil 19 : Z polimerinin sentezinin şematik görünümü

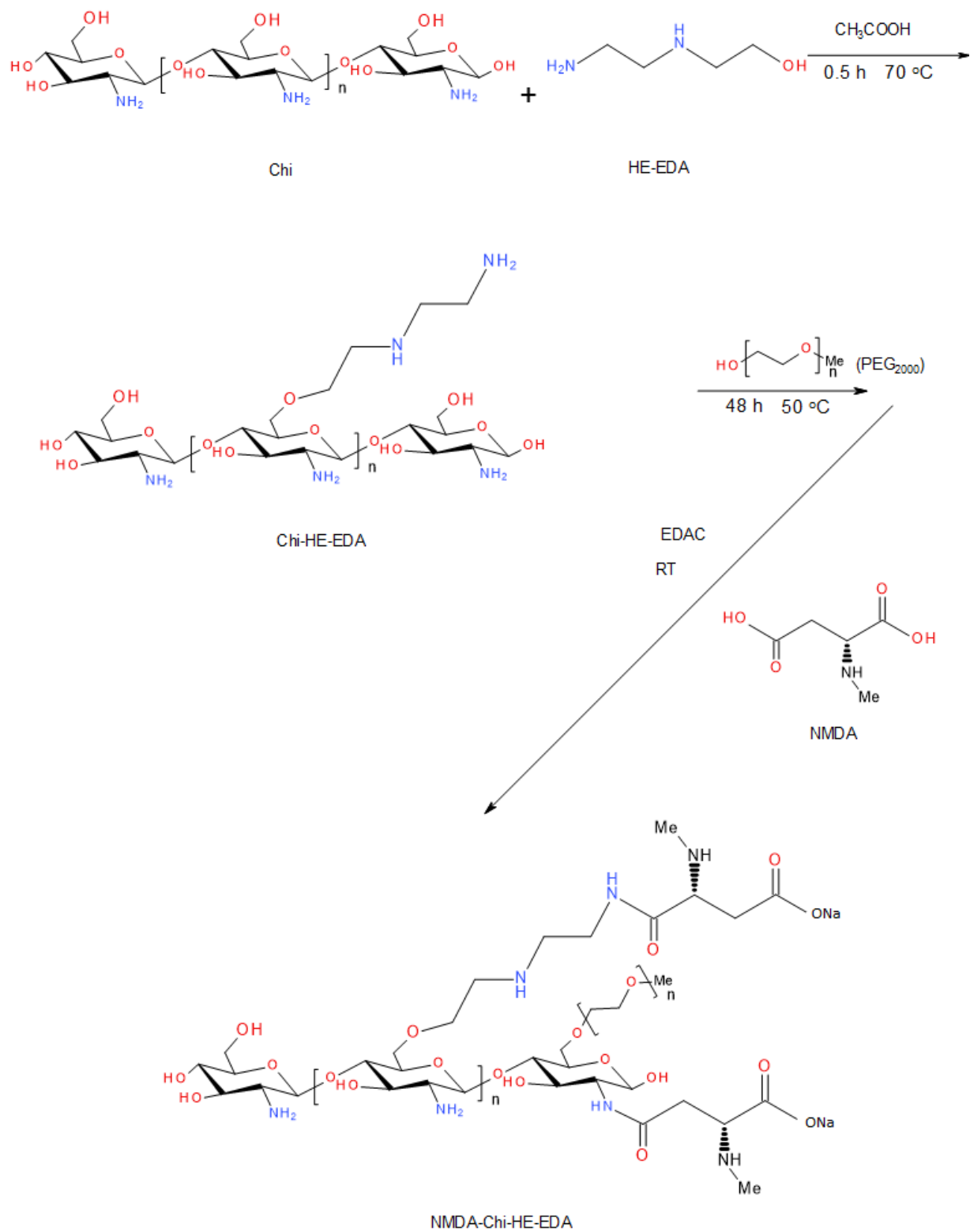
3.2.1.3. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılacak Polimerlerin N-metil D-Aspartik Asit (NMDA) ile Modifikasyonu

Kitosanın PEGlenmiş Aminli Bileşiklerinin NMDA ile Modifikasyonu

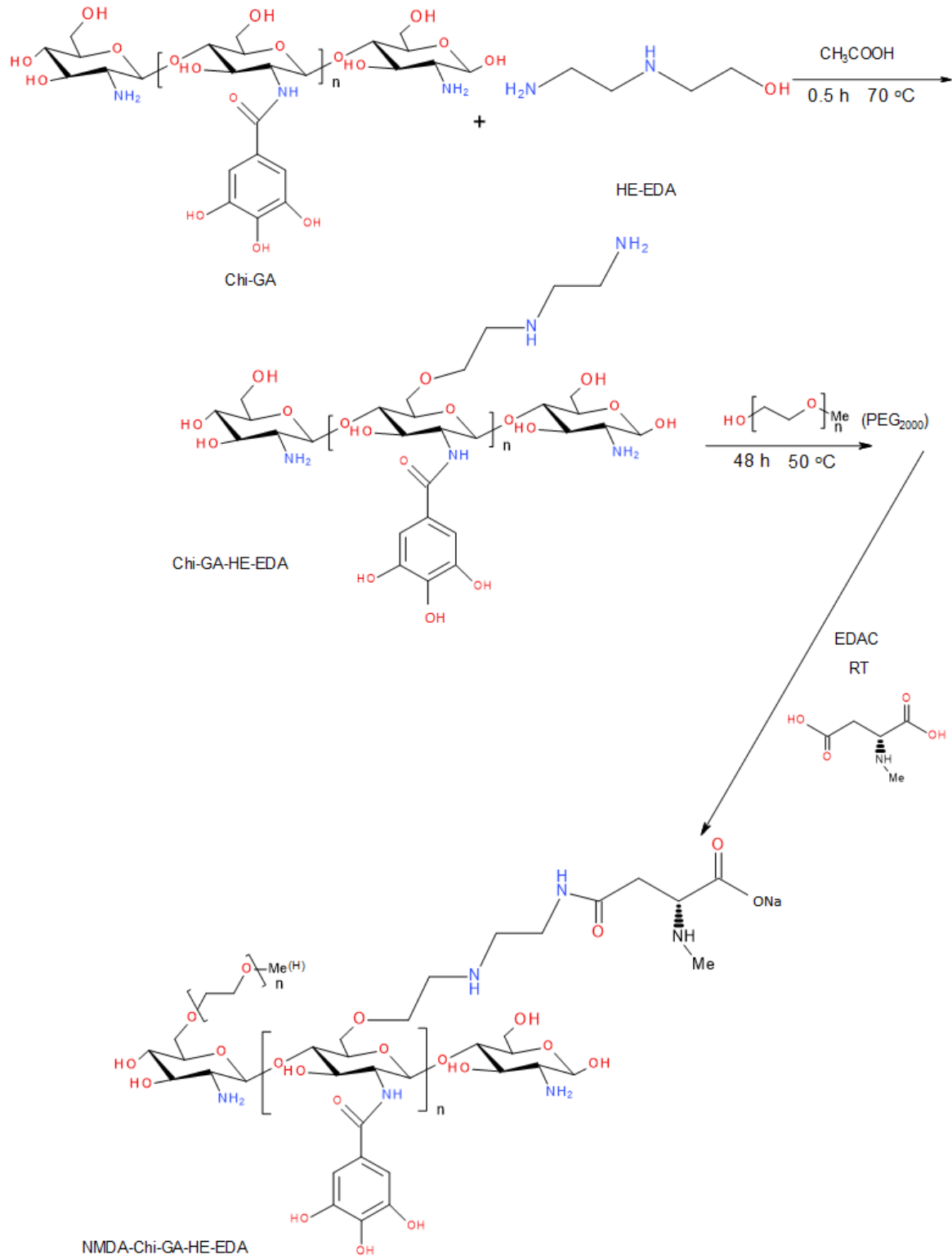
Bu kapsamda, PEGlenmiş modifiye kitosan %4'lük asetik asit içerisinde 1% (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde çözüldü. NMDA (1 mol glukozamin ünitesi başına 0,02 mol NMDA olacak şekilde) 10 mL etanol içinde çözüldü ve NMDA' nin karboksilik asit gruplarını aktive etmek için N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür (EDAC) kullanıldı. EDAC ile aktive edilmiş NDMA çözeltisi PEG ile modifiye kitosan çözeltisine N₂ gazı atmosferinde damla damla ilave edilerek 24 saat oda sıcaklığında 250 rpm hızla karıştırıldı. Bu süre sonunda ürünün çöktürülerek ayrılması için reaksiyon karışımının pH'sı, 1 N NaOH çözeltisi ile 8.5-9 aralığına ayarlandı. Saflaştırma için 6000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi ve her santrifüj işleminden sonra deiyonize su ile yıkanarak işlem 3 kere tekrar edildi. Saflaştırma sonrası ürün 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C'de liyofilize edildi ve kullanılana kadar +4 °C'de saklandı. Şekil 20'de NMDA-Chi-GA-DAPC (K1-PEG-NMDA) polimerinin sentezi gösterildi. Şekil 21'de NMDA-Chi-HE-EDA (K2-PEG-NMDA) polimerinin sentezi gösterildi. NMDA-Chi-GA-HE-EDA (K3-PEG-NMDA) polimerinin sentezi ise Şekil 22'de verilmiştir.



Şekil 20: NMDA-Chi-GA-DAPC (K1-PEG-NMDA) polimerinin sentezi



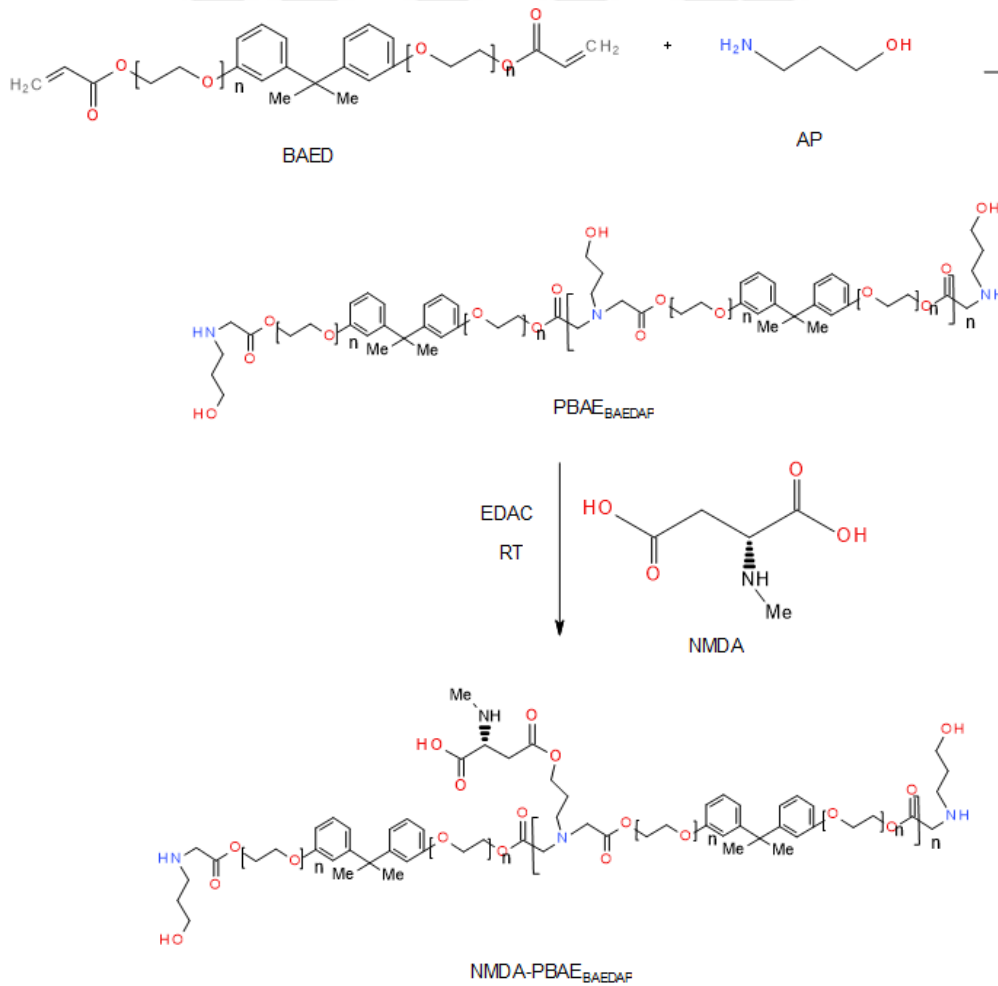
Şekil 21:NMDA-Chi-HE-EDA (K2-PEG-NMDA) polimerinin sentezi



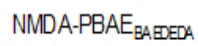
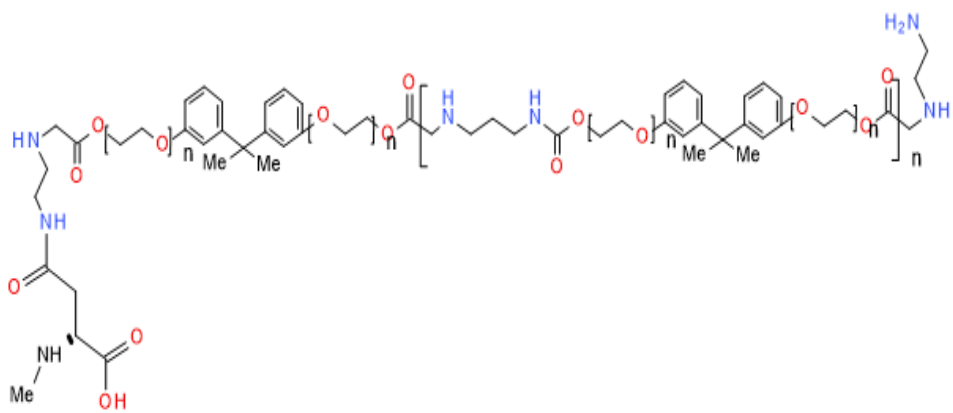
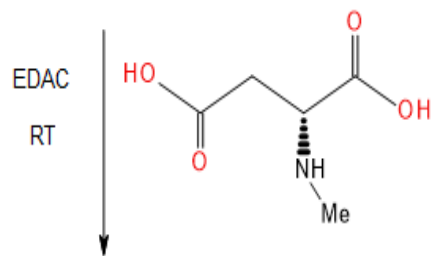
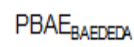
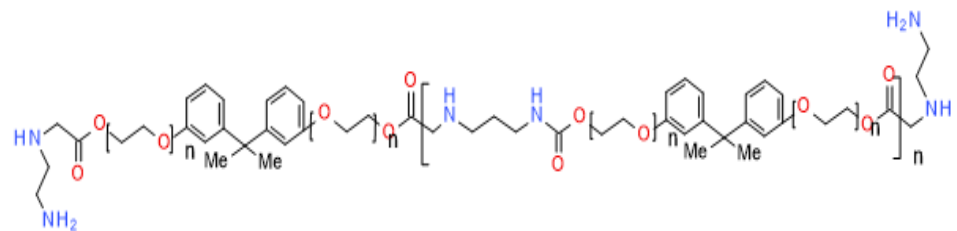
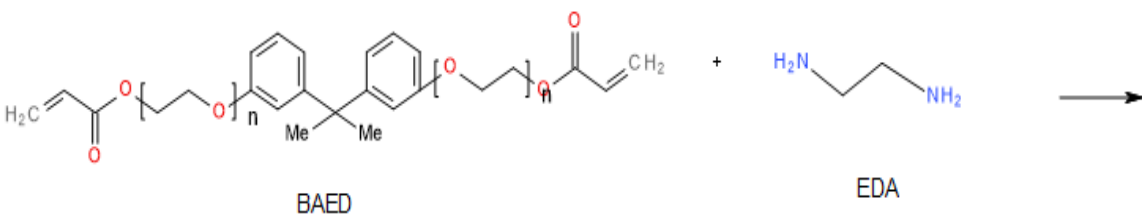
Şekil 22: NMDA-Chi-GA-HE-EDA (K3-PEG-NMDA) polimerinin sentezi

PBAElerin N-metil D-Aspartik Asit ile Modifikasyonu

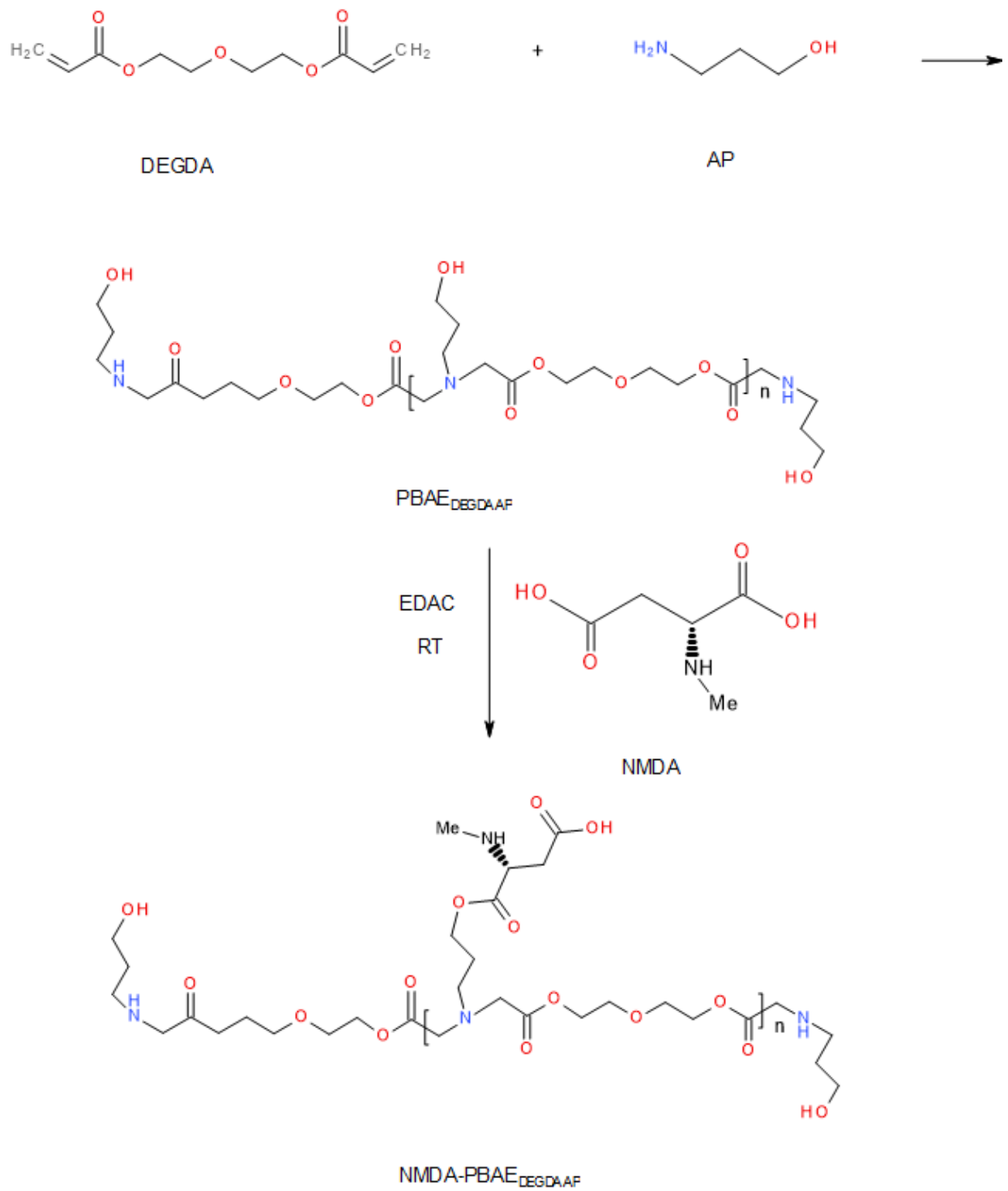
Bu kapsamda, 500 mg PBAE polimeri 2 mL DMSO içerisinde çözüldü. NMDA (1 mol tekrar eden ünite başına 0,02 mol NDMA olacak şekilde) ise 1 mL DMSO içerisinde çözüldü ve karboksilik asit gruplarını aktive etmek için N,N-Disikloheksilcarbodiimid (DCC) ilave edildi. DCC ile aktive edilen NDMA çözeltisi N₂ gazı atmosferinde PBAE çözeltisi üzerine damla damla katılarak 24 saat oda sıcaklığında 250 rpm hızla karıştırıldı. Bu süre sonunda ürünün çöktürülerek ayrılması için reaksiyon karışımı, soğuk saf su içerisine ilave edildi. Polimer 9000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edildi ve 0,01 mbar basınçta -50 ± 1 °C'de liyofilize edildi ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı. Şekil 23'de F1-NMDA polimerinin sentezi gösterilmiştir. D1-NMDA polimerinin sentezi Şekil 24'de, F2-NMDA polimerinin sentezi Şekil 25'de, F3-NMDA polimerinin sentezi Şekil 26'da, M1-NMDA polimerinin sentezi Şekil 27'de ve ME1-NMDA polimerinin sentezi ise Şekil 28'da gösterilmiştir.



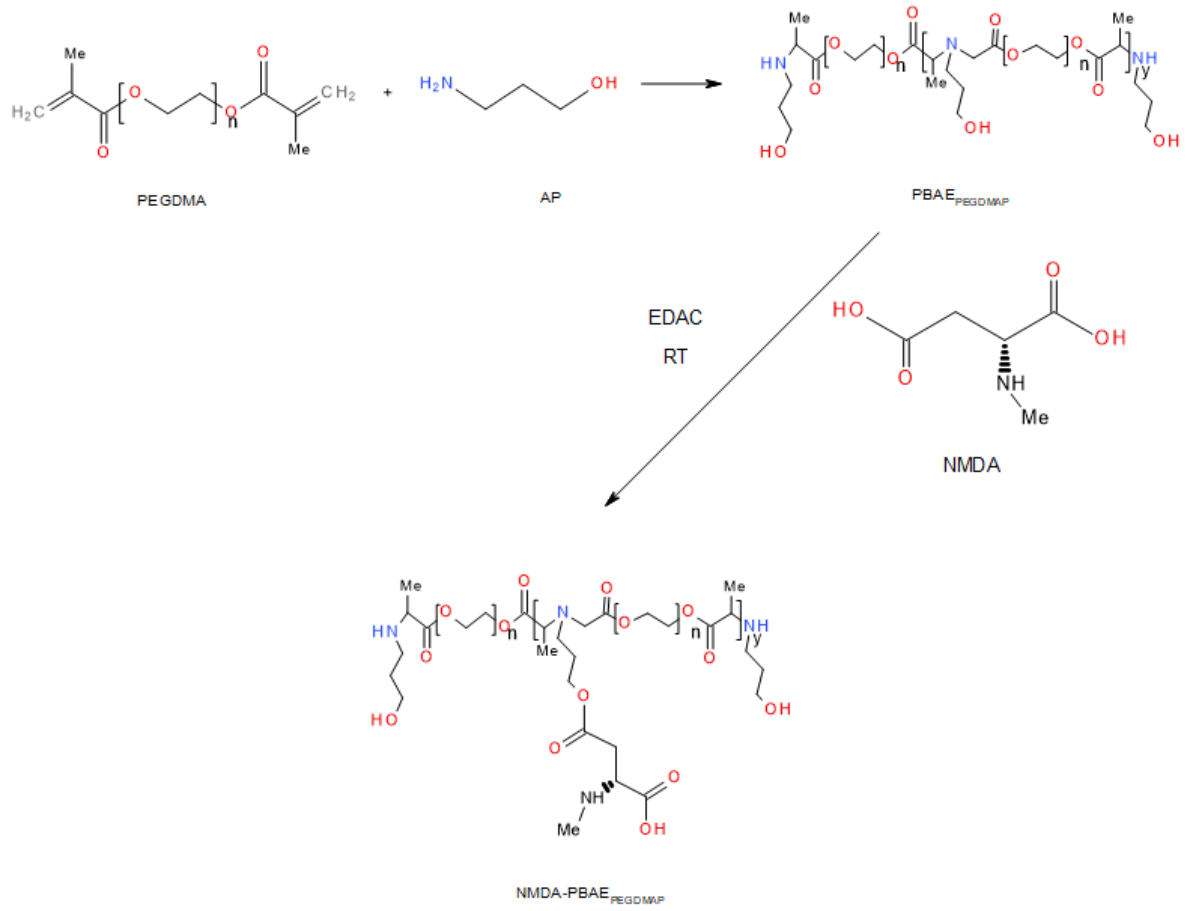
Şekil 23: F1-NMDA Polimerinin Sentezi



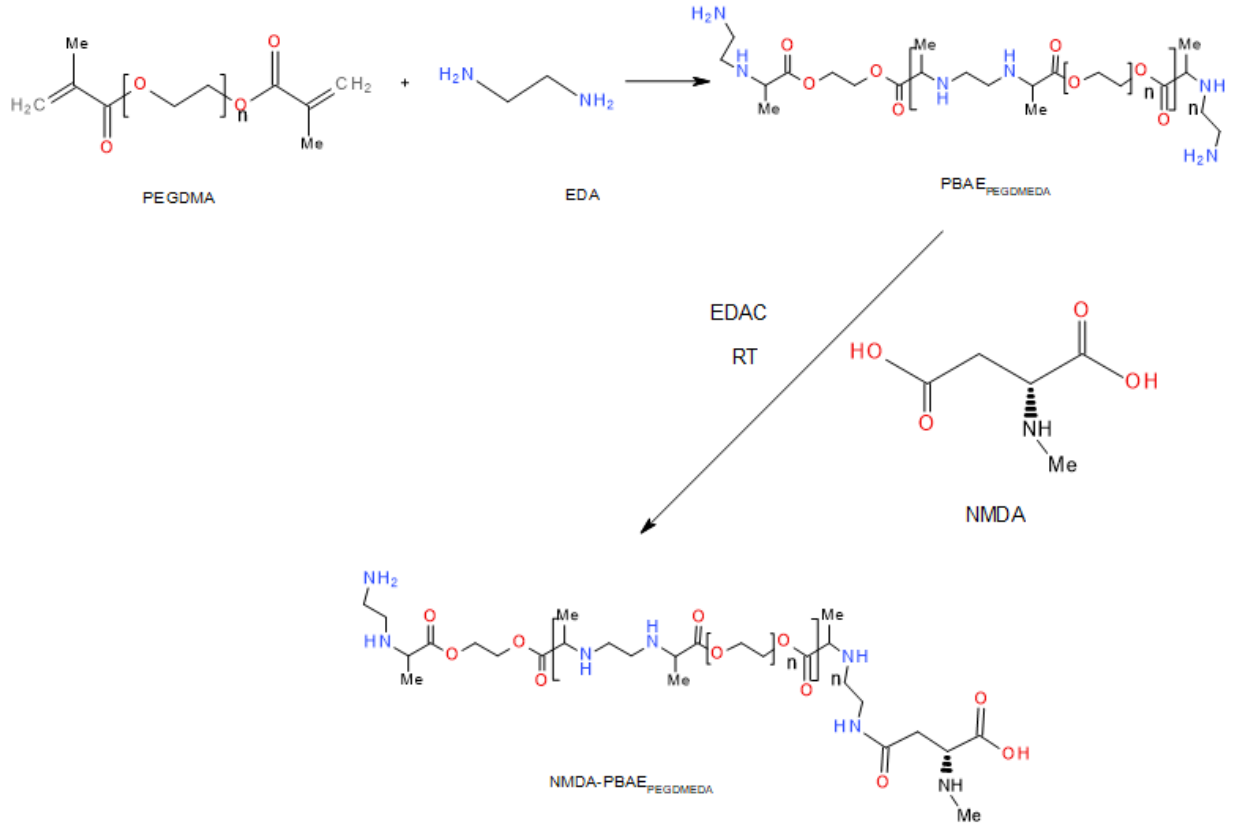
Şekil 24: D1-NMDA polimerinin sentezi



Şekil 26: F3-NMDA Polimerinin Sentezi



Şekil 27: M1-NMDA Polimerinin Sentezi



Şekil 28: ME1-NMDA Polimerinin Sentezi

3.2.2. Sentezlenen Polimerlerin Karakterizasyonu

3.2.2.1. Polimerlerin Molekül Ağırlığının Tayini

Sentezlenen polimerlerden nanopartikül hazırlanmasına uygun bulunan polimerlerin Jel Permeasyon Kromatografisi (GPC) yöntemi ile molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımları tayin edilmiştir.

Ürünlerin sayıca (M_n) ve ağırlıkça (M_w) ortalama molekül ağırlıkları ile polidispersite indeksleri (PDIM w), TOSOH EcoSEC markalı GPC/SEC sistemi ile tayin edilmiştir. GPC ölçümleri, aşağıdaki parametreler kullanılarak Chi ve PBAE ürünlerine spesifik TSK-jel GMPWXL kolonunda (Tosoh Bioscience; Japonya) 1 mL/dakika akış hızı ve 0,142 mL/g kırılma indisi artışı (dn/dc) Chi için ve 0,100 mL/g kırılma indisi artışı (dn/dc) PBAE için olmak üzere gerçekleştirildi. Spesifik dn/dc , diferansiyel kırılma indisi (dRI) detektörü kullanılarak hesaplanırken, mutlak molar kütle ve molar kütle dağılımı, bir mini-DAWN çok açılı ışık saçılımı (MALS) detektörü (Wyatt, ABD) kullanılarak hesaplandı. Veri toplama ve analiz ASTRA yazılımı kullanılarak yapıldı. Chi ve modifiye Chi polimerleri; gece boyunca %1 asetik asit çözeltisi içinde çözündürüldü. Daha sonra çözeltiler, 0,2 mol/L sodyum

asetat çözeltisi ile iki kez seyreltildi, 0,22 µm membrandan süzüldü ve şişelere aktarıldı. PBAE polimerleri ise son konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde DMSO içinde çözülerek şişelere aktarıldı.

Modifiye edilen polimerlerden nanopartikül hazırlanmasına uygun bulunanların sayısal (M_n) ve ağırlıkça (M_w) ortalama molekül ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımları (PDI) TOSOH EcoSEC markalı GPC/SEC sistemi ile tayin edilmiştir.

GPC ölçümleri, aşağıdaki parametreler kullanılarak kitosan ve PBAE ürünlerine spesifik TSK-jel GMPWXL kolonunda 1 mL/dakika akış hızı ve 0,142 mL/g kırılma indisi artışı (dn/dc) kitosan için ve 0,100 mL/g kırılma indisi artışı (dn/dc) PBAE için olmak üzere gerçekleştirildi. Spesifik dn/dc , diferansiyel kırılma indeksi (dRI) dedektörü kullanılarak hesaplanırken, mutlak molar kütle ve molar kütle dağılımı, bir mini-DAWN çok açılı ışık saçılımı (MALS) dedektörü (Wyatt, ABD) kullanılarak hesaplandı. Veri toplama ve analiz ASTRA yazılımı kullanılarak yapıldı. Kitosan ve modifiye kitosan ürünleri; gece boyunca % 1 asetik asit çözeltisi içinde bekletilerek çözüldü. Daha sonra çözeltiler, 0,2 mol/L sodyum asetat çözeltisi ile iki kez seyreltildi, 0,22 µm membrandan süzüldü ve şişelere aktarıldı. PBAE ürünleri ise son konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde DMSO içinde çözülerek şişelere aktarıldı.

3.2.2.2. Polimerlerin Yapısal Özelliklerinin Tayini

Sentezlenen polimerlerin yapısal özellikleri, Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi, ^1H NMR ve ^{13}C NMR analizleri ile incelenmiştir.

Fourier Transform Infrared Spektrofotometresiskopisi (FTIR)

Sentezlenen tüm ürünlerin yapıları Fourier Transform Infrared Spektrofotometre tekniği ile aydınlatıldı. FTIR analizleri Cary 630 model (Agilent; ABD) FT-IR cihazında gerçekleştirildi. Ürün/KBr oranı 1/200 mg olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmış tabletler kullanılarak, spektra $650-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında kaydedildi.

Nükleer Manyetik Rezonans (HNMR ve CNMR)

Ürünlerinin yapılarının aydınlatılması için FTIR yöntemi yanında UNITY INOVA nükleer manyetik rezonans spektrofotometresi (Varian, Kanada) kullanıldı. MSO - d6: D₂O çözücüler ve 500 MHz ve 25°C parametrelerini kullanarak analizler gerçekleştirildi.

3.2.2.3. Termal Analizler

Sentezlenen polimerlerin termal bozunma özelliklerini saptamak amacıyla Termogravimetrik analiz (TGA) yapılmıştır. Bu amaçla, alüminyum kroze içine yerleştirilen örneklerin (15 mg) TGA analizleri, termogravimetrik analiz cihazı (Linseis, STA PT 1750 model, ABD) ile sistem içerisine 0,4 L/dakika hız ile hava gönderilerek 10°C/dakika ısıtma hızı ile 1000°C ye kadar gerçekleştirilmiştir.

3.3. Formülasyon Çalışmaları

3.3.1. siRNA Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Pozitif yüklü PEGlenmemiş modifiye kitosan nanopartikülleri, tripolifosfat kullanılarak iyonik jelasyon tekniği ile hazırlanmıştır ⁸³. K1, K2 ve K3 modifiye kitosanlarından elde edilen nanopartiküllerin hazırlanması için %0,3'lük stok kitosan çözeltileri hazırlanmıştır. Kitosan stok çözeltileri her seferinde taze hazırlanmıştır. Her seferinde taze hazırlanan %1'lik tripolifosfat (TPP) çözeltisi kullanılarak nanopartiküller elde edilmiştir. %0,01 (K1-1), %0,025 (K1-2), %0,05 (K1-3), %0,1 (K1-4) 5 mL'lik kitozan nanopartikülleri için K:TPP oranı 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 olacak şekilde Tablo 1' de gösterildiği üzere çalışılmıştır. 300 rpm'de dönen kitozan çözeltisi üzerine TPP damla damla her bir damla arasında 3 sn olacak şekilde ilave edilmiştir. Aynı işlemler K2, K3, K1-PEG, K2-PEG, K3-PEG modifiye kitozan polimerleri için de tekrarlanmıştır (Tablo 1). Elde edilen formülasyonlar 4 saat boyunca karıştırılmıştır.

Tablo 1: PEGli ve PEGlenmemiş boş kitozan nanopartiküllerinin hazırlama metodu

Polimer kodu	Kitozan NP konsantrasyonu (%)	K çözelti hacmi (mL)	Formülasyon kodu	Chi:TPP oranı	TPP miktarı (mL)	Su miktarı (mL)	Karıştırma hızı (rpm)
5 mL Nanopartikül Dispersiyonu İçin							
K1-1 K2-1 K3-1 K1-1-PEG K2-1-PEG K3-1-PEG	%0,01 (0,4mg/5mL)	0,133	K1-1-3:1 K2-1-3:1 K3-1-3:1	3:1	0.133	4.734	300
			K1-1-4:1 K2-1-4:1 K3-1-4:1	4:1	0.100	4.767	300
			K1-1-5:1 K2-1-5:1 K3-1-5:1	5:1	0.080	4.787	300
			K1-1-6:1 K2-1-6:1 K3-1-6:1	6:1	0.067	4.800	300
			K1-1-7:1 K2-1-7:1 K3-1-7:1	7:1	0.057	4.810	300

K1-2 K2-2 K3-2 K1-2-PEG K2-2-PEG K3-2-PEG	%0,025 (1,25mg/5mL)	0,417	K1-2-3:1	3:1	0,417	4,166	300
			K2-2-3:1				
			K3-2-3:1				
			K1-2-4:1	4:1	0,313	4,271	300
			K2-2-4:1				
			K3-2-4:1				
			K1-2-5:1	5:1	0,250	4,333	300
			K2-2-5:1				
			K3-2-5:1				
K1-3 K2-3 K3-3 K1-3-PEG K2-3-PEG K3-3-PEG	%0,05 (2,5mg/5mL)	0,833	K1-2-6:1	6:1	0,208	4,375	300
			K2-2-6:1				
			K3-2-6:1				
			K1-2-7:1	7:1	0,179	4,404	300
			K2-2-7:1				
			K3-2-7:1				
			K1-3-3:1	3:1	0,833	3,334	250
			K2-3-3:1				
			K3-3-3:1				
K1-4 K2-4 K3-4 K1-4-PEG K2-4-PEG K3-4-PEG	%0,1 (5mg/5mL)	1,670	K1-3-4:1	4:1	0,625	3,542	250
			K2-3-4:1				
			K3-3-4:1				
			K1-3-5:1	5:1	0,5	3,667	250
			K2-3-5:1				
			K3-3-5:1				
			K1-3-6:1	6:1	0,417	3,750	250
			K2-3-6:1				
			K3-3-6:1				
K1-3 K2-3 K3-3 K1-3-PEG K2-3-PEG K3-3-PEG	%0,05 (2,5mg/5mL)	0,833	K1-3-7:1	7:1	0,357	3,810	250
			K2-3-7:1				
			K3-3-7:1				
K1-3 K2-3 K3-3 K1-3-PEG K2-3-PEG K3-3-PEG	%0,05 (2,5mg/5mL)	0,833	K1-3-3:1	3:1	1,667	1,663	250
			K2-3-3:1				
			K3-3-3:1				
K1-4 K2-4 K3-4 K1-4-PEG K2-4-PEG K3-4-PEG	%0,1 (5mg/5mL)	1,670	K1-3-4:1	4:1	1,250	2,080	250
			K2-3-4:1				
			K3-3-4:1				
			K1-3-5:1	5:1	1,000	2,330	250
			K2-3-5:1				
			K3-3-5:1				
			K1-3-6:1	6:1	0,833	2,497	250
			K2-3-6:1				
			K3-3-6:1				
K1-3 K2-3 K3-3 K1-3-PEG K2-3-PEG K3-3-PEG	%0,05 (2,5mg/5mL)	0,833	K1-3-7:1	7:1	0,714	2,616	250
			K2-3-7:1				
			K3-3-7:1				

K1-PEG, K2-PEG ve K3-PEG modifiye kitosanları ile nanopartiküllerin hazırlanmasında, kitosan'ın %1'lik asetik asit içerisindeki % 0,3'lük stok çözeltisi ve TPP'nin ultra saf su içindeki % 0,1'lik çözeltisi her deneyden önce taze olarak hazırlandı. 300 rpm'de karıştırılan modifiye kitosan çözeltisi üzerine her 3 saniyede bir olacak şekilde damla damla TPP çözeltisi ilave edilerek nanopartiküller hazırlandı.

Nanopartikül dispersiyonu aynı hızda 4 saat boyunca karıştırıldı. Ayrıca nanopartikül hazırlama yöntemi daha düşük hacimli (1mL ve 50 μ L) çalışmaya uygun olacak şekilde optimize edildi. Bu dönem zarfında ayrıca, hedeflendirme ligandı (NMDA) bağlanmış modifiye kitosanlar kullanılarak nanopartikül formülasyonları optimize edildi. NMDA ile modifiye edilmiş ve edilmemiş polimerler ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: NMDA ile modifiye edilmiş ve edilmemiş ürünlerden hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Ürün	Konsantrasyon (%)	Polimer:TPP oranı(a/a)	Polimer çözeltisi hacmi (μ L)	TPP çözeltisi hacmi (μ L)	Su hacmi (μ L)	Karıştırma hızı (rpm)	Süre (Saat)
5 mL Nanopartikül Formülasyonu İçin							
K1-2-6:1-PEG (10:1)	0,025 (1,25mg/5mL)	6:1	417	208	4375	300	4
K1-2-6:1-PEG (10:1)-NMDA	0,025 (1,25mg/5mL)	6:1	417	208	4375	300	4
K2-2-7:1-PEG (10:1)	0,025 (1,25mg/5mL)	7:1	417	179	4404	300	4
K2-2-7:1-PEG (10:1)-NMDA	0,025 (1,25mg/5mL)	7:1	417	179	4404	300	4
K3-2-5:1-PEG (10:1)	0,025 (1,25mg/5mL)	5:1	417	250	4333	300	4
K3-2-5:1-PEG (10:1)-NMDA	0,025 (1,25mg/5mL)	5:1	417	250	4333	300	4
1 mL Nanopartikül Formülasyonu İçin							
K1-2-6:1-PEG (10:1)	0,025 (0,25mg/5mL)	6:1	83,4	41,6	875	300	1
K1-2-6:1-PEG (10:1)-NMDA	0,025 (0,25mg/5mL)	6:1	83,4	41,6	875	300	1
K2-2-7:1-PEG (10:1)	0,025 (0,25mg/5mL)	7:1	83,4	35,8	880,8	300	1
K2-2-7:1-PEG (10:1)-NMDA	0,025 (0,25mg/5mL)	7:1	83,4	35,8	880,8	300	1

K3-2-5:1-PEG (10:1)	0,025 (0,25mg/5mL)	5:1	83,4	50	866,6	300	1
K3-2-5:1-PEG (10:1)-NMDA	0,025 (0,25mg/5mL)	5:1	83,4	50	866,6	300	1
siRNA yüklü 50µL Nanopartikül Formülasyonu İçin							
K1-2-6:1-PEG (10:1)-NMDA- siRNA (Enkapsülasyon)	0,025 (0,25mg/5mL)	6:1	4,17	2,03	43,75	300	0,5
K1-2-6:1-PEG (10:1)-NMDA- siRNA (İyonik Etkileşim)	0,025 (0,25mg/5mL)	6:1	4,17	2,03	43,75	300	0,5
K2-2-7:1-PEG (10:1)-NMDA- siRNA (Enkapsülasyon)	0,025 (0,25mg/5mL)	7:1	4,17	1,79	44,04	300	0,5
K2-2-7:1-PEG (10:1)-NMDA- siRNA (İyonik Etkileşim)	0,025 (0,25mg/5mL)	7:1	4,17	1,79	44,04	300	0,5
K3-2-5:1-PEG (10:1)-NMDA- siRNA (Enkapsülasyon)	0,025 (0,25mg/5mL)	5:1	4,17	2,5	43,33	300	0,5
K3-2-5:1-PEG (10:1)-NMDA- siRNA (İyonik Etkileşim)	0,025 (0,25mg/5mL)	5:1	4,17	2,5	43,33	300	0,5

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimize edilmiş ideal nanopartikül formülasyonlarının hem matriks yapısına hem de absorpsiyon tekniği ile yüzeyine siRNA yüklenmiştir.

3.3.2. siRNA Yüklü Poli Beta Aminoester Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Pozitif yüklü poli beta aminoester nanopartikülleri nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır⁸⁴. siRNA yüklenmemiş poli beta aminoester nanopartiküllerinin hazırlama metodu aşağıda anlatılmıştır.

Deneme 1: PBAE_{BAEDED}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

125 mg PBAE_{BAEDED} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL ultra saf suya (UFSu) damla damla 1 dakika (dk) içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 2: PBAE_{BAEDED}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

125 mg PBAE_{BAEDED} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 700 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 1 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 700 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 3: PBAE_{BAEDED}-NP3 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

125 mg PBAE_{BAEDED} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 1 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 4: PBAE_{BAEDED}-NP4 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

125 mg PBAE_{BAEDED} polimeri %99,9 saflıkta 13 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 62 mL UFSu damla damla 1,5 dk içerisinde ilave edildi. Daha sonra %20 amplitütte 1 dk boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 5: PBAE_{BAEDED}-NP5 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

125 mg PBAE_{BAEDED} polimeri %99,9 saflıkta 13 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 62 mL UFSu damla damla 1,5 dk içerisinde ilave edildi. Daha sonra %30 amplitütte 1 dk boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 6: PBAE_{BAEDED}A -NP6 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

125 mg PBAE_{BAEDED}A polimeri %99,9 saflıkta 13 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 62 mL UFSu damla damla 1,5 dk içerisinde ilave edildi. Daha sonra %40 amplitütte 1 dk boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 7: PBAE_{BAEDED}A -NP7 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

21 mg PBAE_{BAEDED}A polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözülmediği için nanopartikül hazırlanamadı .

Deneme 8: PBAE_{BAEDED}A -NP8 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDED}A polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 9: PBAE_{BAEDED}A -NP9 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

6,5 mg PBAE_{BAEDED}A polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 10: PBAE_{BAEDED}A -NP10 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDED}A polimeri 1 mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL DMSO'ya damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat boyunca 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 11: PBAE_{BAEDED}A -NP11 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDED}A polimer 1 mL DMSO ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu'ya damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat boyunca 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 12: PBAE_{BAEDED}A -NP12 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDED}A polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 13: PBAE_{BAEDED}-2 -NP13 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDED}-2 polimeri mL DMSO ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 14: PBAE_{BAEDED} -2-NP14 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDED}-2 polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı. PBAE_{BAEDED} nanopartiküllerinin hazırlanma yöntemi Tablo 3'de özet olarak gösterilmiştir.

Tablo 3: PBAE_{BAEDED} nanopartiküllerinin hazırlanma yöntemi

Deneme no	Polimer /miktarı (mg)	Çözücü /miktarı (mL)	Dispersant /iktarı (mL)	Karıştırma Hızı (rpm)	Damlatma Süresi (dk)	Amplitüt (%)	Sonikasyon süresi (dk)
1	PBAE _{BAEDED} /125	EtOH/7,5	UFSu/42,5	500	1	0	0
2	PBAE _{BAEDED} /125	EtOH/7,5	UFSu/42,5	700	1	0	0
3	PBAE _{BAEDED} /125	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	1	0	0
4	PBAE _{BAEDED} /125	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	1,5	20	1
5	PBAE _{BAEDED} /125	EtOH/13	UFSu/62	1000	1,5	30	1
6	PBAE _{BAEDED} /125	EtOH/13	UFSu/62	1000	1,5	40	1
7	PBAE _{BAEDED} /21	Polimer çözünmemiştir					
8	PBAE _{BAEDED} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	1,15	0	0
9	PBAE _{BAEDED} /6,5	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	1,15	0	0
10	PBAE _{BAEDED} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
11	PBAE _{BAEDED} /10	DMSO/1	UFSu/49	1500	2	0	0
12	PBAE _{BAEDED} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
13	PBAE _{BAEDED} -2/10	DMSO/1	UFSu/49	1500	2	0	0
14	PBAE _{BAEDED} -2/10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0

Deneme 15: PBAE_{BAEDAP}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 16: PBAE_{BAEDAP}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 17: PBAE_{BAEDAP}-NP3 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 18: PBAE_{BAEDAP}-NP4 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı. Etanol uçurma işlemi tamamlandıktan sonra 0,22 µm por açıklığına sahip membran filtreden süzüldü.

Deneme 19: PBAE_{BAEDAP}-NP5 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Daha sonra %30 amplitudda 30 saniye (sn) boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 20: PBAE_{BAEDAP}-NP6 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Daha sonra %30 amplitudda 30 saniye (sn) boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de

karıştırıldı. Etanol uçurma işlemi tamamlandıktan sonra 0,22 µm por açıklığına sahip membran filtreden süzüldü.

Deneme 21: PBAE_{BAEDAP}-NP7 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. 2000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 2000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 22: PBAE_{BAEDAP}-NP8 Nanopartikülünün Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %20 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 42,5 mL UFSu'ya 1,15 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 23: PBAE_{BAEDAP}-NP9 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %40 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 42,5 mL UFSu'ya 1,15 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 24: PBAE_{BAEDAP}-NP10 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. 2000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH uçması için 2000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 25: PBAE_{BAEDAP}-NP11 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %20 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 42,5 mL UFSu'ya 1,15 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 26: PBAE_{BAEDAP}-NP12 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

50 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %40 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 42,5 mL UFSu'ya 1,15 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 27: PBAE_{BAEDAP}-NP13 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 28: PBAE_{BAEDAP}-NP14 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %20 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 42,5 mL UFSu'ya 2 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 29: PBAE_{BAEDAP}-NP15 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 30: PBAE_{BAEDAP}-NP16 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %20 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 45 mL UFSu'ya 2 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 31: PBAE_{BAEDAP}-NP17 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 2,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 47,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 32: PBAE_{BAEDAP}-NP18 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{BAEDAP} polimeri %99,9 saflıkta 2,5 mL EtOH ile bir gece boyunca çözüldü. Daha sonra %20 amplitutta sonikasyona tabi tutulan 47,5 mL UFSu'ya 2 dk içinde ilave edildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

PBAE_{BAEDPA} nanopartiküllerinin hazırlanma yöntemi Tablo 4'da özet olarak gösterilmiştir.

Tablo 4: PBAE_{BAEDPA} nanopartiküllerinin hazırlama yöntemi

Deneme no	Polimer/ Miktarı (mg)	Çözücü/ miktarı (mL)	Dispersant /miktarı (mL)	Karıştırma hızı (rpm)	Dmlatma süresi (dk)	Amplitude (%)	Sonikasyon süresi (dk)
15	PBAE _{BAEDAP} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
16	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
17	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
18	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
19	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	30	0,5
20	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	30	0,5
21	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	2000	1,15	0	0
22*	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	1,15	20	1,15
23*	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	1,15	40	1,15
24	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	2000	1,15	0	0
25*	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	1,15	20	1,15
26*	PBAE _{BAEDAP} /50	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	1,15	40	1,15
27	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
28*	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	20	2
29	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/5	UFSu/45	1500	2	0	0
30*	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/55	UFSu/45	1500	2	20	2
31	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/2,5	UFSu/47,5	1500	2	0	0
32*	PBAE _{BAEDAP} /10	EtOH/2,5	UFSu/47,5	1500	2	20	2

*İlgili denemelerde polimer çözeltisi belirli süre içerisinde sonikasyona tabi tutulan UFSu'ya damlatılmıştır. Daha sonra EtOH'ın uçması için belirtilen rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde 5 saat boyunca bekletilmiştir.

Deneme 33: PBAE_{HDAAP}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{HDAAP} polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 34: PBAE_{HDAAP}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{HDAAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 35: PBAE_{HDAAP}-NP3 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{HDAAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 36: PBAE_{DEGDAAP}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{DEGDAAP} polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 37: PBAE_{DEGDAAP}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{DEGDAAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 38: PBAE_{DEGDAAP}-NP3 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{DEGDAAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 39: PBAE_{PEGMEDA}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGMEDA} polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 40: PBAE_{PEGMEDA}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGMEDA} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 41: PBAE_{PEGMEDA}-NP3 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGMEDA} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi.

Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 42: PBAE_{PEGDMEDA-2}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGDMEDA-2} polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 43: PBAE_{PEGDMEDA-2}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGDMEDA-2} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 44: PBAE_{PEGDMEDA-2}-NP3 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGDMEDA-2} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 45: PBAE_{PEGEDA}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH uçması için 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 46: PBAE_{PEGEDA}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1000 rpm'de karıştırılan 49 mL UFSu damla damla 1,15 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 1 saat 1000 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 47: PBAE_{PEGAP}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGAP} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 48: PBAE_{PEGDTA}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGDTA} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 49: PBAE_{PEGMAP}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

14 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 1mL DMSO ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 50: PBAE_{PEGMAP}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 7,5 mL EtOH ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 51: PBAE_{PEGAP}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGAP} polimeri 1mL DMSO ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 52: PBAE_{PEGAP}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 7,5 mL EtOH ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 53: PBAE_{PEGAP-2}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGAP} polimeri 1mL DMSO ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 54: PBAE_{PEGMAP-2}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 7,5 mL EtOH ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 55: PBAE_{PEGAP-3}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGAP} polimeri 1mL DMSO ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 56: PBAE_{PEGMAP-3}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 7,5 mL EtOH ile 24 saat süre ile çözülmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 57: PBAE_{PEGAP-4}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGAP} polimeri 1mL DMSO ile 24 saat süre ile çözünmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 58: PBAE_{PEGMAP-4}-NP2 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{PEGEDA} polimeri 7,5 mL EtOH ile 24 saat süre ile çözünmeye bırakılmıştır. Ancak polimer çözünmediği için nanopartikül hazırlanamamıştır.

Deneme 59: PBAE_{TEGEDA}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{TEGEDA} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 60: PBAE_{TEMEEDA}-NP1 Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg PBAE_{TEMEEDA} polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL UFSu damla damla 2 dk içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra 5 saat boyunca EtOH'ün uçması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

PBAE_{HDAAP}, PBAE_{DEGDAAP}, PBAE_{PEGDMEDA}, PBAE_{PEGDMEDA-2}, PBAE_{PEGEDA}, PBAE_{PEGAP}, PBAE_{PEGDTA}, PBAE_{PEGMAP}, PBAE_{PEGAP-2}, PBAE_{PEGAP-3}, PBAE_{PEGAP-4}, PBAE_{TEGEDA}, PBAE_{TEMEEDA} polimerleri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hazırlama metodları Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5: PBAE_{HDAAP}, PBAE_{DEGDAAP}, PBAE_{PEGDMEDA}, PBAE_{PEGDMEDA-2}, PBAE_{PEGEDA}, PBAE_{PEGAP}, PBAE_{PEGDTA}, PBAE_{PEGMAP}, PBAE_{PEGAP-2}, PBAE_{PEGAP-3}, PBAE_{PEGAP-4} nanopartiküllerinin hazırlama metodu

Deneme No	Polimer /miktarı (mg)	Çözücü /miktarı (mL)	Dispersant /miktarı (mL)	Karıştırma hızı (rpm)	Dmlatma süresi (dk)	Amplitude (%)	Sonikasyon süresi (dk)
33	PBAE _{HDAAP} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
34	PBAE _{HDAAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
35	PBAE _{HDAAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
36	PBAE _{DEGDAAP} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
37	PBAE _{DEGDAAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
38	PBAE _{DEGDAAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
39	PBAE _{PEGDMEDA} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
40	PBAE _{PEGDMEDA} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
41	PBAE _{PEGDMEDA} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
42	PBAE _{PEGDMEDA-2} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
43	PBAE _{PEGDMEDA-2} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1000	2	0	0
44	PBAE _{PEGDMEDA-2} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
45	PBAE _{PEGEDA} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	1,15	0	0
46	PBAE _{PEGEDA} /10	DMSO/1	UFSu/49	1000	1,15	0	0
47	PBAE _{PEGAP} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
48	PBAE _{PEGDTA} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
49	PBAE _{PEGMAP} /10						
50	PBAE _{PEGMAP} /10						
51	PBAE _{PEGAP} /10						
52	PBAE _{PEGAP} /10						
53	PBAE _{PEGAP-2} /10	Polimerler DMSO ve EtOH'da çözünmediği/disperse olmadığı için nanopartikül hazırlanamamıştır.					
54	PBAE _{PEGAP-2} /10						
55	PBAE _{PEGAP-3} /10						
56	PBAE _{PEGAP-3} /10						
57	PBAE _{PEGAP-4} /10						
58	PBAE _{PEGAP-4} /10						
59	PBAE _{TEGEDA} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0
60	PBAE _{TEMEEDA} /10	EtOH/7,5	UFSu/42,5	1500	2	0	0

Pozitif yüklü PBAE nanopartikül formülasyonları nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır⁸⁴.

Tüm deneylerde kullanılan su, ultra saf sudur. NMDA ile modifiye edilmiş ve edilmemiş, aynı zamanda siRNA yüklenmiş ve boş PBAE nanopartikül formülasyonlarının hazırlama yöntemleri aşağıda verilmiştir.

Deneme 1: D-DMSO Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg D polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1500 rpm’de karıştırılan 49 mL ultra saf suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 1 saat boyunca 1500 rpm’de karıştırıldı.

Deneme 2: D-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg D polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm’de karıştırılan 42,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH’ün uzaklaşması için 1500 rpm’de karıştırıldı.

Deneme 3: F1-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F1 polimeri %99,9 saflıkta 2,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm’de karıştırılan 47,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH’ün uzaklaşması için 1500 rpm’de karıştırıldı.

Deneme 4: F2-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F2 polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm’de karıştırılan 42,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH’ün uzaklaşması için 1500 rpm’de karıştırıldı.

Deneme 5: F3-DMSO Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F3 polimeri 1mL DMSO ile çözüldü. 1500 rpm’de karıştırılan 49 mL suya damla damla 1,15 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 1 saat boyunca 1500 rpm’de karıştırıldı.

Deneme 6: F3-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F3 polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm’de karıştırılan 42,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH’ün uzaklaşması için 1500 rpm’de karıştırıldı.

Deneme 7: ME1-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F3 polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH'ün uzaklaşması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 8: ME2-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F3 polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH'ün uzaklaşması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 9: D-NMDA-DMSO Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg D-NMDA polimeri 1mL saflıkta DMSO ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 49 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 1 saat boyunca 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 10: D-NMDA-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg D-NMDA polimeri %99,9 saflıkta 7,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 42,5 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH'ün uzaklaşması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 11: F1-NMDA-DMSO Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F1-NMDA polimeri 1mL saflıkta DMSO ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 49 mL suya damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 1 saat boyunca 1500 rpm'de karıştırıldı.

Deneme 12: F1-NMDA-EtOH Nanopartikül Formülasyonunun Hazırlanması

10 mg F1-NMDA polimeri %99,9 saflıkta 2,5 mL EtOH ile çözüldü. 1500 rpm'de karıştırılan 47,5 mL ultra saf suya (UFSu) damla damla 2 dakika içerisinde ilave edildi. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra nanopartikül dispersiyonu 5 saat boyunca EtOH'ün uzaklaşması için 1500 rpm'de karıştırıldı.

Tablo 6: PBAE esaslı nanopartikül formülasyonlarının içerikleri ve formülasyon parametreleri

Deneme no	Polimer /miktarı (mg)	Çözücü /miktarı (mL)	Ultra saf su miktarı (mL)	Karıştırma Hızı (rpm)	Damlatma Süresi (dk)	Bekleme Süresi (Saat)
1	D/10	DMSO/1	49,0	1500	2	1
2	D/10	EtOH/7,5	42,5	1500	2	5
3	F1/10	EtOH/2,5	47,5	1500	2	5
4	F2/10	EtOH/7,5	42,5	1500	2	5
5	F3/10	DMSO/1	49,0	1500	1,15	1
6	F3/10	EtOH/7,5	42,5	1500	2	5
7	ME1/10	EtOH/7,5	42,5	1500	2	5
8	ME2/10	EtOH/7,5	42,5	1500	2	5
9	D-NMDA/10	DMSO/1	49,0	1500	2	1
10	D-NMDA/10	EtOH/7,5	42,5	1500	2	5
11	F1-NMDA/10	DMSO/1	49,0	1500	2	1
12	F1-NMDA/10	EtOH/2,5	47,5	1500	2	5

Hazırlanan büyük hacimli formülasyonlardan sonra daha küçük hacimli formülasyonların hazırlanması için yöntem, vortex kullanılarak optimize edildi ⁸⁵. Bu kapsamda D, D-NMDA, F1, F1-NMDA polimerleri ile nanopartikül formülasyonları hazırlandı. Hazırlama yönteminde değiştirilen parametreler Tablo 7’de gösterilmiştir. Polimer konsantrasyonu sabit kalacak şekilde 1 mL nanopartikül formülasyonu elde etmek için farklı karıştırma hızları ve sürelerde hazırlama işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 7: PBAE esaslı nanopartikül formülasyonlarının vortex ile hazırlanması için kullanılan parametreler

Deneme No	Polimer /miktarı (mg)	Çözücü /miktarı (mL)	Alınan Çözücü Miktarı* (µL)	Ultra saf su miktarı (mL)	Alınan Miktar** (Dispersant) (µL)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dk)
13	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	1
14	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	1,5
15	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	1
16	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	1,5
17	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,75
18	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,5
19	D/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,25
20	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	300	2
21	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	300	1,5
22	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	300	1
23	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	2
24	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	1,5
25	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	1
26	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	0,75
27	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	0,5
28	D/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	0,25
29	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	2
30	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	1,5
31	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	1
32	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	0,75
33	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	0,5
34	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	0,25
35	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	2
36	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	1,5
37	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	1
38	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,75
39	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,5
40	F1/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,25
41	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	2

42	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	1,5
43	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	1
44	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	0,75
45	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	0,5
46	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	0,25
47	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	2
48	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	1,5
49	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	1
50	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	0,75
51	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	0,5
52	F1/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	0,25
53	D-NMDA/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	0,25
54	D-NMDA/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,25
55	D-NMDA/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	300	1,5
56	D-NMDA/10	EtOH/7,5	150	42,5	850	200	1,5
57	F1-NMDA/10	DMSO/1	20	49,0	980	300	0,5
58	F1-NMDA/10	DMSO/1	20	49,0	980	200	0,5
59	F1-NMDA/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	300	0,75
60	F1-NMDA/10	EtOH/2,5	50	47,5	950	200	2

*Büyük hacimli formülasyonların hazırlanması için DMSO ve EtOH'da çözülen polimerlerin çözeltisinden küçük hacimli formülasyonların hazırlanması için alınan polimer çözeltisi hacmini ifade etmektedir.

** Büyük hacimli formülasyonların hazırlanması için gerekli olan dispersant miktarına oranla küçük hacimli formülasyonların hazırlanması için ihtiyaç duyulan dispersant miktarını ifade etmektedir.

Optimize edilmiş nanopartikül hazırlama yöntemleri kullanılarak NMDA ile modifiye edilmiş ve edilmemiş polimerler ile hazırlanan nanopartiküllerin içerisine ve yüzeyine siRNA yüklenmiştir. siRNA yüklü nanopartiküllerin hazırlama metodu Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş PBAE nanopartikül formülasyonlarının içerik miktarları ve hazırlama parametreleri

Deneme No	Polimer /miktarı (mg)	Çözücü /miktarı (mL)	Alınan Çözücü Miktarı* (µL)	Ultra saf su miktarı (mL)	Alınan Miktar (Ultra saf su)** (µL)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (sn)	siRNA Yükleme Şekli
61	D-NMDA-siRNA/10	DMSO/1	1	49	49	300	15	Enkapsülasyon
62	D-NMDA-siRNA/10	DMSO/1	1	49	49	300	15	İyonik Etkileşim
63	F1-NMDA-siRNA/10	EtOH/2,5	2,5	47,5	47,5	300	45	Enkapsülasyon
64	F1-NMDA-siRNA/10	EtOH/2,5	2,5	47,5	47,5	300	45	İyonik Etkileşim

*Büyük hacimli formülasyonların hazırlanması için DMSO ve EtOH'da çözülen polimerlerin çözeltisinden küçük hacimli formülasyonların hazırlanması için alınan polimer çözeltisi hacmini ifade etmektedir.

** Büyük hacimli formülasyonların hazırlanması için gerekli olan dispersant miktarına oranla küçük hacimli formülasyonların hazırlanması için ihtiyaç duyulan dispersant miktarını ifade etmektedir

3.3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.3.1. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerinin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımının İncelenmesi

Nanopartiküllerin, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı (poldispersite indeksi, PDI) foton korelasyon spektroskopisi yöntemi (Malvern Zetasizer, Nano-ZS) kullanılarak tayin edilmiştir.

3.3.3.2. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerinin Yüzey Yüklerinin İncelenmesi

Formülasyonların zeta potansiyeli, 25°C'de, 78.5 dielektrik sabitinde, 5 mS/cm iletkenlikte, DTS 1060C zeta küveti kullanılarak, 40 V/cm alan gücünde Malvern Zetasizer (Nano-ZS) ile incelenmiştir ⁸⁶.

3.3.3.3. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerinin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Nanopartiküllerin morfolojileri transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. TEM için örnekler %2 m/v fosfotungustik asit ile boyanmıştır. Bakır grid üzerine yerleştirilip TEM ile gözlemlenmiştir. SEM için, kuru partiküller, çift taraflı karbon karbon emdirilmiş

SEM stub üzerine yerleştirmiştir. Daha sonra örnekler Emitech K550 Sputter Coater kullanılarak 2 dk 30mA’de altın kaplanıp SEM’de görüntüleri alınmıştır ⁸⁷.

3.3.4. Boş ve Yüklü Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları sonrası ideal olduğu belirlenen formülasyonların fiziksel ve kimyasal stabiliteleri 4 ± 2 °C (buzdolabında), 25 ± 2 °C ve $\%60\pm 5$ bağıl nem ile 40 ± 2 °C ve $\%75\pm 5$ bağıl nem şartlarında stabilite kabininde 12 ay boyunca incelenmiştir. Belli zaman aralıklarında formülasyonlar görünüş, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyel ölçüm sonuçları açısından incelenmiştir ⁸⁷.

Formülasyonlar aynı zamanda liyofilize edilmiştir. Liyofilize formülasyonlar aşağıda bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır ve ideal kriyoprotektan miktarının bulunması için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Kriyoprotektan ilavesinden sonra 5 mL formülasyonlar 2 saat süre boyunca -20°C ’deki dondurucuda, 10mL’lik cam flakonlarda dondurulmuşlardır. Daha sonra 48 saat süre boyunca, -45°C ’de, 17 mTorr basınç altında VirTis AdvancePlus marka liyofilizatör cihazı ile liyofilize edilmiştir.

48 saat süren liyofilizasyon işleminin sonucu elde edilen liyofilize tozlar tekrar disitile suda dağıtılmış ve böylece formülasyonlar liyofilize edilmeden önceki konsantrasyona ayarlanmıştır. Örnekler karıştırıcıda 4 saat süre ile karıştırılmıştır. Yeniden disperse edilen formülasyonlardan 0dk, 5dk, 15dk, 30 dk ve 1, 2, 3 ve 4. saatlerde örnek alınıp partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçümü yapılarak karakterize edilmiştir. 0 dk ölçümü formülasyonlara kriyoprotektanın ilave edilip yarım saat karıştırıldıktan sonra dondurulmadan yapılan ölçümlerine tekabül etmektedir. Tüm ölçümler en az 3 paralel çalışılmanın sonucudur ve ölçüm en az 5 kere tekrarlanmıştır.

Deneme 1: Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu

Liyofilize edilecek nanopartikül formülasyonları 5 mL olarak hazırlanmıştır. Hazırlanışları aşağıda anlatılmıştır.

F1-NMDA Formülasyonunun Hazırlanması

5 mL nanopartikül dispersiyonunun elde edilmesi için 4 mg/mL olacak şekilde etanolde çözünmüş F1 polimeri stok çözeltisinden 0,25 mL alınır. 4,75 mL distile su içerisine 2 dk boyunca damla damla ilave edilir. 2 saat boyunca 1500 rpm’de manyetik balık yardımı ile karıştırılır. Nanopartikül dispersiyonu oluştuktan sonra damla damla gerekli miktarda kriyoprotektan ilave edilmiştir.

D-NMDA Formülasyonunun Hazırlanması

5 mL nanopartikül dispersiyonunun ede edilmesi için 10 mg/mL DMSO'da çözünmüş D polimeri stok çözeltisinden 0,1 mL alınır. 4,9 mL distile su içerisine 2 dk süre ile damla damla ilave edilir ve 1500 rpm'de manyetik balık yardımı ile karıştırılır. Nanopartikül dispersiyonu oluştuktan sonra kreyoprotektan damla damla ilave edilmiştir.

K1-PEG-NMDA Formülasyonlarının Hazırlanışı

Kitosan'ın %1'lik asetik asit içerisindeki %0,3'lük stok çözeltisi (45mg kitozan 15 mL %1'lik asetik asit içinde çözündülecek) ve TPP'nin ultra saf su içindeki %0,1'lik çözeltisi her deneyden önce taze hazırlanmıştır. 417 µL K1-PEG-NMDA çözeltisi 4,375 mL su ile çözölmüştür. Üzerine 208 µL TPP çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. 2 saat süre ile karıştırılmıştır.

K2-PEG-NMDA Formülasyonlarının Hazırlanışı

Kitosan'ın %1'lik asetik asit içerisindeki %0,3'lük stok çözeltisi (45mg kitozan 15 mL TPP içinde çözündülecek) ve TPP'nin ultra saf su içindeki %0,1'lik çözeltisi her deneyden önce taze hazırlandı. 417 µL K2 çözeltisi 4404 mL su ile çözöldü. Üzerine 179 µL TPP çözeltisi damla damla ilave edildi

K3-PEG-NMDA Formülasyonlarının Hazırlanışı

Kitosan'ın %1'lik asetik asit içerisindeki %0,3'lük stok çözeltisi (45mg kitozan 15 mL %1'lik asetik asit içinde çözündülecek) ve TPP'nin ultra saf su içindeki %0,1'lik çözeltisi her deneyden önce taze hazırlanmıştır. 417 µL K3-PEG-NMDA çözeltisi 4,333 mL distile suda çözölmüştür. Üzerine 250 µL TPP çözeltisi damla damla ilave edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlara kriyoprotektan olarak D-(+)-Trehaloz (Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edilmiştir. D-(+)-Trehaloz miktarı, hazırlanan formülasyonların içinde barındırdığı polimer miktarının %5, %10, %25, %50 ve %100'ü olacak şekilde belirlenmiştir. Bu işlem için 10 mg/mL D-(+)-Trehaloz stok çözeltisi hazırlanmıştır. F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonları için stok çözeltiden 5 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL ve 100 µL olacak şekilde K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonları için aynı yüzdeleri elde etmek adına 6,25µL, 12,5 µL, 21,25µL, 62,5µL ve 125 µL stok çözeltiden nanopartikül dispersiyonuna ilave edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler yeniden disperse edilmiş ve 4 saat boyunca belirli zaman aralıklarında partikül boyutu, partikül dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak analiz edilmiştir

Deneme 2: Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu

Formülasyonlar Deneme 1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Kriyoprotektan olarak yine D-(+)-Trehaloz kullanılmıştır. Ancak bu sefer nanopartikül formülasyonu içerisindeki kriyoprotektan miktarı artırılmıştır. D-(+)-Trehaloz miktarı, 5mL nanopartikül formülasyonunun %5, %10, %25, %50 ve %100’ü olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunu sağlamak adına, 25mg/mL D-(+)-Trehaloz stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlar için 5 mL formülasyon içerisine 10µL, 20µL, 50µL, 100µL ve 200µL stok çözeltiden ilave edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler yeniden disperse edilmiş ve 4 saat boyunca belirli zaman aralıklarında partikül boyutu, partikül dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak analiz edilmiştir.

Deneme 3: Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu

Formülasyonlar Deneme 1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Kriyoprotektan olarak yine D-(+)-Trehaloz kullanılmıştır. Nanopartikül formülasyonu içerisindeki kriyoprotektan miktarı artırılmıştır. D-(+)-Trehaloz miktarı, son hacimde %2, %4, %10, %20 ve %40 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunu sağlamak adına, distile su içerisinde 240mg/mL D-(+)-Trehaloz stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlara yukarıdaki yüzdeleri elde etmek için sırasıyla 42µL, 85µL, 217µL, 450µL ve 1000µL stok çözeltiden ilave edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler yeniden disperse edilmiş ve 4 saat boyunca belirli zaman aralıklarında partikül boyutu, partikül dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak analiz edilmiştir.

Deneme 1 ile ideal kriyoprotektan miktarı belirlenen F1-NMDA ve D-NMDA ile Deneme 3 ile ideal kriyoprotektan miktarı belirlenen K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA nanopartikül dispersiyonu 0. Hafta, 1. Hafta, 2. Hafta, 3. Hafta, 4. Hafta, 2. Ay, 3. Ay, 6. Ay, 9. Ay ve 12. Ayda partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi için $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ (buzdolabında), $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve 60 ± 5 bağıl nem ile $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve 75 ± 5 bağıl nem şartlarında stabilite kabininde muhafaza edilmeye başlanmıştır.

Liyofilize edilecek formülasyonlar sırası ile Deneme 1 ve Deneme 3’te bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. Kriyoprotektan ilavesinden sonra formülasyonlar 2 mL olacak şekilde 10 mL’lik flakonlara doldurulmuştur. 2 saat süre boyunca - 20°C ’deki dondurucuda, 10mL’lik cam flakonlarda dondurulmuşlardır. Daha sonra

48 saat süre boyunca, -45°C’de, 17 mTorr basınç altında VirTis AdvancePlus marka liyofilizatör cihazı ile liyofilize edilmiştir.

Deneme 4: Kriyoprotektan miktarının optimizasyonu

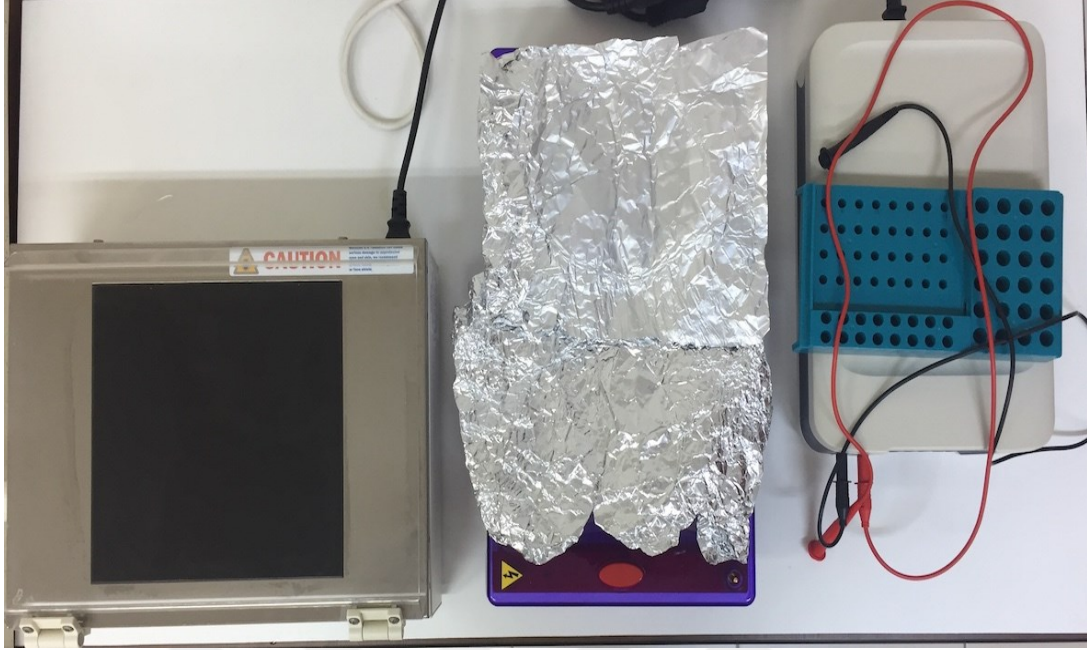
İki aylık stabilite çalışması değerlendirildiğinde K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının stabilite çalışmaları devam ederken, F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonları için kriyoprotektanın değiştirilmesine ve yeniden optimizasyonun yapılmasına karar verilmiştir. Bu bağlamda kriyoprotektan olarak D-(+)-Mannitol tercih edilmiştir. Formülasyonlar Deneme 1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. D-(+)-Mannitol miktarı, son hacimde %2, %4, %10, %20 ve %40 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunu sağlamak adına, distile su içerisinde 240mg/mL D-(+)-Mannitol stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlara yukarıdaki yüzdeleri elde etmek için sırasıyla 42µL, 85µL, 217µL, 450µL ve 1000µL stok çözeltiden ilave edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler yeniden disperse edilmiş ve 4 saat boyunca belirli zaman aralıklarında partikül boyutu, partikül dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak analiz edilmiştir.

% nem tayin çalışmaları için liyofilize formülasyonlar başlangıç ağırlığının (BA) bulunması adına dikkatlice tartılmışlardır. Daha sonra 30°C’den 100°C’ye etüvde ısıtılmışlardır. Hemen tartılarak son ağırlıkları (SA) bulunmuştur ¹⁰⁹. % Nem içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\%Nem = \frac{BA - SA}{BA} \times 100$$

3.3.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Nanopartiküller ile siRNA arasında kompleks oluşturma kabiliyeti ve nanopartiküle yüklenen siRNA’nın formülasyon içerisindeki stabilitesi, Agaroz jel elektroforez (Cleaver Scientific Ltd., İngiltere) yöntemi ile incelenmiştir. Agaroz, trisasetat-EDTA (TAE, pH 8.0) tamponu içerisinde berrak çözelti oluşuncaya kadar kaynatılarak çözündürülmüştür. Takiben oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 0.5 µg/mL derişimde etidiyum bromür ilave edilmiştir. Daha sonra agaroz jel, içerisinde pH 8.0 TAE tamponu bulunan yürütme tankına alınmıştır. Analiz için örnek: elektroforez yükleme tampon 9:1 oranında opsiyonel olarak 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırılıp (bromfenol mavisi) jele uygulanmıştır. Elektroforez işlemi sabit 100 V akımda 1 saatte tamamlanmıştır. Elektroforez işlemi sonrası, UV transilüminatör üzerinde incelenen jeller fotoğraflar ile değerlendirilmiştir.



Şekil 29: AgaroZ Jel Elektroforez sistemi

Liyofilize halde bulunan 2 nMol siRNA 100 μ L RNaz (RNA'yı parçalayan enzim) içermeyen Duplex Buffer ile çözüldü. Böylece 20 μ M konsantrasyona sahip siRNA çözeltisi elde edildi ve daha sonra vortekslendi. Elde edilen çözelti 94°C'de 2 dakika boyunca ısıtıldı. Daha sonra soğuması için oda sıcaklığında tutuldu. Hazırlanan siRNA çözeltisinden 1,5 μ L alınarak cihaz (Thermo Nanodrop 2000 Spektrofotometre, Almanya) yardımı ile hazırlanan çözeltinin 180,5 μ g/mL konsantrasyona sahip olduğu hesaplandı.

K1-NMDA, K2-NMDA, K3-NMDA nanopartikülleri kitosan konsantrasyonu 0,25 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 10 mg F1-NMDA polimeri 2,5 mL EtOH'da çözüldü. 50 μ L polimer çözeltisi 950 μ L ultra saf suya damlatıldı. 300 rpm 45 sn vortekslendi ve böylece nanopartiküller elde edildi. 10 mg D-NMDA polimeri 10 mL DMSO'da çözüldü. 200 μ L polimer çözeltisi 800 μ L deiyonize suya damlatıldı ve 300 rpm 15 sn vortekslendi. İdeal hazırlama metotları belirtilen nanopartiküller için

Tablo 58' de verilen polimer:siRNA oranları kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin siRNA tutma oranları jel elektroforez ile hesaplandı.

Polimer:siRNA oranı, mikrolitredeki milligram polimer ve gen hesaplanarak belirlendi.

Kitosan (K1-NMDA, K2-NMDA, K3-NMDA) örneklerinin jel elektroforez uygulaması için, 500 μL 'lik ependorflara önce belirtilen orandaki polimer, üzerinde 0,55 μL siRNA konuldu ve hafifçe karıştırıldı. Tüm kuyucuklara belirli oranlardaki polimer ve siRNA konulduktan sonra 30 dakika beklendi ve bu süre içinde toplamda 3 defa ependorflar el ile hafifçe karıştırıldı. Ardından hacmi 9 μL 'ye tamamlanması gerekenler için distile su konuldu. Mevcut hacim 9 μL 'den fazla olanlar için herhangi bir tamamlama yapılmadı. 1 μL Loading dye yüklemesinin ardından örnekler kuyucuklara yüklendi ve yürütüldü. Sonuçlar değerlendirildi.

D-NMDA ve F1-NMDA örneklerinin jel elektroforez uygulamasında, siRNA hem enkapsüle edildi hem de iyonik etkileşim ile nanopartiküllere yüklendi.

Enkapsülasyon yönteminde, 500 μL 'lik ependorflara önce çözünmüş PBAE örneğinden belirtilen oranda konuldu, üzerine 0,55 μL gen konularak, hafifçe karıştırıldı. Tüm kuyucuklara belirli oranlardaki polimer ve gen konulduktan sonra 30 dakika beklendi ve bu süre içinde toplamda 3 defa ependorflar hafifçe karıştırıldı. Ardından nanopartikül oranlarına uygun olacak şekilde 500 μL 'lik boş ependorflara ultra saf konuldu, üzerine bu polimer-siRNA karışımları damla damla ilave edildi ve vortexlendi. Hacmi 9 μL 'ye tamamlanması gereken varsa ultra saf su ile hacim tamamlandı. Mevcut hacim 9 μL 'den fazla olanlar için herhangi bir tamamlama yapılmadı ve 1 μL Loading dye yüklemesinin ardından örnekler kuyucuklara yüklendi ve yürütüldü. Sonuçlar değerlendirildi.

İyonik etkileşim yönteminde ise, önce 500 μL 'lik ependorflara çalışılacak polimer oranlarını sağlayan nanopartiküllere uygun su miktarları konuldu. Üzerlerine çözünmüş PBAE örneğinden belirtilen orandaki miktarı damla damla konuldu ve vortexlendi. Üzerine 0,55 μL siRNA konularak, hafifçe karıştırıldı. Tüm kuyucuklar için nanopartikül hazırlanıp üzerlerine siRNA konulduktan sonra 30 dakika beklendi ve bu süre içinde toplamda 3 defa ependorflar hafifçe karıştırıldı. Hacmi 9 μL 'ye tamamlanması gereken varsa ultra saf su ile hacim tamamlandı. Mevcut hacim 9 μL 'den fazla olanlar için herhangi bir tamamlama yapılmadı. 1 μL Loading dye yüklemesinin ardından örnekler kuyucuklara yüklendi ve yürütüldü. Sonuçlar değerlendirildi.

3.3.6. Yüklü Nanopartiküllerin Serum Stabilitelerinin İncelenmesi

Nanopartiküllerin 0, 0,5, 2, 4 ve 24.saatlerde siRNA'nın bütünlüğünü ne kadar koruduğu ise agaroz jel elektroforez ve poliakrilamid jel elektroforez çalışmaları ile gösterilmiştir.

Nanopartiküler formülasyonların siRNA'nın bütünlüğünü ne kadar koruduğunu analiz etmek için 4 µg siRNA'yı ihtiva edecek formülasyonlar hazırlanmıştır. FBS'nin son konsantrasyonu %5 olacak şekilde FBS ile zenginleştirilmiş %30'luk DMEM'den gerekli hacimde nanopartiküler formülasyona eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0, 0,5, 2, 4, 24 saat) 30 µL örnekler alınmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir. Örnekler agaroz ve poliakrilamid jele uygulanmadan önce serum aktivitesini sonlandırmak için 80°C'de 5dk su banyosunda bekletilmişlerdir. Daha sonra siRNA'nın nanopartiküllerden ayrılması için 5µL (1000 IU) heparin formülasyonlara eklenmiş ve 1 saat boyunca beklenmiştir ^{42,88}.

siRNA'nın bütünlüğü, %1 etidyum bromür (EtBr) ile boyanmış %1 (a/h) agaroz jel (Cleaver Scientific Ltd., İngiltere) ve %20 (h/h) poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Agaroz, tris-borik asit- EDTA tamponu içerisinde berrak çözelti oluşucaya kadar kaynatılarak çözündürülmüştür. Daha sonra EtBr ilave edilmiştir. Agaroz jel, içerisinde 0.5XTBE tamponu bulunan yürütme tankına alınmıştır. Analiz için örnek: elektroforez yükleme tampon 10:2 oranında opsiyonel olarak 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırıldı (bromfenol mavisi) ve jele uygulanmıştır. 120 V akım altında 30 dk boyunca jel yürütülmüştür ⁴². 1xTBE (10,8g tris bazı, 5,5g borik asit, 4 mL EDTA, km 1L distile su) içeren %20 poliakrilamid jel elektroforez siRNA'nın bütünlük tayininde siRNA'nın çok küçük parçalarına bile hassas olduğu için tercih edilmiştir. 20 mL %20'lik poliakrilamid jel hazırlamak için 10 mL %40 akrilamid, 2 mL 10X TBE tamponu ve 8 mL distile su ile karıştırılmıştır. Jelin içerisine 100 µL amonyum persülfat (APS) ve 10 µL tetrametilendiamin (TEMED) ilave edilmiştir. Analiz için örnek: elektroforez yükleme tampon 10:2 oranında opsiyonel olarak 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırılmış (bromfenol mavisi) ve jele uygulanmıştır. 200V amperde 30dk boyunca örnekler yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra jel %1 EtBr içeren TBE tamponu içerisinde 30dk bekletilmiştir ⁸⁸. Elektroforez işlemi sonrası hem agaroz jel hem de poliakrilamid jel için UV transilüminatör üzerinde incelenen jeller fotoğraflar ile değerlendirilmiştir.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada kullanılan hücre hatları muhafaza edildikleri likit nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'de su banyosunda 90 saniye boyunca çözöldü ve T25/T75 kültür kaplarında 37°C'ye ısıtılmış komple medyumlar içine alınarak kültürleri başlatıldı. 4 gün boyunca kültür kaplarına yapışarak tek tabaka halinde büyümeleri izlenen hücreler daha sonra pasajlanarak uygun konsantrasyonlarda devam ettirildi. Hücreler, sıcakla inaktive edilmiş %10 FBS, penisilin/streptomisin (100 U ml⁻¹/100 mg ml⁻¹) ve %1 esansiyel olmayan amino asit (NEAA) ihtiva eden Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kültür ortamı içeren T25/T75 plastik kültür kaplarında, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık sağlayan hücre kültürü inkübatöründe 2-5x10⁵ hücre/mL yoğunlukta büyütöldü. Hücre sayımları Neubauer hücre sayma haznesinde sayıldı. Kültür kabının yüzeyine yapışarak büyüyen hücreler, haftada iki kez pasajlanarak çoğaltıldı. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılmalrı için medyum alınıp, steril PBS ile yıkama işlemini takiben hücrelerin üzerine 500 µL %0.05 Trypsin/EDTA eklenip 37°C'de 3 dakika bekletildi, hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben 5 mL medyum eklenerek tripsin inhibe edildi ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj ile hücreler çöktüröldü. Hücre çökeltisi yeni medyum ile tekrar süspanse edilerek 2-5x10⁵ hücre/mL konsantrasyonunu verecek şekilde 1/3 veya 1/5 oranlarında ekimleri gerçekleştirildi. SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) ve Neuro-2A (ATCC, CCL-131) hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop altında kontrol edildi ve floresan mikroskopta faz-kontrast görüntöleri alındı

3.4.1. Sitotoksisite Çalışmaları

Nanopartiköllerin hücre kültüründe oluşturabileceği sitotoksisitenin değerlendirilmesi amacıyla MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi uygulandı. Nanopartiköller ilk olarak ön bilgi sağlaması amacı ile laboratuvarı mevcutta bulunan HEK 293 ve POF hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda denendi. Bu işlemler esnasında SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinin de büyümeleri sağlandıktan sonra bu hücrelere de rutinde çalışılacak olan konsantrasyonlarda nanopartiköl uygulaması yapılarak MTT testi uygulandı.

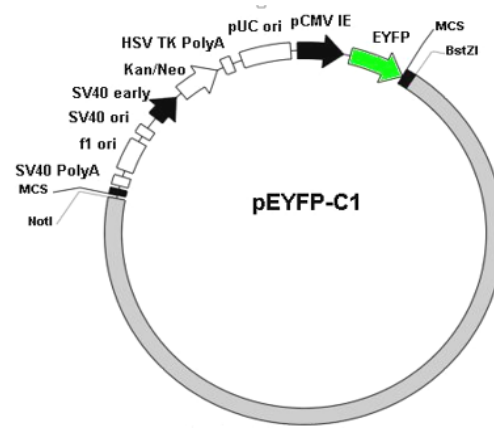
MTT hücre canlılığı analizi için, hücreler steril düz yüzeyli 96 kuyucuklu plakalar içirisine 100 µl hacminde ve 1x10⁵ hücre/ml konsantrasyonunda ekildi ve 37°C de %5 CO₂ ortamında 24 saat boyunca inkübe edildi. Düşük serum konsantrasyonlu kültür medyumunda (Opti-MEM, Thermo) disperse edilen ve 20 dk.

inkübe edilen nanopartiküller, DMEM medyumları uzaklaştırılan hücrelerin üzerine ilave edilerek 4 saat inkübasyonuna bırakıldı. Ardından hücrelere MTT solüsyonu eklenerek 37°C de ve %5 CO₂ ortamında 4 saat bekletilmiş ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için solubilizasyon solüsyonu eklenerek aynı şartlarda 24 saat solubilizasyondan sonra mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm’de absorbans ölçümleri alınarak hücre canlılığı analiz edildi. DMEM medyumunu blank olarak kullanılarak tüm absorbans ölçümlerinden çıkarıldı. Nanopartikül uygulamasının sitotoksik etkileri, DMEM ile muamele edilmiş ve başka uygulama yapılmamış hücrelere (negatif kontrol) karşı değerlendirildi. Üç tekrar ile alınan sonuçların ortalaması alındı ve hücre canlılığı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \text{Abs}_{\text{np uygulaması}} / \text{Abs}_{\text{negkontrol}}$$

3.4.2. Hücrelerin htt Ekspresyon Vektörü ile Transfeksiyonu

siRNA yüklü nanopartiküllerin mutant htt ekspresyonunu baskılama etkinliğinin gösterilmesi için, öncelikle hücrelerde mutant htt ekspresyonu sağlanması gereklidir. Bu amaçla tam uzunlukta insan htt geni içerecek şekilde daha önce yapılan bir araştırma çerçevesinde ⁸⁹ klonlanmış olan FLhtt25Q-YFP ve FLhtt90Q-YFP (normal ve mutant htt) rekombinant ekspresyon vektörleri kullanıldı. Htt geninin klonlanmış olduğu pEYFP-C1 vektörünün özellikleri Şekil 30 ‘da gösterildi.



Şekil 30: FL25Q ve FL90Q htt dizileri pEYFP-C1 ekspresyon vektörünün (Living Colors Fluorescent Vectors, Clontech) MCS bölgesine daha önceki bir çalışmada klonlanmıştır (Ersoy Tunalı, 2012)

A) Rekombinant vektörlerin çoğaltılması: Öncelikle Ultrakompetan *Epicurian coli* XL2-Blue bakterileri (Agilent) ekspresyon vektörleriyle transforme edilerek

başarılı koloniler büyütüldü. -80°C’de muhafaza edilen Ultrakompetan XL2 Blue hücreleri buz içerisinde bekletilerek çözüldü ve 40 µL bakteri hücresi, önceden soğutulmuş ve 0.7 µL 14.2M β-merkaptotanol içeren 15 mL Falcon 2059 polipropilen tüplere aktarıldı. İki dakika aralıklarla hafifçe çalkalanarak toplam 10 dakika buz içerisinde bekletildi. Ardından hücrelerin üzerine 50 ng vektör DNA’sı eklenerek 30 dakika süresince buzda bekletildi. Hücreler 42°C’de 30 saniye ısı şokundan sonra 2 dakika buz içinde bekletildi ve sonrasında üzerlerine 42°C’ye ısıtılmış 360 µL LB besiyeri eklenip orbital çalkalayıcıda (250 rpm, 37°C’de) 1 saat büyütüldü. Bu sürenin ardından kanamisin içeren LB agarlı petri kaplarına ekildi ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi (Şekil 99). Ertesi gün tek bir bakteri kolonisi 25 µg/mL kanamisin içeren 5 mL LB medyumuna transfer edilerek 8 saat boyunca 37°C’de ve 250 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Daha yüksek hacimli kültürün büyütülmesi için, bu kültürden 200 µL alınarak 100 mL LB medyumuna transfer edildi ve orbital çalkalayıcıda 37°C’de ve 250 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Ardından, Plasmid Maxi Kit (Qiagen) protokolüne göre bakterilerden DNA izolasyonu yapıldı. Transformasyon ile çoğaltılan bu vektörlerin dizilerinin doğrulanması amacıyla EL2 (5’ TTTCAGAACTTCTGGGCAT 3’) ve EGFPN (5’ CGTCGCCGTCAGCTCGACCAG 3’) primerleri kullanılarak Sanger dizi analizi yapıldı (İontek A.Ş. İstanbul) ve diziler Chromas 2.33. Programı ile incelendi

B) Hücrelerin transfeksiyonu: SH-SY5Y ve Neuro2A hücre hatlarında FLhtt-EYFP overekspresyonunun gösterilmesi için hücreler Eugene6 (Roche, İsviçre) transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edildi. Bu amaçla hücreler 6- veya 96-kuyucuklu tabaklara ekilerek %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar (24 saat) büyütüldü. Eppendorf tüpe alınan 100 µL serumsuz DMEM medyumuna 3/6 µL Eugene6 eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 0.5/1 µg vektör DNAsı eklenerek ve 15 dakika daha inkübe edilerek DNA-lipozom kompleksinin oluşması sağlandı. Bu kompleks hücrelerin üzerine verilerek hücrelerin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon verimi 24 saat sonra floresan mikroskop altında YFP filtresi ile gözlemlendi (Şekil 101 ve Şekil 102). Rekombinant vektörlerle transfekte edilen hücrelerdeki canlılık daha önce belirtilen şekilde MTT testi ile belirlendi. FLhtt ekspresyonunun 24 saat içinde hücre canlılığında %30 azalmaya sebep olduğu, ancak normal ve mutant formlar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 63, Şekil 103).

3.4.3. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin htt Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması

siRNA yüklü nanopartiküllerin htt ekspresyonuna etkisi, bu nanopartiküllerin rekombinant htt vektörleriyle birlikte hücelere verilmesi sonucunda değerlendirilmiştir. siRNA ve rekombinant htt vektörleri 96 kuyucuklu tabaklarda 24 saat büyütülen (%70-80 konfluens) hücelere transfeksiyon ajanı ile birlikte uygulanmıştır. Bu amaçla sadece siRNA ve htt vektörleri, siRNA yüklü nanopartiküller ve htt vektörleri, sadece htt vektörleri ile muamele edilmiş hücre grupları oluşturulmuştur. Ko-transfeksiyondan 24-48 saat sonra hücreler floresan mikroskop altında incelenmiştir. siRNA'nın htt ekspresyonuna etkisi ilk olarak floresan mikroskop altında 514/527nm (ekstasyon/emisyon) dalga boylarında hücrelerden gelecek olan sinyallerin karşılaştırılması ve transfeksiyon verimine göre normalize edilmesi ile, daha sonra da kantitatif gerçek zamanlı PCR ile incelenecek ve htt gen ifadesindeki değişimler belirlenmiştir.

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analizleri ile htt gen ekspresyonlarının belirlenmesi için BIORAD CFX Connect Real Time System cihazı kullanılmıştır. Aşağıdaki hücre grupları oluşturulduktan ve 24-48 saat inkübasyondan sonra hücrelerden total RNA izole edilmiştir. RNA'nın kalitesi agaroz-formaldehit jel ile 28S/18S : 2/1 oranının gözlemlenmesi ve kantitatif olarak da A260 ölçümü ile belirlenmiştir. 2 µg total RNA'dan sentezlenecek olan 1 µg cDNA, SYBR Green PCR master mix kullanılarak qRT-PCR yapılmıştır. Referans genler olarak gliseraldehit trifosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve beta actin genleri beraber kullanılmıştır. HTT gen ekspresyon düzeyi ise aşağıdaki primer çifti kullanılarak belirlenmiştir (Wang vd., 2005).

ileri:5'-CGCCGCCTCCTCAGCTTCCT-3'

ters:5'-GCGGTGGTGGCGGCGGCGGCT-3'

Ekspresyon seviyelerindeki farklar $\Delta\Delta C_t$ metodu ile belirlenmiş ve deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.

Aşağıdaki uygulamalar yapılmış hücre grupları arasında qRT-PCR sonuçları karşılaştırılmıştır:

- 1.siRNA-HDExon1 uygulaması
- 2.kontrol siRNA uygulaması (scramble)
- 3.FLhtt-YFP uygulaması
4. siRNA-HDExon1 yüklü nanopartikül uygulaması

5. siRNA-HDExon1 yüklü nanopartikül ve FLhtt25Q-EYFP uygulaması

6. siRNA-HDExon1 yüklü nanopartikül ve FLhtt90Q-EYFP uygulaması

Sadece siRNA ve siRNA yüklü nanopartiküllerle hücrelerin inkübasyonu sonuçlarının karşılaştırılması ile siRNA'nın nanopartikülle kompleks olmaksızın hücrelerde yaptığı htt inhibisyonu belirlenmiştir.

siRNA yüklü nanopartiküllerin endojen htt ekspresyonuna etkisi, transfekte edilmemiş hücrelere siRNA yüklü nanopartiküllerin uygulanması öncesinde ve sonrasındaki htt gen ifadeleri karşılaştırılarak belirlenmiştir. siRNA-HDExon1'in hedeflediği htt gen bölgesi, fare ve insanda 3bç farklılık gösterdiği ve siRNA-HDExon1, insan dizisine hedefli olarak tasarlandığı için, fare homolog htt gen ekspresyonunu baskılaması düşük bir ihtimal olarak beklenmemektedir. N2A ve SH-SY5Y hücrelerindeki endojen htt baskılanma seviyelerinin karşılaştırılması ile de kullanılan siRNA dizisinin spesifikliği ortaya koyulmuştur.

cDNA sentezi sonrasında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için 1µg cDNA örneği, HTT genine özgün primer (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) ve RT² Syber Green Fast Master Mix (Qiagen) kullanılarak Qiagen Rotor-Gene Q cihazında qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İnsan β-aktin geni referans gen olarak kullanılmıştır. qRT-PCR reaksiyon koşulları Tablo 9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9: qRT-PCR reaksiyon koşulları

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95°C
40	15 saniye	95°C
	30 saniye	60°C
Erime eğrisi analizi		

qRT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi için öncelikle reaksiyonun eşik değeri ("threshold") belirlenmiş, ardından her örneğe ait döngü eşik değeri ('cycle threshold', Ct) bulunmuştur. Her örnek için 3 tekrar yapılarak Ct değerlerinin ortalaması alınmıştır. Örnekler arasındaki ekspresyon seviyesi farklılıkları $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle (Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real time PCR data by the comparative Ct method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8) belirlenmiştir. Bu amaçla

örneklerdeki referans gen ve HTT genine ait Ct değerlerini kullanılarak ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplanmıştır. $\Delta\Delta Ct$ değeri, gen ekspresyonundaki kat farkını temsil etmektedir.

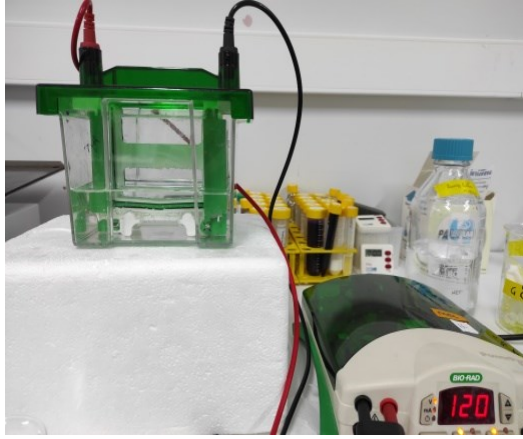
$$\Delta Ct = Ct_{HedefGen} - Ct_{ReferansGen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Örnek} - \Delta Ct_{Kontrol}$$

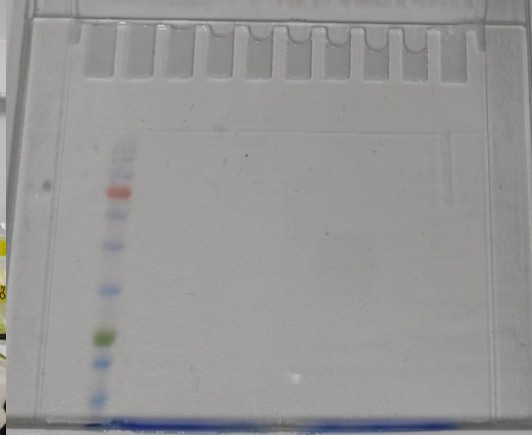
3.4.4. Western Blottlama ile Hücrelerde Ekspresyon Tayini

a) Protein izolasyonu: Kültür ortamındaki hücrelerden protein izolasyonu amacıyla, 6-kuyucuklu kültür kaplarında büyüyen hücreler proteaz inhibitörleri içeren 1x PBS ile kazınarak 2 mL tüplere aktarıldı ve 2500 rpm’de 5 dakika santrifüj ile çöktürülüp üst sıvı uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi 100 μ L 1x PBS/proteaz inhibitörü ile tekrar süspanse edilerek, hücre ekstraktlarındaki protein miktarları Bradford yöntemi ile saptandı. Standart olarak çeşitli konsantrasyonlarda (1.0-6.0 μ g/ μ L) sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA standartları ve 5 μ L hücre ekstresi 1/5 sulandırılmış Bradford boyası ile karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında beklemenin ardından örneklerin 595 nm’deki absorbansları mikropilaka okuyucu ile ölçülerek jele 15 μ g protein yüklenmesi için gereken hacimler hesaplandı.

b) SDS-PAGE elektroforezi: 0,75 mm aralıklı cam kasetler arasına önce ayırma jeli, polimerleşmenin ardından ayırma jelinin üzerine %4’lük yükleme jeli dökülerek tekrar polimeşmek üzere bırakıldı. Protein örnekleri 6x Laemmli tamponu ile karıştırıldı. 10 dakika 80°C’de bekletildi ve bunu takiben jele yüklendi. Elektroforez Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell (BIO-RAD) sisteminde 100V’ta gerçekleştirildi. Jel Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak protein ekspresyonu gösterildi.



Şekil 31: SDS-PAGE elektroforez ünitesi



Şekil 32: Elektroforez sonrası gel görüntüsü ve Opti-Protein XL protein markörünün kontrolü (Kırmızı bant: 75 kDa, yeşil bant: 25 kDa)

c) Blotlama: SDS-PAGE elektroforezini takiben, proteinler PVDF membrana transfer edildi. Bu amaçla, elektroforezi yapılan jel, jel ile aynı büyüklükte kesilmiş Whatman® 3MM kağıtları ve PVDF membran 15 dakika 4°C’de transfer tamponunda dengelenmeleri amacı ile bırakıldı. Hazırlanan blotlama sandivici transfer tamponu ile dolu blotlama tankına alınarak 30 V’ta 10 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi. Blotlama sonrasında PVDF membran 1XPBS ile hazırlanmış %5’lik yağsız süttozu (PBS/YS) ile oda sıcaklığında 30 dakika bloklandı. Primer antikor (pEYFP, rabbit) PBS/YS’da hazırlanarak oda sıcaklığında 1 saat membranla çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için PBS ile üç defa 5’er dakikalık yıkama yapıldı, daha sonra membran PBS/YS ile hazırlanmış sekonder antikor (goat, anti-rabbit) ile 1 saat muamele edilip, üç defa PBS/YS ile yıkandı. Membran 6 mL Lumi-Light^{plus} substrat solüsyonu ile 1 dakika muamele edildikten sonra film ile kaplanıp 2 dakika bekletildi, ardından film banyo edildi.

SDS-PAGE elektroforezi: 0,75 mm aralıklı cam kasetler arasına önce ayırma jeli, polimerleşmenin ardından ayırma jelinin üzerine %4’lük yükleme jeli dökülerek tekrar polimerleşmek üzere bırakılmıştır. 15µg protein örneği 2X Laemmlı tamponu ile karıştırılıp 10 dakika 80°C’de denatüre edilmiş ve bunu takiben jele yüklenmiştir. Elektroforez Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell (BIO-RAD) sisteminde 120V’ta gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonunda jel camların arasından çıkarılmış (Şekil 32).

Coomassie Brilliant Blue boyama solüsyonu ile boyanarak protein ekspresyonları gösterilmiştir (Şekil 110).

Islak Transfer: SDS-PAGE elektroforezini takiben, proteinler PVDF membrana ıslak transfer metodu ile transfer edilmiştir. Bu amaçla, elektroforezi yapılan %6'lık SDS-PAGE jeli, jel ile aynı büyüklükte kesilmiş Whatman 3MM kağıtları ve MeOH ile ıslatılmış PVDF membran 15 dakika 4°C'de transfer tamponunda dengelenmeleri amacı ile bırakılmıştır. Teflon sünger-Whatman 3MM kağıt-jel-membran- Whatman 3MM kağıt-Teflon süngerin üst üste koyulmasıyla hazırlanan blotlama sandvici soğuk transfer tamponu (25mM Tris, 192mM glycine) ile dolu blotlama tankına alınarak 30 V'ta 12 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. FLhtt-GFP proteini 350 kDa'luk büyük bir protein olduğu için düşük voltajda uzun süre blotlanması uygun olmaktadır. Beta aktin ve GAPDH proteinleri ise küçük molekül ağırlıklı olduklarından dolayı %10'luk jelde yürütülerek 100V, 1 saatte membrana transfer edilmiştir. Transfer sonrasında jel Coomassie boyama solüsyonu ile, membran Ponceau boyama solüsyonu ile oda sıcaklığında 15dk boyanarak sırasıyla proteinlerin jelden çıkışı ve membrana bağlanmaları kontrol edilmiştir (Şekil 111).

İmmüno boyama: Blotlama sonrasında PVDF membran bloklama tamponu (Advansta) ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek protein içermeyen membran bölgeleri kapatılmıştır. Primer antikor (Living colors peptide antibody, Clontech; anti-huntington protein antibody, Bioss; GAPDH, Proteintech; Beta-actin, CellSignaling) bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanarak oda sıcaklığında 1 saat membranla çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için PBST (PBS+%0,1 Tween20) ile üç defa 5'er dakikalık yıkama yapılmış, daha sonra membran bloklama tamponu ile hazırlanmış HRP konjuge sekonder antikor (goat, anti-rabbit ve goat, anti-mouse, Advansta) ile 1 saat muamele edilip, üç defa 5'er dakika PBST ile yıkanmıştır. Membran HRP substrat solüsyonu (Advansta) ile 5 dakika muamele edildikten sonra Azure c300 cihazı ile görüntülenmiştir.

Beta aktin ve GAPDH primer antikorları ile yapılan antikor boyamaları, deneyde kullanılan örneklerde bu housekeeping protein ekspresyonlarının değişmediğini göstermiştir ve bu genlerin her ikisinin de referans gen olarak kullanılabileceğini ispatlamıştır, qRT-PCR'da da beta aktin geni kullanılmıştır (Şekil 112).

3.5. Flow Sitometri Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hedef Hücrelerdeki Reseptörlere Bağlanma Çalışmaları

Geliştirilen nanopartiküllerin hedef hücreler olan SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerine bağlanmasını incelemek için Flow sitometri (CytoFlex, Beckman Coulter, Amerika Birleşik Devletleri) yöntemi kullanılmıştır. Floresans madde (FITC-BSA), yüklenmiş yüzeyine hedeflendirme ligandı bağlanmış (N-metil D- aspartik asit) nanopartiküllerin hedef hücrelerde yüzeyinde bulunan N-metil D-aspartik asit reseptörlerine bağlanması, oluşturdukları floresans yoğunluğu ölçülerek incelenmiştir.

SH-SY5Y ve Neuro 2A hücre hatları (Pasaj 22- 27) kullanılmıştır. Hücreler, %5 karbondioksit (CO₂) ve %90 bağıl nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılığını devam ettirmesi için %10 FBS ve antibiotik (%1 gentamisin) kullanılmıştır. Hücre yoğunluğunun yaklaşık %70 konfluent (sıkışık) duruma geldiğinde hücreler ya kültürün devamlılığının sağlanması için pasajlanmış ya da testlerde kullanılmıştır.

6 Kuyulu mikropalakalara yaklaşık 3×10^5 hücre/2 mL/kuyu olacak şekilde dağıtılan hücreler 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırılmış ve kuyular 500 µL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Blok gruplarda, taze serumlu besiyeri ilavesini takiben 20µM olacak şekilde hedeflendirme ajanı N-Metil-D-Aspartik asit ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 30 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve takiben yeni serumlu besiyeri eklenmiştir. Tüm gruplarda 12,5µg/mL konsantrasyon olacak şekilde nanopartikül formülasyonları ortama eklenmiştir. Nanopartikül formülasyonlarına 0,1mg/mL konsantrasyonda FITC-BSA iyonik etkileşimle yüklenmiştir. Hücreler nanopartikülle 3 saat maruziyet ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve kuyular 500 µL PBS (1X) ile yıkanmıştır ve %0,2 tripsinden 1 mL ilave edilerek hücreler tripsinize edilmiştir. Hücre süspansiyonu 1500 rpm’de 4 dk süre ile santrifüj sonrası 2 defa 1 mL PBS (1X) ile yıkanmış ve her yıkamada 1500 rpm’de 4 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti böylece floresans yoğunluğunun tespiti için reseptöre bağlanma etkinliği testi için hazır hale getirilmiştir⁹⁰.

Boyanmamış hücrelere (mock) göre kapı ayarlandıktan sonra her örnek için en az 104 hücre sayılmıştır. Deneyler, her konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

3.6. *İn Vivo* Çalışmalar

Bu araştırmada, erkek/dişi cinsiyette, YAC128 transgenik Huntington fareleri kullanılacaktır. YAC128 Huntington fare modeli, 128 CAG tekrarı içeren tam uzunlukta insan huntingtin genine sahiptir. Hem tam uzunlukta hem de insan htt genini taşıdığı için Huntington hastalarında görülen davranışsal bozuklukları ve striyatal nöron ölümünü en iyi şekilde modeller. YAC128 fareleri hem hastalığın nöropatolojik yollarının incelenmesi hem de yeni terapötik yaklaşımların araştırılması için tercih edilen bir hayvan modelidir^{91,92}.

İn vivo çalışmalar için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 38828770-604.01.01-E.14319 sayı numarası ile onay alınmıştır.

Şekil 33'de üretilen YAC128 transgenik deney hayvanların görüntüsü mevcuttur.



Şekil 33: Çalışmada kullanılmak üzere üretilen YAC128 transgenik fareler

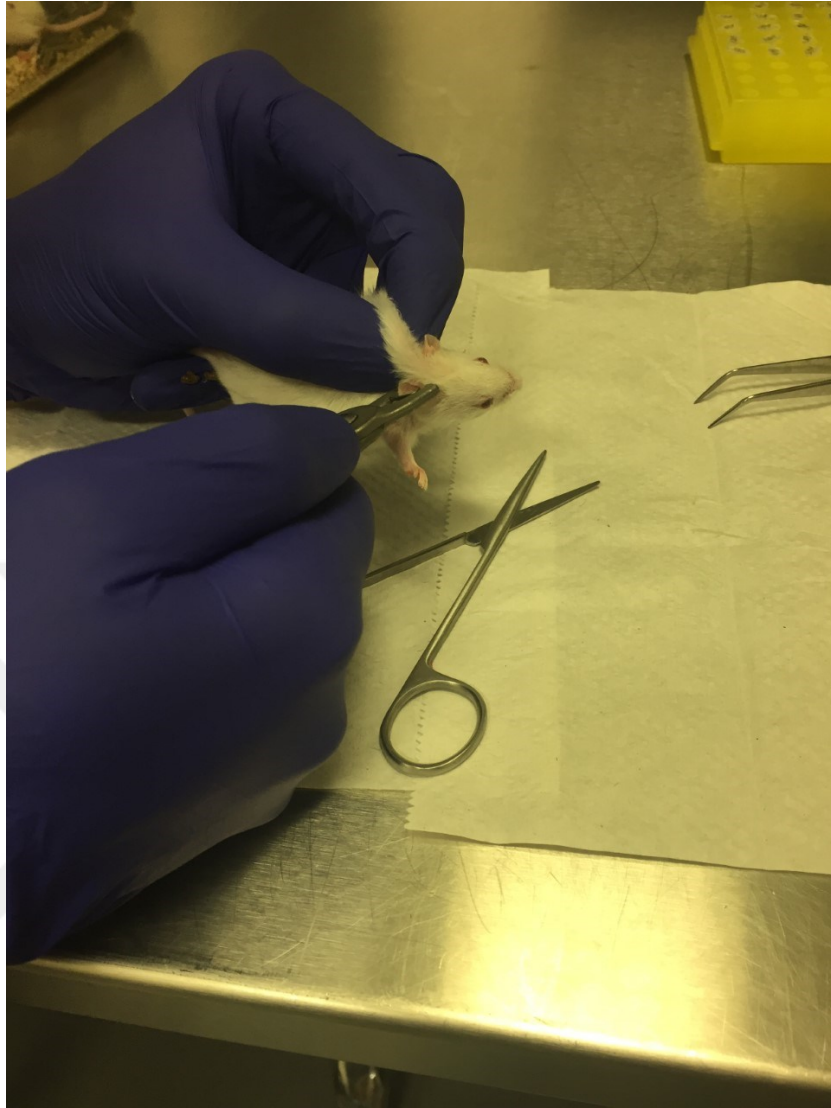
Üretilen yavrular bir aylık olduktan sonra genotipleme çalışmaları için kulak uçlarından örnekler alınarak DNA izolasyonu yapılmış ve ardında da kafeslerde ayrılabilmesi için kulaklarına küpe takılmıştır. Küpe takılması işlemi Şekil 34'da gösterilmiştir. DNA izolasyonu için alkalik lisis tampon (25mM NaOH/ 0.2mM EDTA km: 500 mL) hazırlanmıştır. Daha sonra ise nötralizasyon tamponu (40mM Tris/HCl km:500mL) hazırlanmıştır. DNA izolasyonu için, PCR tüplerine alınan kulak örneklerinin üzerine 75µL Lisis Tamponu eklenmiştir. PCR cihazında 98 °C'de 1 saat 15 °C' de ise ∞ olacak şekilde cycle ayarlanmıştır. PCR'dan alınan örnekler üzerine 75µL nötralizasyon tampon eklenmiştir. Örnekler 4000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Örneklerden kulak dokusuna değmeden 100 µL çekilerek yeni hazırlanan tüplere aktarılıp -20 °C'de saklanmıştır

YAC128 hayvanların genotiplemesi için Jackson Laboratory'nin genotipleme protokolü kullanılmıştır. Özetle, PCR örnekleri 6µL OneTag, 0,6µL primer 1594, 0,6µL primer 1596, 2µL izole edilen DNA ve 2,8µL distile su ile hazırlanmıştır. PCR cycle ise şu şekilde belirlenmiştir:

Tablo 10: PCR cycle değerleri

Sıcaklık (°C)	Süre(saniye)	
94	120	Starting
94	20	Touchdown (11x)
65	15	
68	10	
94	15	Normal PCR (28x)
60	15	
68	15	
68	300	Final (1x)
4	∞	

PCR çalışması sonucu hazırlanan örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür ve band görünen kuyucuklar YAC128 transgenik hayvan olarak belirlenmiştir. %50X TAE tamponu (242g Tris bazı, 57,1 mL glasiyal asetik asit, 100 mL 0,5 M EDTA pH: 8,0) 1x'e seyreltilmiştir. Agaroz jel %4'lük olarak hazırlanmıştır. Agaroz TAE tamponunda çözündükten sonra 4 µL Safeview boya yüklenmiştir. Örnekler 9:1 olacak şekilde loading dye ile boyanıp kuyucuklara yüklenmiştir. 100V akım altında 20 dk boyunca yürütülmüştür.



Şekil 34: Hayvanlara küpe takılması işlemi

3.6.1. Huntington Hastalığı Hayvan Modeli

Tez çalışmamızda HH transgenik fare (YAC128) kullanılmıştır (<https://www.jax.org/strain/004938>). YAC128 kolonileri, Tg(YAC128)53Hay için hemizigot erkek fareler ile FVB/NJ(001800) dişi farelerin Jackson Laboratory protokollerine göre yavrulatilması ile edilmiştir. Yavruların PCR ile genotiplerinin belirlenmesi için kulak ucundan alınan DNA örnekleri Jackson Laboratory'nin protokollerine göre analiz edilmiştir. Gerek boş gerekse siRNA yüklü formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde belirlenen ideal formülasyonlar intranazal ve intraperitonel uygulanmıştır. Hazırlanan ideal

formülasyonlar için aynı başlıklar altında gruplar oluşturulmuştur. Her bir deney grubunda 8 adet YAC128 Huntington fareleri bulunmuştur. 6-7 aylık olan farelerde ideal olarak belirlenen formülasyonların uygulanmasına başlanmıştır. Uygulamalar 3 gün ara ile 10 uygulama olacak şekilde belirlenmiştir. Hücre kültüründen elde edilen etkili doz (20ng siRNA) her bir uygulamada hayvanlara intranasal ve intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Deney grupları aşağıda belirtilmiştir.

Deney Grupları:

1. Grup (Sadece Tampon Çözeltisi İntranazal uygulama) : SF-IN
2. Grup (Sadece siRNA İntranazal uygulama) : siRNA-IN
3. Grup (Taşıyıcı Sistem+siRNA İntranazal uygulama) : F1-NMDA-İ-siRNA-IN
4. Grup (Taşıyıcı Sistem+siRNA İntranazal uygulama): K2-PEG-NMDA-I-siRNA-IN
5. Grup (Taşıyıcı Sistem+siRNA İntranazal uygulama): K3-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN
6. Grup (Sadece taşıyıcı sistem intranasal uygulama) : F1-NMDA-Boş-IN
7. Grup (Taşıyıcı Sistem+siRNA İntraperitoneal uygulama) : F1-NMDA-İ-siRNA-IP
8. Grup (Sadece taşıyıcı sistem İntraperitoneal uygulama) : F1-NMDA-Boş-IP

3.6.1.1. Vücut Ağırlığı Tayini

Deney hayvanlarının vücut ağırlığı her ilaç uygulamasından önce ve davranış deneylerinden önce ölçülmüştür.

3.6.1.2. Tail Suspension Testi

Huntington Hastalığı'nın temel belirtilerinden biri psikiyatrik bozukluklardır. Bu test ise depresyon değerlendirilmesinde kullanılan bir test olup fareler kuyruklarından bağlandıktan sonra hareketli kaldıkları zamanın değerlendirilmesinden ibarettir. Hayvanların depresyon benzeri durumlarının analizi için yerden 50 cm yukarıda olacak şekilde kuyruk ucundan 1 cm içeride hayvanlar bant yardımı ile asılmıştır. Hayvanların depresyon benzeri durumlarının analizi için toplam hareketsiz kaldıkları süre 5 dk boyunca ölçülmüştür ⁹³. Tail suspension testinin yapılışı Şekil 35'de gösterilmiştir. Testler, 0. Gün, 15. Gün, 30. Gün olarak 3 defa yapılmıştır.



Şekil 35: Tail suspension testi

3.6.1.3. Rotarod Testi

Huntington Hastalığı'nın en belirgin belirtisi motor fonksiyon bozukluklarıdır. RotaRod testinde denge ve motor koordinasyon değerlendirilmektedir. RotaRod kendi çevresinde hızı giderek artan (4'den 40 rpm'e 245 saniyede) bir silindirden oluşur ve farelerin bu silindir üzerinde kalabildikleri süre değerlendirilmiştir. Test süresi 5 dakikadır. Test 5 kez tekrarlanmıştır ve ortalama değeri alınmıştır. Bu değerler tedavi öncesi ve tedavinin ortası ve tedavi sonrası farklı zamanlarda tekrarından elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır⁶⁷. Rota Rod testinin yapılışı Şekil 36'da gösterilmiştir



Şekil 36: Rota Rod testi

3.6.1.4. Open Field Analizleri

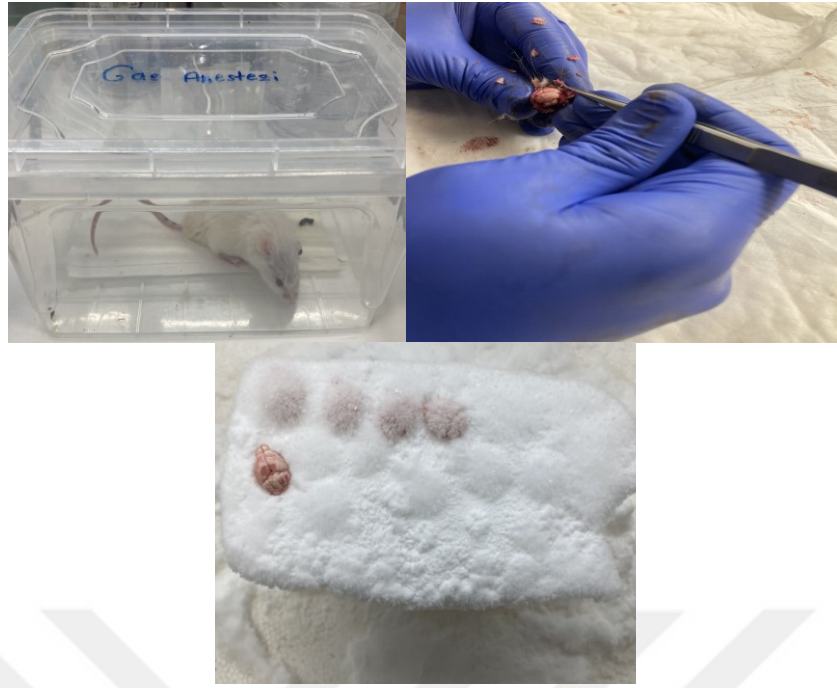
Hayvanların lokomotor aktivitesinin değerlendirilmesi için Open-Field testi kullanılmıştır. Açık alan, spontan lokomotor aktiviteyi ve keşif davranışını ölçmeye izin veren, gri polipropilenden yapılmış 35 cm yüksekliğinde bir yan duvarla çevrili, gri plastik bir zeminle kaplı yuvarlak bir arenadır (çap:150 cm). Arena, bir dış duvar bölgesi (çapın %17,7'si, duvara yakın), bir ara geçiş bölgesi (çapın %32,3'ü) ve bir iç bölge (çapın %50'si, duvarın merkezi) olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. Her fare duvarın yakınında serbest bırakılmış ve 10 dakika boyunca gözlenmiştir. Hayvan yolları bir elektronik görüntüleme sistemi (Anymaze, Stoelting Europe) ile izlenmiştir. Keşfedici davranış ve kaygı ölçümlerini belirlemek için merkezde ve kenarda geçirdikleri süre değerlendirmiştir⁹³. Şekil 37'de Open-Field arenası ve elektronik görüntüleme sistemi gösterilmiştir.



Şekil 37: Open Field testi görünümü A: Open-Field arenası B: elektronik görüntüleme sistemi

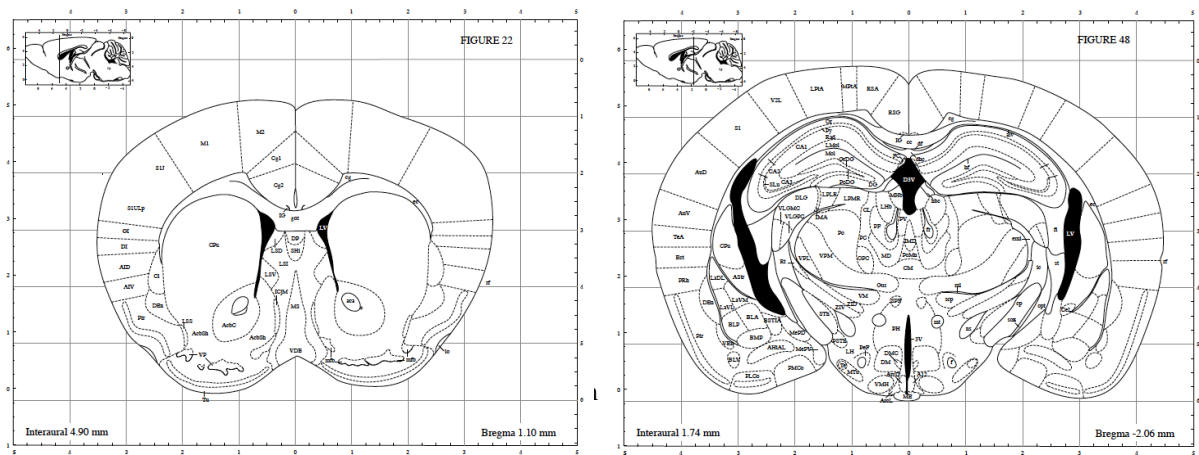
3.6.1.5. Fare Beyinlerinin Çıkarılması ve Analizler için Beyin Kesitlerinin Alınması

Davranış deneyleri sonlandıktan sonra hayvanlar isofluran ile sedasyona uğratılıp giyotin yardımı ile dekapite edilerek sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası beyin çıkarma prosedürü Şekil 38’de gösterilmiştir.



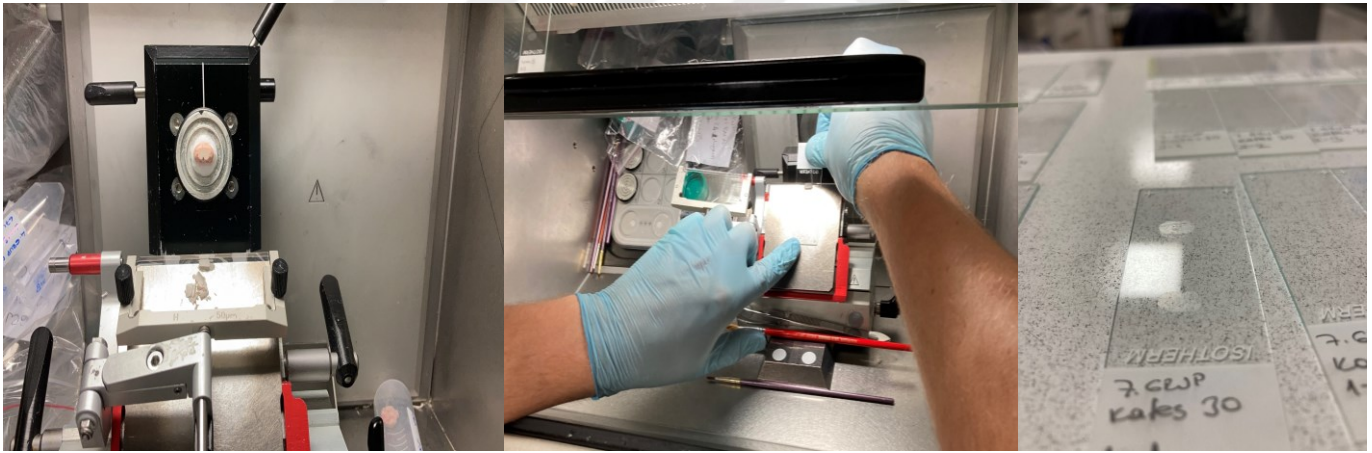
Şekil 38: Sakrifiye edilen hayvanlarda beyin çıkarılması

Beyinler kafatasından çıkarıldıktan sonra kuru buz üzerine konularak donması sağlamıştır. Donan beyinler ileri analizi yapılması için -80°C derecede saklanmıştır. Beyin kesitleri bregmadan 2mm kaudal ve 2 mm rostral olacak şekilde alınmıştır. Şekil 39’da beyin kesitlerinin alınmaya başlandığı ve kesit alımının sonlandığı noktayı göstermektedir.



Şekil 39: Kesitlerin alındığı beyinlerin başlangıç ve bitiş görünümüleri⁹⁴

Beyinlerden, kreyostat cihazı (Leica) kullanılarak kesitler alınmıştır. Önce beyinler Tissue-Tek OCT solüsyonu kullanılarak kreyostat cihazının beyin sabitleme aparatına sabitlenmiştir. Daha sonra bıçak 20 μm 'ye ayarlanarak beynin istenilen bölgesine gelene kadar beyin tıraşlanmıştır. İstenilen bölgeye gelindiğinde beyin kesitleri, pozitif yüklü cam (Isotherm) üzerine alınmıştır. Her bir cam üzerine 20 μm 'lik 2 beyin kesiti alınmıştır. Şekil 40'da beyin kesiti alma işlemi gösterilmiştir. Beyin kesitleri alındıktan sonra 40°C'de sıcak tabla üzerinde yarım saat boyunca bekletilmiştir. 5 cam üzerine toplamda 100 μm 'lik kesit alındıktan sonra 50 μm 'lik bir kesit qRT-PCR analizi, 50 μm 'lik diğer kesit Western Blot analizi için ayrılmıştır. Aynı işlem iki defa tekrar edilmiştir. Son aşamada qRT-PCR ve Western Blot için 50 μm 'lik ikişer kesit alınmıştır. Böylece bir beyin için toplamda her bir cam üzerinde 2'şer beyin kesiti olan 15 camlık kesitler nöropatoloji ve immunohistokimya deneyleri için alınmıştır. qRT-PCR ve Western Blot çalışmaları için ise her bir çalışma için ayrı ayrı toplamda 200 μm 'lik kesitler alınmıştır. Daha sonra kesitler -80°C derecede saklanmıştır.



Şekil 40: Kreyostat kullanarak beyin kesitlerinin alınması

3.7. qRT-PCR ile Ekspresyon Tayini

Belirtilen uygulamalar sonrasında alınan beyin kesitlerinde htt ekspresyonu analizi için qRT-PCR uygulanmıştır. Beyinlerden kuru buz üzerinde bloklar halinde kesitler alınmıştır (bregmadan 2mm kaudal ve 2 mm rostral). Bu bloklardan 6 bölgeden örnekler toplanmıştır (striatum, motor korteks, parietal korteks ipsilateral ve kontralateral vb). Örnekler RNA-later RNA stabilization reagent (Qiagen) ile muamele edilmiş ve RNA izolasyonuna kadar -80°C de dondurulmuştur. Örnekler

homojenize edilip ve total RNA izole edilmiştir. qRT-PCR çalışmaları yöntemler kısmında belirtildiği gibi yapılmıştır.

Transgenik farelerdeki HTT gen ekspresyon düzeyi aşağıdaki primer çifti kullanılarak belirlenmiştir:

ileri: 5'-CGCCGCCTCCTCAGCTTCCT-3',

ters: 5'-GCGGTGGTGGCGGCGGCGGCT-3'

3.8. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Elde edilen *in vitro* ve *in vivo* tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar arasındaki farklılık ya da benzerlikleri yorumlanmıştır. Parametrik testler için Student t test veya ANOVA varyans analizi, non parametrik testler için Kruskal-Wallis analizi tercih edilmiştir. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Polimer Sentezine Ait Bulgular

4.2. Sentezlenen Polimerlerin Karakterizasyonu Bulguları

4.2.1. Polimerlerin Molekül Ağırlığının Tayini Bulguları

Modifiye kitosan ve PBAE ürünlerine ait molekül ağırlığı sonuçları Tablo 11’de verilmiştir.

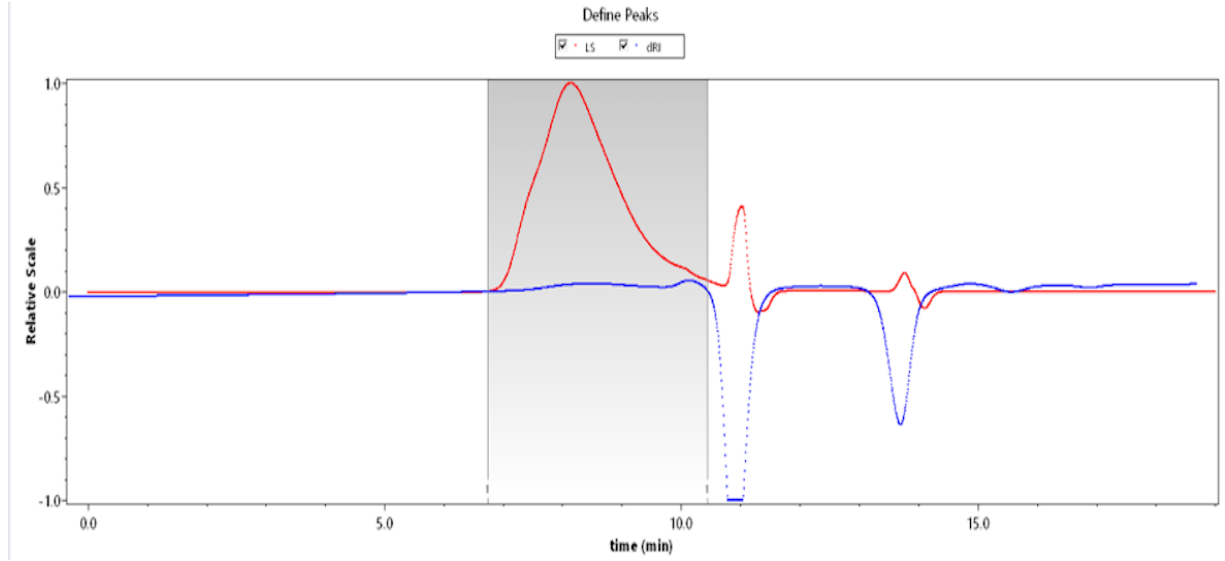
Tablo 11: Modifiye kitosan ve PBAE ürünlerine ait molekül ağırlığı sonuçları

Formülasyon kodu	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PDI (Mw/Mn)
PEG-K1	92,00±0,53	99,00±0,66	1,079±0,01
PEG-K2	171,00±13,70	183,00±15,67	1,068±0,13
PEG-K3	191,00±14,93	251,00±19,77	1,315±0,15
PBAE _{BAEDED} A (D1)	7,10±0,87	11,10±0,36	1,566±0,20
PBAE _{BAEDAP} (F1)	1,30±0,20	1,70±0,23	1,370±0,23
PBAE _{HDAAP} (F2)	0,10±0,01	0,40±0,02	2,755±0,21
PBAE _{DEGDAP} (F3)	2,70±0,60	3,00±0,07	1,110±0,04
PBAE _{PEGDMEDA} (ME1)	3,60±0,21	7,00±0,44	1,969±0,17
PBAE _{PEGDMEDA-2} (ME2)	2,10±0,11	3,00±0,17	1,391±0,11

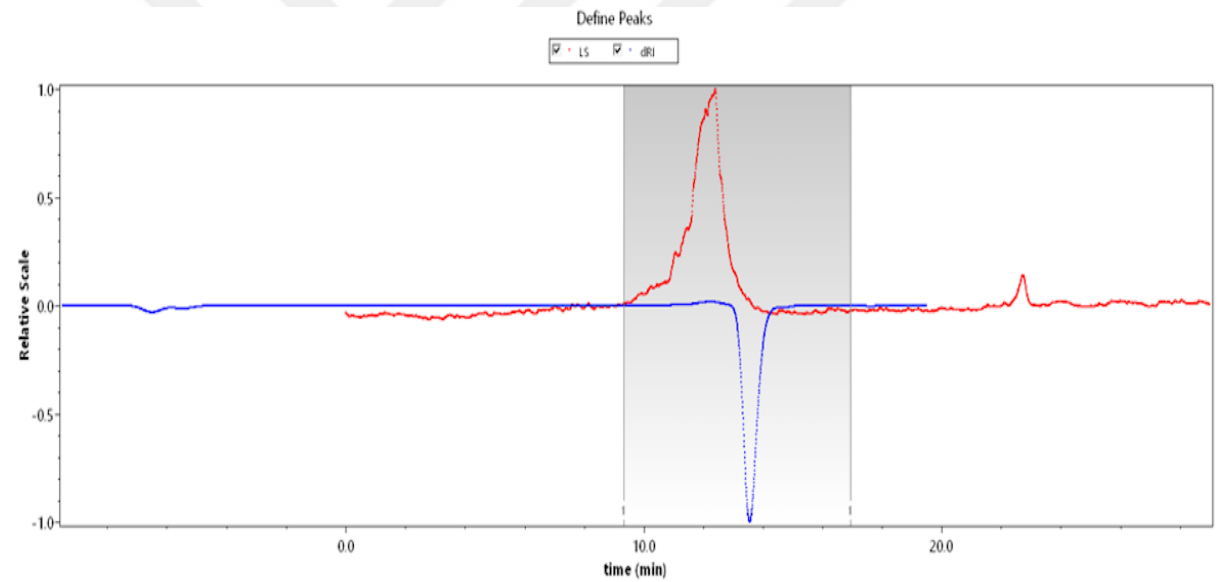
İdeal olarak belirlenen K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA ve D1-NMDA, F1-NMDA polimerlerine ait molekül ağırlığı sonuçları Tablo 12’de verilmiştir. K2-NMDA ve D1-NMDA polimerlerine ait molekül ağırlığı grafikleri ise örnek olarak Şekil 41 ‘da ve Şekil 42 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 12: Modifiye kitosan ve PBAE ürünlerine ait molekül ağırlığı sonuçları

Polimer Kodu	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PDI (Mw/Mn)
K1-PEG-NMDA	31,84±0,25	40,79±0,27	1,281±0,370
K2-PEG-NMDA	10,37±0,11	27,74±0,21	2,674±0,240
K3-PEG- NMDA	87,12±0,80	176,00±3,93	2,021±0,240
D1-NMDA(PBAE _{BAEDED} A-NMDA)	49,18±3,72	52,67±3,76	1,071±0,110
F1-NMDA (PBAE _{BAEDAP} -NMDA)	16,31±3,58	20,44±4,67	1,254±0,310



Şekil 41: K2-PEG-NMDA ürününün GPC görüntüsü



Şekil 42: D1-NMDA ürününün GPC görüntüsü

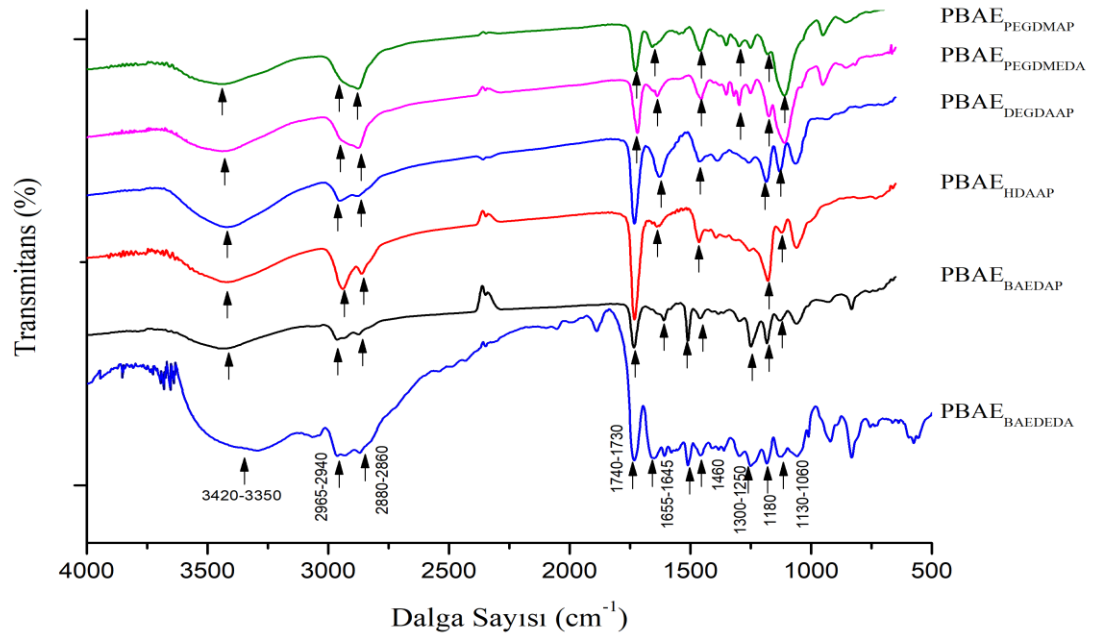
4.2.2. Polimerlerin Yapısal Özelliklerinin Tayini Bulguları

4.2.2.1. Fourier Transform Infrared Spektrofotometresiskopisi (FTIR)

Sentezlenen PBAE polimerlerin FT-IR spektrumu Şekil 43’de gösterilmiştir. PBAE polimerlerin FT-IR spektrumunda tespit edilen absorpsiyon bandları Tablo 13’de verilmiştir ⁹⁵.

Tablo 13 : PBAE polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları

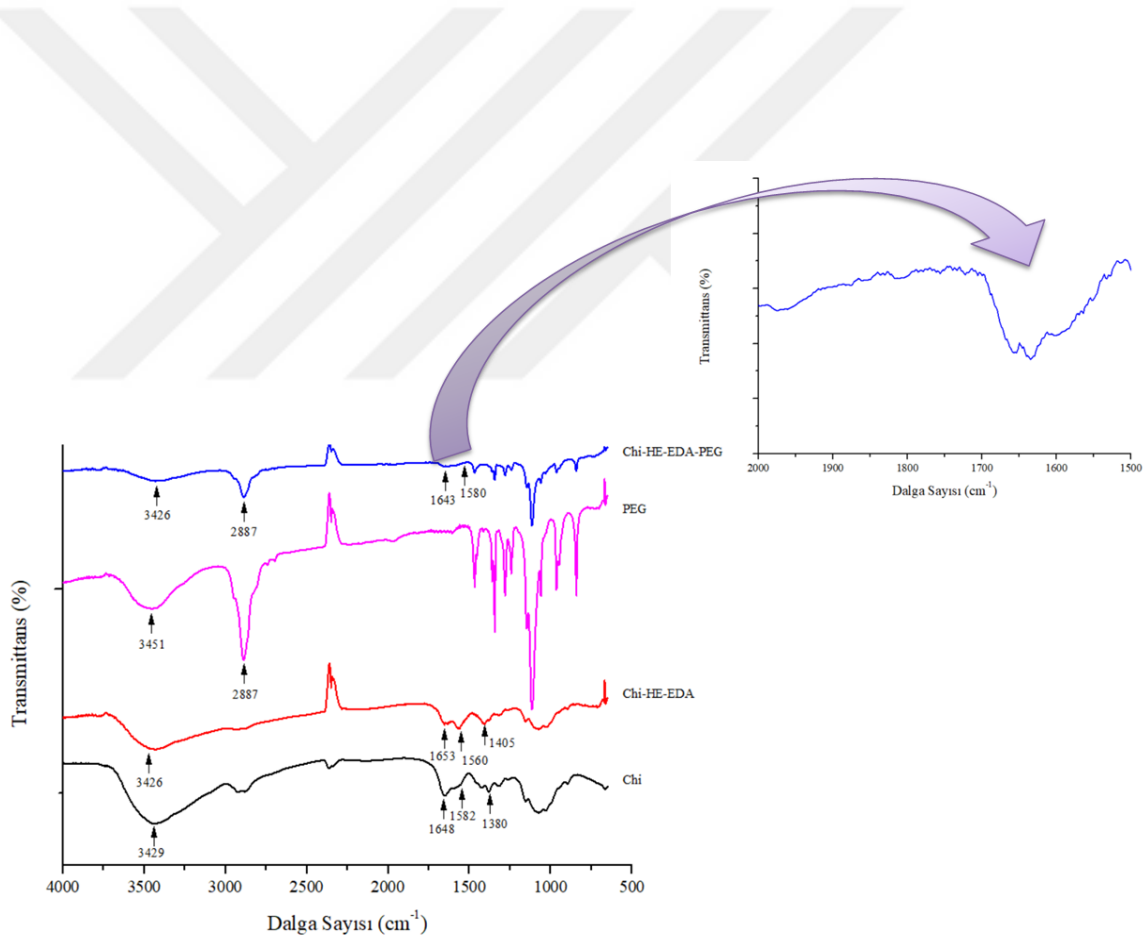
Absorpsiyon bandı (cm^{-1})	Açıklama	Maksimumları					
		PBAE _{BAEEDA}	PBAE _{BAEDAP}	PBAE _{HDAAP}	PBAE _{DEGDAAP}	PBAE _{PEGDMEDA}	PBAE _{PEGDMAP}
3100-3500 cm^{-1}	NH bağının (ester yapısında CH ₂ -NH-CH ₂ sekonder amin yapısına ait) gerilme titreşim bandı	3347	3428	3424	3419	3429	3427
1750-1725 cm^{-1}	Doymuş alifatik ester C=O gerilme titreşimi	1735	1731	1731	1728	1725	1728
1685-1620 cm^{-1}	Diakrilat monomerlerinde yer alan vinil gruplarına ait absorpsiyon piki	Çok küçük	Yok	Yok	Yok	Yok	Çok küçük
1460-1593 cm^{-1}	H ₂ C-NH-CH ₂ gruplarına ve bağ deformasyonlarına ait küçük keskin bandlar	1513 , 1460	1509	1467	1461	1465	1460
1190-1058 cm^{-1}	C-N, N-H grupları ve bağ deformasyonlarına ait küçük ve keskin bandlar veya omuzların	1184, 1123	1183, 1125	1179, 1118	1180, 1129	1183, 1109	1155, 1114

**Şekil 43:** F1, F2, F3, ME1, ME2, D1 numunelerine ait FTIR spektrumları

Tablo 14 : Chi, K2, PEG, PEG-K2 polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları

Absorbsiyon bandı (cm ⁻¹)	Açıklama*	Maksimumları			
		Chi	Chi-HE-EDA	PEG	Chi-HE-EDA-PEG
3500-3100 cm ⁻¹	Kitosan yapısında bulunan primer amin gruplarına ait gerilme titreşim bandı	3429	3426	Yok	3426
3750-3250 cm ⁻¹	OH gerilme bandı overlapped to the (N-H) simetrik gerilme bandı	yok	Yok	3451	Yok
2900-2800 cm ⁻¹	Metoksi gruplarından ileri gelen absorpsiyon bandı	yok	Yok	2887	2887
1670-1640 cm ⁻¹	Amide I bandına ait gerilme titreşimi	1648	1653	Yok	1643
1590-1550 cm ⁻¹	Amide II bandına ait gerilme titreşimi	1582	1560	Yok	1580
1410-1320 cm ⁻¹	metilol gruplarının bükülme titreşim bandı	1380	Yok	Yok	Yok
1410-1390 cm ⁻¹	-CH ₂ -O-CH ₂ bağına ait gerilme titreşimi	yok	1405	Yok	Yok

*Kitosanın HE-EDA reaksiyonunda reaksiyonun kitosanın metilol grupları ile HE-EDA'nın hidroksil grupları arasınada gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca PEGilasyon reaksiyonun beklenildiği gibi metoksi PEG'in, hidroksil grupları ile kitosanın geriye kalan metilol grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür.

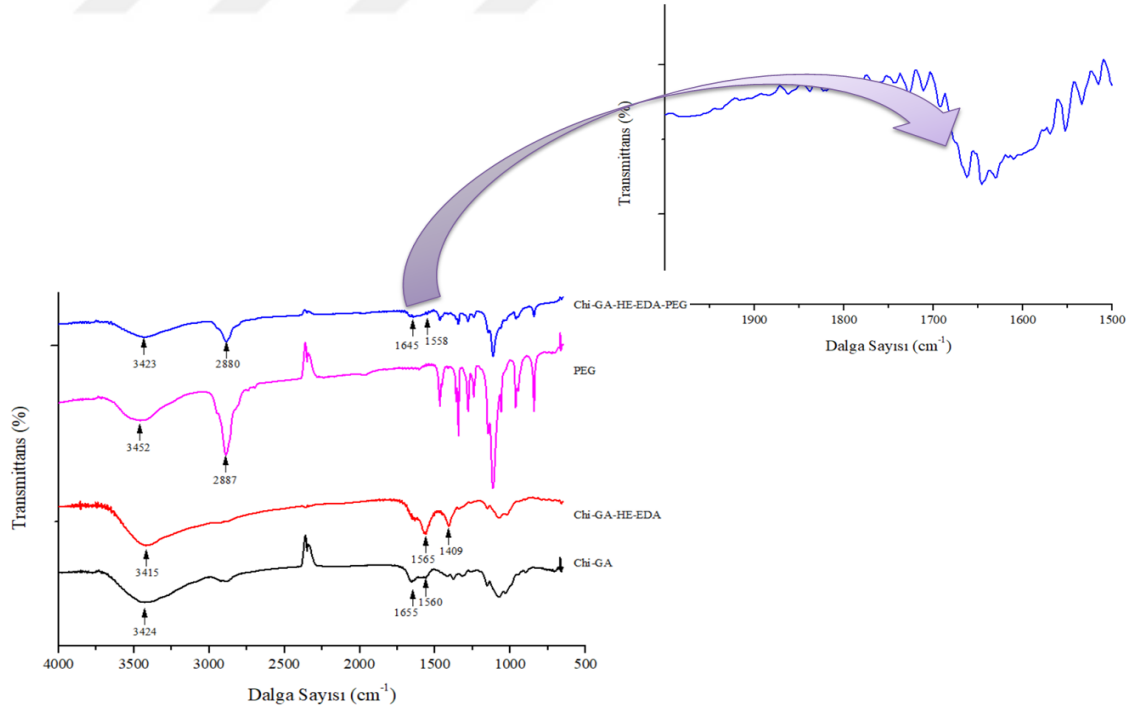


Şekil 44: Chi, K2, PEG, PEG-K2 numunelerine ait FTIR spektrumları

Tablo 15: Chi-GA, K1, PEG, PEG-K1 polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları

Absorbsiyon bandı (cm ⁻¹)	Açıklama*	Maksimumları			
		Chi-GA	Chi-GA-HE-EDA	PEG	Chi-GA-HE-EDA-PEG
3500-3100 cm ⁻¹	Kitosan yapısında bulunan primer amin gruplarına ait gerilme titreşim bandı ve NH bağının (sekonder amin yapısına ait) gerilme titreşim bandı	3424	3415	Yok	3423
3750-3250 cm ⁻¹	OH gerilme bandı overlapped to the (N-H) simetrik gerilme bandı	yok	Yok	3452	Yok
2900-2800 cm ⁻¹	Metoksi gruplarından ileri gelen absorpsiyon bandı	yok	Yok	2887	2880
1670-1640 cm ⁻¹	Amide I bandına ait gerilme titreşimi	1655	Omuz şeklinde çok küçük	Yok	1645
1590-1550 cm ⁻¹	Amide II bandına ait gerilme titreşimi	1560	1565	Yok	1548

*Kitosanın GA reaksiyonunda reaksiyonun kitosanın primer amin grupları ile GA'nın karboksilik asid grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Bununla beraber Chi-GA'nın HE-EDA ile reaksiyonunun ise kitosanın metilol grupları veya daha zor da olsa gallik asidin hidroksil grupları ile HE-EDA'nın hidroksil grupları arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca PEGilasyon reaksiyonun beklenildiği gibi metoksi PEG'in, hidroksil grupları ile kitosanın geriye kalan metilol grupları veya gallik aside ait hidroksil grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür.

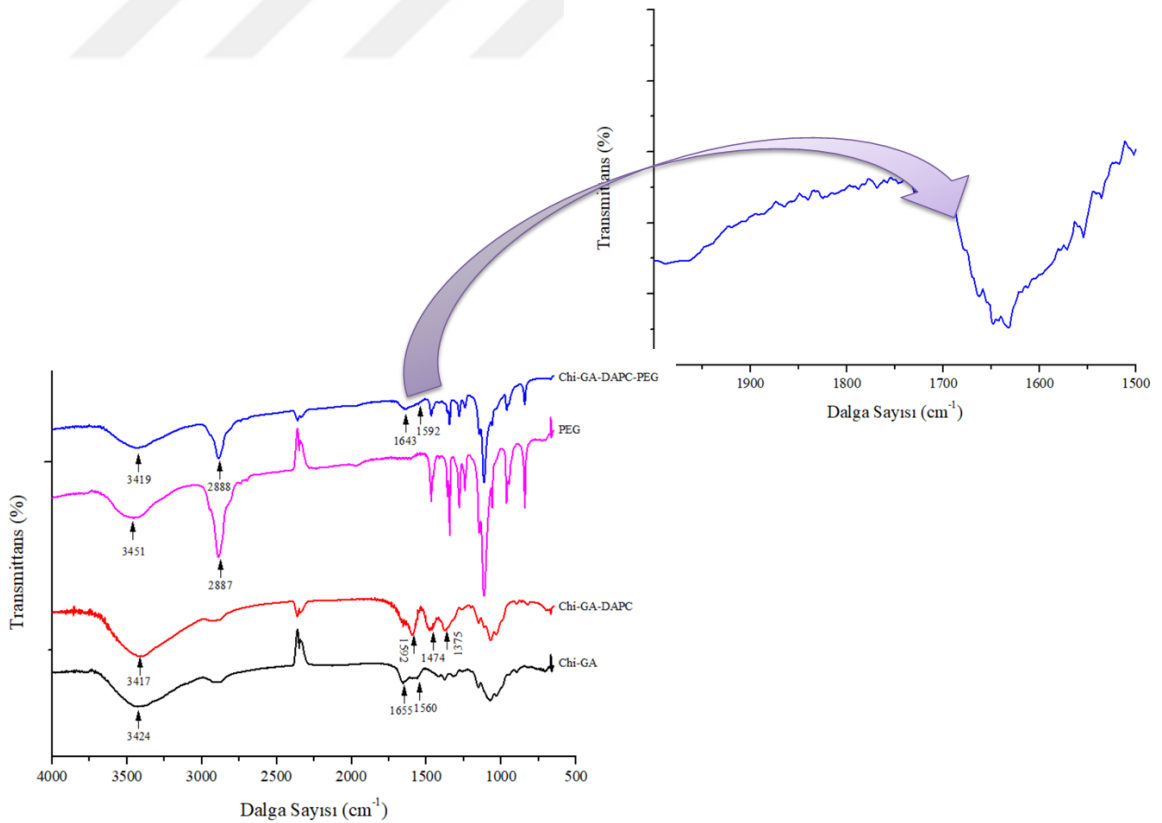


Şekil 45: Chi-GA, K1, PEG, PEG-K1 numunelerine ait FTIR spektrumları

Tablo 16: Chi-GA, K3, PEG, PEG-K3 polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve açıklamaları

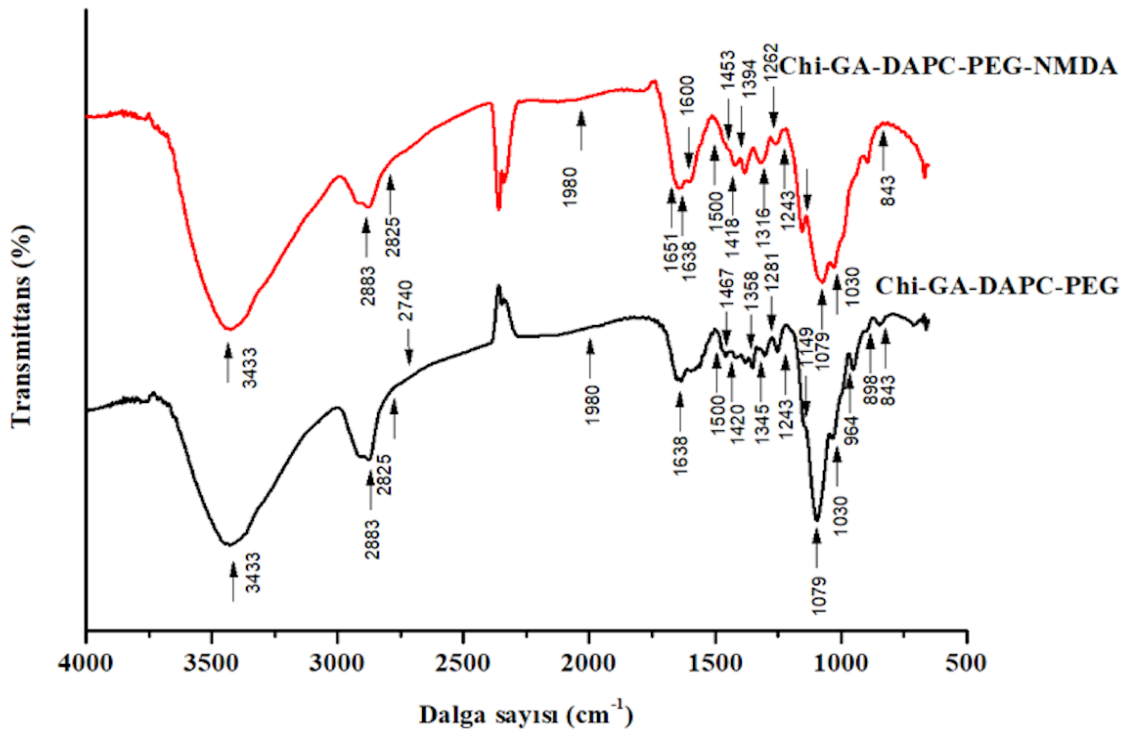
Absorbsiyon bandı (cm ⁻¹)	Açıklama*	Maksimumları			
		Chi-GA	Chi-GA-DAPC	PEG	Chi-GA-DAPC-PEG
3500-3100 cm ⁻¹	Kitosan yapısında bulunan primer amin gruplarına ait gerilme titreşim bandı ve NH bağının (sekonder amin yapısına ait) gerilme titreşim bandı	3424	3417	Yok	3419
3750-3250 cm ⁻¹	OH gerilme bandı overlapped to the (N-H) simetrik gerilme bandı	yok	Yok	3451	Yok
2900-2800 cm ⁻¹	Metoksi gruplarından ileri gelen absorpsiyon bandı	yok	Yok	2887	2888
1670-1640 cm ⁻¹	Amide I bandına ait gerilme titreşimi	1655	Omuz şeklinde çok küçük	Yok	1643
1590-1550 cm ⁻¹	Amide II bandına ait gerilme titreşimi	1560	1592	Yok	1592
1500-1450 cm ⁻¹	DAPC molekülünden ileri gelen -CH ₃ gerilme titreşimine ait	yok	1474	Yok	Yok

*Kitosanın GA reaksiyonunda reaksiyonun kitosanın primer amin grupları ile GA'nın karboksilik asid grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Bununla beraber Chi-GA'nın DAPC ile reaksiyonunun ise kitosanın metilol grupları veya daha zor da olsa gallik asidin hidroksil grupları ile GA'nın klorür grupları arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca PEGilasyon reaksiyonun beklenildiği gibi metoksi PEG'in, hidroksil grupları ile kitosanın geriye kalan metilol grupları veya gallik aside ait hidroksil grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 46: Chi-GA, K3, PEG, PEG-K3 numunelerine ait FTIR spektrası

NMDA ile modifiye edilmiş tüm polimerlerin yapıları FTIR tekniği ile aydınlatıldı. FTIR analizleri Cary 630 model FTIR cihazında gerçekleştirildi. Ürün/KBr oranı 1/200 mg olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmış tabletler kullanılarak, 650-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında spektra kaydedildi. Her bir ürün aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirildi. K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG) ve K1-PEG-NMDA (Chi-GA-DAPC-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 47 ve Tablo 17’de gösterilmiştir. K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ve K2-PEG-NMDA (Chi-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 48 ve Tablo 18’de gösterilmiştir. K3-PEG (Chi-GA-HE-EDA-PEG) ve K3-PEG-NMDA (Chi-GA-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 49 ve Tablo 19’de gösterilmiştir. D1 (PBAEBAEDED) ve D1-NMDA (PBAEBAEDED-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 50 ve Tablo 20’de gösterilmiştir. F1 (PBAEBAEDAP) ve F1-NMDA (PBAEBAEDAP-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 51 ve Tablo 21’de gösterilmiştir.



Şekil 47: K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG) ve NMDA-K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri

Tablo 17: K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG) ve K1-PEG-NMDA (Chi-GA-DAPC-PEG-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu

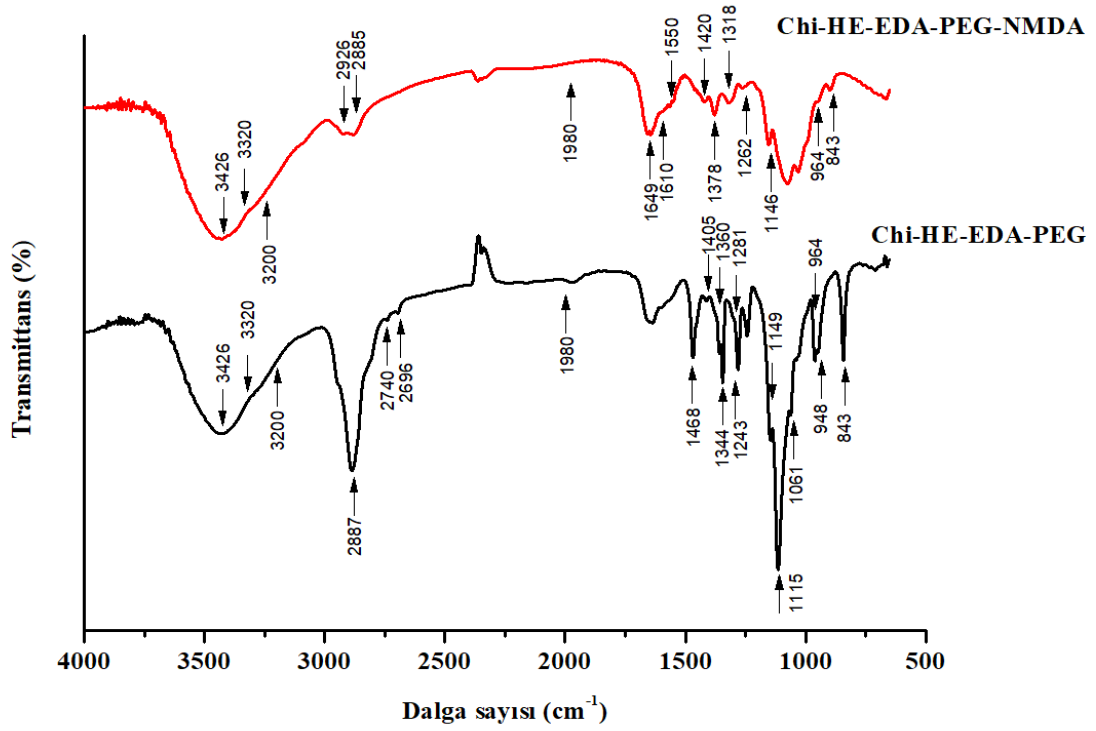
Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Absorpsiyon bandı	K1-PEG (Chi-GA-DAPC- PEG)	K2-PEG-NMDA (Chi-GA-HE EDA-PEG- NMDA)
3433	MPEG yapısında bulunan OH gruplarına ait gerilme bandı	var	var
3426	Kitosan yapısında bulunan primer amin gruplarına ait gerilme bandı	3433 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır	var
2926 ve 2885	NMDA yapısındaki CH ₃ gruplarındaki CH gerilme bandı	yok	2883 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır
2883	MPEG yapısında bulunan (-O-CH ₂), CH ₂ , CH ₃ ve CH gerilme bandı	var	genişlemiş olarak bulunmaktadır
2825-2810	Tersiyer amin (CH ₃) ₂ N gerilme bandı	var	var
2740 ve 2700	MPEG yapısında bulunan (-O-CH ₂ -O-) gruplarındaki CH gerilme bandı	var	2883 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır
1980	MPEG yapısal gerilme bandı	var	var
1651	Aromatik Sekonder Amid I, C=O gruplarının gerilme bandı ve NMDA yapısındaki NH deformasyon bandı	1638 cm ⁻¹ dki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır	var
1638	DAPC yapısında bulunan tersiyer amin gerilme bandı ve Amid I gerilme bandı	var	var
1600	NMDA yapısındaki iyonize serbest karboksilat grubundaki C=O asym ve sym gerilim bandı ve ve ester bağı (MPEG yapısında serbest OH grubu ile NMDA yapısındaki COOH grubu arasında oluşan, karboksilat C=O) gerilme bandı	yok	var
1600-1500	Amid II, NH deformasyon bandı	var	var
1467	MPEG yapısındaki (-O-CH ₂ -) gruplarındaki CH ₂ gerilme bandları	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır

1420	N-CH ₃ gerilme bandı	var	1453 cm ⁻¹ de pik olarak bulunmaktadır
1418	MPEG yapısında serbest OH grubu ile NMDA yapısındaki COOH grubu arasında oluşan, karboksilat C=O) gerilme bandı ve/veya iyonize karboksilat gerilme bandı	yok	var
1405	Eter bağı gerilme bandı	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
1394 ve 1316	Ester bağı gerilme bandı	yok	var
1378	NMDA yapısındaki N-CH ₃ gerilme bandı	yok	1394 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır
1358 ve 1345	MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme ve eter yapısının gerilme bandı	var	yok
1318	Ester bağı C-O gerilme ve Amid III C-N gerilme bandı	yok	1316 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır
1281	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme ve alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı	var	1262 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır
1262	Amid III C-N gerilme bandı	1281 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
1243	MPEG yapısında bulunan (C-O-C) gerilme bandı	var	var
1149, 1115, 1061 ve 948	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme, alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı	var	1079 ve 1030 cm ⁻¹ deki pikler ile girişimli olarak bulunmaktadır
1079 ve 1030	Gallik asitin aromatik halka yapısının "CH" düzlem dışı deformasyon bandı	var	var

964	Kristal MPEG yapısal gerilim bandı	var	950 cm ⁻¹ de pik olarak görülmektedir
898	Gallik asitin aromatik halka yapısının "CH" düzlem dışı deformasyon bandı	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
843	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme, alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı, CH ₂ gerilme ve C-O gerilme bandı	var	var

FT-IR spektrumları (Şekil 47 ve Tablo 17) değerlendirildiğinde K1-PEG (CHI-GA-DAPC-PEG) ürünü ile NDMA reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşmiştir;

- CHI-GA-DAPC-PEG’li ürünlerdeki kitosanın primer amin (NH₂) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı oluşumu görüldü.
- Kitosanın reaksiyona girmemiş metilol gruplarıyla veya MPEG yapısındaki serbest OH grubuyla NDMA’nın COOH gruplarıyla ester bağı oluşturduğu görüldü.
- Gallik asit yapısındaki serbest OH gruplarıyla NDMA yapısındaki COOH grupları arasında reaksiyonun gerçekleşmediği görüldü.
- NDMA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO⁻Na⁺ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları MPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görüldü.



Şekil 48: K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ve K2-PEG- NMDA (Chi- HE-EDA-PEG- NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri

Tablo 18: K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ve K2-PEG- NMDA (Chi- HE-EDA-PEG- NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu

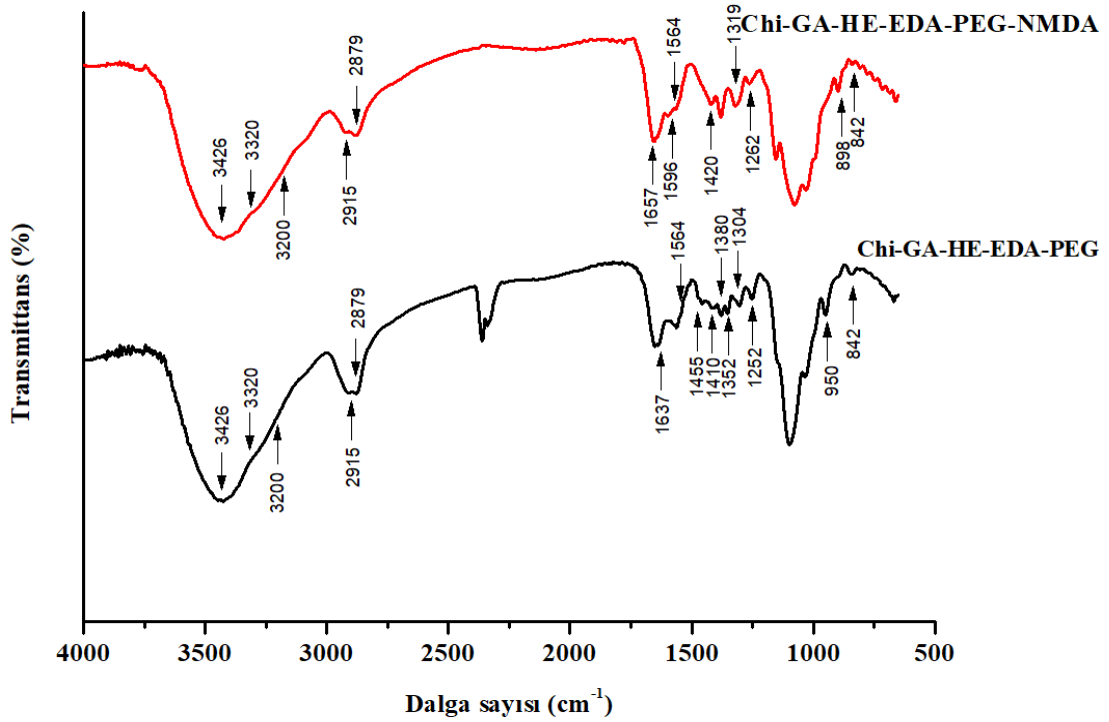
Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Absorpsiyon bandı	K2-PEG (Chi-HE EDA-PEG)	K2-PEG-NMDA (Chi-HE EDA-PEG-NMDA)
3426	Kitosan yapısında bulunan primer amin gruplarına ait gerilme bandı	var	var
3320-3200	MPEG yapısında bulunan OH gruplarına ait gerilme bandı	var	var
2926 ve 2885	NMDA yapısındaki CH ₃ gruplarının CH gerilme bandı	yok	var
2887	MPEG yapısında bulunan (-O-CH ₂ -), CH ₂ ,CH ₃ ve CH gerilme bandı	var	var (pik küçülmüş)
2740 ve 2696	MPEG yapısında bulunan (-O-CH ₂ -O-) gruplarındaki CH gerilme bandı	var	2926 ve 2885 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır

1980	MPEG yapısal gerilme bandı	var	var
1649	Sekonder Amid I, C=O gruplarının gerilme bandı ve NDMA yapısındaki sekonder amin NH deformasyon bandı (girişimli pik)	yok	var
1610 ve 1550	NMDA yapısındaki iyonize serbest karboksilat grubundaki C=O asym ve sym gerilim bandı	yok	var
1599 ve 1560	Amid II, NH deformasyon bandı	yok	yaygın omuz olarak görülmekte ve 1650 ve 1550 cm ⁻¹ deki pikler ile girişimli olarak bulunmaktadır
1468	MPEG yapısındaki (-O-CH ₂ -) gruplarındaki CH ₂ gerilme bandı	var	diğer piklerle girişimli olarak bulunmaktadır
1420 ve 1378	NMDA yapısındaki N-CH ₃ gerilme bandı ve ester bağı (MPEG yapısında serbest OH grubu ile NMDA yapısındaki COOH grubu arasında oluşan, karboksilat C=O) gerilme bandı	yok	var
1405	Eter bağı (Kitosanın HE EDA ile modifikasyonu sonucu oluşan) gerilme bandı	var	diğer piklerle girişimli olarak bulunmaktadır
1360 ve 1344	MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme ve eter yapısının gerilme bandı	var	yok
1318	Ester bağı C-O gerilme ve Amid III C-N gerilme bandı	yok	var
1281	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme ve alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı	var	diğer piklerle girişimli olarak bulunmaktadır
1262	Amid III C-N gerilme bandı	yok	var
1243	MPEG yapısında bulunan (C-O-C) gerilme bandı	var	diğer piklerle girişimli olarak bulunmaktadır

1149-1115- 1061-948	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme ve alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı	var	1146 cm ⁻¹ deki pik ile girişimli olarak bulunmaktadır
964	Kristal MPEG yapısal karakteristik bandı	var	var
843	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme, alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı, CH ₂ gerilme ve C-O gerilme bandı	var	var

FT-IR spektrumları (Şekil 48 ve Tablo 18) değerlendirildiğinde NDMA ile reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşti;

- Chi-HE EDA-PEG'li ürünlerdeki HE EDA yapısında bulunan serbest NH₂ grubuyla NDMA yapısındaki COOH grubu arasında sekonder amid oluşumu görüldü.
- NDMA ile reaksiyonun kitosanın serbest amin grubuyla belirgin bir şekilde olmadığı görüldü.
- NDMA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO⁻Na⁺ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları MPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görüldü.



Şekil 49: K3-PEG (Chi-GA-HE-EDA-PEG) ve K3-PE- NMDA (Chi-GA-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri

Tablo 19: K3-PEG (Chi-GA-HE-EDA-PEG) ve K3-PE- NMDA (Chi-GA-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu

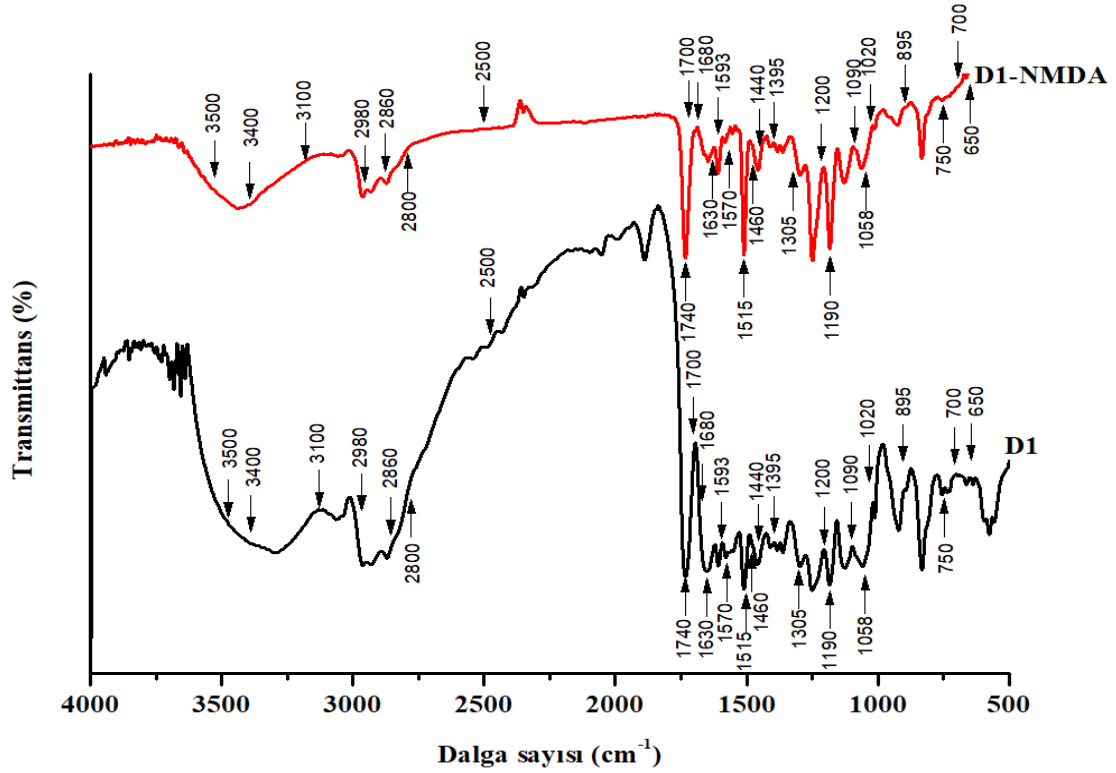
Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Absorpsiyon bandı	K3-PEG (Chi-GA-HE EDA-PEG)	K3-PEG-NMDA (Chi-GA-HE EDA-PEG-NMDA)
3426	Kitosan yapısında bulunan primer amin gruplarına ait gerilme bandı	Gallik asit yapısında bulunan OH gruplarının gerilme bandı ile girişimli olarak görülmektedir	Gallik asit yapısında bulunan OH gruplarının gerilme bandı ile girişimli olarak görülmektedir
3320-3200	MPEG yapısında bulunan OH gruplarına ait gerilme bandı	var	var
2915 ve 2879	MPEG yapısında bulunan (-O-CH ₂ -), CH ₂ , CH ₃ ve CH gerilme bandı	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
2980-2860	NMDA yapısındaki N-CH ₃ gerilme bandı	yok	2915 ve 2879 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli olarak

bulunmaktadır			
2100-1920	MPEG yapısal gerilme bandı	var	var
1657	Sekonder Amid I, C=O gruplarının gerilme bandı ve NDMA yapısındaki sekonder amin gerilme bandı	yok	var
1637	HE EDA yapsında bulunan primer amin gerilme bandı	var	yok
1600-1500	Amid II, NH deformasyon bandı	yok	1596 ve 1564 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli olarak bulunmaktadır
1564	HE EDA yapsında bulunan sekonder amin gerilme bandı	var	var
1455, 1379, 1352, 1304 ve 1252	MPEG yapısındaki (C-OH), (-CH ₂ -O-CH ₂ -), (C-C) ve (C-O) gerilme bandları	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
1420, 1380 ve 1320	Kitosan yapısında bulunan metilol gruplarına ait gerilme bandı	yok	yok
1420	NMDA yapısındaki N-CH ₃ gerilme bandı ve ester bağı (MPEG yapısında serbest OH grubu ile NMDA yapısındaki COOH grubu arasında oluşan, karboksilat C=O) gerilme bandı	yok	var
1410	Eter bağı (Kitosanın HE EDA ile modifikasyonu sonucu oluşan) gerilme bandı	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
1380	MPEG yapısal gerilme bandı	var	NMDA yapısındaki N-CH ₃ gerilme bandı ile girişimli olarak bulunmaktadır
1319	Ester bağı C-O gerilme ve Amid III C-N gerilme bandı	yok	var
1262	Amid III C-N gerilme bandı	yok	var
1200-1000	MPEG yapısal gerilme bandı ve	girişimli olarak	girişimli olarak

	Kitosan yapısal gerilme bandları	görülmektedir	görülmektedir
950	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme ve alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır
898	Gallik asitin aromatik halka yapısının "CH" düzlem dışı deformasyon bandı	950 ve 842 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli olarak bulunmaktadır	var
842	Kristal MPEG yapısında bulunan (C-OH) gruplarındaki C-O gerilme, OH deformasyon, C-C gerilme, alkil eter (-CH ₂ -O-CH ₂ -) gerilme bandı, CH ₂ gerilme ve C-O gerilme bandı	var	diğerleriyle girişimli olarak bulunmaktadır

FT-IR spektrumları (Şekil 49 ve Tablo 19) değerlendirildiğinde CHI-GA-HE EDA-PEG ürünü ile NDMA reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşti;

- CHI-GA-HE EDA-PEG’li ürünlerdeki HE EDA yapısında bulunan serbest amin (NH₂) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı oluşumu görüldü.
- NDMA ile reaksiyonun Kitosanın serbest amin grubu (NH₂) ile gerçekleşmediği belirgin bir şekilde görüldü.
- NDMA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO⁻Na⁺ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları MPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görüldü.
- Gallik asit yapısındaki serbest OH gruplarıyla NDMA yapısındaki COOH grupları arasında reaksiyonun gerçekleşmediği görüldü.



Şekil 50: D1 (PBAE_{BAEDED}) ve D1-NMDA (PBAE_{BAEDED}-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri

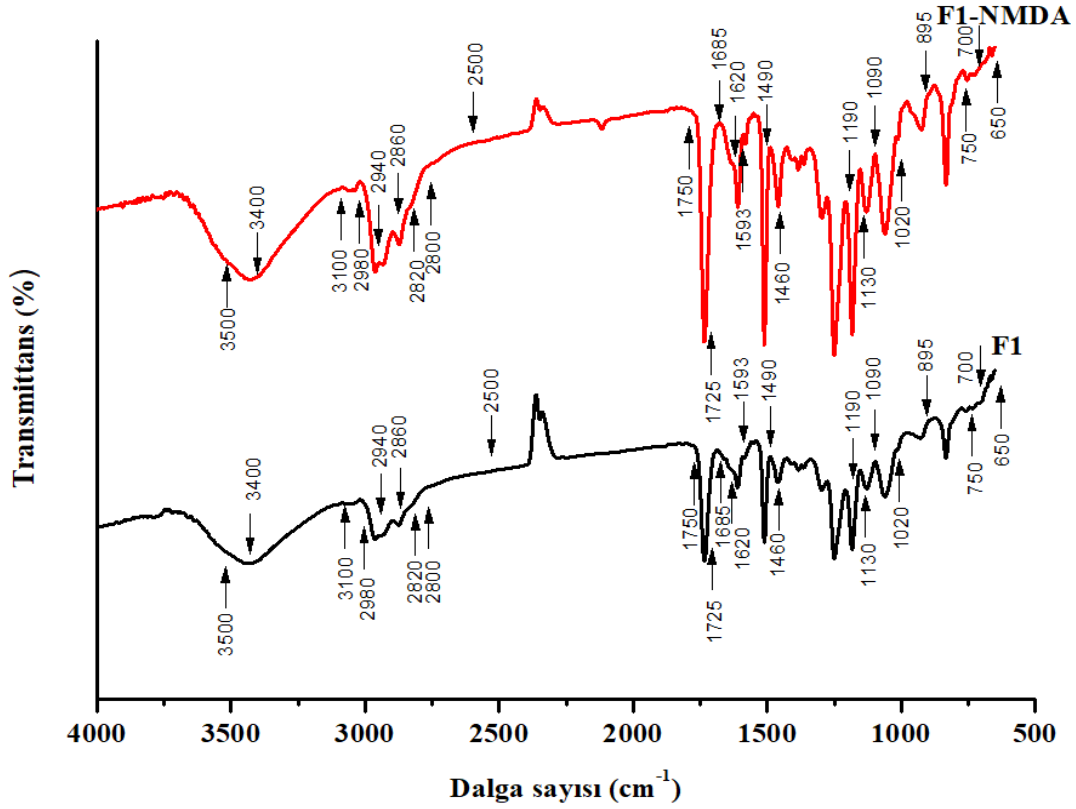
Tablo 20: D1 (PBAE_{BAEDED}) ve D1-NMDA (PBAE_{BAEDED}-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu

Dalga sayısı cm^{-1}	Açıklama	D1	D1-NMDA
3500-3400	Amid N-H gerilme bandı	3500-3100 cm^{-1} deki piklerle girişimli	3500-3100 cm^{-1} deki piklerle girişimli
3500-2500	Karboksil grubundaki OH grubu gerilme	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır
3100-3500	Primer amin grupları gerilme bandı ve sekonder amin gruplarına ait ($\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2$) gerilme bandı	var	var
3100-2800	C-H gerilme bandı	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır
2980-2860	NMDA ve D1 yapısındaki CH_3 gruplarının C-H gerilme bandı	var	var
1750-1725	Doymuş alifatik ester	var	var

		1750-1725 cm ⁻¹ deki	1750-1725 cm ⁻¹ deki
1740-1700	C=O gerilme bandı	piklerle girişimli bulunmaktadır	piklerle girişimli bulunmaktadır
1685-1620	Vinil gruplarına ait gerilme bandı	var	var
1680-1630	sekonder amid, C=O gerilme bandı ve amid N-H deformasyon ve C-N gerilme bandı	1685- 1620 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli	1685- 1620 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli
1593-1460	CH ₂ -NH-CH ₂ gruplarına ve bağ deformasyonlarına ait gerilme bandı	var	var
1570-1515 ve 1305-1200	sekonder amid gerilme bandı	1593-1460 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli	1593-1460 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli
1440-1395	C-O gerilme ve OH deformasyon bandı	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır
1190-1058	C-N, N-H grupları gerilme ve deformasyon bandı	var	var
1090-1020	C-NH ₂ grubuna ait C-N gerilme bandı	var	var
895-650	Primer amin gruplarındaki hidrojen bağı sonucu gerilme bandı	var	var
750-700	Sekonder amin gerilme bandı	var	var

FT-IR spektrumları (Şekil 50 ve Tablo 20) değerlendirildiğinde PBAE_{BAEDED} ürünü ile NDMA reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşti;

- PBAE_{BAEDED}'li ürünlerdeki primer amin (NH₂) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı oluşumu görüldü.



Şekil 51: F1 (PBAE_{BAEDAP}) ve F1-NMDA (PBAE_{BAEDAP}-NMDA) ürünlerine ait FTIR grafikleri

Tablo 21: F1 (PBAE_{BAEDAP}) ve F1-NMDA (PBAE_{BAEDAP}-NMDA) ürünlerine ait ayrıntılı FTIR sonuç tablosu

Dalga sayısı cm ⁻¹	Açıklama	F1	F1-NMDA
3400	F1 yapısındaki OH grubu gerilme	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır
3500-2500	Karboksil grubundaki OH grubu gerilme	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır
3100-2800	C-H gerilme bandı	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır	diğer piklerle girişimli bulunmaktadır
2980-2860	NMDA ve F1 yapısındaki CH ₃ gruplarının C-H gerilme bandı	var (F1 e ait)	pik büyümüş
2940	Karboksil grubunun CH	var	pik büyümüş

deformasyon bandı			
2820	Tersiyer amin N-C-H grubundaki C-H gerilme bandı	var	var
1750-1725	Doymuş alifatik ester	var	var
1740-1700	C=O gerilme bandı	1750-1725 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli bulunmaktadır	1750-1725 cm ⁻¹ deki piklerle girişimli bulunmaktadır
1685-1620	Vinil gruplarına ait gerilme bandı	var	var
1593-1460	CH ₂ -NH-CH ₂ gruplarına ve bağ deformasyonlarına ait gerilme bandı	var	var
1580-1490	Sekonder amin gerilme bandı	küçük pik var	küçük pik var
1190-1130	Amin yapısındaki C-N, N-H grupları gerilme ve deformasyon bandı	var	var
1090-1020	C-NH ₂ grubuna ait C-N gerilme bandı	var	var
895-650	Primer amin gruplarındaki hidrojen bağı sonucu gerilme bandı	var	var
750-700	Sekonder amin gerilme bandı	var	var

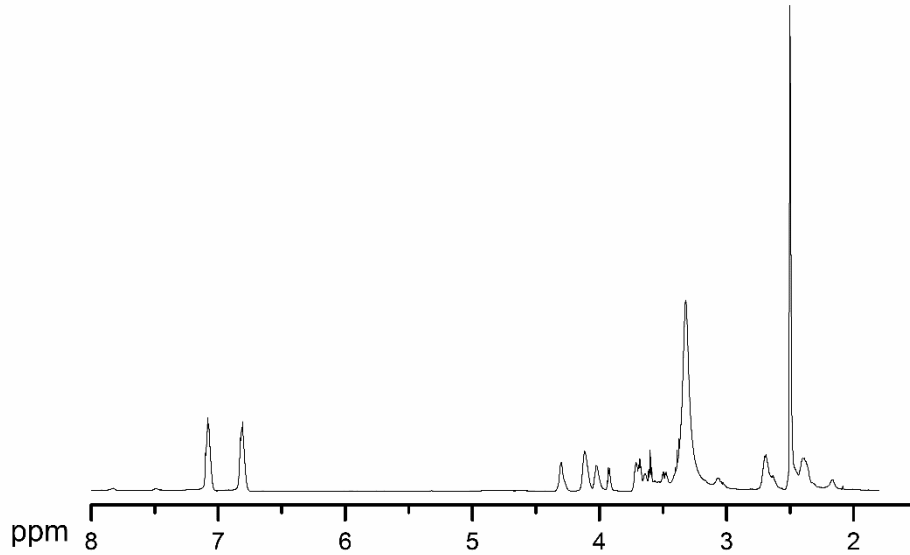
FT-IR spektrumları (Şekil 51 ve Tablo 21) değerlendirildiğinde PBAE_{BAEDAP} ürünü ile NDMA reaksiyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleşti;

- PBAE_{BAEDAP}'lı üründeki hidroksil grupları ile (OH) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında ester bağı oluşumu görüldü.

4.2.2.2. Nükleer Manyetik Rezonans (HNMR ve CNMR) Bulguları

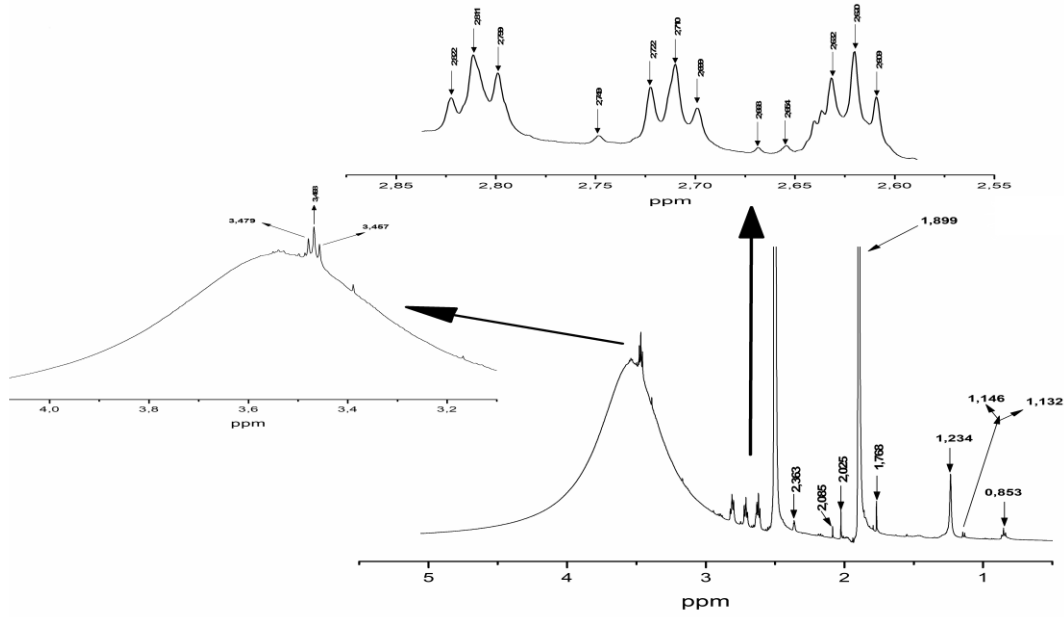
Şekil 52'de, PBAE'e ait ¹H-NMR spektrumu görülmektedir. Bisfenol A ünitelerinde yer alan (-CH-) protonlarına ait kimyasal kayma değerleri sırasıyla yaklaşık δ=7.08, ppm ve δ=6.81 ppm olarak görülmektedir. PEG yapısındaki metilen (-CH₂-) gruplarının protonlarına ait kayma değeri ise δ=4.3 ve δ=4.118 ppm'dir. Kayma değerleri δ=2.7 ve δ=1.5 ppm olan karakteristik ise diamin ünitelerinin (-NHCH₂-) protonlarını belirtmektedir. Ayrıca PBAE monomerlerinden bisfenol A

etoksilat diakrilatın yapısında bulunan ($-\text{CH}_2=\text{CH}-$) protonlarına ait $\delta=6.21$, $\delta=6.05$ ve $\delta=5.82$ ppm spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görülmüştür.



Şekil 52: PBAE ait ^1H -NMR spektrumu

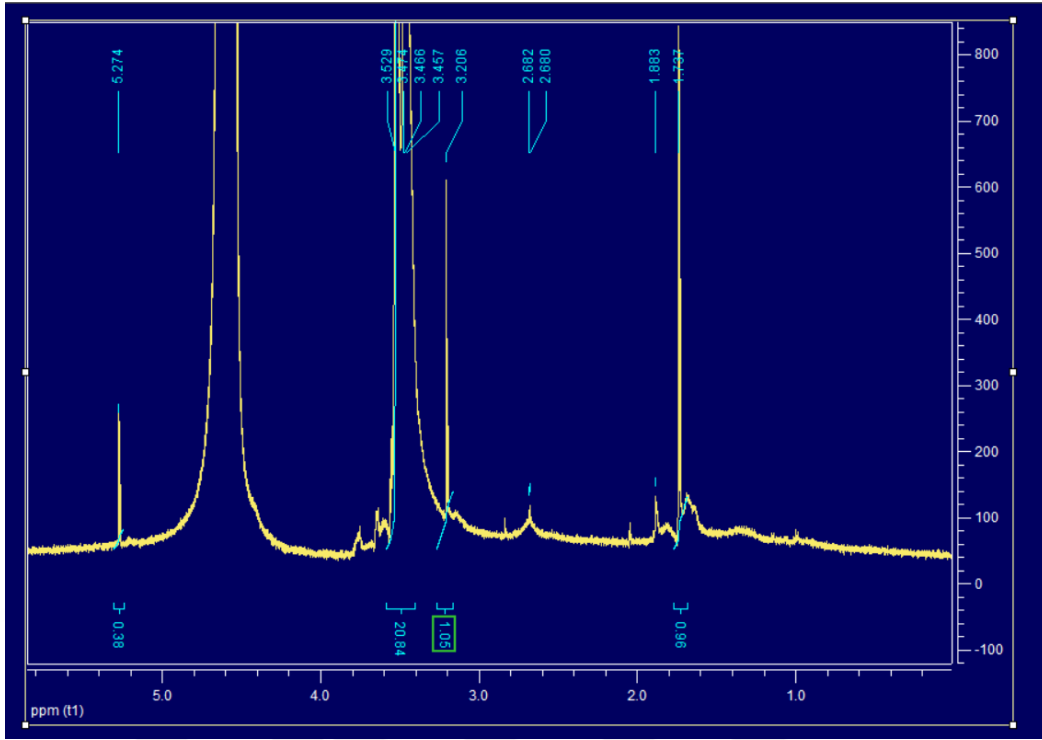
Kitosana N-(2-hidroksietil)etilendiamin bileşiği kullanılarak gerçekleştirilen aminasyon reaksiyonu ürünü olan Chi-HE-EDA (K2) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 53); kitosanın spektrumunda CH_2OH gruplarının hidroksil (OH) protonlarına ait başlıca 1,467 ppm, 1,979 ppm ve 2,164 ppm'de görülen sinyallerin kaybolmuş ve 1,234 ppm'deki sinyallerin ise şiddetinin azalmış olduğu görülmektedir. Buna karşın aminlenmiş kitosanın spektrumunda 1,146 ppm, 1,132 ppm, 1,899 ppm ve 2,025 ppm'de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ yapısındaki metilen ($-\text{CH}_2-$) protonlarına ait, 1,768 ppm'de $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ yapısındaki metilen ($-\text{CH}_2-$) protonlarına ait, yaklaşık 2,6-2,9 ppm arasındaki bölgede üç adet yarılmış halde $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ yapılarındaki metilen ($-\text{CH}_2-$) protonlarına ait ve yaklaşık 3,2-3,6 ppm bölgesinde ise DMSO daki su piki ile girişimli olarak başlıca 3,457 ppm, 3,468 ppm ve 3,479 ppm'de üçlü yarılmış halde bulunan $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ yapısındaki metilen ($-\text{CH}_2-$) protonlarına ait yeni sinyallerin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu durum kitosan ile amin bileşiği arasındaki modifikasyon reaksiyonunun Şekil 3'de görülen reaksiyondaki gibi amin bileşiğinin OH grubu ile kitosandaki serbest CH_2OH gruplarındaki OH grupları arasında eter bağı oluşturacak şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



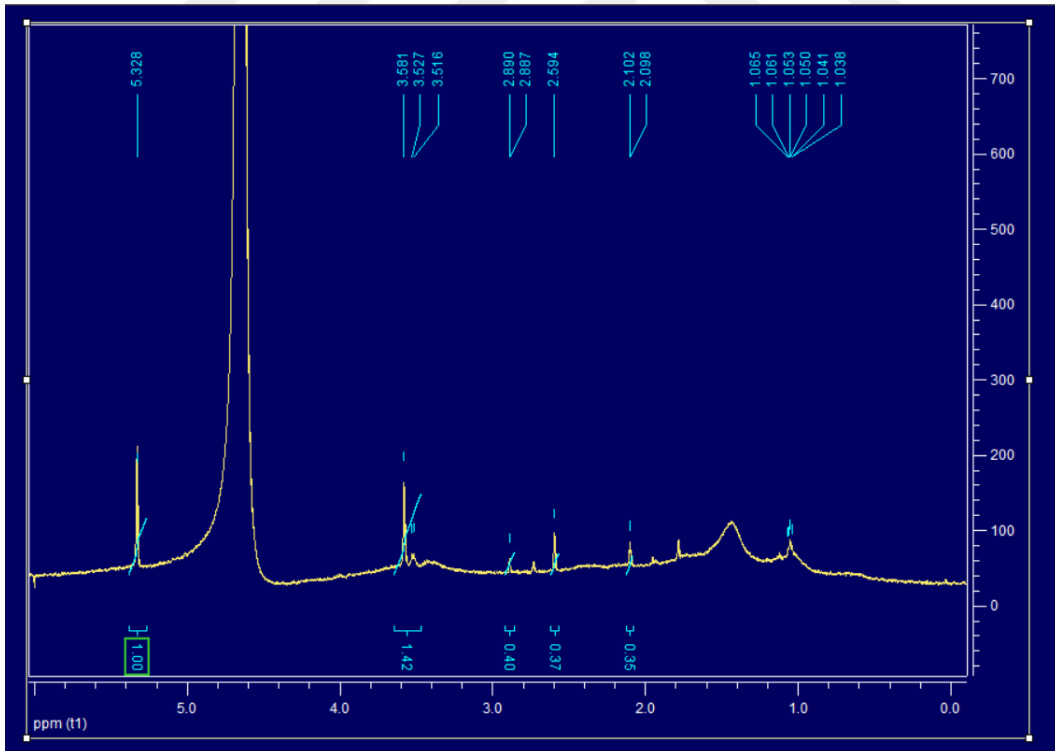
Şekil 53 : K2'ye ait ^1H -NMR spektrumu

Ürünlerinin yapılarının aydınlatılması için FTIR yöntemi yanında UNITY INOVA nükleer manyetik rezonans spektrometresi (Varian, Kanada) kullanıldı. DMSO - d_6 : D_2O çözücüler, 500 MHz ve 25°C parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Ürünler aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirildi.

Tüm kitosan ürünlerinin PEGilasyon ve NMDA ile reaksiyonları gerçekleştirilerek ^1H -NMR spektroskopisi ile yapısal karakterizasyonları tamamlandı ve reaksiyonların beklenildiği gibi gerçekleştiği görüldü. K2'nin ^1H -NMR'ına ek olarak Şekil 54 ve Şekil 55'de K2-PEG ve K2-PEG- NMDA ürünlerine ait ^1H -NMR spektrumları verildi. K2-PEG grafiğinde 3.5 ppm civarında ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) gruplarına ait protonların piklerinin yoğun biçimde görülmesi ve K2-PEG-NMDA grafiğinde de 5.328 ppm'de yer alan ($-\text{CH}_2-\text{COO}-$) bandından ileri gelen protonlara ait integral alan hesaplanması sonucunda NMDA ile modifikasyonun gerçekleştiği görüldü. Sonuçlar FTIR analizi sonuçları ile uyumlu bulundu.



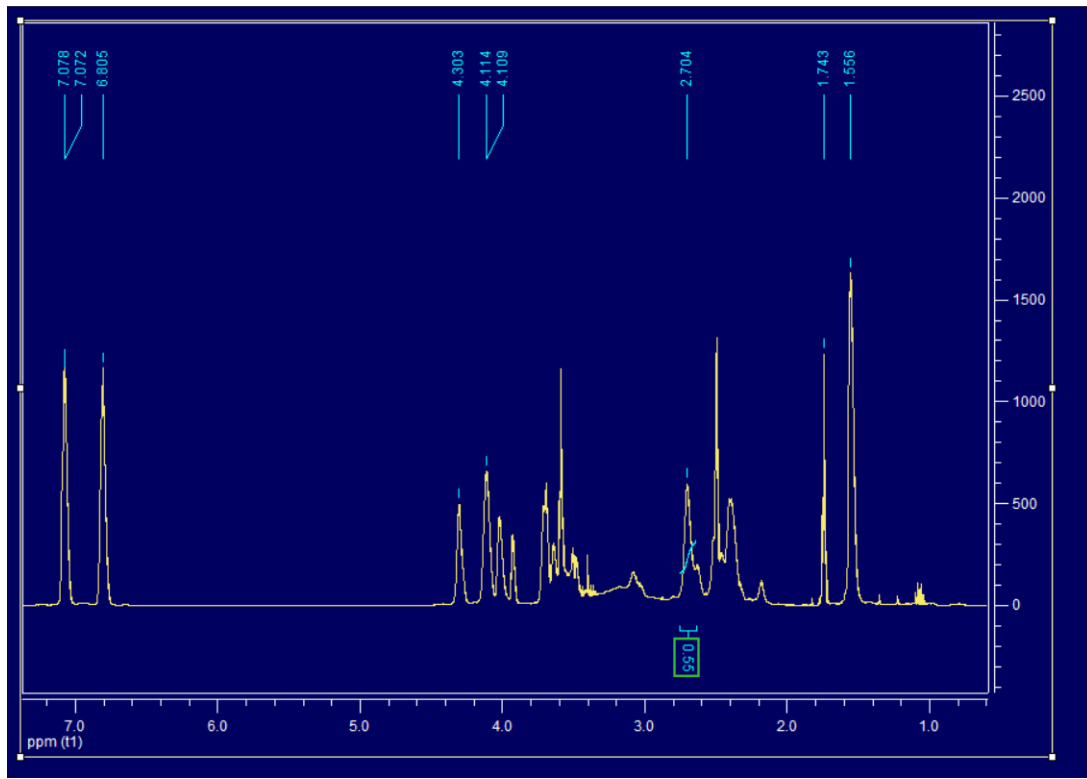
Şekil 54: K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ürününe ait ¹H-NMR Spektrumu



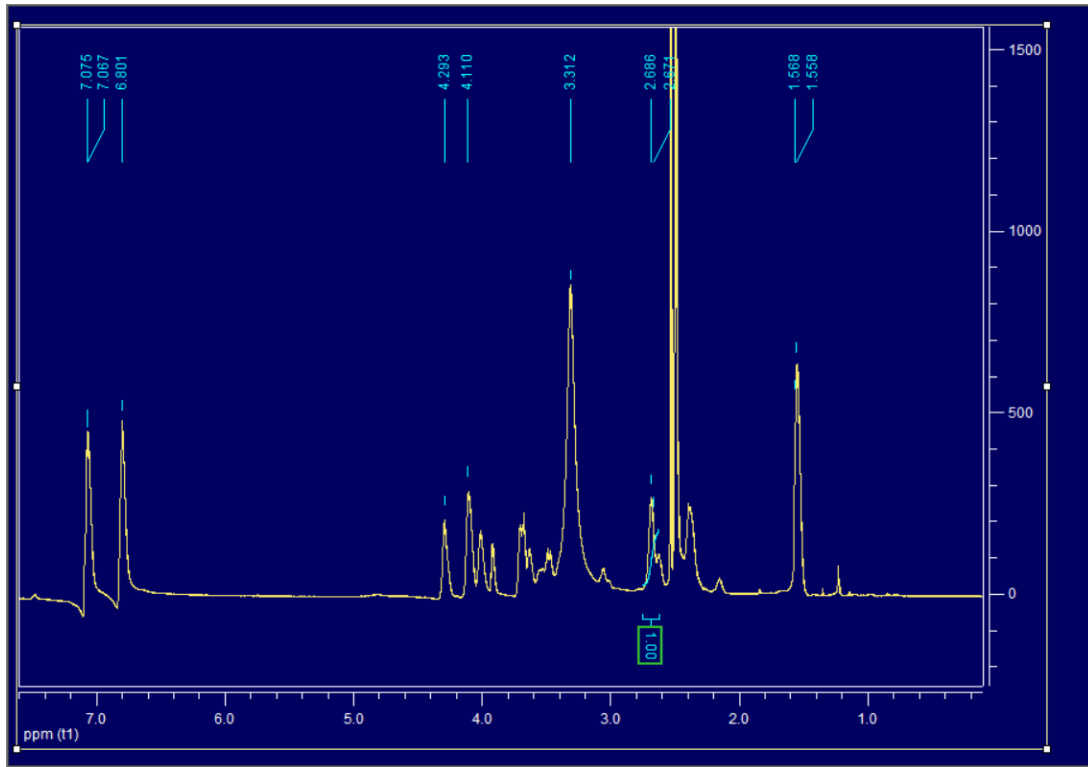
Şekil 55: K2-PEG- NMDA (Chi-HE-EDA-PEG-NMDA) ürününe ait ¹H-NMR Spektrumu

Tüm PBAE örneklerinin ^1H -NMR spektrumları ve açıklamaları Tablo 22, Tablo 23,

Tablo 24, Tablo 25’da ve Şekil 56, Şekil 57, Şekil 58, Şekil 59, Şekil 60, Şekil 61, Şekil 62, Şekil 63’da gösterildi. Bununla beraber yine tüm PBAE ürünleri ile NMDA modifikasyonu gerçekleştirildi ve diğer analizlerde en başarılı bulunan D1 ve F1 numunelerinin NMDA modifikasyonu ait ^1H -NMR spektrumları ve açıklamaları da Tablo 22, Tablo 23 ve Şekil 57, Şekil 59’de yer verildi.



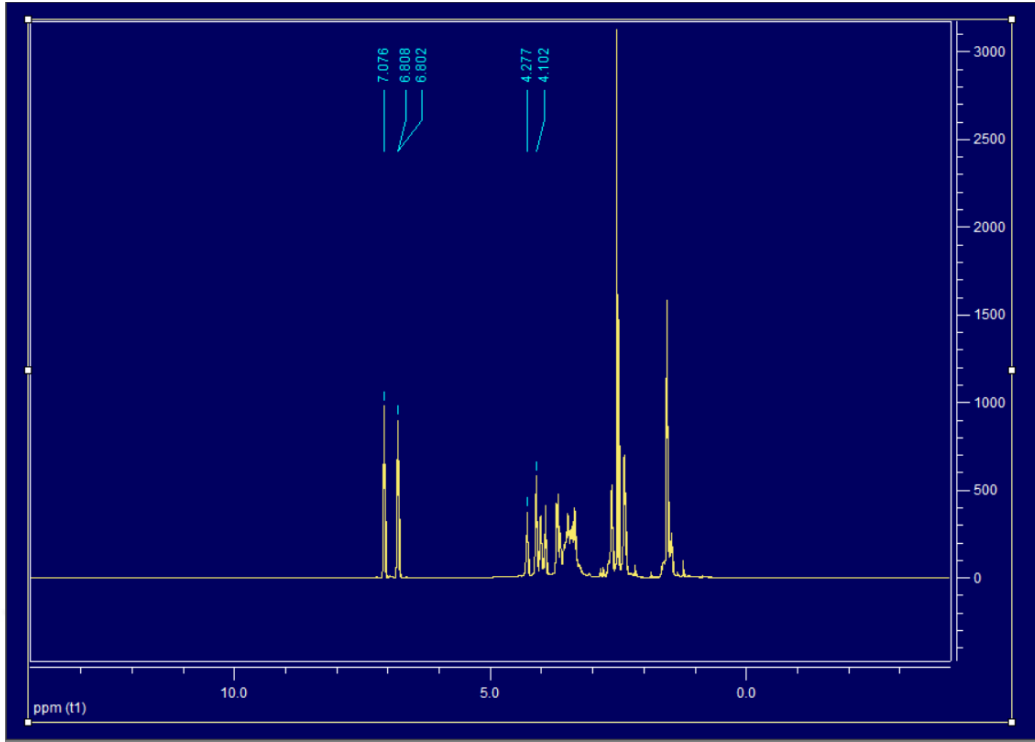
Şekil 56: D1 (PBAE_{BAEDEDA}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu



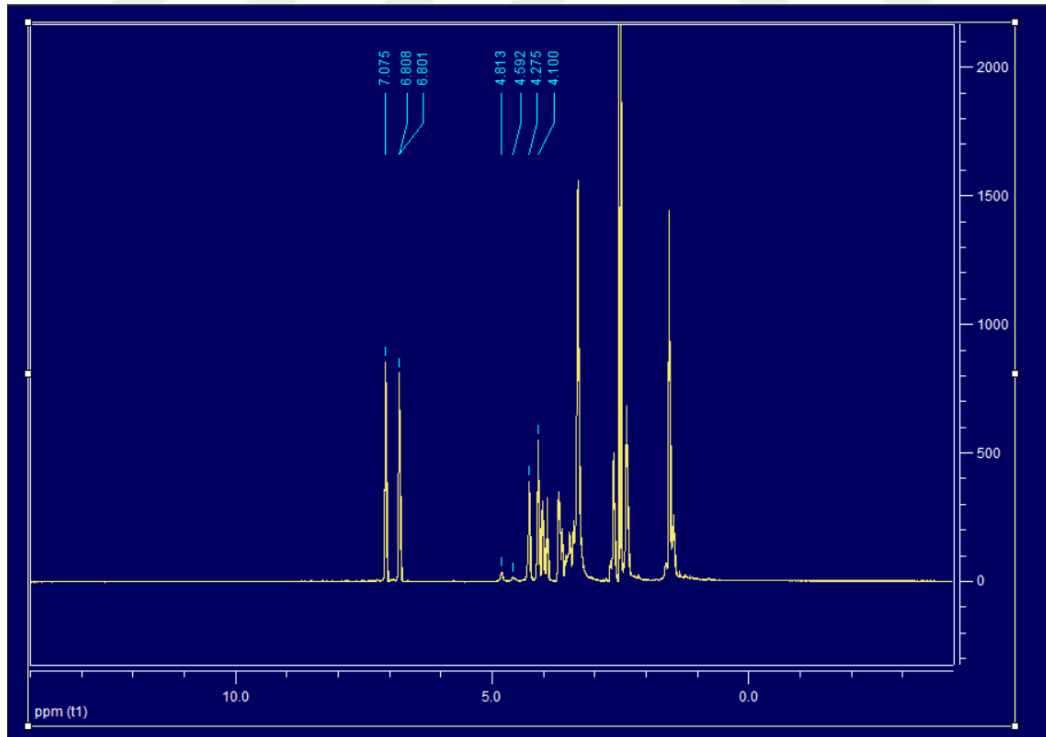
Şekil 57: D1-NMDA (PBAE_{BAEDED}-NMDA) ürününe ait ¹H-NMR Spektrumu

Tablo 22: D1 ve D1-NMDA ürünlerine ait ¹H-NMR açıklamaları

Açıklama	Kimyasal Kaymalar (ppm)	Ürünler	
		D1	D1-NMDA
Bisfenol A ünitelerinde yer alan (-CH-) protonlarına ait kimyasal kayma değerleri	7.08 - 6.81	7.078, 7.072 – 6.805	7.075, 7.067 – 6.801
PEG yapısındaki metilen (-CH ₂ -) gruplarının protonlarına ait kayma değeri	4.3 - 4.1	4.303 – 4.114, 4.109	4.293 – 4.110
Diamin ünitelerinin (-NHCH ₂ -) protonlarını belirtmektedir	2.7 - 1.5	2.704 – 1.556	2.686, 2.671 – 1.568, 1.558
Yapıda bulunan (-CH ₂ =CH-) protonlarına ait spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görülmüştür	6.21 - 6.05 - 5.82	+	+
Yapıya NMDA modifikasyonu sonucunda (-CONHCH ₂ -) bandından ileri gelen protonlara ait integral alan hesabına göre modifikasyonun gerçekleşmesi	2.704	0.55	1



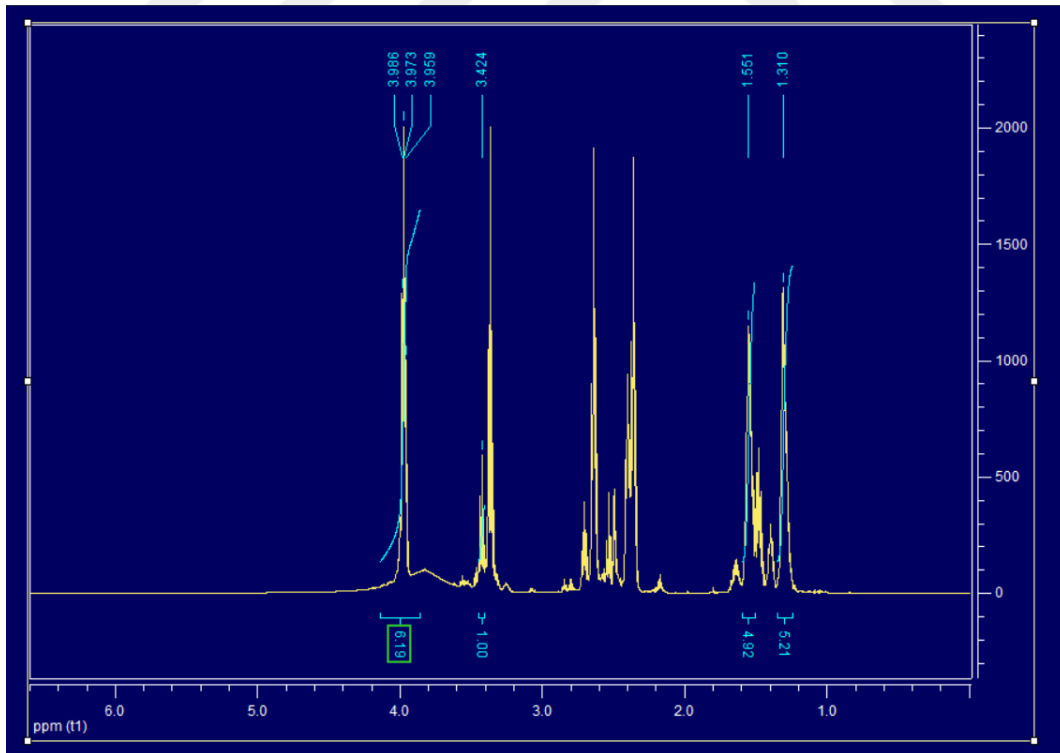
Şekil 58: F1 (PBAE_{BAEDDAP}) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu

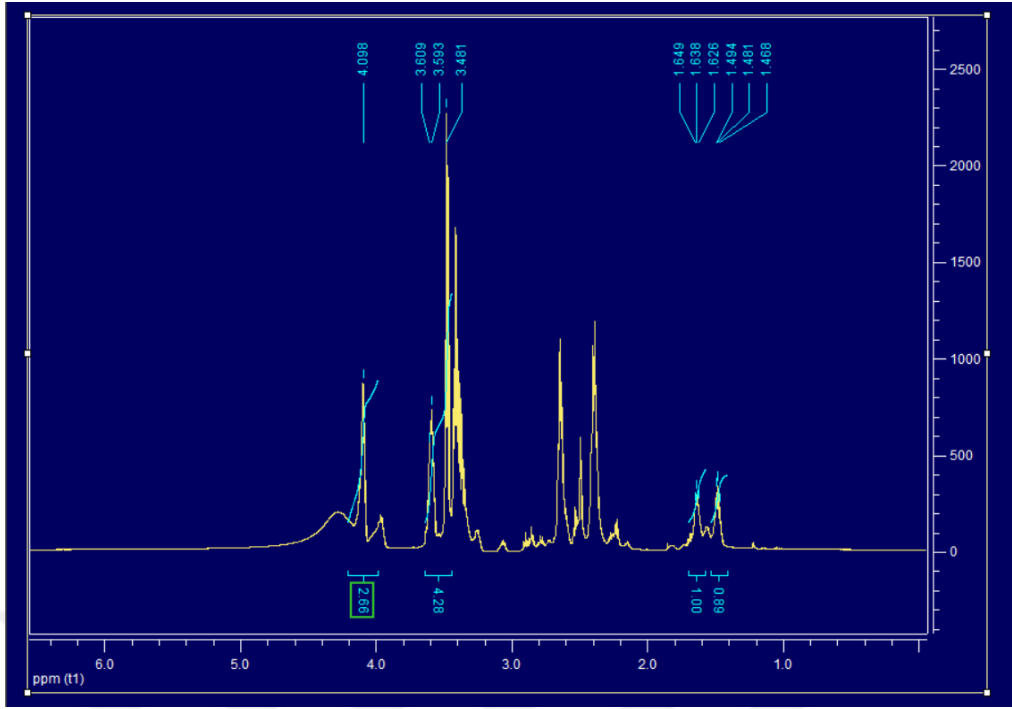


Şekil 59: F1-NMDA (PBAE_{BAEDDAP}-NMDA) ürününe ait ^1H -NMR Spektrumu

Tablo 23: F1 ve F1-NMDA ürünlerine ait ^1H -NMR açıklamaları

Açıklama	Kimyasal Kaymalar (ppm)	Ürünler	
		F1	F1-NMDA
Bisfenol A ünitelerinde yer alan (-CH-) protonlarına ait kimyasal kayma değerleri	7.08 - 6.81	7.076 – 6.808, 6.802	7.075 – 6.808, 6.801
PEG yapısındaki metilen (-CH ₂ -) gruplarının protonlarına ait kayma değeri	4.3 - 4.1	4.277 - 4.102	4.275 – 4.100
Yapıda bulunan (-CH ₂ =CH-) protonlarına ait spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görölmüştür	6.21 - 6.05 - 5.82	+	+
Yapıya NMDA modifikasyonu sonucunda bandından ileri gelen (-COOCH ₂ -) protonlarına ait kayma değeri	4.813 – 4.592	-	+

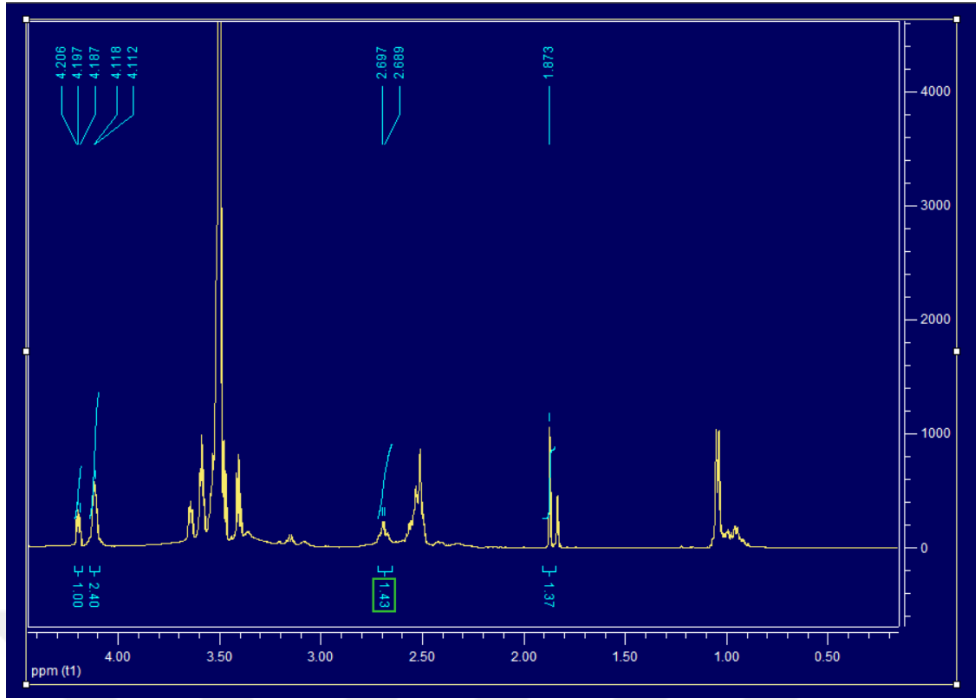
**Şekil 60:** F2 (PBAEHDA) ürününe ait ^1H -NMR Spektrum



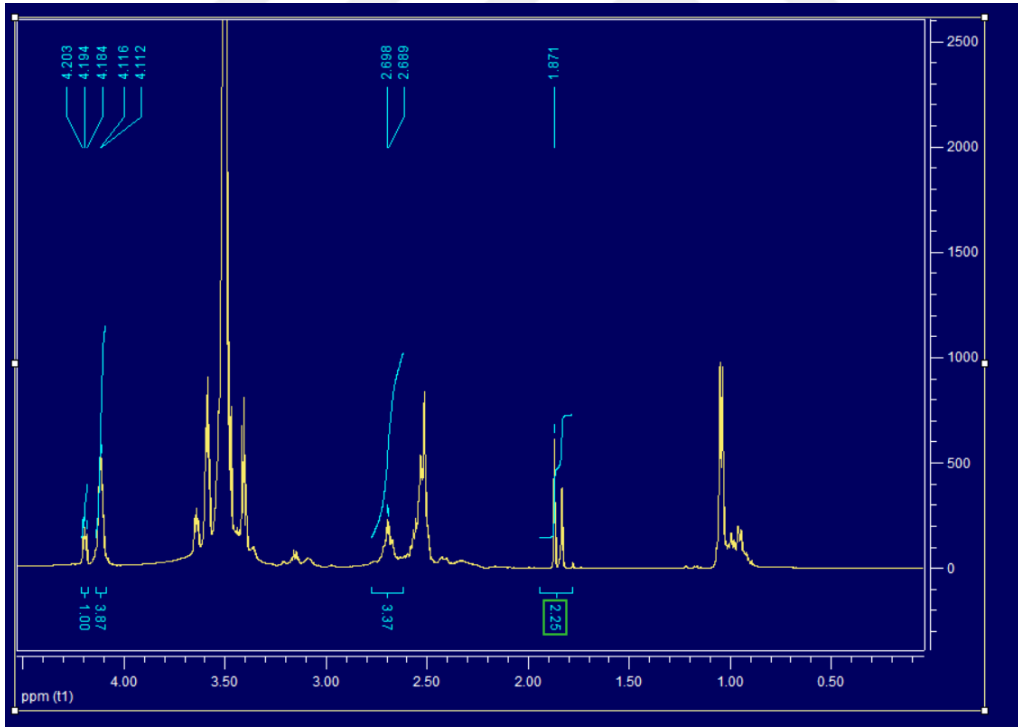
Şekil 61: F3 (PBAE_{DEGDAAP}) ürününe ait ¹H-NMR Spektrumu

Tablo 24: F2 ve F3 ürünlerine ait ¹H-NMR açıklamaları

Açıklama	Kimyasal Kaymalar (ppm)	Ürünler	
		F2	F3
Yapıda yer alan COOCH ₂ gruplarının protonlarına ait kayma değerleri	4.1 – 3.9	3.986, 3.973, 3.959	4.098
Yapıda yer alan (-NCH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH) gruplarının protonlarına ait kayma değerleri	3.6 – 1.6 – 1.4 - 1.3	3.424 – 1.551 – 1.310	3.609, 3.593, 3.481 – 1.649, 1.638, 1.626 – 1.494, 1.481, 1.468
PEG yapısındaki metilen (-CH ₂ -) gruplarının protonlarına ait kayma değeri	4.3 - 4.1	4.277 - 4.102	4.275 – 4.100
Yapıda bulunan (-CH ₂ =CH-) protonlarına ait spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görüldü	6.21 - 6.05 - 5.82	+	+



Şekil 62: ME1 (PBAE_{PEGDMEDA}) ürününe ait ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 63: ME2 (PBAE_{PEGDMEDA1.1}) ürününe ait ¹H-NMR Spektrumu

Tablo 25: ME1 ve ME2 ürünlerine ait ^1H -NMR açıklamaları

Açıklama	Kimyasal Kaymalar (ppm)	Ürünler	
		ME1	ME2
Yapıda yer alan COOCH_2 gruplarının protonlarına ait kayma değerleri	4.2	4.206, 4.197, 4.198	4.203, 4.194, 4.184
Diamin ünitelerinin ($-\text{NHCH}_2-$) protonlarını belirtmektedir	2.7	2.697, 2.689	2.698, 2.689
PEG yapısındaki metilen ($-\text{CH}_2-$) gruplarının protonlarına ait kayma değeri	4.1	4.118, 4.112	4.116, 4.112
Yapıda bulunan ($-\text{CH}_3$) protonlarına ait spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görüldü	1.8	1.873	1.871
Yapıda bulunan ($-\text{CH}_2=\text{CH}-$) protonlarına ait spesifik kayma değerlerinin kaybolduğu görüldü	6.21 - 6.05 - 5.82	+	+

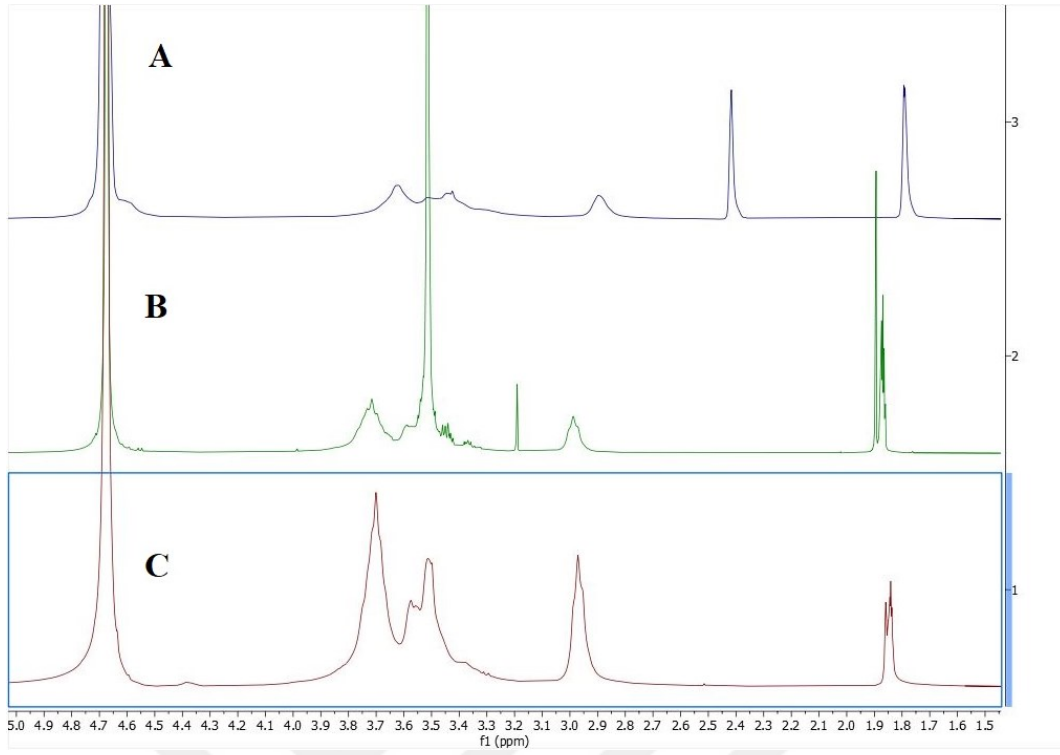
Yapılan diğer karakterizasyon çalışmaları neticesinde ideal olarak seçilen D1 ve F1 polimerlerinin NMDA ile modifikasyonu gerçekleştirildi ve NMR analizleri sunuldu. F2, F3, ME1 ve ME2 polimerlerinin NMDA ile modifikasyonu gerçekleştirilmedi.

K1-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA polimerlerinin eksik olan ^1H NMR analizleri ve ön deneme ve optimizasyon çalışmaları ile yapılan tekrarlı analizler neticesinde elde edilen analiz sonuçlarında başarı gösteren K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA, D1-NMDA ve F1-NMDA ürünlerin ^{13}C NMR analizleri nükleer manyetik rezonans spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

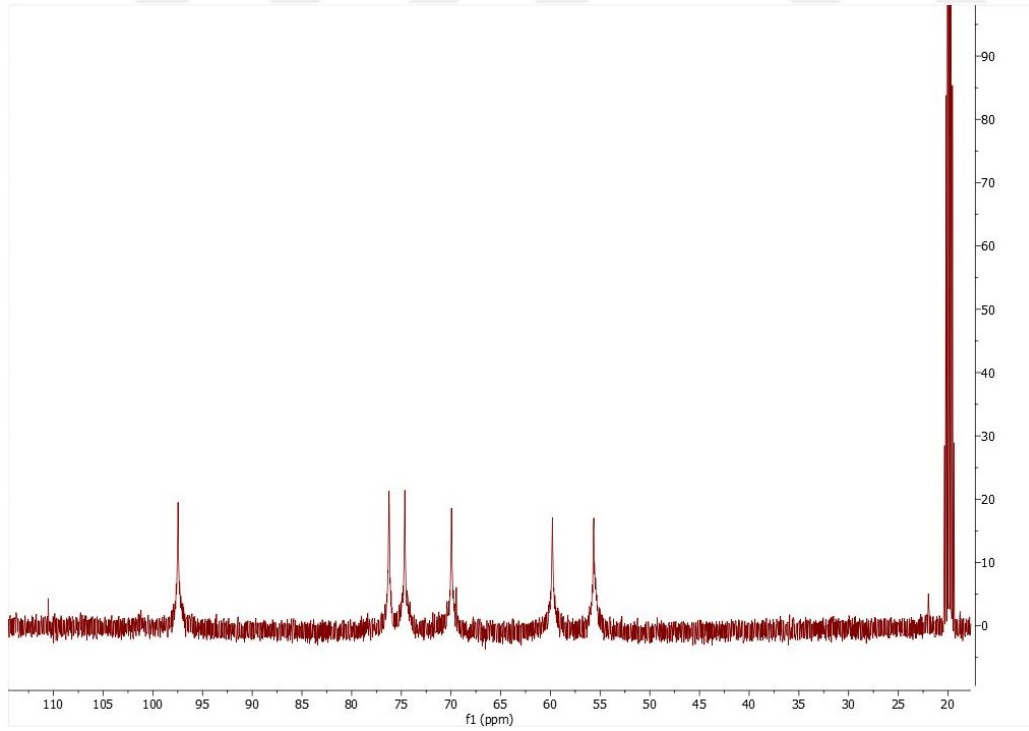
Asetik asit- d_4 : D_2O çözücüler, 500 MHz ve 25°C parametreleri kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. K2-PEG ve K2-PEG-NMDA polimerlerinin ^1H -NMR spektroskopisi ile yapısal karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesine karşın hem çözücü değişimi hem de bütünlüğü korumak adına analiz tekrar edilmiştir. Analiz sonuçları aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirilmiştir.

Tüm kitosan polimerlerinin PEGilasyon ve NMDA ile reaksiyonları gerçekleştirilerek ^1H -NMR ve ^{13}C NMR spektroskopisi ile yapısal karakterizasyonları tamamlanmış ve reaksiyonların beklenildiği gibi gerçekleştiği görülmüştür. Şekil 64, Şekil 66 ve Şekil 68’de modifiye kitosan polimerlerine ait ^1H -NMR spektrumları verilmiştir. Ayrıca Şekil 65, Şekil 67, Şekil 69’da ise modifiye kitosan ürünlerine ait ^{13}C -NMR spektrumları verilmiştir.

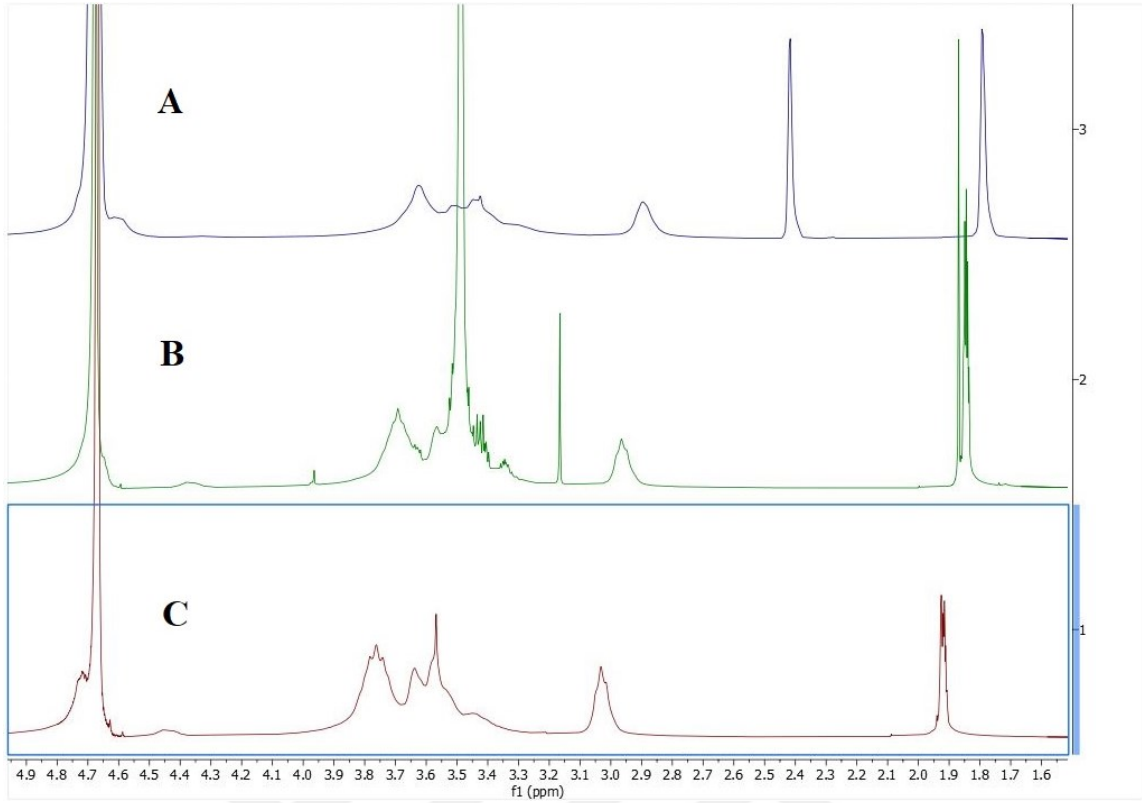
Buna göre; K1-PEG, K2-PEG ve K3-PEG grafiklerinde 3.5 ppm civarında (-O-CH₂-CH₂) gruplarına ait protonların piklerinin yoğun biçimde görülmesi PEGilasyon reaksiyonlarının başarılı bir biçimde gerçekleştiğini göstermiştir. Bununla beraber yine bu spektrumlarda HE-EDA ve DAPC bileşiklerinden ileri gelen 3.2 ppm ve 1.9 ppm civarında (NH-CH₂-CH₂-NH-, CH₂-CH₂-CH₂-N-CH₃-CH₃) gruplarına ait protonlara ait piklerin K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA grafiklerinde kaybolması ve/veya diğer piklerle girişimde bulunması kitosanın reaksiyona girmemiş metilol gruplarıyla ve K2-PEG ve K3-PEG ürünleri için ayrıca HE-EDA bileşiğindeki serbest primer amin grupları ile NMDA arasında reaksiyonun gerçekleştiği görülmüştür. Yine yukarıda her üç K-PEG ürünü için bahsi geçen 3.5 ppm deki PEGilasyona ait pikin şiddetinin bu ürünlerin spektrasında azalması ise ayrıca NMDA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO-Na⁺ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları ile MPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görülmüştür. Sonuçlar bir önceki rapor döneminde ayrıntılı bir şekilde verilen FTIR analizi sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. K1-PEG NMDA ait ¹³C NMR (125 MHz, Asetik acid-d₄; δ = 19.99) [ppm]: δ = 22.03; 55.62; 55.66; 59.79; 69.47; 69.95; 74.65; 76.24; 97.47; 110.53. K2-PEG NMDA ait ¹³C NMR (125 MHz, Asetik acid-d₄; δ = 19.99) [ppm]: δ = 22.04; 32.31; 55.71; 59.87; 69.52; 70.04; 74.69; 76.27; 97.60; 110.4. K3-PEG NMDA ait ¹³C NMR (125 MHz, Asetik acid-d₄; δ = 19.99) [ppm]: δ = 22.04; 55.68; 59.84; 70.04; 74.71; 76.25; 97.54.



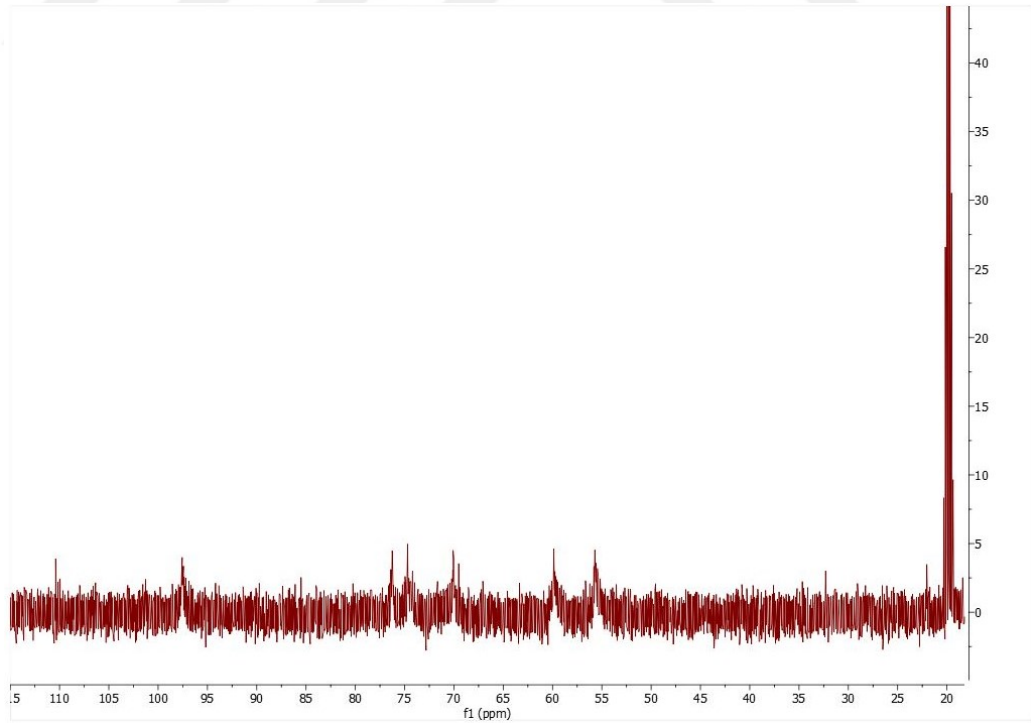
Şekil 64: A) Kitosan; B) K1-PEG, C) K1-PEG-NMDA polimerlerine ait ¹H-NMR Spektrumu



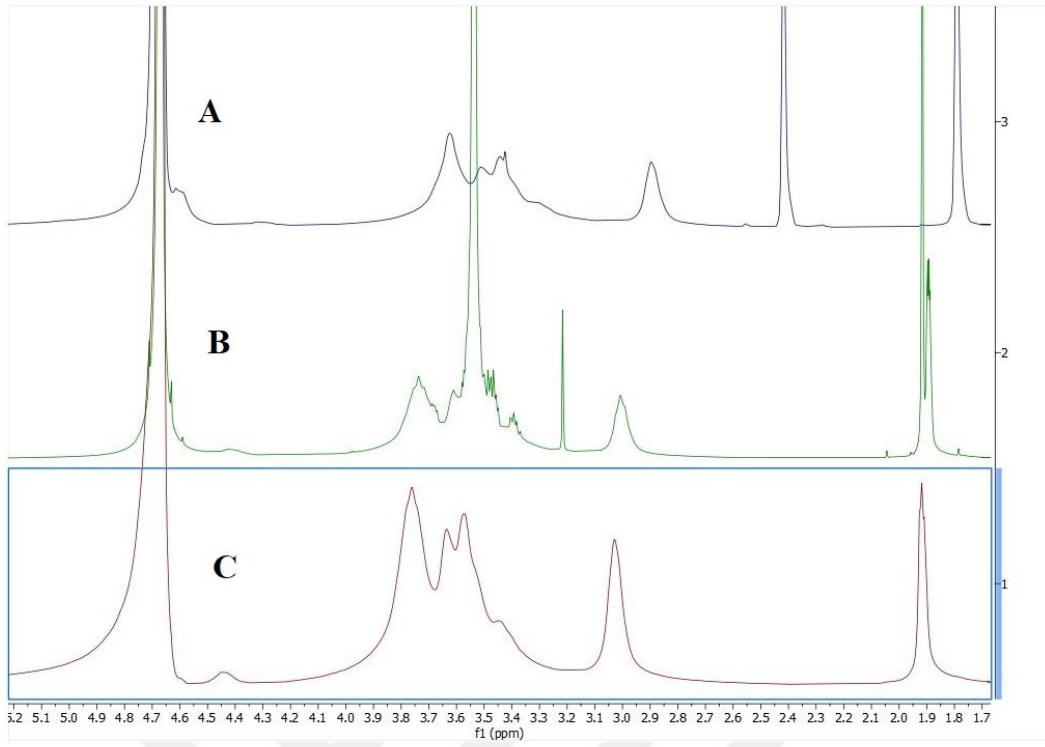
Şekil 65: K1-PEG-NMDA polimerine ait ¹³C-NMR Spektrumu



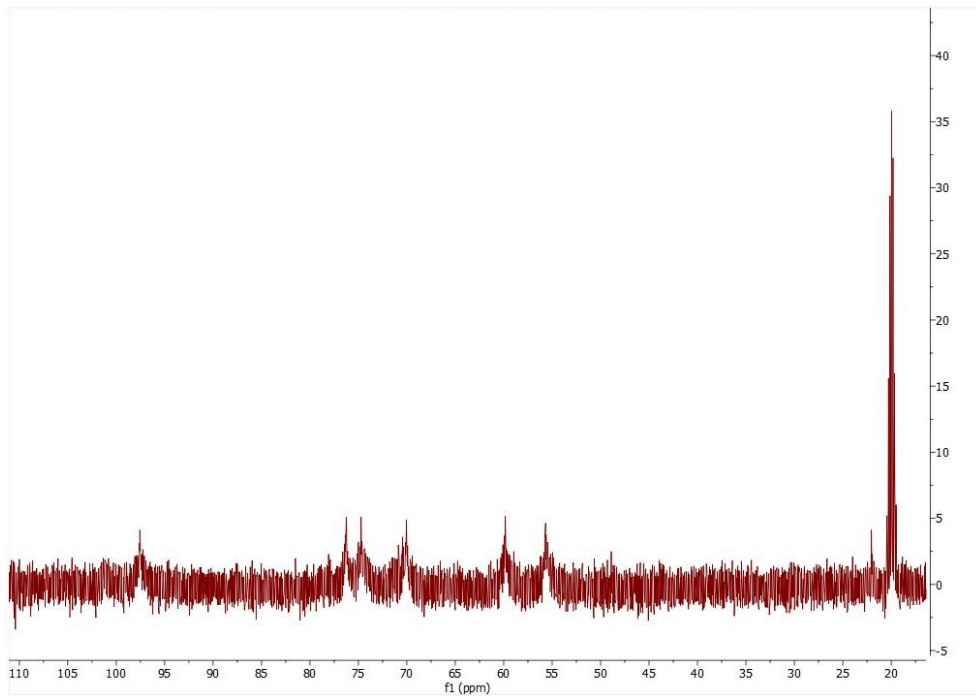
Şekil 66: A) Kitosan; B) K2-PEG, C) K2-PEG-NMDA polimerlerine ait ^1H -NMR Spektrumu



Şekil 67: K2-PEG-NMDA polimerine ait ^{13}C -NMR Spektrum

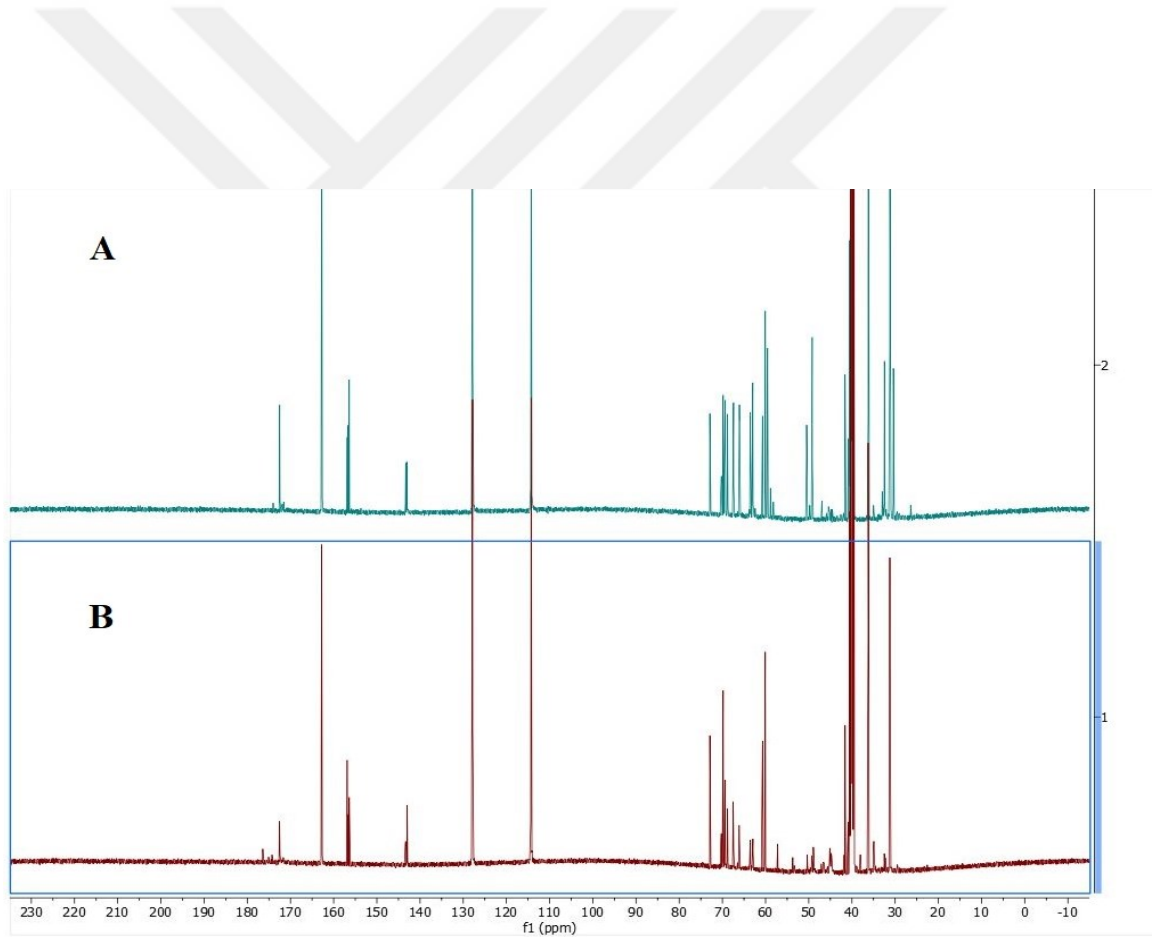


Şekil 68: A) Kitosan; B) K3-PEG, C) K3-PEG-NMDA polimerlerine ait ¹H-NMR Spektrumu



Şekil 69: K3-PEG-NMDA polimerine ait ¹³C-NMR Spektrumu

FTIR ve ^1H NMR analizlerine ilaveten ^{13}C NMR analizleri gerçekleştirilmiş olan F1-NMDA ve D1-NMDA polimerlerinin spektrası Şekil 70’de verilmiştir. F1-NMDA ait ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 ; $\delta = 40.02$) [ppm]: $\delta = 30.04$; 31.17; 31.23; 32.49; 36.24; 40.89; 41.60; 49.21; 50.49; 59.54; 60.07; 60.70; 62.96; 63.57; 66.06; 67.41; 68.82; 69.42; 69.82; 72.90; 114.25; 114.32; 127.85; 127.89; 142.92; 143.07; 143.30; 156.41; 156.66; 156.88; 162.77; 172.51; 172.6. D1-NMDA ait ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6 ; $\delta = 40.02$) [ppm]: $\delta = 29.48$; 31.17; 31.23; 32.51; 34.93; 36.24; 38.07; 40.89; 41.60; 45.13; 48.93; 49.33; 57.21; 60.06; 60.70; 62.93; 63.63; 66.11; 67.43; 68.82; 69.42; 69.82; 70.24; 72.90; 114.27; 127.87; 142.93; 143.08; 143.42; 156.40; 156.67; 156.88; 162.78; 172.54; 174.27; 176.41.



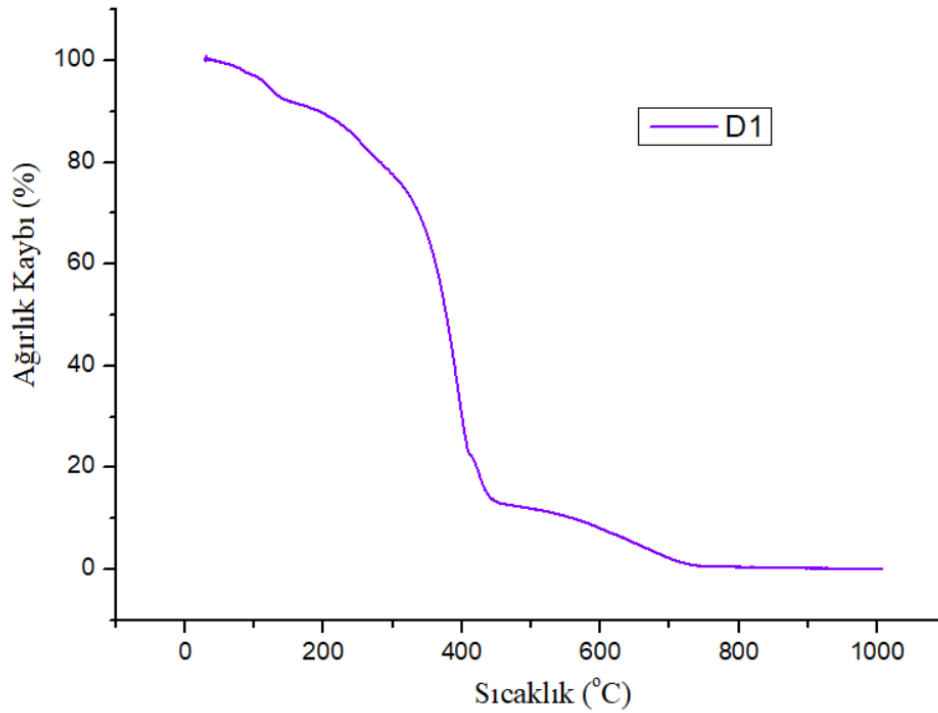
Şekil 70: A) F1-NMDA; B) D1-NMDA ürünlerine ait ^{13}C -NMR Spektrumu

4.2.3. Termal Analizler

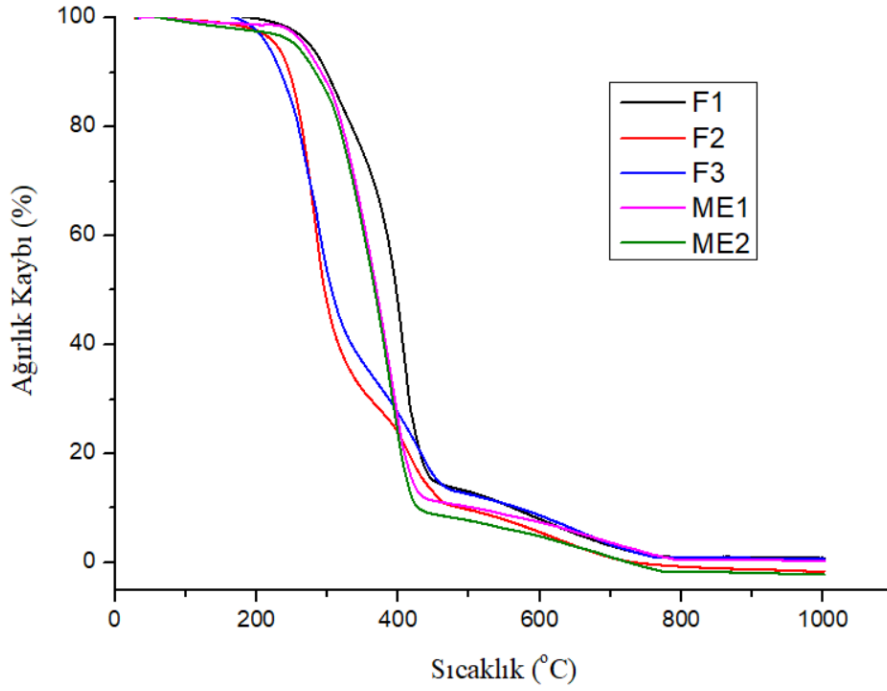
Sentezlenen polimerlerin termal bozunma özelliklerini saptamak amacıyla Termogravimetrik analiz yapılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen PBAE ve kitosan polimerlerine ait TGA eğrileri ve bu eğrilerden elde edilen datalar Tablo 26 ve Şekil 71-73’de verilmiştir.

Tablo 26 : PBAE ve Kitosan ürünlerine ait TGA eğrilerinden tespit edilen çeşitli sıcaklıklarda ağırlık kaybı ve nihai bozunma sıcaklıkları

	Temperature °C								
%Ağırlık Kaybı	D1	F1	F2	F3	ME1	M2	PEG-K1	PEG-K2	PEG-K3
5	120	275	228	216	267	255	113	135	141
10	195	298	246	234	291	283	208	203	228
20	281	334	263	259	321	316	248	251	282
50	377	397	295	306	369	366	313	320	375
99	727	881	698	762	774	700	589	578	971



Şekil 71: D1 ürününe ait termal oksidatif bozunma eğrisi

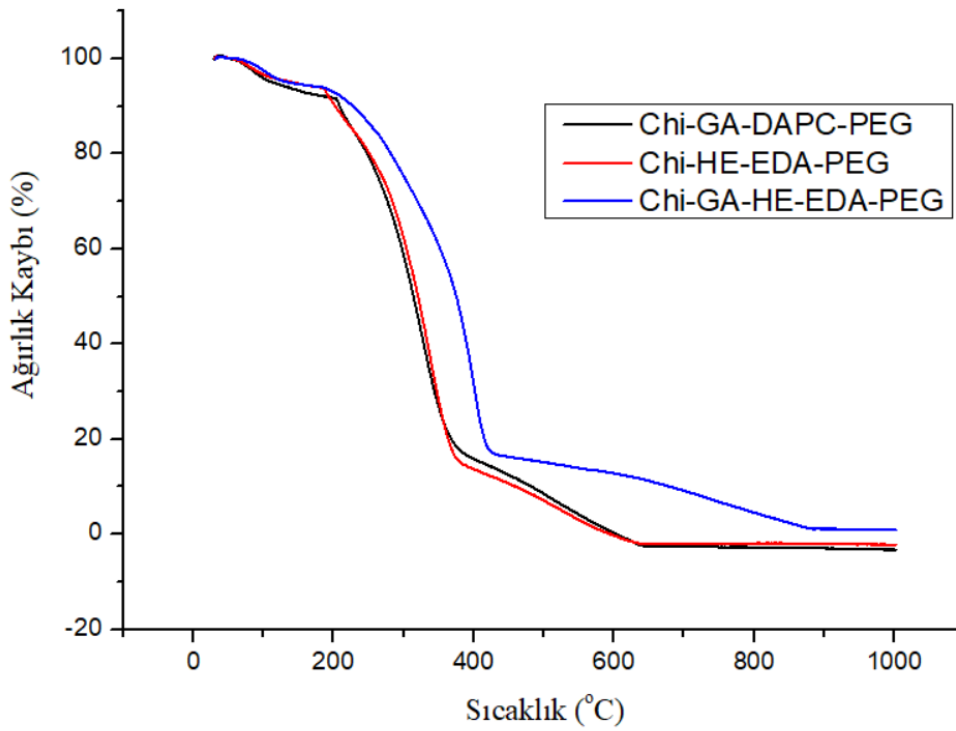


Şekil 72: PBAE ürünlerine ait termal oksidatif bozunma eğrileri

Şekil 71-72 ve Tablo 26'da görüldüğü gibi, bu eğriler, oldukça açık bir şekilde tanımlanmış ilk, orta ve son oksidatif bozunma olmak üzere üç oksidatif bozunma aşamasının varlığını göstermektedir. İlk aşamaya karşılık gelen yaklaşık 195 ila 298°C aralığında, suyun uçması ve ilk aşama oksidasyon reaksiyonu ürünlerinin bozulması nedeniyle %10'luk belirgin bir ağırlık kaybı gözlemlendi. Oksidatif bozunmanın diğer aşamalardan daha hızlı olduğu orta aşama, PbAE yapılarına bağlı olarak yaklaşık %60-80 ağırlık kaybıyla yaklaşık 315-431°C sıcaklık aralığında gerçekleşmiş olup bu aşamada ana ağırlık kayıpları gözlemlendi ve bu sıcaklık aralığında oksidatif bozunma oranları, PbAE'nin yapılarına bakılmaksızın oldukça benzerdir. Son oksidatif bozunma ise bu aşamadan sonra gözlenir ve PbAE yapılarına bağlı olarak yaklaşık 698-881°C'de tamamlandı.

PBAE ürünlerine benzer şekilde, kitosan polimerlerinde de ilk bozunma aşamasına karşılık gelen yaklaşık 203 ila 228°C aralığında, %10'luk belirgin bir ağırlık kaybı gözlemlendi. Orta aşama, kitosan yapılarına ve modifikasyonlarına bağlı olarak yaklaşık %60-80 ağırlık kaybıyla yaklaşık 328-415°C sıcaklık aralığında gerçekleşmiş olup bu aşamada ana ağırlık kayıpları gözlemlendi. Son oksidatif bozunma

ise yine kitosan ve modifiye yapılarına bağlı olarak yaklaşık 578-971°C'de tamamlandı.



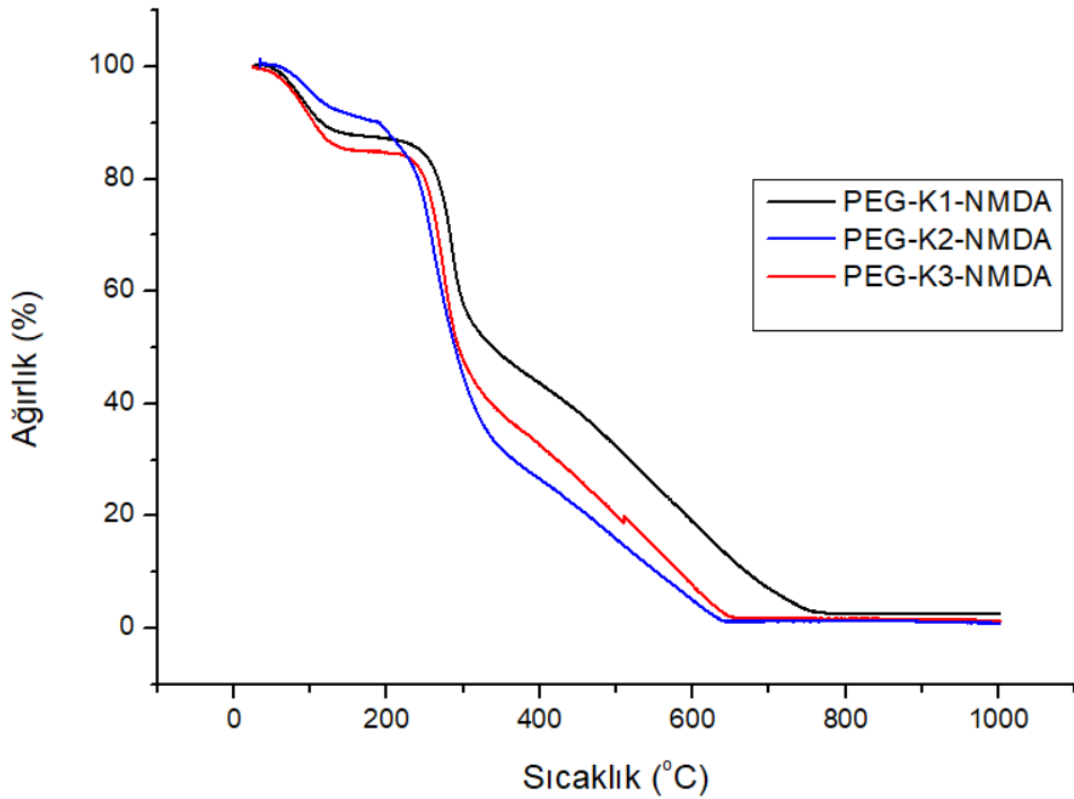
Şekil 73: Kitosan ürünlerine ait Termal Oksidatif Bozunma Eğrileri

Sentezlenen modifiye polimerlerin ligand (NMDA) takılması reaksiyonundan elde edilen son ürünler olan ligand modifiye polimerlerin (PBAE-NMDA ve PEG-Kitosan-NMDA) termal oksidatif bozunma özelliklerini saptamak amacıyla Termogravimetrik analiz (TGA) yapılmıştır. Bu çalışma ile elde edilen PBAE-NMDA ve PEG-Kitosan-NMDA polimerlerine ait TGA eğrileri ve bu eğrilerden elde edilen data Tablo 27 ve Şekil 74’de verilmiştir.

Tablo 27: PBAE-NMDA (D1-NMDA ve F1-NMDA) ve PEG-Kitosan-NMDA (PEG-K1-NMDA, PEG-K2-NMDA ve PEG-K3-NMDA) ürünlerine ait TGA eğrilerinden edilen % ağırlık kayıpları ve son bozunma sıcaklıkları

Ağırlık Kaybı* (%)	Sıcaklık (°C)				
	D1-NMDA	F1-NMDA	PEG-K1-NMDA	PEG-K2-NMDA	PEG-K3-NMDA
5	247	233	86	105	80
10	300	281	115	190	105
20	348	339	267	241	250
50	394	404	338	289	294
100	704	760	760	650	650

*TGA eğrilerinden hesaplanan değerler



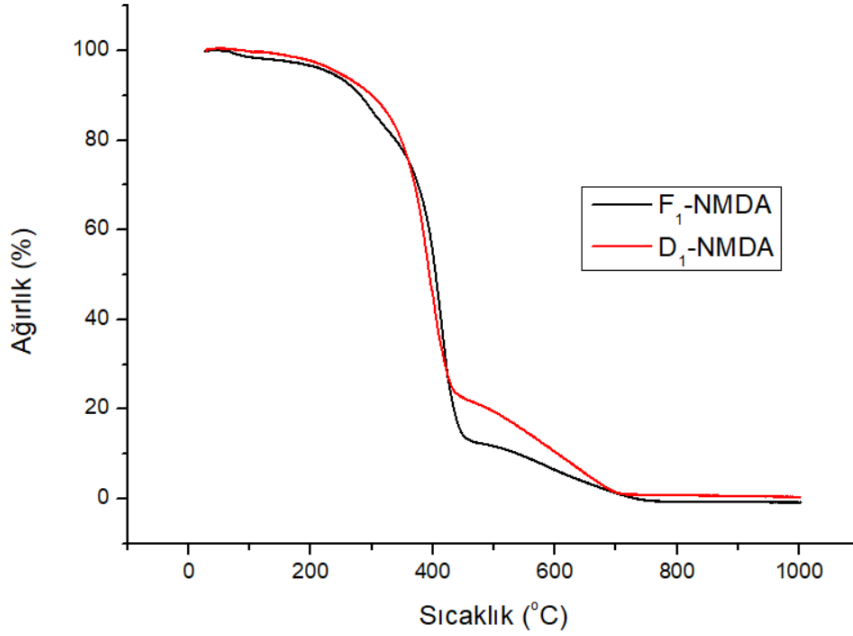
Şekil 74: PEG-Kitosan-NMDA ürünlerine ait Termal Oksidatif Bozunma Eğrileri

Şekil 74 ve Tablo 27’de görüldüğü gibi, PEG-Kitosan-NMDA (K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA) polimerlerinin termal oksidatif bozunma özellikleri aynı davranışı sergilemektedirler. Şöyle ki; her 3 ürünün de birbirlerine çok yakın sıcaklık aralıklarında olmak üzere havada bozunmaları 4 kademede olmaktadır. Tablo 28’de polimerlere ait bozunma kademeleri sıcaklık aralıkları, bunlara karşılık gelen maksimum % ağırlık kaybı miktarları ve son bozunma sıcaklıkları verilmiştir.

Tablo 28: PEG-Kitosan-NMDA (K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA) ve PBAE-NMDA (D1-NMDA ve F1-NMDA) polimerlerine ait bozunma kademeleri

Ürün	Sıcaklık aralığı (°C) ve Ağırlık kaybı (%)*				
Bozunma kademesi	PEG-K1-NMDA	PEG-K2-NMDA	PEG-K3-NMDA	D1-NMDA	F1-NMDA
1	25-120 (10)	25-100 (5)	25-130 (15)	25-350 (8)	25-350 (8)
2	120-270 (15)	100-200 (10)	130-270 (15)	350-450 (78)	350-450 (78)
3	270-300 (47)	200-325 (65)	270-300 (57)	450-700 (100)	450-760 (100)
4	300-760 (100)	325-650	300-650 (100)	----	-----
Son bozunma sıcaklığı (°C)	760	650	650	700	780

* TGA eğrilerinden hesaplanan değerler



Şekil 75: PBAE-NMDA ürünlerine ait Termal Oksidatif Bozunma Eğrileri

4.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1. Boş ve siRNA Yüklü Nanopartiküllerinin Hazırlanmasına Ait Bulgular

4.3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Nanopartiküllerin, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı (poldispersite indeksi, PDI) foton korelasyon spektroskopisi yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Boş kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı sonuçları Tablo 29’de, PEGlenmiş boş kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı sonuçları Tablo 31’de gösterilmiştir. Boş PBAE nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı sonuçları Tablo 33’de gösterilmiştir.

PEGlenmiş kitosan nanopartiküllerinin ve siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş PEG kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı sonuçları Tablo 35’de gösterilmiştir.

Boş kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyeli sonuçları Tablo 29’de ve Tablo 31’de gösterilmiştir. Boş PBAE nanopartiküllerinin zeta potansiyeli sonuçları Tablo 33’de gösterilmiştir.

Tablo 29: Boş kitosan nanopartiküllerinin partikül boyutu ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli sonuçları

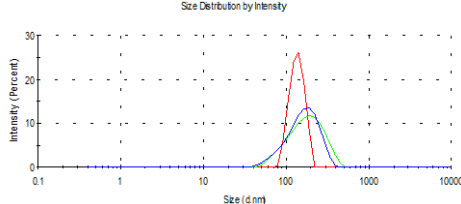
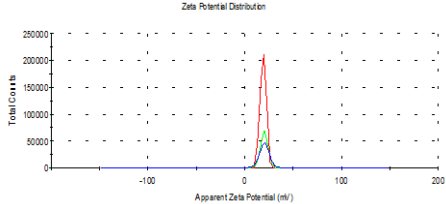
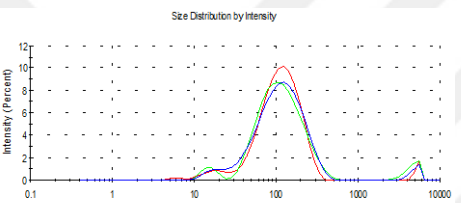
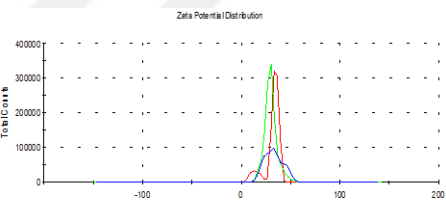
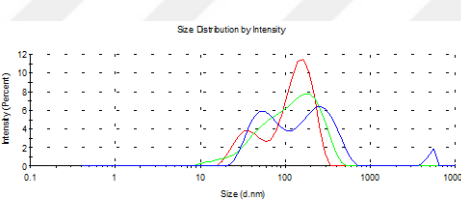
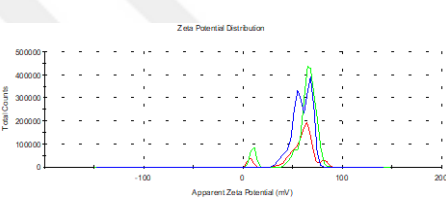
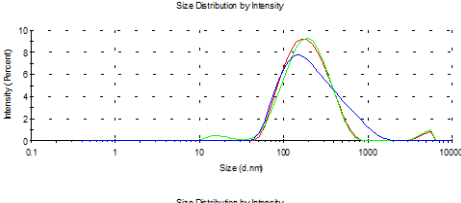
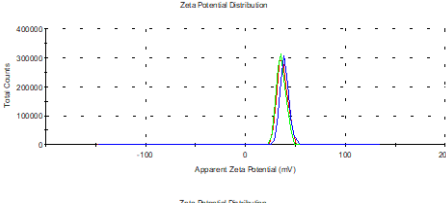
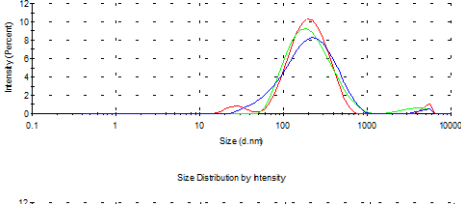
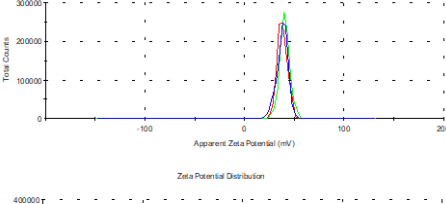
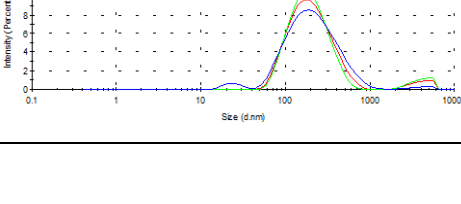
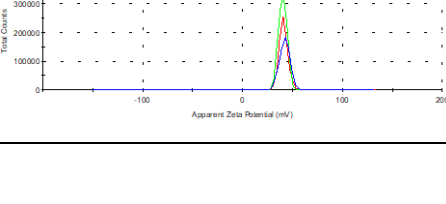
Polimer	Formülasyon kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
K1	K1-1-3:1	237,60±57,79	0,339±0,006	19,6±0,7
K1	K1-1-4:1	143,80±21,69	0,424±0,110	36,5±1,4
K1	K1-1-5:1	96,19±4,16	0,386±0,004	31,5±1,5
K1	K1-1-6:1	128,20±25,53	0,375±0,189	59,4±32,1
K1	K1-1-7:1	114,60±1,08	0,426±0,010	32,8±6,4
K1	K1-2-3:1	5549±1138	1	20,8±0,2
K1	K1-2-4:1	202,10±10,37	0,451±0,102	35,7±0,3
K1	K1-2-5:1	156,20±3,00	0,349±0,053	37,2±1,7
K1	K1-2-6:1	165,50±2,64	0,343±0,036	38,8±1,4
K1	K1-2-7:1	163,00±3,92	0,324±0,048	41,0±1,0
K1	K1-3-3:1		Ölçüm yapılamadı	
K1	K1-3-4:1	220,90±3,41	0,451±0,002	32,4±0,9
K1	K1-3-5:1	212,30±2,46	0,411±0,022	34,8±0,3
K1	K1-3-6:1	190,00±3,78	0,353±0,044	37,8±1,4
K1	K1-3-7:1	196,20±1,83	0,317±0,025	38,6±0,1
K1	K1-4-3:1		Ölçüm yapılamadı	
K1	K1-4-4:1	289,90±6,80	0,739±0,046	30,9±0,7
K1	K1-4-5:1	233,10±2,74	0,456±0,021	36,3±1,4
K1	K1-4-6:1	231,40±2,65	0,382±0,052	2,7±1,5
K1	K1-4-7:1	276,80±5,18	0,453±0,014	39,0±0,9
K2	K2-1-3:1	153,00±25,35	0,304±0,038	34,3±0,9
K2	K2-1-4:1	160,60±20,64	0,431±0,132	39,7±4,0
K2	K2-1-5:1	144,40±5,59	0,640±0,100	36,9±2,2
K2	K2-1-6:1	156,30±7,69	0,599±0,020	40,1±4,0
K2	K2-1-7:1	167,40±8,11	0,622±0,027	42,2±2,4
K2	K2-2-3:1	91,91±1,83	0,465±0,056	25,3±0,7
K2	K2-2-4:1	84,15±0,74	0,394±0,002	30,3±1,0
K2	K2-2-5:1	90,85±1,98	0,427±0,006	31,1±2,4
K2	K2-2-6:1	114,10±6,82	0,492±0,111	21,8±2,2
K2	K2-2-7:1	114,00±0,85	0,420±0,018	24,9±5,2
K2	K2-3-3:1	89,97±1,09	0,423±0,057	22,5±0,1

K2	K2-3-4:1	88,87±0,55	0,400±0,008	30,7±1,7
K2	K2-3-5:1	91,95±0,82	0,433±0,011	30,7±3,3
K2	K2-3-6:1	100,70±1,59	0,443±0,021	24,1±7,2
K2	K2-3-7:1	110,80±0,76	0,434±0,005	32,4±4,6
K2	K2-4-3:1	84,82±1,09	0,348±0,011	21,3±0,3
K2	K2-4-4:1	88,16±0,86	0,366±0,046	33,6±1,1
K2	K2-4-5:1	96,43±0,48	0,452±0,003	36,1±1,4
K2	K2-4-6:1	118,00±4,58	0,506±0,050	5,6±0,8
K2	K2-4-7:1	125,90±0,93	0,483±0,032	41,6±1,1
K3	K3-1-3:1	114,50±14,29	0,648±0,096	28,4±0,7
K3	K3-1-4:1	137,60±7,20	0,657±0,142	38,7±3,2
K3	K3-1-5:1	142,60±2,80	0,591±0,009	41,2±4,2
K3	K3-1-6:1	156,90±10,27	0,602±0,058	47,0±0,5
K3	K3-1-7:1	182,80±22,89	0,459±0,144	47,8±2,4
K3	K3-2-3:1	108,80±1,04	0,653±0,032	26,3±0,7
K3	K3-2-4:1	89,46±0,76	0,403±0,008	27,5±3,2
K3	K3-2-5:1	112,40±3,22	0,471±0,057	34,9±2,9
K3	K3-2-6:1	117,10±12,26	0,349±0,095	10,1±1,2
K3	K3-2-7:1	149,90±23,81	0,397±0,115	43,8±2,2
K3	K3-3-3:1	102,90±3,83	0,467±0,050	23,4±0,7
K3	K3-3-4:1	92,09±1,63	0,424±0,011	34,7±2,1
K3	K3-3-5:1	108,10±2,69	0,479±0,026	35,8±2,2
K3	K3-3-6:1	126,40±1,13	0,456±0,026	37,1±3,7
K3	K3-3-7:1	111,10±0,68	0,442±0,004	31,1±4,1
K3	K3-4-3:1	83,12±1,09	0,304±0,032	19,0±0,6
K3	K3-4-4:1	94,69±1,74	0,405±0,013	31,2±1,4
K3	K3-4-5:1	108,40±2,20	0,484±0,032	38,4±1,0
K3	K3-4-6:1	137,60±3,36	0,467±0,021	37,8±2,2
K3	K3-4-7:1	155,60±6,76	0,444±0,015	31,1±3,9

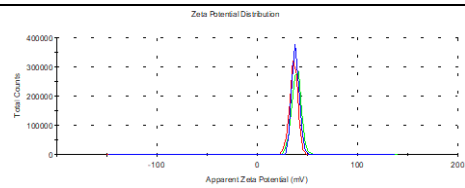
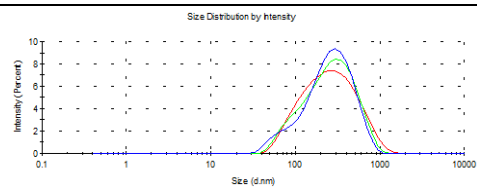
Partikül boyutu ve PDI indeksi sonuçları değerlendirilerek hazırlanan kitosan nanopartiküllerden K1-1-3:1, K1-1-5:1, K1-1-6:1, K1-2-5:1, K1-2-6:1, K1-2-7:1, K1-3-6:1, K1-3-7:1, K1-4-6:1, K2-1-3:1, K2-2-4:1, K2-4-3:1, K2-4-4:1, K3-2-6:1, K3-2-7:1, K3-4-3:1 kodlu formülasyonlar, optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir. Bu

formülasyonlar tekrar hazırlanıp buzdolabında bekletilerek fiziksel stabiliteleri incelenmiştir.

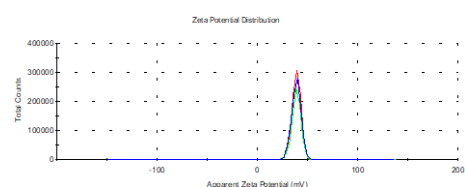
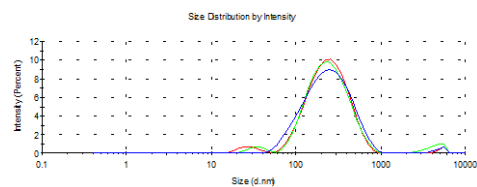
Tablo 30: PEGlenmemiş optimum kitosan (K1, K2, K3) nanopartikül formülasyonlarına ait örneklerin partikül boyutu ve zeta potansiyelini gösteren grafikler

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu	Zeta potansiyeli
K1-1-3:1		
K1-1-5:1		
K1-1-6:1		
K1-2-5:1		
K1-2-6:1		
K1-2-7:1		

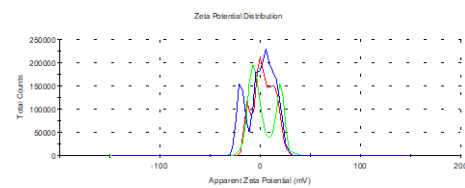
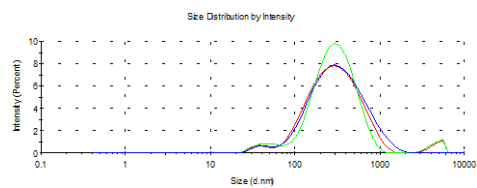
K1-3-6:1



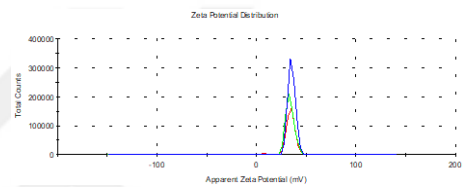
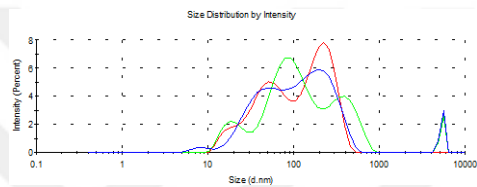
K1-3-7:1



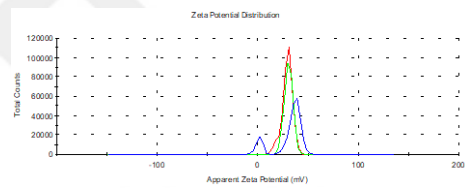
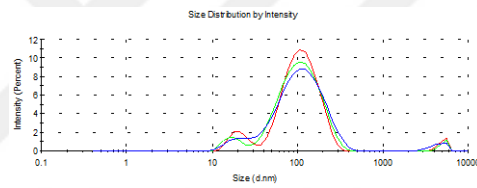
K1-4-6:1



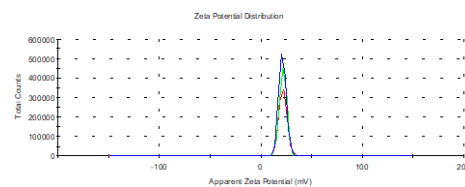
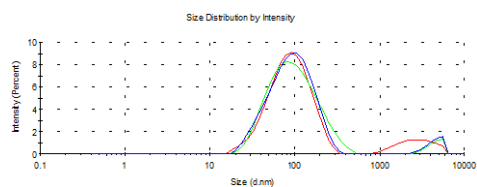
K2-1-3:1



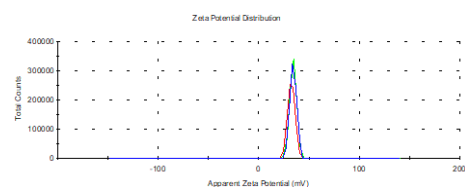
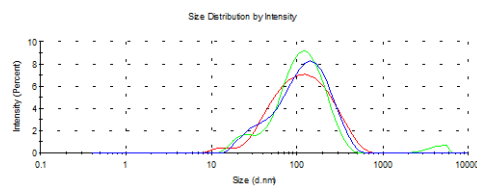
K2-2-4:1



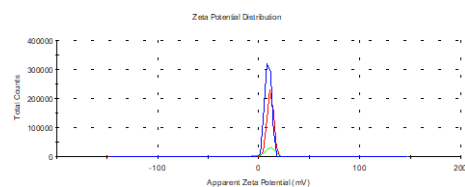
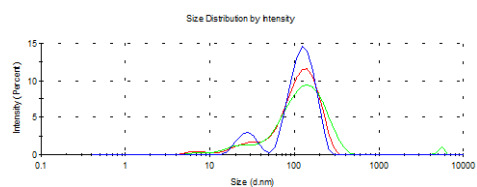
K2-4-3:1



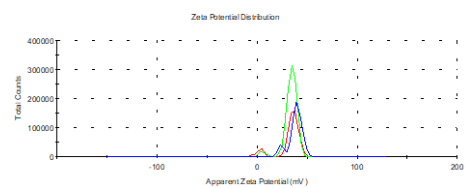
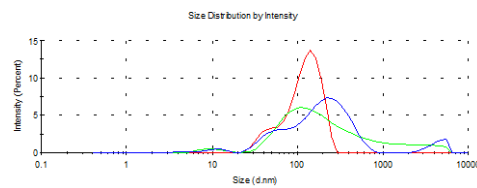
K2-4-4:1



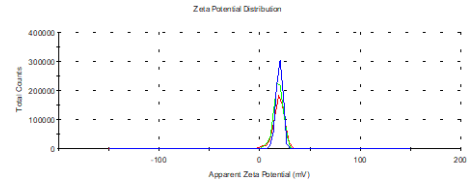
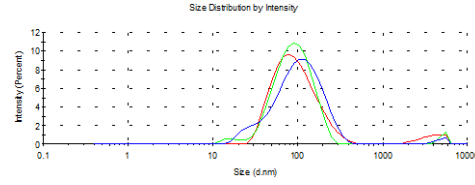
K3-2-6:1



K3-2-7:1



K3-4-3:1



Tablo 31: PEGlenmiş boş kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve dağılımı, zeta potansiyeli sonuçları

Polimer	Formülasyon kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
K1-PEG	K1-1-3:1	777,40±406,20	0,688±0,274	14,0±1,6
K1-PEG	K1-1-4:1	298,20±88,74	0,358±0,060	19,7±0,5
K1-PEG	K1-1-5:1	291,20±42,03	0,477±0,073	20,1±1,3
K1-PEG	K1-1-6:1	104,90±5,65	0,320±0,022	29,5±0,6
K1-PEG	K1-1-7:1	301,30±62,80	0,392±0,025	33,0±1,0
K1-PEG	K1-2-3:1	Sonuç alınamadı		
K1-PEG	K1-2-4:1	3560 ±871,23	1,000	12,3±1,6
K1-PEG	K1-2-5:1	3735,00±912,30	1,000	17,5±2,6
K1-PEG	K1-2-6:1	131,80±8,96	0,311±0,12	29,8±1,0
K1-PEG	K1-2-7:1	106,80±1,97	0,421±0,033	31,2±1,7
K1-PEG	K1-3-3:1	8242,00±502,40	0,605±0,100	8,2±0,5
K1-PEG	K1-3-4:1	Sonuç alınamadı		
K1-PEG	K1-3-5:1	Sonuç alınamadı		
K1-PEG	K1-3-6:1	774,70±46,47	0,500±0,042	23,9±0,7
K1-PEG	K1-3-7:1	116,20±2,33	0,404±0,007	27,6±0,5
K1-PEG	K1-4-3:1	Sonuç alınamadı		
K1-PEG	K1-4-4:1	5741,00±3725,00	0,796±0,353	9,7±0,4
K1-PEG	K1-4-5:1	Sonuç alınamadı		
K1-PEG	K1-4-6:1	2710,00±1575,00	0,941±0,102	18,1±1,1
K1-PEG	K1-4-7:1	147,20±1,40	0,433±0,008	27,7±0,5
K2-PEG	K2-1-3:1	126,40±4,65	0,417±0,008	14,5±0,8
K2-PEG	K2-1-4:1	82,53±6,39	0,421±0,025	21,1±0,9
K2-PEG	K2-1-5:1	102,80±23,95	0,482±0,065	21,3±0,8
K2-PEG	K2-1-6:1	215,70±30,34	0,428±0,081	29,6±0,3
K2-PEG	K2-1-7:1	98,78±1,15	0,629±0,048	23,4±1,7
K2-PEG	K2-2-3:1	307,80±4,83	0,411±0,064	10,6±0,4
K2-PEG	K2-2-4:1	108,50±2,18	0,314±0,009	12,0±0,7

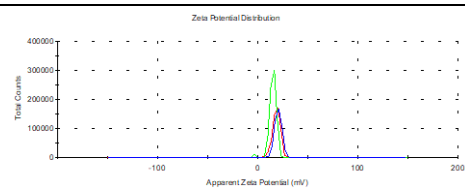
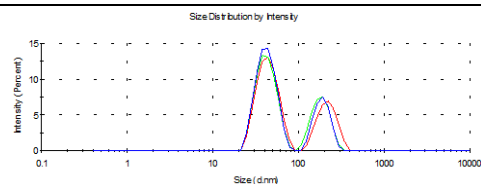
K2-PEG	K2-2-5:1	91,58±14,97	0,310±0,079	15,6±0,9
K2-PEG	K2-2-6:1	139,90±21,85	0,241±0,022	18,1±2,8
K2-PEG	K2-2-7:1	163,90±15,86	0,340±0,041	22,2±0,4
K2-PEG	K2-3-3:1	1092,00±30,81	0,428±0,137	9,1±0,2
K2-PEG	K2-3-4:1	336,70±8,20	0,435±0,021	12,1±0,5
K2-PEG	K2-3-5:1	128,70±1,00	0,212±0,005	11,9±0,2
K2-PEG	K2-3-6:1	78,33±1,40	0,223±0,004	15,9±0,8
K2-PEG	K2-3-7:1	64,33±1,34	0,339±0,003	17,9±0,7
K2-PEG	K2-4-3:1	6221,00±1685,00	0,251±0,108	7,6±0,3
K2-PEG	K2-4-4:1	1992,00±134,10	0,228±0,177	10,7±0,1
K2-PEG	K2-4-5:1	239,60±7,33	0,333±0,056	13,1±0,5
K2-PEG	K2-4-6:1	115,00±1,08	0,164±0,015	14,2±0,3
K2-PEG	K2-4-7:1	67,33±0,65	0,218±0,015	18,0±1,2
K3-PEG	K3-1-3:1	128,00±7,14	0,234±0,025	15,5±0,4
K3-PEG	K3-1-4:1	141,30±31,54	0,226±0,043	18,3±0,8
K3-PEG	K3-1-5:1	247,90±67,07	0,313±0,044	16,2±0,9
K3-PEG	K3-1-6:1	346,40±37,18	0,450±0,031	24,9±1,4
K3-PEG	K3-1-7:1	355,40±63,32	0,447±0,066	29,4±0,6
K3-PEG	K3-2-3:1	959,80±756,10	0,698±0,262	11,3±0,1
K3-PEG	K3-2-4:1	179,40±0,74	0,341±0,056	13,9±1,0
K3-PEG	K3-2-5:1	94,20±19,43	0,266±0,049	20,1±0,7
K3-PEG	K3-2-6:1	175,70±91,84	0,283±0,046	22,3±2,2
K3-PEG	K3-2-7:1	206,90±95,69	0,336±0,047	28,8±0,1
K3-PEG	K3-3-3:1	4400,00±949,80	1	10,8±1,9
K3-PEG	K3-3-4:1	837,20±25,07	0,500±0,019	12,1±0,3
K3-PEG	K3-3-5:1	230,50±4,63	0,341±0,032	16,1±0,361
K3-PEG	K3-3-6:1	87,02±1,61	0,311±0,013	19,8±0,3
K3-PEG	K3-3-7:1	126,70±9,17	0,746±0,133	21,5±2,0
K3-PEG	K3-4-3:1		Sonuç alınamadı	
K3-PEG	K3-4-4:1	4088,00±828,40	0,712±0,254	9,7±0,6
K3-PEG	K3-4-5:1	1226,00±62,01	0,526±0,088	15,2±0,4
K3-PEG	K3-4-6:1	119,10±1,01	0,220±0,013	18,1±0,9
K3-PEG	K3-4-7:1	72,50±0,95	0,400±0,033	23,9±1,1

Partikül boyutu ve PDI indeksi sonuçları değerlendirilerek hazırlanan PEGlenmiş kitozan nanopartiküllerden K1-1-4:1, K1-1-6:1, K1-1-7:1, K1-2-6:1, K2-2-4:1, K2-2-5:1, K2-2-6:1, K2-2-7:1, K2-3-5:1, K2-3-6:1, K2-3-7:1, K2-4-3:1, K2-4-4:1, K2-4-5:1, K2-4-6:1, K2-4-7:1, K3-1-3:1, K3-1-4:1, K3-1-5:1, K3-2-4:1, K3-2-5:1, K3-2-6:1, K3-2-7:1, K3-3-5:1, K3-3-6:1, K3-4-6:1 kodlu formülasyonlar optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir. Bu formülasyonlar tekrar hazırlanıp buzdolabında bekletilerek fiziksel stabiliteleri incelenmiştir.

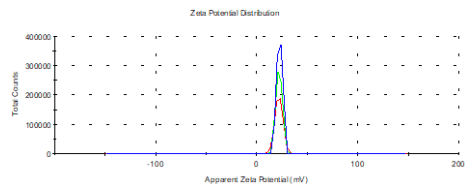
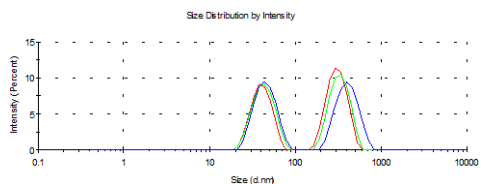
Tablo 32: PEGlenmiş optimum kitozan (K1-PEG, K2-PEG, K3-PEG) nanopartikül formülasyonlarına ait örneklerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli gösteren grafikler

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu	Zeta potansiyeli
K1-1-4:1		
K1-1-6:1		
K1-1-7:1		
K1-2-6:1		
K2-2-4:1		
K2-2-5:1		

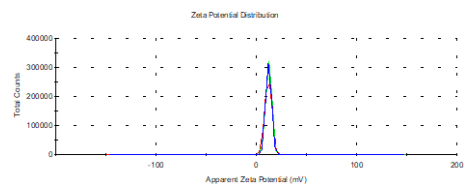
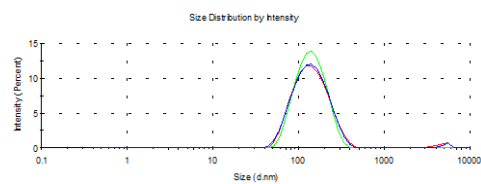
K2-2-6:1



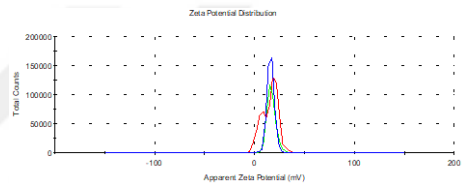
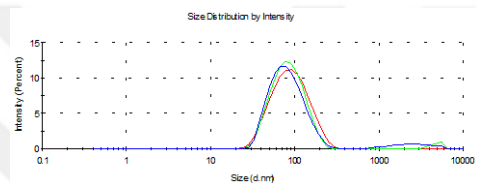
K2-2-7:1



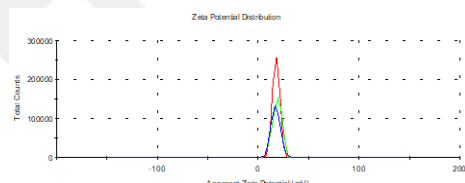
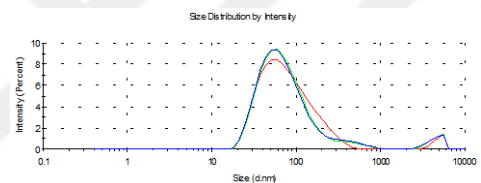
K2-3-5:1



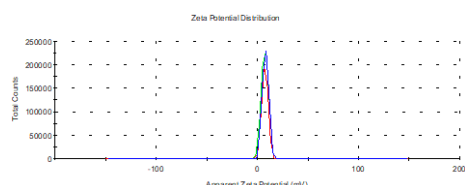
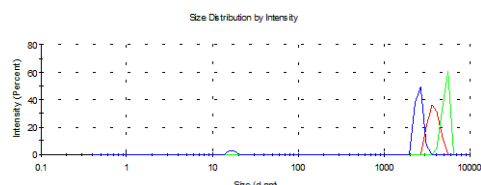
K2-3-6:1



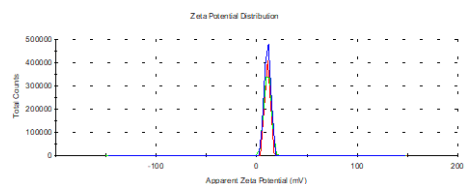
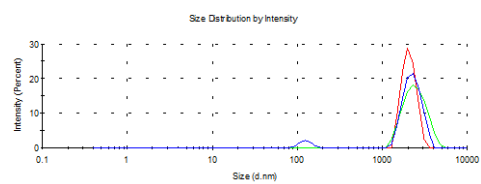
K2-3-7:1



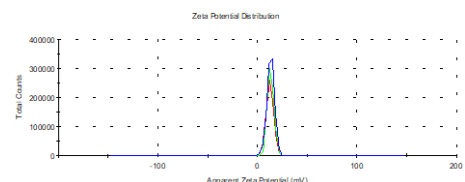
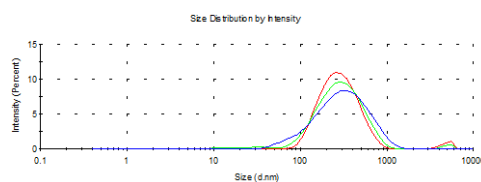
K2-4-3:1



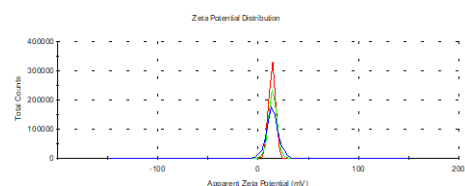
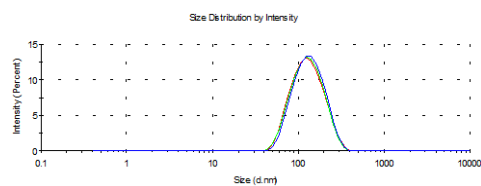
K2-4-4:1



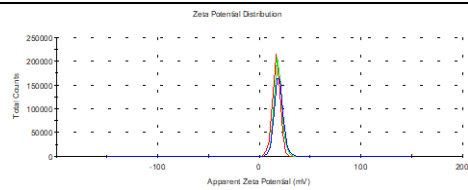
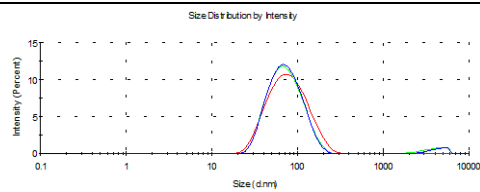
K2-4-5:1



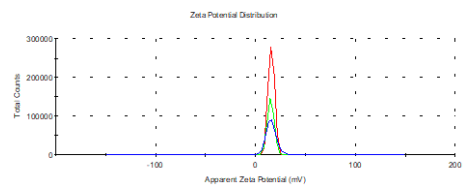
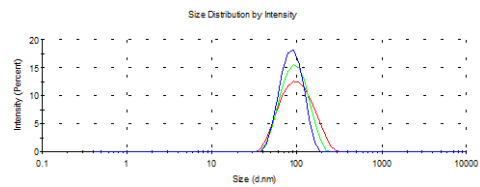
K2-4-6:1



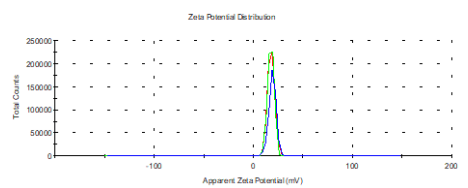
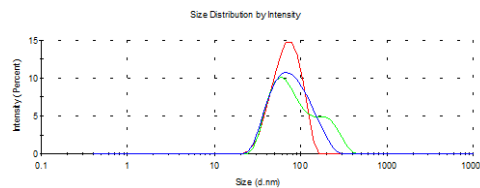
K2-4-7:1



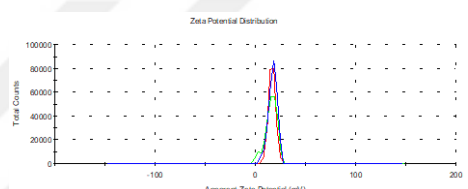
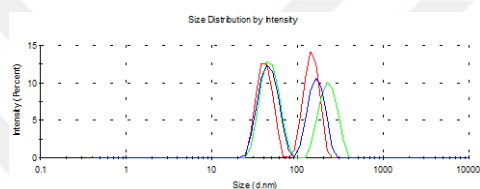
K3-1-3:1



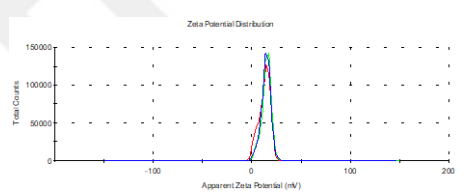
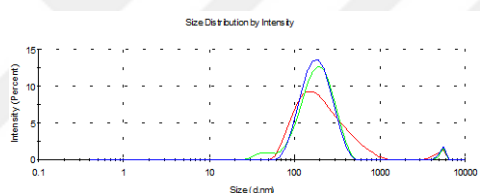
K3-1-4:1



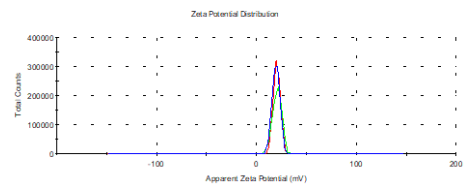
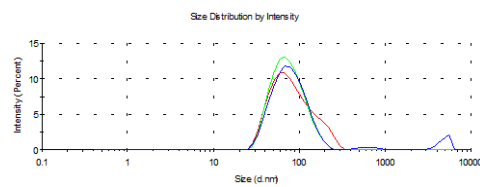
K3-1-5:1



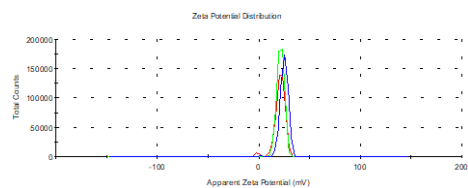
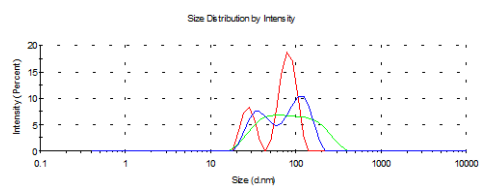
K3-2-4:1



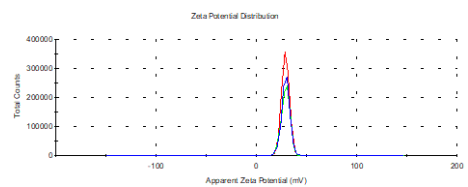
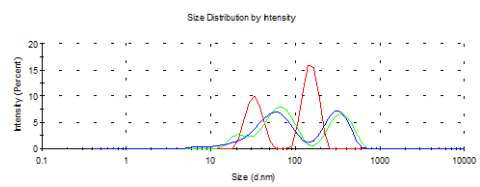
K3-2-5:1



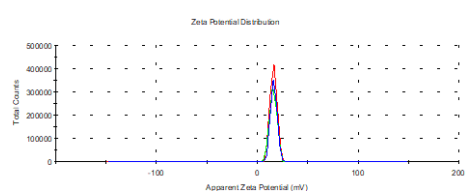
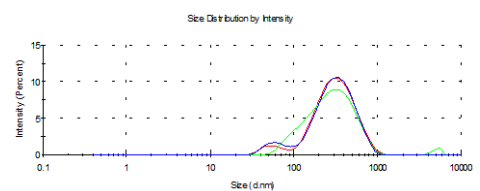
K3-2-6:1

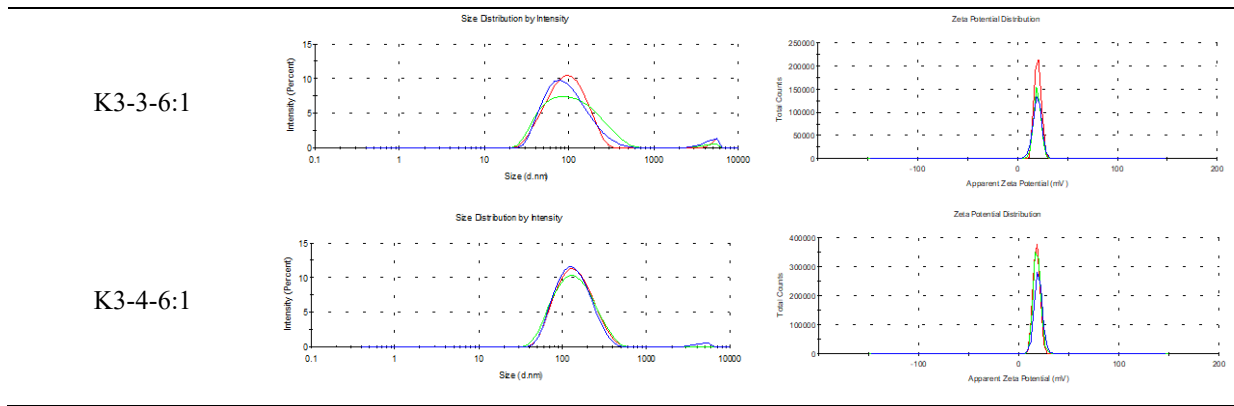


K3-2-7:1



K3-3-5:1





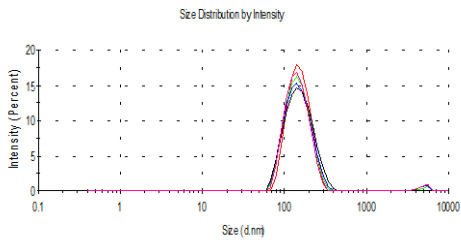
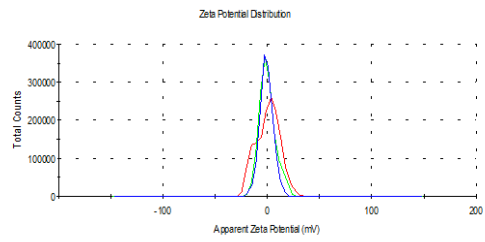
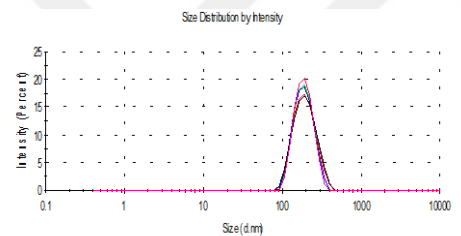
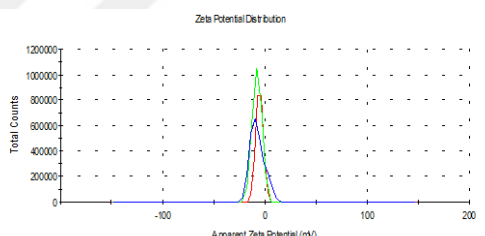
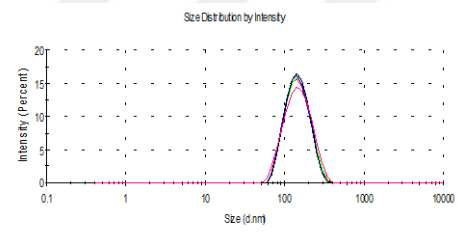
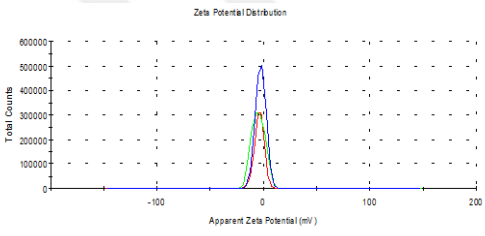
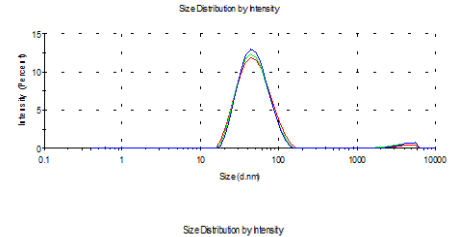
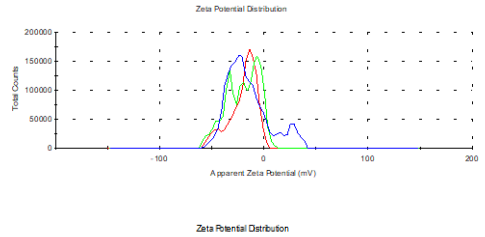
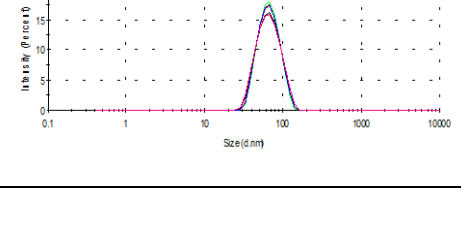
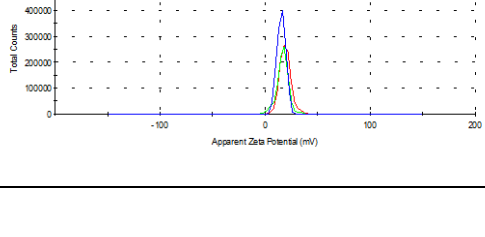
Tablo 33: Boş PBAE nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli sonuçları

Deneme No	Polimer /Miktarı (mg)	Partikül boyutu (nm) $\pm$ SD	PDI $\pm$ SD	Zeta potansiyel (mV)	İletkenlik (μ S)
1	PBAE _{BAEDED} A/125	179,40 $\pm$ 1,82	0,075 $\pm$ 0,015	-0,145 $\pm$ 0,06	1,480 $\pm$ 0,344
2	PBAE _{BAEDED} A/125	142,10 $\pm$ 1,45	0,158 $\pm$ 0,017	- 6,9 $\pm$ 1,20	1,180 $\pm$ 0,213
3	PBAE _{BAEDED} A/125	135,40 $\pm$ 1,09	0,108 $\pm$ 0,013	- 3,7 $\pm$ 1,10	0,878 $\pm$ 0,096
4	PBAE _{BAEDED} A/125	579,90 $\pm$ 19,82	0,423 $\pm$ 0,139	-13,9 $\pm$ 1,00	0,930 $\pm$ 0,022
5	PBAE _{BAEDED} A/125	564,60 $\pm$ 77,79	0,535 $\pm$ 0,072	-3,5 $\pm$ 0,50	0,433 $\pm$ 0,007
6	PBAE _{BAEDED} A/125	756,90 $\pm$ 127,90	0,426 $\pm$ 0,156	-0,6 $\pm$ 0,0	0,339 $\pm$ 0,0273
7	PBAE _{BAEDED} A/21	Nanopartikül elde edilememiştir			
8	PBAE _{BAEDED} A/10	44,67 $\pm$ 0,25	0,209 $\pm$ 0,011	-18,8 $\pm$ 2,4	0,081 $\pm$ 0,006
9	PBAE _{BAEDED} A/6,5	55,46 $\pm$ 0,63	0,420 $\pm$ 0,024	-4,6 $\pm$ 6,4	0,086 $\pm$ 0,011
10	PBAE _{BAEDED} A/10	62,17 $\pm$ 0,41	0,085 $\pm$ 0,012	17,0 $\pm$ 1,8	0,369 $\pm$ 0,073
11	PBAE _{BAEDED} A/10	130,90 $\pm$ 1,21	0,111 $\pm$ 0,018	35,6 $\pm$ 1,8	0,011 $\pm$ 0,000
12	PBAE _{BAEDED} A/10	291,20 $\pm$ 10,37	0,477 $\pm$ 0,070	36,0 $\pm$ 1,9	0,020 $\pm$ 0,000
13	PBAE _{BAEDED} A-2/10	88,07 $\pm$ 1,09	0,159 $\pm$ 0,026	38,0 $\pm$ 1,6	0,015 $\pm$ 0,006
14	PBAE _{BAEDED} A-2/10	324,50 $\pm$ 5,98	0,462 $\pm$ 0,029	26,2 $\pm$ 3,3	0,020 $\pm$ 0,004
15	PBAE _{BAEDAP} /10	106,40 $\pm$ 1,07	0,082 $\pm$ 0,018	9,1 $\pm$ 1,0	0,084 $\pm$ 0,003
16	PBAE _{BAEDAP} /10	63,81 $\pm$ 0,71	0,147 $\pm$ 0,009	33,7 $\pm$ 0,7	0,022 $\pm$ 0,004
17	PBAE _{BAEDAP} /50	373,10 $\pm$ 1,79	0,224 $\pm$ 0,018	58,4 $\pm$ 1,8	0,058 $\pm$ 0,001
18	PBAE _{BAEDAP} /50	101,90 $\pm$ 1,08	0,320 $\pm$ 0,035	39,4 $\pm$ 0,6	0,062 $\pm$ 0,001
19	PBAE _{BAEDAP} /50	364,00 $\pm$ 5,55	0,226 $\pm$ 0,018	58,6 $\pm$ 1,3	0,071 $\pm$ 0,000
20	PBAE _{BAEDAP} /50	108,30 $\pm$ 0,55	0,277 $\pm$ 0,005	53,8 $\pm$ 1,1	0,071 $\pm$ 0,002
21	PBAE _{BAEDAP} /10	110,60 $\pm$ 1,59	0,391 $\pm$ 0,012	47,1 $\pm$ 1,3	0,020 $\pm$ 0,001
22*	PBAE _{BAEDAP} /10	101,90 $\pm$ 0,60	0,141 $\pm$ 0,013	37,4 $\pm$ 0,6	0,031 $\pm$ 0,002
23*	PBAE _{BAEDAP} /10	144,80 $\pm$ 1,08	0,204 $\pm$ 0,016	44,0 $\pm$ 0,3	0,019 $\pm$ 0,002
24	PBAE _{BAEDAP} /50	228,70 $\pm$ 2,08	0,153 $\pm$ 0,010	47,0 $\pm$ 1,3	0,072 $\pm$ 0,001

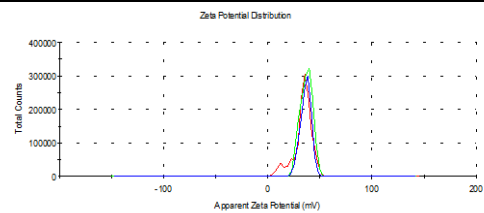
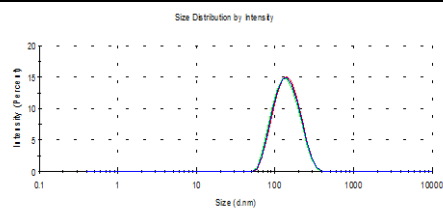
25*	PBAE _{BAEDAP} /50	367,00±3,63	0,252±0,014	49,6±2,3	0,050±0,003
26*	PBAE _{BAEDAP} /50	397,50±4,49	0,443±0,015	51,9±1,5	0,052±0,001
27	PBAE _{BAEDAP} /10	94,34±0,43	0,425±0,021	44,9±3,4	0,016±0,004
28*	PBAE _{BAEDAP} /10	185,00±0,85	0,126±0,015	36,4±0,6	0,020±0,000
29	PBAE _{BAEDAP} /10	76,80±0,77	0,263±0,005	43,9±3,4	0,014±0,001
30*	PBAE _{BAEDAP} /10	110,00±0,44	0,169±0,016	44,2±1,5	0,017±0,01
31	PBAE _{BAEDAP} /10	76,03±0,35	0,148±0,011	48,8±7,4	0,018±0,01
32*	PBAE _{BAEDAP} /10	120,00±0,97	0,150±0,012	45,0±0,8	0,019±0,01
33	PBAE _{HDAAP} /10	164,20±2,21	0,288±0,018	-9,5±0,8	0,032±0,006
34	PBAE _{HDAAP} /10	243,40±3,37	0,260±0,036	3, 5±0,2	0,270±0,019
35	PBAE _{HDAAP} /10	223,90±4,57	0,239±0,023	9,6±0,8	0,026±0,002
36	PBAE _{DEGDAAP} /10	166,90±2,00	0,300±0,019	1,5±0,28	0,024±0,002
37	PBAE _{DEGDAAP} /10	238,90±6,17	0,241±0,049	-0,3±0,06	0,0127
38	PBAE _{DEGDAAP} /10	314,10±7,18	0,237±0,013	0,5±0,20	0,013±0,000
39	PBAE _{PEGDMEDA} /10	238,80±50,65	0,333±0,037	6,6±0,30	0,022±0,006
40	PBAE _{PEGDMEDA} /10	141,60±25,39	0,375±0,115	8,7±1,00	0,015±0,000379
41	PBAE _{PEGDMEDA} /10	247,40±39,73	0,426±0,112	10,00±2,50	9,970±2,540
42	PBAE _{PEGDMEDA-2} /10	245,50±18,99	0,401±0,043	5,5±1,40	0,019±0,003
43	PBAE _{PEGDMEDA-2} /10	183,10±3,97	0,429±0,025	7,7±0,70	0,0136±0,000153
44	PBAE _{PEGDMEDA-2} /10	181,50±78,30	0,348±0,077	5,3±1,70	0,017±0,008
45	PBAE _{PEGEDA} /10	146,80±3,06	0,543±0,032	-16,151±1,51	0,115±0,001
46	PBAE _{PEGEDA} /10	76,15±4,76	0,383±0,024	-23,9±1,80	0,296±0,022
47	PBAE _{PEGAP} /10	237,80±58,42	0,335±0,119	0,3±0,09	0,013±0,000
48	PBAE _{PEGDTA} /10	181,10±225,40	0,452±0,399	1,8±0,11	0,018±0,000
49	PBAE _{PEGMAP} /10				
50	PBAE _{PEGMAP} /10				
51	PBAE _{PEGAP} /10				
52	PBAE _{PEGAP} /10				
53	PBAE _{PEGAP-2} /10	Polimerler, DMSO ve EtOH'da çözünmediği/disperse olmadığı için nanopartikül hazırlanamamıştır			
54	PBAE _{PEGAP-2} /10				
55	PBAE _{PEGAP-3} /10				
56	PBAE _{PEGAP-3} /10				
57	PBAE _{PEGAP-4} /10				
58	PBAE _{PEGAP-4} /10				
59	PBAE _{TEGEDA} /10	474,20±227,30	0,520±0,214	0,4±0,5	0,010±0,008
60	PBAE _{TEMEEDA} /10	188,10±225,40	0,452±0,399	1,8±0,11	0,184±0,000

Partikül boyutu ve PDI sonuçları değerlendirilerek hazırlanan PBAE nanopartiküllerden deneme 1, 2, 3, 8, 10, 11, 13, 15-25, 28-40, 44, 46, 47 nolu formülasyonlar optimum formülasyonlar olarak seçilmiştir. Bu formülasyonlar tekrar hazırlanıp buzdolabında bekletilerek fiziksel stabiliteleri incelenmiştir.

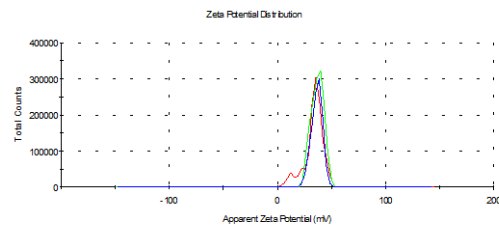
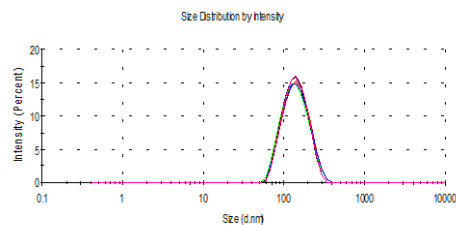
Tablo 34: PBAE polimerlerine ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli grafikleri

Deneme No	Partikül Boyutu	Zeta Potansiyeli
Deneme 1		
Deneme 2		
Deneme 3		
Deneme 8		
Deneme 10		

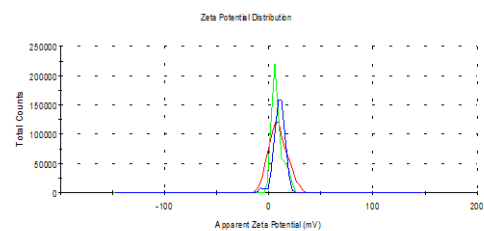
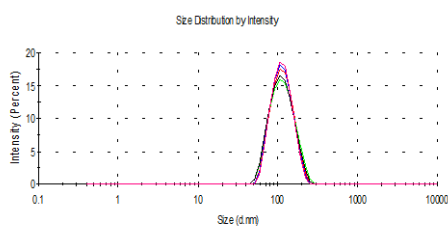
Deneme 11



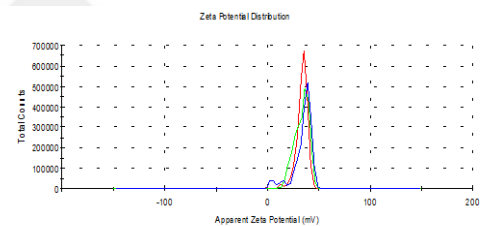
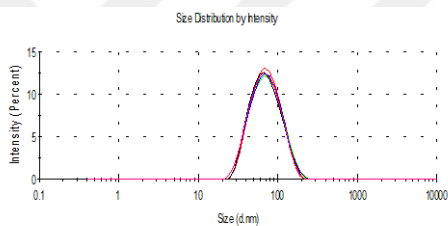
Deneme 13



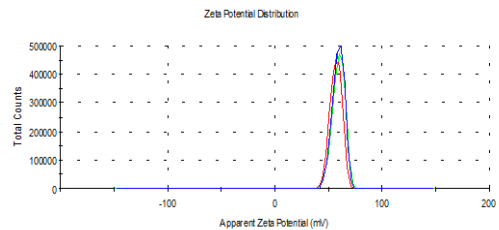
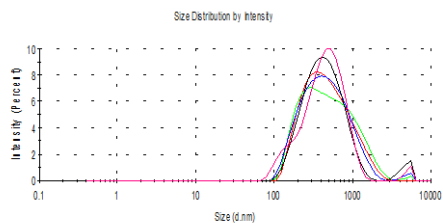
Deneme 15



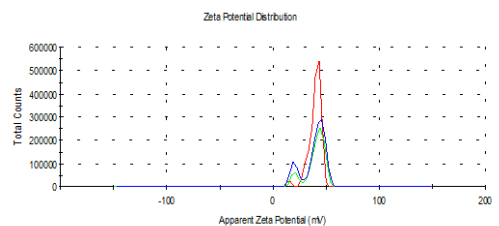
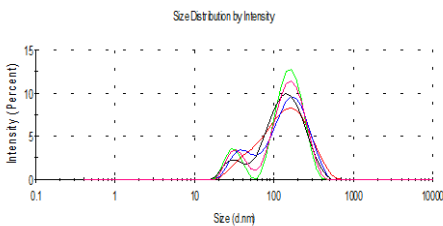
Deneme 16



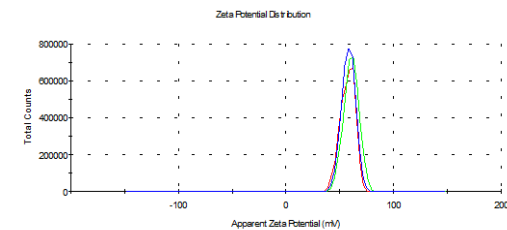
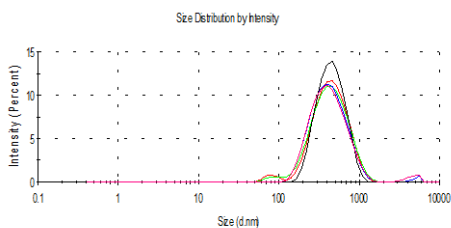
Deneme 17



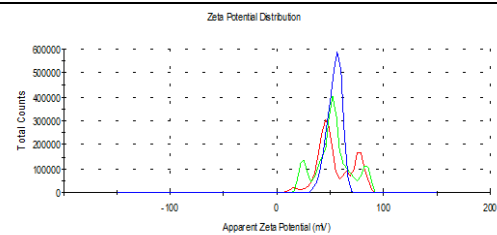
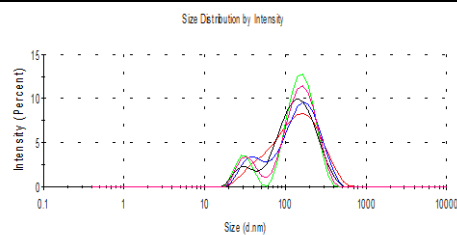
Deneme 18



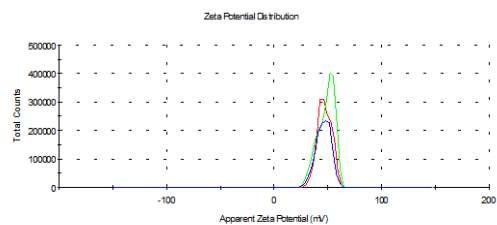
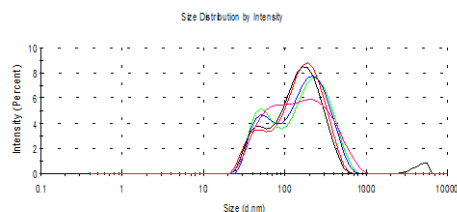
Deneme 19



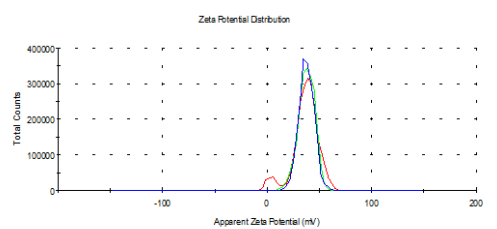
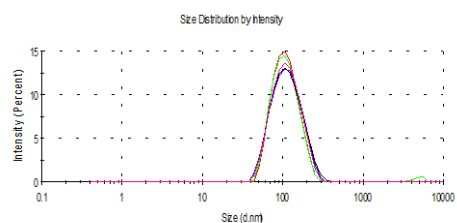
Deneme 20



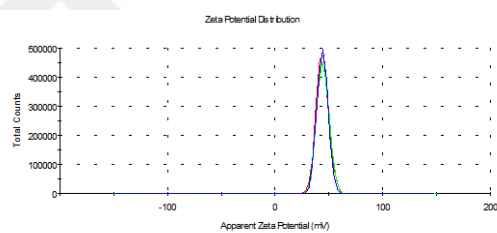
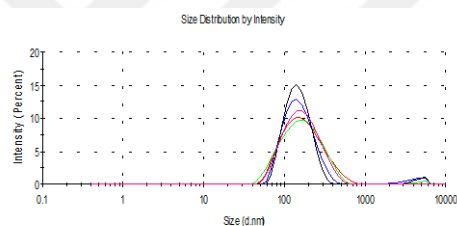
Deneme 21



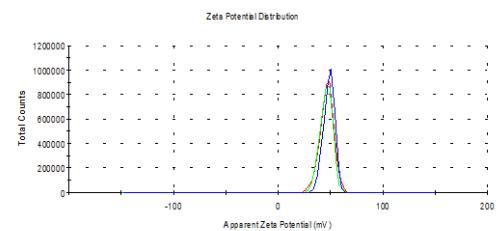
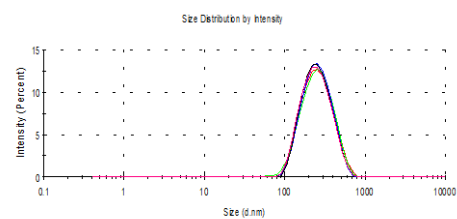
Deneme 22



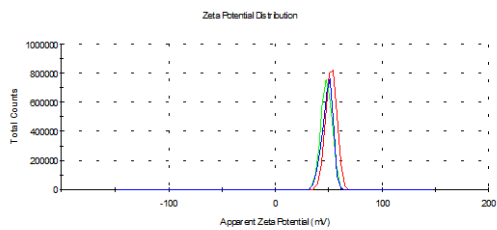
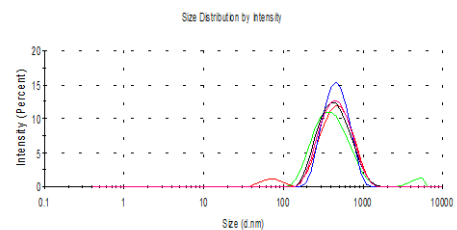
Deneme 23



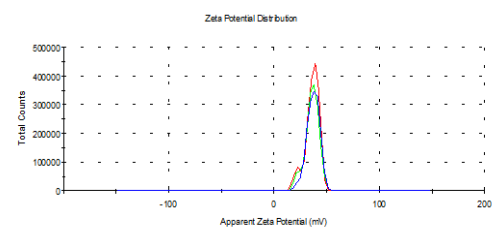
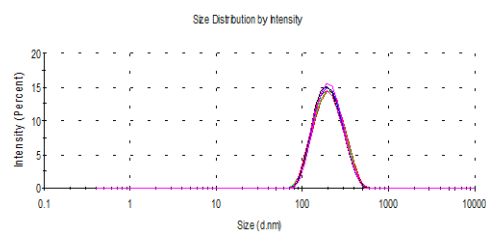
Deneme 24



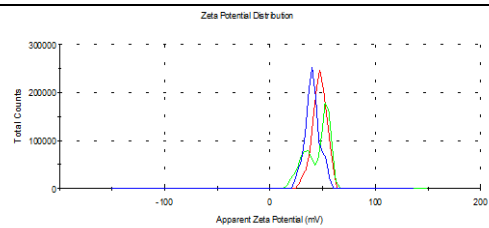
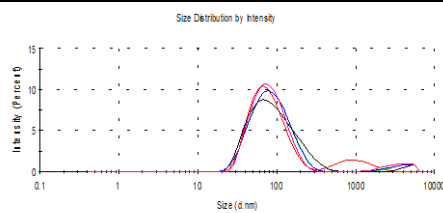
Deneme 25



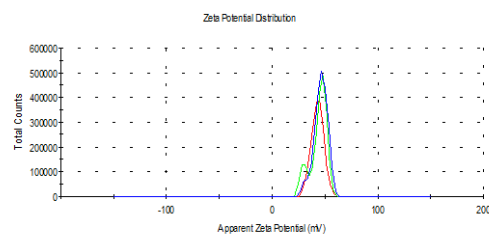
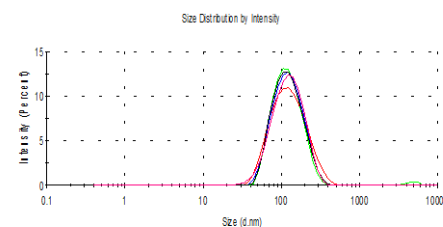
Deneme 28



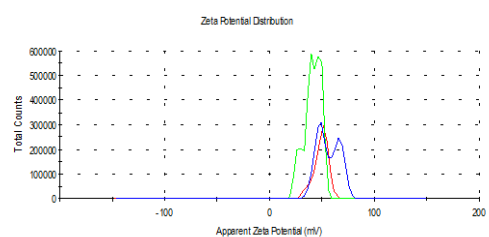
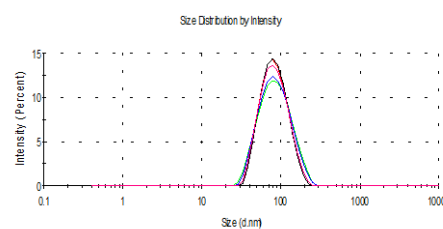
Deneme 29



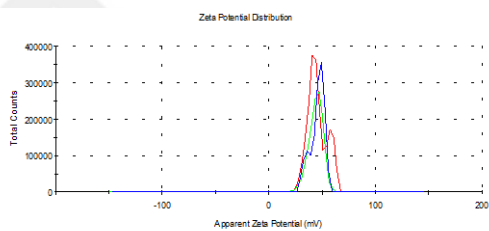
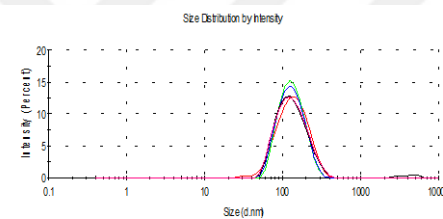
Deneme 30



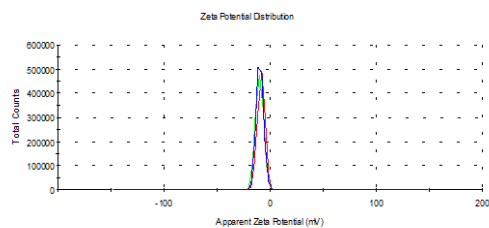
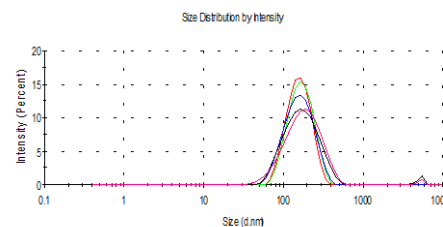
Deneme 31



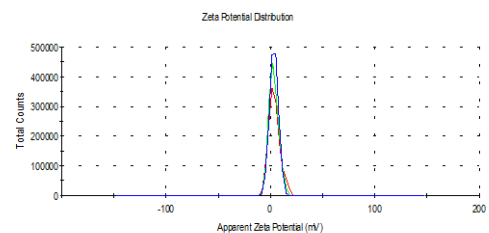
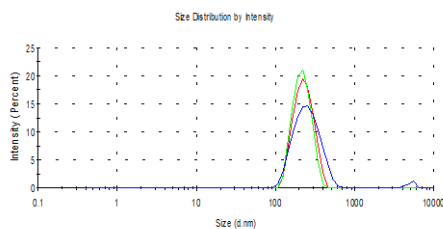
Deneme 32



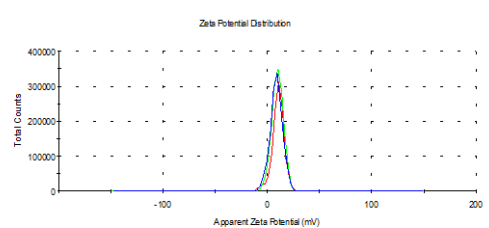
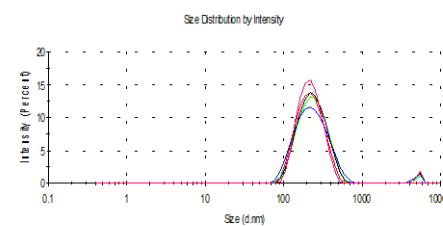
Deneme 33



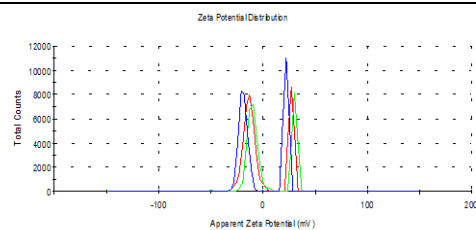
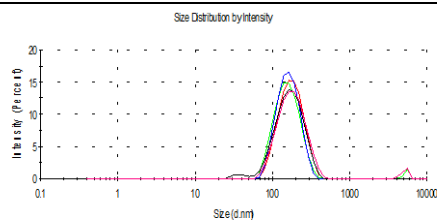
Deneme 34



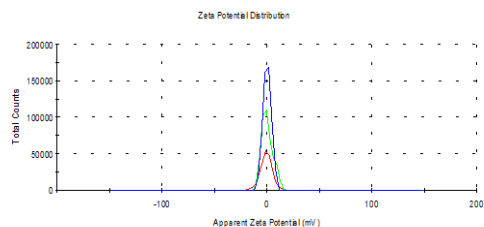
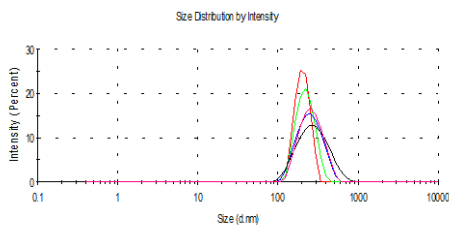
Deneme 35



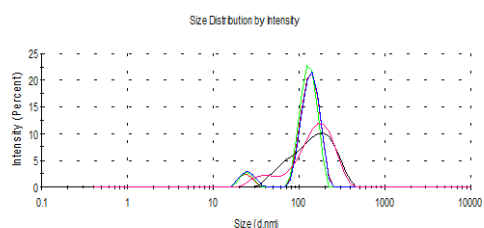
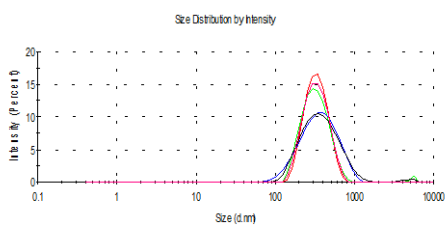
Deneme 36



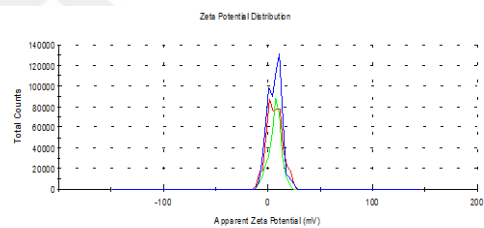
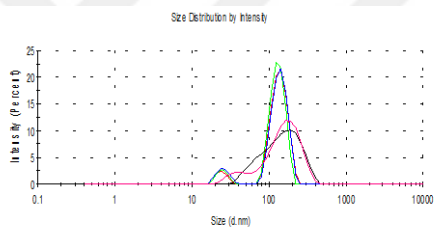
Deneme 37



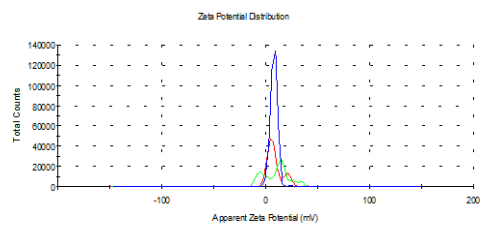
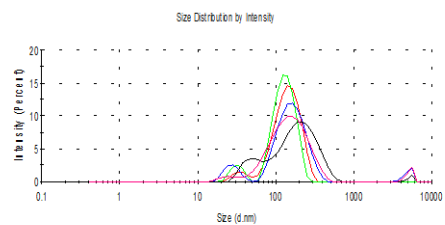
Deneme 38



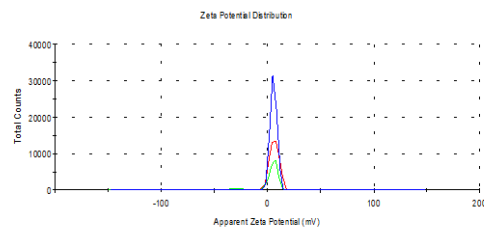
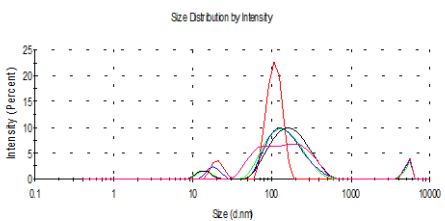
Deneme 39



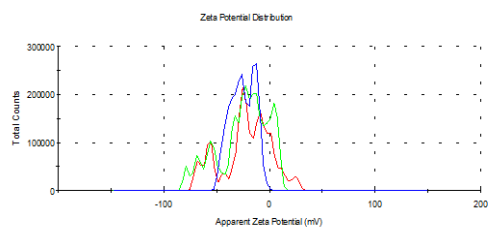
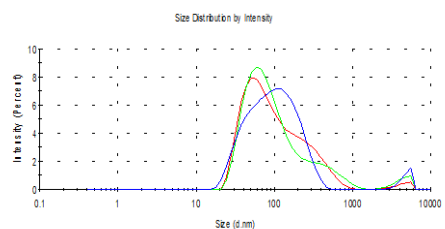
Deneme 40



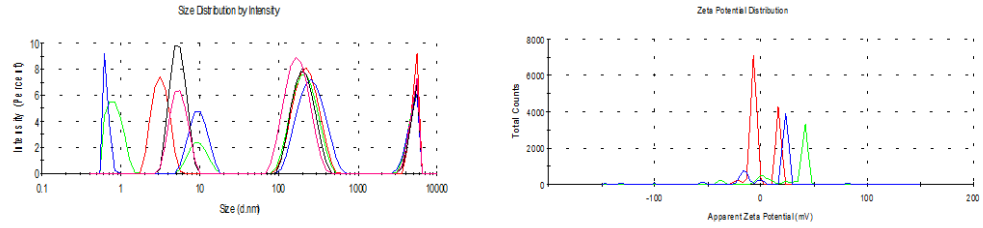
Deneme 44



Deneme 46



Deneme 47



Nanopartiküllerin zeta potansiyeli, elektroforetik ışık saçılımı yöntemi kullanılarak tayin edildi. PEGlenmiş kitosan, NMDA ile modifiye edilmiş PEGlenmiş kitozan nanopartiküllerinin ve siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş PEG kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı sonuçları Tablo 35’de gösterilmiştir. siRNA yüklü kitosan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli grafikleri ise Şekil 76’de gösterilmiştir

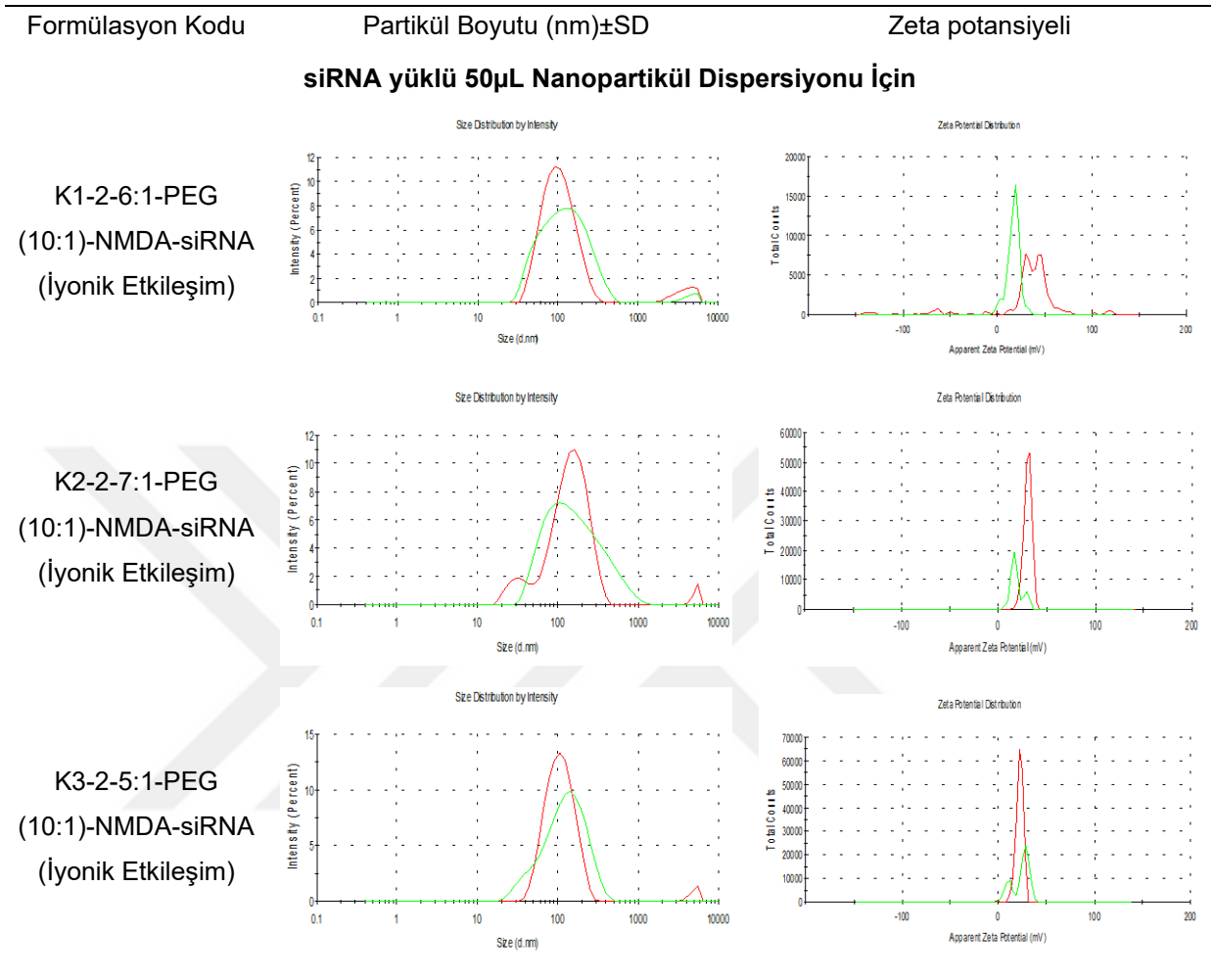
PBAE, NMDA ile modifiye edilmiş PBAE ve siRNA yüklü modifiye PBAE nanopartiküllerinin partikül büyüklük ve büyüklük dağılımı sonuçları Tablo 36’de gösterilmiştir. siRNA yüklü ilgili formülasyonların partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımını ve zeta potansiyelini gösteren grafikler ise Şekil 77’de gösterilmiştir.

Tablo 35: PEGlenmiş, PEGlenmiş, NMDA ile modifiye edilmiş ve siRNA yüklenmiş kitosan nanopartiküllerinin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değeri sonuçları

Polimer	Formülasyon kodu	Partikül Boyutu (nm)±SS	PDI±SS	Zeta potansiyel (mV)
5 mL Nanopartikül Dispersiyonu İçin				
K1	K1-2-6:1-PEG (10:1)	131,8±9,0	0,311±0,010	29,8±1,0
K1	K1-2-6:1-PEG (10:1)-NMDA	146,8±1,1	0,236±0,011	45,3±0,1
K2	K2-2-7:1-PEG (10:1)	163,9±15,9	0,340±0,041	22,2±0,4
K2	K2-2-7:1-PEG (10:1)-NMDA	121,7±0,3	0,352±0,023	32,3±7,1
K3	K3-2-5:1-PEG (10:1)	94,2±19,4	0,266±0,049	20,1±0,7
K3	K3-2-5:1-PEG (10:1)-NMDA	145,3±5,6	0,440±0,006	43,0±3,6
1 mL Nanopartikül Dispersiyonu İçin				
K1	K1-2-6:1-PEG (10:1)	151,9±1,6	0,322±0,033	49,1±0,0

K1	K1-2-6:1-PEG (10:1)- NMDA	148,8±3,2	0,233±0,023	48,0±2,2
K2	K2-2-7:1-PEG (10:1)	145,0±1,1	0,448±0,007	30,1±6,1
K2	K2-2-7:1-PEG (10:1)- NMDA	188,2±1,3	0,489±0,018	44,7±4,7
K3	K3-2-5:1-PEG (10:1)	132,4±2,5	0,484±0,011	41,8±0,4
K3	K3-2-5:1-PEG (10:1)- NMDA	148,4±2,5	0,349±0,045	39,2±0,8
siRNA yüklü 50µL Nanopartikül Dispersiyonu İçin				
K1	K1-2-6:1-PEG (10:1)- NMDA-siRNA (Enkapsülasyon)		Başarısız	
K1	K1-2-6:1-PEG (10:1)- NMDA-siRNA (İyonik Etkileşim)	99,0±5,1	0,319±0,004	14,9±3,04
K2	K2-2-7:1-PEG (10:1)- NMDA-siRNA (Enkapsülasyon)		Başarısız	
K2	K2-2-7:1-PEG (10:1)- NMDA-siRNA (İyonik Etkileşim)	116,3±3,5	0,396±0,014	24,6±8,1
K3	K3-2-5:1-PEG (10:1)- NMDA-siRNA (Enkapsülasyon)		Başarısız	
K3	K3-2-5:1-PEG (10:1)- NMDA-siRNA (İyonik Jelasyon)	93,7±0,8	0,310±0,014	22,9±0,8

Tablo 35 incelendiğinde, farklı hacimlerde hazırlanan (5 mL ve 1 mL) nanopartiküllerin partikül boyutunda hacme bağlı olarak anlamlı bir değişiklik gerçekleşmemiştir. Boş ve siRNA yüklü nanopartikül formülasyonlarının PDI değeri büyük oranda 0.5'den küçük olarak tespit edilmiştir.



Şekil 76: siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş PEG- kitosan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelini gösteren grafikler

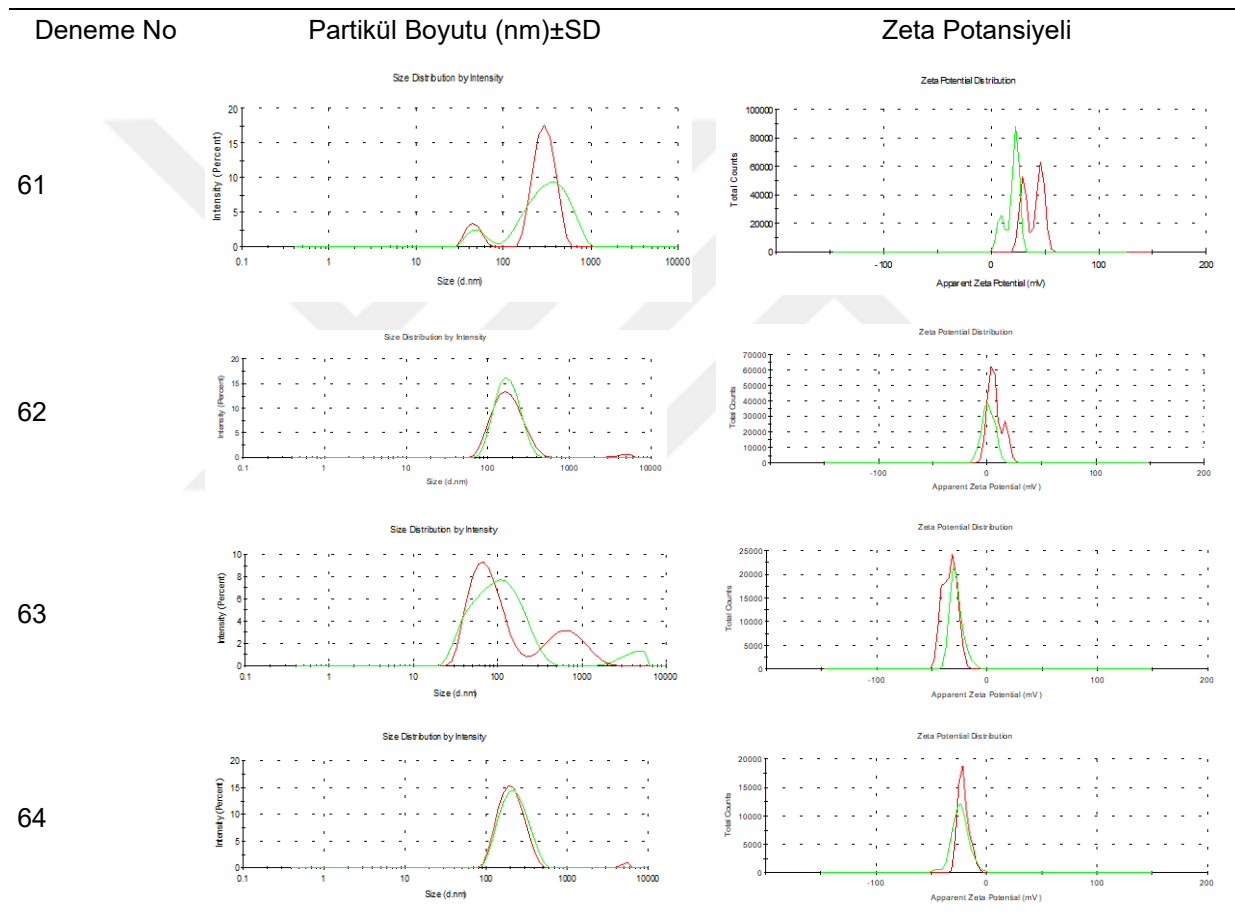
Tablo 36: PBAE nanopartiküllerinin partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve iletkenlik sonuçları

Deneme No	Polimer	Partikül büyüklüğü (nm) ±SD	PDI±SD	Zeta potansiyel (mV)	İletkenlik (µS)
1	D	90,3±0,7	0,327±0,008	29,9±1,0	0,0124±0,0033
2	D	438,6±14,0	0,490±0,007	34,7±1,7	0,0284±0,0001
3	F1	83,7±1,4	0,226±0,009	25,5±2,0	0,0259±0,0056
4	F2	289,4±10,7	0,400±0,029	10,8±0,9	0,0372±0,0005
5	F3	160,9±29,0	0,406±0,144	-0,5±0,2	0,0139±0,0020

6	F3	882,3±858,3	0,919±0,078	-0,6±1,2	0,0158±0,0023
7	ME1	1082.0±630,7	0,826±0,118	-3,1±0,7	0,0346±0,0001
8	ME2	276,0±8,4	0,280±0,121	5,7±1,0	0,0122±0,0001
9	D-NMDA	72,3±3,2	0,587±0,107	39,8±0,8	0,0153±0,0038
10	D-NMDA	216,4±2,5	0,428±0,016	38,6±0,1	0,0349±0,0034
11	F1-NMDA	63,6±0,6	0,223±0,001	36,0±6,6	0,0187±0,0002
12	F1-NMDA	90,2±0,8	0,368±0,008	37,3±1,5	0,0240±0,0006
13	D	63,7±0,9	0,088±0,008	30,9±1,1	0,0122±0,0114
14	D	77,7±0,3	0,096±0,012	35,9±1,7	0,0109±0,0050
15	D	80,5±0,5	0,092±0,015	34,9±1,1	0,0131±0,0108
16	D	81,9±0,6	0,104±0,012	43,4±4,6	0,0119±0,0010
17	D	73,3±0,6	0,112±0,0100	49,7±7,8	0,00696±0,00005
18	D	77,4±0,3	0,08±0,014	38,5±3,5	0,0125±0,0106
19	D	69,9±0,6	0,105±0,021	30,4±0,9	0,0178±0,0000361
20	D	149,0±0,1	0,193±0,016	27,3±2,1	0,00855±0,00094
21	D	171,5±0,9	0,210±0,002	24,5±36	0,0190±0,0088
22	D	147,8±0,4	0,211±0,009	24,9±5,2	0,0154±0,00910
23	D	193,9±1,4	0,160±0,008	29,9±1,4	0,0107±0,0030
24	D	138,9±1,1	0,198±0,007	22,8±4,1	0,0146±0,0060
25	D	201,8±1,2	0,156±0,015	45,3±3,4	0,0166±0,0116
26	D	191,3±2,4	0,164±0,007	28,2±3,1	0,0136±0,0090
27	D	178,2±1,7	0,150±0,024	37,6±5,5	0,0108±0,0047
28	D	286,6±2,0	0,094±0,019	22,5±0,3	0,00794±0,00043
29	F1	127,8±0,5	0,088±0,010	45,7±0,9	0,00639±0,00016
30	F1	121,0±0,6	0,094±0,004	41,4±0,9	0,0121±0,0058
31	F1	127,5±0,9	0,095±0,005	42,5±0,9	0,0108±0,0080

32	F1	143,1±0,8	0,102±0,028	42,8±2,1	0,0115±0,0104
33	F1	128,5±0,6	0,088±0,024	39,5±1,0	0,00562±0,00165
34	F1	124,2±1,3	0,071±0,012	39,8±1,0	0,0110±0,0105
35	F1	146,4±2,0	0,063±0,018	52,6±1,3	0,00711±0,00028
36	F1	139,0±1,0	0,085±0,004	43,4±0,1	0,0104±0,0084
37	F1	141,4±1,8	0,069±0,022	40,8±1,5	0,0163±0,0082
38	F1	143,8±1,9	0,070±0,012	42,9±1,1	0,00732±0,00188
39	F1	147,9±0,6	0,093±0,004	46,2±1,8	0,0133±0,0102
40	F1	149,7±0,4	0,076±0,017	44,4±0,9	0,00602±0,00018
41	F1	195,7±0,8	0,211±0,002	35,1±2,4	0,00886±0,00021
42	F1	200,3±1,8	0,200±0,004	32,4±0,5	0,0104±0,0031
43	F1	198,8±1,2	0,209±0,012	32,6±1,9	0,0145±0,0098
44	F1	176,2±2,0	0,131±0,010	32,0±3,2	0,00889±0,00408
45	F1	180,9±1,6	0,134±0,023	40,8±1,6	0,0173±0,0099
46	F1	169,0±0,8	0,131±0,023	37,6±1,9	0,00691±0,00132
47	F1	159,1±1,1	0,106±0,012	28,9±3,6	0,00908±0,00417
48	F1	173,7±1,6	0,078±0,019	34,1±2,0	0,00646±0,000684
49	F1	195,6±1,4	0,186±0,010	40,5±1,4	0,00653±0,00379
50	F1	185,1±1,2	0,128±0,026	32,3±1,1	0,00849±0,00365
51	F1	189,1±0,1	0,124±0,032	39,7±1,9	0,00980±0,00728
52	F1	193,6±3,6	0,117±0,026	34,0±0,5	0,0123±0,0097
53	D-NMDA	59,1±0,5	0,125±0,032	27,8±10,1	0,00982±0,00408
54	D-NMDA	70,1±1,02	0,086±0,013	33,6±15,1	0,02128±0,0114
55	D-NMDA	107,9±3,1	0,260±0,011	15,6±0,6	0,00975±0,00318
56	D-NMDA	804,9±536,1	0,821±0,253	25,8±2,7	0,817±0,006
57	F1-NMDA	90,2±0,6	0,080±0,042	46,3±1,2	0,0151±0,0144
58	F1-NMDA	104,8±1,7	0,090±0,021	38,7±3,5	0,00985±0,00672
59	F1-NMDA	82,3±0,5	0,114±0,008	41,2±0,6	0,00526±0,00115
60	F1-NMDA	102,3±0,2	0,204±0,004	51,5±3,2	0,0155±0,0145
61	D-NMDA-siRNA (Enkapsülasyon)	279,1±16,1	0,452±0,085	29,1±13,8	0,0312±0,00693
62	D-NMDA-siRNA (İyonik Etkileşim)	166,9±2,3	0,172±0,003	4,2±4,4	0,0252±0,00495
63	F1-NMDA-siRNA (Enkapsülasyon)	202,5±2,1	0,144±0,054	-22,2±1,9	0,0207±0,000212
64	F1-NMDA-siRNA (İyonik Etkileşim)	89,65±1,2	0,379±0,013	-30,8±4,2	0,0152±0,000141

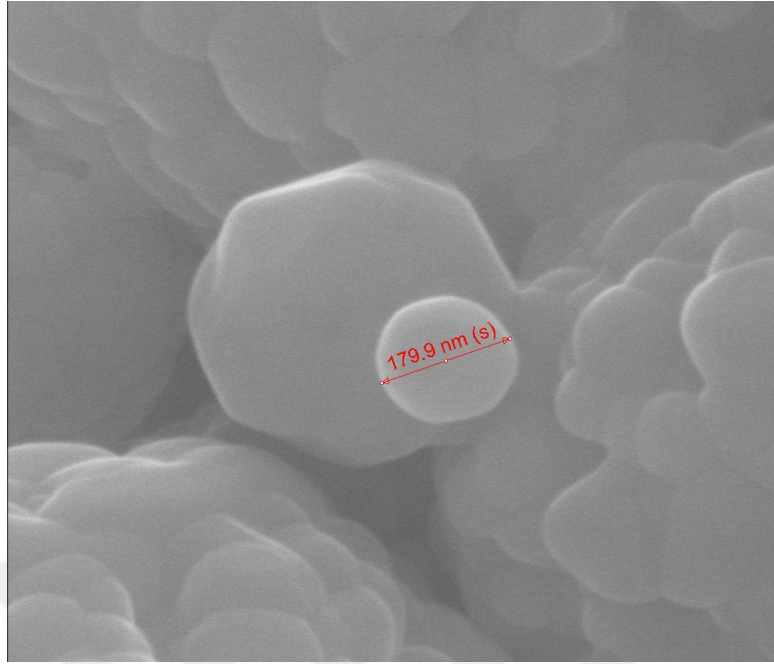
Tablo 36 incelendiğinde, siRNA yüklü nanopartiküllerin partikül büyüklüğü sonuçlarına göre D polimeri ile hazırlanıp iyonik etkileşim ile siRNA yüklenen formülasyonun partikül boyutu 166.9 nm olarak tespit edilmiş olup, PDI değeri de 0.172'dir. F1 polimeri kullanıldığında ise, enkapsülasyon yöntemi ile siRNA yükleme işlemi sonucunda daha düşük partikül boyutu ($202,5 \pm 2,1$) ve PDI değeri ($0,144 \pm 0,054$) elde edilmiştir. D polimeri ile hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel değerleri (+) yüklü olup, 62 nolu deneme hariç diğerleri 15 mV'dan fazladır.



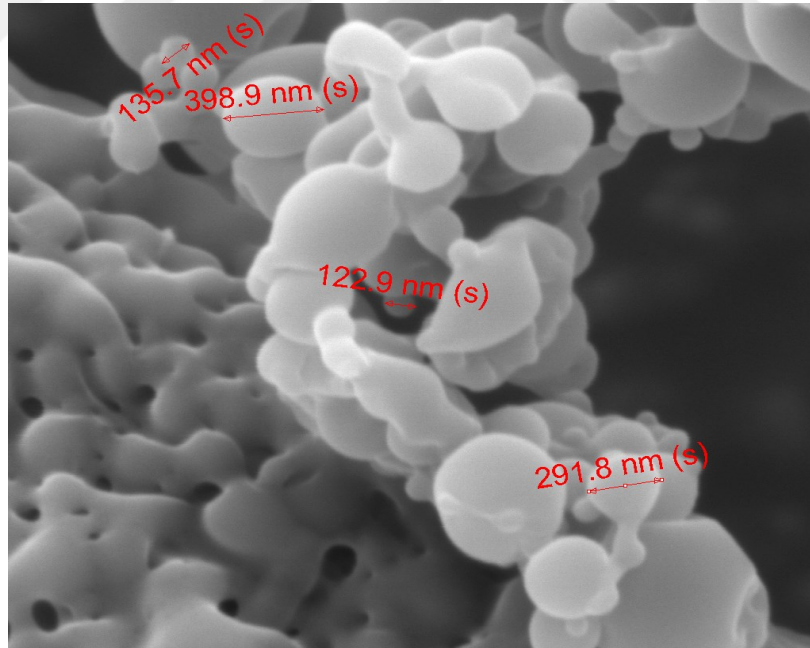
Şekil 77: siRNA yüklü PBAE nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli grafikleri

4.3.2.1. Boş ve siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesine Ait Bulgular

Nanopartiküllerin (D1 ve K2) yüzey özellikleri, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelendi. Şekil 78 ve Şekil 79 sırası ile D1 ve K2 polimerlerinden elde edilen nanopartikül formülasyonlarına ait SEM görüntüleridir.



Şekil 78: D1 nanopartikül ürününe ait SEM görüntüsü

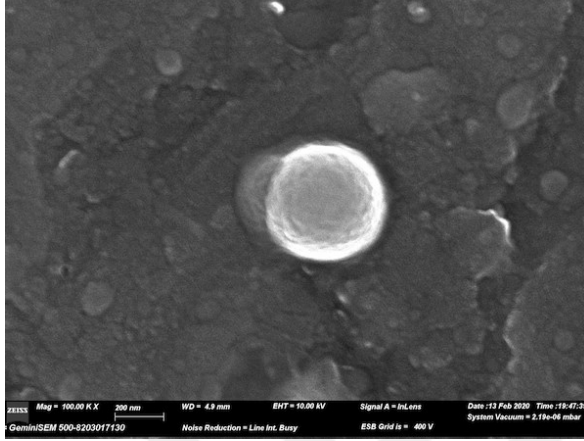


Şekil 79: K2 ürününe ait SEM görüntüsü

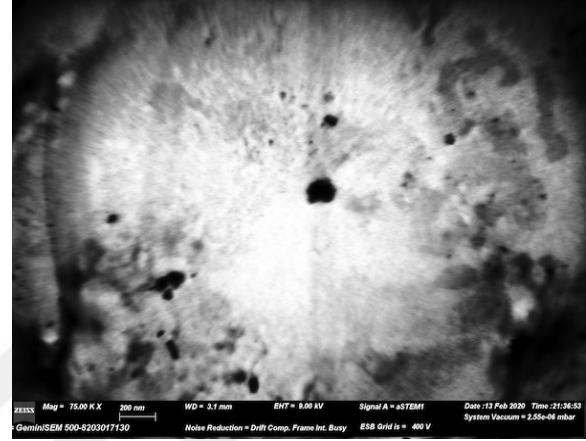
SEM ölçümü yapılan D1 ve K2 nanopartikül formülasyonları polimerik yapılar olduğu için ölçümler esnasında sorunla karşılaşıldı. Mikroskobun merceği daha net görüntüler alınabilmesi için ürünlere yaklaştıkça agromelasyon meydana

geldi. Bu yüzden elde edilen görüntülerin boyutu, sunulan boyutlardan daha büyük çıktı. Daha iyi görüntüler yakalayabilmek için yaptığımız optimazsyon çalışmalarımızda elde ettiğimiz görüntüler Şekil 80’de gösterilmiştir.

D1-NMDA

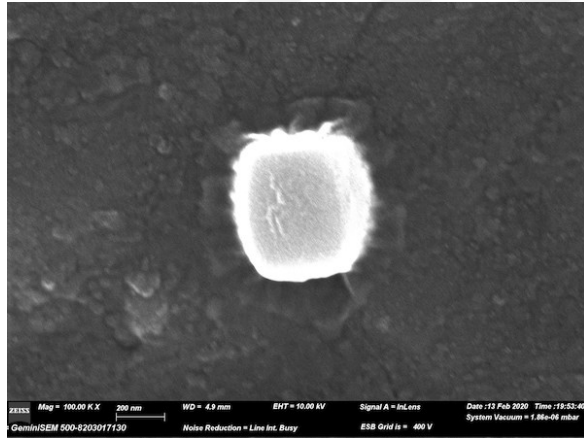


SEM

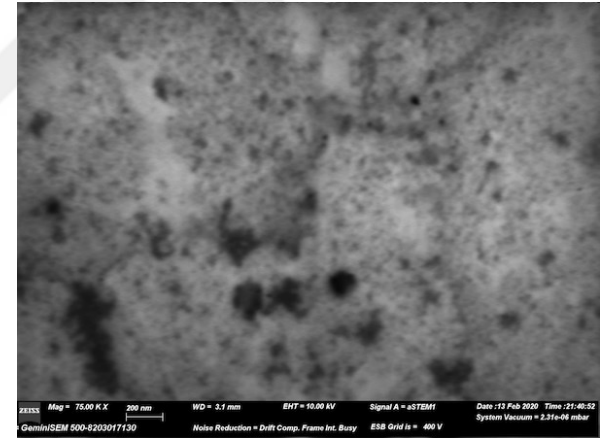


TEM

F1-NMDA

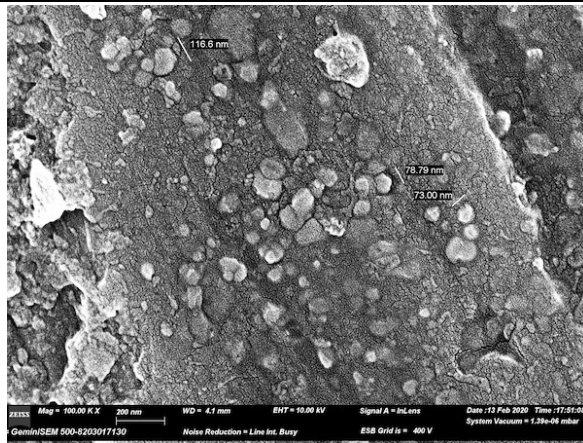


SEM

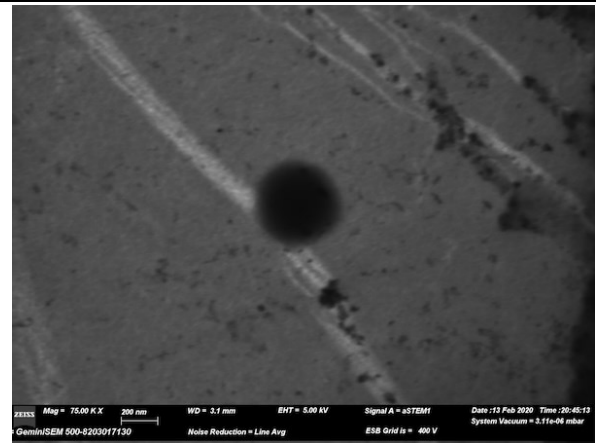


TEM

K1-NMDA

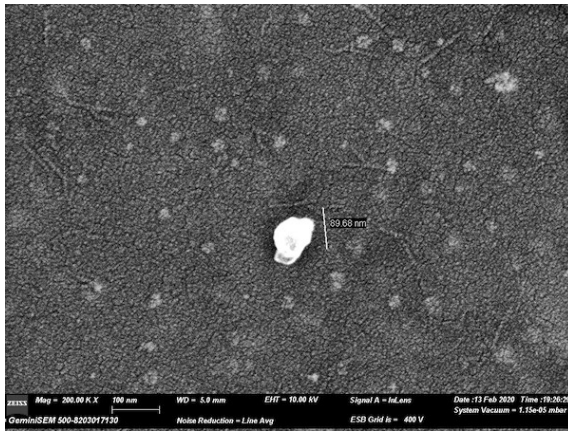


SEM

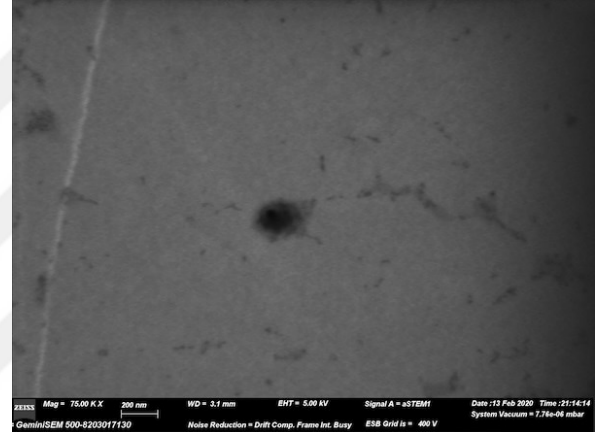


TEM

K2-NMDA

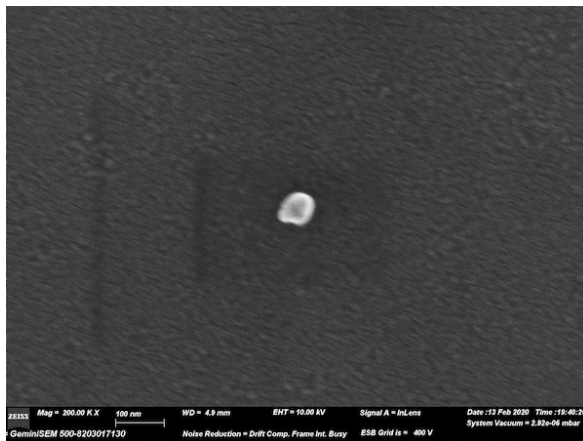


SEM

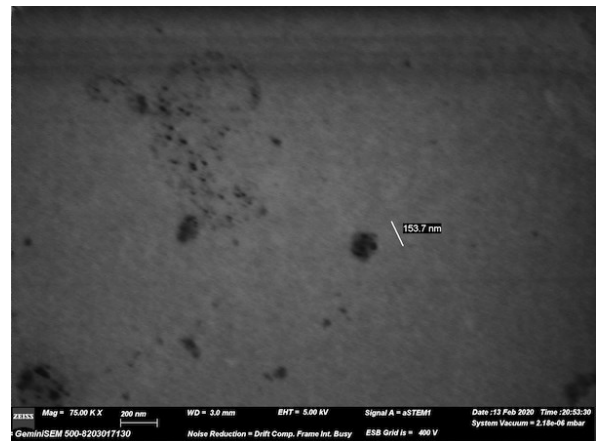


TEM

K3-NMDA



SEM



TEM

Şekil 80: D1-NMDA, F1-NMDA, K1-NMDA, K2-NMDA, K3-NMDA polimerlerinden elde edilen nanopartiküllerine ait SEM ve TEM görüntüleri

4.3.3. Boş ve siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmaları sonrası ideal olduğu belirlenen formülasyonların fiziksel ve kimyasal stabiliteleri $4\pm 2^\circ\text{C}$ (buzdolabında), $25\pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60\pm 5$ bağıl nem ile $40\pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%75\pm 5$ bağıl nem şartlarında stabilité kabininde 1 ay boyunca incelendi (Tablo 37).

Tablo 37: Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının bir aylık fiziksel stabilité sonuçları

Süre	Sıcaklık	Örnek	$4\pm 1^\circ\text{C}$			$25\pm 1^\circ\text{C}$			$40\pm 1^\circ\text{C}$		
			Partikül Büyükülüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli	Partikül Büyükülüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli	Partikül Büyükülüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli
1. Hafta	K1		156,3	0,280	47,3	173,6	0,411	36,3	129,1	0,273	41,5
			$\pm 0,6$	$\pm 0,008$	$\pm 0,7$	$\pm 3,6$	$\pm 0,008$	$\pm 0,2$	$\pm 5,3$	$\pm 0,036$	$\pm 1,4$
	K2		90,2	0,274	17,9	95,07	0,483	40,0	92,14	0,312	25,2
			$\pm 0,6$	$\pm 0,004$	$\pm 9,4$	$\pm 2,0$	$\pm 2,044$	$\pm 2,4$	$\pm 0,8$	$\pm 0,005$	$\pm 5,8$
	K3		84,1	0,442	32,9	105,3	0,461	33,3	114,5	0,380	31,1
			$\pm 0,4$	$\pm 0,025$	$\pm 4,3$	$\pm 1,8$	$\pm 0,013$	$\pm 8,9$	$\pm 27,0$	$\pm 0,173$	$\pm 11,1$
	D		90,2	0,327	29,9						
			$\pm 0,6$	$\pm 0,008$	$\pm 1,0$						
	F1		83,7	0,226	25,5		Destabil			Destabil	
			$\pm 1,3$	$\pm 0,009$	$\pm 2,0$						
2. Hafta	K1		149,5	0,287	47,2	136,0	0,304	40,5	130,1	0,276	38,3
			$\pm 1,8$	$\pm 0,012$	$\pm 1,9$	$\pm 2,6$	$\pm 0,017$	$\pm 0,7$	$\pm 4,0$	$\pm 0,014$	$\pm 0,7$
	K2		100,4	0,367	35,5	116,2	0,518	36,5	78,84	0,407	14,4
			$\pm 3,1$	$\pm 0,022$	$\pm 6,3$	$\pm 0,4$	$\pm 0,006$	$\pm 4,6$	$\pm 2,1$	$\pm 0,013$	$\pm 1,6$
	K3		84,8	0,432	28,0	122,2	0,507	27,1	127,8	0,522	22,6
			$\pm 0,4$	$\pm 0,009$	$\pm 4,1$	$\pm 1,1$	$\pm 0,002$	$\pm 0,1$	$\pm 2,7$	$\pm 0,021$	$\pm 2,8$
	D		58,9	0,151	22,7						
			$\pm 0,2$	$\pm 0,010$	$\pm 3,9$						
	F1		99,2	0,209	24,2		Destabil			Destabil	
			$\pm 0,7$	$\pm 0,009$	$\pm 0,7$						
3. Hafta	K1		153,5	0,323	44,7	139,6	0,350	35,3	123,3	0,264	42,1
			$\pm 2,6$	$\pm 0,050$	$\pm 2,0$	$\pm 2,1$	$\pm 0,019$	$\pm 0,2$	$\pm 2,4$	$\pm 0,017$	$\pm 1,8$
	K2		103,4	0,346	32,0	91,5	0,447	37,2	76,0	0,327	8,23
			$\pm 0,0$	$\pm 0,00$	$\pm 1,9$	$\pm 2,0$	$\pm 0,027$	$\pm 6,9$	$\pm 0,6$	$\pm 0,013$	$\pm 1,2$
	K3		86,2	0,410	26,5	82,4	0,424	27,3	78,5	0,410	15,6
			$\pm 3,3$	$\pm 0,002$	$\pm 3,9$	$\pm 0,3$	$\pm 0,021$	$\pm 6,6$	$\pm 1,6$	$\pm 0,006$	$\pm 8,2$
	D		90,5	0,361	15,3						
			$\pm 1,1$	$\pm 0,005$	$\pm 0,5$						
	F1		2030,0	0,985	1,86		Destabil			Destabil	
			$\pm 359,9$	$\pm 0,027$	$\pm 0,3$						
4. Hafta	K1		135,1	0,371	34,5	153,9	0,421	39,8	140,8	0,334	39,9
			$\pm 1,3$	$\pm 0,001$	$\pm 0,4$	$\pm 0,2$	$\pm 0,013$	$\pm 1,8$	$\pm 1,3$	$\pm 0,023$	$\pm 2,4$

K2	151,4 ±1,1	0,280 ±0,008	44,3 ±2,1	101,9 ±10,9	0,394 ±0,124	32,7 ±8,3	76,3 ±1,4	0,350 ±0,046	14,4 ±6,4
K3	112,4 ±0,9	0,558 ±0,011	33,0 ±7,8	91,3 ±4,5	0,343 ±0,059	20,0 ±2,1	76,8 ±0,8	0,407 ±0,011	12,3 ±2,9
D	63,1 ±0,4	0,195 ±0,011	29,8 ±3,9		Destabil			Destabil	
F1		Destabil							

4.3.3.1. Liyofilizasyon Çalışması için Formülasyonlara İlave Edilmesi Gereken Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu ve Stabilite Çalışmaları

Nanopartikül formülasyonları dispersiyon halinde $4\pm2^{\circ}\text{C}$ (buzdolabında), $25\pm2^{\circ}\text{C}$ ve $\%60\pm5$ bağıl nem ile $40\pm2^{\circ}\text{C}$ ve $\%75\pm5$ bağıl nem şartlarında stabilite kabininde fiziksel ve kimyasal stabiliteleri incelenmiş olup yapılan değerlendirmeler neticesinde formülasyonların liyofilize edilmesine karar verilmiştir.

Deneme 1: Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu

Tablo 38, Tablo 39, Tablo 40, Tablo 41, Tablo 42’de yeniden disperse edilen nanopartikül formülasyonlarının ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 38: Farklı konsantrasyonlarda trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

F1-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	140,1±0,5	0,239±0,052	24,0±10,8
5	144,6±18,5	0,233±0,001	23,7±8,3
15	130,5±1,4	0,296±0,035	11,9±3,2
30	143,5±3,4	0,338±0,006	28,1±0,1
60	148,3±1,4	0,266±0,031	27,1±1,1
120	148,8±5,0	0,248±0,029	26,9±1,8
180	150,4±1,1	0,241±0,019	25,5±2,2
240	144,0±2,1	0,179±0,004	30,0±2,4
F1-NMDA-%10			
0	134,4±3,3	0,269±0,030	28,4±7,4
5	132,3±0,9	0,259±0,036	29,0±2,9
15	145,3±0,2	0,280±0,008	29,5±2,7
30	137,4±5,7	0,290±0,006	15,6±6,5

60	144,5±7,1	0,287±0,049	13,4±0,6
120	143,6±0,1	0,315±0,064	26,3±2,5
180	138,9±4,1	0,271±0,037	26,1±3,7
240	143,6±2,1	0,262±0,002	34,9±8,6
F1-NMDA-%25			
0	196,4±30,1	0,262±0,005	9,4±10,9
5	159,4±0,4	0,276±0,074	5,2±5,8
15	194,4±12,8	0,303±0,269	-9,5±0,7
30	117,8±4,6	0,319±0,023	-8,3±3,8
60	140,9±0,3	0,337±0,071	-6,8±1,5
120	175,6±17,6	0,262±0,024	-3,2±1,2
180	251,9±0,6	0,308±0,015	-2,0±0,1
240	342,0±47,1	0,327±0,014	-0,1±0,9
F1-NMDA-%50			
0	181,6±28,5	0,301±0,069	-0,1±0,1
5	200,9±3,2	0,178±0,103	5,7±1,1
15	229,1±23,1	0,278±0,057	10,9±3,7
30	242,9±7,8	0,310±0,012	11,7±0,0
60	226,1±1,7	0,202±0,007	7,5±0,1
120	228,1±1,5	0,231±0,041	13,5±0,1
180	188,9±1,5	0,282±0,026	8,4±1,0
240	174,2±1,7	0,230±0,032	9,5±3,9
F1-NMDA-%100			
0	610,5±103,0	0,556±0,028	-14,9±0,5
5	673,5±163,3	0,664±0,181	-3,26±1,2
15	399,8±33,2	0,461±0,037	0,4±0,0
30	321,4±18,5	0,396±0,013	5,4±0,1
60	344,6±26,0	0,366±0,008	7,1±2,1
120	214,2±8,0	0,264±0,006	18,7±0,1
180	197,2±0,4	0,273±0,018	10,7±0,5
240	193,4±12,8	0,249±0,017	17,0±3,9

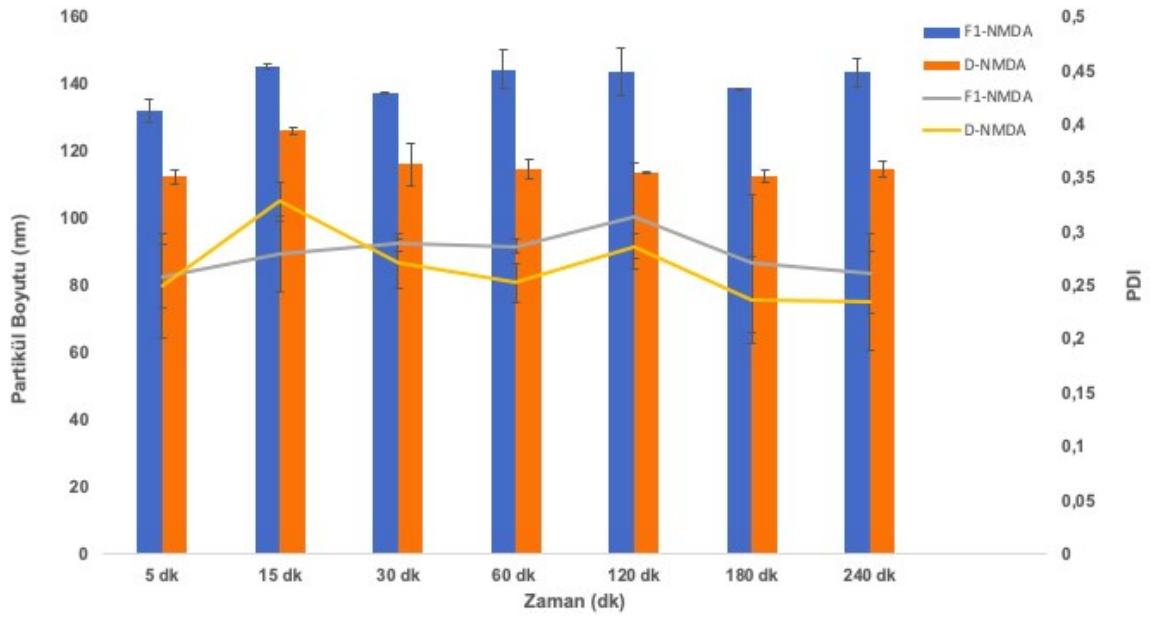
F1-NMDA formülasyonu için ideal kriyoprotektan oranı %10 olarak bulunmuştur. Şekil 81 'de %10 D-(+)-Trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun partikül boyutu ve poli dispersite indeksinin zaman içindeki değişimi gösterilmiştir.

Tablo 39: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

D-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	124,1±3,1	0,272±0,023	34,7±3,8
5	133,8±0,2	0,299±0,018	33,3±7,6
15	425,9±391,4	0,449±0,273	42,0±3,2
30	136,8±1,2	0,261±0,001	45,1±1,7
60	142,4±0,6	0,336±0,011	48,0±0,5
120	145,2±5,1	0,301±0,034	42,5±3,0
180	142,9±1,1	0,342±0,035	42,3±1,2
240	146,1±2,5	0,320±0,035	28,8±1,4
D-NMDA-%10			
0	120,1±2,7	0,262±0,008	35,8±2,2
5	123,0±2,1	0,255±0,030	42,3±5,5
15	128,4±0,9	0,247±0,028	37,5±5,8
30	125,4±0,7	0,250±0,012	33,1±3,1
60	128,3±1,1	0,268±0,004	41,5±9,2
120	145,0±9,8	0,264±0,009	37,0±2,1
180	141,1±5,0	0,257±0,009	32,5±0,2
240	140,9±2,5	0,292±0,013	38,9±7,0
D-NMDA-%25			
0	135,0±4,5	0,238±0,059	33,3±17,2
5	143,8±1,0	0,304±0,064	43,7±3,8
15	744,8±807,9	0,622±0,535	41,8±10,1
30	150,8±1,6	0,273±0,009	44,0±5,1
60	174,8±24,8	0,250±0,046	41,0±1,1
120	177,1±6,0	0,441±0,068	40,8±2,6
180	163,1±1,2	0,248±0,007	40,2±1,2
240	156,9±3,0	0,299±0,018	38,8±10,8
D-NMDA-%50			
0	196,3±2,6	0,371±0,028	29,6±3,1
5	218,8±9,6	0,331±0,052	27,4±2,6
15	228,7±33,9	0,288±0,018	23,3±9,7

30	220,1±13,2	0,305±0,025	38,5±0,3
60	228,9±7,0	0,377±0,040	36,9±6,2
120	190,3±5,9	0,354±0,067	33,5±2,9
180	197,9±1,4	0,367±0,000	40,0±2,3
240	202,9±7,5	0,323±0,037	12,6±1,4
D-NMDA-%100			
0	113,2±2,0	0,282±0,049	39,4±5,6
5	112,5±0,9	0,250±0,018	46,2±4,6
15	126,2±6,4	0,329±0,023	48,9±4,3
30	116,2±2,6	0,271±0,018	31,8±13,4
60	114,8±0,2	0,253±0,011	44,7±0,6
120	113,7±1,7	0,287±0,041	36,3±3,2
180	112,9±2,3	0,237±0,046	42,5±3,3
240	114,8±0,9	0,236±0,004	36,3±2,7

D-NMDA formülasyonu için ideal kriyoprotektan oranı %100 olarak bulunmuştur. Şekil 81'de %100 D-(+)-Trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun partikül boyutu ve poli dispersite indeksinin zaman içindeki değişimi gösterilmiştir.



Şekil 81: İdeal miktarda kriyoprotektan içeren F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının zamana bağlı partikül boyutu ve poli dispersite indeksi değişimi

Tablo 40: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K1-PEG-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	236,1±3,1	0,324±0,006	45,3±0,2
5	Ölçüm Yapılamamıştır		
15	3618,0±3830,0	0,590±0,139	33,5±4,6
30	5348,0±526,8	0,408±0,162	31,4±4,6
60	1936,0±458,2	1,000±0,000	34,0±1,6
120	4870,0±292,7	0,703±0,420	31,9±0,6
180	Ölçüm Yapılamamıştır		
240	1438±78,4	0,952±0,068	34,8±2,7
K1-PEG-NMDA-%10			
0	211,1±3,5	0,274±0,013	44,4±0,5
5	Ölçüm Yapılamamıştır		

15	8964,0±9866,0	0,501±0,706	36,7±7,7,2
30	Ölçüm Yapılamamıştır		
60	3184,0±1088,0	1,000±0,000	34,6±3,9
120	9231,0±985,0	0,721±0,395	33,5±8,4
180	1868,0±4185,0	0,989±0,015	40,1±2,8
240	1050,0±676,3	0,936±0,181	23,6±4,6
K1-PEG-NMDA-%25			
0	118,2±3,2	0,346±0,054	37,5±5,3
5	8994,0 ±534,6	0,626±0,255	35,7±7,6
15	5262,0±2370,0	0,389±0,042	37,7±5,8
30	Ölçüm Yapılamamıştır		
60	2111,0±42,4	1,000±0,000	35,7±4,9
120	1487,0±552,3	0,973±0,038	29,4±5,4
180	1868,0±2086,0	0,936±1,000	38,9±3,6
240	960,2±827,0	1,000±0,000	34,5±5,8
K1-PEG-NMDA-%50			
0	244,1±0,2	0,350±0,047	47,7±2,5
5	Ölçüm Yapılamamıştır		
15	Ölçüm Yapılamamıştır		
30	7646,0±3019,0	0,842±0,223	44,3±1,3
60	4399,0±1498,0	0,514±0,687	34,0±10,7
120	1774,0±152,7	1,000±0,000	34,7±1,7
180	3223,0±916,4	0,581±0,007	38,6±5,2
240	2227,0±507,0	1,000±0,968	48,0±1,9
K1-PEG-NMDA-%100			
0	213,6±1,0	0,306±0,004	46,0±2,4
5	9284,0±6840,0	0,816±0,261	37,2±1,4
15	7782,0±5626,0	1,000±0,000	36,1±4,2
30	2642,0±594,7	1,000±0,000	25,3±2,3
60	7443,0±667,5	0,791±0,296	56,0±6,2
120	1868,0±2669,0	0,936±1,000	42,0±1,0
180	2002,0±437,7	0,993±0,009	32,2±6,2
240	2338,0±787,0	1,000±0,000	36,7±11,7

K1-PEG-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar neticesinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Tablo 41: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K2-PEG-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	128,6±0,5	0,289±0,004	20,6±2,830
5	Ölçüm Yapılamamıştır		
15	9723,0±2,0	1,000±0,000	32,1±12,9
30	3649,0±367,7	0,924±0,107	31,2±7,9
60	694,0±451,1	0,684±0,217	24,9±4,1
120	2694,0±1911,0	1,000±0,000	25,4±3,1
180	Ölçüm Yapılamamıştır		
240	3410,0±777,8	0,739±0,368	31,8±4,0
K2-PEG-NMDA-%10			
0	129,6±0,1	0,282±0,020	24,7±3,9
5	7019,0±1888,0	0,745±0,226	32,8±6,6
15	Ölçüm Yapılamamıştır		
30	7734,0±34,6	0,543±0,012	30,0±3,2
60	1053,0±418,3	0,699±0,426	43,0±0,1
120	Ölçüm Yapılamamıştır		
180	5804,0±339,0	0,848±0,216	41,2±14,4
240	Ölçüm Yapılamamıştır		
K2-PEG-NMDA-%25			
0	124,8±1,1	0,303±0,004	28,0±0,6
5	4278,0±3653,0	0,697±0,429	20,8±8,7
15	9556,0±7318,0	0,700±0,425	33,7±4,3
30	3744,0±845,7	1,000±0,000	40,5±2,3
60	781,1±168,3	0,517±0,682	72,3±21,9

120	2455,0±893,8	0,847±0,216	34,6±20,9
180	843,0±175,2	0,845±0,219	29,5±0,9
240	1096,0±201,0	0,757±0,343	31,3±5,7
K2-PEG-NMDA-%50			
0	125,3±3,5	0,312±0,027	31,6±2,4
5	Ölçüm Yapılamamıştır		
15	9108,0±5293,0	0,521±0,078	52,9±11,6
30	5326,0±3741,0	0,651±0,022	39,7±3,82
60	1599,0±148,5	1,000±0,000	30,5±1,13
120	2339,0±83,4	1,000±0,000	22,0±0,7
180	1775,0±402,3	1,000±0,000	43,8±6,1
240	3820,0±1083,0	0,748±0,356	33,3±5,5
K2-PEG-NMDA-%100			
0	126,9±3,6	0,326±0,080	29,5±0,2
5	4436,0±518,3	1,000±0,000	41,8±9,8
15	Ölçüm Yapılamamıştır		
30	3874,0±1068,0	0,795±0,289	25,3±9,6
60	Ölçüm Yapılamamıştır		
120	2852,0±610,9	1,000±0,000	35,3±30,8
180	2711,0±110,3	0,599±0,567	36,5±7,9
240	3666,0±751,7	0,533±0,660	37,6±0,5

K2-PEG-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar neticesinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Tablo 42: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K3-PEG-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	121,4±1,2	0,382±0,019	34,7±0,9
5	332,4±169,9	0,417±0,003	23,4±9,2
15	363,6±39,8	0,393±0,361	34,5±9,5
30	230,9±14,3	0,431±0,081	27,8±17,7
60	722,2±499,4	0,498±0,091	14,1±15,3
120	369,9±132,9	0,390±0,184	20,8±1,4
180	217,4±28,2	0,380±0,134	28,9±14,6
240	510,2±265,7	0,705±0,228	27,4±6,7
K3-PEG-NMDA-%10			
0	137,1±6,4	0,431±0,004	34,5±1,3
5	229,9 ±43,7	0,340±0,024	4,1±2,0
15	298,4±62,5	0,328±0,008	1,9±0,5
30	475,5±354,5	0,558±0,330	18,0±6,0
60	676,8±145,7	0,651±0,066	5,0±0,9
120	369,8±107,5	0,487±0,059	24,5±4,3
180	522,6±16,8	0,903±0,048	14,9±2,1
240	783,8±322,7	0,648±0,235	34,0±0,1
K3-PEG-NMDA-%25			
0	118,2±3,2	0,346±0,054	37,5±5,3
5	508,0±238,5	0,507±0,214	1,2±0,6
15	690,7±233,8	0,617±0,134	11,3±4,4
30	756,0±166,6	0,865±0,190	19,6±3,7
60	3329,0±3848,0	0,804±0,276	2,6±0,4
120	1175,0±299,1	0,717±0,400	17,7±1,9
180	674,4±341,7	0,613±0,547	26,5±10,5
240	586,3±298,5	0,360±0,359	24,5±1,2
K3-PEG-NMDA-%50			
0	120,8±0,7	0,412±0,009	37,6±2,5
5	793,2±374,6	0,604±0,193	-0,7±3,6
15	563,7 ±235,1	0,484±0,180	12,1±7,2

30	4642,0±5544,0	0,278±0,320	21,5±16,0
60	2251,0±2283,0	0,534±0,659	0,8±0,3
120	681,7±225,9	0,849±0,032	23,5±0,6
180	628,7±148,2	0,174±0,113	23,0±1,4
240	562,8±89,6	0,745±0,255	25,1±4,4
K3-PEG-NMDA-%100			
0	117,8±2,5	0,404±0,014	31,1±0,7
5		Ölçüm Yapılamamıştır	
15		Ölçüm Yapılamamıştır	
30		Ölçüm Yapılamamıştır	
60		Ölçüm Yapılamamıştır	
120	710,3±3,3	0,391±0,372	9,3±1,0
180	836,8±573,0	0,585±0,310	23,3±5,6
240	529,8±190,0	0,601±0,114	28,3±5,0

K2-PEG-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Deneme 2: Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu

Tablo 43, Tablo 44, Tablo 45, Tablo 46, Tablo 47 ‘da yeniden disperse edilen nanopartikül formülasyonlarının ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 43: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

F1-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	86,2±0,5	0,292±0,011	36,3±2,4
5	147,7±22,3	0,455±0,016	40,8±3,2
15	121,5±6,5	0,359±0,073	40,1±6,9
30	138,4±12,0	0,379±0,022	40,7±0,01
60	155,4±11,7	0,216±0,009	42,5±2,6
120	153,4±7,6	0,285±0,029	40,7±2,0

180	150,1±0,6	0,363±0,056	36,9±0,4
240	154,1±1,6	0,310±0,012	40,0±3,3
F1-NMDA-%10			
0	83,9±2,7	0,234±0,025	31,1±0,8
5	683,1±245,3	0,447±0,148	-1,82±6,9
15	623,3±46,1	0,524±0,023	20,1±6,5
30	778,0±321,0	0,663±0,281	19,6±1,4
60	646,7±106,5	0,575±0,022	31,0±1,3
120	263,0±10,8	0,407±0,066	33,0±0,4
180	226,3±0,8	0,306±0,089	26,8±0,2
240	395,8±4,4	1,000±0,000	33,8±3,4
F1-NMDA-%25			
0	86,9±3,4	0,447±0,030	36,8±2,6
5	223,3±14,2	0,206±0,082	37,5±2,7
15	230,6±14,9	0,273±0,030	34,0±2,4
30	242,4±21,0	0,230±0,137	36,8±2,1
60	209,1±5,6	0,250±0,009	29,9±3,8
120	205,1±15,1	0,256±0,001	27,2±4,3
180	219,7±3,8	0,221±0,027	23,8±4,1
240	209,0±17,1	0,275±0,086	25,4±8,1
F1-NMDA-%50			
0	83,3±1,2	0,317±0,004	39,8±2,4
5	227,9±28,5	0,305±0,078	39,7±1,1
15	214,9±8,6	0,164±0,083	38,8±0,2
30	235,4±17,9	0,322±0,105	33,3±0,7
60	219,8±8,7	0,312±0,024	29,1±2,0
120	202,9±11,4	0,241±0,017	35,0±2,0
180	201,0±5,3	0,240±0,035	36,2±1,8
240	193,3±1,6	0,177±0,057	29,8±1,7
F1-NMDA-%100			
0	86,2±1,6	0,232±0,018	38,8±9,2
5	182,3±13,0	0,257±0,040	44,4±2,2
15	177,3±1,1	0,253±0,017	46,6±2,8
30	180,2±7,7	0,237±0,061	41,5±1,7

60	180,1±2,4	0,247±0,060	42,1±2,2
120	173,3±9,8	0,303±0,047	38,6±2,1
180	175,6±5,3	0,198±0,038	39,0±2,7
240	169,9±2,3	0,235±0,083	38,0±0,7

F1-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Tablo 44: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

D-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	62,3±0,1	0,254±0,008	61,9±0,4
5	98,9±0,7	0,389±0,025	36,2±3,6
15	99,5±3,9	0,411±0,127	38,0±0,0
30	98,9±1,6	0,342±0,021	39,8±0,7
60	102,6±4,4	0,333±0,053	40,0±2,1
120	105,1±5,4	0,308±0,033	44,7±0,6
180	103,9±0,9	0,278±0,008	46,4±6,0
240	101,9±3,9	0,282±0,031	40,3±0,6
D-NMDA-%10			
0	85,9±2,7	0,384±0,023	55,0±3,6
5	81,9±0,3	0,454±0,015	48,5±2,0
15	73,1±3,8	0,472±0,018	47,6±0,5
30	81,5±6,1	0,403±0,084	45,0±3,3
60	78,1±0,1	0,454±0,049	50,1±5,2
120	86,9±1,3	0,427±0,058	49,0±4,9
180	88,3±1,8	0,384±0,015	51,3±1,0
240	85,1±1,4	0,420±0,099	44,3±0,5
D-NMDA-%25			
0	73,3±2,3	0,313±0,007	46,5±3,3

5	100,5±5,9	0,306±0,062	51,3±1,9
15	104,8±4,5	0,361±0,040	51,0±6,5
30	103,3±0,2	0,290±0,043	45,3±4,7
60	183,7±121,6	0,335±0,093	47,3±3,0
120	106,8±4,4	0,272±0,027	48,5±3,8
180	102,4±0,6	0,266±0,023	49,9±3,6
240	97,9±0,1	0,334±0,099	49,8±3,0
D-NMDA-%50			
0	73,9±1,513	0,249±0,003	49,0±2,260
5	238,9±67,390	0,349±0,035	53,2±1,200
15	249,6±68,660	0,314±0,045	53,0±2,690
30	155,9±6,010	0,269±0,084	53,5±0,566
60	173,3±6,859	0,287±0,001	54,3±0,354
120	154,4±3,748	0,313±0,011	49,6±2,550
180	165,6±6,223	0,271±0,173	55,3±1,480
240	154,9±2,121	0,292±0,078	52,5±0,071
D-NMDA-%100			
0	67,4±0,4	0,206±0,004	56,6±2,8
5	122,4±3,1	0,363±0,023	57,3±0,8
15	129,2±4,6	0,468±0,103	60,5±0,5
30	128,6±0,4	0,304±0,006	57,3±3,3
60	131,3±2,6	0,388±0,136	57,6±5,9
120	117,0±1,6	0,391±0,012	55,8±2,2
180	123,7±2,4	0,426±0,045	55,3±0,7
240	129,5±2,6	0,356±0,023	54,4±2,5

D-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak prtikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potensiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Tablo 45: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K1-PEG-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	149,4±2,7	0,210±0,018	35,0±2,7
5	3032,0±347,9	0,072±0,040	39,5±14,2
15	5776,0±1012,0	1,000±0,000	36,5±0,0
30	Ölçüm Yapılamamıştır		
60	Ölçüm Yapılamamıştır		
120	4449,0±3867,0	1,000±0,000	40,3±8,4
180	97,0±138,5	0,504±0,701	37,4±5,3
240	1227,0±805,7	0,923±0,941	39,5±1,9
K1-PEG-NMDA-%10			
0	147,8±1,3	0,237±0,006	35,5±1,3
5	4066,0±1189,0	0,270±0,115	39,7±2,6
15	7976,0±4743,0	1,000±0,000	42,0±3,6
30	3736,0±105,4	0,932±0,096	38,4±1,5
60	6568,0±2319,0	0,447±0,353	42,5±3,1
120	4559,0±2489,0	0,840±0,226	41,8±1,2
180	2547,0±2218,0	0,951±0,069	41,5±1,0
240	1303,0±135,1	1,000±0,000	40,7±2,6
K1-PEG-NMDA-%25			
0	150,4±1,6	0,213±0,028	40,7±4,7
5	1324,0±311,1	0,266±0,164	39,5±1,2
15	2120,0±66,4	1,000±0,000	38,3±2,4
30	2743,0±1455,0	0,923±0,110	44,7±0,8
60	1284,0±196,6	0,731±0,274	45,1±0,8
120	1062,0±368,8	0,491±0,522	42,5±0,4
180	1104,0±116,7	0,689±0,062	43,4±1,8
240	1751,0±227,0	0,703±0,420	39,1±0,2
K1-PEG-NMDA-%50			
0	150,4±3,5	0,225±0,045	40,0±5,0
5	Ölçüm Yapılamamıştır		

15	8587,0±1270,0	0,755±0,346	42,3±1,4
30	Ölçüm Yapılamamıştır		
60	7588,0±4458,0	1,000±0,000	41,7±2,1
120	3239,0±1361,0	1,000±0,000	38,8±2,6
180	1092,0±40,3	1,000±0,000	45,0±3,3
240	1105,0±116,0	0,938±0,021	38,4±1,7
K1-PEG-NMDA-%100			
0	153,7±3,9	0,259±0,029	47,3±6,6
5	1021,0±477,4	0,919±0,038	52,7±4,8
15	1071,0±407,0	1,000±0,000	52,2±7,4
30	1088,0±101,8	1,000±0,000	55,3±8,7
60	961,8±463,5	1,000±0,000	50,3±5,1
120	978,8±126,2	0,793±0,078	41,2±0,0
180	770,0±149,9	0,805±0,095	50,8±6,2
240	758,3±80,3	0,660±0,154	50,0±0,5

K1-PEG-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Tablo 46: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K2-PEG-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	125,6±2,5	0,266±0,067	35,8±6,9
5	1515,0±412,2	0,307±0,035	46,0±0,4
15	910,3±50,5	0,451±0,220	36,5±5,4
30	1121,0±119,5	0,738±0,011	39,5±8,1
60	3089,0±596,8	0,633±0,201	56,7±7,7
120	2000,0±567,1	1,000±0,000	30,0±4,1

180	629,5±225,2	0,844±0,067	45,3±1,8
240	1136,0±418,6	1,000±0,000	44,0±6,8
K2-PEG-NMDA-%10			
0	121,3±0,3	0,266±0,067	49,3±2,4
5	3901,0±483,7	0,389±0,182	40,5±4,3
15	3231,0±1203,0	0,297±0,373	29,0±7,2
30	1643,0±4,9	1,000±0,000	47,1±9,6
60	3258,0±870,4	1,000±0,000	23,1±10,5
120	7724,0±2255,0	1,000±0,000	31,0±2,3
180	2048,0±101,8	1,000±0,000	36,4±0,5
240	2385,0±113,8	1,000±0,000	36,5±0,8
K2-PEG-NMDA-%25			
0	Boyut	PDI	Zeta
5	129,6±8,7	0,346±0,037	35,2±1,7
15	Ölçüm Yapılamamıştır		
30	Ölçüm Yapılamamıştır		
60	9994,0±2158,0	1,000±0,000	41,0±0,1
120	1240,0±280,7	1,000±0,000	44,8±2,0
180	2919,0±440,5	1,000±0,000	40,6±0,8
240	4714,0±495,7	1,000±0,000	29,3±3,1
K2-PEG-NMDA-%50			
0	150,2±19,2	0,326±0,033	59,9±2,9
5	828,8±145,9	0,790±0,066	34,0±3,8
15	589,6±142,4	0,964±0,051	51,8±0,5
30	672,3±149,4	0,835±0,032	41,3±12,5
60	786,9±356,5	0,829±0,154	14,3±22,6
120	598,4±16,9	0,194±0,230	53,3±9,2
180	748,5±201,9	0,731±0,018	44,0±1,7
240	645,8±83,1	1,000±0,000	50,2±2,7
K2-PEG-NMDA-%100			
0	145,8±17,6	0,235±0,023	39,5±8,3
5	1333,0±346,5	1,000±0,000	48,0±7,0
15	1371,0±107,5	1,000±0,000	53,7±4,3
30	1116,0±355,1	1,000±0,000	50,6±2,1

60	1985,0±1032,0	0,873±0,180	52,3±0,9
120	751,5±116,5	1,000±0,000	45,3±0,9
180	904,5±242,6	0,907±0,132	48,3±2,1
240	1187,0±9,9	0,925±0,005	54,3±1,4

K2-PEG-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Tablo 47: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K3-PEG-NMDA-%5			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	110,1±2,1	0,380±0,025	49,9±2,1
5	870,2±153,1	0,738±0,192	15,5±1,2
15	2254,0±680,9	0,900±0,142	33,8±6,8
30	2596,0±1503,0	0,922±0,111	33,5±0,0
60	5895,0±1283,0	0,449±0,334	39,5±0,4
120	3102,0±1293,0	0,749±0,354	34,0±1,9
180	3111,0±3043,0	0,906±0,132	38,0±0,0
240	2136,0±1240,0	0,994±0,008	35,3±0,5
K3-PEG-NMDA-%10			
0	107,9±2,4	0,324±0,033	42,0±0,9
5	3255,0±860,5	0,762±0,117	31,9±0,7
15	1307,0±355,7	0,834±0,190	20,3±11,2
30	838,5±235,4	0,881±0,169	36,5±0,4
60	7921,0±5571,0	0,688±0,442	34,3±5,0
120	6090,0±1620,0	0,822±0,252	28,0±5,8
180	9921,0±6420,0	0,699±0,426	27,5±2,4
240	1423,0±270,1	0,848±0,153	38,2±4,6
K3-PEG-NMDA-%25			
0	104,8±5,0	0,375±0,052	46,1±3,9

5		Ölçüm Yapılamamıştır	
15	8054,0±1180,0	0,670±0,063	49,8±4,6
30	8748,0±1031,0	0,674±0,047	45,0±4,7
60	2573,0±659,0	0,546±0,642	38,8±2,0
120	3227,0±994,9	0,501±0,706	33,3±6,3
180	2942,0±1776,0	0,636±0,454	40,5±1,3
240	4262,0±1518,0	1,000±0,000	41,8±8,2
K3-PEG-NMDA-%50			
0	109,8±0,2	0,382±0,022	38,0±0,2
5	4237,0±1289,0	0,181±0,197	56,5±15,5
15	7670,0±2166,0	0,706±0,415	22,9±29,9
30		Ölçüm Yapılamamıştır	
60	9781,0±1597,0	1,000±0,000	43,3±20,0
120	6353,0±1193,0	1,000±0,000	30,9±16,3
180	1579,0±771,5	0,746±0,359	20,5±8,7
240	7771,0±4665,0	1,000±0,000	38,5±4,8
K3-PEG-NMDA-%100			
0	105,0±1,8	0,328±0,016	44,0±0,3
5	711,7±245,4	0,756±0,300	42,5±11,4
15	558,3±317,3	1,000±0,000	57,1±3,6
30	423,6±14,4	1,000±0,000	47,3±7,9
60	1088±709,2	0,871±0,182	54,0±2,7
120	431,0±19,9	1,000±0,000	29,8±5,5
180	815,4±440,7	0,617±0,250	41,9±0,8
240	762,3±95,6	0,910±0,127	24,0±2,0

K2-PEG-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak prtikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potensiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür. Bu sebeple farklı oranlarda kriyoprotektan ilavesi ile işlem yeniden denenmiştir.

Deneme 3: Kriyoprotektan Miktarının Optimizasyonu

Tablo 48, Tablo 49, .

Tablo 50, Tablo 51,

Tablo 52’de yeniden disperse edilen nanopartikül formülasyonlarının ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 48: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

F1-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	81,8±2,6	0,268±0,066	26,9±1,7
5	185,2±3,2	0,225±0,016	31,6±2,8
15	188,7±7,6	0,280±0,042	25,4±0,7
30	191,4±15,9	0,207±0,171	35,0±1,2
60	189,4±7,0	0,282±0,095	28,0±1,9
120	180,4±2,6	0,273±0,039	27,0±0,2
180	198,4±5,0	0,312±0,054	29,2±0,5
240	192,8±7,9	0,146±0,064	30,3±2,1
F1-NMDA-%4			
0	89,8±4,0	0,243±0,039	21,4±0,7
5	318,0±5,5	0,194±0,002	29,5±0,0
15	335,9±43,5	0,310±0,107	30,2±2,8
30	384,6±82,6	0,288±0,061	28,5±0,9
60	327,8±36,8	0,382±0,006	22,5±3,0
120	308,3±21,8	0,364±0,007	26,4±0,7
180	296,7±2,5	0,278±0,071	24,3±2,2
240	311,8±2,8	0,299±0,080	22,8±0,1
F1-NMDA-%10			
0	90,2±2,0	0,336±0,006	24,0±1,1
5	273,0±16,0	0,266±0,039	22,9±1,1
15	266,8±8,9	0,259±0,013	22,9±0,2

30	269,5±9,2	0,214±0,009	24,5±1,2
60	279,3±16,1	0,221±0,052	13,4±8,9
120	265,2±3,9	0,262±0,013	22,6±0,2
180	294,0±1,9	0,262±0,008	17,7±1,4
240	316,7±22,0	0,196±0,00	16,4±0,4
F1-NMDA-%20			
0	91,7±4,8	0,280±0,004	29,2±3,1
5	166,4±7,3	0,259±0,030	25,3±1,7
15	178,4±0,9	0,166±0,013	28,9±2,0
30	179,0±2,2	0,175±0,005	27,2±3,8
60	178,1±3,7	0,181±0,059	30,4±3,9
120	188,3±11,1	0,176±0,025	24,3±1,4
180	183,1±2,6	0,193±0,003	22,0±1,2
240	191,7±6,3	0,184±0,056	20,3±0,8
F1-NMDA-%40			
0	100,1±2,1	0,278±0,004	19,0±4,7
5	185,6±12,5	0,225±0,041	11,9±1,4
15	194,7±1,8	0,166±0,076	10,3±1,1
30	100,1±2,1	0,278±0,004	19,0±4,7
60	185,6±12,5	0,225±0,041	11,9±1,4
120	194,7±1,8	0,166±0,076	10,3±1,1
180	199,8±0,0	0,255±0,023	12,4±2,8
240	244,3±10,4	0,200±0,045	5,64±0,4

F1-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak prtikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür.

Tablo 49: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

D-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)

0	62,3±0,0	0,255±0,003	27,5±1,7
5	561,3±12,7	0,339±0,028	39,2±2,9
15	516,9±26,0	0,383±0,052	36,5±6,1
30	725,3±346,4	0,361±0,155	40,9±1,7
60	441,8±29,5	0,491±0,095	36,5±1,4
120	385,4±8,6	0,548±0,088	36,8±1,7
180	367,5±9,1	0,522±0,116	38,1±1,8
240	329,0±20,6	0,531±0,016	36,8±2,7
D-NMDA-%4			
0	61,9±1,1	0,199±0,013	28,5±0,1
5	338,5±0,1	0,312±0,020	43,0±2,1
15	341,6±51,5	0,363±0,012	42,8±0,4
30	376,6±88,6	0,428±0,067	40,5±1,2
60	316,4±6,2	0,326±0,206	41,2±1,0
120	325,4±12,8	0,317±0,013	36,3±0,5
180	315,5±6,4	0,227±0,001	37,7±1,7
240	327,8±60,1	0,427±0,044	39,1±3,1
D-NMDA-%10			
0	70,01±1,4	0,327±0,059	42,2±10,0
5	398,9±24,8	0,329±0,060	35,7±0,3
15	373,0±12,8	0,139±0,063	37,3±2,3
30	376,4±35,3	0,235±0,016	39,8±2,7
60	377,6±2,4	0,186±0,028	38,0±2,6
120	375,5±10,3	0,376±0,089	39,0±1,3
180	356,0±30,9	0,398±0,016	36,8±0,7
240	362,7±2,5	0,327±0,076	35,0±0,6
D-NMDA-%20			
0	59,7±1,0	0,242±0,016	29,7±1,1
5	314,0±2,8	0,106±0,057	37,0±1,6
15	316,2±6,9	0,194±0,063	37,2±0,3
30	295,8±17,7	0,249±0,054	41,3±0,7
60	320,8±4,7	0,118±0,051	38,7±0,3
120	304,0±7,7	0,203±0,026	38,0±1,1
180	59,74±1,0	0,242±0,016	29,7±1,1

240	314,0±2,8	0,106±0,057	37,0±1,6
D-NMDA-%40			
0	70,1±0,5	0,306±0,001	27,3±6,2
5	79,7±0,1	0,197±0,066	29,9±3,8
15	83,0±1,3	0,221±0,002	28,9±3,5
30	83,0±1,2	0,262±0,059	34,5±1,6
60	88,7±1,4	0,232±0,066	36,3±8,1
120	92,6±0,4	0,263±0,021	36,8±1,2
180	93,8±0,6	0,266±0,026	38,2±10,4
240	96,0±1,8	0,301±0,042	33,8±6,5

D-NMDA formülasyonuna yukarıda belirtilen miktarlarda D-(+)-trehaloz ilavesi yapılmıştır. Ancak partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde başarılı bir liyofilizasyon işleminin gerçekleşmediği görülmüştür.

Tablo 50: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K1-PEG-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	173,9±1,3	0,274±0,030	51,6±0,5
5	2224,0±466,7	0,957±0,061	41,2±4,6
15	1465,0±257,4	0,990±0,013	50,0±0,7
30	2919,0±3031,0	1,000±0,000	50,3±1,9
60	1310,0±281,4	0,974±0,037	51,8±0,9
120	828,3±5,5	0,923±0,109	50,8±1,2
180	772,5±119,6	0,908±0,131	50,7±0,5
240	766,7±14,8	0,760±0,012	51,0±0,2
K1-PEG-NMDA-%4			

0	179,9±5,5	0,375±0,032	53,8±3,8
5	409,8±37,5	0,461±0,031	56,0±3,8
15	446,5±50,5	0,416±0,006	45,7±5,8
30	458,6±17,7	0,511±0,014	53,7±1,4
60	394,1±27,3	0,536±0,059	57,7±1,0
120	426,3±30,1	0,458±0,000	54,1±0,2
180	400,8±18,0	0,540±0,004	55,3±0,9
240	357,8±51,1	0,373±0,034	55,1±1,5
K1-PEG-NMDA-%10			
0	207,7±0,8	0,297±0,049	48,0±0,6
5	276,0±5,1	0,295±0,037	57,3±3,6
15	277,6±9,9	0,344±0,040	55,9±2,8
30	276,9±24,7	0,395±0,130	53,0±4,6
60	297,3±27,4	0,441±0,129	54,7±0,5
120	274,0±9,9	0,384±0,119	54,0±1,5
180	254,6±5,7	0,373±0,053	57,0±0,1
240	257,0±3,4	0,336±0,068	55,7±0,4
K1-PEG-NMDA-%20			
0	188,1±9,5	0,290±0,010	48,9±0,7
5	203,1±7,7	0,329±0,066	55,3±0,4
15	208,1±0,0	0,338±0,027	53,2±1,5
30	222,6±11,4	0,268±0,044	52,5±1,2
60	207,5±0,0	0,275±0,027	49,1±0,2
120	229,9±4,4	0,216±0,182	51,0±0,1
180	201,0±10,1	0,247±0,002	53,8±2,4
240	200,5±2,7	0,283±0,033	52,5±0,9
K1-PEG-NMDA-%40			
0	203,4±0,3	0,310±0,004	46,7±2,6
5	194,6±0,1	0,289±0,015	47,2±5,9
15	207,1±4,5	0,299±0,042	50,3±3,4
30	225,9±9,2	0,329±0,071	48,7±1,7
60	217,2±16,4	0,314±0,013	44,7±0,5
120	210,8±17,8	0,342±0,052	48,7±1,9
180	216,8±23,2	0,460±0,163	46,5±0,2

240	209,3±3,7	0,366±0,066	51,8±3,3

K1-PEG-NMDA formülasyonu için ideal partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri değerlendirildiğinde ideal kriyoprotektan oranı %40 olarak bulunmuştur. Şekil 82’de %40 D-(+)-Trehaloz içeren K1-PEG-NMDA formülasyonunun partikül boyutu ve poli dispersite indeksinin zaman içindeki değişimi gösterilmiştir.

Tablo 51: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K2-PEG-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	130,7±1,8	0,298±0,011	37,0±2,6
5	742,9±237,7	1,000±0,000	50,6±1,2
15	791,7±445,9	0,924±0,107	49,0±0,2
30	594,0±77,5	0,691±0,231	51,5±1,6
60	400,4±20,7	0,783±0,029	51,3±1,2
120	374,2±25,6	0,282±0,137	61,7±3,3
180	489,7±49,0	0,792±0,014	50,9±1,1
240	385,9±75,5	0,937±0,089	49,9±3,9
K2-PEG-NMDA-%4			
0	176,1±22,2	0,435±0,142	40,3±0,1
5	363,1±2,4	0,606±0,147	54,2±0,5
15	374,6±36,1	0,554±0,029	54,5±0,2
30	405,2±113,4	0,643±0,117	52,8±2,2
60	303,5±9,9	0,649±0,079	52,8±4,7
120	280,4±31,9	0,465±0,016	48,3±3,5
180	302,5±7,5	0,536±0,265	51,7±0,9
240	552,5±118,3	0,906±0,018	54,3±0,8
K2-PEG-NMDA-%10			
0	Boyut	PDI	Zeta
5	148,4±5,3	0,294±0,026	48,8±7,4
15	197,6±15,7	0,388±0,025	49,4±1,5
30	193,4±8,1	0,394±0,102	45,8±1,7

60	166,7±7,3	0,356±0,048	49,5±0,6
120	175,8±0,5	0,440±0,090	50,0±1,1
180	177,6±9,2	0,386±0,066	45,2±10,6
240	211,5±8,3	0,348±0,089	36,5±1,3
K2-PEG-NMDA-%20			
0	144,1±3,0	0,319±0,014	39,1±6,0
5	249,1±84,2	0,394±0,077	43,3±0,2
15	176,6±17,0	0,407±0,100	42,3±0,4
30	186,4±5,7	0,379±0,076	51,2±2,1
60	201,7±25,6	0,306±0,033	48,3±7,9
120	189,4±4,1	0,343±0,008	45,8±0,1
180	188,4±0,7	0,401±0,151	46,8±4,8
240	144,1±3,0	0,319±0,014	39,1±6,1
K2-PEG-NMDA-%40			
0	172,7±20,3	0,396±0,004	40,5±2,4
5	183,4±0,6	0,472±0,004	43,3±2,1
15	181,2±0,4	0,461±0,035	40,9±0,1
30	186,3±12,8	0,538±0,108	46,8±3,5
60	185,8±11,1	0,393±0,110	44,5±5,1
120	254,6±102,2	0,437±0,011	44,1±1,8
180	217,8±27,8	0,370±0,092	43,2±6,1
240	172,7±20,3	0,396±0,004	40,5±2,4

K2-PEG-NMDA formülasyonu için ideal partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri değerlendirildiğinde ideal kriyoprotektan oranı %40 olarak bulunmuştur. Şekil 82'de %40 D-(+)-Trehaloz içeren K2-PEG-NMDA formülasyonunun partikül boyutu ve poli dispersite indeksinin zaman içindeki değişimi gösterilmiştir.

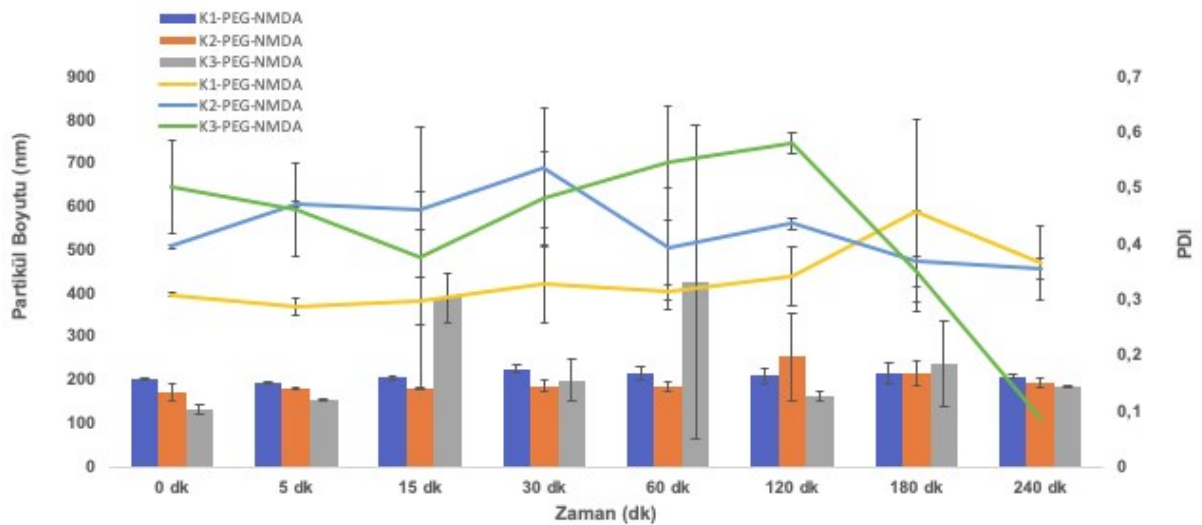
Tablo 52: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

K3-PEG-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	210,1±27,0	0,454±0,049	50,2±0,0

5	4930,0±1562,0	0,905±0,134	27,0±7,9
15		Ölçüm Yapılamamıştır	
30		Ölçüm Yapılamamıştır	
60	2022,0±601,7	0,747±0,119	27,9±11,7
120	3507,0±1386,0	1,000±0,000	42,6±0,8
180	1517,0±186,0	0,986±0,020	75,9±38,3
240	1160,0±335,0	0,950±0,071	38,8±7,1
K3-PEG-NMDA-%4			
0	159,5±21,5	0,488±0,013	41,7±6,2
5	1466,0±84,1	1,000±0,000	49,5±5,5
15	860,5±352,8	0,883±0,009	50,6±2,6
30	707,5±191,1	0,752±0,108	38,5±4,0
60	1044±487,3	1,000±0,000	50,1±31,5
120	727,7±8,2	0,923±0,109	48,8±2,6
180	479,3±23,6	0,695±0,052	43,5±3,6
240	440,7±58,2	0,795±0,088	43,9±12,2
K3-PEG-NMDA-%10			
0	143,3±2,3	0,377±0,094	39,6±2,2
5	233,1±33,8	0,643±0,141	54,8±0,9
15	187,4±30,7	0,800±0,033	51,2±1,9
30	303,0±125,2	0,536±0,164	43,0±11,2
60	217,8±7,9	0,567±0,032	46,5±1,0
120	225,4±46,8	0,714±0,034	45,3±0,1
180	199,8±11,9	0,484±0,023	42,1±1,4
240	211,0±1,2	0,387±0,018	48,8±2,1
K3-PEG-NMDA-%20			
0	198,2±19,8	0,379±0,038	40,2±1,2
5	218,5±1,9	0,598±0,083	48,5±7,4
15	233,4±36,2	0,688±0,084	43,3±2,4
30	336,8±71,6	0,489±0,011	49,8±1,9
60	242,0±3,5	0,501±0,034	52,0±0,9
120	229,1±27,5	0,748±0,046	50,1±3,1
180	250,2±16,8	0,406±0,028	49,5±1,9
240	229,8±0,7	0,414±0,052	52,7±0,2

K3-PEG-NMDA-%40			
0	133,1±11,7	0,504±0,024	39,0±0,2
5	157,1±1,7	0,462±0,083	38,4±8,3
15	390,1±56,1	0,376±0,085	32,3±4,1
30	200,1±47,7	0,482±0,236	50,2±0,1
60	426,7±361,0	0,547±0,086	47,5±1,8
120	162,2±10,7	0,582±0,103	46,8±3,4
180	237,2±99,1	0,352±0,020	43,4±2,6
240	187,6±1,2	0,087±0,027	46,6±3,4

K3-PEG-NMDA formülasyonu için ideal partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri değerlendirildiğinde ideal kriyoprotektan oranı %40 olarak bulunmuştur. Şekil 82 'de %40 D-(+)-Trehaloz içeren K3-PEG-NMDA formülasyonunun partikül boyutu ve poli dispersite indeksinin zaman içindeki değişimi gösterilmiştir.



Şekil 82: İdeal miktarda kriyoprotektan içeren K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının zamana bağlı partikül boyutu ve poli dispersite indeksi değişimi

Deneme 1 ile ideal kriyoprotektan miktarı belirlenen F1-NMDA ve D-NMDA ile Deneme 3 ile ideal kriyoprotektan miktarı belirlenen K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA nanopartikül dispersiyonu 0. Hafta, 1. Hafta, 2. Hafta, 3. Hafta, 4. Hafta, 2. Ay, 3. Ay, 6. Ay, 9. Ay ve 12. Ayda partikül boyutu, polidispersite

indeksi ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi için $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ (buzdolabında), $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%60\pm 5$ bağıl nem ile $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%75\pm 5$ bağıl nem şartlarında stabilite kabininde muhafaza edilmeye başlanmıştır.

Stabilite çalışmaları için elde edilen liyofilize formülasyonlar **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'de gösterilmiştir. Ölçümler için formülasyonlar yeniden istenilen konsantrasyonu sağlaması için ihtiyaç duyulan miktarda distile su ile yeniden disperse edilmiştir. Liyofilize formülasyonların ilk iki aylık fiziksel ve kimyasal stabilitesi kontrol edilmiştir. Tablo 53'da liyofilize formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümelerini göstermektedir. Stabilite çalışmaları için elde edilen liyofilize formülasyonlar **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'da gösterilmiştir.



Şekil 83: Stabilite çalışması için liyofilize olarak elde edilen formülasyonların görünümü

Tablo 53: F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA formülasyonlarının iki aylık stabilite çalışmasının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilmesi

Zaman (hafta)	F1-NMDA-4°C			F1-NMDA-25°C			F1-NMDA-40°C		
	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)
	SD			SD			SD		
0	109,8±11,8	0,237±0,060	32,3±3,2	109,8±11,8	0,237±0,060	32,3±3,2	109,8±11,8	0,237±0,060	32,3±3,1
1	478,4±2,8	0,465±0,033	-2,23±0,7	606,7±114,1	0,821±0,254	-5,86±1,4	221,3±19,6	0,297±0,018	-10,7±0,6
2	461,8 ±175,6	0,440 ±0,156	-6,71 ±0,5	556,7 ±68,1	0,468±0,004	-5,83 ±1,0	390,5 ±114,9	0,493±0,206	-6,93 ±2,5
3	270,0 ±0,5	0,530 ±0,325	-6,36 ±0,9	354,8 ±86,9	0,502±0,012	-5,07 ±0,1	433,3 ±83,5	0,440±0,093	-13,6 ±2,3
4	1066 ±532,0	0,808 ±0,271	25,7 ±0,6	303,9 ±105,5	0,423±0,072	1,63 ±0,1	348,3 ±47,0	0,403±0,108	3,98 ±1,8
8	1100 ±708,5	0,746 ±0,205	-12,9 ±13,1	1736 ±1630	0,762±0,337	-6,64 ±7,3	387,0 ±52,4	0,213±0,261	-6,20 ±0,8
	D-NMDA-4°C			D-NMDA-25°C			D-NMDA-40°C		
	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)
	SD			SD			SD		
0	66,9 ±3,2	0,106 ±0,023	32,4 ±5,7	66,9 ±3,2	0,106±0,048	32,4± 5,71	66,95 ±3,220	0,106 ±0,048	32,4 ±5,71
1	218,9 ±6,5	0,264 ±0,010	43,5 ±1,5	491,9 ±190,4	0,499±0,132	31,9 ±0,361	277,3 ±32,03	0,317 ±0,021	29,6 ±6,03
2	343,5 ±21,7	0,396 ±0,039	33,5 ±0,7	256,0± 23,2	0,512±0,026	34,8 ±2,90	234,6 ±10,54	0,438 ±0,089	30,1 ±4,10
3	Ölçüm yapılamamıştır			424,4± 124,2	0,382±0,168	9,87 ±0,891	363,0 ±30,83	0,342 ±0,006	5,44 ±0,00
4	200,0 ±34,2	0,308 ±0,023	26,2 ±0,4	183,6 ±24,8	0,292±0,011	20,8 ±4,03	200,5 ±8,768	0,282 ±0,037	22,8 ±1,70
8	1249 ±965,0	0,581 ±0,284	7,74 ±2,1	837,3 ±7,1	0,441 ±0,1	0,215 ±0,4	763,8 ±26,9	0,422 ±0,3	3,80 ±1,1
	K1-PEG-NMDA-4°C			K1-PEG-NMDA-25°C			K1-PEG-NMDA-40°C		
	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mv)
	SD			SD			SD		

0	243,8	0,322	49,5	243,8	0,322	49,5	243,8	0,322	49,5
	±17,1	±0,054	±1,4	±17,1	±0,054	±1,4	±17,1	±0,054	±1,4
1	255,7	0,318	47,4	265,6	0,386	46,5	265,3	0,373	44,9
	±11,6	±0,036	±0,7	±18,1	±0,016	±1,3	±13,6	±0,100	±2,4
2	249,5	0,377	50,4	264,9	0,407	49,6	259,0	0,373	45,4
	±14,5	±0,115	±1,1	±12,7	±0,120	±0,6	±3,1	±0,146	±3,9
3	248,1	0,417	47,2	274,0	0,359	48,2	271,8	0,294	47,0
	±0,1	±0,011	±0,4	±15,2	±0,004	±1,8	±11,6	±0,011	±2,9
4	227,3	0,325	46,5	232,8	0,271	44,5	228,3	0,331	49,1
	±5,5	±0,065	±0,5	±16,6	±0,007	±0,8	±9,7	±0,080	±0,8
8	275,1	0,346	47,0	272,0	0,374	47,7	237,9	0,374	50,3
	±36,2	±0,017	±0,2	±5,9	±0,096	±0,4	±4,5	±0,030	±2,1

K2-PEG-NMDA-4°C

K2-PEG-NMDA-25°C

K2-PEG-NMDA-40°C

	Partikül Boyutu (nm) SD	PDI	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm) SD	PDI	Zeta Potensiye li (mv)	Partikül Boyutu (nm) SD	PDI	Zeta Potensiyeli (mv)
0	144,1	0,392	40,0	144,1	0,392	40,0	144,1	0,392	40,0
	±12,2	±0,065	±5,0	±12,2	±0,065	±5,0	±12,2	±0,065	±5,0
1	164,8	0,360	33,0	147,7	0,339	40,3	134,5	0,452	35,2
	±10,2	±0,035	±3,1	±5,2	±0,033	±0,8	±8,4	±0,012	±9,0
2	139,6	0,431	40,6	143,4	0,368	41,2	146,4	0,444	27,9
	±0,3	±0,066	±6,9	±1,5	±0,081	±2,3	±0,2	±0,045	±2,4
3	154,9	0,476	30,4	161,1	0,403	35,1	163,1	0,410	42,0
	±14,9	±0,068	±0,9	±0,1	±0,054	±7,9	±5,5	±0,040	±4,9
4	157,9	0,336	28,6	159,4	0,396	38,9	161,1	0,456	30,9
	±12,5	±0,043	±2,2	±6,5	±0,037	±3,5	±7,8	±0,021	±8,2
8	157,4	0,386	38,3	161,6	174,3	35,8	160,9	0,394	54,1
	±7,9	±0,030	±18,8	±2,3	±11,31	±1,7	±10,0	±0,059	±14,8

K3-PEG-NMDA-4°C

K3-PEG-NMDA-25°C

K3-PEG-NMDA-40°C

	Partikül Boyutu (nm) SD	PDI	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm) SD	PDI	Zeta Potensiye li (mv)	Partikül Boyutu (nm) SD	PDI	Zeta Potensiyeli (mv)
0	140,0	0,451	41,3	140,0	0,451	41,3	140,0	0,451±0,069	41,3
	±3,9	±0,069	±3,5	±3,9	±0,069	±3,5	±3,9		±3,5
1	139,7	0,475	37,2	153,8	0,474	36,6	151,9	0,428±0,006	40,3
	±4,7	±0,102	±2,8	±4,0	±0,011	±3,8	±7,9		±3,0
2	155,9	0,425	38,2	141,6	0,435	36,1	150,1	0,472±0,007	42,3
	±10,3	±0,031	±6,3	±5,5	±0,046	±6,2	±0,5		±0,9

3	155,0	0,438	33,7	170,2	0,369	37,3	153,8	0,550±0,108	40,0
	±2,2	±0,115	±7,9	±7,0	±0,030	±4,7	±6,4		±9,7
4	178,6	0,396	43,5	185,1	0,436	42,7	160,4	0,469±0,044	34,1
	±10,2	±0,080	±3,2	±2,4	±0,147	±1,6	±2,4		±0,8
8	148,4	0,481	43,8	179,4	0,609	43,3	188,7	0,558±0,042	38,7
	±0,9	±0,025	±8,2	±19,0	±0,245	±2,1	±3,6		±1,4

İki aylık stabilite çalışması değerlendirildiğinde F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının stabil kalmadığı, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinde büyük değişimler gerçekleşmediği gözlemlenmektedir. K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının stabilite çalışmaları devam ederken, F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonları için kriyoprotektanın değiştirilmesine ve yeniden optimizasyonun yapılmasına karar verilmiştir. Bu bağlamda kriyoprotektan olarak D-(+)-Mannitol tercih edilmiştir.

Deneme 4: Kriyoprotektan miktarının optimizasyonu

Formülasyonlar Deneme 1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. D-(+)-Mannitol miktarı, son hacimde %2, %4, %10, %20 ve %40 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunu sağlamak adına, distile su içerisinde 240mg/mL D-(+)-Mannitol stok çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlara yukarıdaki yüzdeleri elde etmek için sırasıyla 42µL, 85µL, 217µL, 450µL ve 1000µL stok çözeltiden ilave edilmiştir. Liyofilize edilen örnekler yeniden disperse edilmiş ve 4 saat boyunca belirli zaman aralıklarında partikül boyutu, partikül dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak analiz edilmiştir. Tablo 54 ve Tablo 55’de yeniden disperse edilen nanopartikül formülasyonlarının ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 54: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-mannitol içeren F1-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

F1-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	88,4±1,9	0,280±0,022	28,7±5,8
5	429,5±8,2	0,139±0,051	1,4±0,6
15	1000,0±19,1	0,488±0,062	-4,1±0,5

30	2294,0±423,6	1,000±0,000	0,3±0,3
60		Ölçüm yapılamamıştır	
120	4573,0±4000,0	0,536±0,312	0,9±0,4
180		Ölçüm yapılamamıştır	
240	1887,0±2248,0	0,846±0,0217	-1,6±1,2
F1-NMDA-%4			
0	103,3±1,3	0,329±0,127	24,8±0,7
5	508,9±11,1	0,347±0,042	-1,1±0,1
15	614,9±42,7	0,410±0,037	-0,2±1,0
30	771,4±6,0	0,448±0,054	1,2±0,6
60	991,0±43,9	0,034±0,016	1,6±0,8
120	2321,0±132,9	1,000±0,00	0,1±0,2
180	2495,0±1312,0	0,696±0,284	1,0±0,1
240	1618,0±470,2	0,859±0,199	1,6±0,3
F1-NMDA-%10			
0	88,6±1,4	0,255±0,031	43,7±7,1
5	153,4±4,3	0,189±0,105	2,47±1,1
15	170,6±8,2	0,198±0,011	4,8±0,7
30	198,1±16,3	0,374±0,133	2,6±1,1
60	361,2±158,5	0,438±0,030	3,0±0,3
120	964,9±228,6	0,502±0,500	1,3±0,8
180	1671,0±818,8	1,000±0,000	1,2±0,5
240	879,7±279,0	0,594±0,333	1,8±0,6
F1-NMDA-%20			
0	97,6±1,7	0,253±0,007	32,0±6,1
5	681,5±12,7	0,153±0,112	-8,4±0,5
15	643,0±23,7	0,319±0,022	-9,2±0,7
30	1026,0±73,8	0,127±0,019	-9,0±1,2
60	984,0±140,9	0,600±0,565	-10,1±0,6
120	1146,0±408,7	0,689±0,440	-9,6±0,7
180	97,6±1,7	0,253±0,007	32,0±6,1
240	681,5±12,7	0,153±0,112	-8,4±0,5
F1-NMDA-%40			
0	118,0±5,2	0,363±0,030	19,5±4,3

5	578,5±26,1	0,126±0,078	-6,1±0,6
15	612,4±35,9	0,245±0,035	-4,7±0,3
30	664,5±1,1	0,012±0,004	-6,6±0,5
60	660,0±63,1	0,425±0,071	-6,4±0,3
120	788,2±64,8	0,199±0,148	-6,7±0,3
180	922,0±4,7	0,379±0,054	-6,3±0,2
240	857,0±565,8	0,781±0,309	-4,8±0,6

D-(+)-Mannitol kullanılarak yapılan bu çalışmada F1-NMDA formülasyonunun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri karşılaştırıldığında formülasyonun liyofilize olmadığı gözlemlenmiştir. F1-NMDA formülasyonu için optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Tablo 55: Farklı konsantrasyonlarda D-(+)-mannitol içeren D-NMDA formülasyonunun yeniden disperse edilmesi sonucu elde edilen partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri

D-NMDA-%2			
Zaman (dk)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	53,4±0,7	0,252±0,033	31,0±0,6
5	195,4±8,8	0,188±0,025	18,4±0,7
15	642,5±277,4	0,692±0,281	25,6±4,5
30	202,9±15,9	0,371±0,066	27,2±1,5
60	205,9±6,2	0,191±0,001	28,3±1,1
120	215,9±24,0	0,264±0,075	23,9±1,9
180	202,4±13,3	0,281±0,016	23,6±1,4
240	201,1±0,6	0,255±0,021	23,5±2,1
D-NMDA-%4			
0	56,0±1,4	0,257±0,029	33,3±2,4
5	159,9±10,1	0,236±0,030	24,1±1,4
15	162,6±8,7	0,256±0,016	25,0±3,3
30	164,3±1,6	0,151±0,006	28,9±3,2
60	170,6±1,6	0,151±0,047	27,2±0,0
120	160,3±3,8	0,140±0,071	31,5±2,9

180	163,3±3,1	0,231±0,023	23,4±3,3
240	165,3±4,8	0,247±0,015	25,1±0,3
D-NMDA-%10			
0	74,0±1,5	0,340±0,051	32,6±3,5
5	155,2±2,5	0,228±0,006	28,3±0,8
15	148,9±1,5	0,176±0,054	30,5±0,9
30	148,9±0,6	0,214±0,029	26,5±5,7
60	157,4±6,7	0,217±0,058	33,6±2,1
120	156,4±7,0	0,179±0,021	31,7±2,6
180	152,1±2,1	0,225±0,037	33,3±5,7
240	155,4±7,2	0,201±0,018	28,9±1,4
D-NMDA-%20			
0	67,7±2,7	0,268±0,024	29,8±0,9
5	127,3±1,6	0,183±0,046	24,1±1,2
15	127,3±2,4	0,174±0,002	32,2±0,1
30	67,75±2,7	0,268±0,024	29,8±0,9
60	127,3±1,6	0,183±0,046	24,1±1,2
120	127,3±2,4	0,174±0,002	32,2±0,1
180	126,8±1,9	0,138±0,057	28,4±2,8
240	129,9±2,6	0,170±0,018	28,6±1,9
D-NMDA-%40			
0	89,4±15,9	0,250±0,137	36,0±0,1
5	123,1±1,2	0,154±0,037	18,4±2,8
15	121,7±3,8	0,236±0,021	25,9±3,6
30	120,1±2,6	0,196±0,008	21,6±1,9
60	135,9±14,5	0,243±0,204	27,5±1,4
120	125,8±1,4	0,146±0,068	24,5±0,8
180	125,7±0,8	0,161±0,031	24,9±6,4
240	139,3±0,7	0,235±0,006	30,8±4,8

D-NMDA formülasyonu için D-(+)-mannitol ile yapılan liyofilizasyon çalışmasında partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlendirildiğinde son hacimde %40 mannitol içeren formülasyon ideal olarak bulunmuştur. Stabilité çalışmalarına başlanmış ve sonuçları beklenmektedir.

Kriyoprotektan ilavesinden sonra formülasyonlar 2 mL olacak şekilde 10 mL'lik flakonlara doldurulmuştur. 2 saat süre boyunca -20°C'deki dondurucuda, 10mL'lik cam flakonlarda dondurulmuşlardır. Daha sonra 48 saat süre boyunca, -45°C'de, 17 mTorr basınç altında liyofilizatör cihazı ile liyofilize edilmiştir. Ölçümler için formülasyonlar yeniden istenilen konsantrasyonu sağlaması için ihtiyaç duyulan miktarda distile su ile yeniden disperse edilmiştir. Liyofilize formülasyonların dokuz aylık fiziksel ve kimyasal stabilitesi kontrol edilmiştir. Tablo 53'de liyofilize formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümlemlerini göstermektedir.

Tablo 56: F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA kodlu formülasyonların dokuz aylık stabilite çalışmasının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilmesi

Zaman (ay)	F1-NMDA-4°C			F1-NMDA-25°C			F1-NMDA-40°C		
	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potansiyeli (mv)
	± SS		± SS	± SS		± SS	± SS		± SS
0	109,8±11,8	0,237±0,060	32,3±3,2	109,8±11,8	0,237±0,060	32,3±3,2	109,8±11,8	0,237±0,060	32,3±3,1
0,25	478,4±2,8	0,465±0,033	-2,23±0,7	606,7±114,1	0,821±0,254	-5,86±1,4	221,3±19,6	0,297±0,018	-10,7±0,6
0,5	461,8±175,6	0,440±0,156	-6,71±0,5	556,7±68,1	0,468±0,004	-5,83±1,0	390,5±114,9	0,493±0,206	-6,93±2,5
0,75	270,0±0,5	0,530±0,325	-6,36±0,9	354,8±86,9	0,502±0,012	-5,07±0,1	433,3±83,5	0,440±0,093	-13,6±2,3
1	1066±532,0	0,808±0,271	25,7±0,6	303,9±105,5	0,423±0,072	1,63±0,1	348,3±47,0	0,403±0,108	3,98±1,8
2	1100±708,5	0,746±0,205	-12,9±13,1	1736±1630	0,762±0,337	-6,64±7,3	387,0±52,4	0,213±0,261	-6,20±0,8
3	245,9±323,5	0,986±0,011	0,993±1,78	220,92±5,81	0,212±0,064	2,74±3,72	218,3±17,82	0,345±0,004	0,0375±1,11
6	137,7±4,384	0,289±0,022	-18,2±10,6	199,7±17,96	0,117±0,037	-17,0±0,424	289,4±27,15	0,098±0,005	-1,95±2,76
9	316,6±123,3	0,342±0,029	-3,94±2,70	276,0±47,45	0,495±0,002	-13,6±0,424	278,9±32,75	0,365±0,042	-21,7±0,252
12	313,8±19,5	0,280±0,008	17,9±5,6	267,35±3,04	0,162±0,021	13,4±0,14	402,45±32,17	0,330±0,028	-5,185±1,336
Zaman (ay)	D-NMDA-4°C			D-NMDA-25°C			D-NMDA-40°C		
	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potansiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potansiyeli (mv)
	± SS		± SS	± SS		± SS	± SS		± SS
0	66,9±3,2	0,106±0,023	32,4±5,7	66,9±3,2	0,106±0,048	32,400±5,71	66,95±3,220	0,106±0,048	32,4±5,71
0,25	218,9±6,5	0,264±0,010	43,5±1,5	491,9±190,4	0,499±0,132	31,900±0,361	277,3±32,03	0,317±0,021	29,6±6,03
0,5	343,5±21,7	0,396±0,039	33,5±0,7	256,0±23,2	0,512±0,026	34,800±2,90	234,6±10,54	0,438±0,089	30,1±4,10

0,75	Ölçüm yapılamamıştır			424,4±124,2	0,382±0,168	9,870±0,891	363,0±30,83	0,342±0,006	5,44±0,00
1	200,0±34,2	0,308±0,023	26,2±0,4	183,6±24,8	0,292±0,011	20,80±4,03	200,5±8,768	0,282±0,037	22,8±1,70
2	1249±965,0	0,581±0,284	7,74±2,1	837,3±7,1	0,441±0,1	0,215±0,400	763,8±26,9	0,422±0,3	3,80±1,1
3	391,1±70,36	0,561±0,226	2,69±2,60	430,2±105,5	0,572±0,045	15,6±0,778	255,9±12,37	0,414±0,100	18,5±0,495
6	541,2±278,9	0,516±0,179	13,9±2,19	562,5±33,59	0,488±0,011	0,627±0,556	113,4±16,55	0,482±0,037	2,98±0,445
9	137,8±6,437	0,344±0,001	3,53±0,251	463,5±6,718	0,491±0,019	-10,4±1,23	353,0±74,77	0,442±0,064	-14,5±2,60
12	253,9±9,33	0,169±0,125	0,629±0,893	300,2±25,47	0,258±0,07	-21,7±1,9	192,025±5,663	0,241±0,048	12,875±0,602
K1-PEG-NMDA-4°C				K1-PEG-NMDA-25°C			K1-PEG-NMDA-40°C		
Zaman (ay)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)
	± SS		± SS	± SS		± SS	± SS		± SS
0	243,8±17,1	0,322±0,054	49,5±1,4	243,8±17,1	0,322±0,054	49,5±1,4	243,8±17,1	0,322±0,054	49,5±1,4
0,25	255,7±11,6	0,318±0,036	47,4±0,7	265,6±18,1	0,386±0,016	46,5±1,3	265,3±13,6	0,373±0,100	44,9±2,4
0,5	249,5±14,5	0,377±0,115	50,4±1,1	264,9±12,7	0,407±0,120	49,6±0,6	259,0±3,1	0,373±0,146	45,4±3,9
0,75	248,1±0,1	0,417±0,011	47,2±0,4	274,0±15,2	0,359±0,004	48,2±1,8	271,8±11,6	0,294±0,011	47,0±2,9
1	227,3±5,5	0,325±0,065	46,5±0,5	232,8±16,6	0,271±0,007	44,5±0,8	228,3±9,7	0,331±0,080	49,1±0,8
2	275,1±36,2	0,346±0,017	47,0±0,2	272,0±5,9	0,374±0,096	47,7±0,4	237,9±4,5	0,374±0,030	50,3±2,1
3	247,6±5,162	0,333±0,005	48,0±3,61	241,9±0,212	0,266±0,035	45,0±2,62	243,1±1,626	0,393±0,001	45,4±3,25
6	239,2±5,091	0,291±0,013	40,9±0,707	220,3±1,556	0,382±0,140	43,3±1,34	196,6±7,566	0,347±0,042	34,6±0,990
9	241,4±11,89	0,333±0,024	45,0±0,600	252,2±4,432	0,344±0,087	44,8±2,57	259,5±7,872	0,303±0,022	41,8±2,36
12	273,766±8,957	0,287±0,024	43,63±1,10	263,3±3,08	0,309±0,035	45,35±1,79	270,8±7,9	0,324±0,016	45,325±0,953
K2-PEG-NMDA-4°C				K2-PEG-NMDA-25°C			K2-PEG-NMDA-40°C		
Zaman (ay)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)
	± SS		± SS	± SS		± SS	± SS		± SS
0	144,1±12,2	0,392±0,065	40,0±5,0	144,1±12,2	0,392±0,065	40,0±5,0	144,1±12,2	0,392±0,065	40,0±5,0
0,25	164,8±10,2	0,360±0,035	33,0±3,1	147,7±5,2	0,339±0,033	40,3±0,8	134,5±8,4	0,452±0,012	35,2±9,0
0,5	139,6±0,3	0,431±0,066	40,6±6,9	143,4±1,5	0,368±0,081	41,2±2,3	146,4±0,2	0,444±0,045	27,9±2,4
0,75	154,9±14,9	0,476±0,068	30,4±0,9	161,1±0,1	0,403±0,054	35,1±7,9	163,1±5,5	0,410±0,040	42,0±4,9
1	157,9±12,5	0,336±0,043	28,6±2,2	159,4±6,5	0,396±0,037	38,9±3,5	161,1±7,8	0,456±0,021	30,9±8,2
2	157,4±7,9	0,386±0,030	38,3±18,8	161,6±2,3	174,3±11,31	35,8±1,7	160,9±10,0	0,394±0,059	54,1±14,8
3	146,9±1,838	0,435±0,001	28,1±4,81	152,8±11,24	0,431±0,063	20,0±8,84	152,1±12,02	0,304±0,024	27,0±6,86
6	190,1±4,879	0,356±0,024	26,1±2,90	169,6±5,586	0,368±0,095	33,5±15,7	159,4±22,91	0,533±0,045	44,3±2,97
9	178,0±8,633	0,400±0,065	29,5±2,16	218,8±20,84	0,427±0,096	30,0±1,42	213,8±29,10	0,441±0,123	24,3±6,11
12	169,5±11,3	0,374±0,047	23,2±0,1	215,5±3,5	0,478±0,105	48,15±0,14	192,475±9,911	0,435±0,050	37,0±0,556
K3-PEG-NMDA-4°C				K3-PEG-NMDA-25°C			K3-PEG-NMDA-40°C		
Zaman (ay)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)	Partikül Boyutu (nm)	PDI ± SS	Zeta Potensiyeli (mv)
	± SS		± SS	± SS		± SS	± SS		± SS
0	140,0±3,9	0,451±0,069	41,3±3,5	140,0±3,9	0,451±0,069	41,3±3,5	140,0±3,9	0,451±0,069	41,3±3,5
0,25	139,7±4,7	0,475±0,102	37,2±2,8	153,8±4,0	0,474±0,011	36,6±3,8	151,9±7,9	0,428±0,006	40,3±3,0
0,5	155,9±10,3	0,425±0,031	38,2±6,3	141,6±5,5	0,435±0,046	36,1±6,2	150,1±0,5	0,472±0,007	42,3±0,9
0,75	155,0±2,2	0,438±0,115	33,7±7,9	170,2±7,0	0,369±0,030	37,3±4,7	153,8±6,4	0,550±0,108	40,0±9,7
1	178,6±10,2	0,396±0,080	43,5±3,2	185,1±2,4	0,436±0,147	42,7±1,6	160,4±2,4	0,469±0,044	34,1±0,8

2	148,4±0,9	0,481±0,025	43,8±8,2	179,4±19,0	0,609±0,245	43,3±2,1	188,7±3,6	0,558±0,042	38,7±1,4
3	168,7±0,000	0,632±0,161	43,6±6,36	156,4±0,495	0,489±0,082	40,8±0,990	168,9±26,73	0,572±0,006	33,3±3,11
6	206,3±19,23	0,328±0,057	32,8±12,0	175,9±35,43	0,397±0,136	42,3±6,72	148,8±8,556	0,476±0,011	28,3±0,919
9	241,0±21,36	0,588±0,138	42,2±4,40	164,5±10,24	0,446±0,054	30,1±6,42	171,1±8,958	0,475±0,013	30,0±5,04
12	153,3±5,7	0,452±0,017	43,5±2,7	187,05±18,31	0,327±0,040	43,15±0,77	182,2±13,1	0,381±0,002	36,65±0,77

On iki aylık stabilite çalışması değerlendirildiğinde F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının stabil kalmadığı, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinde büyük değişimler gerçekleşmediği gözlemlenmektedir. Bu sebeple hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin liyofilize bir şekilde saklanabileceği öngörülmektedir.

4.3.3.2. Liyofilize Toz Formülasyonların % Nem Tayinine Ait Bulgular

F1-NMDA formülasyonunun liyofilizasyon optimizasyonları devam ettiğinden ve D-NMDA formülasyonunun ise liyofilizasyon çalışmaları devam ettiğinden dolayı % nem içerikleri tayin edilememiştir. K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG NMDA formülasyonlarının % nem tayini gerçekleştirilmiştir.

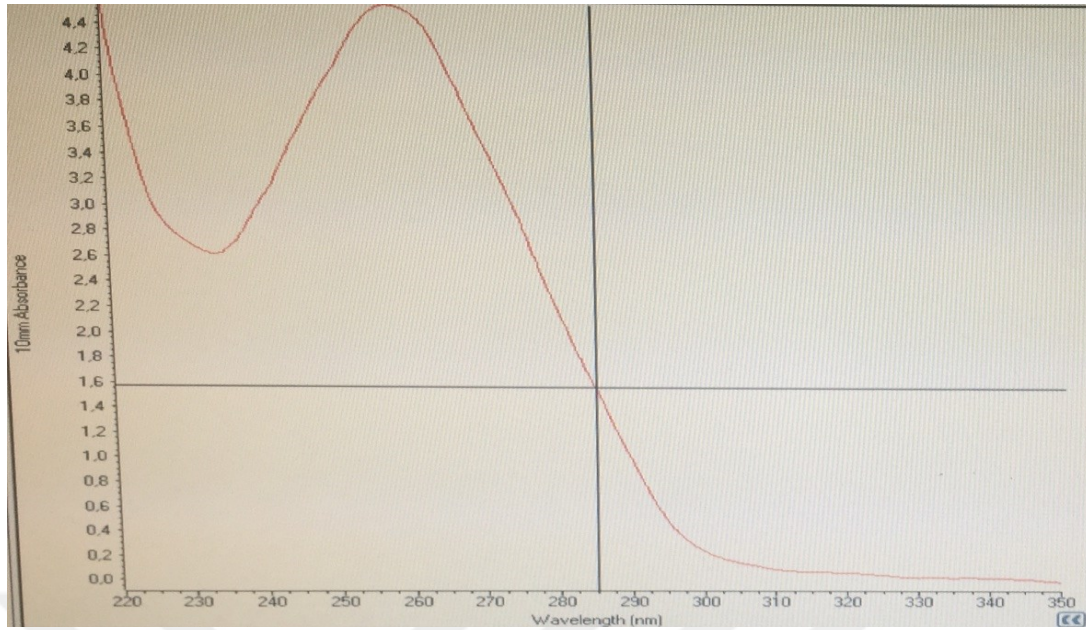
K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG NMDA liyofilize formülasyonlarına ait % nem miktarı Tablo 57 'da gösterilmiştir

Tablo 57: K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının içerik nem miktar yüzdeleri

Formülasyon	İçerik Nem Yüzdesi (%)
K1-PEG-NMDA	0,0513
K2-PEG-NMDA	0,0113
K3-PEG-NMDA	0,0143

4.3.4. Agaroz Jel Elektrophorez Çalışmalarına Ait Bulgular

Elektrophorez işlemi sonrası, UV transilüminatör üzerinde incelenen jeller fotoğraflar ile değerlendirildi. Şekil 84'de siRNA'nın spektrofotometrik kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 84: siRNA'nın spektrofotometrik konsantrasyon eğrisi

İdeal hazırlama metotları belirtilen nanopartiküller için

Tablo 58' de verilen polimer:siRNA oranları kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin siRNA tutma oranları jel elektroforez ile hesaplandı. Polimer:siRNA oranı, mikrolitredeki milligram polimer ve gen hesaplanarak belirlenmiştir.

Tablo 58: Jel elektroforez çalışmasında kullanılan polimer:gen oranları ve elde edilen sonuçlar

	ÜRÜN	SIRA	ORAN (a/a)	POLİMER MİKTARI (µL)	siRNA MİKTARI (µL)	LOADING DYE (µL)	ULTRA SAF SU (µL)	SONUÇ
0,55 µL	siRNA	1	0:1	-	0,55	1	8,45	<i>band var</i>
K2	Chi + HE-EDA + PEG + NMDA	2	3:1	1,2	0,55	1	7,25	<i>(10:1) de polimerin siRNA'yı tuttuğu görüldü.</i>
		3	5:1	2,0	0,55	1	6,45	
		4	7:1	2,8	0,55	1	5,65	
		5	10:1	4,0	0,55	1	4,45	
		6	12:1	4,8	0,55	1	3,65	
		7	20:1	8	0,55	1	0,45	
K 1	C +	8	3:1	1,2	0,55	1	7,25	<i>(5:1) de</i>

		9	5:1	2,0	0,55	1	6,45	<i>polimerin siRNA'yı tuttuğu görüldü.</i>
		10	7:1	2,8	0,55	1	5,65	
		11	10:1	4,0	0,55	1	4,45	
		12	12:1	4,8	0,55	1	3,65	
		13	20:1	8	0,55	1	0,45	

	ÜRÜN	SIRA	ORAN (a/a)	POLİMER MİKTARI (µL)	siRNA MİKTARI (µL)	LOADING DYE (µL)	ULTRA SAF SU SU (µL)	SONUÇ
0,55 µL	siRNA	1	0:1	-	0,55	1	8,45	<i>band var</i>
K3	Chi + GA+ HE- EDA + PEG + NMIDA	2	0,5:1	0,2	0,55	1	8,25	<i>(3:1) de polimerin siRNA'yı tuttuğu görüldü.</i>
		3	1:1	0,4	0,55	1	8,05	
		4	2:1	0,8	0,55	1	7,65	
		5	3:1	1,2	0,55	1	7,25	
		6	5:1	2,0	0,55	1	6,45	
		7	7:1	2,8	0,55	1	5,65	
		8	10:1	4,0	0,55	1	4,45	
		9	12:1	4,8	0,55	1	3,65	
		10	20:1	8	0,55	1	0,45	

	ÜRÜN	SIRA	ORAN (a/a)	POLİMER MİKTARI (µL)	siRNA MİKTARI (µL)	LOADING DYE (µL)	ULTRA SAF SU SU (µL)	SONUÇ
0,55 µL	siRNA	1	0:1	-	0,55	1	8,5	<i>band var</i>
F1 PBAE	F1 PBAE Enkapsülasyon	2	20:1	0,5	0,55	1	9,5	<i>(40:1) de polimerin siRNA'yı tuttuğu görüldü.</i>
		3	25:1	0,625	0,55	1	11,88	
		4	30:1	0,75	0,55	1	14,25	
		5	40:1	1	0,55	1	19	
		6	50:1	1,25	0,55	1	23,75	
		7	60:1	1,5	0,55	1	28,5	
	F1 PBAE İyonik Etkileşim	8	20:1	0,5	0,55	1	9,5	<i>(60:1) de polimerin siRNA'yı</i>
		9	25:1	0,625	0,55	1	11,88	
		10	30:1	0,75	0,55	1	14,25	

		11	40:1	1	0,55	1	19	tuttuğu görüldü.
		12	50:1	1,25	0,55	1	23,75	
		13	60:1	1,5	0,55	1	28,5	

	ÜRÜN	SIRA	ORAN (a/a)	POLİMER MİKTARI (µL)	siRNA MİKTARI (µL)	LOADING DYE (µL)	ULTRA SAF SU (µL)	SONUÇ
	0,55 µL siRNA	1	0:1	-	0,55	1	8,5	band var
D PBAE	D PBAE Enkapsülasyon	2	1:1	0,1	0,55	1	0,49	Np'deki su oranları dikkate alınarak belirtilen miktarlarda su konuldu. Fakat jele 10µL'lik örnekler konulduğu için kuyucuklara yükleme yapılmadan önce toplam hacim 10µL olacak şekilde suyla tamamlandı.
		3	3:1	0,3	0,55	1	1,47	
		4	5:1	0,5	0,55	1	2,45	
		5	7:1	0,7	0,55	1	3,43	
		6	10:1	1	0,55	1	4,9	
		7	20:1	2	0,55	1	9,8	
		8	1:1	0,1	0,55	1	0,49	(3:1) de polimerin siRNA'yı tuttuğu görüldü.
	D PBAE İyonik Etkileşim	9	3:1	0,3	0,55	1	1,47	
		10	5:1	0,5	0,55	1	2,45	
		11	7:1	0,7	0,55	1	3,43	
		12	10:1	1	0,55	1	4,9	
		13	20:1	2	0,55	1	9,8	

*Gri renk ile gösterilen (polimer:siRNA) oranlarında polimerin tamamen siRNA'yı enkapsülasyon veya iyonik etkileşimle tuttuğu görülmektedir.

K2-NMDA (Chi + HE-EDA + PEG + NMDA) ve K1-NMDA (Chi + GA+ DAPC + PEG + NMDA) ait Jel Elektroforez görüntüsü:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
siRNA	K2						K1					
0,1µg	3:1	5:1	7:1	10:1	12:1	20:1	3:1	5:1	7:1	10:1	12:1	20:1



K3-NMDA (Chi + GA+ HE- EDA + PEG + Asp. Acid) Jel Elektroforez görüntüsü:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
siRNA	K3								
0,1µg	0,5:1	1:1	2:1	3:1	5:1	7:1	10:1	12:1	20:1



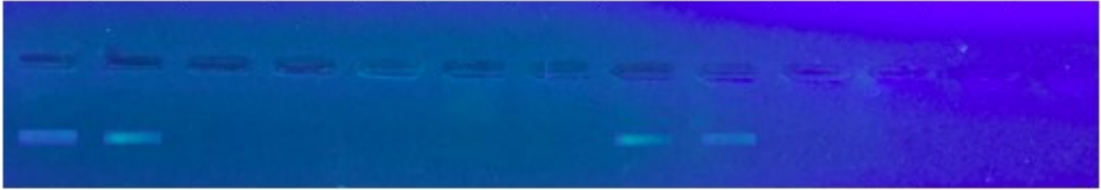
F1-NMDA Jel Elektroforez görüntüsü:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
siRNA	F1											
0,1µg	20:1	25:1	30:1	40:1	50:1	60:1	20:1	25:1	30:1	40:1	50:1	60:1



D -NMDA Jel Elektroforez görüntüsü:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
siRNA	D											
0,1µg	1:1	3:1	5:1	7:1	10:1	20:1	1:1	3:1	5:1	7:1	10:1	20:1



Şekil 85: F1-NMDA, D1-NMDA, K1-NMDA, K2-NMDA, K3-NMDA polimerlerinden elde edilen nanopartikül formülasyonlarının jel elektroforez görüntüleri

4.3.5. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Serum Stabilitelerinin İncelenmesine ait Bulgular

Ölçüm sonuçları Tablo 59’da gösterilmiştir.

Tablo 59: %0,5 ve %1 (a/a) FBS varlığında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli değerleri

Zaman (Saat)	Partikül Büyüklüğü nm±SD		PDI±SD		Zeta Potansiyeli (mV)	
	%0,5 FBS	%1 FBS	%0,5 FBS	%1 FBS	%0,5 FBS	%1 FBS
D-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller						
0	154,1 ±4,3	118,8 ±4,1	0,130 ±0,010	0,137 ±0,010	-8,27 ±0,76	-7,05 ±3,26
1	193,9 ±2,0	160,1 ±0,1	0,146 ±0,023	0,191 ±0,006	-8,57 ±0,70	-7,68 ±1,14
2	197,1 ±0,9	150,1 ±0,8	0,147 ±0,037	0,170 ±0,001	-8,10 ±1,20	-7,74 ±0,29
4	192,1 ±5,6	149,6 ±1,9	0,158 ±0,017	0,182 ±0,001	-8,43 ±0,26	-7,93 ±0,73
6	195,9 ±2,7	150,3 ±1,2	0,160 ±0,023	0,157 ±0,018	-7,14 ±0,04	-7,18 ±0,5
18	190,8 ±0,8	149,1 ±0,2	0,177 ±0,043	0,155 ±0,012	-12,3 ±1,0	-10,9 ±0,3
F1-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller						
0	156,9 ±1,9	147,8 ±1,7	0,082 ±0,028	0,225 ±0,008	-8,27 ±1,07	-7,36 ±2,03
1	180,4 ±2,1	136,8 ±2,1	0,147 ±0,003	0,075 ±0,011	-20,5 ±3,7	-4,79 ±1,61
2	178,4 ±0,4	135,2 ±0,2	0,125 ±0,020	0,124 ±0,015	-23,3 ±0,3	-5,84 ±1,41
4	177,1 ±0,2	156,9 ±2,8	0,108 ±0,050	0,198 ±0,018	-17,1 ±3,0	5,03 ±0,48
6	174,4 ±3,3	333,5 ±9,9	0,073 ±0,002	0,428 ±0,028	-1,22 ±0,47	-4,51 ±0,98
18	177,6 ±3,5	352,3 ±22,0	0,125 ±0,027	0,432 ±0,058	-19,,6 ±3,0	-6,30 ±0,20

K1-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller

0	120,0 ±1,9	231,9 ±20,9	0,358 ±0,061	0,343 ±0,008	12,6 ±3,3	10,8 ±0,4
1	130,3 ±0,2	2987 ±87,68	0,336 ±0,073	0,428 ±0,010	10,9 ±1,7	7,25 ±0,52
2	135,8 ±0,1	5763 ±270,1	0,355 ±0,001	0,634 ±0,044	13,3 ±0,5	8,03 ±0,30
4	202,1 ±1,6	5979 ±1082	0,506 ±0,148	1,000 ±0,000	10,9 ±0,7	7,26 ±0,15
6	232,7 ±0,0	4626 ±978,6	0,480 ±0,000	1,000 ±0,000	13,9 ±0,0	8,54 ±1,94
18	230,0 ±2,6	2056 ±195,9	0,503 ±0,143	1,000 ±0,000	12,8 ±0,0	3,95 ±0,14

K2-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller

0	61,8 ±2,4	72,3 ±3,5	0,622 ±0,161	0,822 ±0,064	15,3 ±1,0	10,5 ±2,4
1	93,7 ±4,1	65,8 ±0,3	0,712 ±0,052	0,452 ±0,003	13,4 ±0,0	8,71 ±0,53
2	72,5 ±6,7	96,2 ±1,9	0,731 ±0,139	0,508 ±0,031	10,6 ±1,2	7,84 ±0,78
4	187,8 ±12,0	317,4 ±13,5	0,963 ±0,052	0,985 ±0,021	12,6 ±0,1	9,22 ±0,16
6	244,7 ±25,3	516,1 ±25,4	0,733 ±0,192	0,728 ±0,101	11,4 ±0,2	7,16 ±0,10
18	243,3 ±9,8	965,2 ±145,4	0,934 ±0,082	1,000 ±0,000	8,67 ±0,2	7,26 ±0,19

K3-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller

0	68,6 ±2,6	96,8 ±5,2	0,538 ±0,132	0,495 ±0,062	12,3 ±6,4	12,6 ±1,3
1	74,6 ±17,6	72,5 ±1,4	0,400 ±0,272	0,436 ±0,025	12,6 ±0,2	9,43 ±2,93
2	66,1 ±2,2	83,8 ±0,5	0,534 ±0,122	0,452 ±0,039	8,63 ±2,9	9,02 ±0,94
4	75,4 ±3,0	111,4 ±1,6	0,472 ±0,043	0,412 ±0,003	12,3 ±0,8	8,87 ±0,09
6	84,9 ±7,2	151,3 ±6,1	0,614 ±0,032	0,472 ±0,007	9,78 ±1,0	9,17 ±1,06
18	118,3	326,4	0,684	1,000	8,86	7,30

$\pm 6,7$ $\pm 15,3$ $\pm 0,057$ $\pm 0,000$ $\pm 0,8$ $\pm 0,47$

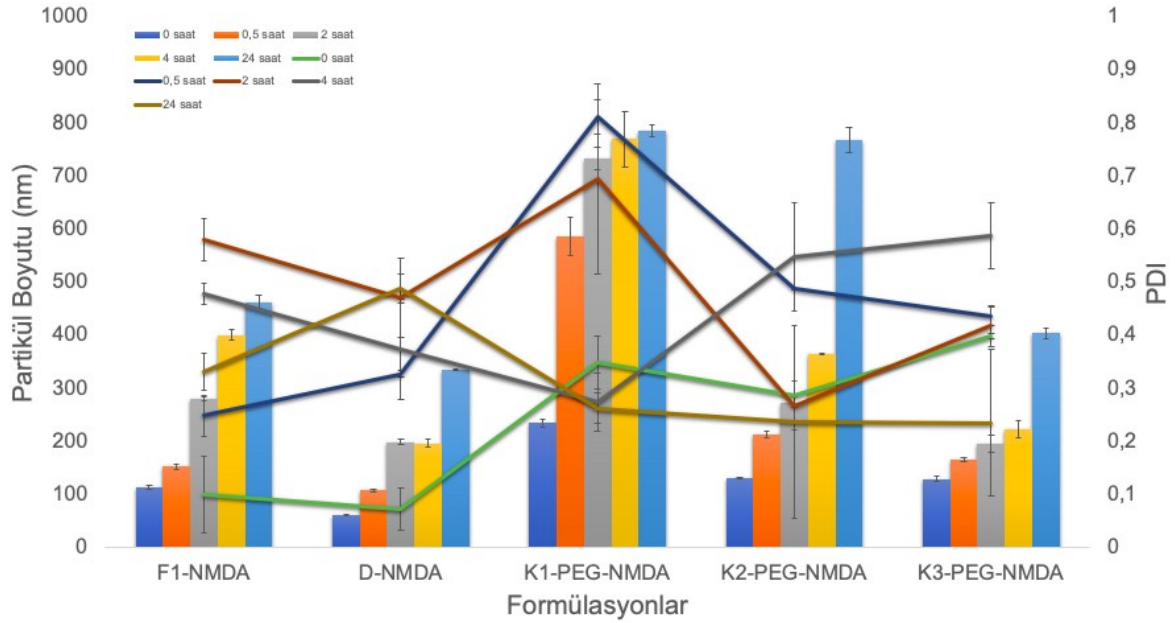
Ayrıca, belirlenen zaman aralıklarında belirli miktarda nanopartikül dispersiyonu alınarak, zamana bağlı olarak siRNA'nın bütünlüğünde herhangi bir değişiklik olup olmadığı poliakrilamid gel elektroforez yöntemi ile incelenmiştir.

Kan dolaşımına verilecek siRNA yüklü F1-NMDA, D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA nanopartiküllerin, serum varlığında fiziksel stabilitelerinin ölçüm sonuçları Tablo 60 ve Şekil 86 de gösterilmiştir.

Tablo 60: %5 FBS varlığında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli değerleri

F1-NMDA			
Zaman (saat)	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0	114,2 $\pm$ 2,7	0,101 $\pm$ 0,073	25,1 $\pm$ 0,2
0,5	153,1 $\pm$ 4,7	0,249 $\pm$ 0,038	-5,2 $\pm$ 0,2
2	281,6 $\pm$ 3,8	0,581 $\pm$ 0,040	-2,6 $\pm$ 1,2
4	400,8 $\pm$ 9,9	0,479 $\pm$ 0,019	-10,2 $\pm$ 0,8
24	463,5 $\pm$ 12,1	0,331 $\pm$ 0,035	-10,1 $\pm$ 0,1
D-NMDA			
0	62,4 $\pm$ 0,1	0,074 $\pm$ 0,040	28,9 $\pm$ 0,8
0,5	108,8 $\pm$ 2,0	0,328 $\pm$ 0,006	-10,4 $\pm$ 0,6
2	199,9 $\pm$ 4,9	0,471 $\pm$ 0,074	-10,3 $\pm$ 0,3
4	197,4 $\pm$ 7,1	0,375 $\pm$ 0,094	-10,7 $\pm$ 0,4
24	335,5 $\pm$ 1,2	0,489 $\pm$ 0,028	-11,4 $\pm$ 0,1
K1-PEG-NMDA			
0	235,3 $\pm$ 8,4	0,349 $\pm$ 0,049	53,6 $\pm$ 2,9
0,5	586,8 $\pm$ 36,4	0,812 $\pm$ 0,032	12,8 $\pm$ 0,1
2	733,7 $\pm$ 20,1	0,695 $\pm$ 0,180	10,3 $\pm$ 0,2
4	770,2 $\pm$ 53,0	0,275 $\pm$ 0,054	9,85 $\pm$ 0,4
24	785,5 $\pm$ 11,8	0,263 $\pm$ 0,028	10,3 $\pm$ 0,2
K2-PEG-NMDA			
0	131,8 $\pm$ 0,6	0,287 $\pm$ 0,001	43,0 $\pm$ 2,5
0,5	213,7 $\pm$ 6,6	0,488 $\pm$ 0,001	12,9 $\pm$ 0,9
2	274,0 $\pm$ 10,1	0,268 $\pm$ 0,046	11,1 $\pm$ 1,1
4	366,0 $\pm$ 0,8	0,549 $\pm$ 0,102	10,6 $\pm$ 0,9

24	768,3±23,6	0,238±0,181	8,68±0,3
K3-PEG-NMDA			
0	129,7±4,3	0,399±0,004	47,0±1,4
0,5	166,0±3,2	0,437±0,017	16,5±0,5
2	197,2±15,7	0,418±0,038	13,9±0,5
4	224,3±16,6	0,589±0,062	13,0±0,5
24	404,6±10,5	0,236±0,139	9,62±0,3



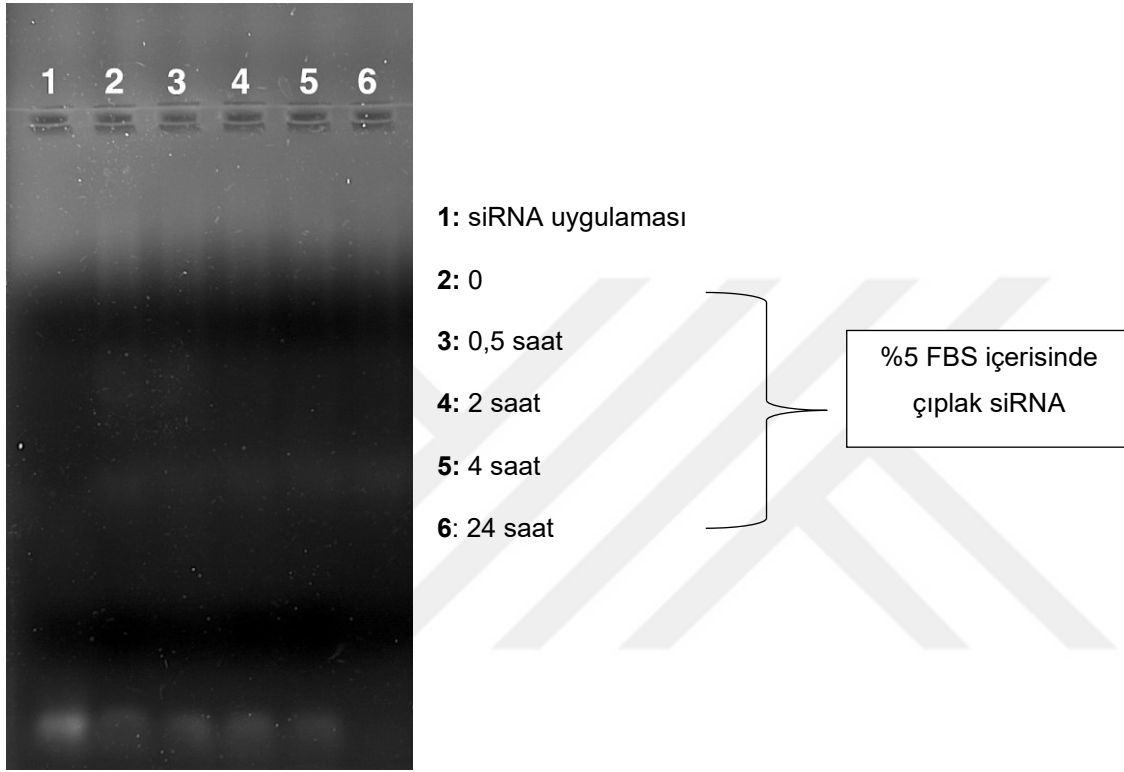
Şekil 86: %5 (h/h) FBS varlığında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli değerleri

Yapılan bu çalışma neticesinde formülasyonların 24 saate yaklaşıırken partikül boyutu ve polidispersite indeklerinin arttığı gözlemlenmiştir. En çok değişikliği ise K1-PEG-NMDA nanopartikül formülasyonu göstermiştir. Nanopartiküllerin 0, 0,5, 2, 4 ve 24.saatlerde siRNA'nın bütünlüğünü ne kadar koruduğu ise agaroz jel elektroforez ve poliakrilamid jel elektroforez çalışmaları ile gösterilmiştir.

Nanopartiküler formülasyonların siRNA'nın bütünlüğünü ne kadar koruduğunu analiz etmek için 4 µg siRNA'yı ihtiva edecek formülasyonlar hazırlanmıştır. FBS'nin son konsantrasyonu %5 olacak şekilde FBS ile zenginleştirilmiş %30'luk DMEM'den gerekli hacimde nanopartiküler formülasyona eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0, 0,5, 2, 4, 24 saat) 30 µL örnekler alınmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir. Örnekler agaroz ve poliakrilamid jele uygulanmadan önce serum aktivitesini sonlandırmak için 80°C'de 5dk su banyosunda bekletilmişlerdir. Daha sonra

siRNA'nın nanopartiküllerden ayrılması için 5 μ L (1000 IU) heparin formülasyonlara eklenmiş ve 1 saat boyunca beklenmiştir ^{42,88}.

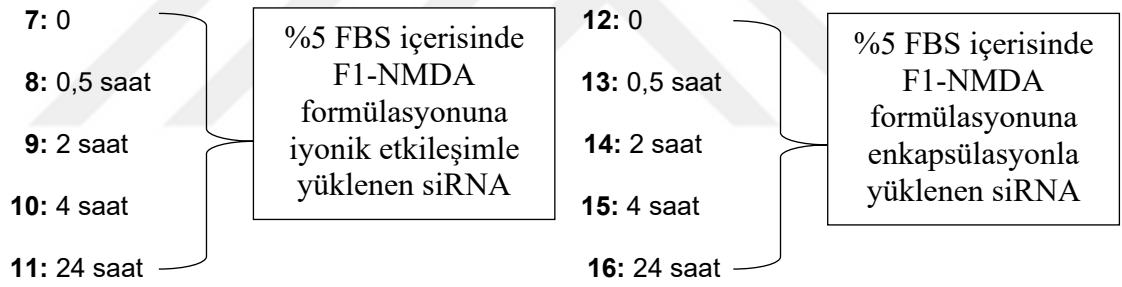
Şekil 87, Şekil 89, Şekil 89, Şekil 90 agaroz jel örneklerini, Şekil 91, Şekil 92 ise poliakrilamid jel örneklerini göstermektedir.



Şekil 87: %5 FBS içerisindeki çıplak siRNA'nın agaroz jelde elektroforetik hareketi



Şekil 88: F1-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşim ve enkapsülasyon ile yüklenmiş siRNA'nın agaroz jelde elektroforetik hareketi





Şekil 89: D-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşim ve enkapsülasyonla, K1-PEG-NMDA ve K2-PEG-NMDA formülasyonlarına iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın agaroz jeldeki elektroforetik hareketi

17: siRNA uygulaması

18: 0

19: 0,5 saat

20: 2 saat

21: 4 saat

22: 24 saat

%5 FBS içerisinde
D-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

31: siRNA uygulaması

28: 0

29: 0,5 saat

30: 2 saat

32: 4 saat

33: 24 saat

%5 FBS içerisinde
K1-PEG-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

23: 0

24: 0,5 saat

25: 2 saat

26: 4 saat

27: 24 saat

%5 FBS içerisinde
D-NMDA
formülasyonuna
enkapsülasyonla
yüklenen siRNA

34: 0

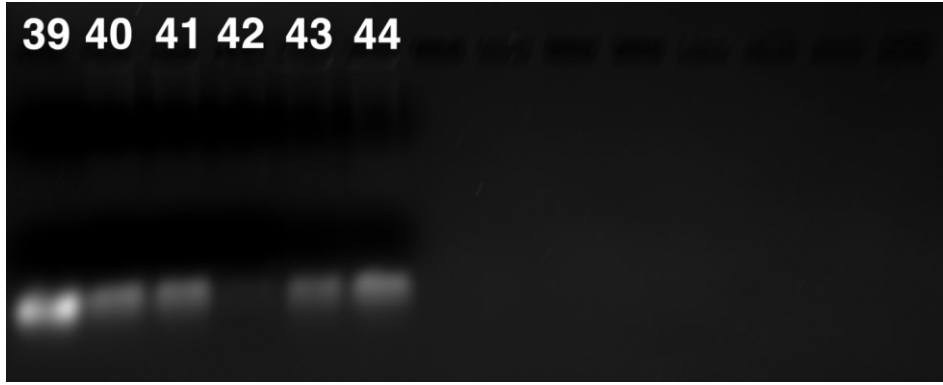
35: 0,5 saat

36: 2 saat

37: 4 saat

38: 24 saat

%5 FBS içerisinde
K2-PEG-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA



Şekil 90: K3-PEG-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın agaroz jeldeki elektorforetik hareketi

39: siRNA uygulaması

40: 0

41: 0,5 saat

42: 2 saat

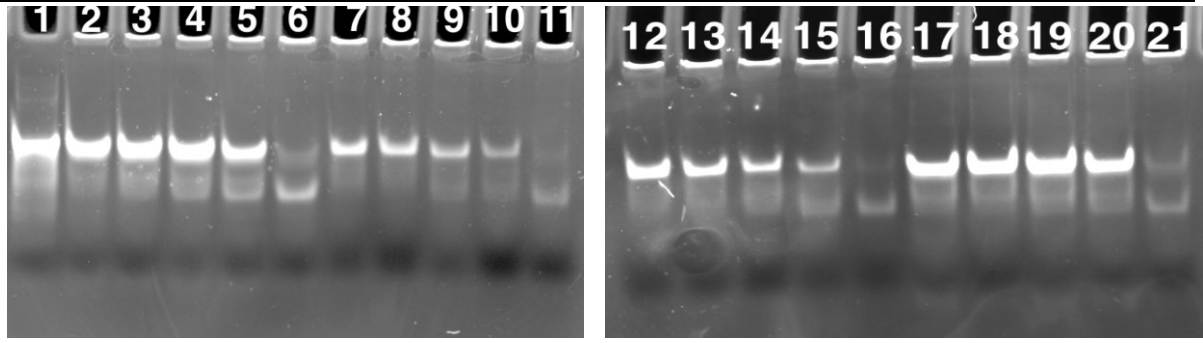
43: 4 saat

44: 24 saat

%5 FBS içerisinde
K3-PEG-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

siRNA'nın agaroz jel elektroforezde yürütülmesi sonucunda F1-NMDA hariç bütün nanopartikül formülasyonlarının siRNA'yı 24 saat boyunca serum aktivitesinden koruduğu gözlemlenmiştir. F1-NMDA formülasyonunun olduğu siRNA bantlarının soluk görünmesinin sebebi ise F1-NMDA nanopartikül formülasyonuna siRNA yükleme kapasitesinin polimer:siRNA oranının sırası ile 60:1 iyonik etkileşim, 40:1 enkapsülasyon ile yüklenebilmesidir. 4 µg siRNA'nın F1-NMDA formülasyonuna yüklenebilmesi için yaklaşık 1,5 mL'lik nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. Agaroz jeldeki kuyucuklara ise maksimum 12 µL örnek yüklenmiştir. Bu yüzden F1-NMDA formülasyonu için, oldukça düşük miktarda siRNA kuyucuklara yüklenmiş olmasına rağmen bantlar yine de görülmüştür.

Poliakrilamid jel elektroforez çalışmaları siRNA'nın küçük parçacıklarına karşı daha hassas bir sistem olduğu için yukarıda anlatıldığı şekilde örnekler poliakrilamid jel de yürütülmüştür.



Şekil 91: %5 FBS içerisinde çıplak siRNA, F1-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşimle ve enkapsülasyonla D-NMDA formülasyonuna iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın poliakrilamid jelde elektroforetik hareketi

1: siRNA uygulaması

2: 0

3: 0,5 saat

4: 2 saat

5: 4 saat

6: 24 saat

%5 FBS içerisinde
çıplak siRNA

7: 0

8: 0,5 saat

9: 2 saat

10: 4 saat

11: 24 saat

%5 FBS içerisinde
F1-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

12: 0

13: 0,5 saat

14: 2 saat

15: 4 saat

16: 24 saat

%5 FBS içerisinde
F1-NMDA
formülasyonuna
enkapsülasyonla
yüklenen siRNA

17: 0

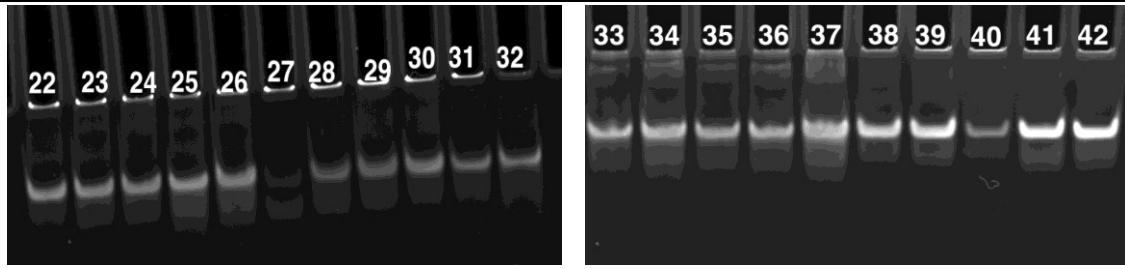
18: 0,5 saat

19: 2 saat

20: 4 saat

21: 24 saat

%5 FBS içerisinde
D-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA



Şekil 92: %5 FBS içerisinde D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarına iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA'nın poliakrilamid jelde elektroforetik hareketi

22: siRNA uygulaması

23: 0

24: 0,5 saat

25: 2 saat

26: 4 saat

27: 24 saat

%5 FBS içerisinde
D-NMDA
formülasyonuna
enkapsülasyonla
yüklenen siRNA

28: 0

29: 0,5 saat

30: 2 saat

31: 4 saat

32: 24 saat

%5 FBS içerisinde
K1-PEG-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

33: 0

34: 0,5 saat.

35: 2 saat

36: 4 saat

37: 24 saat.

%5 FBS içerisinde
K2-PEG-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

38: 0

39: 0,5 saat

40: 2 saat

41: 4 saat

42: 24 saat

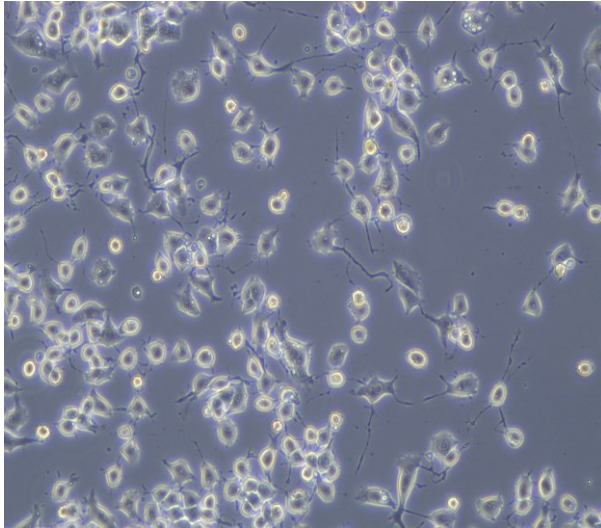
%5 FBS içerisinde
K3-PEG-NMDA
formülasyonuna
iyonik etkileşimle
yüklenen siRNA

Yapılan bu çalışma neticesinde 24 saat boyunca nanopartiküllerin siRNA'nın bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir. F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonları polimer:gen oranında polimer miktarının fazlalığı nedeni ile K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarına göre daha yüksek hacimde

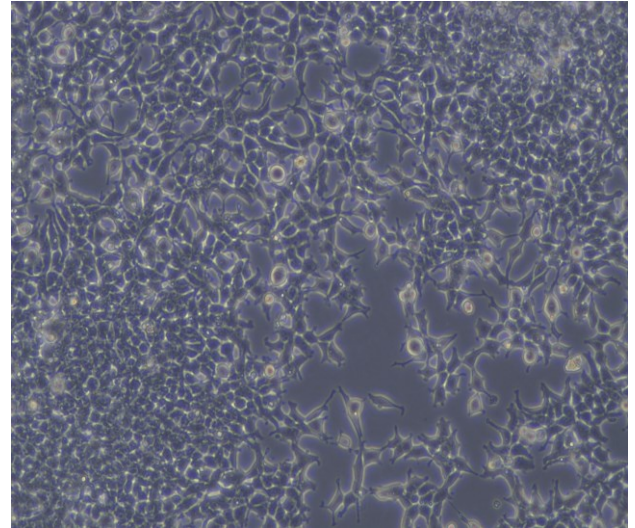
hazırlanmıştır ve aynı miktarda siRNA yüklenmiştir. Agaroz jel ve poliakrilamid jel kuyucuklarına ise kitosan nanopartikül formülasyonları ile aynı hacimde tatbik edilmiştir. Bu sebeple F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının ışımaları kitosanolara göre daha az gözükmeğedir. Kitosan nanopartikül formülasyonlarının ise siRNA'nın bütünlüğünü oldukça iyi koruduğı görülmüştür.

4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada kullanılan hücre hatları muhafaza edildikleri likit nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'de su banyosunda 90 saniye boyunca çözüldü ve T25/T75 kültür kaplarında 37°C'ye ısıtılmış komple medyumlar içine alınarak kültürleri başlatıldı. 4 gün boyunca kültür kaplarına yapışarak tek tabaka halinde büyümeleri izlenen hücreler daha sonra pasajlanarak uygun konsantrasyonlarda devam ettirildi. Hücreler, sıcakla inaktive edilmiş %10 FBS, penisilin/streptomisin (100 U ml⁻¹/100 mg ml⁻¹) ve %1 esansiyel olmayan amino asit (NEAA) ihtiva eden Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kültür ortamı içeren T25/T75 plastik kültür kaplarında, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık sağlayan hücre kültürü inkübatöründe 2-5x10⁵ hücre/mL yoğunlukta büyütüldü. Hücre sayımları Neubauer hücre sayma haznesinde sayıldı. Kültür kabının yüzeyine yapışarak büyüyen hücreler, haftada iki kez pasajlanarak çoğaltıldı. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılmalari için medyum alınıp, steril PBS ile yıkama işlemini takiben hücrelerin üzerine 500 µL %0.05 Trypsin/EDTA eklenip 37°C'de 3 dakika bekletildi, hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben 5 mL medyum eklenerek tripsin inhibe edildi ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltisi yeni medyum ile tekrar süspanse edilerek 2-5x10⁵ hücre/mL konsantrasyonunu verecek şekilde 1/3 veya 1/5 oranlarında ekimleri gerçekleştirildi. SH-SY5Y (ATCC, CRL-2266) ve Neuro-2A (ATCC, CCL-131) hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop altında kontrol edildi ve floresan mikroskopta faz-kontrast görüntüleri alındı (Şekil 95, Şekil 94).



Şekil 93: Neuro-2A hücreleri (10x)



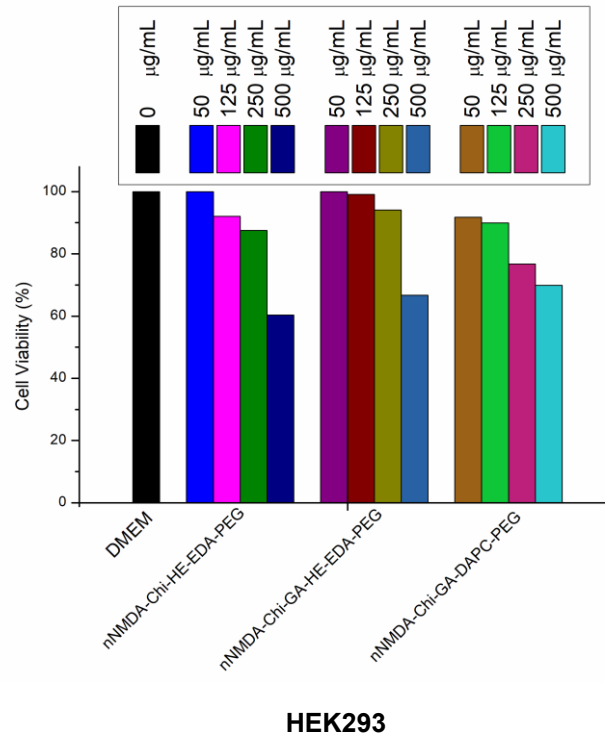
Şekil 94: SH-SY5Y hücreleri (10x)

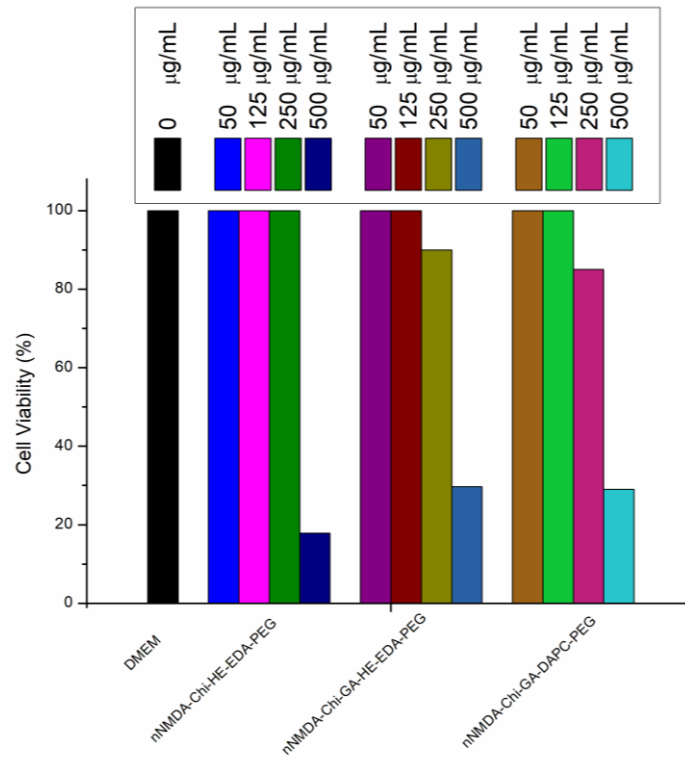
4.4.1. Sitotoksikite Çalışmaları

Nanopartiküllerin hücre kültüründe oluşturabileceği sitotoksikitenin değerlendirilmesi amacıyla MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi uygulandı. Nanopartiküller ilk olarak ön bilgi sağlaması amacı ile laboratuvarında mevcutta bulunan HEK 293 ve POF hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda denendi. Bu işlemler esnasında SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinin de büyümeleri sağlandıktan sonra bu hücrelere de rutinde çalışılacak olan konsantrasyonlarda nanopartikül uygulaması yapılarak MTT testi uygulandı.

MTT hücre canlılığı analizi için, hücreler steril düz yüzeyli 96 kuyucuklu plakalar içerisine 100 µl hacminde ve 1×10^5 hücre/ml konsantrasyonunda ekildi ve 37°C de %5 CO₂ ortamında 24 saat boyunca inkübe edildi. Düşük serum konsantrasyonlu kültür medyumunda disperse edilen ve 20 dk. inkübe edilen nanopartiküller, DMEM medyumları uzaklaştırılan hücrelerin üzerine ilave edilerek 4 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından hücrelere MTT solüsyonu eklenerek 37°C de ve %5 CO₂ ortamında 4 saat bekletilmiş ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için solubilizasyon solüsyonu eklenerek aynı şartlarda 24 saat solubilizasyondan sonra mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de absorbans ölçümleri alınarak hücre canlılığı analiz edildi. DMEM medyumunu blank olarak kullanılarak tüm absorbans ölçümlerinden çıkarıldı. Nanopartikül uygulamasının sitotoksik etkileri, DMEM ile muamele edilmiş ve başka uygulama yapılmamış hücrelere (negatif kontrol) karşı değerlendirildi.

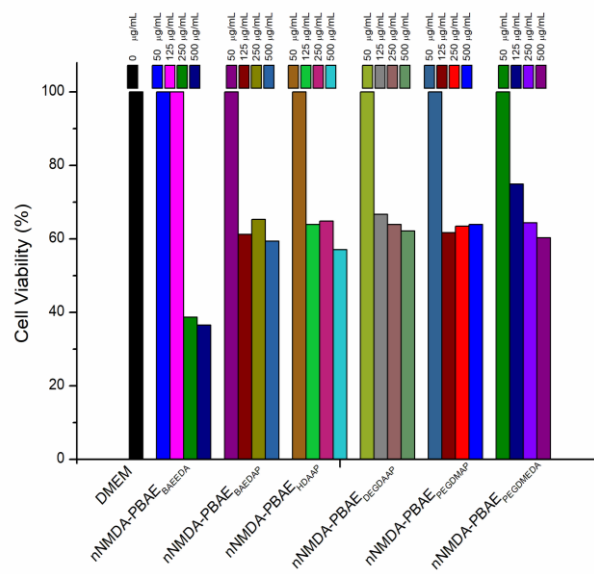
50-500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarındaki kitosan ve PBAE örneklerinin HEK ve POF hücrelerinde canlılığa etkisi Şekil 95 ve Şekil 96’ de gösterilmiştir. Kitosan örneklerinin yüksek dozlarda (250-500 $\mu\text{g/mL}$) anlamlı derecede toksisite gösterdikleri ve POF hücrelerinin toksisiteden daha fazla etkilendikleri görüldü. PBAE örnekleri ile yapılan deneylerde ise 125 $\mu\text{g/mL}$ ’den başlayan konsantrasyonlarda toksisite görülmeye başlandı.



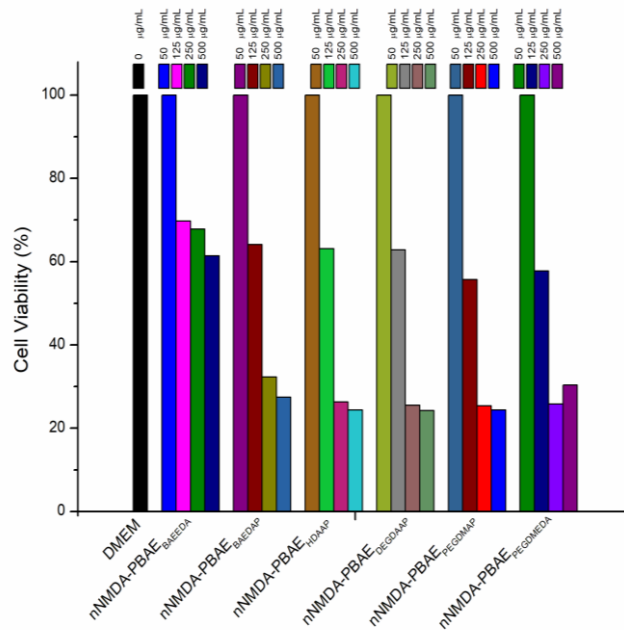


POF

Şekil 95: Kitosan ürünlerinin HEK293 ve POF hücre hatlarındaki sitotoksikite grafikleri



HEK293



POF

Şekil 96: PBAE ürünlerinin HEK293 ve POF hücre hatlarındaki sitotoksikite grafikleri

Nanopartikül formülasyonları SH-SY5Y ve Neuro2A hücrelerinde daha düşük dozlarda (5, 12,5, 25, 50 µg/mL) uygulanarak hücre yaşayabilirliği aynı şekilde değerlendirildi (Tablo 61 ve

Tablo 62; Şekil 97, Şekil 98). Nanopartikül formülasyonları bu analiz için aşağıdaki şekilde kodlanmıştır:

K1: K1-NMDA

K2: K2-NMDA

K3: K3-NMDA

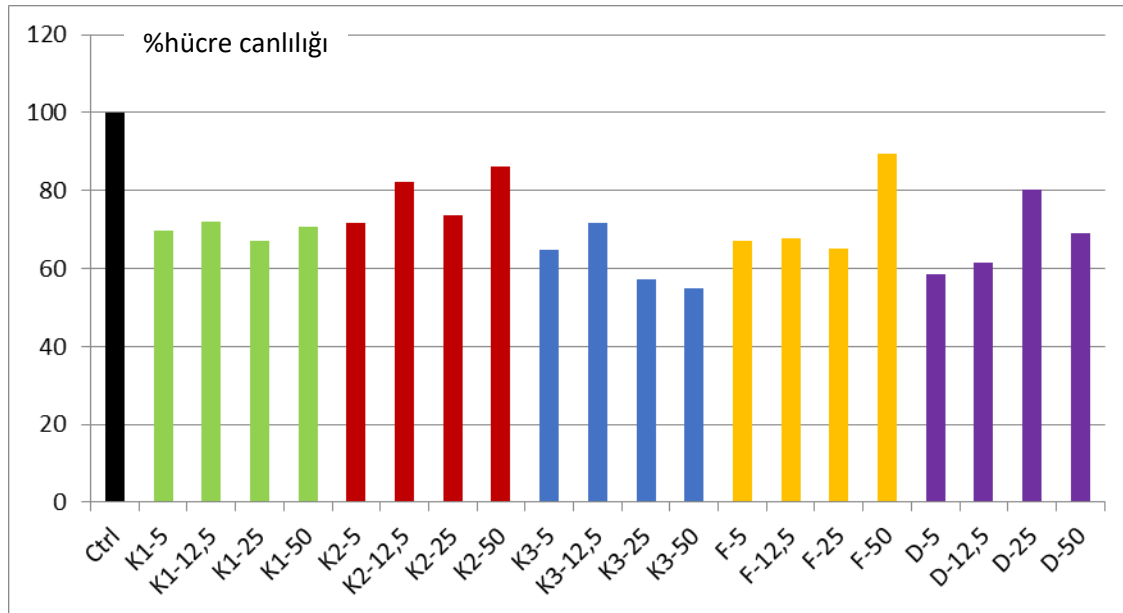
F: F1-NMDA

D: D1-NMDA

Tablo 61’de de gösterildiği gibi K1-5, K1-NMDA örneğinden 5 µg/mL konsantrasyonunda uygulandığını ifade etmektedir. Diğer örnekler için de aynı ifade geçerlidir.

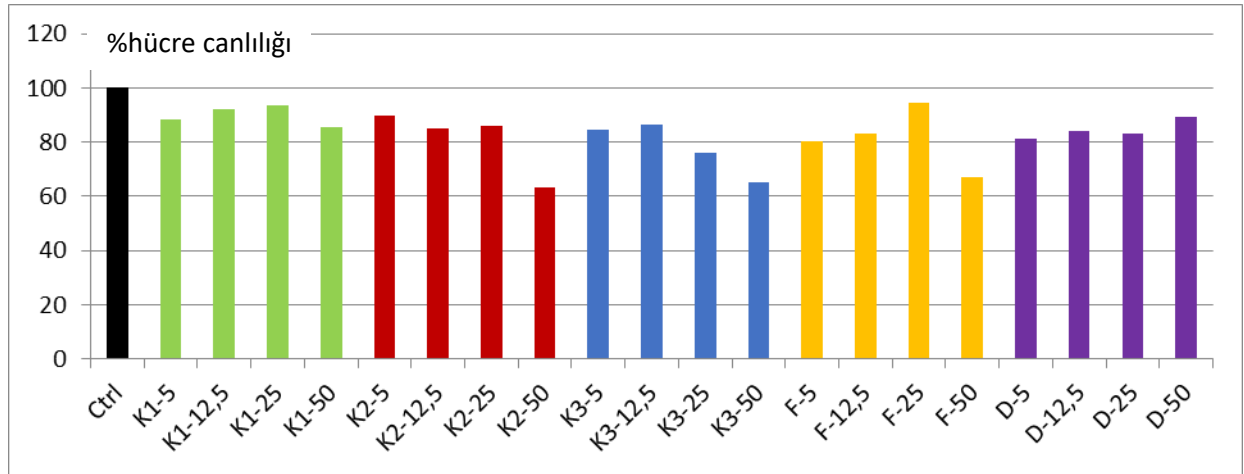
Tablo 61: Neuro-2A hücrelerinde MTT testi sonuçları

	Viability	Fold Change	St Dev	T.Test, p
Ctrl	100	1	0,056388	
K1-5	69,869	0,69869	0,031963	0,001292
K1-12,5	72,18084	0,721808	0,001604	0,001031
K1-25	67,19753	0,671975	0,059786	0,002297
K1-50	70,6653	0,706653	0,065972	0,004247
K2-5	71,53866	0,715387	0,024903	0,001326
K2-12,5	82,3401	0,823401	0,013623	0,025558
K2-25	73,74775	0,737478	0,046474	0,003396
K2-50	86,18032	0,861803	0,104194	0,113446
K3-5	64,86001	0,6486	0,028339	0,000646
K3-12,5	71,8469	0,718469	0,025211	0,001392
K3-25	57,23093	0,572309	0,075584	0,001419
K3-50	54,86771	0,548677	0,06103	0,003388
F-5	67,17185	0,671718	0,043602	0,001338
F-12,5	67,68559	0,676856	0,041365	0,001322
F-25	65,271	0,65271	0,058855	0,001797
F-50	89,46828	0,894683	0,140586	0,304308
D-5	58,51528	0,585153	0,023992	0,000303
D-12,5	61,52068	0,615207	0,03212	0,000507
D-25	80,19522	0,801952	0,103301	0,043473
D-50	69,17544	0,691754	0,111325	0,012865

**Şekil 97:** N2A hücrelerinde nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığına etkisi

Tablo 62: SH-SY5Y hücrelerinde MTT testi sonuçları

	Viability	Fold Change	St Dev	T-Test,p
Ctrl	100	1	0,056388	
K1-5	88,13255	0,881325456	0,04034	0,041361
K1-12,5	91,90855	0,919085538	0,112386	0,327475
K1-25	93,43694	0,934369381	0,010353	0,219249
K1-50	85,61521	0,856152068	0,059756	0,038686
K2-5	89,87927	0,898792705	0,083227	0,156161
K2-12,5	84,92165	0,849216543	0,042046	0,020601
K2-25	85,84639	0,85846391	0,019617	0,046775
K2-50	63,44721	0,634472129	0,021991	0,000472
K3-5	84,48497	0,84484973	0,01734	0,010377
K3-12,5	86,51426	0,865142564	0,027831	0,020572
K3-25	75,944	0,759440021	0,009263	0,010785
K3-50	65,01413	0,650141279	0,011797	0,000462
F-5	80,16954	0,801695351	0,032561	0,006191
F-12,5	83,12356	0,831235551	0,055475	0,020921
F-25	94,5158	0,945157976	0,093179	0,458529
F-50	67,22322	0,672232212	0,064356	0,002678
D-5	81,37683	0,813768302	0,024259	0,006277
D-12,5	84,33085	0,843308502	0,018834	0,010299
D-25	83,26483	0,832648343	0,016892	0,030014
D-50	89,33984	0,893398407	0,145122	0,301283



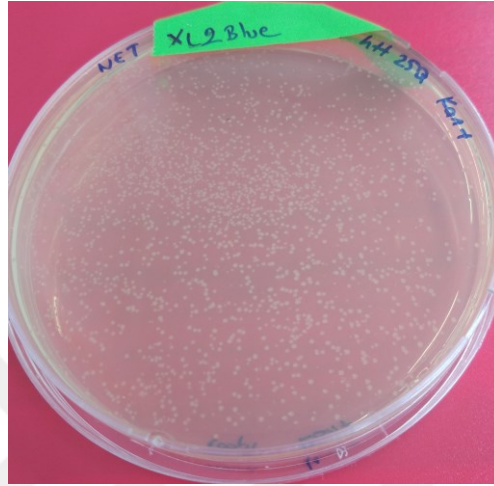
Şekil 98: SH-SY5Y hücrelerinde nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığına etkisi

4.4.2. Hücrelerin htt Ekspresyon Vektörü ile Transfeksiyonu

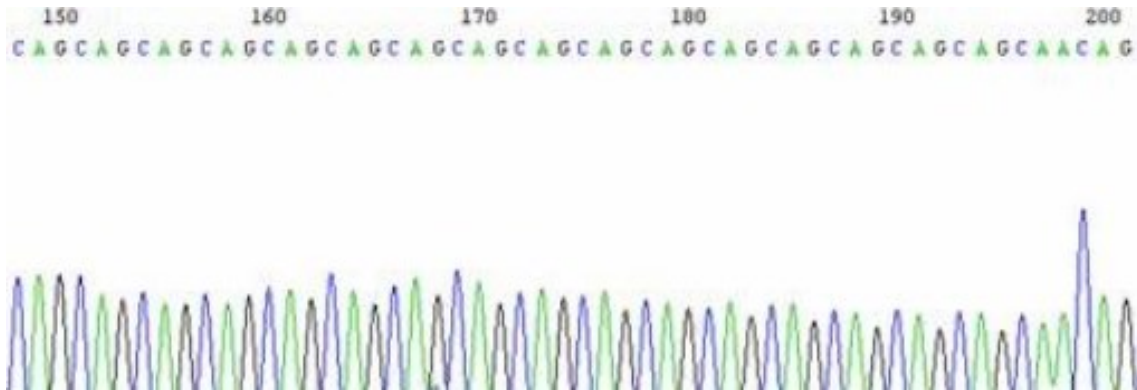
siRNA yüklü nanopartiküllerin mutant htt ekspresyonunu baskılama etkinliğinin gösterilmesi için, öncelikle hücrelerde mutant htt ekspresyonu sağlanması gereklidir. Bu amaçla tam uzunlukta insan htt geni içerecek şekilde daha önce yapılan bir araştırma çerçevesinde ⁸⁹ klonlanmış olan FLhtt25Q-YFP ve FLhtt90Q-YFP (normal ve mutant htt) rekombinant ekspresyon vektörleri kullanıldı.

B) Rekombinant vektörlerin çoğaltılması: Öncelikle Ultrakompetan *Epicurian coli* XL2-Blue bakterileri (Agilent) ekspresyon vektörleriyle transforme edilerek başarılı koloniler büyütüldü. -80°C’de muhafaza edilen Ultrakompetan XL2 Blue hücreleri buz içerisinde bekletilerek çözüldü ve 40 µL bakteri hücresi, önceden soğutulmuş ve 0.7 µL 14.2M β-merkaptöetanol içeren 15 mL Falkon 2059 polipropilen tüplere aktarıldı. İki dakika aralıklarla hafifçe çalkalanarak toplam 10 dakika buz içerisinde bekletildi. Ardından hücrelerin üzerine 50 ng vektör DNA’sı eklenerek 30 dakika süresince buzda bekletildi. Hücreler 42°C’de 30 saniye ısı şokundan sonra 2 dakika buz içinde bekletildi ve sonrasında üzerlerine 42°C’ye ısıtılmış 360 µL LB besiyeri eklenip orbital çalkalayıcıda (250 rpm, 37°C’de) 1 saat büyütüldü. Bu sürenin ardından kanamisin içeren LB agarlı petri kaplarına ekildi ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi (Şekil 99). Ertesi gün tek bir bakteri kolonisi 25 µg/mL kanamisin içeren 5 mL LB medyumuna transfer edilerek 8 saat boyunca 37°C’de ve 250 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Daha yüksek hacimli kültürün büyütülmesi için, bu kültürden 200 µL alınarak 100 mL LB medyumuna transfer

edildi ve orbital çalkalayıcıda 37°C’de ve 250 rpm’de çalkalanarak büyütüldü. Ardından, Plasmid Maxi Kit (Qiagen) protokolüne göre bakterilerden DNA izolasyonu yapıldı. Transformasyon ile çoğaltılan bu vektörlerin dizilerinin doğrulanması amacıyla EL2 (5’ TTTCAGAACTTCTGGGCAT 3’) ve EGFPN (5’ CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG 3’) primerleri kullanılarak Sanger dizi analizi yapıldı (İontek A.Ş. İstanbul) ve diziler Chromas 2.33. Programı ile incelendi



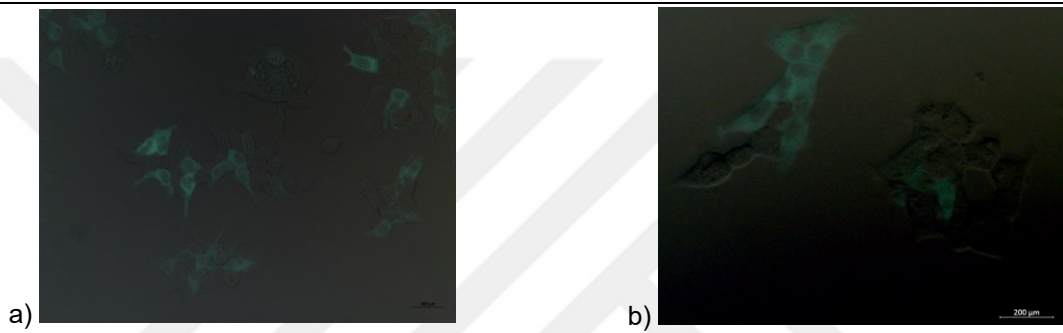
Şekil 99: XL2 Blue hücrelerinin FLht25Q-YFP ile transformasyonu sonucu oluşan koloniler



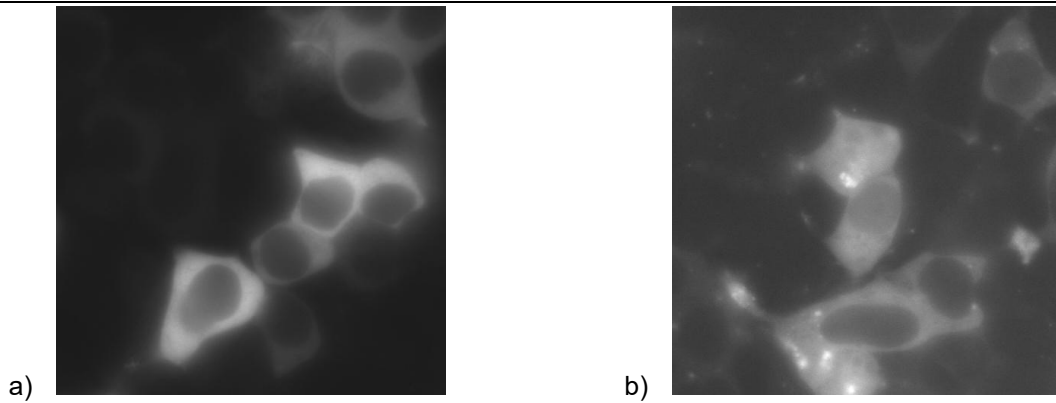
Şekil 100: pEYFP-C1 ekspresyon vektörüne klonlanan FL htt dizisindeki CAG tekrar bölgesi

B) Hücrelerin transfeksiyonu: SH-SY5Y ve Neuro2A hücre hatlarında FLht-EYFP overekspresyonunun gösterilmesi için hücreler Eugene6 (Roche, İsviçre) transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edildi. Bu amaçla hücreler 6- veya 96-kuyucuklu tabaklara ekilerek %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar (24 saat) büyütüldü.

Eppendorf tüpe alınan 100 μ L serumsuz DMEM medyumuna 3/6 μ L Fugene6 eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 0.5/1 μ g vektör DNAsı eklenerek ve 15 dakika daha inkübe edilerek DNA-lipozom kompleksinin oluşması sağlandı. Bu kompleks hücrelerin üzerine verilerek hücrelerin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon verimi 24 saat sonra floresan mikroskop altında YFP filtresi ile gözlemlendi (Şekil 101 ve Şekil 102). Rekombinant vektörlerle transfekte edilen hücrelerdeki canlılık daha önce belirtilen şekilde MTT testi ile belirlendi. FLhtt ekspresyonunun 24 saat içinde hücre canlılığında %30 azalmaya sebep olduğu, ancak normal ve mutant formlar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Tablo 63, Şekil 103).



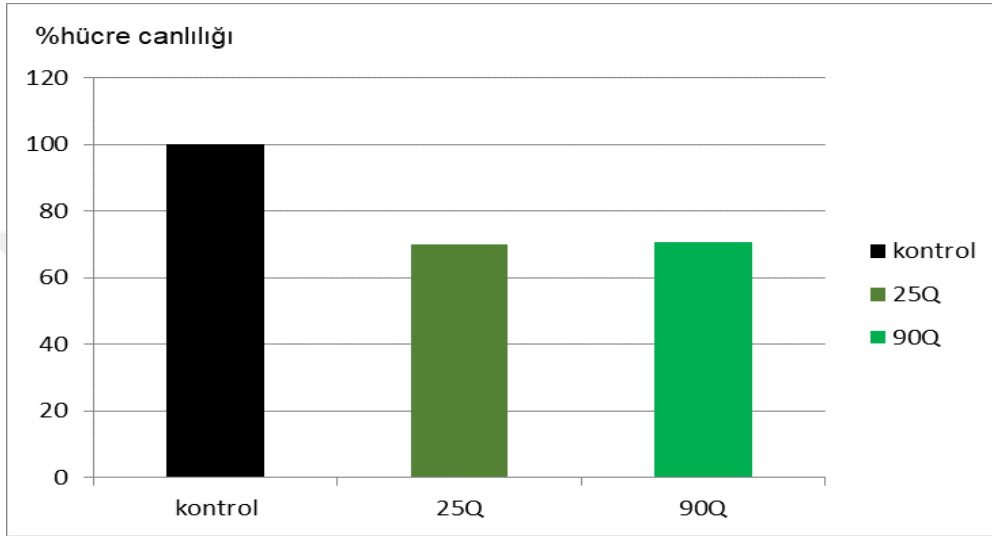
Şekil 101: SH-SY5Y hücrelerinde a) FLhtt25Q-YFP ve b) FLhtt-90Q-YFP ekspresyonu (20x)



Şekil 102: Neuro-2A hücrelerinde a)FL htt25Q-YFP ve b) FLhtt-90Q-YFP ekspresyonu (20x)

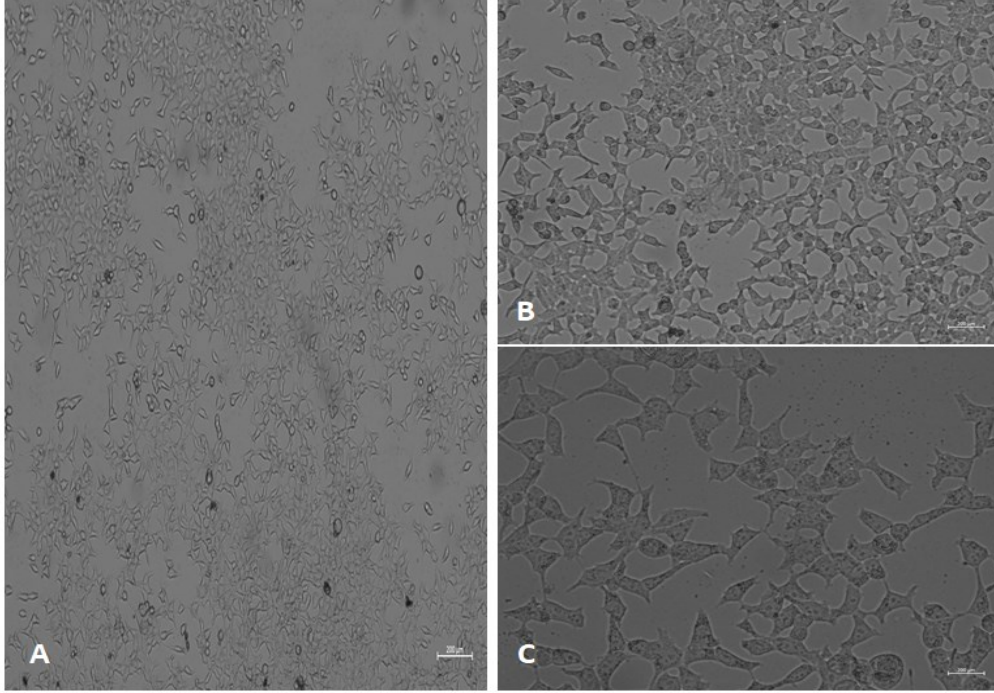
Tablo 63: Htt ile transfekte edilmiş Neuro-2A hücrelerinde MTT testi sonuçları

	Viability	Fold Change	St Dev	T-Test,p
kontrol	100	0,067095229	0,067095	
25Q	70,15936	0,046764831	0,046765	0,00126408
90Q	70,77025	0,087523875	0,087524	6,9636E-05

**Şekil 103:** Htt ile transfekte edilmiş Neuro-2A hücrelerinde hücre canlılığı

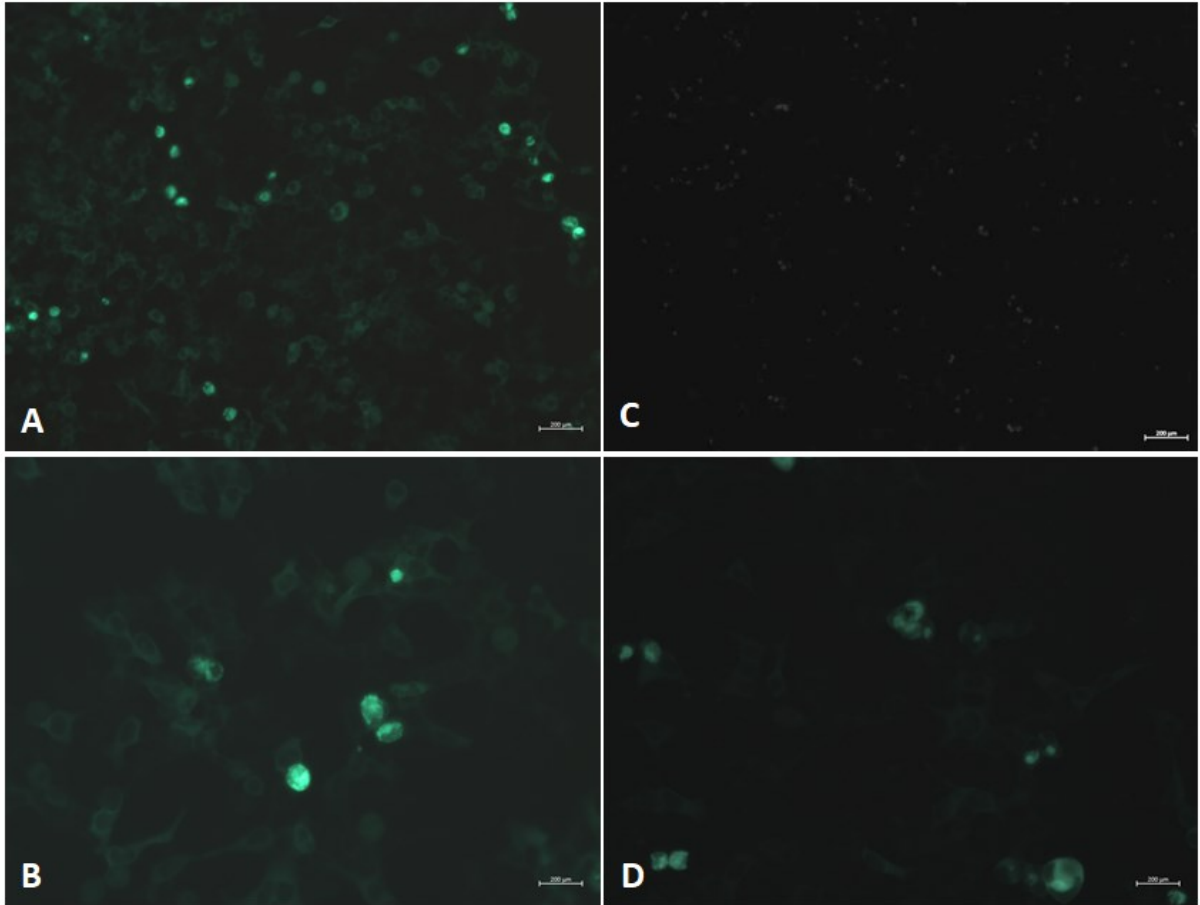
4.4.3. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin htt Ekspresyonuna Etkisinin Araştırılması

HTT geninin susturulabilmesi için gerekli olan siRNA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, SH-SY5Y hücrelerine farklı miktarlarda siRNA uygulaması yapılarak huntingtin geni (HTT) ekspresyonuna etkisi bakılmıştır. Bu amaçla SH-SY5Y hücreleri öncelikle 6 kuyucuklu tabaklara 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 37°C 'de %5'lik CO_2 ortamında 24-48 saat boyunca inkübe edilmiş ve %80 konfluent duruma gelmeleri beklenmiştir. Hücre morfolojilerinin ışık mikroskobu altında incelenmeleri neticesinde 48 saatlik inkübasyon sonunda karakteristik özelliklerini gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 104). Bu nedenle tüm transfeksiyon çalışmalarının hücrelerin kültür ortamında 48 saat proliferasyon sonrasında başlatılması kararlaştırılmıştır.



Şekil 104: SH-SY5Y hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında (A) 5X, (B) 10X, (C) 20X ışık mikroskobu görüntüleri

48 saatlik proliferasyon sonrasında hücreler HTT ekspresyon vektörü ve siRNA ile ko-transfekte edilmiştir. Ekilen hücreler 48 saat sonra transfeksiyon tamponu, siRNA ve HTT vektör (0,5µg) karışımına eklenen siTran 2.0 transfeksiyon ajanı ile kokteyl haline getirilip 15dk oda sıcaklığında inkübe edilerek nükleik asit-lipit kompleksi oluşması sağlanmış ve sonrasında hücrelere verilmiştir. Rekombinant htt ekspresyon vektörleri tam uzunlukta insan HTT geni içerecek şekilde pEYFP ekspresyon vektörüne klonlanmış olduğu için, bu vektörü eksprese eden hücrelerin floresans mikroskopta YFP/GFP filtresi ile incelenmesi gerekir. Bu doğrultuda, ko-transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler floresans mikroskopta GFP filtresi ile incelenmiş ve siRNA ile transfekte edilen ve edilmeyen hücrelerden gelen floresans sinyal şiddeti karşılaştırılmıştır. HTT ve siRNA ile ko-transfekte edilen hücrelerde 24 saat sonra floresans sinyalin azaldığı, yani htt protein ekspresyonunun baskılandığı görülmüştür (Şekil 105).



Şekil 105: HTT90Q ile transfekte hücrelerin floresan mikroskopta 10X (A) ve 20X görüntüsü (B); HTT90Q ve siRNA ile ko-transfeksiyon sonrasında hücrelerin 5X (C) ve 20X görüntüsü (D)

siRNA'nın HTT genini susturma etkisi floresans mikroskopta gözlemlendikten sonra gen ekspresyonu seviyelerinin belirlenmesi için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle 24 saat boyunca ko-transfekte olmuş hücrelerden RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve RNA miktarları nanospektrofotometrede 260nm dalga boyunda absorbans ölçümlerinin yapılmasıyla kantitatif olarak belirlenmiştir (Tablo 64). K1-siRNA, K1-PEG-NMDA nanopartikül formülasyonuna; K2-siRNA, K2-PEG-NMDA nanopartikül formülasyonuna, K3-siRNA ise K3-PEG-NMDA nanopartikül formülasyonuna iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA yüklü nanopartikül formülasyonunu ifade etmektedir. F1-i-siRNA, F1-NMDA nanopartikül formülasyonuna iyonik etkileşimle yüklenmiş siRNA yüklü nanopartikül formülasyonunu F-e-siRNA ise enkapsülasyonla yüklenmiş nanopartikül

formülasyonunu ifade etmektedir. Aynısı D-i-siRNA ve D-e-siRNA formülasyonları için de geçerlidir.

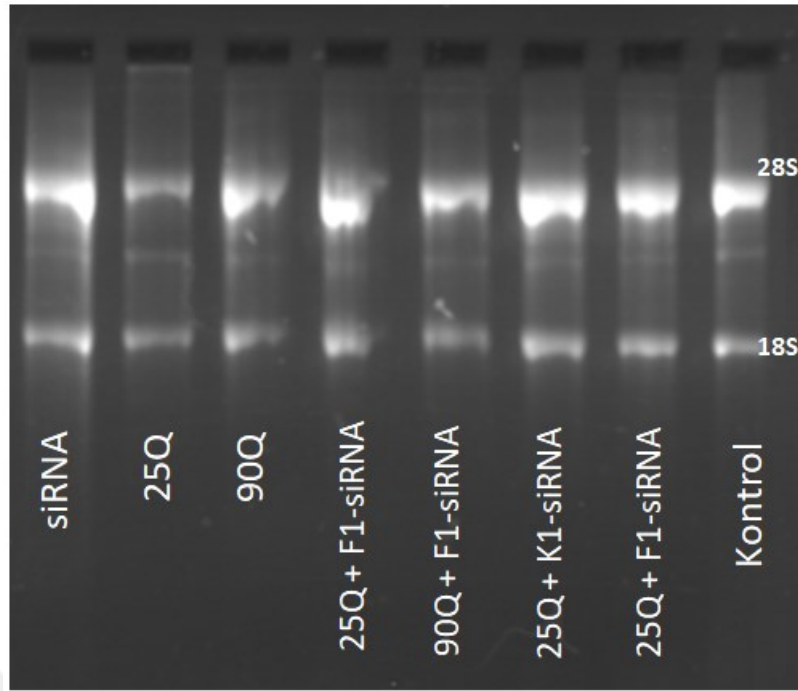
Tablo 64: RNA konsantrasyonları

Konsantrasyon		Konsantrasyon	
Örnekler	(ng/μl)	Örnekler	(ng/μl)
25Q	595,779	90Q	709,333
25Q K1-siRNA	51,56	90Q K1-siRNA	68,999
25Q K2-siRNA	95,006	90Q K2-siRNA	107,54
25Q K3-siRNA	44,238	90Q K3-siRNA	149,69
25Q F1-i-siRNA	247,512	90Q F1-i-siRNA	225,384
25Q F1-e-siRNA	236,955	90Q F1-e-siRNA	238,183
25Q D-i-siRNA	320,235	90Q D-i-siRNA	344,276
25Q D-e-siRNA	274,096	90Q D-e-siRNA	329,906

Total RNA izolasyonlarından elde edilen RNA miktarları karşılaştırıldığında, siRNA yüklü nanopartikül uygulamalarının, sadece HTT25Q ve HTT90Q ile transfekte edilen hücrelere oranla genel olarak hücrelerdeki RNA miktarını azalttığı gözlenmiştir. Bu durum, henüz RNA izolasyonu aşamasında bile HTT gen susturmasının gerçekleştiğine dair ilk kanıt olarak değerlendirilebilir. Ancak, siRNA yüklü K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA nanopartiküllerinin hücrelerdeki total RNA miktarı üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu ve hücrelerdeki genel RNA havuzunu azalttığı görülmüştür. Diğer nanopartiküllere kıyasla, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA uygulamalarının total RNA miktarını yaklaşık olarak 3-4 kat azalttığı tespit edilmiştir.

İzole edilen total RNA örneklerinin kalitatif analizleri %2'lik agaroz-formaldehit jel elektroforezi ile 28S/18S=2/1 oranın gözlemlenmesiyle belirlenmiştir (Şekil 106).

Total RNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri, örneklerin qRT-PCR'a devam edilebilecek saflık ve miktarda olduğunu göstermiştir.



Şekil 106: %2'lik agaroz-formaldehit jelde izole edilen RNA'ların elektroforez görüntüsü

Hücrelerdeki HTT geni ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla öncelikle 1µg total RNA örneği ters transkripsiyon metoduyla, RT² First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiş ve sentezlenen cDNA miktarları nanospektrofotometrede 260nm dalga boyunda absorbans ölçümlerinin yapılmasıyla kantitatif olarak belirlenmiştir (Tablo 65).

Tablo 65: cDNA konsantrasyonları

Örnekler	Konsantrasyon (ng/µl)	Örnekler	Konsantrasyon (ng/µl)
25Q	2322,481	90Q	2187,654
25Q K1-PEG-NMDA-siRNA	2051,516	90Q K1-siRNA	732,538
25Q K2-PEG-NMDA-siRNA	223,549	90Q K2-siRNA	759,903
25Q K3-PEG-NMDA-siRNA	2195,02	90Q K3-siRNA	739,123
25Q F1-NMDA—siRNA-İyonik Etkileşim	2202,136	90Q F1-i-siRNA	743,329
25Q F1-NMDA-siRNA-Enkapsülasyon	2246,978	90Q F1-e-siRNA	726,439
25Q D-NMDA-siRNA-İyonik Etkileşim	2299,269	90Q D-i-siRNA	732,818
25Q D-NMDA-siRNA-Enkapsülasyon	2229,371	90Q D-e-siRNA	674,421

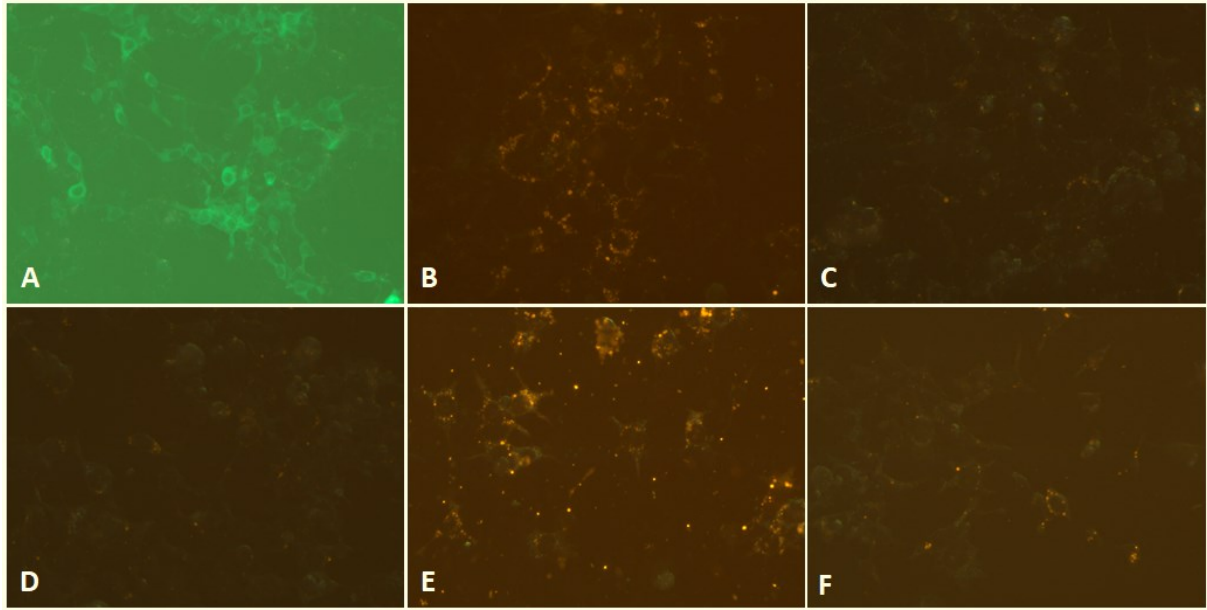
cDNA sentezi sonrasında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için 1µg cDNA örneği, HTT genine özgün primer (RT² qPCR Primer Assay, Qiagen) ve RT² Syber Green Fast Master Mix (Qiagen) kullanılarak Qiagen Rotor-Gene Q cihazında qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İnsan β-aktin geni referans gen olarak kullanılmıştır.

Nanopartiküle yüklenecek olan siRNA konsantrasyonunun belirlenebilmesi için öncelikle hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda siRNA uygulaması yapılarak HTT gen ekspresyonundaki değişim qRT-PCR ile incelenmiştir (Tablo 66). Bu optimizasyon gerçekleştirilirken mutant HTT genini temsil eden HTT90Q ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Çalışmanın in vivo iş paketlerinde siRNA yüklü NP'ler 128 Glutamin(Q) tekrarlı YAC128 fare modeline uygulanacağından dolayı, in vitro'da siRNA konsantrasyonu optimizasyon deneylerinde normal sayıda glutamin içeren HTT 25Q vektörü yerine HTT90Q vektörünün kullanımının daha uygun olacağı düşünülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde siRNA konsantrasyonu arttıkça susturma veriminin de arttığı gözlenmiş ve 40nM siRNA'nın HTT genini yüksek bir etkinlikle (>%50) susturduğu belirlenmiştir ve takip eden nanopartiküllere siRNA yüklenmesi çalışmalarında bu konsantrasyon kullanılmıştır. Ayrıca, HTT genine özgün olmayan, dizisi karıştırılmış bir siRNA (scrambled siRNA) da kontrol olarak kullanılarak, HTT genine özgün olmayan başka herhangi bir siRNA dizisinin htt gen ekspresyonuna etkisi olmayacağı da ispatlanmıştır (Tablo 66).

Tablo 66: Farklı siRNA konsantrasyonlarının ve karıştırılmış siRNA'nın gen ekspresyonuna etkisine dair qPCR sonuçları

			Ortalama			
Örnek	Ortalama Ct	Örnek	Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
β -Act 5nM siRNA	11,435	HTT 5nM				
		siRNA	17,965	6,53	0,12	0,920188
β -Act 10nM siRNA	11,505	HTT 10nM				
		siRNA	18,53	7,025	0,615	0,65293
β -Act 20nM siRNA	11,23	HTT 20nM				
		siRNA	18,4	7,17	0,76	0,590496
β -Act Kontrol	12,15	HTT 90Q				
		Kontrol	18,56	6,41	0	1
Örnek	Ortalama Ct	Örnek	Ortalama Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
β -Act 40nM siRNA	10,56	HTT 40nM				
		siRNA	14,23	3,67	2,71	0,15283
β -Act 90Q Kontrol	11,105	HTT 90Q				
		Kontrol	12,065	0,96	0	1
Örnek	Ortalama Ct	Örnek	Ortalama Ct	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{-ΔΔCt}
β-Act scrambledktrl	10,82	HTT scrambled ktrl	18,035	7,215	0,03	0,97942
β-Act Kontrol	10,57	HTT Kontrol	17,755	7,185	0	1

siRNA yüklü nanopartiküllerin hücrelerdeki HTT ekspresyonuna etkisinin araştırılması için yukarıda belirtildiği şekilde hücreler HTT90Q ve siRNA yüklü nanopartiküllerle ko-transfekte edildikten 24 saat sonra öncelikle nanopartiküllerin hücre içine girişleri belirlenmiştir. Bu amaçla hücrelere TYE-563 işaretli siRNA kullanılarak yüklenen nanopartiküller uygulanmış ve 24 saat sonra floresan mikroskopta hücre içi yerleşimleri gözlemlenmiştir. Tüm nanopartiküllerin hücre içine verimli bir şekilde alındığı görülmüştür (Şekil 107).



Şekil 107: Nanopartiküllerin hücre içine alınması. HTT90Q transfeksiyonu (A) ve HTT90Q transfeksiyonu ile birlikte siRNA yüklü K1-PEG-NMDA (B), K2-PEG-NMDA (C), K3-PEG-NMDA (D), F1-NMDA-iyonik (E) ve D-NMDA-iyonik (F) nanopartiküllerinin hücre içinde görüntülenmesi

Nanopartiküllerin hücre içine girişlerinin teyidi yapıldıktan sonra, HTT ekspresyonuna etkisinin araştırılması için HTT25Q/90Q ve siRNA yüklü nanopartiküllerle ko-transfekte edildikten 24 saat sonra total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmış; ardından qRT-PCR ile HTT geni ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilerek ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, siRNA yüklenmiş tüm nanopartiküllerin HTT90Q gen ekspresyonunu çok verimli bir şekilde susturduğu (>%50) bulunmuştur (Tablo 67). Normal sayıda glutamin içeren HTT25Q ekspresyonun seviyelerinde bakıldığında ise F1-NMDA-iyonik ve K2-PEG-NMDA nanopartiküllerinin verimli bir şekilde (>%50) susturma yaptığı, ancak diğer nanopartiküllerin daha az verimli olduğu gözlenmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: HTT25Q ve HTT90Q ile transfekte edilen hücreler RNA izolasyonundan önce floresans mikroskopta incelendiğinde HTT25Q'nun transfeksiyon verimliliğinin %95'in üzerinde olduğu, HTT90Q transfeksiyon ve ekspresyon verimliliğinin buna kıyasla göre daha az olduğu görülmüştür. Bu durum daha önceki çalışmalarımızda da gözlenen ve beklenen bir durumdur. Mutant htt geni tam boy insan htt geni üzerinde (180kb) çok büyük bir glutamin tekrar bölgesi taşımaktadır ve dolayısıyla hücrelerin içine

transfekte edilme verimi diğer küçük genlere kıyasla daha zordur. Ayrıca hücre içinde bu genden toksik fonksiyon kazanan 350kDa'luk büyük bir protein sentezlenmektedir, bu anlamda da protein ekspresyonu daha zor ve azdır. Bu bilgiler ışığında, mutant HTT90Q'nun HTT25Q'ya oranla daha büyük olması ve dolayısıyla hücre içine alınıp ifade edilmesinin daha zor ve uzun sürmesi söz konusudur. Diğer bir deyişle HTT25Q transfeksiyon verimi ve ekspresyonu her zaman HTT90Qya göre çok daha yüksek olacaktır.

Sonuç olarak, K1-PEG-NMDA, K3-PEG-NMDA ve D-NMDA nanopartiküllerinin etkinliği HTT25Q ekspresyonunun susturulması için yeterli bulunmamıştır ve deney tekrarı yapılacaktır; ancak bu durum çok yüksek HTT25Q ekspresyonundan kaynaklanmaktadır ve qRT-PCR sonuçlarından çıkarım yapılırken mutant protein olan HTT90Q ekspresyonunun durumu temel alınması söz konusu olduğundan, gen susturmanın başarılı olduğu ve tüm nanopartiküllerle >%50 oranında gen susturması başarısı elde edildiği görülmektedir.

Tablo 67: siRNA yüklü nanopartiküllerin HTT gen ekspresyonuna etkisinin qRT-PCR ile belirlenmesi ve kat değişiminin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) hesaplanması

Örnek	Ortalama Ct	Örnek	Ortalama Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
β -Act 25Q	17,43	HTT 25Q	14,4	-3,03	0	1
β -Act 25Q K1-siRNA	15,35	HTT 25Q K1-siRNA	12,47	-2,88	0,15	0,90125
β -Act 25Q K2-siRNA	15,17	HTT 25Q K2-siRNA	14,05	-1,12	1,91	0,266093
β -Act 25Q K3-siRNA	15,84	HTT 25Q K3-siRNA	13,02	-2,82	0,21	0,864537
β -Act 25Q F1-i-siRNA	17,38	HTT 25Q F1-i-siRNA	15,94	-1,44	1,59	0,332171
β -Act 25Q F1-e-siRNA	17,65	HTT 25Q F1-e-siRNA	15,12	-2,53	0,5	0,707107
β -Act 25Q D-i-siRNA	16,78	HTT 25Q D-i-siRNA	13,09	-3,69	-0,66	1,580083
β -Act 25Q D-e-siRNA	17,37	HTT 25Q D-e-siRNA	14,13	-3,24	-0,21	1,156688
β -Act 90Q	24,84	HTT 90Q	22,7	-2,14	0	1
β -Act 90Q K1-siRNA	18,08	HTT 90Q K1-siRNA	19,29	1,21	3,35	0,098073
β -Act 90Q K2-siRNA	15,13	HTT 90Q K2-siRNA	17,57	2,44	4,58	0,04181
β -Act 90Q K3-siRNA	13,62	HTT 90Q K3-siRNA	16,94	3,32	5,46	0,022718
β -Act 90Q F1-i-siRNA	15,84	HTT 90Q F1-i-siRNA	21,03	5,19	7,33	0,006215
β -Act 90Q F1-e-siRNA	13,57	HTT 90Q F1-e-siRNA	20,64	7,07	9,21	0,001689
β -Act 90Q D-i-siRNA	15,46	HTT 90Q D-i-siRNA	19,14	3,68	5,82	0,017701
β -Act 90Q D-e-siRNA	14,09	HTT 90Q D-e-siRNA	18,94	4,85	6,99	0,007867

Kullanılan siRNA'nın insan HTT genine olan özgünlüğü, gen ekspresyonu analizinin N2A hücrelerinde de yapılmasıyla gösterilmiştir. SH-SY5Y insan nöroblastoma, Neuro-2A ise fare neuroblastoma hücreleridir. Kullanılan siRNA, insan HTT dizisine hedefli tasarlandığı için fare homologunu aynı oranda baskılaması teorik olarak beklenmemektedir. N2A hücrelerinin siRNA yüklü NP'lerle transfeksiyonu sonrasında elde edilen qRT-PCR verileri bu beklentiye karşılamaktadır. Neuro-2A hücrelerinde endojen HTT gen ekspresyonunun azalmadığı ve dolayısıyla kullanılan siRNA'nın insan HTT genine özgünlüğü gösterilmiştir (Tablo 68).

Tablo 68: Neuro-2A hücrelerine siRNA yüklü nanopartikül uygulaması sonrasında endojen HTT ekspresyonunun qRT-PCR ile belirlenmesi

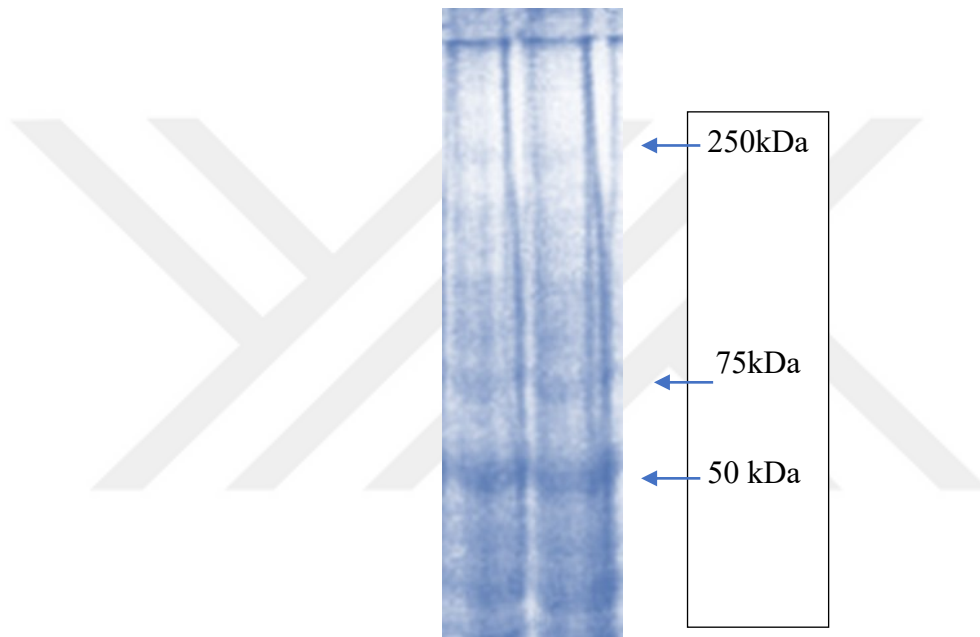
Örnek	Ortalama Ct	Örnek	Ortalama Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
β -Actin N2A	18,21	HTT N2A	24,88	6,67	0	1
		HTT N2A F1-i-siRNA	24,67	6,46	-0,21	1,156688
		HTT N2A F1-e-siRNA	25,26	7,05	0,38	0,768438
		HTT N2A D-i-siRNA	25,39	7,18	0,51	0,702222
		HTT N2A D-e-siRNA	24,77	6,56	-0,11	1,079228
		HTT N2A K1-siRNA	24,85	6,64	-0,03	1,021012

4.4.4. Western Blottlama ile Hücrelerde Ekspresyon Tayini

a) Protein izolasyonu: Kültür ortamındaki hücrelerden protein izolasyonu amacıyla, 6-kuyucuklu kültür kaplarında büyüyen hücreler proteaz inhibitörleri içeren 1x PBS ile kazınarak 2 mL tüplere aktarıldı ve 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülüp üst sıvı uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi 100 μ L 1x PBS/proteaz inhibitörü ile tekrar süspanse edilerek, hücre ekstraktlarındaki protein miktarları Bradford yöntemi ile saptandı. Standart olarak çeşitli konsantrasyonlarda (1.0-6.0 μ g/ μ L) sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA standartları ve 5 μ L hücre ekstresi 1/5 sulandırılmış Bradford boyası ile karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında beklemenin ardından

örneklerin 595 nm'deki absorpsanları mikropilaka okuyucu ile ölçülerek jele 15 µg protein yüklenmesi için gereken hacimler hesaplandı.

b) SDS-PAGE elektroforezi: 0,75 mm aralıklı cam kasetler arasına önce ayırma jeli, polimerleşmenin ardından ayırma jelinin üzerine %4'lük yükleme jeli dökülerek tekrar polimeşmek üzere bırakıldı. Protein örnekleri 6x Laemmli tamponu ile karıştırıldı. 10 dakika 80°C'de bekletildi ve bunu takiben jele yüklendi. Elektroforez Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell (BIO-RAD) sisteminde 100V'ta gerçekleştirildi. Jel Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak protein ekspresyonu gösterildi (Şekil 108).

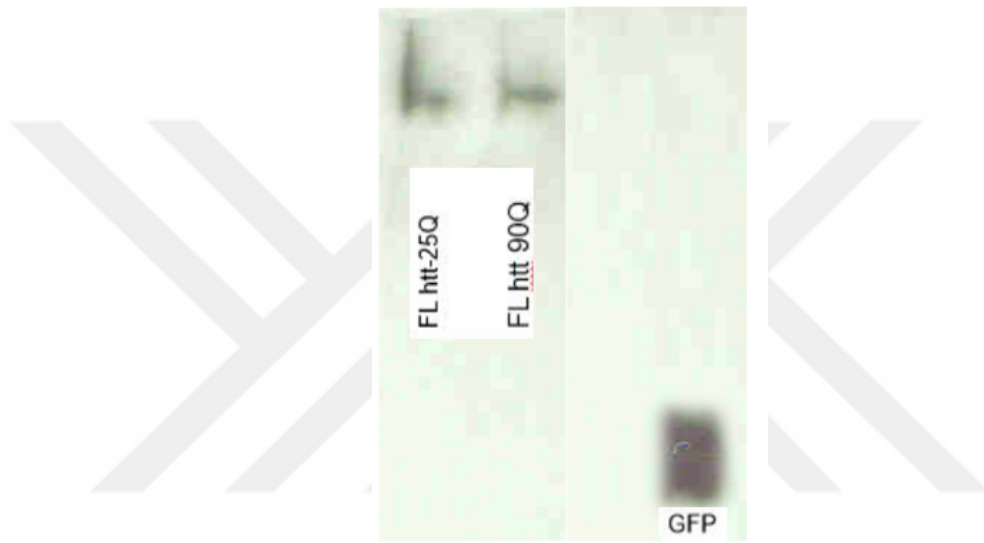


Şekil 108: SDS-PAGE jelinde protein ekspresyonunun gösterilmesi. 1) FLhtt25Q, 2) FLhtt90Q.

c) Blotlama: SDS-PAGE elektroforezini takiben, proteinler PVDF membrana transfer edildi. Bu amaçla, elektroforezi yapılan jel, jel ile aynı büyüklükte kesilmiş Whatman® 3MM kağıtları ve PVDF membran 15 dakika 4°C'de transfer tamponunda dengelenmeleri amacı ile bırakıldı. Hazırlanan blotlama sandivici transfer tamponu ile dolu blotlama tankına alınarak 30 V'ta 10 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi. Blotlama sonrasında PVDF membran 1XPBS ile hazırlanmış %5'lik yağsız süttozu (PBS/YS) ile oda sıcaklığında 30 dakika blokladı. Primer antikor (pEYFP, rabbit) PBS/YS'da hazırlanarak oda sıcaklığında 1 saat membranla çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için PBS ile üç defa 5'er dakikalık yıkama yapıldı, daha sonra membran PBS/YS ile

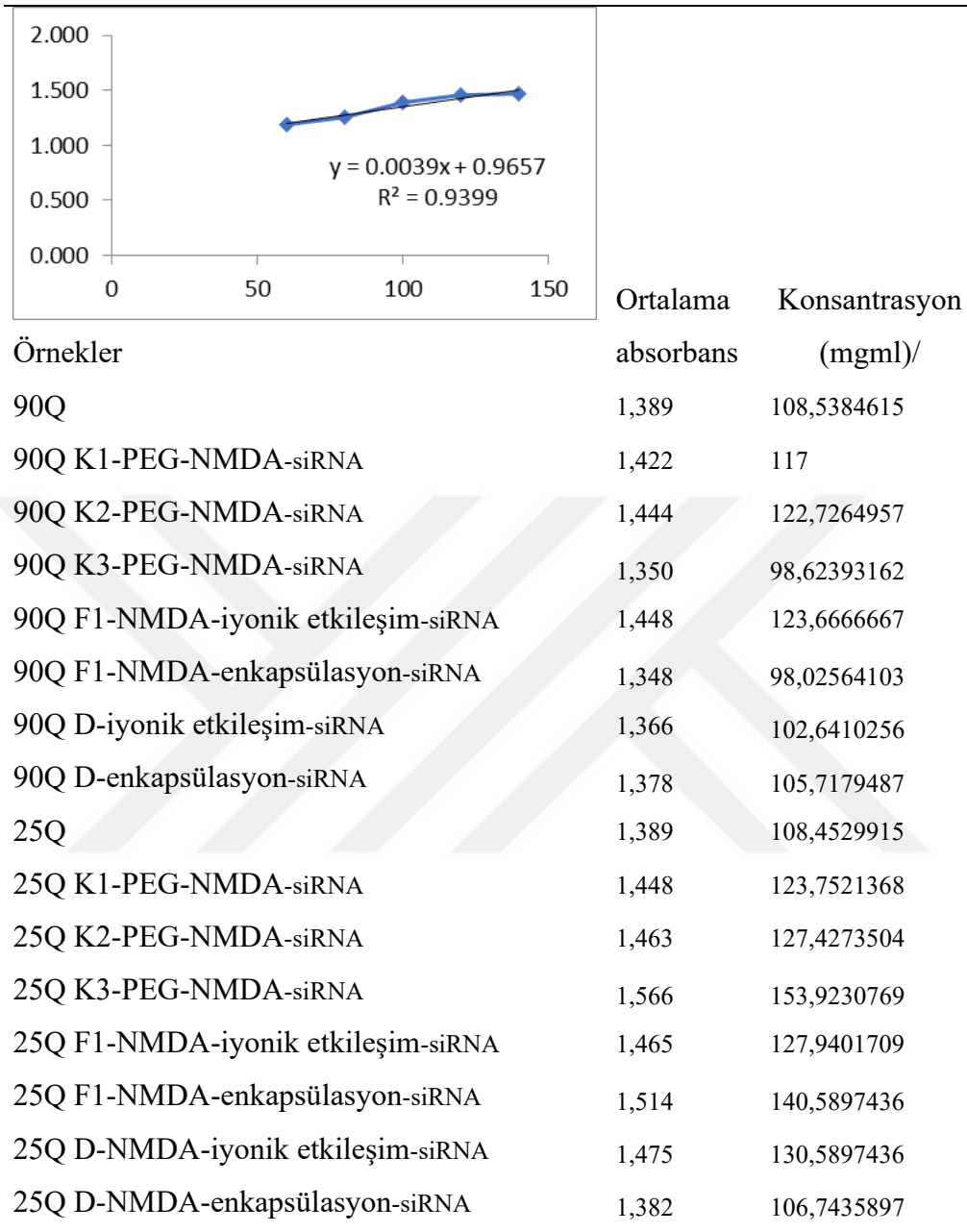
hazırlanmış sekonder antikor (goat, anti-rabbit) ile 1 saat muamele edilip, üç defa PBS/YS ile yıkandı. Membran 6 mL Lumi-Light^{plus} substrat solüsyonu ile 1 dakika muamele edildikten sonra film ile kaplanıp 2 dakika bekletildi, ardından film banyo edildi (Şekil 109).

Alınan sonuçlar çerçevesinde beklenen büyüklükte proteinlerin hücrelerde eksprese edildiği ve başarılı bir şekilde blotlandığı gösterilmiştir. Bunu takiben, siRNA içeren nanopartikül uygulamasının protein ekspresyonuna etkisi de western blotlama ile gösterilecektir.



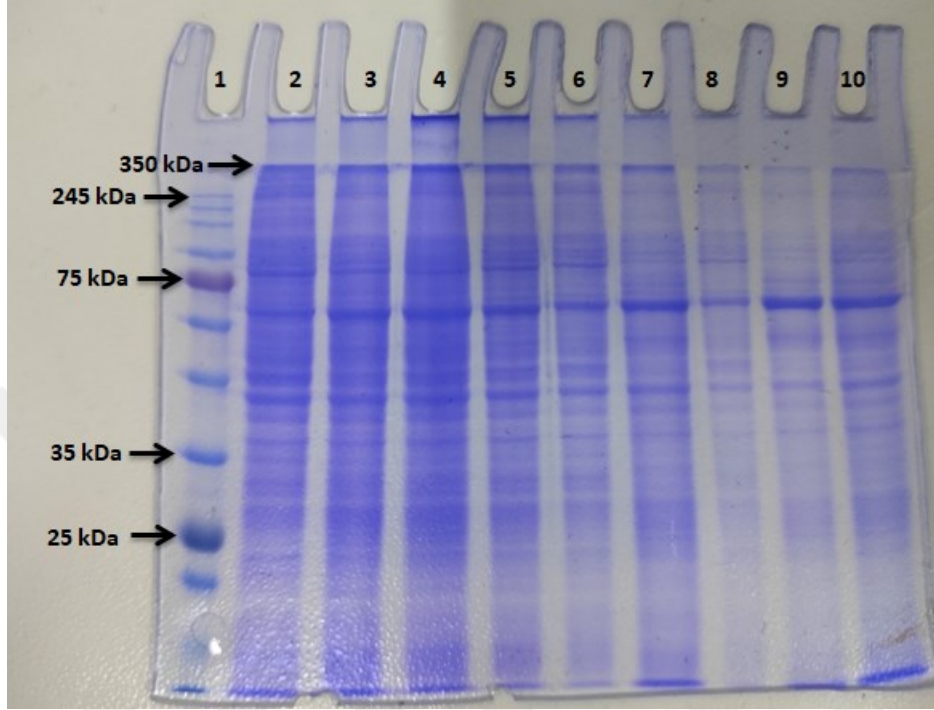
Şekil 109: Neuro-2A hücrelerinde pEYFP antikoruna ile western blotlama

Hücre lizisi: 6-kuyucuklu kültür kaplarında büyütülen hücreler tripsin ile kaldırılarak santrifüj edilmiş; hücre peleti üzerine proteaz inhibitörü (Complete Mini Tabs, Roche) içeren lizis tamponu eklenmiştir. Vorteks ve pipetleme yardımıyla lizise uğratılan hücreler 12000rpm’de 10 dakika santifüje konulmuş ve protein içeren süpernatantları toplanmıştır. Hücre ekstraktlarındaki protein miktarları Bradford yöntemi ile saptanmıştır. Protein standartı olarak çeşitli konsantrasyonlarda (50-200 ng/μl) sıgır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. BSA standartları ve 10 μl hücre ekstresi, 1/5 sulandırılmış Bradford boyası ile karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış, ardından örneklerin 595 nm’deki absorbansları 3 tekrarlı olarak mikropilaka okuyucu ile ölçülerek protein konsantrasyonları hesaplanmıştır (Tablo 69).

Tablo 69: BSA standart eğrisi üzerinden örneklerin protein konsantrasyonlarının hesaplanması

SDS-PAGE elektroforezi: 0,75 mm aralıklı cam kasetler arasına önce ayırma jeli, polimerleşmenin ardından ayırma jelinin üzerine %4'lük yükleme jeli dökülerek tekrar polimerleşmek üzere bırakılmıştır. 15µg protein örneği 2X Laemmli tamponu ile karıştırılıp 10 dakika 80°C'de denatüre edilmiş ve bunu takiben jele yüklenmiştir. Elektroforez Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell (BIO-RAD) sisteminde 120V'ta gerçekleştirilmiştir

Elektroforez sonunda jel camların arasından çıkarılmış (Şekil 32). Coomassie Brilliant Blue boyama solüsyonu ile boyanarak protein ekspresyonları gösterilmiştir (Şekil 110).

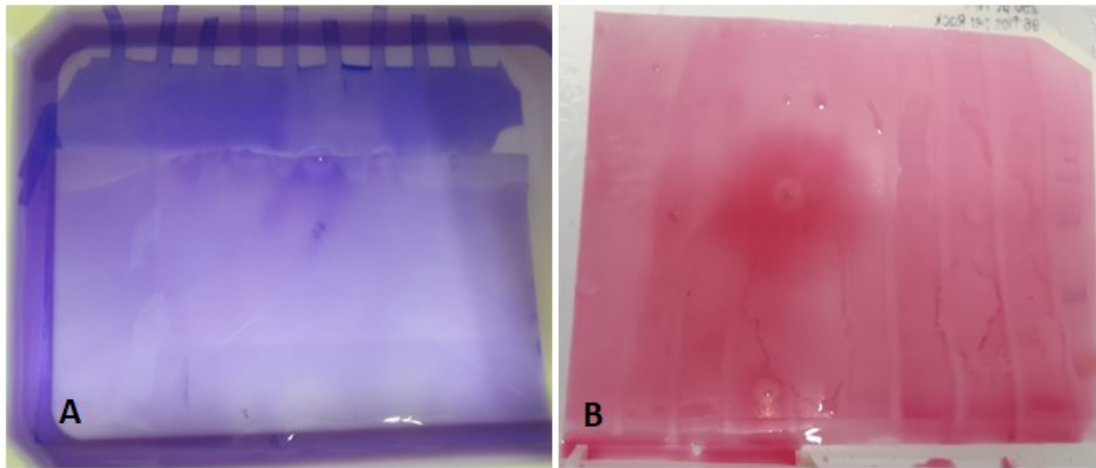


Şekil 110: SDS-PAGE jelinin Coomassie boyaması sonrasında protein ekspresyonlarının gösterilmesi. 350kDa'luk protein bandı, htt ekspresyonunu göstermektedir. (1: Opti-protein XL Marker. 2:Transfekte edilmemiş kontrol hücreler, 3: 90Q, 4:90Q+K1-PEG-NMDA-siRNA, 5: 90Q+K2PEG-NMDA-siRNA. 6: 90Q+K3-PEG-NMDA-siRNA, 7: 90Q+F1-NMDA-iyonik-siRNA, 8: 90Q+F1-NMDA-enkapsüle-siRNA, 9: 90Q+D-NMDA iyonik-siRNA, 10: 90Q+D-NMDA-enkapsüle-siRNA

Jeldeki protein bantlarının boyanma koyulukları karşılaştırıldığında, beklendiği gibi 90Q protein ekspresyonunun kontrole kıyasla artmış olduğu (2 ve 3), ayrıca siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının genel olarak htt protein ekspresyonunu azalttığı, özellikle de F1-NMDA ve D-NMDA nanopartiküllerinin (7-10) daha etkili olduğu, bunları sırasıyla K3-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K1-PEG-NMDA (6,5,4) nanopartiküllerinin takip ettiği belirlenmiştir. Bu veriler qRT-PCR verileriyle tam olarak örtüşmektedir.

Islak Transfer: SDS-PAGE elektroforezini takiben, proteinler PVDF membrana ıslak transfer metodu ile transfer edilmiştir. Bu amaçla, elektroforezi yapılan %6'luk SDS-PAGE jeli, jel ile aynı büyüklükte kesilmiş Whatman 3MM kağıtları ve MeOH

ile ıslatılmış PVDF membran 15 dakika 4°C’de transfer tamponunda dengelenmeleri amacı ile bırakılmıştır. Teflon sünger-Whatman 3MM kağıt-jel-membran- Whatman 3MM kağıt-Teflon süngerin üst üste koyulmasıyla hazırlanan blotlama sandvici soğuk transfer tamponu (25mM Tris, 192mM glycine) ile dolu blotlama tankına alınarak 30 V’da 12 saat boyunca transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. FLhtt-GFP proteini 350 kDa’luk büyük bir protein olduğu için düşük voltajda uzun süre blotlanması uygun olmaktadır. Beta aktin ve GAPDH proteinleri ise küçük molekül ağırlıklı olduklarından dolayı %10’luk jelde yürütülerek 100V, 1 saatte membrana transfer edilmiştir. Transfer sonrasında jel Coomassie boyama solüsyonu ile, membran Ponceau boyama solüsyonu ile oda sıcaklığında 15dk boyanarak sırasıyla proteinlerin jelden çıkışı ve membrana bağlanmaları kontrol edilmiştir (Şekil 111).

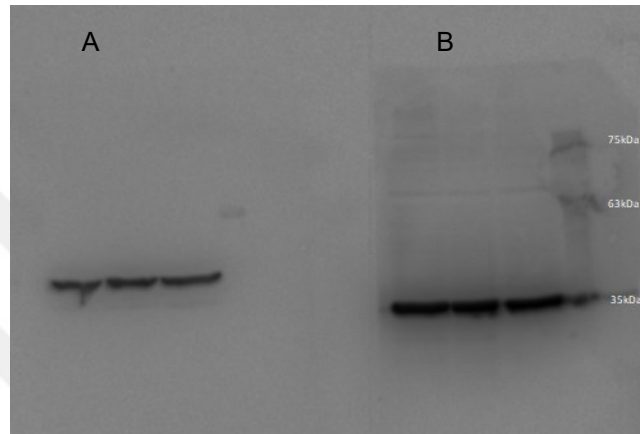


Şekil 111: Transfer sonrasında Coomassie ve Ponceau solüsyonları ile boyanmış jel ve membran

İmmüno boyama: Blotlama sonrasında PVDF membran bloklama tamponu (Advansta) ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek protein içermeyen membran bölgeleri kapatılmıştır. Primer antikor (Living colors peptide antibody, Clontech; anti-huntington protein antibody, Bioss; GAPDH, Proteintech; Beta-actin, CellSignaling) bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanarak oda sıcaklığında 1 saat membranla çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için PBST (PBS+%0,1 Tween20) ile üç defa 5’er dakikalık yıkama yapılmış, daha sonra membran bloklama tamponu ile hazırlanmış HRP konjuge sekonder antikor (goat, anti-rabbit ve goat, anti-mouse, Advansta) ile 1 saat muamele edilip, üç defa 5’er dakika PBST ile yıkanmıştır. Membran HRP substrat solüsyonu

(Advansta) ile 5 dakika muamele edildikten sonra Azure c300 cihazı ile görüntülenmiştir.

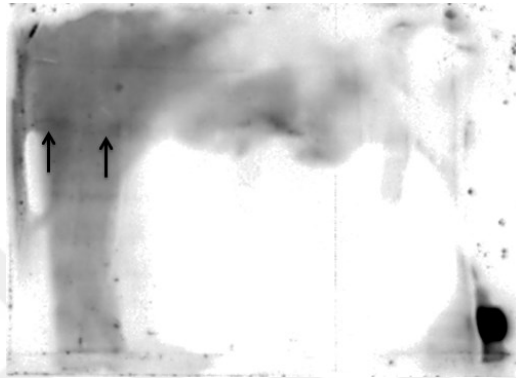
Beta aktin ve GAPDH primer antikorum ile yapılan antikor boyamaları, deneyde kullanılan örneklerde bu housekeeping protein ekspresyonlarının değişmediğini göstermiştir ve bu genlerin her ikisinin de referans gen olarak kullanılabileceğini ispatlamıştır, qRT-PCR’da da beta aktin geni kullanılmıştır (Şekil 112).



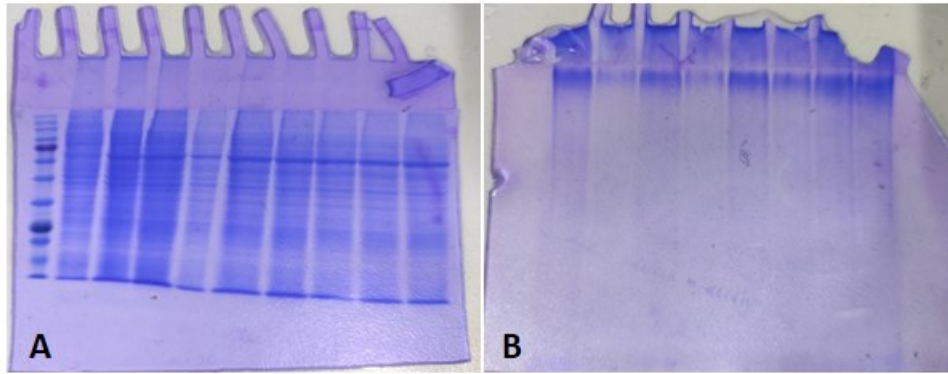
Şekil 112: Membran üzerinde A: β -actin (45kDa); B: GAPDH (36kDa)’e ait kemilüminesans görüntü

Htt protein ekspresyonunu göstermek için kullanılan GFP antikor ve htt antikor ile membranda zayıf sinyaller elde edilmiştir (Şekil 113). Bunun sebeplerinden birinin bu transfere ait jelin Coomassie boyaması sonrasında membrana aktarılmış olduğu düşünülmektedir. Coomassie boya solüsyonundaki fiksatifler (metanol ve glasiyel asetik asit) hali hazırda jelden çıkması göreceli olarak zor olan 350kDa’luk htt proteininin jelden çıkmasını daha da zorlaştırmış olabilir. Jelden membrana transfer sonrasında jel tekrar boyandığında proteinlerin büyük oranda jelde kaldığı gözlenmiştir (Şekil 114A). Ayrıca beta aktin ve GAPDH antikorum ile muamele amacıyla jeller elektroforez sonrasında direkt olarak ıslak transfer yapılmış ve başarılı bir şekilde membrana aktarımları gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla, sonraki transferler yapılırken buna dikkat edilerek jel, elektroforez sonrasında direkt olarak 30V, 10 saat transfere tabi tutulmuştur. Transfer sonrasında jel boyandığında transferin büyük oranda gerçekleştiği, ancak yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin jelde kaldığı, membrana yüksek verimle aktarılamadığı belirlenmiştir (Şekil 114B). 10 saat yapılan transferin süresi 12 saate çıkarılmış, ancak yine %100 verimli transfer

gerçekleşmemiştir. Daha önceki deneylerde 30V, 10 saatte yapılan başarılı transferlerin tekrarlanamaması, voltajın sabit tutulmasında bir problem olabileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak laboratuvarında sık yaşanan elektrik kesintileri de gece boyunca yapılan transferi etkilemiş olabilir. Bu nedenlerle htt proteininin membrana transferi ve antikorlarla tespit edilmesi tekrar edilecektir. 30V-16 saat, 100mA sabit akım ve transfer tamponunda modifikasyon (geçişi kolaylaştırmak için MeOH ve SDS eklenmesi) şartları denenecektir.



Şekil 113: Membran üzerinde GFP'ye ait kemilüminesans görüntü



Şekil 114: Transfer sonrası Coomassie ile boyanan jeller. (A) Protein aktarımının gerçekleşmediği (B) yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin jelde kaldığı örnekler

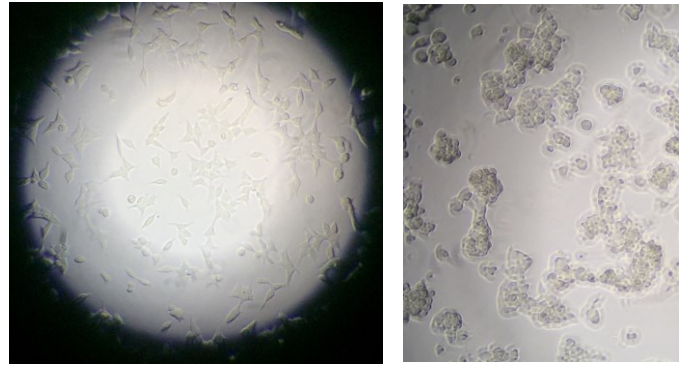
Sonuç olarak, siRNA yüklü nanopartiküllerin HTT gen ekspresyonunu başarılı bir şekilde susturduğu gösterilmiş, protein ekspresyonundaki azalma da SDS-PAGE jeli üzerinde ortaya koyulmuştur.

4.5. Flow Sitometri Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hedef Hücrelerdeki Reseptörlere Bağlanma Çalışmaları

Geliştirilen nanopartiküllerin hedef hücreler olan SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerine bağlanmasını incelemek için Flow sitometri (CytoFlex, Beckman Coulter, Amerika Birleşik Devletleri) yöntemi kullanılmıştır. Floresans madde (FITC-BSA), yüklenmiş yüzeyine hedeflendirme ligandı bağlanmış (N-metil D- aspartik asit) nanopartiküllerin hedef hücrelerde yüzeyinde bulunan N-metil D-aspartik asit reseptörlerine bağlanması, oluşturdıkları floresans yoğunluğu ölçülerek incelenmiştir. SH-SY5Y ve Neuro 2A hücre hatları (Pasaj 22- 27) kullanılmıştır. Hücreler, %5 karbondioksit (CO₂) ve %90 bağıl nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin canlılığını devam ettirmesi için %10 FBS ve antibiotik (%1 gentamisin) kullanılmıştır. Hücre yoğunluğunun yaklaşık %70 konfluent (sıkışık) duruma geldiğinde hücreler ya kültürün devamlılığının sağlanması için pasajlanmış ya da testlerde kullanılmıştır.

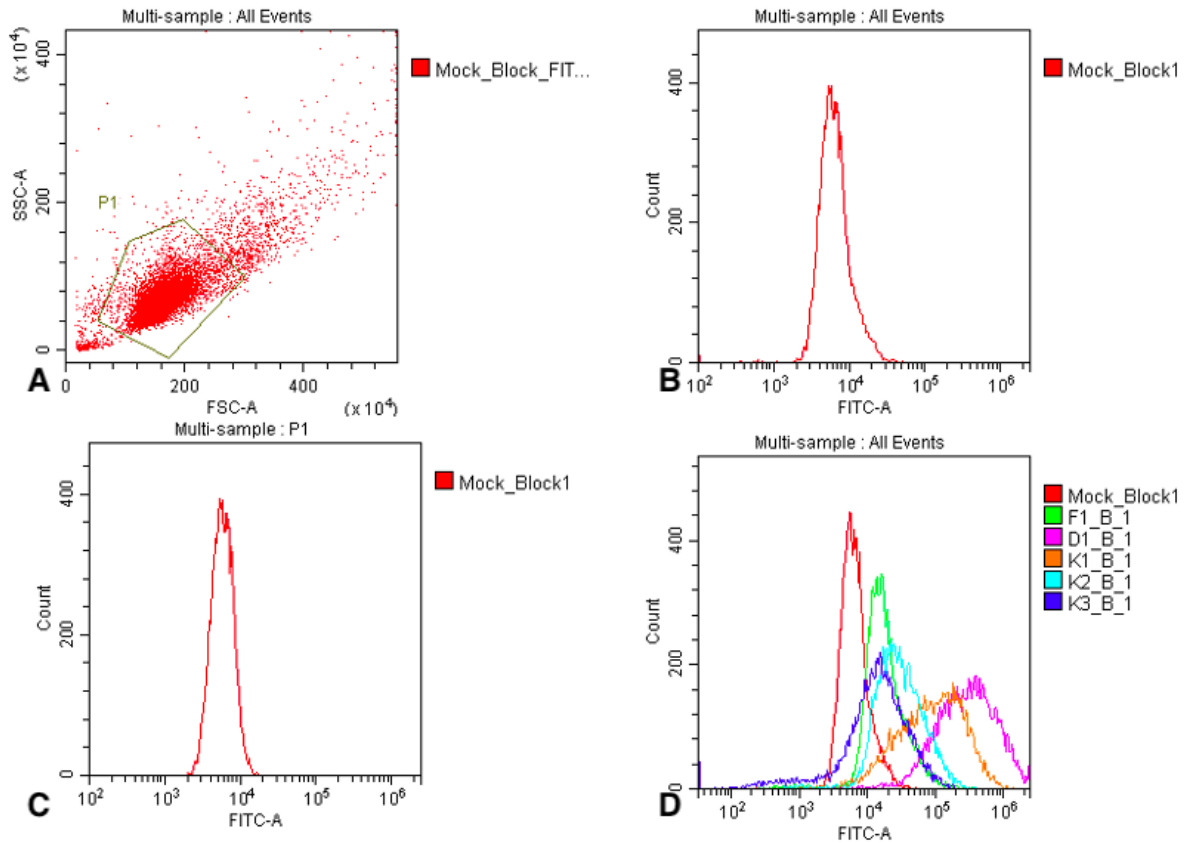
6 Kuyulu mikroplakalara yaklaşık 3×10^5 hücre/2 mL/kuyu olacak şekilde dağıtılan hücreler 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırılmış ve kuyular 500 µL PBS (1X) ile yıkanmıştır. Blok gruplarda, taze serumlu besiyeri ilavesini takiben 20µM olacak şekilde hedeflendirme ajanı N-Metil-D-Aspartik asit ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 30 dakikanın sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve takiben yeni serumlu besiyeri eklenmiştir. Tüm gruplarda 12,5µg/mL konsantrasyon olacak şekilde nanopartikül formülasyonları ortama eklenmiştir. Nanopartikül formülasyonlarına 0,1mg/mL konsantrasyonda FITC-BSA iyonik etkileşimle yüklenmiştir. Hücreler nanopartikülle 3 saat maruziyet ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve kuyular 500 µL PBS (1X) ile yıkanmıştır ve %0,2 tripsinden 1 mL ilave edilerek hücreler tripsinize edilmiştir. Hücre süspansiyonu 1500 rpm’de 4 dk süre ile santrifüj sonrası 2 defa 1 mL PBS (1X) ile yıkanmış ve her yıkamada 1500 rpm’de 4 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti böylece floresans yoğunluğunun tespiti için reseptöre bağlanma etkinliği testi için hazır hale getirilmiştir⁹⁰.

Boyanmamış hücelere (mock) göre kapı ayarlandıktan sonra her örnek için en az 10^4 hücre sayılmıştır. Deneyler, her konsantrasyon için 3 tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Şekil 115’de SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinin uygulama öncesi görünüşü gösterilmiştir.



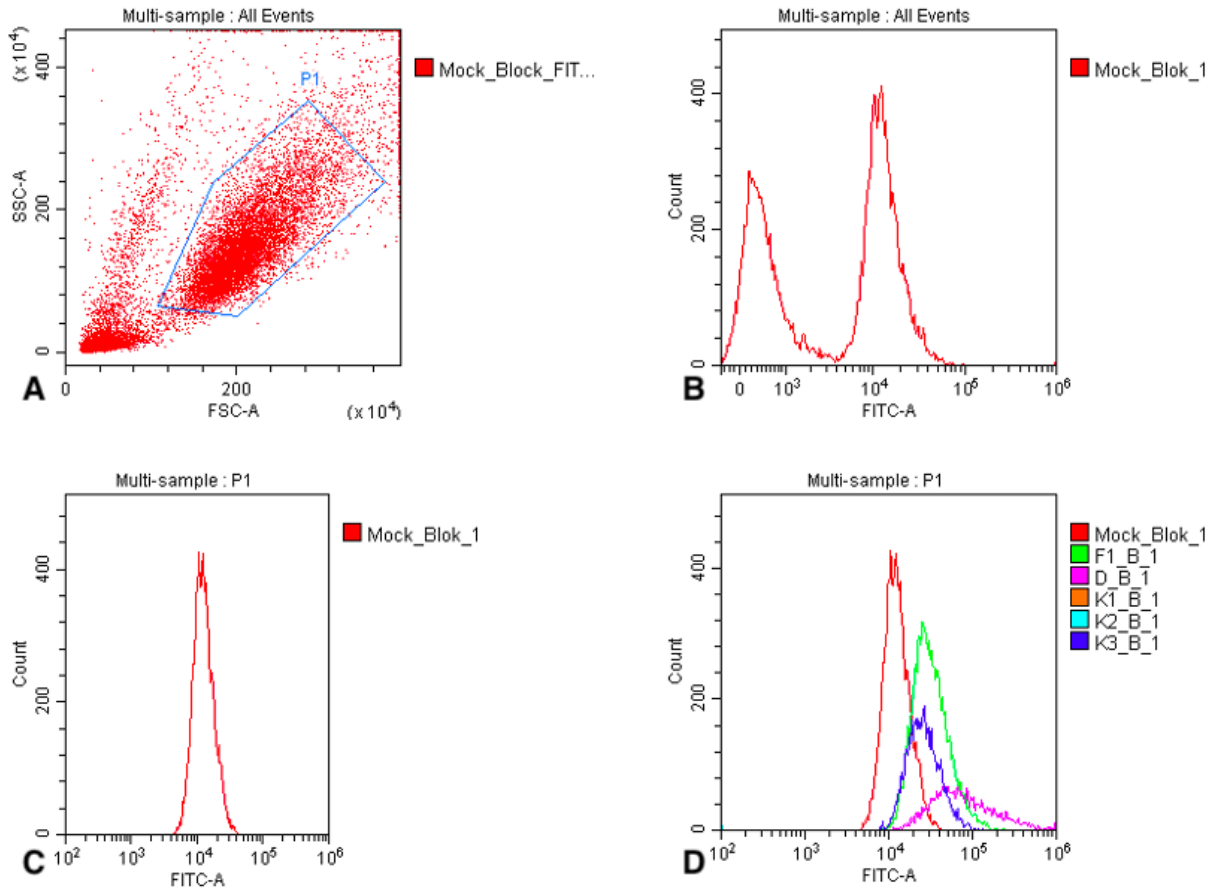
Şekil 115: SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinin görünümü

SH-SY5Y hücrelerinde yapılan çalışmada önce kapı aralığı (P1) belirlenmiştir. Daha sonra FITC bandındaki tüm hücelere bakılmıştır. Aynı zamanda P1 kapısında FITC bandında görülen tüm hücelere bakılmıştır. Bu işlemten sonra örnekler tatbik edilmiştir ve floresans yoğunluğu ölçülmüştür. Şekil 116'da görüldüğü üzere bloklanmış hücelere uygulanan nanopartikül formülasyonlarının ışımlarında azalma görülmüştür. Grafik üzerinden değerlendirildiğinde F1-NMDA formülasyonu diğer formülasyonlarla karşılaştığında daha fazla ışıma yapmıştır. D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının ışımasında ise belirgin bir azalma olmuştur.



Şekil 116: SH-SY5Y hücrelerinde flowsitometri grafikleri A) P1 kapısının belirlenmesi B) FITC bandındaki tüm hücreler C) P1 kapısında ve FITC bandındaki tüm hücreler D) Formülasyonların ışıma grafiklerinin karşılaştırılması

Neuro-2A hücrelerinin uygulama öncesi morfolojik yapılarına bakıldığında farklılaşma olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde bu hücreler flowsitometri analizine tabi tutulduğunda Şekil 117’de görüldüğü gibi iki farklı hücre kümelenmesi gözlemlenmiştir. Formülasyonlar yine de bu hücre gruplarına tatbik edilmiştir. Çalışmada önce kapı aralığı (P1) belirlenmiştir. Daha sonra FITC bandındaki tüm hücrelere bakılmıştır. Aynı zamanda P1 kapısında FITC bandında görülen tüm hücrelere bakılmıştır. Bu işlemden sonra örnekler tatbik edilmiştir ve floresans yoğunluğu ölçülmüştür. Şekil 117’de görüldüğü üzere bloklanmış hücrelere uygulanan nanopartikül formülasyonlarının ışımlarında azalma görülmüştür. F1-NMDA formülasyonu diğer formülasyonlarla karşılaştığında daha fazla ışıma yapmıştır. D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının ışımasında ise belirgin bir azalma olmuştur.



Şekil 117: Neuro-2A hücrelerinde flowsitometri grafikleri A) P1 kapısının belirlenmesi B) FITC bandındaki tüm hücreler C) P1 kapısında ve FITC bandındaki tüm hücreler D) Formülasyonların ışıma grafiklerinin karşılaştırılması

Yapılan bu çalışmada:

- F1_B_1: F1- NMDA
- D_B_1: D-NMDA
- K1_B_1: K1-PEG-NMDA
- K2_B_1: K2-PEG-NMDA
- K3_B_1: K3-PEG-NMDA olarak belirlenmiştir

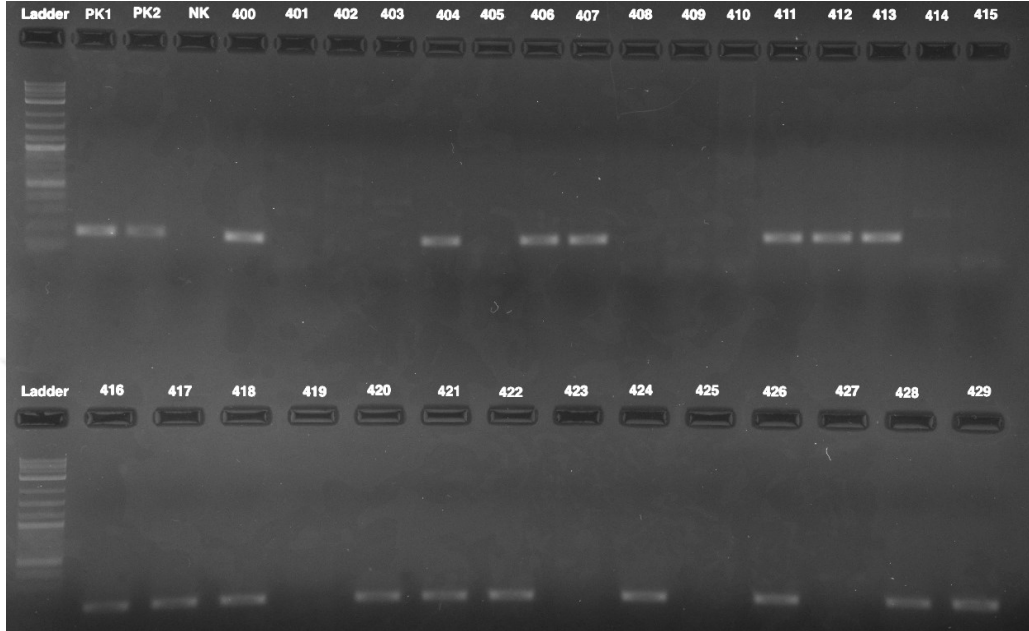
4.6. *İn Vivo* Çalışmalar

Jackson Laboratory'den sipariş verilen transgenik hayvanların üretimine İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) üretimine başlanmıştır. Tablo 70'de küpe numaralarına göre transgenik hayvanların genotipleme sonucu belirtilmiştir. Şekil 118, Şekil 119, Şekil 120 ve Şekil 121'te ise genotipleme çalışmalarının agaroz jel görüntüleri gösterilmiştir.

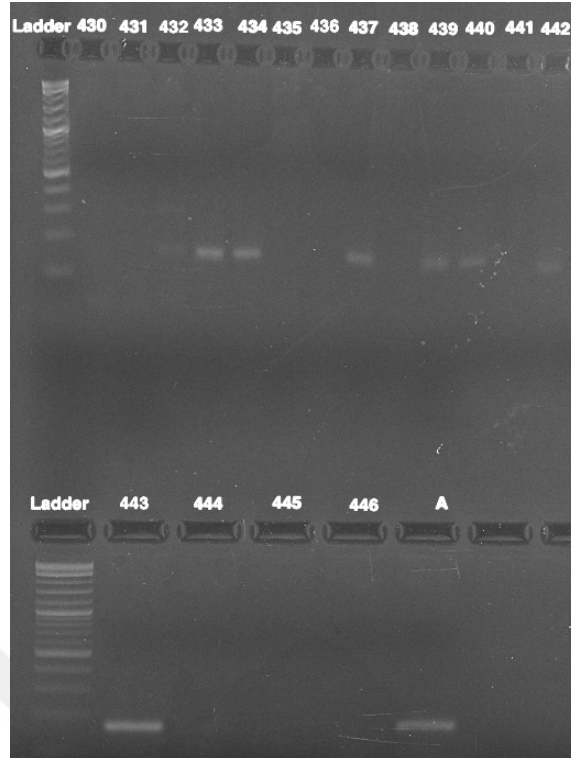
Tablo 70: Küpe numaralarına göre genotipleme sonucu

Küpe No	Pozitif	Negatif	Küpe No	Pozitif	Negatif	Küpe No	Pozitif	Negatif	Küpe No	Pozitif	Negatif
400	+		424	+		614			640	+	
401		-	425			615			641	+	
402			426	+		616	+		642	+	
403			427			617			643	+	
404	+	-	428	+		618			644		
405			429	+		619			645		
406	+		430			620	+		646	+	
407	+		431			621	+		647		
408		-	432			622	+		648		
409		-	433	+		623	+		649	+	
410		-	434	+		624			650		
411	+		435			625			651		
412	+		436			626			652		
413	+		437	+		627			653		
414		-	438			628			654	+	
415		-	439	+		629	+		655		
416	+		440	+		630	+		656	+	
417	+		441			631	+		657		
418	+		442	+		632	+		658	+	
419		-	443	+		633	+		659		
420	+		444			634	+		660	+	
421	+		445			635			661		
422	+		446			636	+		662		

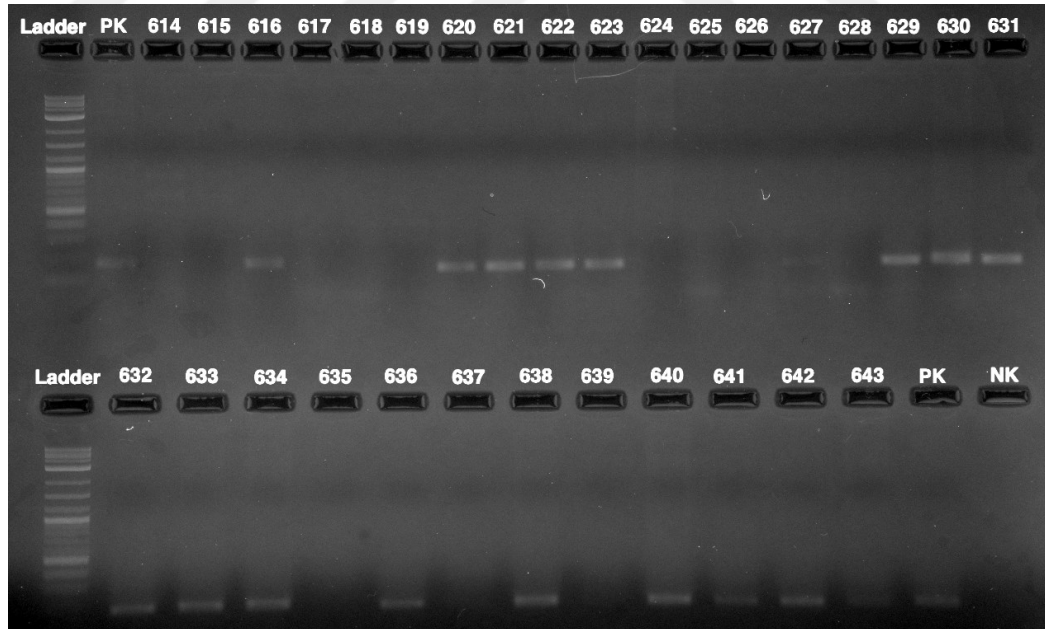
423	-	A	+	637		663	+
				638	+	664	+
				639		665	



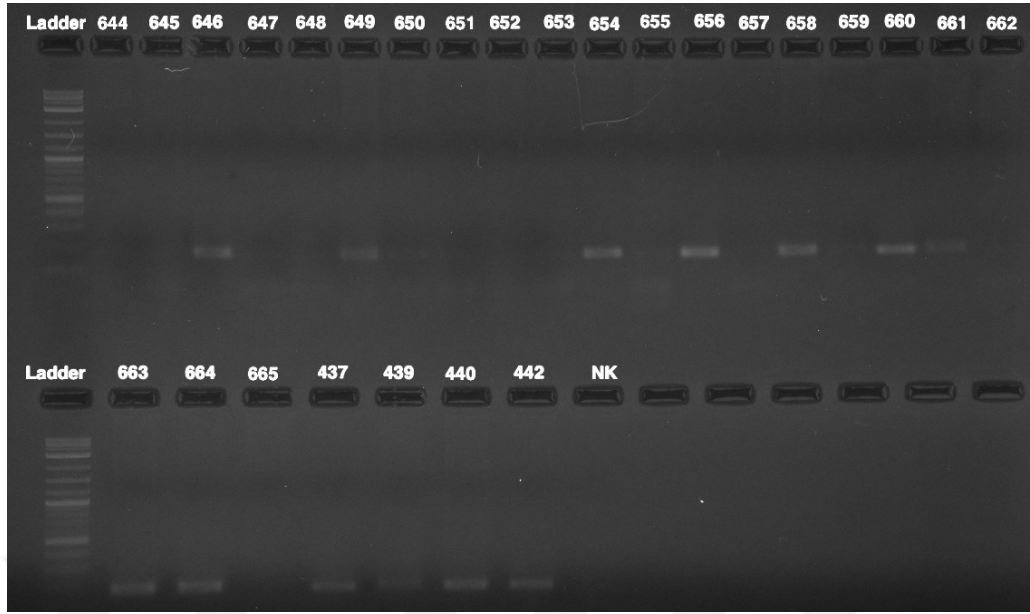
Şekil 118: Küpe numaraları 400 ile 429 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü
 PK: Pozitif kontrol NK: Negatif Kontrol



Şekil 119: Küpe numaraları 430 ile 446 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü



Şekil 120: Küpe numaraları 614 ile 643 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü
PK: Pozitif Kontrol NK: Negatif Kontrol



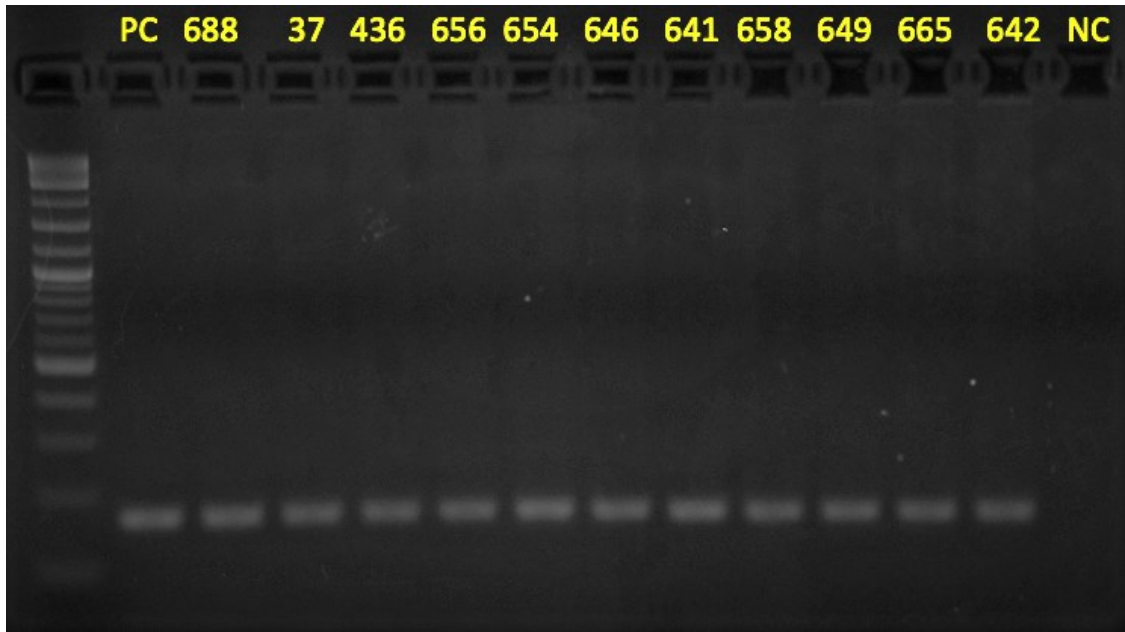
Şekil 121: Küpe numaraları 644 ile 665 arasında olan farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü

Tablo 71’de küpe numaralarına göre transgenik hayvanların genotipleme sonucu belirtilmiştir. Şekil 122, Şekil 123, Şekil 124 ise genotipleme çalışmalarının agaroz jel görüntüleri gösterilmiştir.

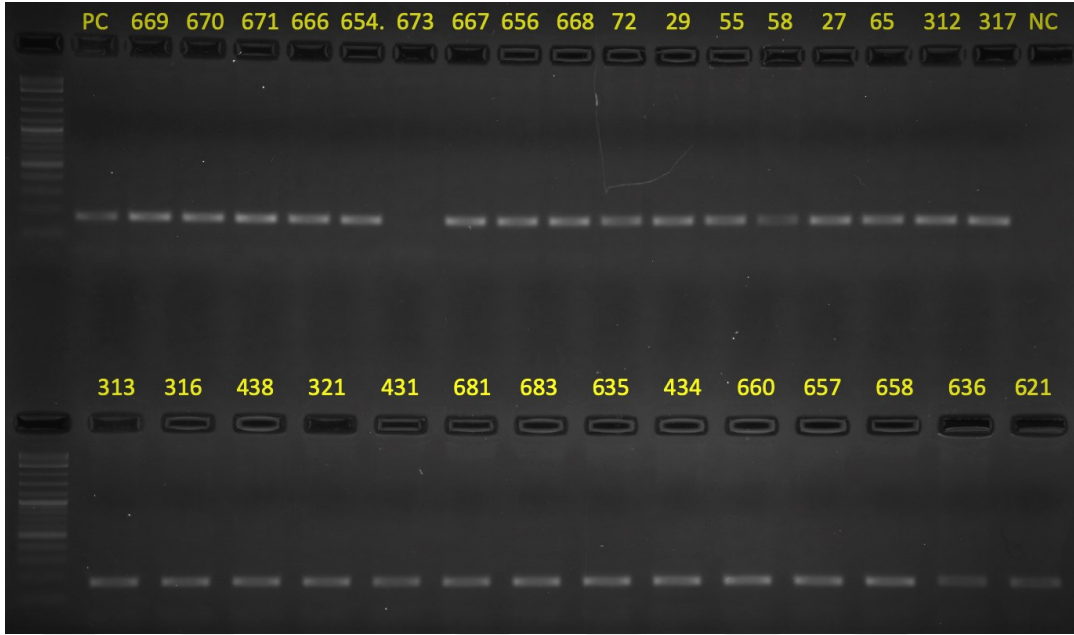
Tablo 71: Küpe numaralarına göre genotipleme sonucu

Küpe No	Pozitif	Negatif	Küpe No	Pozitif	Negatif	Küpe No	Pozitif	Negatif	Küpe No	Pozitif	Negatif
688	+		646	+		642	+		654-2	+	
37	+		641	+		669	+		673		-
436	+		658	+		670	+		667	+	
656	+		649	+		671	+		656	+	
654	+		665	+		666	+		668	+	
313	+		316	+		438	+		645	+	
321	+		431	+		681	+		683	+	
635	+		434	+		660	+		657	+	
658	+	-	636	+		621	+		309		-
325		-	39		-	30		-	323		-
253		-	254		-	319	+		54		-

26	+		42	+		255		-	637		-
310		-	256	+		257		-	415		-
916	+		644	+		659	+		648		-
414		-	438			628			654	+	
15	+		645		-	651		-	408		-
914	+										

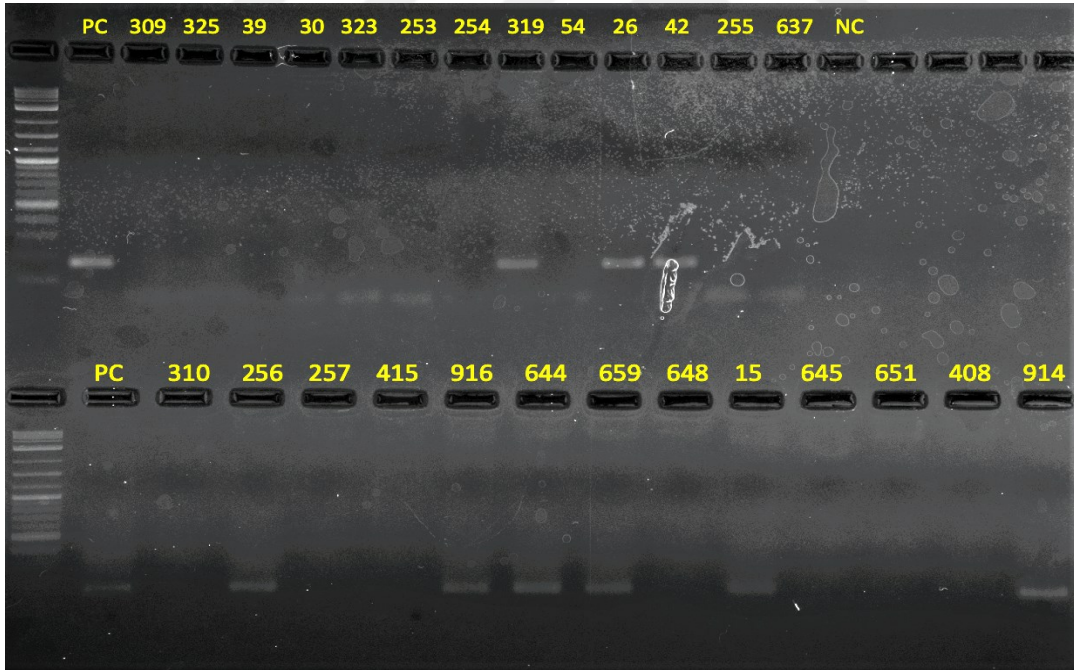


Şekil 122: Küpe numaralarına göre farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü
PC: Pozitif kontrol NC: Negatif Kontrol



Şekil 123: Küpe numaralarına göre farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü

PC: Pozitif kontrol NC: Negatif Kontrol



Şekil 124: Küpe numaralarına göre farelerin genotipleme sonucunun agaroz jel görüntüsü

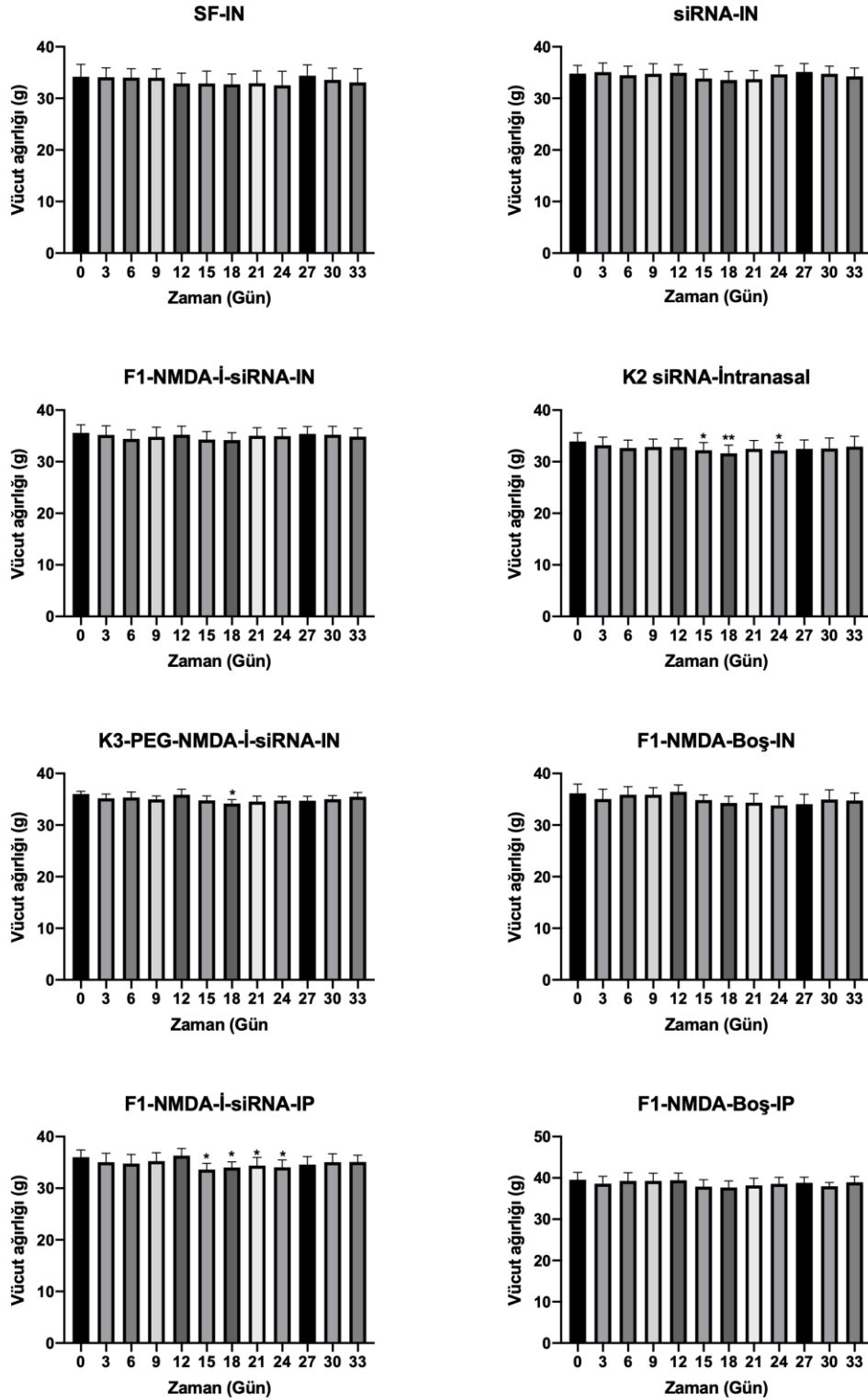
PC: Pozitif kontrol NC: Negatif Kontrol

Formülasyonlar 3 gün ara ile 10 uygulama olacak şekilde 1 ay boyunca uygulanmıştır. Daha sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen hayvanların beyinleri qRT-PCR ile ekspresyon tayini, Western Blot ile protein analizi, nöropatoloji ve immunohistokimya analizleri için beyni çıkarılmıştır. Yine aynı şekilde sitokin seviyesi tayini için sakrifiye edilen hayvanların kanları ayrı ayrı toplanmış ve serumları santrifüj ile elde edilmiştir.

4.6.1. Huntington Hastalığı Hayvan Modeli

4.6.1.1. Vücut Ağırlığı Tayini

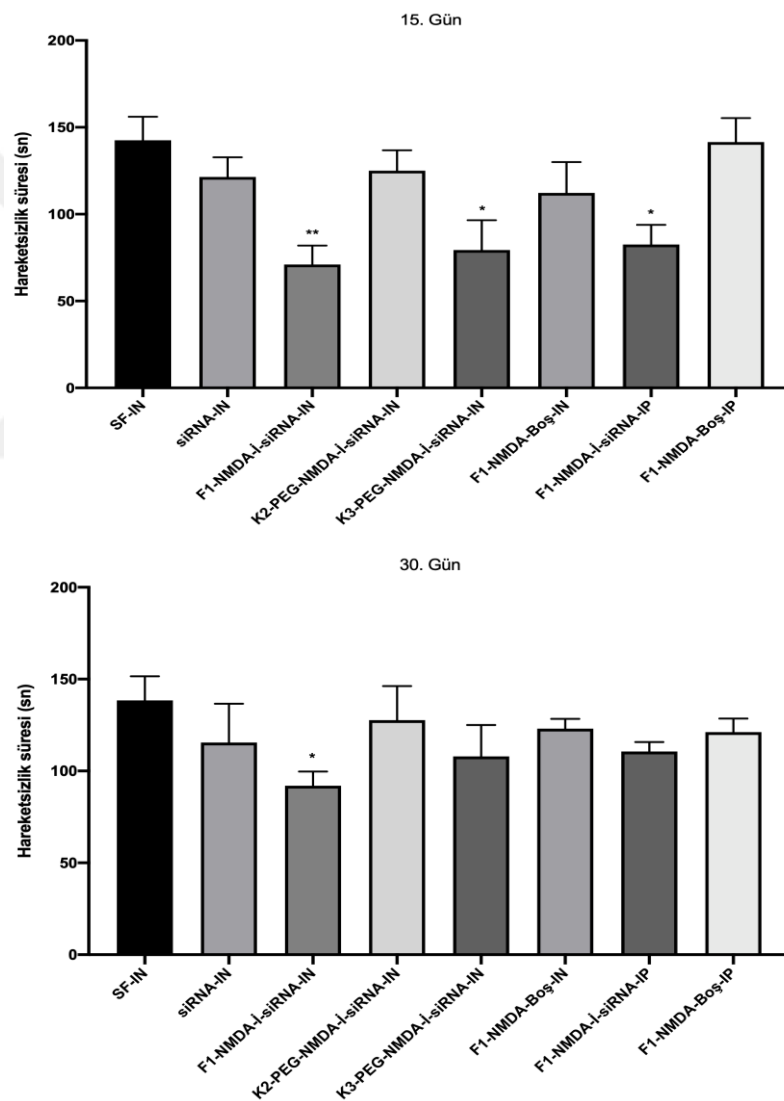
Transgenik farelerin vücut ağırlıkları her ilaç uygulamasından önce ölçülmüştür. Sonuçlar gram cinsinden verilmiştir. Farelerin vücut ağırlıklarındaki değişim Şekil 125'te gösterilmiştir.



Şekil 125: Farelerin vücut ağırlıklarının her uygulama sonrası değişimi (Ortalama Vücut Ağırlığı (g) $\pm$ Standart Hata). * $p<0.05$, ** $p<0.01$; 0. güne göre tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark

Hayvanların zamana bağlı vücut ağırlığı grafiği değerlendirildiğinde SF-IN, siRNA-IN, F1-NMDA-İ-siRNA-IN, F1-NMDA-Boş-IN ve F1-NMDA-Boş-IP gruplarında sıfırıncı güne göre belirgin bir ağırlık değişimi meydana gelmemiştir. Bununla birlikte K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN uygulanan grupta 15. ve 18. günlerde, K3-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN uygulanan grupta 18. günde ve F1-NMDA-İ-siRNA-IP uygulanan grupta ise 15., 18. ve 21. Günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

4.6.1.2. Tail Suspension Testi

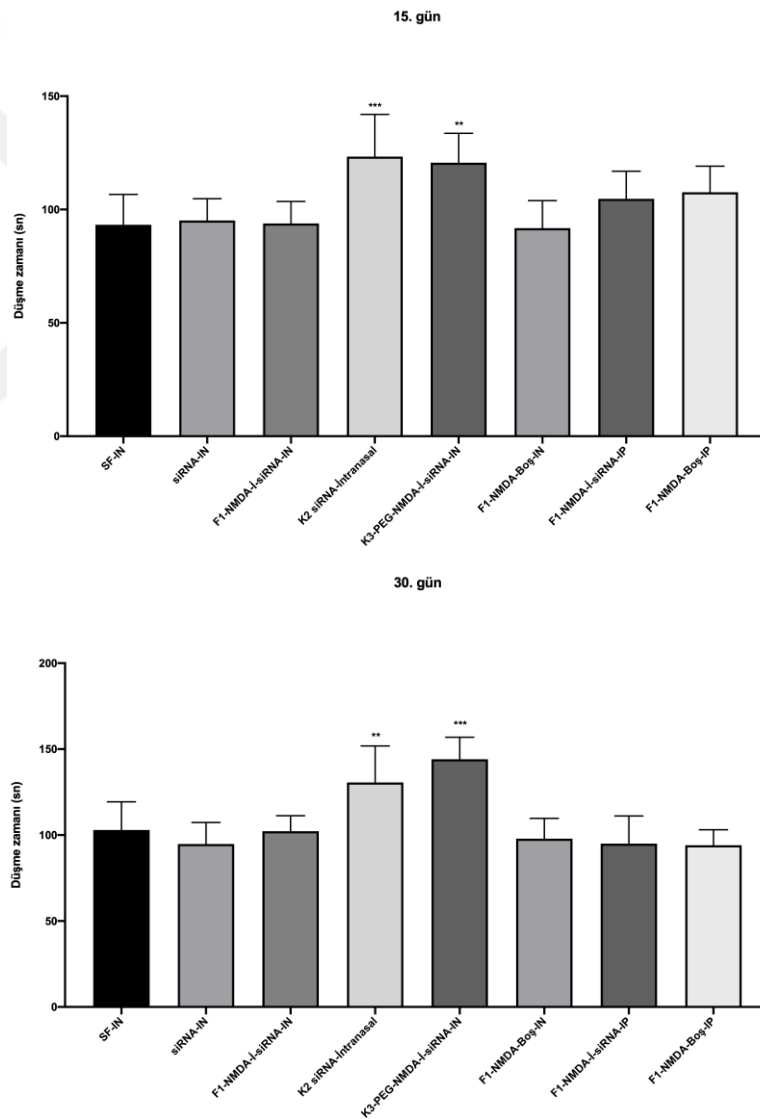


Şekil 126: 15. ve 30. Gün tail suspension testi grafiği (Hareketsizlik süresi (sn) $\pm$ Standart Hata). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; SF-IN grubuna göre tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark.

Tail suspension testi neticesinde F1-NMDA-İ-siRNA-IN formülasyonu uygulanan farelerde belirgin oranda hareketlilik artmıştır. Bu da uygulanan formülasyonun Huntington Hastalığı'na özel depresyon benzeri etkileri azalttığını göstermiştir. 15. gün ölçümlerinde K3-PEG-NMDA-I-siRNA-IN formülasyonu ve F1-NMDA-siRNA-IP formülasyonlarının da belirgin bir şekilde hareketsizlik süresini azalttığı görülmektedir. 30. gün deneylerinde istatistiksel anlamda belirgin bir şekilde azalma görülmesine de anlamlı bir düşüş devam etmektedir. Fakat F1-NMDA-İ-siRNA-IN grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş devam etmektedir.

4.6.1.3. Rotarod Testi

Deney sonucu 15. ve 30. gün Rota Rod testi grafiği Şekil 127'de gösterilmiştir.



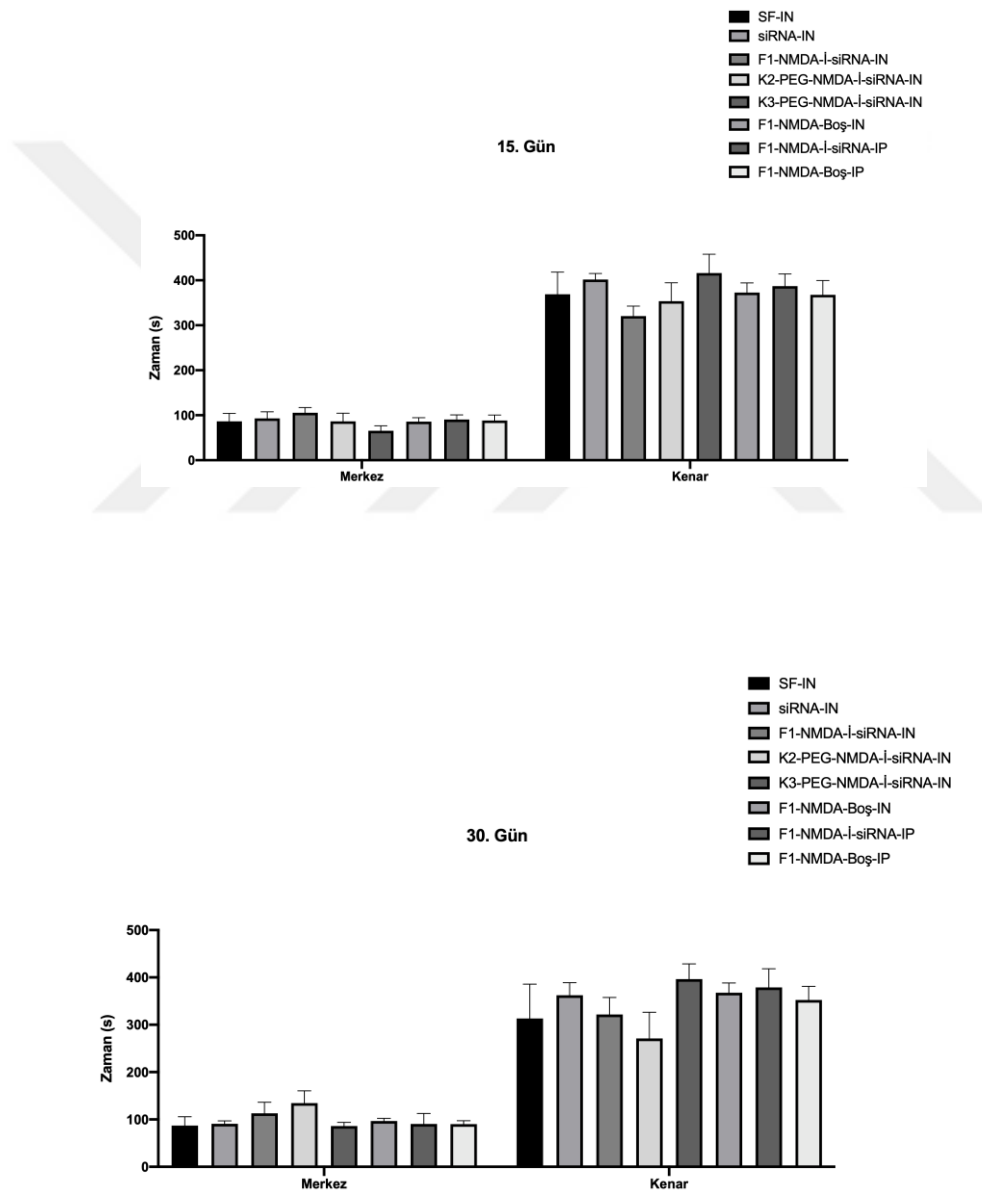
Şekil 127: 15. ve 30. gün Rota Rod testi grafiği (Düşme Zamanı (sn) ±Standart Hata).

p<0.01, *p<0.001; SF-IN grubuna göre tek yönlü varyans analizi ile anlamlı fark.

Grafikler incelendiğinde sıfırıncı uygulamaya göre K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN ve K3-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN formülasyonu uygulanan gruplarda belirgin oranda düşme zamanının uzadığı görülmektedir.

4.6.1.4. Open Field Analizleri

15. ve 30. günde yapılan open-field çalışma sonuçları Şekil 128’da gösterilmiştir.



Şekil 128: Open field analiz grafikleri (Zaman (sn) ±Standart Hata)

15. ve 30. günde yapılan open-field çalışma sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Bunun yanında merkezde geçirilen süre ölçüm sonuçlarına göre 15. Günde F1-NMDA-İ-siRNA grubu ($105,5 \pm 11,46$ sn) ile en anlamlı ölçüm yapılmıştır. 30. Gün ölçümlerinde ise K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN grubu ($134,6 \pm 26,01$ sn) ile en anlamlı ölçüm yapılmıştır. Bu gruptan sonra en anlamlı sonucu 30. Gün ölçümlerinde F1-NMDA-İ-siRNA ($112,9 \pm 23,49$ sn) ile elde edilmiştir.

4.6.1.5. qRT-PCR ile Ekspresyon Tayini

YAC128 transgenik ve kontrol fareleri beyinlerinden kuru buz üzerinde bloklar halinde kesitler alınmıştır (bregmadan 2mm kaudal ve 2 mm rostral). Striatum, motor korteks, parietal korteks ipsilateral ve kontralateral bölgelerini kapsayacak şekilde doku örnekleri toplanmıştır. Örnekler RNA-later RNA stabilization reagent (Qiagen) ile muamele edilerek işlem yapılana kadar -80°C 'de saklanmıştır.

-80°C 'den çıkarılan örnekler homojenize edildikten sonra RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve RNA miktarları nanospektrofotometrede 260nm dalga boyunda absorbans ölçümlerinin alınmasıyla kantitatif olarak belirlenmiştir. Sonrasında $1\mu\text{g}$ total RNA örneği ters transkripsiyon metoduyla, RT2 First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiş ve sentezlenen cDNA miktarları nanospektrofotometrede 260nm dalga boyunda absorbans ölçümlerinin alınmasıyla kantitatif olarak belirlenmiştir (Tablo 72). K; kafes numarasını ifade ederken G; grup numarasını ifade etmekte etmektedir. Grup 1 (G1) kontrol grubunu (SF-IN); Grup 2 (G2) serbest siRNA uygulamasını (siRNA-IN); Grup 3 (G3) F1-NMDA-İ-siRNA-IN nanopartikülü uygulamasını; Grup 4 (G4) K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN nanopartikülü uygulamasını; Grup5 (G5) ise K3-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN nanopartikülü uygulamasını temsil etmektedir.

Tablo 72: Dokulardan elde edilen RNA ve cDNA konsantrasyonları

Doku Örneği	RNA (ng/μl)	cDNA (ng/μl)
G1K4	115,101	1300,967
G1K2	128,209	1370,879
G2K11	120,143	1299,270
G2K1	83,355	1286,644
G3K6	139,409	1305,588
G3K7	94,657	1232,871
G4K3	87,868	1322,395
G4K5	90,486	1219,888
G5K9	92,444	1255,767
G5K10	125,347	1367,203

cDNA sentezi sonrasında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için 1μg cDNA örneği, HTT genine özgün primer (RT2 qPCR Primer Assay, Qiagen) ve RT2 Syber Green Fast Master Mix (Qiagen) kullanılarak Qiagen Rotor-Gene Q cihazında qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İnsan β-aktin geni referans gen olarak kullanılmıştır. qRT-PCR reaksiyonu in vitro çalışmalar için optimize edilen koşullarda Tablo 73’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 73: qRT-PCR koşulları

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95
40	15 saniye	95
	30 saniye	60
Erime eğrisi analizi		

qRT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi için öncelikle reaksiyonun eşik değeri (“threshold”) belirlenmiş, ardından her örneğe ait döngü eşik değeri (‘cycle threshold’, Ct) bulunmuştur. Her örnek için 3 tekrar yapılarak Ct değerlerinin ortalaması alınmıştır. Örnekler arasındaki ekspresyon seviyesi farklılıkları $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle (Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real time PCR data by the comparative Ct method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8) belirlenmiştir. Bu amaçla örneklerdeki beta aktin referans geni ve HTT genine ait Ct değerlerini kullanılarak ΔCt ve $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplanmıştır. $\Delta\Delta Ct$ değeri, gen ekspresyonundaki kat farkını temsil etmektedir (Tablo 74).

$$\Delta Ct = Ct_{HedefGen} - Ct_{ReferansGen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Örnek} - \Delta Ct_{Kontrol}$$

Tablo 74: siRNA yüklü nanopartiküllerin in vivo HTT gen ekspresyonuna etkisinin qRT-PCR ile belirlenmesi

Sample	Ct	Sample	Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
ACT G1K4	15,47	HTT G1K4	18,89	3,42	1,86	0,275476
ACT G1K2	16,56	HTT G1K2	18,12	1,56	0	1
ACT G2K11	16,11	HTT G2K11	18,97	2,86	1,3	0,406126
ACT G2K1	15,95	HTT G2K1	19,01	3,06	1,5	0,353553
ACT G3K6	15,94	HTT G3K6	18,73	2,79	1,23	0,426317
ACT G3K7	16,74	HTT G3K7	18,89	2,15	0,59	0,664343
ACT G4K3	16,88	HTT G4K3	18,54	1,66	0,1	0,933033
ACT G4K5	17,3	HTT G4K5	18,97	1,67	0,11	0,926588
ACT G5K9	18,57	HTT G5K9	19,58	1,01	-0,55	1,464086
ACT G5K10	23,68	HTT G5K10	23,08	-0,6	-2,16	4,469149

In vitro testlerle önceden optimizasyonu gerçekleştirilen serbest siRNA ve nanopartikül formunda siRNA uygulanması sonucunda serbest siRNA'nın %60 ve F1-NMDA-İ-siRNA-İN nanopartikülünün %40-60% aralığında HTT gen ifadesini susturma sağladığı belirlenmiştir. Ancak K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN nanopartikülünün HTT gen ekspresyonunu %10 azaltabildiği belirlenerek verimliliği yeterli bulunmamıştır. K3-siRNA nanopartikülünün ise HTT gen ekspresyonunu azaltmadığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

5.1. Genel Değerlendirme

Huntington hastalığı (HH), ilk kez 1872'de Amerikalı bir doktor olan George Huntington tarafından tanımlanmıştır. George Huntington HH'yi, bazı ailelerin kore ve psikiyatrik semptomlarla işaretlenmiş kalıtsal bir durumdan etkilendiğini ve hastalığın “tedavisi olmayanlardan biri” olduğunu kaydetmiştir. HH, motor, bilişsel ve psikiyatrik özellikler üçlüsü ile karakterize otozomal dominant nörodejeneratif bir hastalıktır. HH'nin, 10-15 yıl boyunca semptomların geri dönüşümsüz ilerlemesi ile tipik olarak erişkin başlangıcı en çok görülmektedir^{1,2}. Fakat artık HH'nin genetiği ve patobiyolojisi hakkında çok şey bilinmektedir, bu da araştırmacılara potansiyel terapötik ajanları tasarlamak için sağlam bir temel sağlamaktadır.

Tez çalışmamızdaki genel amacımız HTT hastalığının tedavisinde kullanılabilecek yenilikçi formülasyonlar tasarlamak ve bu formülasyonların etkinliğini değerlendirmektir. Literatürde siRNA' nın intraperitonel ve nazal yol ile kullanılabilen kitozan ve poli beta aminoester bazlı nanopartikül formülasyonlarının bulunmaması projenin yenilikçi yönüdür.

5.2. Polimer Sentezi ve Sentezlenen Polimerlerin Karakterizasyonu

Tez çalışmamızda polimer sentezi olarak kitosanın PEGlenmiş aminli bileşiklerinin sentezi ve poli beta aminoester polimerlerinin sentezi yapılmıştır. Çalışmamızda viral olmayan gen taşıyıcı sistemler olarak kitosan ve PBAE tercih edilmesinin sebebi her iki polimer ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olmasıdır^{115,116}. Bölüm 3.2.1.1 ve 3.2.1.2'de anlatıldığı üzere 3 farklı modifiye kitosan (Polimer kodları: K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA) ve 37 farklı PBAE polimerinin (Polimer kodları: A1-2, A1-3, A1-4, A1-5, B1-2, B1-3, B1-4, B1-5, C1-2, C1-3, C1-4, C1-5, D1, D2, D3, D4, E1, E2, E3, E4, F1, F2, F3, G, H, L, M1, M2, ME1, ME2, P1, X1, X2, X3, X4, Y, Z) sentezi gerçekleştirilmiştir.

K1 polimerinin sentezinde güçlü antioksidan özelliğinden dolayı gallik asit (GA) ve katyonik özelliklerini arttırmak için 3-dimetilamino-1-propilklorür hidroklorür (DAPC) kullanılmıştır^{117,118}. K2 polimerinin sentezinde N-(2-hidroksietil)etilendiamin modifikasyonu yapılmıştır. Son olarak K3 sentezinde ise

gallik asit ve N-(2-hidroksietil)etilendiamin kullanılarak düşük moleköl ağırlığına sahip kitosan polimeri modifiye edilmiştir. Sentezlenen bu polimerler PEG ile modifiye edilerek hedeflenme ajanı olarak N-metil-D-aspartik asit (NMDA) eklenerek modifiye edilmiştir. PEG ile modifikasyon sayesinde hazırlanan polimerlerin retiküloendotelyal sistemden kaçışları sağlanmıştır. NMDA sayesinde ise Huntington Hastalığı'nda nöron hücrelerinde miktarı artan NMDA reseptörlerine hazırlanan formülasyonlar hedeflendirilmiştir. Şekil 1'de kitosan polimerinin gallik asit ile modifikasyonu gösterilmiştir. Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'de sırası ile K1, K2, K3 polimerlerinin sentez şeması gösterilmiştir. Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22'de ise sırası ile K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA polimerlerinin PEG ve NMDA ile modifikasyonu için sentez şeması gösterilmiştir.

Polimerlerin sentezinde negatif yüklü akrilatlar (dietilenglikol diakrilat, tetraetilenglikol dimetakrilat, trimetiloilpropan etoksilat metileter diakrilat, neopentilglikol diakrilat, polietilenglikol diakrilat, bisfenol A etoksilat diakrilat, 1,6-hekzandiol diakrilat, dietilen glikol diakrilat) ve amin yapısındaki monomerler (etilendiamin monomerleri) kullanılmıştır. Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17, Şekil 18, Şekil 19'da sırası ile G, H, L, A1-2, A1-3, A1-5, A1-4, E1, D1, F1, F2, F3, D1-1, Y, Z olarak kodlanan polimerlerin sentez şemaları görülmektedir. Ancak elde edilen bu polimerlerden gerek polimerlerin kendi stabilitelerinin ve çözünürlüklerinin düşük olması gerekse düşük katyonik özellik göstermeleri sebebi ile sadece D1, F1, F2, F3, ME1, ME2 polimerleri ideal polimerler olarak bulunmuşlardır. PBAE yapıları kullanılarak nanopartikül hazırlanmasında da bu polimerler kullanılmıştır. Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25, Şekil 26, Şekil 27 ve Şekil 28'de ideal olarak bulunan PBAE polimerlerinin NMDA ile modifikasyonu gösterilmiştir. Bu polimerler kendi kimyasal yapıları içerisinde PEG bulundurduğu için PEG ile modifikasyon işlemi gerçekleştirilmemiştir.

Sentezlenen tüm polimerlerin karakterizasyonu kapsamında polimerlerin moleköl ağırlığı, yapısal özellikleri (FT-IR Spektroskopisi, ¹H NMR ve ¹³C NMR analizleri) ve termal özellikleri incelenmiştir.

Tablo 11'de PEG ile modifiye edilmiş K1, K2, K3 kitosan polimerleri ve ideal olarak belirlenen D1, F1, F2, F3, ME1 ve ME2 polimerlerine ait moleköl ağırlığı sonuçları gösterilmiştir. Tablo 12'de son ürün olarak NMDA ile modifiye edilmiş K1-

PEG, K2-PEG, K3-PEG, D1 ve F1 polimerlerine ait moleköl ağırlığı sonuçları gösterilmiştir.

PEGlenmiş modifiye kitosan polimerlerinin moleköl ağırlıkları ve buna bağı polidispersite sonuçları incelendiğinde, daha önceki çalışmalarda elde edilmiş olan Sigma tarafından ticari olarak “düşük moleköl ağırlıklı (low molecular weight)” olarak satılan kitosan ürününün ağırlıkça ortalama moleköl ağırlığı $284 \pm 2,9$ kDa ve polidispersite indeksi de $2,62 \pm 0,05$ olduğu düşünüldüğünde, bu çalışma sonucu elde edilen PEGlenmiş modifiye kitosanların uygun ağırlıklarda olduğu ve özellikle çok iyi bir dağılım (monodispers) gösterdiği görülmüştür. Bununla beraber, PEGlenmiş ürünlerin ticari olarak satılan kitosanın moleköl ağırlığından düşük bulunması ise, yapılan modifikasyonlara bağı olarak sıcaklık ve ortam etkenleri dolayısıyla zincirlerde kırılmalar meydana geldiği ve sonrasında da saflaştırma ile uzaklaştırma işlemleri uygulanması sebebiyle olduğu düşünülmektedir.

PBAE ürünlerinin moleköl ağırlıklarına bakıldığında ise, PBAE_{BAEDED} (D1) polimerinin diğ PBAE ürünlerinden daha yüksek moleköl ağırlığına sahip olduğu görülmektedir. Yüksek moleköl ağırlığına ulaşılmasının sebebinin ise, monomerlerin çözücü ortamı içerisine katılması sonrası reaksiyonun da aynı ortamda gerçekleştirilmesi olduğu düşünülmektedir. Diğ PBAE polimerlerinin sentezleri ise klasik kütle polimerizasyonuna göre gerçekleştirilmiş olup, elde edilen moleköl ağırlıkları ve dağılımları literatür ile uyumludur^{119,120}.

Sentezlenen polimerlerin karakterizasyon çalışmalarından biri olan FTIR analizleri için önce NMDA ile modifiye edilmeyen polimerler daha sonrasında ise NMDA ile modifiye edilen polimerlerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 13’de NMDA ile modifiye edilmemiş PBAE polimerlerine ait (F1, F2, F3, ME1, ME2, D1) FTIR absorpsiyon bandları bulunmaktadır. Şekil 43’de ise aynı polimerlere ait FTIR spektrumları bulunmaktadır. Elde edilen veriler polimer sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Tablo 14’de Chi, PEG, K2, K2-PEG polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları bulunmaktadır. Şekil 44’de ise aynı polimerlere ait FTIR spektrumları görülmektedir. Bu spektrumların analizi neticesinde kitosanın HE-EDA reaksiyonunda, reaksiyonun kitosanın metilol grupları ile HE-EDA’nın hidroksil grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Aynı zamanda, PEGilasyon reaksiyonunun beklendiği gibi metoksi PEG’in, hidroksil grupları ile kitosanın geriye kalan metilol grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Tablo 15’de Chi-GA,

PEG, K1, K1-PEG polimerlerine ait absorpsiyon bandları bulunmaktadır. Şekil 45’de ise aynı polimerlerin FTIR spektrumları bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlar neticesinde kitosanın GA reaksiyonunda, reaksiyonun kitosanın primer amin grupları ile GA’nın karboksilik asit grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Bununla beraber, Chi-GA’nın HE-EDA ile reaksiyonun ise kitosanın metilol grupları veya daha zor da olsa GA’nın hidroskil grupları ile HE-EDA’nın hidroksil grupları arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca PEGilasyon reaksiyonun beklendiği gibi metoksi PEG’in, hidroksil grupları ile kitosanın geri kalan metilol grupları veya gallik aside ait hidroksil grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Tablo 16’da ve Şekil 46’da ise Chi-GA, K3, PEG, K3-PEG polimerlerine ait FTIR absorpsiyon bandları ve spektrumu gösterilmiştir. Tablo ve şekil analiz edildiğinde, kitosanın GA reaksiyonunda kitosanın primer amin grupları ile GA’nın karboksilik asit grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür. Bununla beraber, Chi-GA2nın DAPC ile reaksiyonun ise kitosanın metilol grupları veya daha zor da olsa gallik asidin hidroksil grupları ile GA2nın klorür grupları arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca PEGilasyon reaksiyonunun beklendiği gibi metoksi PEG’in, hidroksil grupları ile kitosanın geriye kalan metilol grupları veya gallik aside ait hidroksil grupları arasında gerçekleştiği görülmüştür.

NMDA ile modifiye edilmiş tüm polimerlerin yapıları Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FTIR) tekniği ile aydınlatıldı. FTIR analizleri Cary 630 model FTIR cihazında gerçekleştirildi. Ürün/KBr oranı 1/200 mg olacak şekilde seyretilerek hazırlanmış tabletler kullanılarak, 650-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında spektra kaydedildi. Her bir ürün aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirildi. K1-PEG (Chi-GA-DAPC-PEG) ve K1-PEG-NMDA (Chi-GA-DAPC-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 47 ve Tablo 17’de gösterilmiştir. K2-PEG (Chi-HE-EDA-PEG) ve K2-PEG- NMDA (Chi-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 48 ve Tablo 18’de gösterilmiştir. K3-PEG (Chi-GA-HE-EDA-PEG) ve K3-PE- NMDA (Chi-GA-HE-EDA-PEG-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 49 ve Tablo 19’de gösterilmiştir. D1 (PBAE_{BAEDED}) ve D1-NMDA (PBAE_{BAEDED}-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 50 ve Tablo 20’de gösterilmiştir. F1 (PBAE_{BAEDAP}) ve F1-NMDA (PBAE_{BAEDAP}-NMDA) ürünlerine ait FTIR sonuçları Şekil 51 ve Tablo 21’de gösterilmiştir.

FT-IR spektrumları (Şekil 47 ve Tablo 17) değerlendirildiğinde K1-PEG (CHI-GA-DAPC-PEG) ürünü ile NDMA reaksiyonunda, CHI-GA-DAPC-PEG’li ürünlerdeki kitosanın primer amin (NH_2) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı oluşumu görülmüştür. Kitosanın reaksiyona girmemiş metilol gruplarıyla veya MEPG yapısındaki serbest OH grubuyla NMDA’nın COOH gruplarıyla ester bağı oluşturduğu görülmüştür. Gallik asit yapısındaki serbest OH gruplarıyla NMDA yapısındaki COOH grupları arasında reaksiyonun gerçekleşmediği görülmüştür. NMDA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO^-Na^+ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları metoksiPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görülmüştür ⁹⁶. FT-IR spektrumları (Şekil 48 ve Tablo 18) değerlendirildiğinde NDMA ile reaksiyonunda, Chi-HE EDA-PEG’li ürünlerdeki HE EDA yapısında bulunan serbest NH_2 grubuyla NMDA yapısındaki COOH grubu arasında sekonder amid oluşumu görülmüştür. NMDA ile reaksiyonun kitosanın serbest amin grubuyla belirgin bir şekilde olmadığı görülmüştür. NMDA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO^-Na^+ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları MPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görülmüştür ⁹⁶. FT-IR spektrumları (Şekil 49 ve Tablo 19) değerlendirildiğinde CHI-GA-HE EDA-PEG ürünü ile NDMA reaksiyonunda CHI-GA-HE EDA-PEG’li ürünlerdeki HE EDA yapısında bulunan serbest amin (NH_2) grubuyla NMDA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı oluşumu görülmüştür. NMDA ile reaksiyonun Kitosanın serbest amin grubu (NH_2) ile gerçekleşmediği belirgin bir şekilde görülmüştür. NMDA yapısındaki serbest COOH grubu reaksiyon sonrasında uygulanan çöktürme aşamasında NaOH kullanıldığından COO^-Na^+ tuzu halinde bulunduğu, aynı zamanda bu serbest iyonize karboksilat grupları MPEG molekülündeki serbest OH gruplarıyla reaksiyona girerek ester bağı oluşturduğu görülmüştür. Gallik asit yapısındaki serbest OH gruplarıyla NMDA yapısındaki COOH grupları arasında reaksiyonun gerçekleşmediği görülmüştür ⁹⁶.

FT-IR spektrumları (Şekil 50 ve Tablo 20) değerlendirildiğinde $\text{PBAE}_{\text{BAEDED}}\text{A}$ ürünü ile NDMA reaksiyonunda $\text{PBAE}_{\text{BAEDED}}\text{A}$ ’li ürünlerdeki primer amin (NH_2) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı

oluşumu görülmüştür. FT-IR spektrumları (Şekil 51 ve Tablo 21) değerlendirildiğinde PBAE_{BAEDAP} ürünü ile NDMA reaksiyonunda PBAE_{BAEDAP}'lı ürünlerdeki hidroksil grupları ile (OH) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında ester bağı oluşumu görülmüştür⁹⁶.

Tüm kitosan ürünlerinin PEGilasyon ve NDMA ile reaksiyonları gerçekleştirilerek ¹H-NMR spektroskopisi ile yapısal karakterizasyonları tamamlandı ve reaksiyonların beklenildiği gibi gerçekleştiği görüldü. K2'nin ¹H-NMR'ına ek olarak Şekil 54 ve Şekil 55'de K2-PEG ve K2-PEG- NDMA ürünlerine ait ¹H-NMR spektrumları verildi. K2-PEG grafiğinde 3.5 ppm civarında (-O-CH₂-CH₂) gruplarına ait protonların piklerinin yoğun biçimde görülmesi ve K2-PEG-NDMA grafiğinde de 5.328 ppm'de yer alan (-CH₂-COO-) bandından ileri gelen protonlara ait integral alan hesaplanması sonucunda NDMA ile modifikasyonun gerçekleştiği görüldü. Sonuçlar FTIR analizi sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Tüm PBAE örneklerinin ¹H-NMR spektrumları ve açıklamaları Tablo 22, Tablo 23,

Tablo 24, Tablo 25'da ve Şekil 56, Şekil 57, Şekil 58, Şekil 59, Şekil 60, Şekil 61, Şekil 62, Şekil 63'da gösterildi. Bununla beraber yine tüm PBAE ürünleri ile NDMA modifikasyonu gerçekleştirildi ve diğer analizlerde en başarılı bulunan D1 ve F1 numunelerinin NDMA modifikasyonu ait ¹H-NMR spektrumları ve açıklamaları da Tablo 22, Tablo 23 ve Şekil 57, Şekil 59'de yer verilmiştir. Yapılan diğer karakterizasyon çalışmaları neticesinde ideal olarak seçilen D1 ve F1 polimerlerinin NDMA ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir ve NMR analizleri sunulmuştur. F2, F3, ME1 ve ME2 polimerlerinin NDMA ile modifikasyonu gerçekleştirilmemiştir. Tüm kitosan polimerlerinin PEGilasyon ve NDMA ile reaksiyonları gerçekleştirilerek ¹H-NMR ve ¹³CNMR spektroskopisi ile yapısal karakterizasyonları tamamlanmış ve reaksiyonların beklenildiği gibi gerçekleştiği görülmüştür. Şekil 64, Şekil 66 ve Şekil 68'de modifiye kitosan polimerlerine ait ¹H-NMR spektrumları verilmiştir. Ayrıca Şekil 65, Şekil 67, Şekil 69'da ise modifiye kitosan ürünlerine ait ¹³C-NMR spektrumları verilmiştir. FTIR ve ¹H-NMR analizlerine ilaveten ¹³CNMR analizleri gerçekleştirilmiş olan F1-NDMA ve D1-NDMA polimerlerinin spektrası Şekil 70'de verilmiştir. Her iki spektrumda da 162.7 ppm'de görülen NDMA bileşiğine ait C=O bağından ileri gelen pik ile F1 ürünündeki hidroksil grupları ile (OH) grubuyla NDMA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında ester bağı oluşumu ve D1

polimerindeki primer amin grupları ile (NH₂) grubuyla NMDA yapısındaki karboksil (COOH) grubu arasında sekonder amid bağı oluşumu görülmüştür. Sonuçlar yukarıda ayrıntılı bir şekilde verilen FTIR ve ¹HNMR analizleri sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Sentezlenen polimerlerin termal bozunma özelliklerini saptamak amacıyla Termogravimetrik analiz (TGA) yapılmıştır. İlk olarak PEG ile modifiye edilen kitosan (K1-PEG, K2-PEG, K3-PEG) ve modifiye edilmeyen PBAE polimerlerinin (D1, F1, F2, F3, ME1, ME2) polimerlerinin TGA eğrileri ve bu eğrilerden elde edilen ağırlık kayıpları ve nihai bozunma sıcaklıkları verilmiştir. Şekil 71-72 ve Tablo 26'da görüldüğü gibi, bu eğriler, oldukça açık bir şekilde tanımlanmış ilk, orta ve son oksidatif bozunma olmak üzere üç oksidatif bozunma aşamasının varlığını göstermektedir. İlk aşamaya karşılık gelen yaklaşık 195 ila 298°C aralığında, suyun uçması ve ilk aşama oksidasyon reaksiyonu ürünlerinin bozulması nedeniyle %10'luk belirgin bir ağırlık kaybı gözlenmiştir. Oksidatif bozunmanın diğer aşamalardan daha hızlı olduğu orta aşama, PBAE yapılarına bağlı olarak yaklaşık %60-80 ağırlık kaybıyla yaklaşık 315-431°C sıcaklık aralığında gerçekleşmiş olup bu aşamada ana ağırlık kayıpları gözlenmiş ve bu sıcaklık aralığında oksidatif bozunma oranları, PBAE'nin yapılarına bakılmaksızın oldukça benzer olarak yorumlanmıştır. Son oksidatif bozunma ise bu aşamadan sonra gözlenir ve PBAE yapılarına bağlı olarak yaklaşık 698-881°C'de tamamlanmıştır.

PBAE ürünlerine benzer şekilde, kitosan polimerlerinde de ilk bozunma aşamasına karşılık gelen yaklaşık 203 ila 228°C aralığında, %10'luk belirgin bir ağırlık kaybı gözlenmiştir. Orta aşama, kitosan yapılarına ve modifikasyonlarına bağlı olarak yaklaşık % 60-80 ağırlık kaybıyla yaklaşık 328-415°C sıcaklık aralığında gerçekleşmiş olup bu aşamada ana ağırlık kayıpları gözlenmiştir. Son oksidatif bozunma ise yine kitosan ve modifiye yapılarına bağlı olarak yaklaşık 578-971°C'de tamamlanmıştır.

Sentezlenen modifiye polimerlerin ligand (NMDA) takılması reaksiyonundan elde edilen son ürünler olan ligand modifiye polimerlerin (PBAE-NMDA ve PEG-Kitosan-NMDA) termal oksidatif bozunma özelliklerini saptamak amacıyla da Termogravimetrik analiz (TGA) yapılmıştır.

Tablo 27 ve Şekil 74'den görüldüğü gibi, polimerlerin hepsi ilk bozunma aralığında moleküllerindeki başlıca tutulmuş haldeki suyun uzaklaşması nedeniyle yaklaşık %5-15 arasında ağırlık kaybı göstermektedir. Takiben 2. bölgenin sonuna

kadar bozunma hızı oldukça yavaştır ve 200-270 °C'a kadar belirgin bir ağırlık kaybı gözlenmemekte ve %10-15 değerlerini korumaktadır. 3. bölge ise eğrinin eğiminden de görüldüğü gibi bozunmanın en hızlı olduğu adımdır ve %47-65 arasında değişen bir ağırlık kaybına bu bölgede ulaşılmaktadır. Takiben son bozunma bölgesinde hızı yavaşlayarak son iki ürün için 650°C'da, diğer ürün için ise daha yüksek sıcaklık olan 760°C'da son bozunma ürünleri CO, CO₂ ve benzeri gazların oluşumuyla bozunma son bulmaktadır. Sonuç olarak NMDA ligandının kitosan esaslı modifiye ürünlere takılması termal oksidatif dayanımını olumsuz yönde etkilemediği açıkça görülmektedir ¹²¹.

Şekil 75 ve Tablo 27'de görüldüğü gibi, PBAE-NMDA (D1-NMDA ve F1-NMDA) polimerlerinin termal oksidatif bozunma özellikleri de aynı davranışı sergilemektedirler. Şöyle ki; her 2 polimerin de aynı sıcaklık aralıklarında olmak üzere havada bozunmaları 3 kademe olmaktadır. Sadece son bozunma sıcaklıkları bakımından F1-NMDA polimerininki daha yüksektir. Polimerler yaklaşık 350°C'a kadar olan düşük bir hızla meydana gelen ilk oksidatif bozunma aşamasında moleküllerindeki başlıca tutulmuş haldeki suyun uzaklaşması nedeniyle yaklaşık % 8 ağırlık kaybı göstermektedir. Ancak 2. bozunma aşaması eğrinin eğiminden de görüldüğü gibi bozunmanın en hızlı olduğu adımdır ve yaklaşık %78 ağırlık kaybına bu bölgede ulaşılmaktadır. Takiben son bozunma bölgesinde hızı yavaşlayarak, son bozunma ürünleri CO, CO₂ ve benzeri gazların oluşumuyla bozunma D1-NMDA polimeri için 700 °C'da, F1-NMDA polimeri için ise 780 °C'da son bulmaktadır. Sonuç olarak NMDA ligandının PBAE esaslı modifiye polimerlere takılmasının diğer ürün gruplarında olduğu gibi, termal oksidatif dayanımını olumsuz yönde etkilemediği açıkça görülmektedir ¹²².

Her iki polimer grubunun termal oksidatif bozunma ürünleri karşılaştırıldığında ise, PBAE esaslı polimerler 350 °C'a kadar ancak %8 gibi düşük bir ağırlık kaybı göstermektedirler. Oysaki kitosan esaslı polimerlerin %10-15 gibi düşük ağırlık kaybına 200-270 °C'da ulaşmakta, bu ürünlerin 300-325 °C'daki ağırlık kaybı değerleri ise PBAE esaslı polimerlere göre çok yüksek olup yaklaşık %47-65 değerlerine ulaşmaktadır. Buna rağmen son bozunma sıcaklıkları benzer olup her iki ürün grubu için 650-760 °C arasında değişmektedir.

5.3. Formülasyon Çalışmaları

5.3.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Çalışmamızda nanopartiküller farklı yöntemler denenerek hazırlanmıştır.

Sentezlenen polimerler ile yapılan ön formülasyon çalışmaları neticesinde elde edilen nanopartikül formülasyonları partikül büyüklüğüne, partikül dağılımına ve zeta potansiyeline göre değerlendirilmiş ve başarılı olarak D1, F1, F2, F3, ME1 ve ME2 polimerleri kullanılarak hazırlanan formülasyonları belirlenmiştir. İdeal olarak seçilen D, D-NMDA, F1, F1-NMDA, F2, F3, ME1 ve ME2 polimerlerinin optimum hazırlama yöntemleri Tablo 6’de gösterilmiştir. Nanopartikül formülasyonları partikül büyüklüklerine, büyüklük dağılımlarına ve zeta potansiyeline göre ideal olarak seçilmiştir. İdeal olarak seçilen nanopartikül formülasyonlarından, partikül boyutu analizi yapılan önformülasyon çalışmalarından en küçük boyutlular, partikül dağılımı 0,5 ve aşağısında olanlar, zeta potansiyeli ise +30mV ve üstünde olanlar olarak belirlenmiştir. Yapılan bu değerlendirmeler neticesinde, retiküloendotelyel sisteme takılmadan kan beyin bariyerini aşan, homojen dağılım gösteren, siRNA’nın tamamının yüklenebildiği ve toksik etki görülmediği nanopartikül formülasyonlarının elde edilmesi amaçlanmıştır ¹²³⁻¹²⁵.

Bununla beraber her ne kadar başarılı gibi görünse de Huntington hastalığında kullanılmak üzere siRNA yüklenecek nanopartiküler sistemlerin belirlenmesi için farklı şartlarda (çözücüler, karıştırma hızları süreleri vs) gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre F2, F3, ME1 ve ME2 polimerlerinden hazırlanan nanopartiküler sistemlerin zetasizer sistemi ile partikül büyüklükleri, dağılımları ve zeta potansiyeli analiz sonuçlarına göre de 200 nm ve altı partikül boyutuna sahip, 0.5 PDI değeri altında ve +30 mV ve üstü zeta potansiyeline sahip bir formülasyonun olmadığı tekrarlı sonuçlarında da görülmektedir. Bu sebeple çalışmalara D1 ve F1 polimerleri kullanılarak devam edilmiş ve bu polimerlerden hazırlanan nanopartiküller değerlendirilmiştir. Bölüm 3.2’de son paragrafta açıklandığı gibi en başarılı bulunan D1-NMDA ve F1-NMDA polimerik nanopartiküler formülasyonlar ideal nanopartiküler sistemler olarak belirlenmiş ve farklı şartlarda (çözücüler, karıştırma hızları süreleri vs) analizler gerçekleştirilerek optimize edilmiş nanopartiküler formülasyonlara siRNA yüklenmiştir. Nanopartiküllerin, partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı (polidispersite indeksi, PDI), Foton Korelasyon Spektroskopisi

yöntemi ile tayin edilmiştir. PDI değerinin 0,3'den küçük olması hazırlanan formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımının homojen olduğunu göstermiştir ⁸⁶.

Nanopartiküllerin yüzey bileşimi, hücre giriş mekanizmalarını tanımlamak için gereklidir. Oldukça pozitif bir yüzey yükünün, hafif negatif nanopartikül yüzey yükünden farklı bir biyodistribüsyon gösterdiği açıklanmaktadır. Küçük partikül boyutu ve pozitif yüzey yükü, negatif yüklü hücre zar ile etkileşimleri kolaylaştırarak hücre alımı yardımcı olan fizikokimyasal özelliklerdir ^{126,127}

Burundan beyine ilaç uygulama için, ideal boyuttaki nanopartiküllerin boyutu <200 nm olmalıdır. Hazırlanan taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğü; ilaç salımı, biyodistribüsyon, hücre alımı vb. faaliyetleri etkilediği için formülasyon geliştirme ve karakterizasyon aşamasında önemli bir rol oynar. Buna göre Mantimadugu ve ark. partikül boyutu ≈ 200 nm olan (139.52 ± 5.35 nm) polimerik nanopartiküller hazırlamışlar ve olfaktor aksonları boyunca transellüler taşıma ile beyne doğrudan geçiş sağlamışlardır ¹²⁸.

Intranasal uygulamada olfaktor aksonlar üzerinden nanopartikül formülasyonunun transellüler taşınmasının gerçekleşmesi için partikül boyutları 200 nm'nin altında hazırlanmaya çalışılmıştır ¹²⁸. Hazırlanan kitosan nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu 200 nm'nin altında bulunmuştur.

Sava ve ark. Huntington hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirdikleri siRNA yüklü kitozan nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunu ve zeta potansiyelini sırası ile 103.7-205 nm arasında, 42,5-54,7 mV arasında bulmuştur. Yapılan çalışma neticesinde intranasal yolla uygulanan siRNA yüklü kitozan nanopartikülleri ile boş siRNA karşılaştırıldığında; siRNA yüklü kitosan nanopartiküllerinin boş siRNA'ya göre %77 oranında mutant hunginton proteinin sentezini inhibe ettiğini bulmuşlardır ¹²⁹.

Nanotaşıyıcılar sistemik dolaşımın, KBB geçişinin ve hücresel iletimin verimliliğini etkileyen çeşitli parametreler vardır. Birkaç çalışmada nanopartikül boyutu ve KBB penetrasyonu arasında açık bir ters korelasyon olduğu gösterilmiştir ^{130,131}. Özellikle, şimdiye kadar inme ve parkinson hayvan modellerinde yapılan çalışmaların çoğunda, boyutları 50 nm ila 100 nm arasında olan nanopartiküller kullanılmıştır. Nanopartiküllerin şekli aynı zamanda vücut dağılımını ve hücre alımı etkiler ve bu nedenle nanopartiküllerin küresel şekli çoğunlukla hazırlanır. Nanopartiküllerin şekli, diğer formların yanı sıra küresel, kübik, çubuk benzeri

arasında değişebilir. Çalışmaların çoğu, hazırlanması nispeten kolay olduğu için küresel nanopartiküllerle gerçekleştirilmiştir.

Sava ve arkadaşlarına göre, huntington hastalığı gen ekspresyonu için kitosan nanopartikülleri geliştirmişlerdir. Hazırladıkları kitosan nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik boyutu 103.7 ve 205nm arasında ve zeta potansiyeli 42.5 ila 54.7mV arasında tespit edilmiştir ¹²⁹. Benzer şekilde Godinho ve arkadaşları, β -Siklodekstrin siRNA nanotaşıyıcı formülasyonlarının düşük boyutunun (100 nm ile 350 nm arasında bir hidrodinamik ϕ) ve pozitif yüzey yükünün beyine hedefleme için ideal olduğunu ortaya koymuşlardır ¹³².

PDI değerinin 0,5'den küçük olması hazırlanan formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımının homojen olduğunu göstermiştir ⁸⁶.

Van Woensel ve ark. yaptıkları çalışmada glioblastoma tedavisi için siRNA yüklü kitozan nanopartikülleri hazırlamışlardır. Partikül büyüklükleri, partikül dağılımı ve zeta potansiyeli sırası ile 141 ± 5 nm, 0,3 ve + 32mV olarak bulunmuştur. Yapılan çalışma neticesinde intranasal yol ile uygulanan kitosan nanopartikül formülasyonlarının kısa süre içerisinde siRNA'yı merkezi sinir sistemine taşıdığı gösterilmiştir ¹³³.

Ayrıca, pozitif zeta potansiyeli, siRNA uygulaması için kullanılması amaçlanan nanopartiküllerin stabilitesini artırabilir. Orta (15 mV'ye kadar) veya yüksek pozitif zeta potansiyeline (15 mV'nin üzerinde) sahip nanopartiküller kan beyin bariyerini (KBB) geçebilir ve beyine ilaç taşıyıcı sistemler olarak etkili bulunmuştur. Örneğin, Jalluli ve ark. yüksek pozitif zeta potansiyeli olan maltodekstrin ile hazırlanan katyonik nanopartikülleri beyin taşımada etkili olarak tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra, zeta potansiyelin yüksek negatif/pozitif (15 ila 30 mV) değerleri, partiküller arasındaki birleşmeyi önleyerek elektrostatik itmeler nedeniyle nanopartikül dağılımını stabilize eder ¹³⁴.

Yapılan çalışmalar da değerlendirildiğinde hazırladığımız kitosan nanopartikül formülasyonlarımızın partikül boyutunun, partikül dağılımının ve zeta potansiyelinin intranasal, intravenöz ve intrarteryal uygulamaya uygun olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Tzeng ve ark. yaptıkları çalışmada poli beta aminoester yapısına sahip polimerik nanopartikül formülasyonlarına siRNA yüklemişler ve mesenkimal kök hücrelere osteojenik farklılaşmanın artırılması için hedeflemişlerdir. Yapılan bu

çalışmada hazırlanan nanopartikül formülasyonları 200 nm'nin altında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar neticesinde %91 oranında başarı sağlandığı görülmüştür¹³⁵.

Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarından bir diğeri ise morfolojilerinin incelenmesidir. Tüm bu sebeple hazırlanan formülasyonların TEM ve SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 78 ve Şekil 79'da sırası ile modifiye edilmemiş D1 ve K1 polimerine ait SEM görüntüleri bulunmaktadır. Hazırlanan formülasyonlar polimerik yapılar olduğu için formülasyonların elektron mikroskobu altında görüntülerinin alınması esnasında daha net görüntülerin alınabilmesi için merceğin formülasyonlara yaklaşması ile formülasyonlarda agromelasyon meydana gelmiştir. Bu sebeple optimizasyon çalışmaları yapılmış olup hem SEM hem de TEM görüntüleri Şekil 80'de gösterilmiştir. Yapılan analizler neticesinde hazırlanan formülasyonların TEM ve SEM görüntüleri literatür ile uyumlu bulunmuştur^{136,137}.

Elde ettiğimiz nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunun 200 nm ve altında olması, zeta potansiyellerinin +35 mV'den yüksek olması, PDI değerlerinin 0,5'ten küçük olması ve yüzey morfolojilerinin literatür ile uyumluluk göstermesi değerlendirildiğinde hazırladığımız nanopartikül formülasyonlarımızın siRNA taşınması açısından uygun olarak değerlendirilmiştir.

5.4. Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları

Geliştirilen formülasyonların piyasaya çıkmasını engelleyen en önemli faktörlerden biri stabilitesini uzun süre koruyamamasıdır. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları sonrası ideal olduğu belirlenen formülasyonların fiziksel ve kimyasal stabiliteleri 4 ± 2 °C (buzdolabında), 25 ± 2 °C ve 60 ± 5 bağıl nem ile 40 ± 2 °C ve 75 ± 5 bağıl nem şartlarında stabilite kabiniinde 12 ay boyunca incelenmek için yerleştirilmiştir. İlk etapta bir ay boyunca haftalık ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 37). Yapılan bu çalışma neticesinde hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin stabilitesini koruduğu gözlenirken PBAE nanopartiküllerinin destabil oldu gözlemlenmiştir. PBAE yapısında bulunan ester bağları literatürde de gösterildiği üzere hidrolize uğrayarak formülasyon stabilitesini kaybetmiştir⁹⁹. Bunun üzerine formülasyonlar liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon çalışmaları için farklı konsantrasyonlarda liyofilizasyon ajanı trehaloz, mannitol ve sorbitol kullanılmıştır. Dondurarak kurutma koloidal nanopartiküllerin uzun vadeli kararlılığını iyileştirmek için iyi bir tekniktir. Nanopartiküllerin sulu bir ortamdaki zayıf stabilitenin klinik kullanımına karşı büyük bir engel teşkil etmektedir^{100,101}.

Trehaloz, mannitol veya sorbitol'ün kriyoprotektan olarak kullanılması, nanopartiküllerin dondurularak kurutulması sırasında fiziksel özelliklerini korumak için etkili bir yoldur ^{102,103}. Bu kriyoprotektanlar arasında en çok tercih edilenlerden biri trehalozdur ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Trehalozun toksik olmaması tercih edilebilirliğini arttırmaktadır ¹⁰⁷. Almalik ve arkadaşları iyonik jelleşme yöntemi ile kitozan nanopartikülleri hazırlamışlardır. Bu hazırlanan sistemlerin % 5, % 10, % 20 ve % 50 konsantrasyonda altı farklı kriyoprotektan türü (sükroz, glikoz, trehaloz, mannitol, polietilen glikol-2000 ve polietilen glikol-10.000) kullanarak partikül boyutu açısından stabilitelerini incelemişlerdir. Sükroz ve trehaloz kriyoprotektanlarını, kitozan nanopartiküllerinde en yüksek koruyucu etkiye sahip olduğu tespit etmişleridir ¹⁰⁸. Yapılan tüm optimizasyon çalışmaları neticesinde nanopartikül formülasyonlarının liyofilizasyonu başarılı olmuştur. Bununla birlikte liyofilize edilen formülasyonlar 12 ay boyunca stabilitesinin değerlendirilmesi için stabilite kabinlerine bırakılmıştır.

İki aylık stabilite çalışması değerlendirildiğinde F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının stabil kalmadığı, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinde anlamlı değişimler gerçekleşmediği gözlemlenmektedir. K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının stabilite çalışmaları 12 ay boyunca devam ederken, F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonları için kriyoprotektanın değiştirilmesine ve yeniden optimizasyonun yapılmasına karar verilmiştir. 12 aylık stabilite çalışması değerlendirildiğinde F1-NMDA ve D-NMDA formülasyonlarının stabil kalmadığı, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelinde büyük değişimler gerçekleşmediği gözlemlenmektedir. Bu sebeple hazırlanan kitosan nanopartiküllerinin liyofilize bir şekilde saklanabileceği öngörülmüştür.

Liyofilize edilen formülasyonların %nem tayini de liyofilize edilmiş formülasyon açısından önemli bir parametredir. D1-NMDA ve F1-NMDA liyofilizasyon işlemleri tamamlanamadığı için %Nem miktarı ölçülememiştir. Bunun haricinde K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının %nem miktarları ölçülmüştür. Liyofilize edilen formülasyonların %nem miktarları literatür ile uyumluluk göstermiştir. Suyun uzaklaştırılmasıyla sağlanan gelişmiş

stabilite, ilaç endüstrisi tarafından yoğun bir şekilde kullanılmaktadır ¹¹⁰. Liyofilize edilmiş formülasyonlarda nem içeriğinin belirlenmesi, dondurularak kurutulmuş ürünlerin kalitesini ve stabilitesini tahmin etmek için esastır ¹¹⁰. Üstündağ Okur ve arkadaşları nebivolol yüklü katı lipid nanopartiküller hazırlamışlar ve hazırladıkları nanopartikülleri kitozan ve PEG ile modifiye etmişlerdir. Hazırlanan nanopartikül dispersiyonlarını %11 trehaloz ilave ederek liyofilize etmişlerdir. Daha sonra liyofilizasyon işleminin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel üzerine etkilerini inceleyerek liyofilizasyon sonra nanopartiküllerde nem miktarı tayini yapmışlardır. Partikül boyutu büyümesi modifiye edilmemiş nanopartiküllerde görülürken özellikle kitozan ve PEG ile modifiye edilmiş nanopartiküllerde tespit edilmemiştir. Nem miktarı tayini çalışmalarında %0,558 ile %3,412 aralığında nem tespit edilmiştir. Bu sebeple kullanılan liyofilizasyon tekniğinin kuru toz elde etmek için uygun ve yeterli bir yöntem olduğunu bulmuşlardır ¹¹¹.

5.5. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışmalarının temel amacı hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının gen tutma kapasitelerinin incelenmesidir. Yaptığımız çalışmanın sonuçları Tablo 58 ve Şekil 85’de gösterilmiştir. siRNA; K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA nanopartiküllerine iyonik etkileşimle F1-NMDA ve D1-NMDA nanopartiküllerine ise hem iyonik etkileşim hem de enkapsülasyon ile yüklenmiştir. Çalışma sonucunda polimer: siRNA tutulma oranı K1-PEG-NMDA’nın 5:1, K2-PEG NMDA’nın 10:1 oranında, K3-PEG-NMDA’nın ise 3:1 oranında enkapsüle edildiği bulunmuştur. F1-NMDA’da ise 40:1 oranında enkapsüle edildiği, 60:1 oranında ise iyonik etkileşimle siRNA’nın nanopartiküle bağlandığı bulunmuştur. D1-NMDA’da ise durum 3:1 oranında enkapsüle edildiği 5:1 oranında ise iyonik etkileşimle bağlandığı bulunmuştur. Bu çalışmada istenilen siRNA’nın görüntülenmesi esnasında bir ışıma vermemesidir. Bu sayede siRNA’nın hazırlanan formülasyonlarca tutulduğu kanıtlanmış olmaktadır. Yapılan çalışmanın sonuçları literatür ile uyumluluk göstermektedir¹³⁸.

5.6. Nanopartiküllerin Serum Stabilitesi Çalışmaları

Nanopartiküller genellikle farklı biyolojik sıvılar arasında geniş bir çeşitlilik gösteren çeşitli proteinler ve iyonlar içeren çeşitli biyolojik ortamlarla karşılaşılır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri genellikle fizyolojik tuz

konsantrasyonları altında karakterize edilir ve daha sonra serum içeren hücre kültürü ortamına veya diğer biyolojik sıvılara sokulur. Nanopartiküllerin kolloidal stabilitesini ve fizikokimyasal özelliklerini büyük ölçüde değiştirebilen nanopartikül-protein etkileşimleri bazen göz ardı edilebilir. Bu etkileşimler nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini, kolloidal kararlılığını ve nanopartikül-hücre etkileşimlerini büyük ölçüde değiştirdiği gösterildiğinden, biyolojik proteinlerle nanopartikül etkileşimlerinin ilaç taşınması üzerindeki etkisini anlamak önemlidir.

Kan dolaşımına verilecek siRNA yüklü nanopartiküllerin, serum varlığında stabilitesini incelemek çok önemlidir. siRNA'nın serum nükleazları nedeniyle serumda unstabil olduğu bulunmuştur ¹¹². Kan dolaşımına verilecek siRNA yüklü NMDA ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin, serum varlığında fiziksel stabilitelerini incelemek için, nanopartiküller, belirli zaman aralıklarında partikül boyutunun, PDI değerinin ve zeta potansiyelinin değişimi gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 59 ve Tablo 60'da gösterilmiştir.

Raval ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada FDA onaylı albumin bazlı taşıyıcılar geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri formülasyonların serum stabilitesini değerlendirmek amacıyla formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelleri 24 saat süre boyunca değerlendirilmiştir. Serum varlığında, 24 saat sonra bile formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelinde önemli bir değişiklik tespit etmemişlerdir ¹¹². Malcolm ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonuçlarına göre, serum içerisinde nanopartikül-siRNA komplekslerinin partikül boyut ve polidispersite indeksinde artış görüldüğü ve nanopartikül-siRNA agregasyonunu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, zaman geçtikçe nanopartiküllerin büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli çok fazla değişmemiştir. Bizim çalışmamızda %0,5 ve %1 FBS içeren ortamlarda da benzer şekilde sonuçlar tespit edilmiştir. Örneğin, D-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller 0 saat içinde PBS içinde mevcut boyutu 154,1 nm iken 1 saat içinde 193,9 nm'ye artış göstermiştir. Diğer saatlerde partikül boyutu değişmemiştir. Örneğin, Malcolm ve arkadaşları, hazırladıkları kompleks nanopartiküllerin serum varlığında büyük ölçüde (7 nm'den 74.5 nm'ye) artış gösterdiğini göstermişlerdir. Bu nedenle, mevcut sonuçlar hazırlanan nanopartiküllerin serumda oldukça kararlı olduğunu ve gerçek zamanlı olarak olası stabilitelerinin ölçülmesini önermektedir. Buna ek olarak, nanopartiküllerin zeta potansiyeli de değişir, ancak bu stabilitye etkileyebilecek

yüksek değerde değildir. Örneğin bizim çalışmamızda, K2-NMDA Polimeri ile hazırlanmış siRNA yüklü nanopartiküller 0 saatte Zeta potansiyeli $10,5 \pm 2,4$ ve deney sonunda $7,26 \pm 0,19$ 'dur. Bu fark potansiyel kullanımını etkilemeyecektir, çünkü hala istenen sınırlar içinde kalmaktadır ¹¹³. Ancak %5 FBS içeren ortamda nanopartiküller artan protein konsantrasyonu kaynaklı nispeten daha farklı özellikler göstermiştir (Şekil 86). Yapılan bu çalışma neticesinde formülasyonların 24 saate yaklaşırken partikül boyutu ve polidispersite indeklerinin arttığı gözlemlenmiştir. En çok değişikliği ise K1-PEG-NMDA nanopartikül formülasyonu göstermiştir. Formülasyonların daha sonra 24 saat boyunca siRNA bütünlüğünü koruduğunu gösterilmesi için önce agaroz jel daha sonra ise poliakrilamid jel elektroforez çalışmaları yürütülmüştür. Poliakrilamid jel az bazlı oligonükleotidlere agaroz jele göre daha hassas olduğu için her iki elektroforez yöntemi de tercih edilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm formülasyonların 24 saat boyunca siRNA bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 87, Şekil 89, Şekil 89, Şekil 90, Şekil 91, Şekil 92).

Dosta ve ark., RNAi tedavilerinde kullanılmak üzere serum stabilitesinin ve hedefleme etkinliğinin artırıldığı polibeta aminoester katyonik polimerlerini geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın neticesinde ürettikleri polimerin 48 saat boyunca serumda stabil kaldığını bulmuşlardır ¹³⁹. Biz de yaptığımız çalışma neticesinde F1-NMDA ve D-NMDA nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunu çok fazla değiştirmeden kaldığını ve aynı zamanda da 24 saat boyunca siRNA bütünlüğünü koruduğunu gözlemlenmiştir.

Katas ve ark., hızlı metabolize olan ve düşük oranda hücre içine alınan siRNA'ların bu özelliklerini ortadan kaldırmak adına boyutları 500nm'den küçük olan kitosan nanopartikül formülasyonları geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar neticesinde kitosan nanopartikül formülasyonların serumda 72 saat uygulamanın ardından tamamen parçalandığını gözlemlenmişlerdir ⁸⁸. Biz de K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA kitosan nanopartikül formülasyonu ile yaptığımız çalışmalarda siRNA bütünlüğünün 24 saat boyunca korunduğunu görmüş bulunmuştur.

5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Nanopartiküllerin hücre kültüründe oluşturabileceği sitotoksitenin değerlendirilmesi amacıyla MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum

bromür) testi uygulandı. Nanopartiküller ilk olarak ön bilgi sağlaması amacı ile laboratuvarında mevcutta bulunan HEK 293 ve POF hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda denenmiştir. Bu işlemler esnasında SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinin de büyümeleri sağlandıktan sonra bu hücrelere de rutinde çalışılacak olan konsantrasyonlarda nanopartikül uygulaması yapılarak MTT testi uygulanmıştır.

Genel olarak nanopartiküllerin farklı hücre hatlarında farklı seviyelerde toksisite gösterdiği anlaşılmaktadır. SH-SY5Y ve Neuro2A hücreleri nöron hücreleri olduğu için daha düşük dozlarda daha fazla toksisite görülmesi kabul edilebilir bir sonuçtur. Bununla birlikte, Tablo 61’te K2 ve F formülasyonlarının en yüksek konsantrasyonları ile alınan değerler genel sonuçlar ile uyumsuzluk göstermektedir. Bu da yüksek konsantrasyonlu nanopartikül yapılarının hücre kültürü medyumunda değişebileceği ihtimalini düşündürmektedir. Ek olarak, Neuro2A hücrelerinde K3 formülasyonunun daha fazla toksisite oluşturduğu belirlenmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde, Neuro-2A hücrelerine kıyasla genel olarak nanopartikül toksisitesi çok daha az görülmektedir. Sonuçlar, hücre canlılığının her durumda %50’den fazla olması nedeniyle bu konsantrasyonların uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Rekombinant vektörlerle transfekte edilen hücrelerdeki canlılık daha önce belirtilen şekilde MTT testi ile belirlenmiştir. FLhtt ekspresyonunun 24 saat içinde hücre canlılığında %30 azalmaya sebep olduğu, ancak normal ve mutant formlar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 63, Şekil 103).

Transfekte edilen hücrelerde hazırlanan nanopartikül formülasyonun siRNA’nın HTT genini susturma etkisi floresans mikroskopta gözlemlendikten sonra gen ekspresyonu seviyelerinin belirlenmesi için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonlarından elde edilen RNA miktarları karşılaştırıldığında, siRNA yüklü nanopartikül uygulamalarının, sadece HTT25Q ve HTT90Q ile transfekte edilen hücrelere oranla genel olarak hücrelerdeki RNA miktarını azalttığı gözlenmiştir. Bu durum, henüz RNA izolasyonu aşamasında bile HTT gen susturmasının gerçekleştiğine dair ilk kanıt olarak değerlendirilebilir. Ancak, siRNA yüklü K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA nanopartiküllerinin hücrelerdeki total RNA miktarı üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu ve hücrelerdeki genel RNA havuzunu azalttığı görülmüştür. Diğer nanopartiküllere kıyasla, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA uygulamalarının total RNA miktarını yaklaşık olarak 3-4 kat azalttığı tespit edilmiştir.

Total RNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri, örneklerin qRT-PCR'a devam edilebilecek saflık ve miktarda olduğunu göstermiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde siRNA konsantrasyonu arttıkça susturma veriminin de arttığı gözlenmiş ve 40nM siRNA'nın HTT genini yüksek bir etkinlikle (>%50) susturduğu belirlenmiştir ve takip eden nanopartiküllere siRNA yüklenmesi çalışmalarında bu konsantrasyon kullanılmıştır. Ayrıca, HTT genine özgün olmayan, dizisi karıştırılmış bir siRNA (scrambled siRNA) da kontrol olarak kullanılarak, HTT genine özgün olmayan başka herhangi bir siRNA dizisinin htt gen ekspresyonuna etkisi olmayacağı da ispatlanmıştır (Tablo 66).

Nanopartiküllerin hücre içine girişlerinin teyidi yapıldıktan sonra, HTT ekspresyonuna etkisinin araştırılması için HTT25Q/90Q ve siRNA yüklü nanopartiküllerle ko-transfekte edildikten 24 saat sonra total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmış; ardından qRT-PCR ile HTT geni ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilerek ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, siRNA yüklenmiş tüm nanopartiküllerin HTT90Q gen ekspresyonunu çok verimli bir şekilde susturduğu (>%50) bulunmuştur (Tablo 67). Normal sayıda glutamin içeren HTT25Q ekspresyonun seviyelerinde bakıldığında ise F1-NMDA-iyonik ve K2-PEG-NMDA nanopartiküllerinin verimli bir şekilde (>%50) susturma yaptığı, ancak diğer nanopartiküllerin daha az verimli olduğu gözlenmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: HTT25Q ve HTT90Q ile transfekte edilen hücreler RNA izolasyonundan önce floresans mikroskopta incelendiğinde HTT25Q'nun transfeksiyon verimliliğinin %95'in üzerinde olduğu, HTT90Q transfeksiyon ve ekspresyon verimliliğinin buna kıyasla göre daha az olduğu görülmüştür. Bu durum daha önceki çalışmalarımızda da gözlenen ve beklenen bir durumdur. Mutant htt geni tam boy insan htt geni üzerinde (180kb) çok büyük bir glutamin tekrar bölgesi taşımaktadır ve dolayısıyla hücrelerin içine transfekte edilme verimi diğer küçük genlere kıyasla daha zordur. Ayrıca hücre içinde bu genden toksik fonksiyon kazanan 350kDa'luk büyük bir protein sentezlenmektedir, bu anlamda da protein ekspresyonu daha zor ve azdır. Bu bilgiler ışığında, mutant HTT90Q'nun HTT25Q'ya oranla daha büyük olması ve dolayısıyla hücre içine alınıp ifade edilmesinin daha zor ve uzun sürmesi söz konusudur. Diğer bir deyişle HTT25Q transfeksiyon verimi ve ekspresyonu her zaman HTT90Qya göre çok daha yüksek olacaktır.

Kullanılan siRNA'nın insan HTT genine olan özgünlüğü, gen ekspresyonu analizinin N2A hücrelerinde de yapılmasıyla gösterilmiştir. SH-SY5Y insan nöroblastoma, Neuro-2A ise fare neuroblastoma hücreleridir. Kullanılan siRNA, insan HTT dizisine hedefli tasarlandığı için fare homologunu aynı oranda baskılaması teorik olarak beklenmemektedir. N2A hücrelerinin siRNA yüklü NP'lerle transfeksiyonu sonrasında elde edilen qRT-PCR verileri bu beklentiyi karşılamaktadır. Neuro-2A hücrelerinde endojen HTT gen ekspresyonunun azalmadığı ve dolayısıyla kullanılan siRNA'nın insan HTT genine özgünlüğü gösterilmiştir (Tablo 68).

WesternBlot çalışmalarından alınan sonuçlar çerçevesinde beklenen büyüklükte proteinlerin hücrelerde eksprese edildiği ve başarılı bir şekilde blotlandığı gösterildi. Bunu takiben, siRNA içeren nanopartikül uygulamasının protein ekspresyonuna etkisi de western blotlama ile gösterilmiştir.

Jeldeki protein bantlarının boyanma koyulukları karşılaştırıldığında, beklendiği gibi 90Q protein ekspresyonunun kontrole kıyasla artmış olduğu (2 ve 3), ayrıca siRNA yüklü nanopartikül uygulamasının genel olarak htt protein ekspresyonunu azalttığı, özellikle de F1-NMDA ve D-NMDA nanopartiküllerinin (7-10) daha etkili olduğu, bunları sırasıyla K3-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K1-PEG-NMDA (6,5,4) nanopartiküllerinin takip ettiği belirlenmiştir. Bu veriler qRT-PCR verileriyle tam olarak örtüşmektedir.

5.8. Flow Sitometri Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hedef Hücrelerdeki Reseptörlere Bağlanma Çalışmaları

Geliştirilen nanopartiküllerin hedef hücreler olan SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerine bağlanmasını incelemek için Flow sitometri (CytoFlex, Beckman Coulter, Amerika Birleşik Devletleri) yöntemi kullanılmıştır. Floresans madde (FITC-BSA), yüklenmiş yüzeyine hedeflendirme ligandı bağlanmış (N-metil D- aspartik asit) nanopartiküllerin hedef hücrelerde yüzeyinde bulunan N-metil D-aspartik asit reseptörlerine bağlanması, oluşturdukları floresans yoğunluğu ölçülerek incelenmiştir. Şekil 116'da görüldüğü üzere bloklanmış hücrelere uygulanan nanopartikül formülasyonlarının ışımlarında azalma görülmüştür. Grafik üzerinden değerlendirildiğinde F1-NMDA formülasyonu diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında daha fazla ışıma yapmıştır. D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının ışımasında ise belirgin bir azalma olmuştur. Neuro-

2A hücrelerinin uygulama öncesi morfolojik yapılarına bakıldığında farklılaşma olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde bu hücreler flowsitometri analizine tabi tutulduğunda Şekil 117’de görüldüğü gibi iki farklı hücre kümelenmesi gözlemlenmiştir. Şekil 117’de görüldüğü üzere bloklanmış hücrelere uygulanan nanopartikül formülasyonlarının ışımlarında azalma görülmüştür. F1-NMDA formülasyonu diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında daha fazla ışıma yapmıştır. D-NMDA, K1-PEG-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının ışımada ise belirgin bir azalma olmuştur.

Erel-Akbaba ve ark, yaptığı çalışmada siRNA yüklü katı lipid nanopartikül formülasyonunu glioblastoma tedavisi için geliştirmişlerdir. Geliştirilen nanopartiküllerin reseptör aracılığı ile hücre içine alınıp alınmadığını kontrol etmişler ve bu yüzden hedefleme ajanı ile hücrelerin reseptörlerini doyurmuşlardır (block). Daha sonra hedefleme ajanı bağlı nanopartiküllerini block hücrelere uyguladıklarında hücrelerin ışımada belirgin bir azalma görmüşleridir. Böylece geliştirdikleri formülasyonların reseptör aracılığı ile hücre içine alındığını belirtmişlerdir ⁹⁰

5.9. *In Vivo* Çalışmalar

Yapılan çalışmalar neticesinde F1-NMDA, K2-PEG-NMDA ve K3-PEG-NMDA formülasyonlarının gen susturma etkisi %50’nin üzerinde bulunmuştur. Bu sebeple bu üç formülasyon da *in vivo* çalışmalarda değerlendirilmiştir.

Vücut ağırlığı tayini sonuçları Şekil 125’de gösterilmiştir. Hayvanların zamana bağlı vücut ağırlığı grafiği değerlendirildiğinde SF-IN, siRNA-IN, F1-NMDA-İ-siRNA-IN, F1-NMDA-Boş-IN ve F1-NMDA-Boş-IP gruplarında sıfırıncı güne göre belirgin bir ağırlık değişimi meydana gelmemiştir. Bununla birlikte K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN uygulanan grupta 15. ve 18. günlerde, K3-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN uygulanan grupta 18. günde ve F1-NMDA-İ-siRNA-IP uygulanan grupta ise 15., 18. ve 21. Günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Pouladi ve ark. yaptıkları çalışmada huntingtin proteininin insülin benzeri büyüme faktörü-1 ekspresyonunu etkileyerek vücut ağırlığını nasıl değiştirdiğini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda YAC128 türü transgenik farelerde vücut ağırlığının değişmediğini ve azalmadığını huntingtin proteininin uzunluğuna bağlı olarak bazı durumlarda artma eğiliminde olduğunu bulmuşlardır ¹⁴⁰. Yapılan diğer bir çalışmada ise, mutant huntingtin proteininin uzunluğunun vücut ağırlığına nasıl etki ettiği araştırılmıştır. Araştırmacılar sentezlenen mutant huntingtin proteininin dozuna bağlı olarak 2-11 ay

arasında farelerin vücut ağırlığında anlamlı artış bulmuşlardır. Fakat bir aylık bir süre içerisinde artış istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Aynı şekilde azalan mutant huntingtin proteinin miktarının kilo artışında da azalamaya sebebiyet vereceği görülmüştür ¹⁴¹. YAC128 transgenik fareler uzun dönem Huntington Hastalığını modellediği ve araştırmamız da proflaktik bir tedavi öngördüğü için sonuçlar tutarlı bulunmuştur.

Tail suspension testi sonuçları Şekil 126'da gösterilmiştir. Tail suspension testi neticesinde F1-NMDA-İ-siRNA-IN formülasyonu uygulanan farelerde belirgin oranda hareketlilik artmıştır. Bu da uygulanan formülasyonun Huntington Hastalığı'na özel depresyon benzeri etkileri azalttığını göstermiştir. 15. gün ölçümlerinde K3-PEG-NMDA-I-siRNA-IN formülasyonu ve F1-NMDA-siRNA-IP formülasyonlarının da belirgin bir şekilde hareketsizlik süresini azalttığı görülmektedir. 30. gün deneylerinde istatistiksel anlamda belirgin bir şekilde azalma görülmese de anlamlı bir düşüş devam etmektedir. Fakat F1-NMDA-İ-siRNA-IN grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş devam etmektedir.

Nascimento-Castro ve ark. yaptıkları çalışmada probucol etkin maddesini antidepresan etkisinden dolayı erken dönem Huntington Hastalığı'nda kullanımının depresyon benzeri belirtileri nasıl etkilediğine dair araştırmak için YAC128 transgenik fareleri kullanmıştır. Yapılan çalışmada ikinci aydan başlanarak altıncı aya kadar hayvanların sularına ilaç etkin maddesi ilave edilmiştir. Farklı zamanlarda yapılan tail suspension deney sonuçları toplam hareketsiz geçen sürenin zamanla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını göstermiştir ¹⁴². Diğer bir taraftan, Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada motor koordinasyon bozukluklarında Huntington hastalarına reçete edilen tetraabenazin ilaç etkin maddesinin nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Bu araştırma esnasında kullanılan ilaç etkin maddesinin depresyon benzeri etkilerini araştırmak için tail suspension deneyi kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda tetraabenazin ilaç etkin maddesinin YAC128 türü transgenik farelerde hareketsiz kalma süresini uzatarak depresyon benzeri davranışları arttırdığı görülmüştür ¹⁴³. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında geliştirdiğimiz siRNA yüklü ilaç formülasyonları depresyon benzeri davranışları azaltması açısından oldukça etkili bulunmuştur.

Huntington Hastalığı'nın en belirgin belirtisi motor fonksiyon bozukluklarıdır. Rotarod testi sonuçları Şekil 127'de gösterilmiştir. RotaRod testinde denge ve motor koordinasyon değerlendirilmektedir. Grafikler incelendiğinde sıfırıncı uygulamaya

göre K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN ve K3-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN formülasyonu uygulanan gruplarda belirgin oranda düşme zamanının uzadığı görülmektedir. Bu da hazırlanan formülasyonların motor fonksiyon üzerine etkili olduğu şeklinde yorumlanabilmektedir. Harper ve ark. yaptıkları çalışmada Huntington hastalığının fare modelinde RNA uygulamalarının motor ve nöropatolojik anormallikleri nasıl etkilediğini incelemişlerdir. Bu bağlamda Adeno virüslere shRNA yükleyip striatum bölgesine hedefli beyin içi enjeksiyonlar gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucu genetik materyal yüklü viral vektörlerin boş vektörlere oranla Rota Rod'da düşme zamanını istatistiksel olarak belirgin oranda arttırdığı gözlemlenmiştir ¹⁴⁴. Bir başka çalışmada ise ilaç etkin maddesi olarak kullanılan etil-EPA'nın, rota rod davranış deneyi ile beraber striatal hacimde ve nöron sayısında artışa sebebiyet verip vermediği tartışılmıştır. Bir omega 3- yağ asidi türevi olan etil-EPA'nın ise bu sürece nasıl etki ettiği yapılan davranış deneyleri ve moleküler analizlerle araştırılmıştır. Rota rod çalışmasının sonuçlarına göre kullanılan etkin maddenin görece mütevazı de olsa istatistiksel anlamda düşme süresini uzattığı görülmüştür ¹⁴⁵.

Open Field analizleri farelerin spontan motor aktivitelerinin ve alandaki araştırma benzeri davranışların değerlendirildiği bir metottur. Şekil 128'de open field analizleri gösterilmiştir. 15. ve 30. günde yapılan open-field çalışma sonuçlarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Bunun yanında merkezde geçirilen süre ölçüm sonuçlarına göre 15. Günde F1-NMDA-İ-siRNA grubu ($105,5 \pm 11,46$ sn) ile en anlamlı ölçüm yapılmıştır. 30. Gün ölçümlerinde ise K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN grubu ($134,6 \pm 26,01$ sn) ile en anlamlı ölçüm yapılmıştır. Bu gruptan sonra en anlamlı sonucu 30. Gün ölçümlerinde F1-NMDA-İ-siRNA ($112,9 \pm 23,49$ sn) ile elde edilmiştir

Lopes ve ark. insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) intranazal uygulaması ile yedi aylık YAC128 türü transgenik farelerde Huntington hastalığının fenotiplerinin nasıl değiştiğini araştırmışlardır. Yaptıkları araştırmada bir ay boyunca iki gün aralıklarla farelere ilaç uygulaması yapmışlardır. Belirli aralıklarla kan örneği almışlar ve deneyin başlamasından bir hafta önce ve deneyin son haftası davranış deneylerini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmanın neticesinde bir aylık süre içinde hayvanların ağırlıklarının belirgin oranda değişmediğini bulmuşlardır. Open-field analizi sonuçlarında ise farelerin lokomotor aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin meydana gelmediğini belirtmişlerdir ¹⁴⁶.

Çalışmamızda fare beyinlerinden elde edilen dokularda RNA izolasyonu yapılmış ve ne kadar susturulduğunun tespit edilmesi için daha önceden optimize edilmiş qRT-PCR çalışmaları yapılmıştır. *In vitro* testlerle önceden optimizasyonu gerçekleştirilen serbest siRNA ve nanopartikül formunda siRNA uygulanması sonucunda serbest siRNA'nın %60 ve F1-NMDA-İ-siRNA-İN nanopartikülünün %40-60% aralığında HTT gen ifadesini susturma sağladığı belirlenmiştir. Ancak K2-PEG-NMDA-İ-siRNA-IN nanopartikülünün HTT gen ekspresyonunu %10 azaltabildiği belirlenerek verimliliği yeterli bulunmamıştır. K3-siRNA nanopartikülünün ise HTT gen ekspresyonunu azaltmadığı belirlenmiştir. Bu da hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının intranasal uygulama ile beyinde gen susturma işlevine sahip olduğunun ama en etkili gen susturmanın F1-NMDA-siRNA formülasyonu ile gerçekleştiğini göstermektedir.

5.10. Sonuç

Sonuç olarak, siRNA içeren nanopartikül sistemlerinin hazırlandığı ve değerlendirildiği bu çalışmada, modifiye edilmiş kitosan ve polibeta aminoester polimerlerinden hazırlanan nanopartikül formülasyonları başarı ile geliştirilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ideal formülasyonların intranasal yolla ve gen susturucu etkisinden dolayı gen tedavisi olarak HH tedavisinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Elde edilen formülasyonların istenilen partikül boyutu, zeta potansiyel ve partikül boyutu dağılımına sahip olduğu ve stabilitesini uzun süre korudukları tespit edilmiştir. Hazırlanan formülasyonların HEK 293 ve POF, SH-SY5Y ve Neuro-2A hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği ve HTT proteinini inhibe *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmiştir. HTT oluşturulan hayvanlarda yapılan değerlendirmeler sonucunda, intranasal uygulanan F1-NMDA-siRNA ve K2-PEG-NMDA-siRNA formülasyonlarının HH tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur. Geliştirilen formülasyonlar Huntington Hastalığı'nın tedavisinde umut vaad etmektedir. Özellikle F1-NMDA-siRNA formülasyonların HTT tedavisinde, daha az dozlama ile hasta uyuncunu arttıracak ve daha etkin bir şekilde tedavi sağlayacağını düşünmekte ve önermekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 2011;10(1):83-98. doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3
2. Ghosh R, Tabrizi SJ. Huntington disease. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Vol 147. Elsevier; 2018:255-278. doi:10.1016/B978-0-444-63233-3.00017-8
3. Akhtar A, Andleeb A, Waris TS, et al. Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics. *J Control Release.* 2021;330(November 2020):1152-1167. doi:10.1016/j.jconrel.2020.11.021
4. Sharma S, Majsak MJ. Brain Anatomy. In: *Encyclopedia of the Neurological Sciences.* Academic Press; 2014:463-466. doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.01121-0
5. Sokoloff L. Cerebral Metabolism and Visualization of Cerebral Activity. *Compr Hum Physiol.* Published online 1996:579-602. doi:10.1007/978-3-642-60946-6_30
6. Camandola S, Mattson MP. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J.* 2017;36(11):1474-1492. doi:10.15252/embj.201695810
7. Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic B V. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1318-1331. doi:10.1038/s41593-018-0234-x
8. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13-25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
9. Jones AR, Shusta E V. Blood–Brain Barrier Transport of Therapeutics via Receptor-Mediation. *Pharm Res.* 2007;24(9):1759-1771. doi:10.1007/s11095-007-9379-0
10. Pardridge WM. Drug Targeting to the Brain. *Pharm Res.* 2007;24(9):1733-1744. doi:10.1007/s11095-007-9324-2
11. Nag S, David J B. Blood Brain Barrier, Exchange of metabolites and gases. In: Kalimo H, ed. *Pathology and Genetics: Cerebrovascular Diseases.* ISN

- Neuropath Press; 2005:22-29.
12. Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 2004;45(4):545-552. doi:10.1016/J.NEUINT.2003.11.006
 13. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53. doi:10.1038/nrn1824
 14. Kandel ER, Schwartz JH (James H, Jessell TM. *Principles of Neural Science.* McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000. Accessed April 3, 2019. https://books.google.com.tr/books/about/Principles_of_Neural_Science_Fourth_Edit.html?id=yMtpAAAAMAAJ&redir_esc=y
 15. Guo L, Ren J, Jiang X. Perspectives on Brain-Targeting Drug Delivery Systems. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(12):2310-2318. doi:10.2174/138920112803341770
 16. Li H, Qian ZM. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Med Res Rev.* 2002;22(3):225-250. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11933019>
 17. Huang R, Ke W, Liu Y, Jiang C, Pei Y. The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain. *Biomaterials.* 2008;29(2):238-246. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2007.09.024
 18. Sauer I, Dunay IR, Weisgraber K, Bienert M, Dathe M. An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells. *Biochemistry.* 2005;44(6):2021-2029. doi:10.1021/bi048080x
 19. Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2008;1200:159-168. doi:10.1016/J.BRAINRES.2008.01.039
 20. Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, et al. Apolipoprotein-mediated Transport of Nanoparticle-bound Drugs Across the Blood-Brain Barrier. *J Drug Target.* 2002;10(4):317-325. doi:10.1080/10611860290031877
 21. Gaillard PJ, de Boer AG. 2B-TransTM Technology: Targeted Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. In: Humana Press; 2008:161-175. doi:10.1007/978-1-59745-210-6_8

22. Kumar P, Wu H, McBride JL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*. 2007;448(7149):39-43. doi:10.1038/nature05901
23. Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S, Langer K. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J Control Release*. 2007;118(1):54-58. doi:10.1016/J.JCONREL.2006.12.012
24. Gynther M, Ropponen J, Laine K, et al. Glucose Promoiety Enables Glucose Transporter Mediated Brain Uptake of Ketoprofen and Indomethacin Prodrugs in Rats. *J Med Chem*. 2009;52(10):3348-3353. doi:10.1021/jm8015409
25. Smith QR. Carrier-mediated transport to enhance drug delivery to brain. *Int Congr Ser*. 2005;1277:63-74. doi:10.1016/J.ICS.2005.02.012
26. Enerson BE, Drewes LR. Molecular Features, Regulation, and Function of Monocarboxylate Transporters: Implications for Drug Delivery. *J Pharm Sci*. 2003;92(8):1531-1544. doi:10.1002/JPS.10389
27. Battaglia G, La Russa M, Bruno V, et al. Systemically administered D-glucose conjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents. *Brain Res*. 2000;860(1-2):149-156. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727634>
28. Tamai I, Tsuji A. Drug delivery through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 1996;19(3):401-424. doi:10.1016/0169-409X(96)00011-7
29. Sakane T, Yamashita S, Yata N, Sezaki H. Transnasal Delivery of 5-Fluorouracil to the Brain in the Rat. *J Drug Target*. 1999;7(3):233-240. doi:10.3109/10611869909085506
30. Sakane T, Akizuki M, Yoshida M, et al. Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *J Pharm Pharmacol*. 1991;43(6):449-451. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681064>
31. Wang X, He H, Leng W, Tang X. Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of estradiol by the microdialysis method. *Int J Pharm*. 2006;317(1):40-46. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.02.055
32. Wang Y, Aun R, Tse FL. Brain uptake of dihydroergotamine after intravenous and nasal administration in the rat. *Biopharm Drug Dispos*. 1998;19(9):571-575. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872338>

33. Dahlin M, Jansson B, Björk E. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *Eur J Pharm Sci.* 2001;14(1):75-80. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457653>
34. Zhao H, Liu X, Mao X, Chen C. Intranasal delivery of nerve growth factor to protect the central nervous system against acute cerebral infarction. *Chinese Med Sci J = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih.* 2004;19(4):257-261. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15669182>
35. Draghia R, Caillaud C, Manicom R, Pavirani A, Kahn A, Poenaru L. Gene delivery into the central nervous system by nasal instillation in rats. *Gene Ther.* 1995;2(6):418-423. Accessed April 3, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584117>
36. Yadav P, Yadav AB. Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system. *Futur J Pharm Sci.* 2021;7(1). doi:10.1186/s43094-021-00345-w
37. Karlsson J, Rhodes KR, Green JJ, Tzeng SY. Poly(beta-amino ester)s as gene delivery vehicles: challenges and opportunities. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020;0(0). doi:10.1080/17425247.2020.1796628
38. Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. Synthesis of TAT peptide-tagged PEGylated chitosan nanoparticles for siRNA delivery targeting neurodegenerative diseases. *Biomaterials.* 2013;34(4):1270-1280. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.013
39. Sato T, Ishii T, Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials.* 2001;22(15):2075-2080. doi:10.1016/S0142-9612(00)00385-9
40. Fernández Fernández E, Santos-Carballal B, Weber WM, Goycoolea FM. Chitosan as a non-viral co-transfection system in a cystic fibrosis cell line. *Int J Pharm.* 2016;502(1-2):1-9. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.083
41. Pacheco C, Sousa F, Sarmiento B. Chitosan-based nanomedicine for brain delivery: Where are we heading? *React Funct Polym.* 2020;146(October 2019):104430. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104430
42. Abdul M, Raja G, Katas H, Wen TJ. Stability , Intracellular Delivery , and Release of siRNA from Chitosan Nanoparticles Using Different Cross-Linkers. Published online 2015:1-19. doi:10.1371/journal.pone.0128963

43. Iqbal S, Qu Y, Dong Z, et al. Poly (β -amino esters) based potential drug delivery and targeting polymer; an overview and perspectives (review). *Eur Polym J*. 2020;141(August):110097. doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.110097
44. Fields RJ, Cheng CJ, Quijano E, et al. Surface modified poly(β amino ester)-containing nanoparticles for plasmid DNA delivery. *J Control Release*. 2012;164(1):41-48. doi:10.1016/j.jconrel.2012.09.020
45. Tzeng SY, Guerrero-Cázares H, Martinez EE, Sunshine JC, Quiñones-Hinojosa Alfredo A, Green JJ. Non-viral gene delivery nanoparticles based on Poly(β -amino esters) for treatment of glioblastoma. *Biomaterials*. 2011;32(23):5402-5410. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.016
46. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;81(3):463-469. doi:10.1016/J.EJPB.2012.04.007
47. Zhou D, Cutlar L, Gao Y, et al. The transition from linear to highly branched poly(β -amino ester)s: Branching matters for gene delivery. *Sci Adv*. 2016;2(6):e1600102. doi:10.1126/sciadv.1600102
48. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*. 2011;10(1):83-98. doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3
49. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72(6):971-983. doi:10.1016/0092-8674(93)90585-E
50. Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 2004;10(7):S10-S17. doi:10.1038/nm1066
51. Ersoy N, Başak AN. Huntington Hastalığı'nın Moleküler Biyolojisi. *Türk Nöroloji Derg*. 2005;11(1):27-44.
52. Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*. 1995;11(2):115-116. doi:10.1038/ng1095-115
53. Tukamoto T, Nukina N, Ide K, Kanazawa I. Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;51(1-2):8-14. Accessed March 22, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427501>
54. Moulder KL, Onodera O, Burke JR, Strittmatter WJ, Johnson EM. Generation of neuronal intranuclear inclusions by polyglutamine-GFP: analysis of inclusion clearance and toxicity as a function of polyglutamine length. *J*

- Neurosci.* 1999;19(2):705-715. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-02-00705.1999
55. Godinho BMDC, Ogier JR, Darcy R, O'Driscoll CM, Cryan JF. Self-assembling Modified β -Cyclodextrin Nanoparticles as Neuronal siRNA Delivery Vectors: Focus on Huntington's Disease. *Mol Pharm.* 2013;10(2):640-649. doi:10.1021/mp3003946
 56. Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5(1):40. doi:10.1186/1750-1172-5-40
 57. Videnovic A. Treatment of Huntington Disease. *Curr Treat Options Neurol.* 2013;15(4):424-438. doi:10.1007/s11940-013-0219-8
 58. Sah DWY, Aronin N. Oligonucleotide therapeutic approaches for Huntington disease. *J Clin Invest.* 2011;121(2):500-507. doi:10.1172/JCI45130
 59. Scanlon K. Anti-Genes: siRNA, Ribozymes and Antisense. *Curr Pharm Biotechnol.* 2004;5(5):415-420. doi:10.2174/1389201043376689
 60. Chan JH, Lim S, Wong WF. ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(5-6):533-540. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x
 61. Bertrand J-R, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;296(4):1000-1004. doi:10.1016/S0006-291X(02)02013-2
 62. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):219-230. doi:10.1038/nrm2347
 63. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-531. doi:10.1038/nrg1379
 64. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):657-685. Accessed March 22, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665679>
 65. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi. *Cell.* 2000;101(1):25-33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80620-0
 66. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 2002;110(5):563-574. Accessed March 22, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230974>

67. Wang YL, Liu W, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res.* 2005;53(3):241-249. doi:10.1016/j.neures.2005.06.021
68. DiFiglia M, Sena-Esteves M, Chase K, et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(43):17204-17209. doi:10.1073/pnas.0708285104
69. Wong Y, Markham K, Xu ZP, et al. Efficient delivery of siRNA to cortical neurons using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(33):8770-8779. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.077
70. Anguela XM, High KA. Entering the modern era of gene therapy. *Annu Rev Med.* 2019;70:273-288. doi:10.1146/annurev-med-012017-043332
71. Weng Y, Xiao H, Zhang J, Liang XJ, Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol Adv.* 2019;37(5):801-825. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.04.012
72. Anguela XM, High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med.* 2019;70:273-288. doi:10.1146/ANNUREV-MED-012017-043332
73. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1). doi:10.1038/s41392-019-0089-y
74. Setten RL, Rossi JJ, Han S ping. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(6):421-446. doi:10.1038/s41573-019-0017-4
75. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411(6836):494-498. doi:10.1038/35078107
76. Balwani M, Sardh E, Ventura P, et al. Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med.* 2020;382(24):2289-2301. doi:10.1056/NEJMOA1913147/SUPPL_FILE/NEJMOA1913147_DATA-SHARING.PDF
77. Agarwal S, Simon AR, Goel V, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Small Interfering Ribonucleic Acid, Givosiran, in

- Patients With Acute Hepatic Porphyrria. *Clin Pharmacol Ther.* 2020;108(1):63-72. doi:10.1002/CPT.1802
78. Sardh E, Harper P, Balwani M, et al. Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyrria. *N Engl J Med.* 2019;380(6):549-558. doi:10.1056/NEJMOA1807838
 79. Hu B, Zhong L, Weng Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1-25. doi:10.1038/s41392-020-0207-x
 80. Cho WG, Albuquerque RJC, Kleinman ME, et al. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(17):7137-7142. doi:10.1073/pnas.0812317106
 81. Anderson DG, Akinc A, Hossain N, Langer R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(β -amino esters). *Mol Ther.* 2005;11(3):426-434. doi:10.1016/j.ymthe.2004.11.015
 82. Potineni A, Lynn DM, Langer R, Amiji MM. Poly(ethylene oxide)-modified poly(β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery. *J Control Release.* 2003;86(2-3):223-234. doi:10.1016/S0168-3659(02)00374-7
 83. Ahmed T, Aljaeid B. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:483. doi:10.2147/DDDT.S99651
 84. Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(1):67-75. doi:10.1016/j.ejps.2004.09.011
 85. Fields RJ, Quijano E, McNeer NA, et al. Modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for enhanced cellular uptake and gene editing in the lung. *Adv Healthc Mater.* 2015;4(3):361-366. doi:10.1002/adhm.201400355
 86. Üstündağ-Okur N, Gökçe EH, Bozbıyık Dİ, Eğrilmez S, Özer Ö, Ertan G. Preparation and in vitro–in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nano structured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. *Eur J Pharm Sci.* 2014;63:204-215. doi:10.1016/j.ejps.2014.07.013
 87. Ustündağ Okur N, Yavaşoğlu A, Karasulu HY. Preparation and evaluation of microemulsion formulations of naproxen for dermal delivery. *Chem Pharm*

- Bull.* 2014;62(2):135-143. doi:10.1248/cpb.c13-00051
88. Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. 2006;115:216-225. doi:10.1016/j.jconrel.2006.07.021
 89. Ersoy N. Modeling Huntington's Disease: in vivo, in vitro, in silico. In: *Huntington's Disease - Core Concepts and Current Advances*. InTech; 2012. doi:10.5772/30487
 90. Erel-akbaba G, Carvalho LA, Tian T, Zinter M, Akbaba H, Tannous BA. Radiation-Induced Targeted Nanoparticle-Based Gene Delivery for Brain Tumor Therapy. *ACS Nano*. 2019;13:4028-4040. doi:10.1021/acsnano.8b08177
 91. Gil-Mohapel JM. Screening of therapeutic strategies for Huntington's disease in YAC128 transgenic mice. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(1):77-86. doi:10.1111/j.1755-5949.2011.00246.x
 92. Johnson E, Chase K, McGowan S, et al. Safety of Striatal Infusion of siRNA in a Transgenic Huntington's Disease Mouse Model. *J Huntingtons Dis*. 2015;4(3):219-229. doi:10.3233/JHD-150163
 93. Caglayan AB, Beker MC, Caglayan B, et al. Acute and post-acute neuromodulation induces stroke recovery by promoting survival signaling, neurogenesis, and pyramidal tract plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2019;13. doi:10.3389/fncel.2019.00144
 94. Sharma S, Majsak MJ. Brain Anatomy. In: *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. Elsevier Inc.; 2014:463-466. doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.01121-0
 95. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. John Wiley & Sons; 2007. Accessed May 24, 2019. <https://www.wiley.com/en-us/Infrared+and+Raman+Characteristic+Group+Frequencies%3A+Tables+and+Charts%2C+3rd+Edition-p-9780470093078>
 96. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts.*; 2001. doi:10.1002/jrs.1238
 97. Gök MK, Demir K, Cevher E, Özgümüş S, Pabuccuoğlu S. Effect of the linear aliphatic amine functionalization on in vitro transfection efficiency of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym*. 2019;207:580-587.

- doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.013
98. Üstündağ-Okur N, Gökçe EH, Bozbiyik DI, Eğrilmez S, Özer Ö, Ertan G. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of ofloxacin loaded ophthalmic nano structured lipid carriers modified with chitosan oligosaccharide lactate for the treatment of bacterial keratitis. *Eur J Pharm Sci.* 2014;63:204-215. doi:10.1016/j.ejps.2014.07.013
 99. Lynn DM, Langer R. Degradable Poly(β -amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J Am Chem Soc.* 2000;122(44):10761-10768. doi:10.1021/ja0015388
 100. Alihosseini F, Ghaffari S, Dabirsiaghi AR, Haghighat S. Freeze-drying of ampicillin solid lipid nanoparticles using mannitol as cryoprotectant. *Brazilian J Pharm Sci.* 2015;51(4):797-802. doi:10.1590/S1984-82502015000400005
 101. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(15):1688-1713. doi:10.1016/j.addr.2006.09.017
 102. Almalik A, Alradwan I, Kalam MA, Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J.* 2017;25(6):861-867. doi:10.1016/j.jsps.2016.12.008
 103. Gokce Y, Cengiz B, Yildiz N, Calimli A, Aktas Z. Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2014;462:75-81. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.08.028
 104. Fonte P, Soares S, Costa A, et al. Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter.* 2012;2(4):329-339. doi:10.4161/biom.23246
 105. Akbaba H, Demir Dora D, Kantarci AG. *The Effects of Lyophilization and Cryoprotectants on Solid Lipid Nanoparticle-DNA Systems.*; 2017.
 106. Ball R, Bajaj P, Whitehead K. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *Int J Nanomedicine.* 2016;Volume 12:305-315. doi:10.2147/IJN.S123062
 107. Zhang Y, Wang H, Stewart S, et al. Cold-Responsive Nanoparticle Enables Intracellular Delivery and Rapid Release of Trehalose for Organic-Solvent-Free Cryopreservation. *Nano Lett.* 2019;19(12):9051-9061. doi:10.1021/acs.nanolett.9b04109

108. Almalik A, Alradwan I, Kalam MA, Alshamsan A. Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J.* 2017;25(6):861-867. doi:10.1016/j.jsps.2016.12.008
109. Hazzah HA, Farid RM, Nasra MMA, El-Massik MA, Abdallah OY. Lyophilized sponges loaded with curcumin solid lipid nanoparticles for buccal delivery: Development and characterization. *Int J Pharm.* 2015;492(1-2):248-257. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.06.022
110. Anchordoquy TJ, Jinxiang Y. Effects of Moisture Content on the Storage Stability of Dried Lipoplex Formulations. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):3278-3289. doi:10.1002/jps.21846.Effects
111. Üstündağ-okur N, Yurdasiper A, Gündoğdu E, Homan E. Modification of solid lipid nanoparticles loaded with nebivolol hydrochloride for improvement of oral bioavailability in treatment of hypertension : polyethylene glycol versus chitosan oligosaccharide lactate Modification of solid lipid nanoparticles load. 2016;2048. doi:10.3109/02652048.2015.1094532
112. Raval N, Jogi H, Gondaliya P, Kalia K, Tekade RK. Method and its Composition for encapsulation, stabilization, and delivery of siRNA in Anionic polymeric nanoplex: An In vitro- In vivo Assessment. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-18. doi:10.1038/s41598-019-52390-4
113. Malcolm DW, Varghese JJ, Sorrells JE, Ovitt CE, Benoit DSW. The Effects of Biological Fluids on Colloidal Stability and siRNA Delivery of a pH-Responsive Micellar Nanoparticle Delivery System. *ACS Nano.* 2018;12(1):187-197. doi:10.1021/acsnano.7b05528
114. Wang Q, Liang G, Yang H, Wang S, Eckenhoff MF, Wei H. The common inhaled anesthetic isoflurane increases aggregation of huntingtin and alters calcium homeostasis in a cell model of Huntington's disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;250(3):291-298. doi:10.1016/j.taap.2010.10.032
115. Guang Liu W, De Yao K. Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release.* 2002;83(1):1-11. doi:10.1016/S0168-3659(02)00144-X
116. Karlsson J, Rhodes KR, Green JJ, Tzeng SY. Poly(beta-amino ester)s as gene delivery vehicles: challenges and opportunities. <https://doi.org/10.1080/1742524720201796628>. Published online 2020.

- doi:10.1080/17425247.2020.1796628
117. Lamarra J, Rivero S, Pinotti A. Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Mater Sci Eng C*. 2016;67:717-726. doi:10.1016/J.MSEC.2016.05.072
 118. Gök MK. In vitro evaluation of synergistic effect of primary and tertiary amino groups in chitosan used as a non-viral gene carrier system. *Eur Polym J*. 2019;115:375-383. doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.03.048
 119. Segovia N, Dosta P, Cascante A, Ramos V, Borrós S. Oligopeptide-terminated poly(β -amino ester)s for highly efficient gene delivery and intracellular localization. *Acta Biomater*. 2014;10(5):2147-2158. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.054
 120. Dosta P, Segovia N, Cascante A, Ramos V, Borrós S. Surface charge tunability as a powerful strategy to control electrostatic interaction for high efficiency silencing, using tailored oligopeptide-modified poly(beta-amino ester)s (PBAEs). *Acta Biomater*. 2015;20:82-93. doi:10.1016/j.actbio.2015.03.029
 121. Gedde UW. Thermal Analysis of Polymers. In: *Polymer Physics*. Springer Netherlands; 1999:217-237. doi:10.1007/978-94-011-0543-9_10
 122. Menczel., Menczel JD, Prime RB. *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*. Wiley; 2014.
 123. Gao K, Jiang X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J Pharm*. 2006;310(1-2):213-219. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.11.040
 124. Olivier JC. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx*. 2005;2(1):108-119. doi:10.1602/neurorx.2.1.108
 125. Patel S, Chavhan S, Soni H, et al. Brain targeting of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles by intranasal route. *J Drug Target*. 2011;19(6):468-474. doi:10.3109/1061186X.2010.523787
 126. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11613-11618. doi:10.1073/pnas.0801763105
 127. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2873-2896. doi:10.1007/s00018-009-0053-z

128. Muntimadugu E, Dhommami R, Jain A, Challa VGS, Shaheen M, Khan W. Intranasal delivery of nanoparticle encapsulated tarenflurbil: A potential brain targeting strategy for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Sci.* 2016;92:224-234. doi:10.1016/j.ejps.2016.05.012
129. Sava V, Fihurka O, Khvorova A, Sanchez-Ramos J. Enriched chitosan nanoparticles loaded with siRNA are effective in lowering Huntington's disease gene expression following intranasal administration. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2020;24:102119. doi:10.1016/j.nano.2019.102119
130. Etame AB, Smith CA, Chan WCW, Rutka JT. Design and potential application of PEGylated gold nanoparticles with size-dependent permeation through brain microvasculature. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2011;7(6):992-1000. doi:10.1016/j.nano.2011.04.004
131. Hanada S, Fujioka K, Inoue Y, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Cell-based in vitro blood-brain barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):1812-1825. doi:10.3390/ijms15021812
132. Godinho BMDC, Ogier JR, Darcy R, O'Driscoll CM, Cryan JF. Self-assembling modified β -cyclodextrin nanoparticles as neuronal siRNA delivery vectors: Focus on huntington's disease. *Mol Pharm.* 2013;10(2):640-649. doi:10.1021/mp3003946
133. Van Woensel M, Wauthoz N, Rosière R, et al. Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration. *J Control Release.* 2016;227:71-81. doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.032
134. Jallouli Y, Paillard A, Chang J, Sevin E, Betbeder D. Influence of surface charge and inner composition of porous nanoparticles to cross blood-brain barrier in vitro. *Int J Pharm.* 2007;344(1-2):103-109. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.06.023
135. Tzeng SY, Hung BP, Grayson WL, Green JJ. Cystamine-terminated poly(beta-amino ester)s for siRNA delivery to human mesenchymal stem cells and enhancement of osteogenic differentiation. *Biomaterials.* 2012;33(32):8142-8151. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.036
136. Dowaidar M, Nasser Abdelhamid H, Hällbrink M, Langel Ü, Zou X. Chitosan enhances gene delivery of oligonucleotide complexes with magnetic

- nanoparticles–cell-penetrating peptide. *J Biomater Appl.* 2018;33(3):392-401. doi:10.1177/0885328218796623
137. Rui Y, Varanasi M, Mendes S, Yamagata HM, Wilson DR, Green JJ. Poly(Beta-Amino Ester) Nanoparticles Enable Nonviral Delivery of CRISPR-Cas9 Plasmids for Gene Knockout and Gene Deletion. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2020;20:661-672. doi:10.1016/J.OMTN.2020.04.005
 138. Carrillo C, Suñé JM, Pérez-Lozano P, et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomed Pharmacother.* 2014;68(6):775-783. doi:10.1016/J.BIOPHA.2014.07.009
 139. Dosta P, Ramos V, Borros S. Stable and efficient generation of poly(b-aminoester)s for RNAi delivery. *Mol Syst Des Eng.* 2018;3:667-689.
 140. Pouladi MA, Xie Y, Skotte NH, et al. Full-length huntingtin levels modulate body weight by influencing insulin-like growth factor 1 expression. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1528-1538. doi:10.1093/hmg/ddq026
 141. Van Raamsdonk JM, Gibson WT, Pearson J, et al. Body weight is modulated by levels of full-length Huntingtin. *Hum Mol Genet.* 2006;15(9):1513-1523. doi:10.1093/hmg/ddl072
 142. De Paula Nascimento-Castro C, Wink AC, Da Fônsaca VS, et al. Antidepressant Effects of Probucol on Early-Symptomatic YAC128 Transgenic Mice for Huntington's Disease. *Neural Plast.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/4056383
 143. Wang H, Chen X, Li Y, Tang T-S, Bezprozvanny I. Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice. *Mol Neurodegener* 2010 51. 2010;5(1):1-12. doi:10.1186/1750-1326-5-18
 144. Harper SQ, Staber PD, He X, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(16):5820-5825. doi:10.1073/PNAS.0501507102
 145. Van Raamsdonk JM, Pearson J, Rogers DA, et al. Ethyl-EPA treatment improves motor dysfunction, but not neurodegeneration in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Exp Neurol.* 2005;196(2):266-272. doi:10.1016/J.EXPNEUROL.2005.07.021
 146. Lopes C, Ribeiro M, Duarte AI, et al. IGF-1 intranasal administration rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *Mol Neurobiol.* 2014;49(3):1126-1142. doi:10.1007/s12035-013-8585-5



ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HUNTINGTON HASTALIĞI'NIN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE BİYOTEKNOLOJİK İLAÇ İÇEREN FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI, İN VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Yazar Emre Şefiğk Çağlar

Gönderim Tarihi: 12-Kas-2021 06:41AM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 1700392212

Dosya adı: OTEKNOLOJI_K_I_LAC_I_C_EREN_FORMU_LASYONLARIN_HAZIRLANMASI,.pdf (9.77M)

Kelime sayısı: 76569

Karakter sayısı: 438220

HUNTINGTON HASTALIĞI'NIN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE BİYOTEKNOLOJİK İLAÇ İÇEREN FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI, İN VİTRO - İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

2

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

3

polen.itu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

link.springer.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.gov.pl

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

aclanthology.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.docstoc.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

9	İnternet Kaynağı	<%1
10	He, Y.. "Solubilization of Fluasterone in cosolvent/cyclodextrin combinations", International Journal of Pharmaceutics, 20031002 Yayın	<%1
11	mcc.lip6.fr İnternet Kaynağı	<%1
12	www.doczz.it İnternet Kaynağı	<%1
13	denemepuani.com İnternet Kaynağı	<%1
14	www.fedoa.unina.it İnternet Kaynağı	<%1
15	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
16	intiharegilimleri.aydin.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
17	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
18	www.thermoscientific.com İnternet Kaynağı	<%1
19	Mehmet Koray Gök, Kamber Demir, Erdal Cevher, Saadet Özgümüş, Serhat	<%1

Pabuccuoğlu. "Effect of the linear aliphatic amine functionalization on in vitro transfection efficiency of chitosan nanoparticles", Carbohydrate Polymers, 2019
Yayın

20	acikerisim.mu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
21	TİĞLİ, Seda, KÜÇÜKİSLAMOĞLU, Mustafa, SALTEK, Necdet and YILDIZ, S. Zeki. "Schiff bazı ve makrosiklik halka içeren, polimer-metal komplekslerinin hazırlanması ve yapılarının aydınlatılması", TUBITAK, 2004. Yayın	<%1
22	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
23	nte.etnolog.org.ua İnternet Kaynağı	<%1
24	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
25	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
26	marmarapharmaceuticaljournal.com İnternet Kaynağı	<%1
27	www.selcukmedj.org İnternet Kaynağı	<%1

parkinsonderneği.com

28	İnternet Kaynağı	<% 1
29	jeccr.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<% 1
30	www.yunzhan365.com İnternet Kaynağı	<% 1
31	acikerisim.erdogan.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
32	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
33	www.yumpu.com İnternet Kaynağı	<% 1
34	Mehmet Koray Gök. "In vitro evaluation of synergistic effect of primary and tertiary amino groups in chitosan used as a non-viral gene carrier system", European Polymer Journal, 2019 Yayın	<% 1
35	www.michigan.gov İnternet Kaynağı	<% 1
36	Jessica Marotta, Carla Piano, VALERIO BRUNETTI, Danilo Genovese et al. "Heart Rate Variability during wake and sleep in Huntington's Disease patients. An observational, cross-sectional, cohort study.", Neurodegenerative Diseases, 2021	<% 1

Yayın

37	docs.google.com İnternet Kaynağı	<%1
38	valoracion.ibv.org İnternet Kaynağı	<%1
39	www.freepatentsonline.com İnternet Kaynağı	<%1
40	ÖZDEMİR, İbrahim, MERT, Ahmet, ÖZKAN, Ulaş Yunus, AKSAN, Şengül and ÜNAL, Yasin. "Bir kızılçam orman ekosisteminde spektral ve kuş türü rarefaksiyon eğrileri ", Süleyman Demirel Üniversitesi orman Fakültesi, 2017. Yayın	<%1
41	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
42	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
43	eurekamag.com İnternet Kaynağı	<%1
44	tr.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
45	www.handikappidrott.se İnternet Kaynağı	<%1
46	www.jove.com İnternet Kaynağı	<%1

47	www.mebelihyetsinavsorulari.com İnternet Kaynağı	<% 1
48	Lasse Kanerva. "Occupational epoxy dermatitis with patch test reactions to multiple hardeners including tetraethylenepentamine", Contact Dermatitis, 5/1998 Yayın	<% 1
49	doczz.fr İnternet Kaynağı	<% 1
50	www.ubaksymposium.org İnternet Kaynağı	<% 1
51	DEMİRCAN, Turan, AVŞAROĞLU, Mahmut Erhan, ÖZTÜRK, Gürkan and KESKİN, İlknur. "Aksolel Rejenerasyonunun Farklı Evrelerinde miRNA Profilinin Bulunması ve Bulunan miRNA'ların Görevlerinin İn-siliko Analizi", Haydarpaşa Numune Hastanesi, 2017. Yayın	<% 1
52	R. Varón, M.M. Ruiz-Galea, C. Garrido-del Solo, F. García-Sevilla et al. "Transient phase of enzyme reactions.", Biosystems, 1999 Yayın	<% 1
53	Shiraishi, Maresuke, Shohei Saga, and Shuichiro Yokoyama. "CMB power spectra induced by primordial cross-bispectra between metric perturbations and vector	<% 1

fields", Journal of Cosmology and
Astroparticle Physics, 2012.

Yayın

54	UNAL2, Reyhan Nergiz-* and EKİCİ, Merve. "İnsülin Direnci, Beslenme ve Yağlı Yeme İsteği ile CD36 Reseptörü İlişkisi", TST, 2017. Yayın	<%1
55	abakus.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
56	app.trdizin.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
57	irep.iium.edu.my İnternet Kaynağı	<%1
58	medipol.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
59	pubs.acs.org İnternet Kaynağı	<%1
60	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<%1
61	www.marmaragazetesi.com İnternet Kaynağı	<%1
62	www.semanticscholar.org İnternet Kaynağı	<%1
63	A.F. Rodrigues, A.I. Amaral, M. Carmo, Paula M. Alves, Ana S. Coroadinha. "Chapter 112	<%1

The Role of Culture Medium Lipids and Lipid Metabolism in Retroviral Vector Production Under Serum Deprivation", Springer Science and Business Media LLC, 2012

Yayın

64

Rahayu Kariadinata. "STUDENTS' REFLECTIVE ABSTRACTION ABILITY ON LINEAR ALGEBRA PROBLEM SOLVING AND RELATIONSHIP WITH PREREQUISITE KNOWLEDGE", Infinity Journal, 2020

Yayın

<%1

65

"Neuroimmune Pharmacology", Springer Science and Business Media LLC, 2017

Yayın

<%1

66

Current Topics in Behavioral Neurosciences, 2015.

Yayın

<%1

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

