

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YONCA -*Medicago sativa* SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE FLORESANS
İŞARETLİ POLİ laktik ko-glikolik ASİT NANOPARTİKÜLLERİNİN HÜCREYE
ALIMI VE DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI**

ESMA ULUSOY

**DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMİHA ERİŞEN**

İSTANBUL, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YONCA -*Medicago sativa* SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE FLORESANS
İŞARETLİ POLİ laktik ko-glikolik ASİT NANOPARTİKÜLLERİNİN HÜCREYE
ALIMI VE DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI

Esma ULUSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 10.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Filiz VARDAR

Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nn FDK-2018-3237 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

“Yonca -*Medicago Sativa* Süspansiyon Kültürlerinde Floresans İşaretli Poli laktik-ko-glikolik Asit Nanopartiküllerinin Hücreye Alımı ve Dağılımının Araştırılması” konulu tezimi yazmamla sonuçlanan 4 yıllık yoğun, verimli ve yorucu geçen bu Doktora eğitimimin arkasında bana destek olan pek çok kişi bulunmaktadır. Bu nedenle üzerimde emekleri olan ve yardımcı olan kişilere şükranlarımı sunmak istiyorum.

Doktora eğitimine başlamamın en önemli sebebi, her zaman ilham kaynağım olan, doktora süresince beni hiç yalnız bırakmayan aynı zamanda TİK komitemde bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Nagihan GÜLSOY hocama,

Tez çalışmalarımda konuyu belirlememden, laboratuvar çalışmalarım her zaman yanımda olan ve tezi daima daha fazla geliştirmeye, daha fazla araştırmaya teşvik eden, bunların yanında tez çalışmaları dışında bana her türlü konuda katkı sağlayan, ilgisini, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilim insanı olmam konusunda yolumu aydınlatan saygıdeğer danışmanım sayın Prof. Dr. Semiha ERİŞEN hocama,

Deneysel çalışmalarda her zaman yanımda olan, farklı bakış açısı, enerjisi ve dinamik düşünceleri ile hep desteğini hissettiğim değerli eş danışmanım sayın Doç. Dr. Serap DERMAN hocama,

Yapılan toplantılarda çok değerli katkıları ve yönlendirmeleri ile laboratuvar çalışmalarımdeki desteklerinden dolayı değerli hocam sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca TEM analizi deneyi süresi çok sancılı ve meşakkatli olmuştur. Bu çalışmam sırasında sayın hocam Doç. Dr. Filiz VARDAR’ın yardımı ve katkıları olmasa idi bunu başaramazdım. Kendisine en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana her zaman yardımcı olan Arş. Görevlileri F. Şayan POYRAZ, Tayfun ACAR, Nur KALUÇ arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler ediyorum.

Son olarak, 23 yıldır hep yanımda olan verdiği moral ve desteğin yanı sıra sayısız güzellikleriyle hayatıma anlam katan değerli eşim O. Erhan ULUSOY’a, varlıklarına her zaman minnet duyduğum sevgilerini benden esirgemeyen canım oğlum ve canım kızım, benimle daima gurur duyan ve beni her durumda destekleyen sevgili annem Zeliha EFE ve sevgili ağabeyim Korkut EFE’ye sonsuz şükranlarımı sunarım.

Temmuz, 2019

Esmâ ULUSOY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ixi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
TEORİK BİLGİLER.....	5
2.1 Nanoteknoloji	5
2.1.1 Nanoteknoloji Uygulama Alanları	6
2.1.1.1 Tarımsal Uygulamalar	6
2.2 Nanopartiküller	8
2.2.1 Nanopartiküllerin Üretiminde Kullanılan Yöntemler	9
2.2.1.1 Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi.....	10
2.2.2 Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	12
2.2.3 Polimerik Nanopartiküller	13
2.2.3.1 Poli (laktik ko-glikolik) asit (PLGA) Polimeri ve Özellikleri.....	14
2.2.4 Nanopartikül Uygulamaların Hücreye Etkileri	16
2.2.4.1 Sitotoksik Etkileri	17
2.2.4.2 Genotoksik Etkileri	18
2.3 Bitkilerde Yaygın Kullanılan Gen Aktarım Yöntemleri.....	18
2.3.1 Biyolojik Yöntem	20
2.3.1.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Gen Aktarımı	20
2.3.2 Kimyasal Yöntemler	22
2.3.2.1 PEG Aracılığıyla Gen Transformasyonu	22
2.3.3 Fiziksel Yöntemler	23

2.3.3.1	Mikroenjeksiyon	23
2.3.3.2	Partikül Bombardmanı (Gen Tabancası)	24
2.3.3.3	Elektroporasyon.....	25
2.3.3.4	Slikon Karpid Aracılığıyla Gen Transformasyonu	27
2.3.3.5	Ultrasonikasyon Uygulaması	28
2.3.3.6	Nanopartiküller ile Yapılan Gen Aktarım Çalışmaları.....	31
BÖLÜM 3		
MATERYAL VE METOD		34
3.1	Materyal	34
3.1.1	Kullanılan Materyaller	34
3.1.2	Kullanılan Alet ve Malzemeler	36
3.2	Metod	37
3.2.1	<i>Medicago sativa</i> 'nın Süspansiyon Kültürünün Oluşturulması ..	37
3.2.1.1	Tohumların Sterilizasyonu ve Çimlendirme:	37
3.2.1.2	Kallus Kültürlerinin Oluşturulması:	37
3.2.1.3	Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması	38
3.2.2	FITC Yüklü PLGA NP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu	40
3.2.2.1	Nanopartiküllerin hazırlanması	40
3.2.3	SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) ile PLGA NP'lerin Morfolojik İncelemesi.....	43
3.2.4	Hücre Canlılığı (MTT Protokolü).....	43
3.2.5	<i>M. sativa</i> Hücrelerinde PLGA NP'lerin Alımı ve Dağılımı	44
3.2.6	PLGA'nın <i>M. sativa</i> Hücrelerindeki Genotoksik Etkisinin Comet Protokolü ile Araştırılması	45
3.2.7	PLGA'nın Bitki Hücresine Girişi ve Lokalizasyonunun TEM (Geçirimli Elektron Mikroskop) Kullanılarak İncelenmesi	49
3.2.8	Data Analizi	54
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER		55
4.	Sonuçlar	55
4.1	FITC Yüklü PLGA NP'lerinin Karakterizasyonu	55
4.2	Hücre Canlılığı	577
4.3	Yonca Hücre Kültüründe PLGA NP'lerin Hücreyel Alımı ve Dağılımı	611
4.4	PLGA NP'lerin Yonca Hücrelerinde Genotoksik Potansiyeli	69
4.5	Tartışma ve Öneriler	71
KAYNAKLAR		76
ÖZGEÇMİŞ		99

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat Derece
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
sn	Saniye
dk	Dakika
mg	Miligram
g	Gram
ml	Mililitre
mV	Milivolt
kV	Kilovolt
V	Volt
kHz	Kilohertz
W	Watt
M	Molar

KISALTMA LİSTESİ

DCM	Diklorometan
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FITC	Floresans izotiyosiyanat izomer I
GFP	Green Floresans Protein
HMA	Yüksek erime noktalı agaroz
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MGE	Mikrojel elektroforezi
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MS	Murashige ve Skoog besiyeri
MSN	Mezoporus Silika Nanopartikülleri
NP	Nanopartikül
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik) asit
PLA	Poli laktik asit
PGA	Poli glikolitler
PVA	Poli (vinil alkol)
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Çeşitli biyolojik ve fiziksel nesnelerin boyut ölçeği5
Şekil 2. 2	Tekli emülsiyon o/w çözücü evaporasyon yöntemi ile nanopartiküllerin üretimi.....11
Şekil 2. 3	Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi12
Şekil 2. 4	Nanoküre (matris sistemi) ve nanokapsül sistemlerinin şematik gösterimi ve bunları üretmek için kullanılan bazı önemli polimerlerin kimyasal yapıları.14
Şekil 2. 5	PLGA'nın formülü16
Şekil 2. 6	Agrobacterium Ti-plazmidinin yapısı ve T-DNA'nın konağa entegrasyonu..22
Şekil 2. 7	Partikül Bombardımanı (Gen Tabancası).....25
Şekil 2. 8	Elektroporatör.....26
Şekil 2. 9	Bitkilerin nano-taşıyıcılar içine alınmış transgenlerle transforme edilmesi..31
Şekil 2. 10	Hem hayvan hem de bitki sistemlerinde biyomolekül aktarımı için yaygın olarak kullanılan NP'ler.....33
Şekil 3. 1	Yonca hipokotil eksplantından gelişen kalluslar.....38
Şekil 3. 2	Yonca kalluslarından oluşturulan hücre süspansiyon kültürleri.....39
Şekil 3. 3	Prob sonikatör kullanılarak PLGA NP sentezlenmesi.....41
Şekil 3. 4	Nanopartikül çözeltisinin PVA çözeltisine damla damla eklenmesi.....42
Şekil 3. 5	NP'lerin 500 rpm' de manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılması.....42
Şekil 3. 6	Comet deneyi için agarozlu lamaların hazırlanışı ve hücrelerin gömülmesi ..46
Şekil 3. 7	Epoksi Resin (EPON) hazırlama işlemi.....51
Şekil 3. 8	EPON'a gömülü örneklerden ince kesitlerin alınması.....53
Şekil 3. 9	Kesitlerin uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanması.....53
Şekil 4. 1	Sentezlenen NP'lere ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği.....56
Şekil 4. 2	Üretilen nanopartiküllere ait 100.000x SEM görüntüsü.....56
Şekil 4. 3	Ultrasonikasyona maruz bırakılan süspansiyon hücrelerine ait MTT sonuçları...58
Şekil 4. 4	Farklı sürelerde ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi....59
Şekil 4. 5	PLGA NP ilavesi ve 1 ile 3 dk ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi.....60
Şekil 4. 6	1 dk ultrasonikasyon uygulamasında FITC-yüklü PLGA NP'lerin zamana bağlı hücreye girişine ait floresans mikroskop görüntüleri (a-c).....62
Şekil 4. 7	3 dk ultrasonikasyon uygulamasında FITC-yüklü PLGA NP'lerin zamana bağlı hücreye girişine ait floresans mikroskop görüntüleri (a-c).....63

Şekil 4. 8 Farklı ultrasonikasyon uygulama ve inkübasyon sürelerinin FITC yüklü PLGA NP'lerin hücresel alımına etkisi.....	65
Şekil 4. 9 PLGA NP'lerin hücreye girişi ve dağılımına ait TEM görüntüleri (a-f).....	66
Şekil 4. 10 Comet uygulamasına ait floresans mikroskobu görüntüleri (a-d).....	69

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Bitkilerde en çok kullanılan transformasyon yöntemleri.....21
Çizelge 3. 1	Çalışmalarda kullanılan materyaller.34
Çizelge 3. 2	Çalışmalarda kullanılan cihaz ve malzemeler.....36
Çizelge 3. 3	Yüksek ve düşük erime dereceli agarozların içerik ve hazırlanışları.....46
Çizelge 3. 4	Lizis çözelti içeriği.....47
Çizelge 3. 5	Elektroforez tampon içeriği.....48
Çizelge 3. 6	Nötralizasyon sıvısı.....48
Çizelge 3. 7	Lamları boyama çözeltisi.....49
Çizelge 3. 8	EPON hazırlama içeriği.....52
Çizelge 4. 1	Farklı sürelerde ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi.....58
Çizelge 4. 2	PLGA NP ilavesi ve 1 ile 3 dk ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi.....60
Çizelge 4. 3	Farklı ultrasonikasyon ve inkübasyon sürelerinin FITC yüklü PLGA NP'lerin hücresel alımına etkisi.....65

YONCA -*Medicago sativa* SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE FLORESANS İŞARETLİ POLİ laktik ko-glikolik ASİT NANOPARTİKÜLLERİNİN HÜCREYE ALIMI VE DAĞILIMININ ARAŞTIRILMASI

Esmâ ULUSOY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Eş Danışman: Doç. Dr. Serap DERMAN

Nanopartikül sistemler, gen transfer teknolojisinin geliştirilmesi, ilaç ve gübre uygulaması gibi tarımsal amaçlar için kullanılma potansiyeline sahiptir. Son yıllarda bu sistemlerin bitkilerde alımı, taşınması ve birikimi konularındaki araştırmalarda artış yaşanmaktadır. Bu çalışmada da *Medicago sativa* (yonca) süspansiyon kültüründe Floresans izotiyosiyanat izomer I (FITC) yüklü Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) nanopartiküllerin (NP) ultrasonikasyonla hücreye girişi ve dağılımının incelenmesi amaçlandı.

PLGA NP'ler sentezlenerek karakterizasyonu yapıldı, daha sonra farklı ultrasonikasyon ve inokülasyon sürelerinin PLGA NP'lerin hücreye girişi üzerine etkileri ile PLGA NP'lerin yonca hücre hatlarında sitotoksik ve genotoksik etkileri belirlendi. Ultrasonikasyon uygulamasının, PLGA NP'lerin hücresel alımını arttırdığı tespit edildi. En iyi sonuç ise (% 82.66) 3 dk'lık ultrasonikasyonda elde edildi. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analizlerinde, 100 nm'ye kadar PLGA NP'lerin hücre duvarından geçtiği, sitoplazma ve

ekirdeęe dağıldığı tespit edildi. Ultrasonikasyon ile PLGA NP'lere maruz bırakılmış yonca süspansiyon hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik bir etki gözlenmedi.

Sonuç olarak, PLGA NP sistemi bitkilerde toksik etki göstermediğinden çeşitli tarımsal uygulamalarda kullanılabilir. Ayrıca bu protokol, bitkilere gen aktarımı için alternatif ve güvenli bir yöntem olarak uygulanabilir.

Anahtar kelimeler: PLGA, nanopartikül, *Medicago sativa*, süspansiyon hücre kültürü, ultrasonikasyon

**UPTAKE AND CELLULAR DISPERSION OF FLUORESCENTLY LABELED
POLY lactic-*co*-glycolic ACID NANOPARTICLES IN *Medicago sativa*
SUSPENSION CULTURE**

Esmay ULUSOY

Department of Molecular Biology and Genetics

PhD Thesis

Adviser: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Co- Adviser: Assoc. Prof. Dr. Serap DERMAN

Nanoparticle systems have the potential to be used for agricultural purposes such as the development of gene transfer technology, pesticide or fertilizer application. In recent years, the studies related with intake, transport and accumulation of these systems in plants have been increasing. The aim of this study was to investigate the penetration and distribution of poly (lactic-*co*-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles (NPs) loaded with fluorescence isothiocyanate isomer I (FITC) into the cell by ultrasonication in *Medicago sativa* (alfalfa) suspension culture.

PLGA NPs were synthesized and characterized, then the effects of different ultrasound and inoculation times on entry of PLGA NPs into the cell were determined. It is also toxic effects of ultrasonication and PLGA NPs on alfalfa cell lines were detected. It was found that ultrasound application increased the cellular uptake of PLGA NPs. The best

result (82.66%) was obtained in 3 min ultrasound treatment. In Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis showed that PLGA NPs up to 100 nm passed through the cell wall and dispersed to the cytoplasm and nucleus. No cytotoxic and genotoxic effect was observed in cultured alfalfa cells exposed to PLGA NPs by ultrasonication.

As a result, PLGA NP system can be used in various agricultural applications because it does not show toxic effects on plants. In addition, this protocol can be used as an alternative and safe method for gene transfer to plants.

Keywords: PLGA, nanoparticles, *Medicago sativa*, suspension cell culture, ultrasonication

1.1 Literatür Özeti

1959 yılında, Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman'ın, Amerikan Fizik Kurumu yıllık toplantısında "Aşağıda daha çok yer var" adlı konuşması Nanobilim'in başlangıcı sayılmaktadır [1]. Karmaşık sistemlerin kimyasını atom fiziği ile birleştiren Nanobilim'in kullanımıyla yeni bir çalışma alanı olan "**Nanoteknoloji**" ortaya çıkmıştır [2]. Nanoteknoloji kavramı ise ilk olarak, Norio Taniguchi tarafından (Tokyo Science Üniversitesi) 1974 yılında dile getirilmiştir. Taniguchi'nin hala geçerliliğini koruyan nanoteknoloji tanımı; "maddeleri atom veya molekül seviyesinde bozma, ayırma ve birleştirme süreçleridir" şeklindedir [3].

Günümüzde nanoteknoloji, çevre-enerji, tekstil, elektronik, haberleşme, gıda endüstrisi, tıp ve tarım gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin, biyolojik alanlardaki (tıp, tarım vb.) uygulamalarına ise "Nanobiyoteknoloji" adı verilmektedir [2]. Nanobiyoteknoloji, nanoölçekli yapıların biyoloji ve biyokimya esaslı yöntemler ile uygulamalarını araştırıp, onları ürüne dönüştüren, ortaya çıkaran, nanoteknoloji temelli bir çalışma alanıdır. Nanobiyoteknolojinin hastalık teşhisinden, hücre içine giren nanoyapılara, ilaç taşıyıcı sistemlerden, biyosensörlere, tarımsal uygulamadan, çevresel iyileştirmeye kadar farklı uygulamaları vardır [4]. Nanoteknoloji, her bir hücrenin yapı ve fonksiyonunu değiştirme potansiyeli taşımaktadır [3]. Nanosistemler yoluyla DNA'da istenilen modifikasyonların mümkün olduğunun görülmesi biyoteknolojiye yeni bir boyut katmaktadır [2].

Biyoteknolojik çalışmalarda, tarımsal alanda sıklıkla 2 gen aktarım yöntemi; yüksek maliyetli ve DNA hasarına yol açan partikül bombardıman yöntemi ile [5] düşük maliyetli *Agrobacterium tumefaciens* kullanılmaktadır. Ancak Agro-hatlarının çalışılması özellikle dikotlarda etkili, monokotlarda dezavantajlıdır [6], [7]. Ayrıca Agro-hatların bitki güvenliği açısından tercihi sorun yaratmaktadır. Özellikle düşük kopya sorunu, Ti-plazmitin büyüklüğü DNA manipülasyonunu ve izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Bununla beraber bitki DNA'sında delesyonlara veya dublikasyonlara yol açabilmektedir [8], [9], [10]. Nanopartiküller (NP'ler) sistemler ise bu sorunların çözümüne alternatif bir yol olarak görülmektedir [11].

Bitkilerde nanopartikül sistemlerin hücreye alımı ile ilgili en büyük zorluk bitki hücre duvarının varlığıdır. Pektin ve selüloz kökenli olan hücre duvarı nanopartikül geçişlerine ekstra bariyer olmaktadır. Bu zorluğun giderilmesi için çeşitli kimyasal yöntemler kullanılarak hücre duvarı uzaklaştırılmakta ve bitki protoplast kültürleri çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu yöntemle bugüne kadar CdSe/ZnS kuantum dotlar, polistren nanoküreler, poli (fenil etilen) NP'ler, karbon nanomateryallerle çalışmalar gerçekleştirilmiştir [12], [13]. Ancak protoplast hücrelerinin çok hassas ve dayanıksız olması nedeniyle [14] hücre duvarı bozulmadan yapılan çalışmalar daha fazla önem kazanmıştır. Hücre duvarına sahip hücreler ile yapılan çalışmalarda; karbon nanotüpler, CdSe/ZnS kuantum dotlar, poli (amidoamin) dendrimerleri, mezoporöz silika ve PEI (Poli etilemin) gibi NP'ler kullanılmıştır [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21]. Fakat özellikle karbon nanotüplerin ve CdSe/ZnS kuantum dotların bitkilerde hayli yüksek toksisite gösterdiği bildirilmiştir [16], [22], [23].

Biyoparçalanabilir bir polimer olan PLGA, vücutta şeker metabolizması sırasında bir ara ürün olarak bulunan laktik aside dönüştüğü için toksik etkisi olmayan ve ilaç salım sistemlerinde sıkça kullanılan ticari bir üründür [24]. Avrupa İlaç Ajansı [European Medicine Agency (EMA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration; FDA)] tarafından onaylı olması, DNA, RNA, peptit ve proteinler dâhil çok farklı yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılması, uzun süreli klinik deneyimin kazanılmış olması, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması PLGA'nın nanotaşıyıcı sistemlerde kullanımında avantaj sağlamaktadır [25], [26]. Günümüzde, PLGA NP'lerin hayvan hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığı

gösterilmesine rağmen, bitki hücrelerinde sitotoksitesi ve genotoksitesi hakkında yeterli rapor bulunmamaktadır.

NP'lerin bitkilerde kullanılması için gerekli önkoşul, organ, doku ve hücresele seviyelerde alım, taşıma ve birikiminin incelenmesidir. Bu tür araştırmalar nanobiyoteknolojinin tarımdaki uygulanmaları yanında nanomalzemelerin bitkiler üzerindeki tahmini toksik etkilerini ve bitkilerin yenilebilir kısımlarındaki muhtemel birikimlerini anlamak için de gereklidir [24].

Literatürde oldukça az rastlanan çalışmalarda, NP'lerin alımının, taşınmasının ve birikiminin, bitki türlerine ve NP'lerin şekil, boyut, konsantrasyon ve uygulama şekli gibi özelliklere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir [14], [27], [28], [29], [30], [31].

1.2 Tezin Amacı

Tarımsal amaçlı kullanım potansiyeline sahip nanopartikül sistemlerinin bitkilerde alımı, taşınması ve biriktirilmesi çalışmaları son yıllarda sürekli olarak ilgi çekmektedir. Ancak literatürde farklı nanoyapıların bitki hücrelerine girişi ve dağılımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu tez çalışmasında, farklı sürelerde ultrasound ve inokülasyon uygulamalarının Floresan İzotiyosiyanat İzomer I (FITC) yüklü, poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) NP'lerinin *Medicago sativa* (yonca) süspansiyon hücrelerine girişi ve dağılımına etkilerinin belirlenmesi, bununla beraber, PLGA NP'lerin bitki hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

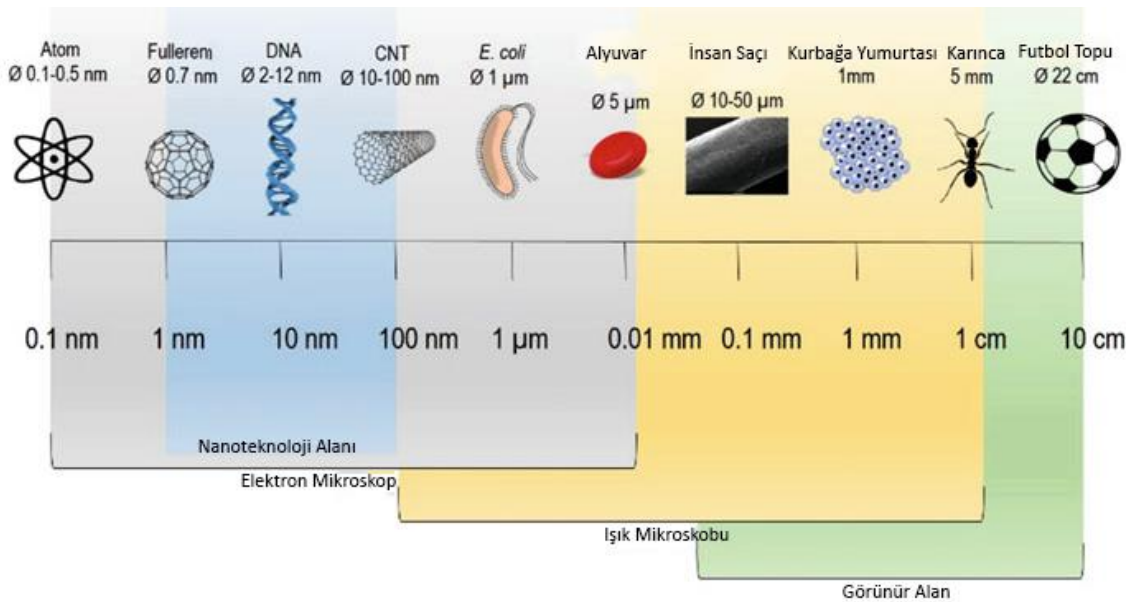
Bitkilere gen aktarımda alternatif yöntemlerin geliştirilmesi hala devam eden çabalardan biridir. Nanosistemlerin bu amaçla kullanımı yönündeki çalışmalar olumlu sonuçlar vermekle birlikte etkinliğinin artırılması gerekmektedir. Ultrasonikasyon uygulamalarının bitkilere gen aktarım frekansını arttırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada ultrasonikasyon uygulamalarının PLGA NP'lerin bitki hücrelerine girişini artırması beklenmektedir. Bu PLGA NP sistemlerin bitkilere gen aktarımında kullanımı için alternatif bir protokol geliştirilmesini sağlayacaktır. Ayrıca, PLGA NP'lerin bitki hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri belirlenerek, PLGA'nın bitkilerde çeşitli

tarımsal sistemlerde (ilaç salımı ve madde taşınması gibi) alternatif ve güvenli bir polimer olarak kullanımı değerlendirilecektir.

TEORİK BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

Nanobilim, nanometre ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) boyutlarında olan sistemlerle ilgilenen bir bilimdir [2]. İnsan saç telinin çapı 10 000 nm kalınlığında, insan kan hücreleri 2000–5000 nm uzunluğunda, bir hücre zarı ise yaklaşık 5 – 10 nm iken, DNA yaklaşık 2 nm ve yan yana duran 10 hidrojen atomu 1 nm kadardır (Şekil 2.1). Nanoteknoloji ise yapıların nanometre ölçeğinde tasarım ve yapımını kapsayan bir bilim alanıdır [32].



Şekil 2.1 Çeşitli biyolojik ve fiziksel nesnelerin boyut ölçeği (nanoteknoloji alanı 1 ile 100 nm arasındadır) [33]

2.1.1 Nanoteknoloji Uygulama Alanları

Nanoteknoloji endüstriyel üretim (tekstil, gıda vb.), enerji, elektronik, çevre, sağlık, tarım, elektronik, haberleşme ve mühendislik alanlarındaki uygulamalarla günümüzde önemli bir yer teşkil etmektedir[1], [2], [32], [34].

2.1.1.1 Tarımsal Uygulamalar

Tarım, birçok ülkenin ekonomisinin ana itici güçlerinden biridir. Aynı zamanda en büyük gıda kaynağı sağlayıcılarından biri olarak dünya çapında hayati bir öneme sahiptir. Bu nedenle, nanoteknoloji sürdürülebilir ve hassas tarımın gelişmesinde önemli bir rol oynayabilir. Nanoteknolojinin tarım biliminde kullanımı, sürekli büyüyen dünya nüfusunun daha yüksek tarımsal verime olan talebi nedeniyle artmaktadır [1]. Örneğin, tarımda mahsul verimini en üst düzeye çıkarmak için nanoteknolojik sensörler ve izleme cihazları kullanılarak hassas tarım teknolojileri geliştirilebilmektedir. Böylelikle nanoteknolojinin, tarım sektöründe küresel gıda üretiminin artırılması yönünde olumlu etki göstermesi beklenmektedir [35].

Tarım ticaretinin (2030 yılına kadar) küresel yatırımda 2.9 trilyon ABD doları değerinde bir sanayi olduğu tahmin edilmektedir [36]. Dünya'daki zirai kimyasal madde tüketimi ise yılda yaklaşık 2,5 milyon tondur (FAO 2012) [37]. Bununla beraber, gelişigüzel şekilde zirai kimyasalların kullanılması, çevresel kirlenmeye sebep olup, hedef dışı organizmalara (insanlar, toprak mikrobiyotası, yerli fauna ve flora) ve zararlı böceklerin direncinin artmasına neden olabilmektedir [38], [39].

Bu problemlere alternatif olarak nanoteknoloji, tarım sektörünü, yıllık %25'lik (1,08 milyar ABD doları) büyüme hızıyla daha çevre dostu hale getirerek, tarıma faydalı olma potansiyeline sahip bir alan oluşturmaktadır [40]. Önümüzdeki yıllarda ise, nanobiyoteknoloji, bitki üretim tekniklerinin geliştirilmesinde hayati bir rol oynayabilir. Zirai kimyasal ilaçların püskürtülerek uygulanmasının sızıntı, fotoliz, hidroliz ve biyolojik bozulma gibi problemlerden ötürü etken maddelerin yalnızca küçük bir kısmının hedef bölgelere ulaşabildiği bildirilmiştir [41]. Bu sorunlara çözüm olarak NP'ler, istenilen molekülleri (DNA, ilaç, protein vb.) dış etkilerden, hücredeki parçalayıcı ajanlardan koruyarak, bitki dokularına ve hücrelerine kolayca nüfuz edebilecek ve kademeli olarak

gerekli dozlarda salımını sağlayacak şekillerde tasarlanabilirler [42]. Özellikle, son yıllarda silika esaslı NP'ler bitkilerde zirai kimyasalların potansiyel bir dağıtım ajanı olarak ilgi çekmektedir [43].

Sonuç olarak, NP'ler, zirai kimyasallar için kontrollü bir salım sistemi sağlama, çözünürlüklerini artırma veya biyoaktif bileşiklerin erken bozulmaya karşı korunması amacı ile geliştirilebilmektedirler [44], [45]. Bu şekilde NP'ler, daha düşük dozlarda ve az sayıda uygulama ile zirai kimyasalların etkinliğini artırabilir. Bunun yanında çevresel kirlenme (toksikite) riskini, insanlar ve diğer hedef dışı organizmalar için azaltabilirler [46], [47], [48]. NP'lere ek olarak, tarımda kullanılacak nanomalzemeler nanotabakaları, nanojelleri ve karbon nanotüpleri de içermektedir [48], [49].

Bitki biyoteknolojisi, gıda ve enerji güvenliğini sağlamada anahtar bir rol oynamaktadır. Bununla beraber, bitki gen mühendisliğinde biyomolekül aktarımı ve neslin devamlılığının sağlanması, temel zorluklar olmaya devam etmektedir. Bitkilerdeki geleneksel biyomolekül aktarım yöntemleri, düşük verimlilik, az sayıda bitki türünü kapsamaması, sınırlı kargo çeşitleri ve doku hasarı gibi kritik dezavantajlara sahiptir. Nanoteknolojideki ilerlemeler ise, geleneksel yöntemlerdeki sınırlamaların üstesinden gelmek için fırsatlar yaratmaktadır: NP'ler, türlerden bağımsız, DNA, RNA ve proteinlerin pasif aktarımı için umut vericidir. Nükleaz bazlı genom düzenlemesinin ortaya çıkışı (örneğin, CRISPR-Cas9), diğer etkilerinin yanı sıra (sert düzenleyici kısıtlamalar olmadan) genetik olarak işlenmiş mahsüllerin geliştirilmesine olanak sağlayan yeni bir genetik mühendisliği çağının kapısını aralamıştır. Nükleaz-bazlı düzenlenmiş genom kargo aktarımı için NP'ler en uygun aktarım aracı olma potansiyeline sahiptirler. Böylece, bitki gen mühendisliğinin ilerlemesi için bitkilere nanopartikül aktarımı kritik bir teknoloji haline gelmektedir [11].

Yakın gelecekte, tarım ve bitki araştırmaları için NP'lerin geliştirilmesi çok daha fazla önem kazanacaktır. Günümüzde pestisit uygulamalarından, gübre kullanımına ve hatta genetik dönüşüme olanak sağlayan çalışmalar yapılmaktadır [50]. Bununla birlikte, NP'ler ile yapılan araştırmaların çoğu insan hücre hatları üzerinde gerçekleştirildiği için, bu çalışmaların bitki hücrelerine adapte edilmesinin zor olduğu literatürde belirtilmektedir [42]. Nananopartikül sistemlerin bitki hücreleri üzerindeki etkileri ve

bitki hücrelerine alımı, bitki hücrelerine etken madde/DNA/ilaç taşınması günümüzde önemli çalışmalar olarak değerlendirilmektedir.

2.2 Nanopartiküller

Nanopartiküller, nanometre boyutlarında büyüklüğe sahip, organik ya da sentetik polimerlerle hazırlanan, çözünmüş, enkapsüle veya adsorbe edilen etken maddeyi kontrollü olarak salabilen katı koloidal sistemlerdir [51], [52].

NP'ler, çeşitli malzemelerden oluşur ve bunların etkileri kimyasal kompozisyonlarına, boyutlarına ve şekillerine bağlı olarak değişmektedir [53]. Tasarlanmış nanomalzemeler, karbon bazlı, metal bazlı, dendrimerler ve kompozit bazlı NP'ler olmak üzere dört tipte sınıflandırılabilirler. (i) Karbon-bazlı materyaller arasında fulleren, tek ve çok duvarlı karbon nanotüpler bulunur. (ii) Metal-bazlı maddeler kuantum noktaları, nano-altın, nano-çinko, nano-aluminyum ve TiO_2 , ZnO ve Al_2O_3 gibi nano ölçekli metal oksitlerdir. (iii) Dendrimerler ve nano-boyutlu polimerler özel kimyasal faaliyetleri yerine getirebilecek kapasiteye sahip dallanmış birimlerden oluşurlar [28]. (iv) Kompozitler (polimer) veya birleşik NP'ler, diğer NP'lerden veya daha büyük polimerlerden üretilir ve küre, tüp, çubuk ve prizma gibi farklı morfolojilerde olabilirler [54].

NP-bazlı aktarımlarda, NP'lere istenen molekülü yüklemek için çeşitli stratejiler kullanılır. Enkapsülasyon, NP yüzeyini modifiye ederek taşınan molekülün infüzyonunu sağlamak için kovalent olmayan konjugasyon (elektrostatik etkileşim) [55], p-p istifleme [56] ve kovalent konjugasyon [57] gibi farklı teknikler ilaç taşınması için geliştirilmektedir.

NP'ler (en az bir boyutta 1-100 nm) fiziksel ve kimyasal özellikleri ayarlanarak çeşitli kompozisyonlar, morfolojiler, boyutlar ve yüklerde tasarlanıp üretilebilirler. Sıfırdan üç boyutluya kadar değişen özelliklerdeki NP'ler; sınırsız enerji depolama, sensör sistemleri ve biyomedikal uygulamalar dâhil çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar [58], [59]. Çoğu NP, tekrar edilebilir olarak, çeşitli biyolojik sistemleri, dokuları, hücreleri veya alt hücreli yapıları hedefleyecek şekilde üretilebilir [60]. Dahası, NP aracılı gen ve ilaç aktarımı, viral vektörlerle karşılaşılan yaygın sorunların üstesinden

gelebilir. NP'ler genellikle daha az immünojenik ve onkojeniktir ve ayrıca farklı ve daha büyük molekülde taşıyabilirler. Ancak büyük moleküllerin NP yüzeyine yüklenmesi ile artan NP boyutları biyolojik engelleri aşma sorununu arttırmaktadır [61]. Ayrıca, NP kullanımının etkileri henüz tam olarak çalışılmamıştır, mevcut araştırmalar sitotoksiteyi kontrol etmek için nanopartikül kimyası, büyüklüğü ve dozunun ayarlanabilmesini gerekli kılmaktadır [62].

2.2.1 Nanopartiküllerin Üretiminde Kullanılan Yöntemler

NP'lerin 1 ila 100 nm arasında değişen ortalama bir boyuta sahip olması tercih edilir [63]. Özellikle, farmasötik bilimlerde, nanoboyuttaki partiküller, agrega malzemelere kıyasla benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle son yıllarda oldukça tercih edilmektedir [64].

NP'ler litografi [65], biriktirme [66] ve kendinden toparlanma (self assembly) [67] gibi teknikler kullanılarak yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımlı yöntemlerle sentezlenebilirler [68], [69]. **Yukarıdan aşağıya** doğru işlemden, büyük yapılar enerji girişi sonucu boyut küçültme mekanik işlemiyle nano ölçekli parçacıklara dönüştürülür, bunun yanında küçük moleküller arası afiniteye bağlı olarak **aşağıdan yukarıya** işlemden nano tanecikler oluşturmak üzere modifiye edilebilirler. Mekanik işlemle nanopartikül sentezlemenin en çok tercih edilen yöntemlerinden biri "nanoemülsiyon" oluşturmaktır. Bu işlemde, yüksek enerji kullanımı her zaman gerekmektedir. Bu yöntemde NP'lerinin oluşumu için yağ ve su fazlarından emülsiyon elde etmek için yoğun kuvvetler uygulanabilir [70]. Diğer bir yol olan "çözünme / antisolvent yöntemi" NP'lerin aşağıdan yukarıya doğru işleme için oldukça yaygın kullanılır [71]. Nanopartikül üretiminde kendiliğinden bir araya gelme (Self assembly) kullanılan bir başka yöntemdir. Sentez, moleküller arasındaki etkileşimlerden yararlanılarak gerçekleştirilmektedir. Kendiliğinden bir araya gelerek nanopartikül üretimi, moleküller arası kütle oranlarından, üretim pH koşulundan, sıcaklıktan, vb. etkilenir [72], [73], [74].

NP'lerin sentez yönteminin belirlenmesi, kullanılan polimer yapısı ve etkin maddenin çözünürlüğüne göre gerçekleşir. Önceki çalışmalarda monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayalı uygulamalar sıklıkla tercih edilmekteyken [75],

günümüzde ise, iyi karakterize edilen, sentetik polimer veya doğal polimerlerin dispersiyonuna dayalı yöntemler daha yaygın uygulanmaktadır [76].

Polimerik NP'lerin hazırlanma yöntemleri şu şekilde özetlenebilir: Emülsifikasyon /çözücü buharlaştırma, emülsifikasyon/çözücü difüzyon, tuzla çöktürme (salting-out), nano çöktürme (nanopresipitasyon), süperkritik sıvı teknolojisi ve diyaliz olmak üzere altı temel yöntem olarak özetlenebilir [76].

Bu çalışmada, FITC-yüklü PLGA NP'lerin hazırlanmasında **emülsifikasyon/ çözücü buharlaştırma yöntemi** kullanılacağından bu yöntem daha detaylı olarak anlatılacaktır.

2.2.1.1 Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi sıklıkla nano ve mikropartikülleri hazırlamak için kullanılan basit ve hızlı bir yöntemdir [77], [78], [79], [80]. Üretilen NP'lerin stabilizasyonu için yüzey aktif maddeler (surfaktant) kullanılır. Bununla birlikte, yüzey aktif maddelerin yeterli şekilde uzaklaştırılmaması bir problem olmaya devam etmektedir. Bu nedenle biyomedikal uygulamalarda yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir [81].

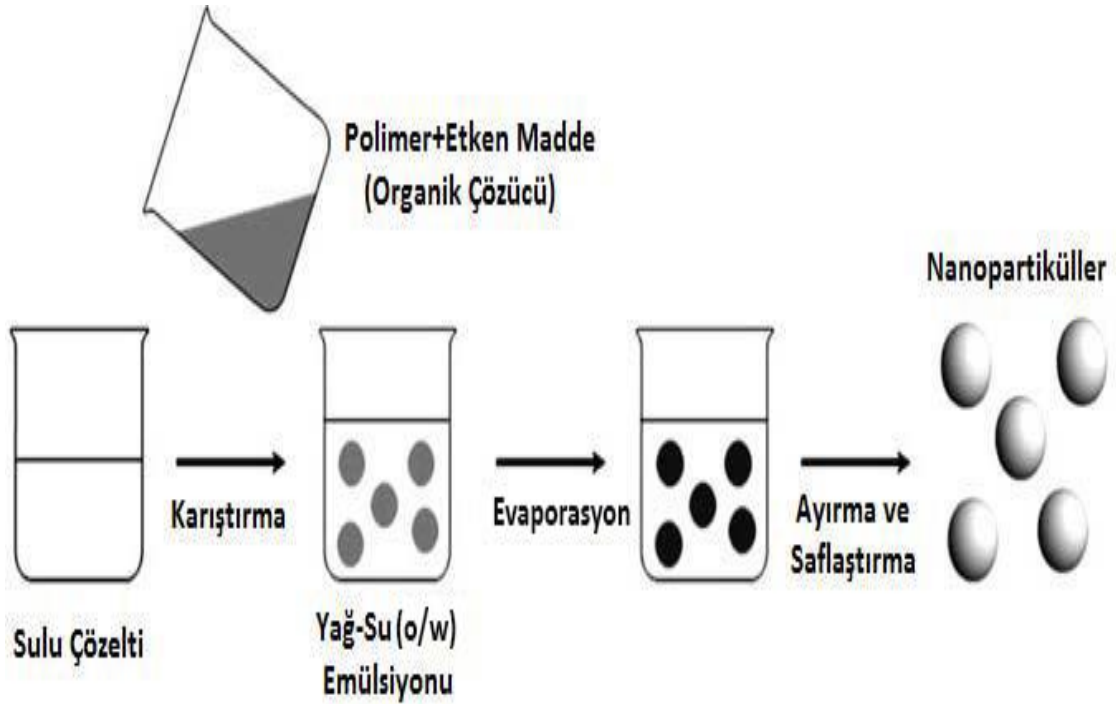
Bu yöntemin esası polimer çözeltisinin uçucu solvent içerisinde hazırlanarak emülsiyon oluşturulması prensibine dayanır. Bu yöntemde sıklıkla kullanılan çözücüler diklorometan, kloroform ve etil asetatdır. Elde edilen emülsiyon, çözücünün evaporasyonu sonucu nanopartikül süspansiyonuna dönüştürülmektedir [82], [83].

Enkapsüle edilecek etken maddenin hidrofilik ya da hidrofobik karakterine bağlı olarak nanopartikül üretiminde **tekli emülsiyon (yağ/su)** ya da **ikili emülsiyon (su/yağ/su)** olmak üzere iki temel yöntem tercih edilmektedir. Uygulama yüksek hızda ultrasonikasyon ya da homojenizasyon uygulamasından sonra çözücünün; oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırma ile ya da düşük basınç altında evapore edilmesiyle gerçekleştirilmektedir [76].

Tekli Emülsiyon (o/w) Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi

Bu uygulamada suda çözünmeyen etkin madde ve polimer için ortak olarak diklorometan, kloroform veya etil asetat gibi bir organik çözücü seçilir. Etken ve

polimer seçilen organik çözücüde çözündürülür. Daha sonra poli (vinil alkol) gibi bir yüzey aktif madde kullanarak su içinde yağ (o / w) emülsiyonu oluşturmak için organik faz su fazı içerisine eklenir ve emülsiyon haline getirilir. Kararlı bir emülsiyonun oluşumundan sonra, organik çözücü basınç altında sıcaklığı artırarak veya oda sıcaklığında karıştırılarak buharlaştırılır (Şekil 2.2)[84], [85].

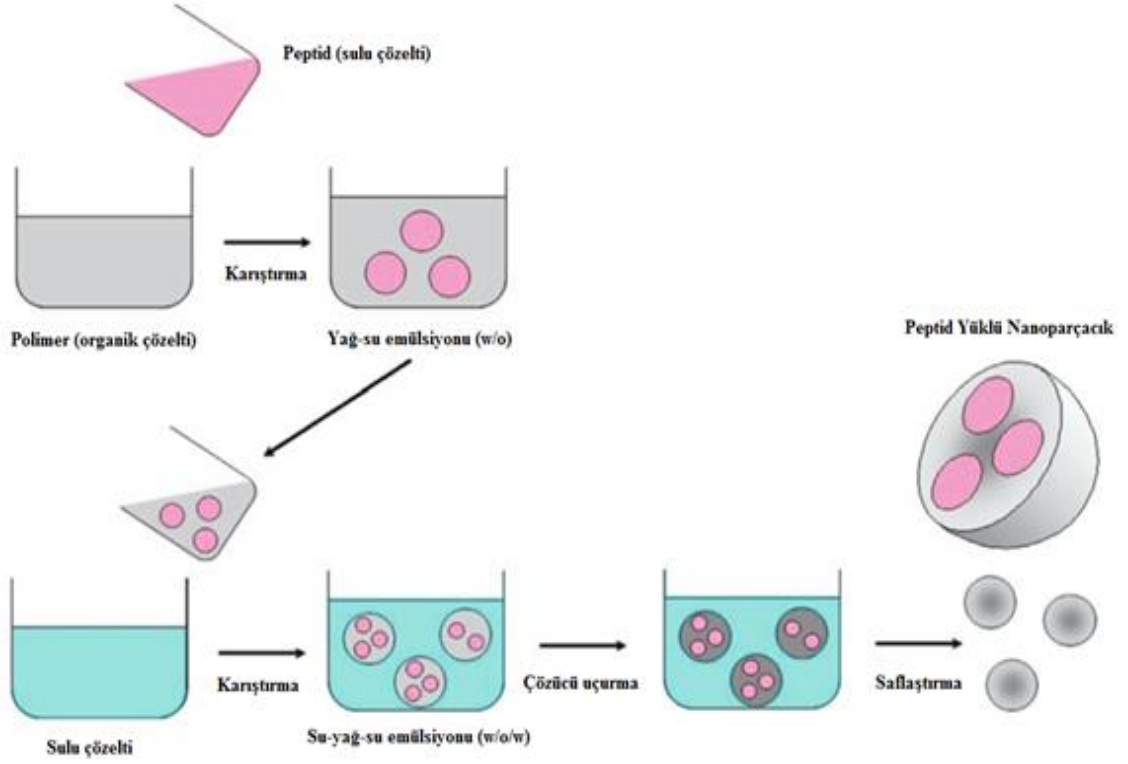


Şekil 2.2 Tekli emülsiyon o/w çözücü evaporasyon yöntemi ile NP'lerin üretimi [81]

İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

İkili emülsiyon (w/o/w=su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi, suda çözünür moleküller olan peptitleri veya proteinleri NP'lere yüklemek için (homojenizasyon yada ultrasonikasyon destekli) yaygın olarak kullanılır (Şekil 2.3) [86], [87]. Bu uygulamada, etkin madde ilk önce sulu bir çözelti içinde çözülür, daha sonra polimer içeren organik çözelti içerisinde karıştırılır. Elde edilen bu ilk w/o emülsiyonu dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek w/o/w ikili emülsiyonu oluşumu sağlar. Daha sonra kullanılan organik çözücü difüzyon ya da evaporasyon [88], [89] ile uzaklaştırılır. Böylece etkin maddeyi içeren nanopartikül süspansiyonu oluşturulur [75], [90] ve filtrasyon veya santrifüjleme yoluyla NP'ler elde edilir. Distile suyla yıkama yapıldıktan sonra liyofilizatörde kurutulan NP'ler kullanılmak üzere dondurulur [91]. Bununla birlikte,

proteinlerin yağ-su ara yüzeyindeki muhtemel denatürasyonu bu yöntemin kullanımını sınırlar. Bu ara yüzeyin sığır serum albümininde (BSA) konformasyonel değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir [92], [93].



Şekil 2.23 Peptit yüklü NP'lerin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi [81]

Her iki yöntemde de emülsifikasyon metodu, ultrasonikasyon, mekanik karıştırma ya da yüksek basınçlı homojenizasyonla uygulanmaktadır. Partikül boyutunun özellikle azaltılması ise ancak ultrasonikasyonla mümkün olabilmektedir [94].

2.2.2 Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

NP'ler tarım, kimya, biyoloji, tıp ve enerji alanlarındaki potansiyel kullanımları için yaygın olarak üretilmektedir [95], [96]. Floresans/benzeri moleküllerle yüklü NP'ler ile işaretli NP'ler teşhis ve tanılamada kullanılmaktadır. Pestisit ve gübre yüklü NP'ler de etken maddenin kontrollü salımını sağladıkları için özellikle tarımda tercih edilmektedirler [97], [98]. Yapılan bir çalışmada NP'ler (pozitif yüklü nano-altın), bitki hücrelerinde plazma zarındaki endositoz mekanizmaları hakkında fikir edinmek için

prob olarak kullanılmıştır [99]. Bir başka çalışmada ise, kirli yüzeylerden ağır metal emiciler olarak yüzey fonksiyonlu NP'lerin kullanımı gerçekleştirilmiştir [100]. Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalarda, hayvan ve bitki hücrelerinde NP'lerin belirli konsantrasyonlarda toksik etkilerinin olduğu gösterilmiş [101], [102], ancak bitkilerde penetrasyon ve translokasyon ve toksisite mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır.

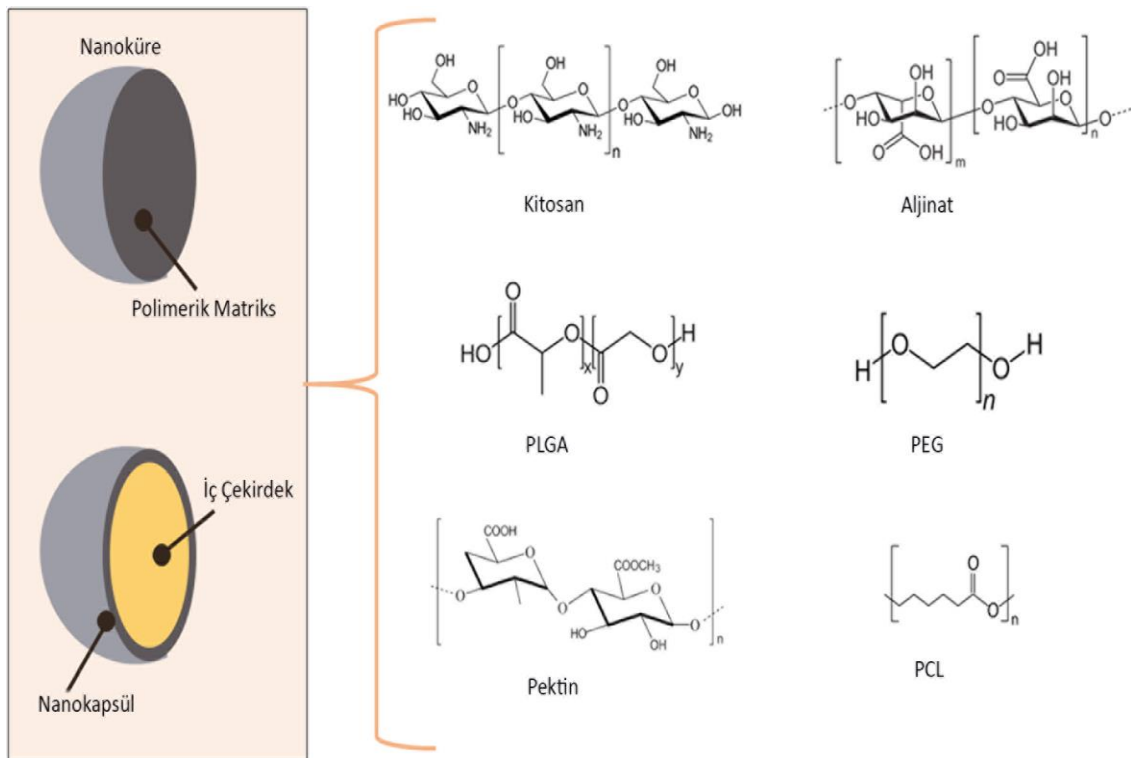
2.2.3 Polimerik Nanopartiküller

Tarımsal uygulamalarda, herbisitler, böcek öldürücüler, mantar öldürücüler, gübreler, bitki büyüme düzenleyicileri gibi tarımsal kimyasallar, nükleik asitler ve proteinlerin taşınması için silika, metalik, metal oksit, lipit ve polimerik NP'ler gibi farklı NP'ler kullanılabilir [60], [103], [104], [105]. Polimerik NP'ler, ilaç dağılım sistemleri için, geniş uygulanabilirliği sayesinde oldukça fazla kullanılmaktadır [106]. Bu nanoürünler, özellikle biyouyumlulukları, biyobozunurlukları ve düşük toksisitesi sebebiyle zirai kimyasallar için en uygun taşıyıcıdır [107]. Polimerik NP'ler, zirai kimyasalları etkin bir şekilde kapsülleme yeteneği ile onları dış ortamdan koruyan ve salımlarını kontrol eden sistemlerdir [45], [108].

Polimerik NP'ler, farklı türlerde biyobozunur sentetik veya doğal polimerler kullanılarak sentezlenebilir. Polisakkaritler düşük maliyetleri, aynı zamanda biyouyumlu ve biyobozunur olmaları sebebiyle biyolojik uygulamalarda yoğun şekilde kullanılmaktadırlar [109]. Tarımda, kitosan ve pektin, NP'lerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılan doğal polimerlerdir [110], [111], [112], [113]. Kitosan, kabuklu hayvanların, böceklerin ve mantarların dış iskeletinden elde edilen, doğal ve her yerde bulunan bir polisakarit olan kitinin N-deasetilasyonu ile elde edilir [114]. Kitosan, düşük maliyetli, biyobozunabilirlik, biyouyumluluk, antimikrobiyal ve böcek öldürücü aktiviteleri, yüksek ilaç yükleme kabiliyeti ve muko-yapışma özellikleri nedeniyle, ilaç dağıtımında kullanılan en popüler biyopolimerdir [108], [115], [116]. Ek olarak, kitosan bitkilerde kontrollü uygulama için inorganik bileşikler ile şelatlama kabiliyetine sahiptir [46]. Kitosan'a benzer şekilde, pektin polisakariti de biyouyumlu ve biyobozundur. Ayrıca bu polimerler, gıda endüstrisinde ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [109].

Nanoagropartikül formülasyonları için kullanılan sentetik polimerler arasında, poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA), poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), poliglutamik asit veya poliglikolitler (PGA), poli (vinil alkol) (PVA), poli (sitrik asit) (PCA) ve polietilen glikol (PEG) bulunmaktadır [117], [118], [119], [120], [121], [122]. Şekil 2.4 polimerik NP'lerin hazırlanmasında en sık kullanılan polimerlerin kimyasal yapılarını göstermektedir.

Polimerik NP'ler, önceden var olan polimerlerden veya monomerlerin doğrudan polimerizasyonu yoluyla sentezlenebilir [82]. Fiziksel yapılarına göre nanokapsül veya nanoküre olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.4). Nanokapsüller polimerik veziküler bir yapı ve iç faza sahipken, nanoküreler polimerik zincirlerle katı bir matrisel organizasyon gösterir [123].



2.2.3.1 Poli (laktik ko-glikolik) asit (PLGA) Polimeri ve Özellikleri

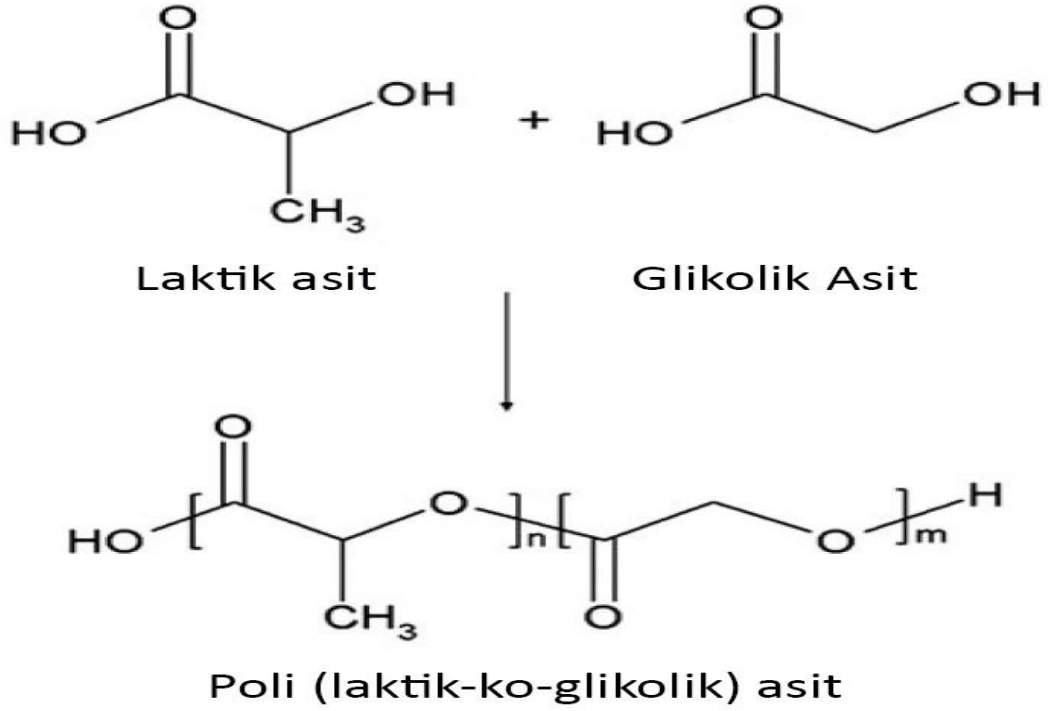
PLGA, biyobozunur ve biyouyumlu olmasından dolayı, polimerik NP'lerin üretiminde sıklıkla kullanılan polimerlerden biridir. PLGA'nın hidrolizi; polimerin metabolit monomerlerine yani laktik asit ve glikolik aside dönüşmesine yol açar (Şekil 2.5) [26].

Polimerik hidrolizi ile açığa çıkan her iki monomer de endojendir ve krebs çevrimi yoluyla vücut tarafından kolayca metabolize edilir. Böylece minimal sistemik toksisite ile ilaç dağıtımı veya biyomateryal uygulamalar için PLGA kullanımı önem kazanmaktadır [125]. PLGA, FDA ve EMA tarafından insanlarda kullanılan çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerde onaylanmıştır. PLGA polimeri, farklı moleküler ağırlıklar ve kopolimer bileşimleri ile ticari olarak temin edilebilir. Bozunma süresi, moleküler ağırlığa ve kopolimer oranına bağlı olarak birkaç ay ila birkaç yıl arasında değişebilir [126]. PLGA biçimleri genellikle kullanılan monomer oranı ile tanımlanır. Örneğin, PLGA 50:50, bileşimi %50 laktik asit ve %50 glikolik asit olan bir kopolimeri tanımlar [127].

PLGA oldukça düşük toksiteye sahiptir, doğal hali amorfudur. Poli (laktik) ve poli (glikolik) asit solvent içinde düşük çözünürlükte olmakla birlikte, PLGA, tetra hidrofuran, aseton, etil asetat ve klorlu solventlerde dahil olmak üzere pek çok çözücü madde içerisinde çözünebilmektedir. PLGA özellikle implant ve protez teknolojisinde, dikiş, gıda ve özellikle ilaç yüklü NP'lerin üretimi teknolojisinde kullanılmaktadır [128].

Polyester PLGA, poli laktik asit (PLA) ve PGA bir kopolimeridir (Şekil 2.5). Tasarım ve verim açısından ilaç dağılımı için kullanılan polimerler içinde en iyi tanımlanmış olanıdır. PLA, tipik olarak klasik kimyasal formülünde sırasıyla D veya L formunda ve bazen R ve S formunda tarif edilen bir asimetrik α -karbon içerir. Polimer PLA'nın enantiyomerik formları poli D-laktik asit (PDLA) ve poli L-laktik asittir (PLLA). PLGA ise genel olarak D ve L-laktik asit formlarının eşit olduğu durumlarda poli D, L-laktik-ko-glikolik asit olarak ifade edilmektedir [25].

PLGA'nın biyodegradasyon derecesi laktik ve glikolik asitin polimer zincirindeki molar oranlarına, polimerin molekül ağırlığına ve camsı geçiş sıcaklığına göre değişiklik gösterir. PLGA'lar, PLA ve PGA'nın çeşitli miktarlarda (35:65, 50:50, 65:35, 75:25) bir araya gelmesinden oluşmaktadır. Laktik asit oranı azaldıkça parçalanma hızı ve ilacın salım miktarı da artmaktadır [129], [130].



Şekil 2.25 PLGA'ın formülü [131]

Piyasada bulunan ticari PLGA kopolimerleri fonksiyonel gruplarına göre üçe ayrılır. Birinci olarak serbest karboksilik asit grubu, sonra ester grubu ve son olarakta alkil esteri grubudur. PLGA'nın ticari çeşitlerinin adlandırılmasında fonksiyonel grupları ve molekül ağırlığı göz önünde bulundurulmaktadır. Ester ve alkil esteri taşıyan PLGA çeşitleri, serbest karboksilik asit taşıyanlara göre daha uzun sürede bozunma gösterirler [132], [133], [134], [135].

2.2.4 Nanopartikül Uygulamaların Hücreye Etkileri

Bilindiği gibi, doğal ve sentetik polimerler, nanopartikül temelli, biyoaktif moleküllerin kontrollü salım sistemlerini geliştirmek için kullanılan malzemelerdir [136]. Nanopartikül üretiminde kullanılan polimerler arasında, PLA, PGA ve bunların kopolimerleri olan PLGA bazlı polyesterler, tasarım ve performans açısından en iyi tanımlanmış polimerlerden bazılarıdır [137], [138], [139], [140], [141]. PLGA temelli NP'ler (10-1000 nm) veya mikro tanecikler (1-100 µm) PLGA'nın biyolojik uyumluluk kapasitesinin yüksek oluşu, iyi biyodegradasyon özelliklerine sahip olmasından dolayı oldukça fazla çalışılmaktadır [142].

2.2.4.1 Sitotoksik Etkileri

Hücrel toksisite, in vivo değerlendirmelerden önce ilaç yüklü NP'lerin hedef hücrelere karşı spesifikliğini ve etkinliğini değerlendirmek için yapılan in vitro analizlerdir. NP'lerin hücrel alımını kontrol etmek için, NP'ler, FITC gibi uygun floresans problemleriyle etiketlenir ve bu işlemi, floresans etiketli NP'lerin hücreler ile inkübe edilmesi takip eder. İnkübasyon sonrasında fazla NP'lerin uzaklaştırılmasının ardından, hücrelerin NP alımı floresans mikroskop ile (floresans dağılımı) görselleştirilir [143]. Sitotoksikite analizi ise, NP'lerin belirli bir süre boyunca hücrelerle inkübe edilmesinden sonra gerçekleştirilir. Daha sonra, hücreler yıkanır ve taze ortam ile desteklenir. 72 saatlik ek kültürlemenin ardından iyi bilinen MTT deneyi ve ATP deneyi gibi uygun protokollerle hücre canlılığı değerlendirilir [144].

NP'lerin hücre toksisitesi, nanomalzemelerin olumsuz etkilerinin değerlendirilmesini sağlayan en önemli belirteçtir. Örneğin, bakır oksit toksiktir ve hücreleri öldürdüğü bildirilmiştir [145]. Hücre zarı negatif yük taşıdığı için pozitif yüklü NP'lerin hücre zarı ile temas ettiklerinde hücre zarı ile bağlanarak elektrostatik şekilde hücre iletişimini bloke ederler ve hücrenin ölümüne yol açarlar. TiO_2 , Fe_3O_4 , ZnO , Al_2O_3 , Ag , Au , NiO ve CrO_3 NP'ler ve karbon nanotüpler gibi karbon bazlı nanomalzemeler gibi çeşitli NP'ler, hücre morfolojisi, mitokondriyal fonksiyon, apoptoz ve plazma geçirgenliğini etkileyen sitotoksik etkileri araştırılmaktadır. Birçok çalışmada bu NP'lerin hücre morfolojisini değiştiren ve zarar veren toksik etkilerinin olduğu bildirilmiştir [146], [147], [148], [149], [150], [151], [152], [153].

Aslında, serbest olarak salınan ilaçlarla karşılaştırıldığında, NP tarafından enkapsüle edildikten sonra ilaçların hücrel toksisitesinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir [154]. PLGA bazlı NP'ler günümüzde en umut verici ilaç taşıyıcıları arasındadır, ancak bunların bitkilerde kullanımı yeterince araştırılmamıştır. Günümüzde, PLGA NP'lerin hayvan hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığı gösterilmesine rağmen, bitki hücrelerinde sitotoksisitesi ve genotoksisitesi hakkında yeterli rapor bulunmamaktadır [62], [155], [156], [157]. Bu NP'lerin bitki dokularındaki etkisini ilk defa Valletta ve ark. [42] 2014'de *Vitis vinifera* L. hücre hatları üzerinde araştırmıştır. Bu çalışma sonucunda canlılık testleri ile PLGA NP'lerin *V. vinifera* kültürlü hücreler için sitotoksik olmadığı

gösterilmiştir. Ayrıca, PLGA NP'lerin önemli bazı bitki hastalıkları etmeni olan mantarlar tarafından alınmasının da gözlemlendiği bu çalışmada, PLGA NP'lerin fungal hücreleri etkisiz hale getirmede mantar önleyici bileşikler sunmak için kullanılabileceğini göstermiştir.

2.2.4.2 Genotoksik Etkileri

NP'ler, bitki yüzeylerinin çapraz bağlı (hücre duvarı) bariyerinden kolayca geçebilen ve sitotoksik etki gösterebilen küçük boyutlara sahiptir [156]. Bitki organları, hücre duvarının sızdırmazlık yeteneğine rağmen, NP'lerin hücre içine girişini engelleyemezler. Bunlar bitkiye girdikten sonra insan için avantajlı etkilerinin yanı sıra zararlı etkileride üretilebilirler [156]. Eichert ve ark. (2008), yaklaşık 43 nm büyüklüğünde polimerik NP'lerin stoma yaprağı yoluyla *Vicia faba* içine geçebildiğini bildirmişlerdir. Bunun yanısıra toplamda 29 çalışma, çoğu *Allium sp* (n = 22), *Nicotiana sp* (n = 4) ve *Vicia sp* (n = 4) model bitkilerinde gerçekleştirilen farklı NP'lerin (Ag, Zn, Au, Ti, In, Fe, Cu, Al, Ce, Ni ve Al) genotoksitesini bildirmiştir. Ancak bitkilerde penetrasyon ve translokasyon ve toksisite mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır [101], [102], [158].

Nanoyapılı taşıyıcı sistem tasarlanırken; parçacık büyüklüğü, yük, kimyasal yüzey ve diğer fiziko-kimyasal özelliklerin kontrolü ile polimerik nanopartikülün belirli zamanda (çözünürlüğü ve salımının çalışılması) hedeflenen bölgeye penetrasyonunu sağlamak için dizayn edilmesi gerekmektedir [159]. Çoğu polimerin yüksek uyumlu, biyoaktif bileşiği koruyan, biyouyumlu ve kolay biyobozunur özellikte olması, farklı tarım-kimyasalları [124] ve gen aktarımı [60] için nano taşıyıcıların geliştirilerek kullanılmalarını teşvik etmektedir. Bu nedenle, NP'lerin toksik etkinin aşılması ve bunlarla ilgili detoksifikasyon çalışmalarının araştırılması çok önemli bir araştırma alanıdır [155]. Özellikle polimerik NP'ler üzerinde yapılan genotoksik çalışmalar oldukça azdır. Bu çalışma ile PLGA NP'lerin yonca hücre hatlarındaki genotoksitesini ilk defa çalışarak, literatüre katkı sağlanacaktır.

2.3 Bitkilerde Yaygın Kullanılan Gen Aktarım Yöntemleri

Biyokimyasal ve farmasötik uygulamalara kıyasla, agrokimyasal taşıyan polimerik NP'lerin potansiyel kullanımlarının araştırılmasında laboratuvar ortamlarında önemli

ilerleme kaydedilmesine rağmen, tarımda [124] ve bitki gen aktarımında [160] NP'lerin kullanımı halen başlangıç aşamasındadır.

Bitki genetik mühendisliği hayvan sistemlerindeki ilerlemenin gerisinde kalmıştır; bitkilerde uygulanan geleneksel biyomolekül dağılım yöntemleri hücre duvarlarından dolayı hücre içi taşınmasında zorluklara sahiptir. Bunun sonucu olarak bitki genetik transformasyon etkinliği sınırlanmaktadır [11].

2000'li yıllardan beri gıda ve tarım alanında milyarlarca dolarlık bir endüstri olan rekombinant DNA teknolojisinin [161] geleneksel uygulamalarıyla, günümüzde bitki biyoteknolojisi, hormonlar, pıhtılaşma faktörleri, herbisite dayanıklı bitkiler, enzimler ve aşılardan gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Kırk yılı aşkın bir süredir tarıma uygun arazi miktarındaki %10'luk azalmaya karşın dünyayı nüfusu yaklaşık iki katına çıkıştır. Ayrıca, son kırk yılda kişi başına düşen dünya gıda üretimi %25 artmıştır. Buna çare olarak da bitkilere gen transferi ile gelecek nesillerin, gıda ve enerji ihtiyacının karşılanmasının mümkün olduğu düşünülmektedir [32]. Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamalarına İlişkin Uluslararası Hizmet (ISAAA) Kuruluşu (1996-2016) %90'ı gelişmiş ülkeleri kapsayan 28 ülkedeki 17 milyondan fazla çiftçinin, genetik mühendisliği bitkilerinden (biyoteknolojik mahsul), yaklaşık 186,1 milyar dolar ekonomik kazanç sağladığını bildirmiştir [162].

Trangenik bitki teknolojisi (bitkilere doğrudan gen transferi), klasik ıslah yöntemleri ile yapılması mümkün olmayan değişikliklerin yapılmasını sağlar. Kendi pestisitlerini üreten, herbisitlere dayanıklı, aşı ve biyoyakıt gibi ürünler üreten bitkiler ticari olarak önemli potansiyeli olan gelişmelerden birkaç tanesidir. Günümüzde, transgenik bitkilerin dünya tarımındaki yaygınlığı giderek artmaktadır. Bir yandan, kıtlık Dünyada sorun olmaya devam ederken, daha besleyici ve verimli besinlerin hızlı üretimi de tartışma konusudur. Öte yandan bazı sektörler denemelerin insan sağlığı ve çevre açısından zararlı olabileceğini düşünmektedir. Her durumda tarımsal biyoteknoloji devriminin durdurulması mümkün değildir [32].

Bu nedenle, bitki biyoteknolojisinde ana hedefler bitkilerde transgenik DNA miktarını en aza indirmenin yanı sıra, ilgilenilen özelliklere sahip transgenik bitkiler oluşturmaktır. Bunu yaparken DNA gen ekspresyonunun ve performans özelliğinin

maksimum kararlılıkta olması istenir. Burada kullanılan gen aktarım yöntemlerini; biyolojik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere 3 ana grupta sınıflandırmak mümkündür [163]. Bitkiler için mevcut biyomolekül aktarım yöntemleri ve karşılan zorluklar Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

2.3.1 Biyolojik Yöntem

Yüksek yapılı bitkilerde transgenik bitki oluşturmak için *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes’e* [163] ait plazmit vektörler (transformasyon) kullanılmaktadır [161] .

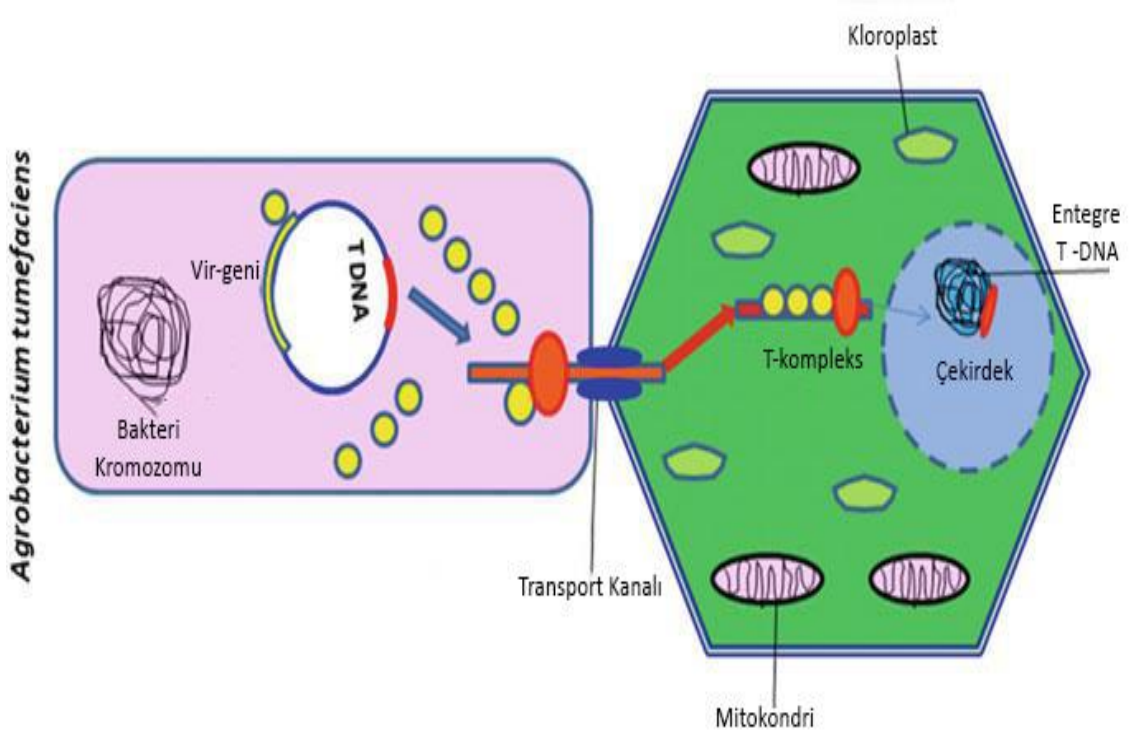
2.3.1.1 *Agrobacterium tumefaciens* ile Gen Aktarımı

A. tumefaciens, birçok farklı bitki türünde **taç gal** (tümör) hastalığına neden olan fitopatojenik Gram-negatif bir toprak bakterisidir. Bu bakteriler bitki kültürü hormonları ilave edilmeden basit kültür ortamında in vitro olarak kolayca çoğaltılabilir [164]. Bu hastalıkta tümör oluşumu, bakterinin taşıdığı Ti plazmiti nedeniyle gerçekleşir. Tümörü indükleyen bu Ti plazmiti, bitkiyi enfekte ettiğinde T-DNA olarak bilinen kısmını, konak bitki nükleer genomuna entegre eder (Şekil 2.6). Bu T-DNA’daki tümör yapan genler çıkarılarak, yerine istenilen yabancı genler sokulabilir ve *A. tumefaciens* enfeksiyonu ile rekombinant DNA bitki hücrelerinin genomuna girmiş olur [161]. Bu özellik bitki biyoteknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve transgenik bitkilerin üretilmesinde kullanılan en önemli araç *Agrobacterium’dur* [165].

Son otuz yılda, *Agrobacterium'un* biyolojisi bu uygulamalarda ciddi biçimde incelenmiştir ve yöntemin dezavantajları özetle şöyle açıklanabilmektedir; düşük kopya sayısı ve büyük boyuttaki Ti plazmitleri nedeniyle, plazmit manipülasyonu ve izolasyonunda ciddi zorluklara yol açmaktadır. Ayrıca tüm dokular veya bitki türleri *Agrobacterium'a* duyarlı olmadığı için, dönüştürülebilen bitki türleri aralığı da sınırlıdır [8], [10].

Çizelge 2.1 Bitkilerde en çok kullanılan transformasyon yöntemleri; avantajları ve dezavantajları

Yöntem	Prosedür	Avantajlar	Dezavantajlar
Biyolojik			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Bakteride bulunan DNA plazmidinin (Ti-plazmiti) T-DNA bölgesinden yararlanılır. Agro-enfeksiyonu sonucunda T-DNA bölgesi bitki hücrelerine aktarılır ve DNA'sı ile kalıcı olarak bütünleşir.	Mutlak genom entegrasyonu gerçekleşir, düşük kopya sayısına rağmen transgen kolayca yerleşir. Genin entegrasyonu, kalıtımı ve ifadesi yeni jenerasyonlar boyunca kararlıdır. Farklı hücre tiplerinde kullanılabilir. Birçok dikotiledon ve bazı monokotiledon tarla bitkileri için tekrarlanabilir ve verimli protokoller geliştirilmiştir. Yüksek verimlilik.	Kullanımı kolay olmayan çeşitli parametreler, transformasyon verimliliğini ve bitki rejenerasyonunu etkiler. Süreç yavaş gerçekleşir. Bitkiye bilinmeyen genetik ifadeler üreten gereksiz vektörlerin aktarılabilir. Steril yöntemler gerektirir.
Kimyasal			
PEG	Elde edilen plazmit, protoplastlarla yavaşça karıştırılır. CaCl ₂ , mannitol gibi maddeler ortama eklenerek PEG çözeltisi ile karıştırılır.	Uygulaması kolay ve ekipman ihtiyacı pahalı değildir.	Transformasyon verimi düşüktür. Protoplastların kullanılmasından dolayı, transgenik olan protoplastların bitki oluşturma rejenerasyonu düşüktür.
Fiziksel			
Mikroenjeksiyon	Bir enjeksiyon pipeti ile bitki hücresine doğrudan DNA aktarımı ile gerçekleştirilir.	Transformasyon verimi son derece yüksektir. Plazmitlerin ve bütün kromozomların girmesine imkân verir.	Pahalı, zahmetli ve yavaştır. Sadece bir hücre tranfekte olur. Bütün organizma için uygun değildir.
Elektroporasyon	DNA, güçlü elektrik atımlarıyla indüklenen hücre zarının geçirgenliğinin artmasıyla porlardan içeri sokulur.	Geçici transformasyon verimi oldukça yüksektir. Kolay, hızlı ve ucuzdur. Tüm bitki protoplast ve farklı hücre çeşitlerine uygulanabilir.	Kararlı transformasyon verimi düşüktür. Zahmetli protokoller gerektirir ve esas olarak protoplastlara uygulanır.
Gen Tabancası (Biyolistik)	Genlerle kaplı yüksek yoğunluklu taşıyıcı partiküller hücreye hızlıca atılır ve DNA'yı bir adsorpsiyon mekanizmasıyla hücre içine bırakırlar.	Basittir. Hücre duvarının ön işlemine gerek yoktur. Hücrenin fizyolojik özelliklerinden bağımsız olarak farklı hücrelerin transformasına izin verir. Çoklu transgen aktarılmasına olanak verir.	Yüksek maliyetli ve transformasyon verimi düşüktür. Kullanılan her bir biyolojik hedefe göre sürekli optimize edilmelidir. Transgenlerin çoklu kopyalarının aktarılması, DNA ve hücrelerin zarar görmesi riski vardır.
Silikon karbid fiberler	Silikon karbid fiberler aşınmaya neden olacak şekilde doku süspansiyonu ile karıştırılır ve DNA'nın içeri iletimini sağlar.	Basit, hızlı ve ucuzdur. Farklı bitkilerde ve hücre tiplerinde sınırlama olmadan kullanılabilir.	Çok düşük verimlilik (biyolistikten daha düşük). Hücrelerin rejenerasyon yeteneklerini etkileyecek şekilde zarar görmesi. Fiberlerin solunması nedeniyle çalışanlar için tehlikeli olabilir.
Ultrasonikasyon	DNA molekülleri, hücre zarının geçirgenliğini geçici olarak değiştiren akustik kavitasyon yoluyla hücrelere aktarılır.	Basit ve güvenli. Oldukça verimliliğe sahiptir. Özellikle sıvı özellikteki hücresel bitkilerde daha etkilidir. Farklı hücre çeşitlerine uygulanabilir.	Hüresel hasara neden olabilir. Standart olmayan protokolleri vardır.



Şekil 2.6 Agrobakterium Ti-plazmidinin yapısı ve T-DNA'nın konağa entegrasyonu [166]

2.3.2 Kimyasal Yöntemler

Kimyasal yöntemler, esas olarak DNA ile kompleks oluşturarak taşıyıcı görevi yapan kimyasallara bağlıdır. Bu yöntemler, katyonik bileşiklerin ve rekombinant proteinlerin bir taşıyıcı olarak kullanılmasını içermektedir [166].

2.3.2.1 PEG Aracılığıyla Gen Transformasyonu

Son yıllarda bu yöntem *in vivo* çalışmalarda, protein yapıları ve komplekslerinin subelular yerleşimiyle geçici gen transformasyonu ve genlerin susturulmasını mümkün hale getirmiştir. Kalıcı gen transformasyonuna göre daha hızlı ve gen ifadesinin haftalar içinde analizine olanak tanınması önemli avantajlarından [167]. Bu nedenle, oldukça etkili bir yöntem olan polietilen glikol (PEG) aracılı protoplast transfeksiyonu en çok kullanılan tekniklerden biridir [168], [169]. Bu yöntemde kullanılacak protoplastlar genellikle klorofili bol (yaprak, fide vb) mezofillerden enzimatik yolla elde edilir [168]. İstenilen geni taşıyan plazmit, protoplast ile hafifçe karıştırılarak hücre DNA'sına aktarılır [170]. Bu yönüyle elektroporasyona benzer ancak elektriksel atım yerine PEG eklenmesi ile aktive olur [170]. Özel aletlere ihtiyaç

duyulmadan kolayca uygulanmasına rağmen transformasyon başarısının düşük olması ve istenen düzeyde protoplastın rejenerasyonunun gerçekleştirilememesi önemli dezavantajlar yaratmaktadır. Bu yöntem transgenik arpa ve mısır gibi monokot bitkilerde başarıyla uygulanmıştır [170], [171]. Bunların yanı sıra arabidopsis, tütün, mısır, pirinç, üzüm gibi çeşitli bitkilerde de farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir [169], [172], [173], [174].

2.3.3 Fiziksel Yöntemler

Özellikle biyolojik yöntemlerin monokotlarda dezavantajlı olması nedeniyle, önemli tahıl ürünleri olan pirinç, buğday, mısır ve yulaf gibi bitkilerin manipülasyonu için alternatif teknikler geliştirilmiştir [175]. Elektroporasyon, mikroenjeksiyon, silisyum karpit ve mikropartikül bombardımanı, transgenik dokuları ve bitkileri üretmek için başarıyla kullanılan doğrudan gen transfer teknolojileridir [5].

2.3.3.1 Mikroenjeksiyon

İlk olarak yaklaşık 30 yıl önce bildirilen, tüm transfer yöntemlerinin en yaygın kullanılan doğrudan ve en etkili yöntemlerinden biri, mikroenjeksiyondur [176], [177]. Bu, 0.5 µm'den küçük ince ucu olan cam mikropipetler kullanılarak tek bir hücrede gerçekleştirilen mikrocerrahi bir prosedürdür. Genetik materyali içeren sıvı hidrostatik basınç kullanılarak mikropipetle enjekte edilir [178]. Enjeksiyonlar tipik olarak, bir mikroskop kullanılarak doğrudan görsel kontrol altında gerçekleştirilir. Mikromanipülatörün yüksek hassasiyetiyle birleştirilmiş bu mikropipetlerin küçük uç çapları, doğru ve kesin DNA iletimi sağlar ve ilgili genin, hücrelerin hücre çekirdeğine veya sitoplazmasına enjekte edilmesi için kullanılır. Mikroenjeksiyonun, transfer verimi % 100'e kadar olabilmektedir [179]. Çok çeşitli moleküller enjekte edilebilir ve hatta bütün organellerin enjeksiyonu bile rapor edilmiştir [180] ve ilgilenilen moleküller de enjekte edilebilir. Hücre döngüsünün ve hücre kültürü koşullarının tanımlanmış aşamaları enjeksiyondan önce, sırasında veya sonrasında değiştirilebilir [179].

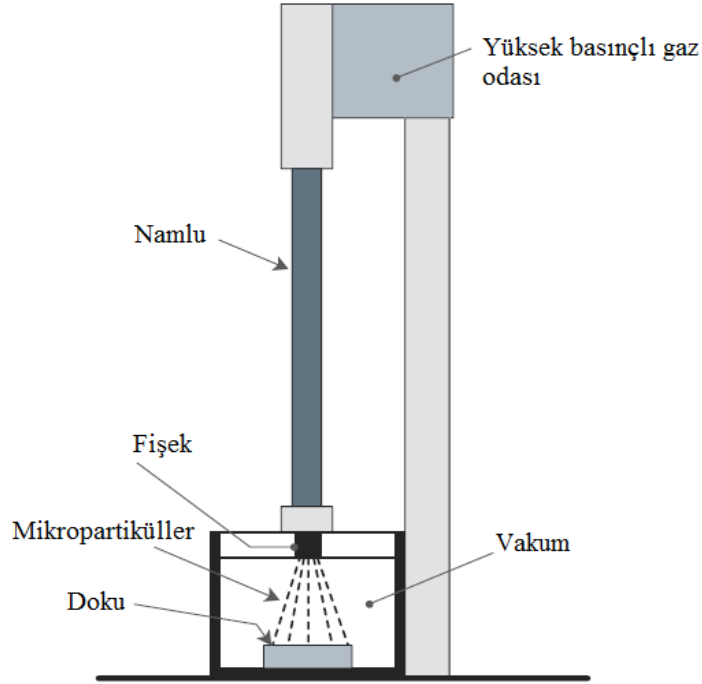
Mikroenjeksiyon en basit gen aktarımı olmasına rağmen uygulanması zordur. Pronükleer DNA enjeksiyonu çok etkili olsa da uygulayıcı için zahmetli bir işlemdir ve tekrarlanabilir sonuçlar rutin olarak elde edilinceye kadar uzun bir eğitim süresi

gerektirir. Klasik mikroenjeksiyon metodolojilerinin bir başka dezavantajı, bir deneyde yalnızca birkaç hücreye (100-200 tekrar sayısı gerekir) enjekte edilebilmesidir. Mikroenjeksiyon için kullanılacak hücre tiplerinde de bir sınırlama vardır. Süspansiyonda yetişen kültürlerin ve sadece küçük hacimli çekirdek veya sitoplazmaya sahip olan yapışık hücrelerin kullanımı daha zordur [179]. Sonuç olarak, gen aktarım işlemini basitleştirmek ve verimliliğini artırmak için başka fiziksel teknikler geliştirilmiştir [178].

2.3.3.2 Partikül Bombardımanı (Gen Tabancası)

Partikül bombardımanı, biyolistik (ayrıca biyobalistik veya Gen tabancası olarak da bilinir) metodu olarak adlandırılan gen transfer metodunun bir parçasıdır. Bu yöntemde, DNA veya RNA biyolojik olarak kararlı partiküllere (altın veya tungsten gibi) yapışır. Daha sonra, DNA-partikül kompleksi, hedef dokuya vakum altında kuvvetli bir şekilde ateşlenerek hızlandırılır. Bu şekilde, transgenler, hücrenin genomuna veya plastomuna iletebilir [179]. Gen tabancası (Şekil 2.7) transferinin etkinliği hücre tipi, hücre büyümesi koşulu, kültür ortamı, gen tabancası mikropartikül tipi, gen tabancası ayarları ve deneysel deneyimler gibi özelliklere bağlı olabilmektedir [179].

Partikül bombardımanı ilk olarak Sanford tarafından tasarlanmıştır [181]. 1980'lerde Agrobacterium ile transformasyonuna uygun olmayan bitkileri genetik olarak üretmek için geliştirildiğinden beri; deneysel amaçlar, tarımsal uygulamalar, kararlı biçimde transforme edilmiş dokular ve gen ekspresyonu için tasarlanan bitkilerin üretimi için güçlü bir araç haline gelmiştir [5]. Partikül bombardımanının uygulanması, 1990'lı yıllarda, çok çeşitli bitki türlerinde transgenik bitkilerin üretilmesinde [182], [183] başarılı bir şekilde kullanıldığı için hızla gelişmiştir.



Şekil 2.7 Partikül Bombardımanı (Gen Tabancası) [184]

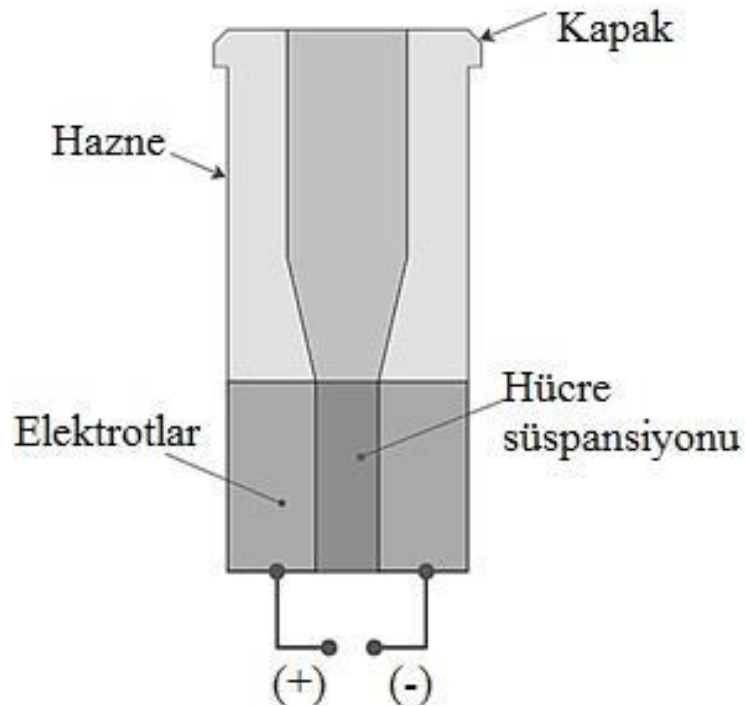
Bu yöntemin avantajları hemen hemen her türlü hücre veya dokuyu uygulanabilir olmasıdır. Cihazın kullanımı kolaydır. Çok sayıda örnek teknisyenler tarafından kısa sürede uygulanabilir. Binary vektörlerde rutin uygulanabilmektedir. Ayrıca geçici gen ekspresyonu birkaç gün içinde incelenebilir. Sıkı dokularda farklı gen yapılarının geçici ekspresyonunu değerlendirmek için elverişli bir yöntemdir [5], [163]. Bu yöntemin dezavantajları ise, gen aktarım verimliliğinin oldukça düşük olmasıdır [185]. Sarf malzemeleri oldukça pahalı olmakla beraber, yöntem hücrelere veya dokulara hasar vermektedir [179], [186]. Ayrıca, Agrobacterium aracılı transformasyonun aksine, biyolistik aktarım, genetik kargonun spesifik olmayan lokalizasyonuna bağlı olarak istenmeyen bir şekilde nükleer, plastidal veya mitokondriyal genomların transformasyonu ile sonuçlanabilir [11].

2.3.3.3 Elektroporasyon

En popüler fiziksel gen aktarım yöntemi elektroporasyondur. Bunun nedeni düşük verimliliğe sahip olmasına rağmen çabukluğu, düşük maliyeti ve basit olmasıdır. Bu yöntemle genetik transformasyondan sonra bitkinin rejenerasyonu için ise zahmetli protokoller gerektirir. Ancak başlangıçta sadece protoplastlara gen aktarımı için

geliştirilen bu yöntemin [184], [187], [188], [189], [190], daha sonra bütün bitki hücrelerinde çalıştığı ortaya çıkmıştır [191].

Pratik olarak, elektroporotör ile oluşturulan yüksek elektrik alanları, protoplastlara veya sıvı kültür ortamında yetişen süspansiyon hücrelere uygulanır (Şekil 2.8) [192]. Yöntem, bir kapasitör boşalmasıyla, bazı cihazlarda (3000)'e kadar yüksek voltaj sağlayabilen elektriksel atım ile uygulanır [193]. Uygulanan voltaj ve zaman, kullanılan hücre tipine göre belirlenir. Elektriksel atım uygulamasıyla istenilen DNA; hayvan, bitki ve bakteri hücrelerine aktarılabilir. Elektroporasyonla transfeksiyon verimini etkileyen faktörler ise şöyle sıralanabilir; uygulanan elektrik alan şiddeti ve uzunluğu, sıcaklık, DNA konformasyonu, DNA konsantrasyonu ve transfeksiyon ortamının iyonik bileşimi, vb [178]. Bir elektroporasyon uygulandığında sonuç, geçici gözeneklerin oluşmasıdır. Oluşan gözenekler 20-120 nm arasındadır. Gözenekler tekrar kapanmadan önce, hedef moleküller hücrelere girer [194], [195]. Geçirgenliğin ön koşulu, uygulanan elektrik alanının kritik eşik değeri geçmesini gerektirir. Hücre süspansiyonu için, elektroporasyon 0,5 V - 1 V derecesini gerektirir [196], [197].



Şekil 2.8 Elektroporotör [184]

Gen transferinin elektroporasyonla elde edilebileceğini ilk olarak, Neumann ve arkadaşları 20 yıldan fazla bir süre önce fare myeloma hücreleri üzerinde yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir [198]. Daha sonra, elektroporasyon sisteminde elektrik alan şarjı kullanılarak, olgunlaşmamış mısır embriyoların kararlı transformantları üretilmiştir [199]. Ancak, genellikle protoplastların eksplant olarak kullanılması transformantların rejenerasyonunu zorlaştırmaktadır. Hatta yöntem sıkı dokulara uygulandığında, doku hücre çeperlerinin elektroporasyonu engelleyen bariyer oluşturduğu gözlemlenmiştir [170].

2.3.3.4 Silikon Karbid Aracılığıyla Gen Transformasyonu

En sade yöntemlerden biri olan silikon karbid aracılı transformasyonun kullanımı ilk kez Kaeppler ve ark. tarafından, 1990 yılında bildirilmiştir [200]. Silikon karbid lifler hücreleri öldürmeden delik açabilme yeteneğine sahiptirler. Bu özelliği kullanılarak, silikon karbid aracılı transformasyon metodu ile mısır ve tütün [200] ayrıca pamuk ve yerfıstığı gibi bitkilerde genetik transformasyon başarıyla uygulanmıştır [201], [202]. Yöntem, çeşitli hücreler için etkili bir şekilde uygulanabilen kolay, ucuz ve hızlı bir prosedürdür [189], [203], [204].

Bu tür çalışmalarda bitki hücre duvarı, DNA aktarımında her zaman bir bariyer olmaktadır. Çalışmada silikon karbid lifler 10-80 mm uzunluğunda ve 0.6 mm çapında kullanılmaktadır. Bu lifler sert ve kolayca kırılan keskin uçlara sahiptirler [205]. Silikon karbid lifler, bir vorteks, çalkalayıcı veya blender kullanarak bir doku süspansiyonuna (hücre kümeleri, olgunlaşmamış embriyolar veya kallus) ve plazmit DNA'ya eklenir. DNA kaplı lifler, hücre zarına, bitki hücreleri ve lifler arasındaki çarpışmaların yarattığı küçük deliklerden girer [206]. Silikon karbid lifler negatif yüklü olduklarından DNA ile bağ yapmaz ve bu sayede aktarım verimliliğini düşürmezler [207].

Yöntemin tam olarak genetik transformasyon mekanizması bilinmemektedir, ancak silikon karbid liflerinin güçlü ve keskin kenarlarının çarpıştığında hücresel çeperi keserek DNA'nın hedef hücrelere girmesine izin veren iğneler gibi davrandığı öne sürülmüştür [205], [206]. Yöntemin verimliliği, lif büyüklüğüne, girdap parametrelerine (tür, süre ve çalkalama hızı), damar şekline, bitki türlerine ve hücre özelliklerine, özellikle hücre duvarının kalınlığına bağlıdır [205]. Pahalı ekipman, maliyetli

malzemeler veya kalifiye teknisyenler gerektirmedikinden, büyük ölçekli gen aktarımları için ümit verici bir yöntem olarak kabul edilmektedir [208]. Üstelik yöntem, yerleşik protokoller aracılığıyla [204], farklı bitkilerin kararlı transformasyona izin verir. Bununla birlikte, düşük gen aktarım verimliliğine sahiptir ve rejenerasyon yeteneklerini etkileyerek hücrelere zarar verebilir. Ayrıca, laboratuvar personelinin lifleri solumasına engel olmak için çok dikkatli olunmalıdır, çünkü solunum tehlikesi oluşturabilir ve tehlikeli atık olarak değerlendirilmelidir [209], [210], [211].

Fiberlerin bir DNA süspansiyonu ile çalkalanmasının, gen aktarım verimliliğini arttırmadığı kanıtlanmıştır [212], ki bu, fiberlerin DNA'yı hücrelerin içine taşımadığını, ancak delinme ve aşınma mekanizmalarıyla transferini kolaylaştırdığını göstermektedir [206]. Ayrıca hücrelere DNA da ekleyebilen, silisyum karbür, silisyum nitrat ve cam gibi silikon karbid liflerinininkilere benzer özelliklere sahip başka malzemeler de vardır ancak, transformasyon verimliliği daha düşüktür [204].

2.3.3.5 Ultrasonikasyon Uygulaması

Daha önce tarif edilen transformasyon yöntemlerinin sınırlamaları, tarımsal bitki hücrelerine ekzojen DNA eklenmesi için daha verimli, daha kolay ve daha güvenli teknikler arayışını teşvik etmiştir [205], [213], [214], [215], [216], [217], [218], [219], [220], [221]. Özellikle en yaygın kullanılan Agrobakteriyum aracılı bitki transformasyonu; hem her bitkiye uygulanamaması hemde Agrobakteriyum'un doğru hücre dokusu ve hücrelerine ulaşamaması sebepleriyle dezavantajlıdır. Açık tohumlu, tek çenekli ve çift çenekli çeşitli bitki gruplarındaki bu problemleri aşmak ve DNA aktarımını arttırmak hedefiyle uygulanan yöntemlerden biri de ultrasonik dalgalardır. Bu yöntem özellikle bitki protoplastlarına gen aktarmak için geliştirilen bir yöntemdir [213], [222], [223].

Sonoporasyon olarak da bilinen bu ultrasonik dalgalar; oluşturduğu akustik kaviteasyon yoluyla hücre zarının geçirgenliğini geçici [224] olarak değiştirerek çeşitli biyoetkiler üretebilmektedir [213], [219], [225], [226]. Düşük frekanslı ultrasonikasyondan (kilohertz), orta frekanslara (klinik şok dalgaları) ve yüksek ultrasonikasyona (megahertz) kadar çok çeşitli koşullarda akustik kaviteasyon kabarcıklarını indükleyebilir. Bu olay, iç bitki dokusunun Agrobakterium'a maruz kalma yoğunluğunu arttırırken,

mikroskopik kanallar üretir; böylece transfer edilen DNA'nın [227] geçici ekspresyon seviyesini arttırmaktadır [219]. Bu sayede DNA gibi makromoleküllerin kolayca [228] hücrelerin içine alınması sağlanır [225], [226], [229]. Ultrasonikasyon, uzaysal ve zamansal özgülük ile hayvan hücrelerinin, in vitro dokuların ve protoplastların transfeksiyon verimini artırır [219]. Ayrıca bu yöntemin mezofil (yaprak) dokuları, kökler, gövdeler, sürgün meristemi, bütün halindeki fideleri, embriyonik süspanse hücreleri, somatik ve zigotik embriyoları ve genç kotiledonlarda transformasyon verimini arttırdığı bilinmektedir [227]. Bu uygulamayla gen aktarılmış birçok transgenik bitki mevcuttur [230], [231], [232], [233], [234]. Ancak, ultrasonikasyonun yol açtığı kavitasyon kabarcıklarının hücreye zarar verebileceği ve zarını tamamen parçalayabileceği bildirilmiştir [219]. Bu nedenle bitki hücrelerinin veya dokularının ultrasonikasyonla güçlendirilmiş transformasyonu hakkında çok az araştırma yapıldığı söylenebilir [219], [235].

Gen aktarımı için kullanılan ultrasonik dalgalar, sulu ortam boyunca yayılan 20 kHz'den daha yüksek frekanslara sahip uzunlamasına basınç dalgaları şeklindedir. Yöntemde, biyolojik etki üreten önemli bir mekanizma iletim, taşınım ve radyasyon yoluyla doku emilimine bağlı olarak hücrelerin ısınmasıyla gerçekleşir [225]. Ortalama biyolojik sıcaklığın birkaç derece üzerinde ısıtılması hücre metabolizmasını artırabilir ve dokunun perfüzyonunu indükleyebilir [236]. Akustik kavitasyon, yani hızlı basınç değişikliği ile üretilen mikroskopik gaz kabarcıklarının büyümesi ve çökmesi bir başka önemli olaydır [237]. Kavitasyon, zarda delikler açabilir veya onu parçalayabilir. Bu olayı etkileyen parametreler sadece yoğunluk, maruz kalma süresi ve merkezi frekans değil, aynı zamanda uygulama tipi (sürekli veya atımlı), atımın tekrarlanma frekansı ve süresidir [238]. Kavitasyon, gaz kütlelerinin varlığına bağlı olduğu için, hücresel bitkiler üzerinde, yani dokularında kanalları veya lifleri olmayan mantar, liken ve yosun gibi lifsiz canlılarda daha etkilidir. Bu uygulamanın yapıldığı bir çalışmada, DNA, tütün ve pancarın protoplastlarına, 500 (0.5 sn) ila 900 (0.9 sn) milisaniye boyunca, 0.5 ila 1.5 W/cm²'de 20 kHz ultrasonikasyon uygulanarak aktarılmış ve geçici genetik ekspresyonda elektroporasyon kullanımından daha iyi bir verimlilik elde edilmiştir [222].

Ultrasonikasyon yönteminde, eksplantlar bir mikro santrifüj tüpünde birkaç mililitre ultrasonikasyon ortamı içinde süspansiyon haline getirilir. Plazmit DNA (ve muhtemelen taşıyıcı DNA) eklenir ve hızlı karıştırmadan sonra numuneler ultrasonikasyon için hazırlanır. Sonrasında, hücreler taze büyüme ortamına aktarılır. Ses, frekans ve maruz kalma süresi, alım verimliliğini belirler [219], [225]. Yapılan diğer çalışmalarda, protoplastların plazmit DNA'nın varlığında 20 kHz ultrasonikasyona kısa bir süre maruz kalmasıyla, şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) ve tütünde (*Nicotiana tabacum* L.) kloramfenikol asetiltransferaz geninin geçici ekspresyonları bildirilmiştir [222]. Yaprak parçalarının ultrasonikasyonu ile tütünün kararlı transformasyonu, protoplast ultrasonikasyonunun kullanılmasına göre 1.5–2 saniyeden daha uzun ultrasonikasyona maruz kalma süresi gerektirmiştir [239]. Ultrasonikasyonun aracılık ettiği bozulmamış doku transformasyonu, patates yumru disklerinde de test edilmiştir [234]. Ultrasonikasyon tekniğinin çoğu, bitki hücrelerinde veya dokularında sonikasyon yardımı ile *Agrobacterium* aracılı transformasyona yöneliktir [227], [240], ve bu yöntem dokuyu *Agrobacterium* varlığında kısa süre ultrasonikasyona maruz bırakan bir tekniktir. Deneyler, *Agrobacterium* aracılı transformasyonun, hedef bitki hücrelerine veya dokularına çok sayıda mikro kanallar açarak *Agrobacterium* enfeksiyonunun etkinliğini büyük ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir [213], [232], [233], [241], [242], [243], [244], [245], [246].

Avantajları:

- * Ultrasonikasyon, teoride bakteriler, mantarlar, bitkiler ve memeli hücreleri dahil olmak üzere herhangi bir hücreye DNA veya RNA iletebilir.
- * Doğrudan fiziksel temas gerektirmeyen, invazif olmayan bir yöntemdir.
- * İn vivo olarak da kullanılabilir.
- * Ultrasonikasyonun uygulama alanına özgü davranmasıdır (ultrasonikasyon, kolayca istenen bir hacimde uygulanabilir).
- * Ultrasonikasyon parametrelerini manipüle etmek kolaydır [179].

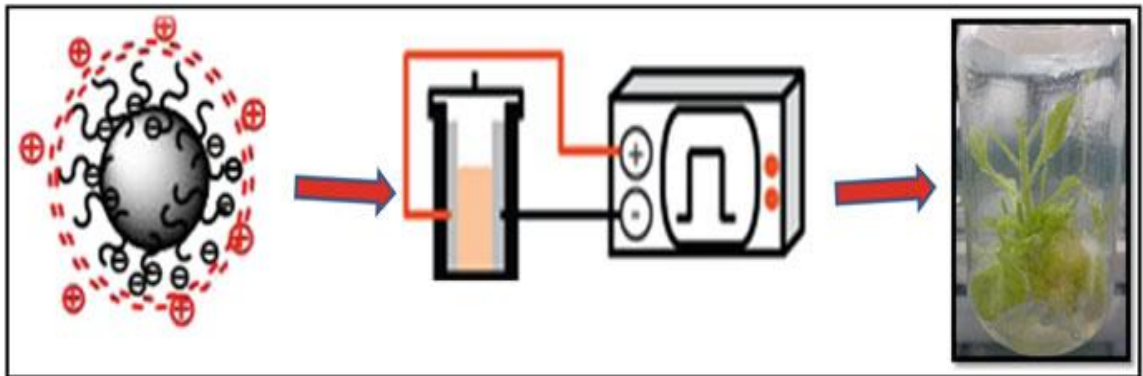
Dezavantaj:

İn vitro ve in vivo olarak kullanılan ultrasonikasyonun transfeksiyon etkinliği nispeten düşük bulunmuştur [179], [247], [248], [249].

2.3.3.6 Nanopartiküller ile Yapılan Gen Aktarım Çalışmaları

Bitkilerdeki geleneksel biyomolekül transfer yöntemleri, düşük verim, tür aralığının darlığı, sınırlı sayıda biyomoleküle uygulanabilmesi ve doku hasarı gibi kritik dezavantajlara sahiptir. Nanoteknolojideki ilerlemeler ise geleneksel metotlardaki sınırlamaların üstesinden gelmek için yeni fırsatlar yaratmıştır: DNA, RNA ve proteinlerin türden bağımsız pasif yollarla aktarılması için NP'lerin geliştirilmesi devam etmektedir [11]. Bu sebepten son yıllarda NP'ler çokça çalışılan bir alan olmuştur (Şekil 2.9).

NP'ler biyolojik membranları geçme, taşıdıkları etken maddeleri dış etkilerden koruma, kontrollü salım ve çok yönlü hedefleme yapma yetenekleri gibi özellikleriyle etken maddelerin hücre içi dağıtımını sağlayan önemli malzemelerdir. Bu özellikler, NP'lerin, memeli sistemlere biyomoleküllerin hedeflenen taşıma ve kontrollü salım çalışmalarında devrim yaratmasını sağlamıştır. Bununla birlikte, bitkilerde hücre duvarının varlığı sorun teşkil etmektedir.



Şekil 2.9 Bitkilerin nano-taşıyıcılar içine alınmış transgenlerle transforme edilmesi [250]

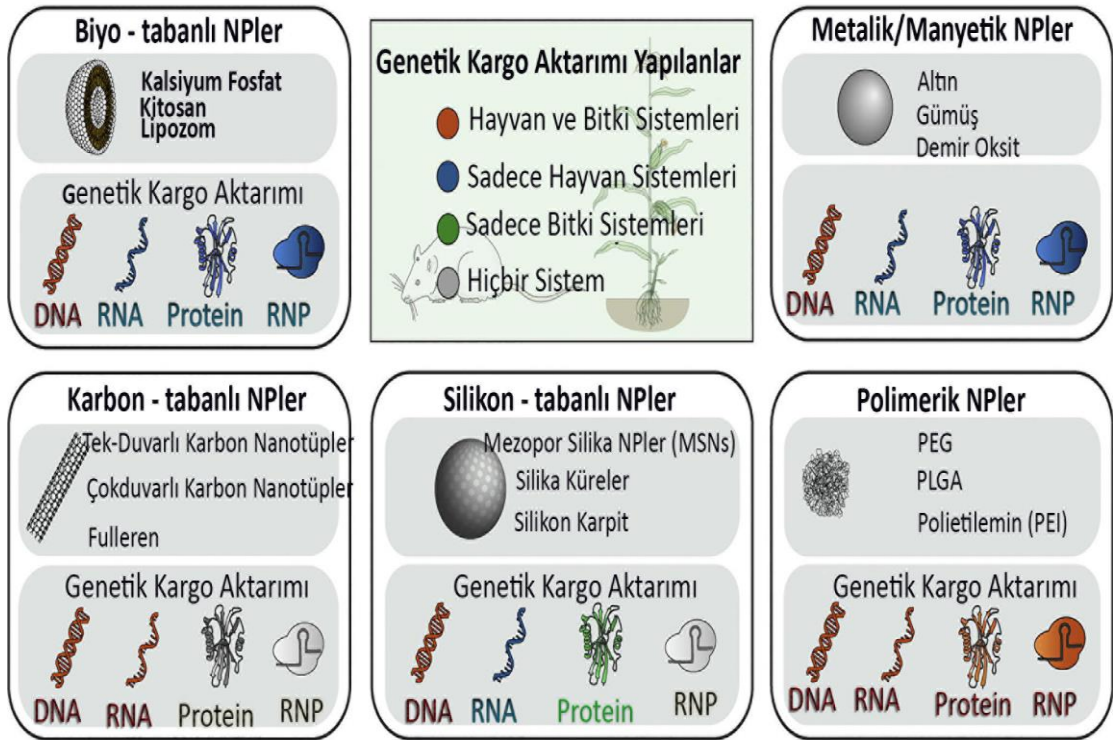
Son yıllarda, DNA'nın memeli sistemlerindeki NP dağıtımı için ortak stratejilerin belirlenip bitkilere adapte edilebileceği fikri ortaya atılmıştır. Bitkilerde, NP'ler ile DNA aktarımı ilk kez 2007'de, Torney ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. İlgili çalışma,

Nicotiana tabacum bitkilerine 100–200 nm boyutlarında altın nanopartikül kaplı Mezoporus Silika NP'lerinin (MSN) biyolistik yolla uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir [251]. Bu çalışmada, bir kimyasal ekspresyon indükleyicisi, altın NP'lerle kovalent olarak kaplanmış olan MSN gözeneklerine (3 nm) yüklenmiştir. Bağlanan MSN'ler daha sonra Green floresans protein (GFP) plazmitleri ile kaplanmış ve gen tabancası ile *N. tabacum* kotiledonlarına verilmiş; burada GFP ekspresyonu, ekspresyon indükleyicisinin ortama eklenmesiyle tetiklenmiştir [251]. Başka bir çalışmada, altın MSN'ler ile DNA ve proteinlerin biyolistik yolla aktarımı gerçekleştirilmiştir. MSN'ler ile GFP ve Cre-rekombinaz genlerinin aktarımının sağlandığı görülmüştür [252].

Birçok dağıtım stratejisi hala bir gen tabancası, elektromanyetik alan veya protoplast PEG transfeksiyonu [252], [253], [254], [255], [256] gerektirir. Çünkü NP yapı/fonksiyonu parametreleri hücre duvarından geçmek için henüz tam olarak optimize edilmemiştir. Bununla birlikte, NP'lerin hücre içine alınmasında mekanik veya kimyasal yardımın gerekli olduğu sistemlerde bile, nano-taşıyıcıların küçük boyutu ve yüksek yüzey alanı hala geleneksel yöntemlere göre üstün performans sunar. Torney ve arkadaşlarının MSN çalışması, protoplastlarda geleneksel PEG-transfeksiyonu için gerekli olan DNA'dan çok daha az DNA ile transgen ekspresyonunu sağlamıştır [251].

Son yıllarda yapılan birkaç çalışmada, bitkilere in vitro (*N. tabacum* protoplastları) [19], [257], [258] ve in vivo (*Arabidopsis thaliana* kökleri) [259], [260] olarak NP aracılı pasif aktarım yapılması alternatif bir yöntem olarak umut vermiştir. Yakın zamanda Demirer ve arkadaşları DNA plazmitleri ve korunmuş siRNA'yı pasif yolla aktarmayı başardıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, kullanılan karbon–nano tüp (KNT) NP'leri ile *Eruca sativa* (roka) yapraklarında ve *Triticum aestivum*'da (buğday) geçici GFP ifadesi gerçekleştirilirken, *Nicotiana benthamiana* yapraklarında yapısal olarak eksprese edilen GFP genlerinin susturulduğu bildirilmiştir [261]. NP aracılı biyomolekül aktarımını optimize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulurken, bu erken sonuçlar, NP'lerin geleneksel yöntemlerin eksikliklerini gideren bir bitki biyomolekül dağıtım platformu olarak daha fazla araştırılması için umut vericidir [11]. Hayvan ve bitki sistemlerinde biyomolekül aktarımı için yaygın olarak kullanılan NP'ler Şekil 2.10'da verilmiştir.

Özetle, NP sistemler ile bitki genetik mühendisliği hayvan sistemlerindeki ilerlemenin gerisinde kalmıştır. Bitki hücre duvarları biyomolekül dağıtım metotlarında, her zaman hücre içi alımda ve bitki genetik transformasyonunda engelleyici bir rol oynamıştır. Bugüne kadar, bitki biyoteknolojisi, bitkilere çeşitli biyomoleküllerin, dış kuvvet yardımı olmadan ve doku hasarına neden olmadan pasif olarak iletilmesini sağlayan yöntemlerden yoksun durumdadır. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda, dağıtım zorluklarını çözmek ve bitki genetik mühendisliğinin faydasını arttırmak için dönüşümsel bir araç yaratılmasında nanoteknoloji, kilit bir faktör olarak görülmektedir.



Şekil 2.10 Hem hayvan hem de bitki sistemlerinde biyomolekül aktarımı için yaygın olarak kullanılan NP'ler; biyo-tabanlı, karbon-tabanlı, silikon-tabanlı, polimerik ve metalik / manyetik olarak beş ana kategoride incelenmektedir. Şekilde bu beş NP tipinin (DNA, RNA, proteinler (rekombinazlar veya nükleazlar) ve ribonükleoprotein (RNP) bitki ve hayvan sistemlerine aktarımlarının görsel bir karşılaştırması sunulmaktadır. NP aracılı aktarımlarda hayvanlarda bitkilerden daha fazla çeşitlilikte genetik kargo kullanıldığı açıktır [11]

MATERYAL VE METOD**3.1 Materyal**

Çalışmada kullanılan *M. sativa* Verco çeşidine ait tohumlar Dr. Satı Uzun'dan (Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi) temin edilmiştir. Kullanılan materyaller (Çizelge 3.1) ile alet ve malzemeler (Çizelge 3.2) aşağıdaki tablolarda belirtilmektedir.

3.1.1 Kullanılan Materyaller

Çizelge 3.1 Çalışmalarda kullanılan materyaller

Kimyasal Malzeme Adı	Üretici Firma ve Ülkesi
Agar	Duchefa, (Haarlem), Hollanda
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri), ABD
2,4-D (2,4- diklorofenoksiasetik asit) (Büyüme düzenleyici)	Duchefa, (Haarlem), Hollanda
Kinetin (Büyüme düzenleyici)	Duchefa, (Haarlem), Hollanda
Murashige ve Skoog besiyeri (MS)	Duchefa, (Haarlem), Hollanda
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck Millipore, Almanya

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Merck Millipore, Almanya
Epoksi resin (EPON) seti	Fluka, Buchs, İsviçre
Etanol (%100)	Merck Millipore, Almanya
Ethidium Bromide (EtBr)	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Floresans izotiyosiyanat izomer I (FITC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri), ABD
Glutaraldehit	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Yüksek erime EEO agarozu (HMA)	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Düşük erime EEO agarozu (LMA)	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Thiazolil mavi tetrazolyum bromür tozu (MTT)	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Poli (laktik-ko-glikolik) asit (PLGA) 50:50, Mw 38.000–54.000 Da	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Propilen oksit (PO)	AppliChem, Darmstadt, Almanya
Polivinil alkol (PVA)	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Sükroz	Duchefa, (Haarlem), Hollanda
Trizma hydrochloride	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD
Triton X-100	Sigma-Aldrich'den (St. Louis, Missouri), ABD

3.1.2 Kullanılan Alet ve Malzemeler

Çizelge 3.2 Çalışmalarda kullanılan cihaz ve malzemeler

Malzeme/Cihaz Adı	Üretici Firma ve Ülkesi
Comet Assay Tanks	MCOM series, Saratoga, ABD
Floresans mikroskopu-FISH	ZEISS Axio Vert.A1, Jena, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Snijders, İsrail
pH metre	Schott CG 840, Hollanda
Terazi	Shimadzu AW 320, Japonya
Ultramikrotom	Ultracut, Reichert-Jung, Viyana, Avusturya
Ultrasonik banyo	Sonorex Digitec, Bandelin, Berlin, Almanya
Ultrasantrifüj	Hitachi GX serisi, Tayland
UV spektrofotometresi	Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan
Vorteks	Nüve-NM 110, Türkiye
Hassas Terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
Hamiltom 10µL Enjektör	Hamilton Messtechnik GmbH, Almanya
İklimlendirme kabini	SANYO MLR-351H, Ora-Gun, Japan
Prob Sonikatör	Bandelin, Sonopuls, Almanya
Taramalı elektron mikroskop (SEM)	HITACHI Regulus 8230 FE- SEM, Tayland
Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z383 K, Almanya
Steril kabin	Hedlab X-Bio Class II, Eskişehir, Türkiye
Ultra Saf Su Sistemi	Simplicity 185-Millipore, ABD
Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM)	JEOL JEM-1220, Tokyo- Japan
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm aleti	MalvernZetasizer-NanoS, Cambridge, İngiltere

3.2 Metod

3.2.1 *Medicago sativa*'nın Süspansiyon Kültürünün Oluşturulması

3.2.1.1 Tohumların Sterilizasyonu ve Çimlendirme:

Aseptik sürgünlerin eldesi için tohumların yüzey sterilizasyonu şu şekilde yapıldı; yonca tohumları %50'lik ticari çamaşır suyuna (%5'lik sodyum hipoklorit içeren) Polisorbat (Tween 20- 3-5 damla) damlatılarak 30 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra tohumlar 3 kez 5'er dk steril distile su ile yıkanarak çamaşır suyundan arındırıldı. Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar Murashige ve Skoog (1962)'de geliştirdiği besin ortamı (MS) içeren magentalara her birinde 25-30 tane olacak şekilde ekimi yapıldı. Doku kültürü çalışmaları sırasında yapılan tüm işlemler, hava akımlı steril kabinde (Hedlab X-Bio Class II) gerçekleştirildi. Çalışmalarda 8g/l agar +30 g/l sükröz içeren MS temel besiyeri kullanıldı. Besin ortamlarının hazırlığında deiyonize saf su kullanılmış ve ortamların pH'sı 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra otoklavda 1.2 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dk tutularak sterilizasyon işlemi yapıldı. Kültürler 25°C'de karanlıkta iklimlendirme kabininde (SANYO MLR-351H) inkübe edildi.

3.2.1.2 Kallus Kültürlerinin Oluşturulması:

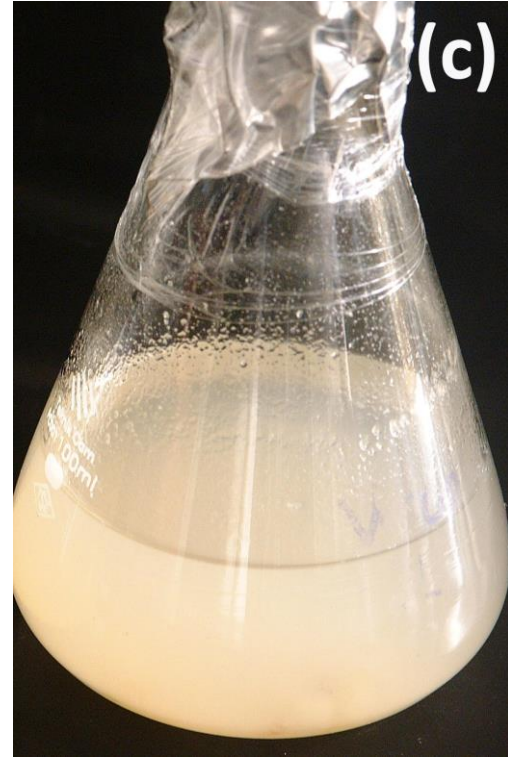
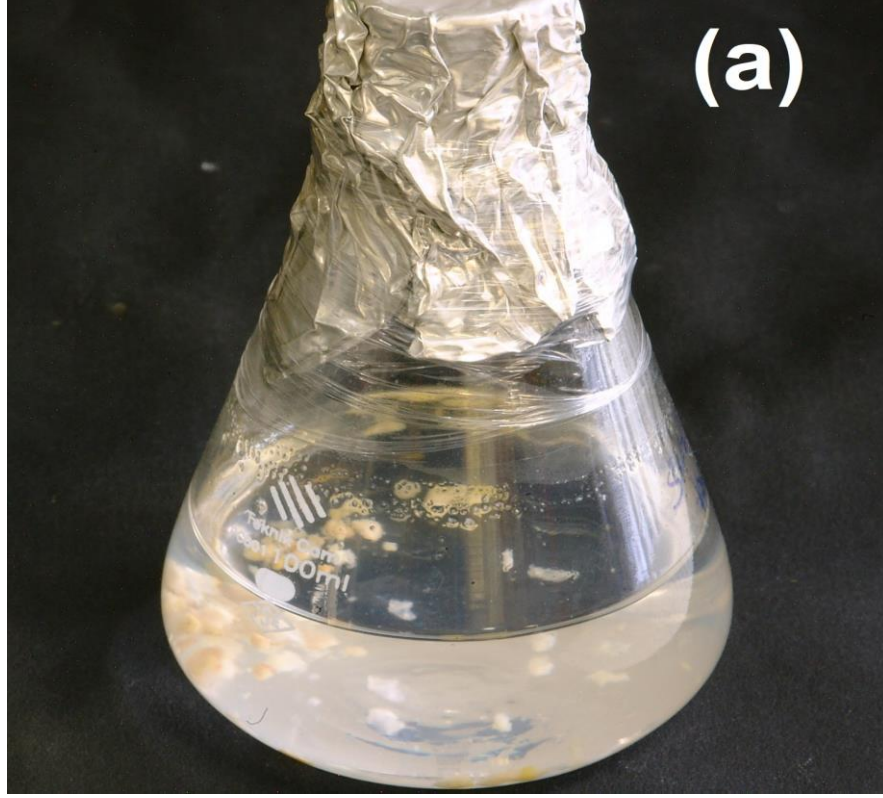
Çimlenme sonrası 7-10 günlük aseptik yonca fidelerine ait hipokotil kısımları eksplant olarak kullanıldı. Hipokotiller yaklaşık 0,5 cm boyutlarında steril bistüri ile kesilerek, kallus oluşumunu indüklemek üzere 3 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l Kinetin içeren MS besin ortamına aktarıldı. Kültür başlangıcından 4 hafta sonra gelişen kalluslar hücre kültürlerinin kurulmasında eksplant kaynağı olarak kullanıldı (Şekil 3. 1).



Şekil 3.1 Yonca hipokotil eksplantından gelişen kalluslar

3.2.1.3 Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması

Hücre öncü süspansiyon kültürünün oluşturulması için gelişen kalluslardan başlangıç için 1'er gram steril koşullarda nazıkçe küçük parçalara ayrıldı (Şekil 3.2 a). Ayrılan kallus dokusu 4 mg/l 2-4 D içeren 50 ml sıvı MS besin ortamı bulunan 100 ml erlenlere aktarıldı. Kültürler 24°C karanlıkta 110 rpm de karıştırıcılı inkübatörde kültüre alınarak başlangıç öncü kültürü elde edildi (Şekil 3.2 b). 4 hafta sonunda, 6-7 gün arayla alt kültürlemeleri yapıldı. Alt kültürleme 10 ml öncü kültüre, 30 ml taze kültür ortamı eklenerek gerçekleştirildi. Çalışmalarda alt kültürlerden elde edilen hücre süspansiyon kültürleri kullanıldı (Şekil 3.2 c).



Şekil 3.2 Yonca kalluslarından oluşturulan hücre süspansiyon kültürleri a) Hücre süspansiyon kültürlerinin kurulması, b) 4 haftalık öncü kültür, c) Alt kültürden elde edilen 6 günlük hücre süspansiyon kültürleri

3.2.2 FITC Yüklü PLGA NP'lerin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.2.2.1 Nanopartiküllerin hazırlanması

Tez çalışmamızda, NP'lerin sentezi PLGA polimeri kullanılarak Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Tekniği ile üretilmiştir. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi nano ve mikropartiküllerin oluşturulması için sıkça kullanılan yöntemlerden biridir. Polimer diklorometan (DCM), kloroform veya etil asetat gibi bir organik çözücü içerisinde çözülür ve polivinil alkol (PVA) gibi yüzey aktif madde kullanılarak su içinde yağ (o/w) emülsiyonu oluşturulur. Sabit emülsiyonun oluşturulmasından sonra, basınç altında sıcaklığın artırılmasıyla organik çözücü buharlaştırılır. Bu işlemin etkisi nanopartikülün özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çoğu zaman, yüzey aktif maddeler, suda çözünmeyen polimerlerin agregasyon ve/veya çökmesini önleyerek NP'leri sulu çözeltide stabilize etmek için kullanılmaktadırlar [262].

İlk olarak, sentez için 50 mg PLGA polimeri ve 3 mg FITC 1,5 ml DCM içerisinde çözüldü. Elde edilen çözelti 4 ml %3'lük PVA içerisine damla damla eklendi ve 2 dk %80 güç uygulaması ile ultrasonikasyona tabi tutularak tekli emülsiyonlar elde edildi (Şekil 3.3). Daha sonra NP çözeltisi 35 ml %0,1'lik PVA çözeltisine damla damla eklenerek (Şekil 3.4) gece boyunca 500 rpmde manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırıldı ve organik çözücü uçuruldu (Şekil 3.5).

Organik çözücü uçurulduktan sonra NP'ler santrifüj ile 9000 rpmde 40 dk santrifüj edildi, ardından 30'ar mL dH₂O ile aşağıda belirtilen şekilde 3 kez yıkandı.

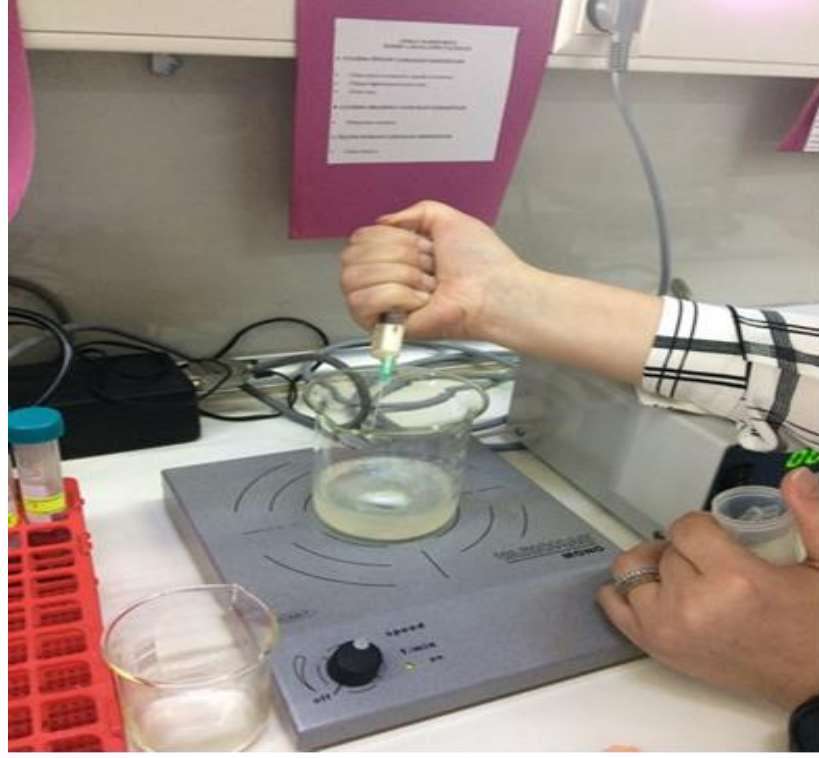
Yıkama İşlemi

- Önce 35 ml örnek santrifüj edildi → 40 dk 9000 rpm 4 C de.
- Süpernatant ayrıldı, 35 ml distile su eklendi → 30 dk 9000 rpm 4 C de.
- Süpernatant ayrıldı, 35 ml distile su eklendi → 30 dk 9000 rpm 4 C de.
- Süpernatant ayrıldı, 35 ml distile su eklendi → 30 dk 9000 rpm 4 C de.

Elde edilen NP'ler liyofilizasyon ile kurutuldu. Sonra kurutulmuş örnekler +4 °C' de saklanarak muhafaza edildi.



Şekil 3.3 Prob sonikatör kullanılarak PLGA NP sentezlenmesi



Şekil 3.4 Nanopartikül çözeltisinin PVA çözeltisine damla damla eklenmesi



Şekil 3.5 NP'lerin 500 rpm' de (gece boyu) manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılması

3.2.3 SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) Analizi

Çalışmada, NP'lerin morfolojik incelemesi için HITACHI Regulus 8230 FE- SEM model taramalı elektron mikroskobu kullanıldı. Liyofilize NP'ler, çift taraflı karbon bant kullanılarak alüminyum bir stub üzerine monte edildi. Numuneler daha sonra bir püskürtmeli kaplayıcı kullanılarak 10 nm kalınlığında bir altın + paladyum film ile kaplandı. Kaplanmış numuneler, 3 kV 100.000 büyütme ile analiz edilerek görüntüledi. SEM görüntülemesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ARUM) hizmet alımıyla gerçekleştirildi.

3.2.4 Hücre Canlılığı (MTT Protokolü)

Ultrasonikasyon'un hücre canlılığına etkisi ve PLGA NP ile sonike edilen hücrelerin canlılık testi MTT protokolü kullanılarak belirlendi. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA plate okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır [263]. Süpernatant plateler içine yerleştirilir ve daha sonra spektrofotometrede 570 nm'de absorbans değerleri belirlenir.

Ultrasonikasyonun hücre canlılığına etkisini belirlemek için; 5-6 günlük süspansiyon hücre kültürleri 25 ° C'de 35 kHz frekans ve 60-120 W (Bandelin elektronik, RK 52 H, Berlin, Almanya) ile 1, 3, 5, 7, 9 dk ultrasonikasyona maruz bırakıldı. PLGA NP'lerin hücre canlılığına etkisini tespit etmek için; hücre süspansiyon kültürlerine 15 mg l⁻¹ PLGA NP ilave edilerek 1 ve 3 dk boyunca ultrasonik bir banyoda, 35 kHz frekans ve 25 ° C'de 60-120 W (Sonorex Digitec, Bandelin, Berlin, Almanya) ultrasonikasyona tabi tutuldu 0, 30, 60 dk inkübe edildi. Hücrelerin canlılığını belirlemek için kullanılan MTT protokolü aşağıda verilmiştir [264].

MTT protokolü;

- MTT stok; 50 mg MTT toz boya 10 ml 50 mM'lık PBS'de çözülerek hazırlandı.

1'er ml yonca hücre süspansiyonu ($\sim 1.5 \times 10^5$) mikro santrifüj tüplerine aktarıldı ve hücre kültürü örnekleri 1, 3, 5, 7 ve 9 dk boyunca sonike edildi.



Hücreler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.



Her tüpe, 100 ul 5 mg / ml MTT eklendi ve 24 ° C'de 2 saat karanlıkta bir çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.



Tüpler tekrar 5 dk boyunca 3000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.



200 ul DMSO ile yeniden süspense edildi ve 10 dk boyunca inkübe edildi.
Hücre canlılığı absorban ölçümleri ile [265] değerlendirildi.

Süpernatant 96 kuyucuklu mikrolakalara 3 tekrarlı olarak yerleştirildi ve daha sonra 570 nm'de mikrolaka okuyucu (Shimadzu, UV-1800) ile absorban değerleri tespit edildi.

Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak yüzde (%) olarak hesaplandı.

Hücre canlılığı: (Numune optik yoğunluğu / kontrol optik yoğunluğu) * 100.

3.2.5 *M. sativa* Hücrelerinde PLGA NP'lerin Alımı ve Dağılımı

FITC yüklü PLGA NP'leri, 15 mg l⁻¹lik konsantrasyonda 5-6 günlük süspansiyon hücre kültür ortamına doğrudan ilave edildi. Hücre süspansiyonları 3'er tekerrürlü olarak mikro santrifüj tüplerine 1'er ml olarak eklendi. Kültürler, 1 veya 3 dk boyunca

ultrasonik bir banyoda, 35 kHz frekans ve 25 ° C'de 60-120 W (Sonorex Digitec, Bandelin, Berlin, Almanya) ile ultrasonikasyona tabi tutuldu. Kùltürler, 2000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatantları dikkatli pipetajlama ile uzaklaştırıldı, sonra MS ortamı ile yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Hücreler gözlemlenmek üzere MS ortamında yeniden süspansiyon edildi.

Elde edilen hücre süspansiyonu, NP'lerin hücreye girişi ve dağılımının görselleştirilmesi için 0, 30, 60 dk ve 24 saat sonra lamlara yerleştirildi. Analiz için floresans-FISH (ZEISS Axio Vert.A1, Jena, Almanya) altında (490-525 nm) fotoğrafları çekilip, hücre içine alımı ve dağılımı gözlemlendi. NP'lerin hücreye girişi yüzde (%) olarak hesaplandı.

Hücreye giriş % 'si = floresans işaretli hücre sayısı / toplam hücre sayısı) * 100.

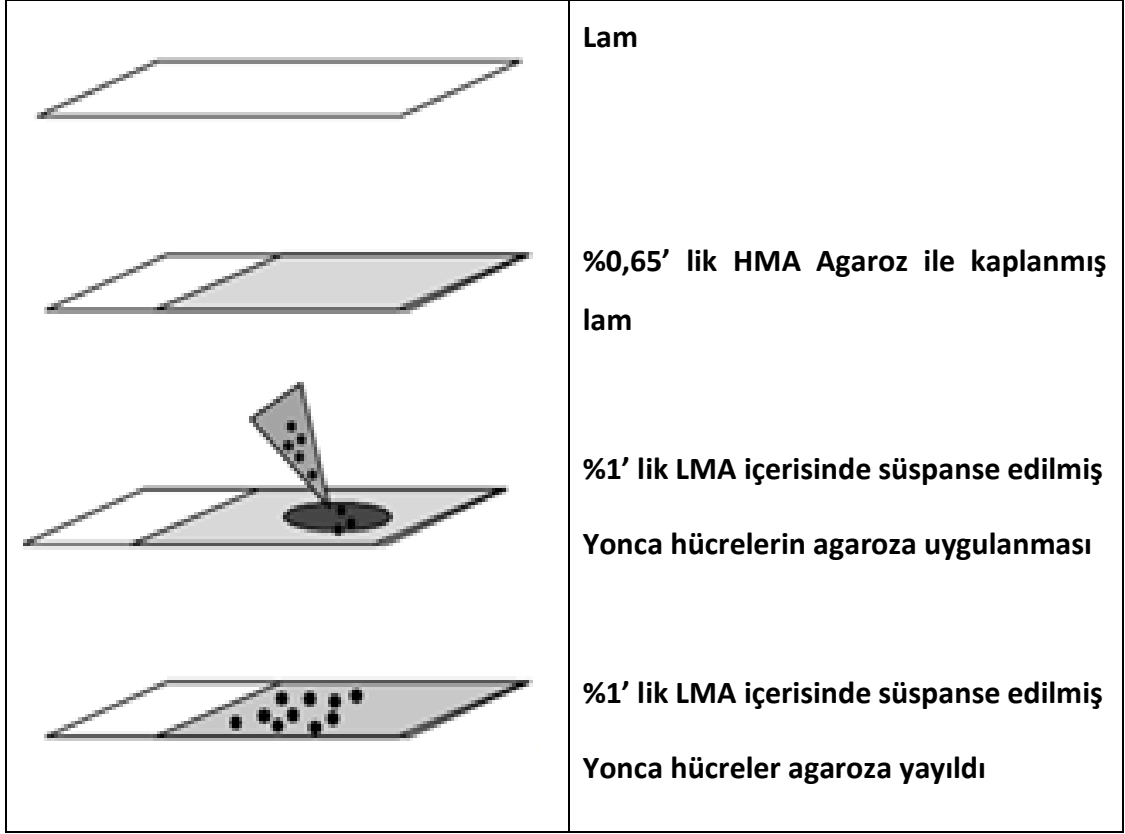
3.2.6 Hücre Genotoksitesi (Comet Protokolü)

Comet testi tek tip hücrelerde meydana gelen DNA ipliği hasarını ölçer [266]. Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) veya mikrojel elektroforez (MGE) testi olarak da adlandırılır.

Comet Protokolü Hazırlıkları

Çalışmamızda ilk olarak, 15 mg l⁻¹ PLGA NP konsantrasyonu içeren hücre kùltürleri 3 dk ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak 60 dk inkübe edildi. Daha sonra süspansiyon hücreleri mikro santrifüj tüplerine alındı. Hücreler sıvı nitrojen içinde donduruldu ve dikkatlice ezilerek hücreler parçalandı haline getirildi.

Deneyde kullanılacak lamlar, mikrodalgada 100 ml dH₂O içinde çözülmüş 0.65 g yüksek erime noktalı agaroz (HMA) içine daldırılarak kaplandı. Sonraki aşamada, 200 µl hafifçe ezilmiş hücre süspansiyonundan ile 200 µl düşük erime noktasına sahip agaroz (LMA-%1) ile karıştırıldı. Donmadan karıştırılan LMA-hücre süspansiyonu Şekil 3.6 'da görüldüğü gibi, HMA ile kaplanmış lamlara yayıldı ve 24X60'lık lamelle kapatılarak +4 °C'de donması sağlandı. Agarozlar Çizelge 3.3'deki gibi hazırlandı.



Şekil 3.6 Comet deneyi için agarozlu lamların hazırlanışı ve hücrelerin gömülmesi [267]

Çizelge 3.3 Yüksek ve düşük erime dereceli agarozların içerik ve hazırlanışları

	İçerik	Hazırlanışı
Yüksek erime noktalı agaroz (HMA)	0,65 g + 100 ml dH ₂ O	0,65 g HMA 100 ml dH ₂ O içerisinde mikrodalga fırında çözünmesi sağlanır. Lamlar bu agarozla kaplanır.
Düşük erime noktalı agaroz (LMA)	1 g + 100 ml PBS	1 g LMA 100 ml PBS içerisinde mikrodalga fırında çözünmesi sağlanır. Sonra kullanılabildiği kadar 37 °C de bekletilir.

Lamlar daha sonra oda sıcaklığında 20 dk boyunca yüksek tuzda (2.5 M NaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 10, 100 mM EDTA) lizis çözeltisinde lizise (Çizelge 3.4) maruz bırakıldı.

Çizelge 3.4 Lizis çözelti içeriği

	İçerik (1000 ml)	Hazırlanışı	
Lizis çözeltisi	Stok	2,5 M NaCl 146,1 g 100 mM EDTA 37,2 g 10 mM Tris baz 1,2 g	İçerik 700 ml dH ₂ O ile karıştırılır. 10 M'lık NaOH ile çözeltinin pH'ı 10 olarak ayarlanır. dH ₂ O ile 890 ml ye tamamlanır. +4 °C'de kullanılıncaya kadar bekletilir.
	Çalışma çözeltisi	890 ml stok solüsyonu 100 ml Dimetil sülfoksit (DMSO) 10ml Triton-X	İçerik karıştırılarak, yarım saat buzdolabında bekletilir. Her deneyde taze olarak hazırlanır.

Elektroforez tamponu (Çizelge 3.5: 10 M NaOH, 200 mM EDTA) içine lamelleri kaldırılmış lamalar daldırıldı ve 5-10 dk bekletildi. Ardından Comet tankı elektroforez tamponu ile dolduruldu ve +4 °C'de 300 mA bir akımla 24 V (~ 0.74 V / cm) koşullarında 30 dk elektroforez gerçekleştirildi. Böylece muhtemel DNA kırıklarının göç etmesi sağlandı.

Çizelge 3.5 Elektroforez tampon içeriği

		İçerik	Hazırlanışı
Elektroforez çözeltisi	Stok	10 N NaOH 200 mM EDTA	400 g NaOH 1000 ml dH ₂ O içinde çözülür. 14,89 g EDTA 200 ml dH ₂ O ile çözülür.
	Çalışma çözeltisi	30 ml 10 M NaOH (stok) 5 ml 200 mM EDTA (stok)	İçerik karıştırılarak, 1000 ml dH ₂ O ile tamamlanır. pH> 13 olacak şekilde ayarlanır. Her deneyde taze olarak hazırlanır.

Lamlar yavaşça tampingden çıkarıldı ve bir deşarj tepsinine yerleştirildi. Lamlar nötralizasyon (Çizelge 3.6) sıvısında (1 şale = 75 ml) en az 15 dk bekletildi. Son aşamada, lamlar 80µL 1X Ethidium Bromid ile boyandı (Çizelge 3.7), 5 dk beklemeye bırakıldı ve sonra fazla boyayı gidermek için soğuk distile suya daldırıldı [268]. Sonrasında floresans mikroskopta görüntülemesi yapıldı. Comet deneyinin tüm aşamaları gün ışığında, floresans görüntüleme ise karanlık odada gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6 Nötralizasyon sıvısı

Nötralizasyon Çözeltisi	Çalışma çözeltisi	0,4 M Tris – HCL 63,04 g	İçerik karıştırılarak az miktarda dH ₂ O ile çözülür. pH: 7,5 olarak ayarlanır ve su 1000 ml ye tamamlanır.
----------------------------	--------------------------	-----------------------------	--

Çizelge 3.7 Lamları boyama çözeltisi

		İçerik	Hazırlanışı
Boyama çözeltisi	Stok (10X)	200 mg EtBr (Etidyum Bromür) 1000 ml distile su	200 mg EtBr 1000 ml distile su içinde çözünür. Çözelti +4 °C'de karanlıkta saklanır.
	Çalışma çözeltisi	200 ml stok EtBr çözeltisi	Görüntülenecek her lam 80µL 1X EtBr ile boyanır.

3.2.7 TEM (Geçirimli Elektron Mikroskop) Analizi

TEM örnek hazırlanması için Bancroft ve ark. [269] tarafından uygulanan yöntemden faydalanılmıştır.

TEM analizinde fiksasyon ve takip işlemleri için, hayvan hücrelerindeki uygulama minör revizyonlarla bitki hücrelerine uygulanarak, sonuç alınmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerine 15 mg l⁻¹ PLGA NP ilave edilerek 3 dk boyunca ultrasonik bir banyoda, 35 kHz frekans ve 25 ° C'de 60-120 W ultrasonikasyona tabi tutuldu 60 dk inkübe edildi. 1 ml hücre kültürü mikro santrifüj tüplerine eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüje tabi tutuldu. Santrifüjlenmiş hücreler 1 saat boyunca %3 glutaraldehit 0,1M PBS tampon içinde fikse edildi. Daha sonra minimum 0.5 ml %15 sulu BSA eklendikten sonra 1 saat bekletildi. Süspansiyon üzerine BSA miktarına eşit hacimde glutaraldehit fiksatifi ilave edildi (2-24 saat katılaştırıldı). Katılaştıran örnekler çıkarıldı ve küçük parçalara ayrıldı. Numuneler daha sonra osmiyum tetroksit içinde post fikse edildi. Bu işlemlerden sonra, numuneler dereceli bir etanol ve propilen oksit serisinde geçirilerek suyu uzaklaştırıldı ve şeffaflaştırıldı. Sonrasında Epoksi Reçinesine (EPON) gömme işlemi yapılarak, ultramikrotom ile ince kesitleri alındı. Alınan kesitler gridlere konularak Uranil asetat, ardından Kurşun Sitrata ile TEM için kontrastlama yapılarak görüntülemesi yapıldı. Tüm TEM analizi işlem basamakları ayrıntılı olarak aşağıda verilmiştir.

TEM İÇİN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

Stok hazırlıkları:

%15 BSA stok hazırlığı: 0,75 g BSA + 50 ml dH₂O (steril)

%25'lik stok Glutaraldehitden %3'lük 100 ml fiksatif hazırlanması: 12 ml glutaraldehit + 88 ml 0,1M PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi) pH:7,4

Örneklerin Hazırlanması

İlk Fiksasyon

- 1ml örnek mikro santrifüj tüpüne alındı santrifüj yapıldı; 2000 rpm → 5 dk
- Süpernatant atıldı → minimum 1 saat 22 °C'de glutaraldehitte bekletildi.
- Dikkatlice santrifüj yapıldı, süpernatant atıldı.
- 2 defa PBS'de 10 – 15 dk yıkandı.
- 0,5 ml %15'lik BSA çözeltisinde minimum 1 saat bekletildi.
- Santrifüj sonrası süpernatantın bir kısmı atıldı (hepsi atılmaz) en az 1ml kalması sağlandı.
- BSA'lı pellete eşit miktarda glutaraldehit eklendi → katılaşıncaya kadar beklenir (2 – 24 saat).
- Sonrasında katılaştıran örnekler plastik tüp kesilerek alındı ve 2 defa PBS de 10 – 15 dk yıkandı.

Post Fiksasyon

- %1 'lik Osmiyum Tetroksit (O₃O₄) de 1 saat postfiksasyon yapıldı; 1 ml örnek + 6 ml O₃O₄.
- 2 defa PBS tamponun da yıkandı; 1 ml örnek + 10 ml PBS. 1.yıkama → 30 dk, 2.yıkama → 25 dk.
- Fikse olmuş örnekler %30, %50 ve %70'lik alkol (2 defa) serilerinden 25'er dk süre ile geçirilerek suyu uzaklaştırıldı (dehidrasyon). Son seride saklama (1 gece) yapıldı.

Dehidrasyon, Şeffaflaştırma İşlemi

- Bir gece saklanan örnekler %80, %90, %96, %100 alkol (2 defa) serilerinde 20'şer dk bekletildi ve dehidratasyon işlemi tamamlandı.
- Daha sonra şeffaflaştırma yapıldı; önce %100 alkol + Propilen oksit (PO) (1:1) 25 dk, sonra PO 'da 15 dk bekletildi.

EPON'a Gömme İşlemi

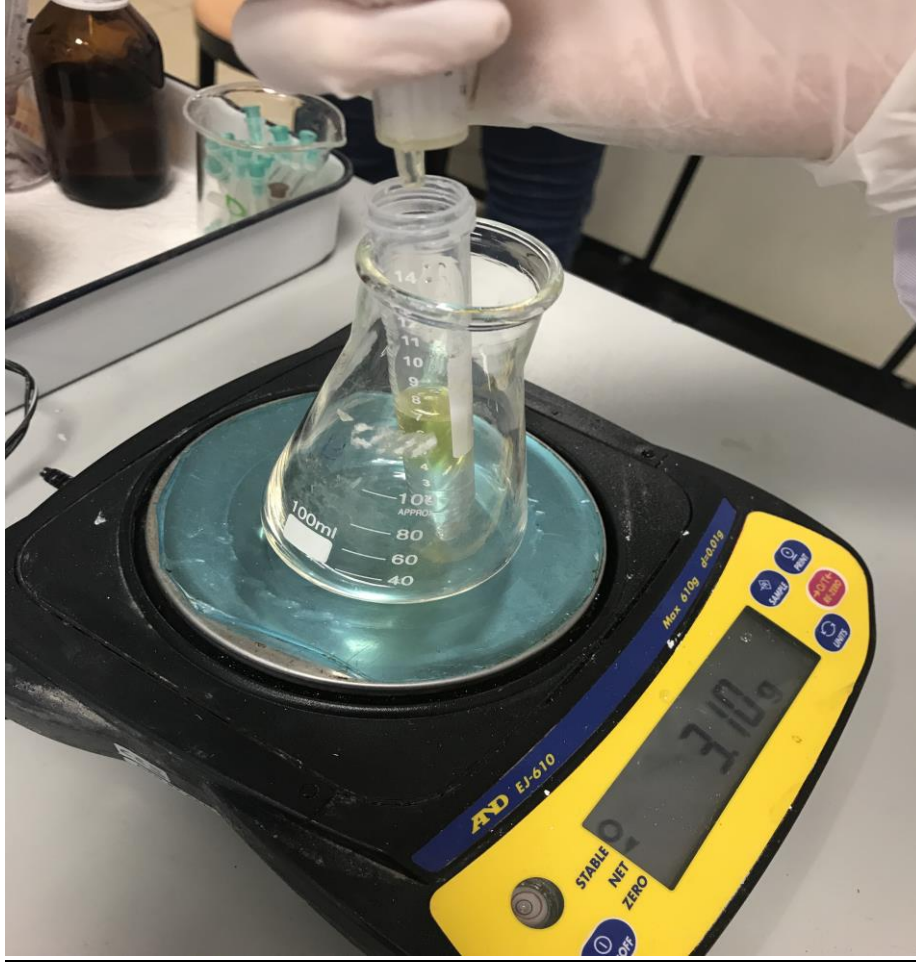
İlk olarak Çizelge 3.8'deki içeriğe göre kimyasallar eklenerek EPON (10 ml) hazırlandı (Şekil 3.7).

Çizelge 3.8 EPON hazırlama içeriği

Çözelti	Açıklama	Miktar
EPON 812	Epoksi gömme ortamı	4.55 ml
DDSA	Dodecenly succinic anhydride / sertleştirici	3.10 ml
MNA	Methyl nadic anhydride / sertleştirici	2.35 ml
DMP30	2,4,6 Tris (Dimethylaminomethyl) phenol / hızlandırıcı	0.20 ml

EPON'a gömme işlemi aşağıdaki basamaklara göre yapıldı.

- 2 ml PO + 1 ml EPON örneklerin üzerine eklendi ve 1 saat beklendi.
- 1 ml PO + 1 ml EPON (yoğun olduğu için 4000 rpm de 8 dk karıştırılıp kullanıldı) 1,5 saat bekletildi.
- 1 ml PO + 2 ml EPON yoğun olduğundan bütün gece (Rotorda) yavaşça karıştırılarak 1 gece bekletildi (1-4 saat veya 1 gece).
- Ertesi gün sadece EPON' a gömülür 1 gece (Rotorda) beklendi.
- Sonra EPON'lu örnekler kalıplara alındı ve 60 °C'deki etüvde 24 saat bekletildi.

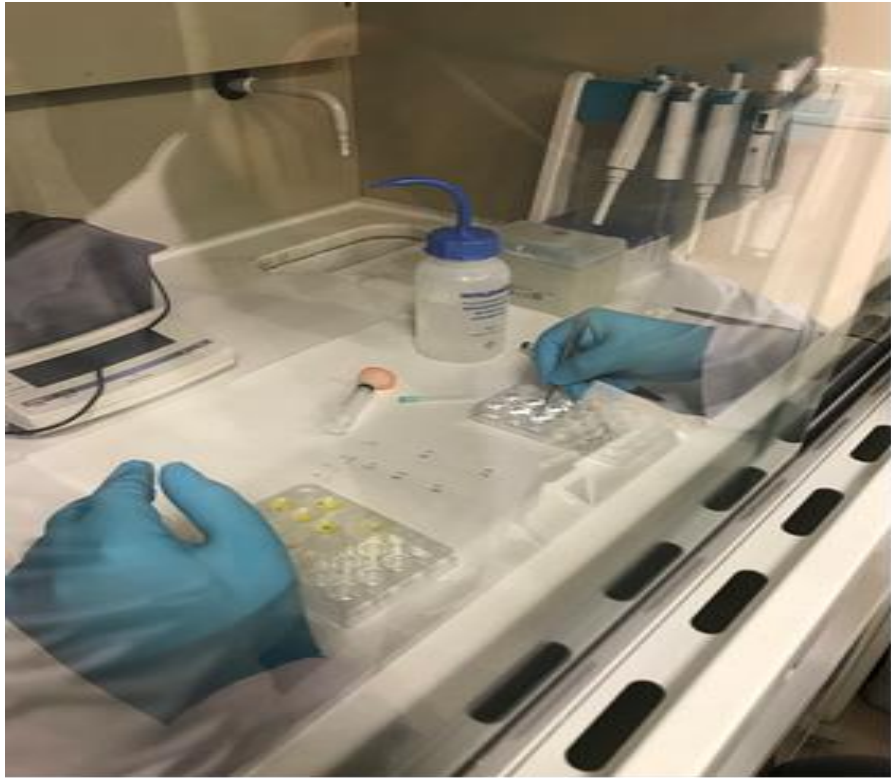


Şekil 3.7 EPON'un hazırlanışı

EPON içine gömülen örnekler elmas bıçağı ile donatılmış ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Wien, Avusturya) ile ince kesitleri alındı (Şekil 3.8). Sonra gridlere alınan örnekler; uranil asetat ile 20 dk (karanlık) kontrastlandı ve sonra yıkanıp (30dk) kurutuldu. Hemen sonra kurşun sitrat ile 5 dk ile kontrastlandıktan sonra yıkanıp (30dk) kurutuldu (Şekil 3.9). Kesitler 120 kV altında çalışan TEM (JEOL JEM-1220, Tokyo-Japan) ile görüntülerek ultramikrograflar elde edildi. TEM ince kesit alımı, kontrastlama ve görüntüleme işlemleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ARUM) hizmet alımıyla gerçekleştirildi.



Şekil 3.8 EPON'a gömülü örneklerden ince kesitlerin alınması



Şekil 3.9 Kesitlerin uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanması

3.2.8 Data Analizi

Her uygulama üç tekerrürlü yapıldı ve tüm işlemler ikişer kere tekrar edildi. MTT testi ile PLGA hücrel alınıma ait verilere istatistiksel analizler yapıldı. Veriler arasındaki farklılıklar ($p < 0,05$ düzeyinde) varyans analizi (ANOVA) ile tespit edildi. Farklılıklar arasındaki önem düzeylerini belirlemek için Duncan testi yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda T-testi kullanıldı. İstatistiksel analizlerde SPSS for Windows 15.0 programı kullanıldı.

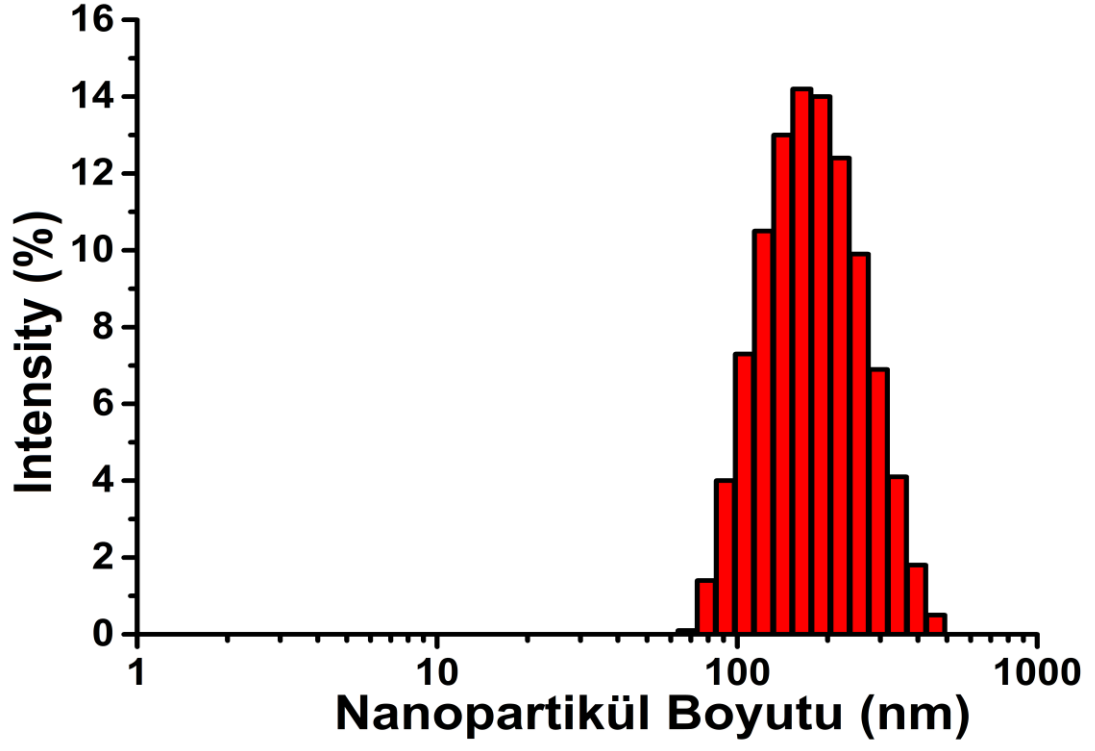
SONUÇ VE ÖNERİLER

4. Sonuçlar

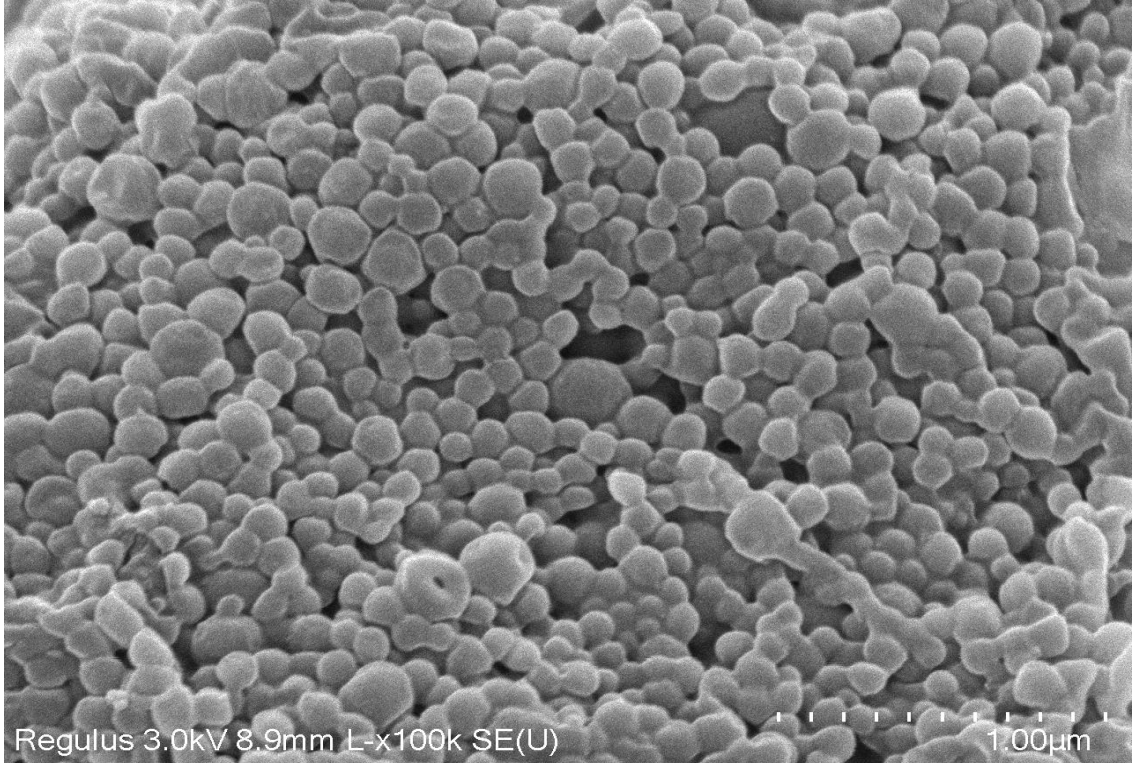
4.1 FITC Yüklü PLGA NP'lerinin Karakterizasyonu

FITC yüklü PLGA NP'lerinin hazırlanmasında tekli-emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanıldı. NP'lerin parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli ve çoklu dağılım indeksi analizi foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak ölçümlendi. Parçacık büyüklüğü dağılımı Şekil 4.1 gösterildi. Sentezlenen NP'lerin boyutlarının 60-500 nm arasında değiştiği saptandı. Ayrıca parçacıkların zeta potansiyeli -24 mV olarak ölçüldü.

NP'lerin morfolojik analizleri SEM kullanılarak yapıldı (Şekil 4.2). SEM görüntüleri, NP'lerin küresel ve pürüzsüz morfolojiye sahip olduğunu gösterdi. Üretilen NP'lerin SEM sonuçları dinamik ışık saçılması yöntemi ile elde edilen boyut sonuçları ile örtüşmekte olup partiküllerin monodisperse boyut dağılımında olduğu SEM sonucunda görüldü. NP'lerin karakteristik özelliklerinin aynı sentez yöntemini kullanan diğer çalışmalarla [270], [271] uyumlu olduğu tespit edildi



Şekil 4.1 Sentezlenen NP'lere ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği



Şekil 4.2 Üretilen NP'lere ait 100.000x SEM görüntüsü

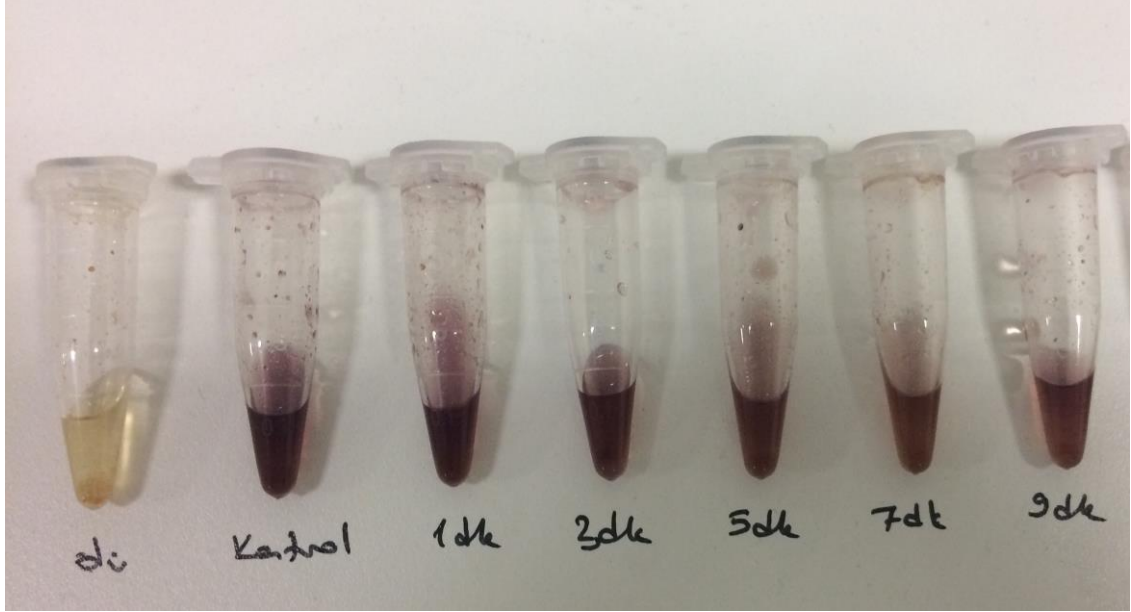
4.2 Hücre Canlılığı

Düşük ultrasonikasyon seviyeleri, bitki hücreleri üzerinde çeşitli mekanik ve biyolojik etkilere yol açabilir ve bu, bitki biyoteknolojisine uygulanabilir [256]. Ancak ultrasonikasyonun yol açtığı kavitasyon kabarcıklarının hücreye zarar verebileceği ve zararını tamamen parçalayabileceği bildirilmiştir [235]. Bu nedenle, çalışmanın birinci bölümünde farklı ultrasonikasyon zamanlarının (1, 3, 5, 7 ve 9 dk) hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4.3).

Sonuçlar, ultrasonikasyon süresinin hücre canlılığına etkisinin anlamlı farklılıklara yol açtığını gösterdi ($p < 0.01$). Ultrasonikasyon süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığı tespit edildi. Kontrol ile 1 ve 3 dk'lık ultrasonikasyon uygulamalarında yonca hücre süspansiyon kültürü üzerinde benzer etkilere sahip olduğu ve 1 ve 3 dk sonikasyonda diğer uygulamalardan daha yüksek hücre canlılığı elde edildiği belirlendi.

Ultrasonikasyon uygulamaları sonrası hücre canlılıkları sırasıyla 1 dk için %92.05 iken, 3 dk için %89.80 olarak tespit edildi. Bununla beraber, daha uzun süreli ultrasonikasyon uygulamalarında hücre canlılıkları ise sırasıyla 5 dk için %46.80, 7 dk için %33.80 ve 9 dk için %25.71 olarak hesaplandı (Çizelge 4.1).

Hücre canlılığının ultrasonikasyon süresi arttıkça belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlendi. 3 dk'dan fazla ultrasonikasyonlarda hücre yaşayabilirliğinin çarpıcı bir şekilde azaldığı belirlendi. 7 ila 9 dk'lık ultrasonikasyon uygulaması sonucunda hücre hasarı ~%70-80 arasında tespit edildi. Bu sonuçlara göre, en ideal ultrasonikasyon süreleri 1 dk ve 3 dk olarak belirlendi (Şekil 4.4). Sonuçlar, 1 ila 3 dk'lık ultrasonikasyonun düşük hücre hasarı ile NP işaretlenmesini kolaylaştırabileceğini gösterdi.

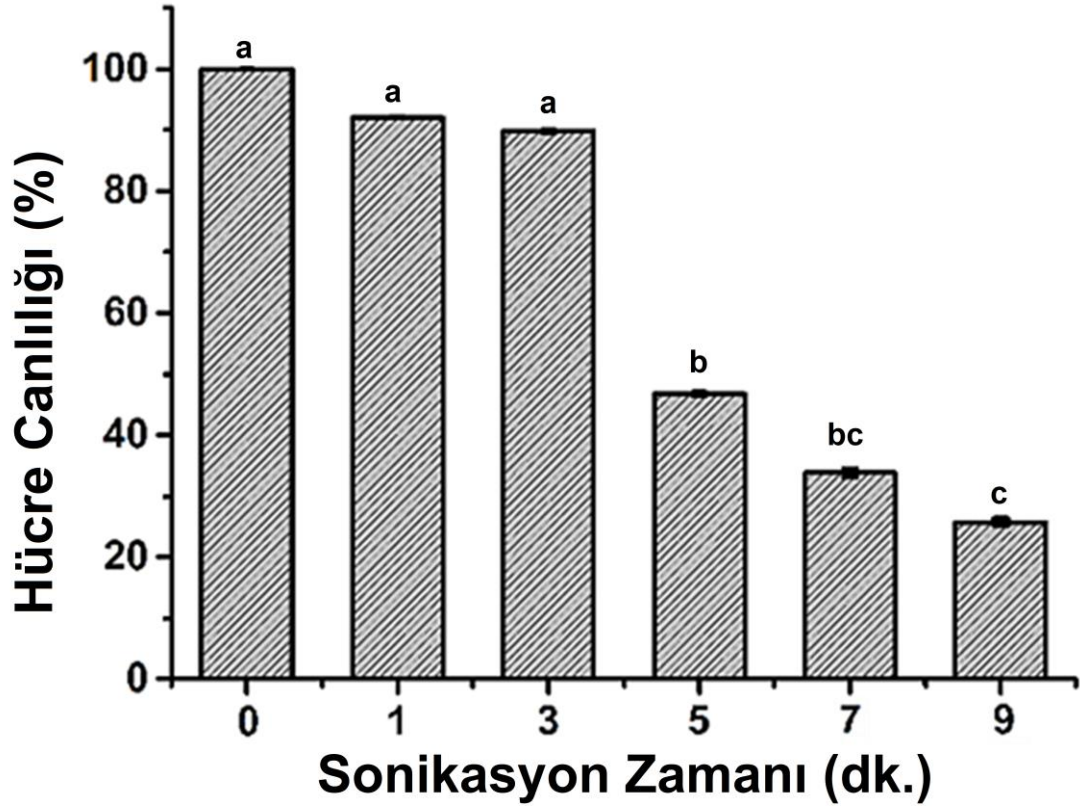


Şekil 4.3 Ultrasonikasyona maruz bırakılan süspansiyon hücrelere ait MTT sonuçları

Çizelge 4. 1 Farklı sürelerde ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi

Ultrasonikasyon süresi (dk)	1.Tekerrür (%)	2.Tekerrür (%)	3.Tekerrür (%)	Ortalama (%)
Kontrol	100	100	100	100 a
1	98.44	95.68	82.02	92.05 a
3	102.71	78.86	87.85	89,80 a
5	45.42	44.14	50.85	46.80 b
7	26.28	44.71	30.42	33.80 bc
9	22.85	22.85	31.42	25.71 c

Aynı sütunda küçük harflerle gösterilen gruplar arasındaki ortalamalar arasında fark $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.



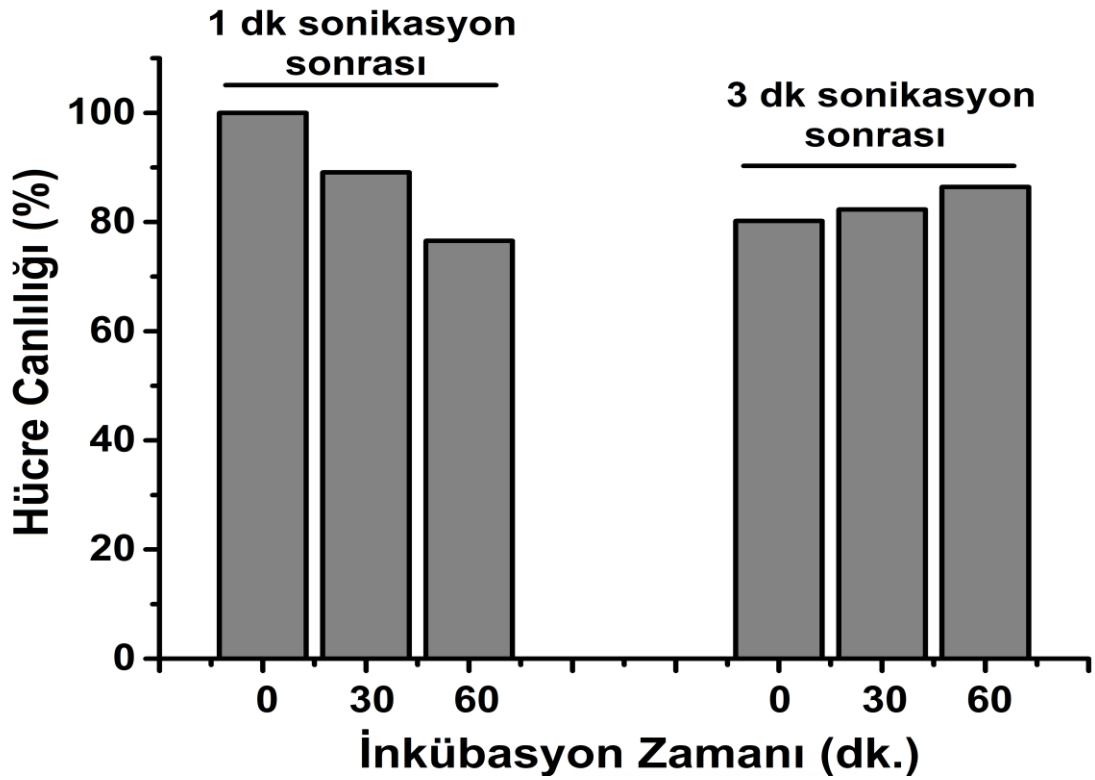
Şekil 4.4 Farklı sürelerde ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi

Çalışmanın ikinci bölümünde, 1 ve 3 dk ultrasonikasyon uygulaması için PLGA NP'lerinin farklı inkübasyon sürelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri incelendi. 0, 30 ve 60 dk boyunca PLGA NP'lerle hücrelerin inkübasyonunu takiben hücre canlılığı, 1 dk'lık ultrasonikasyonda sırasıyla %106.79, %89.07, %76.57 olarak belirlendi. Sonrasında, 3 dk'lık ultrasonikasyonda 0, 30 ve 60 dk'lık inkübasyon için hücre canlılığı sırasıyla %80.21, %82.28 ve %86.41 (Çizelge 4.2) olarak ölçüldü.

Bununla birlikte, farklı inkübasyon süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.5). Ayrıca bu sonuçlar PLGA NP'lerin (15 mg l-1) yonca hücre kültürlerinde sitotoksik olmadığını göstermiştir.

Çizelge 4.2 PLGA NP ilavesi ve 1 ile 3 dk ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi

Ultrasonikasyon süresi (dk)	İnkübasyon süresi (dk)	1.Tekerrür (%)	2.Tekerrür (%)	3.Tekerrür (%)	Ortalama (%)
1	0	124.60	106.29	89.46	106.79
	30	97.44	121.06	48.72	89.07
	60	84.44	77.65	67.61	76.57
3	0	106.05	98.02	36.56	80.21
	30	62.59	76.47	107.77	82.28
	60	74.70	94.48	90.05	86.41



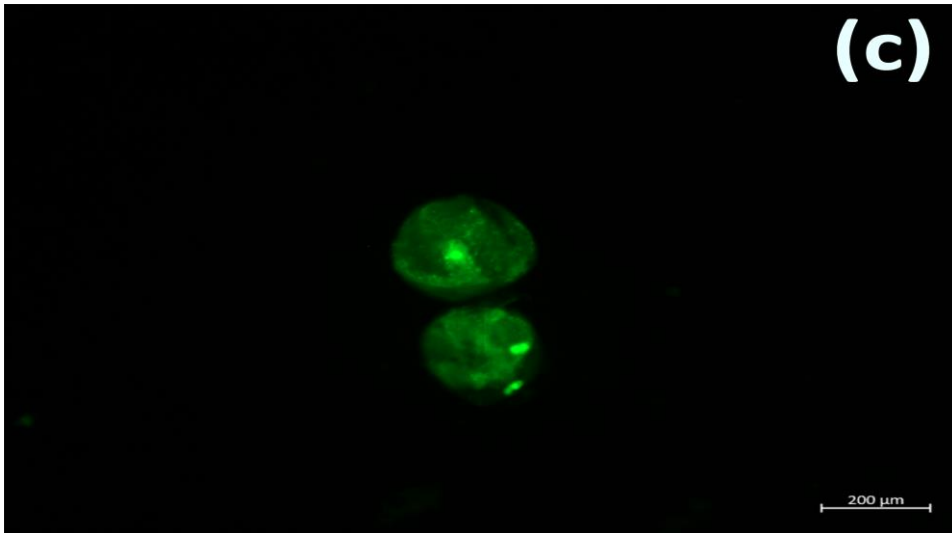
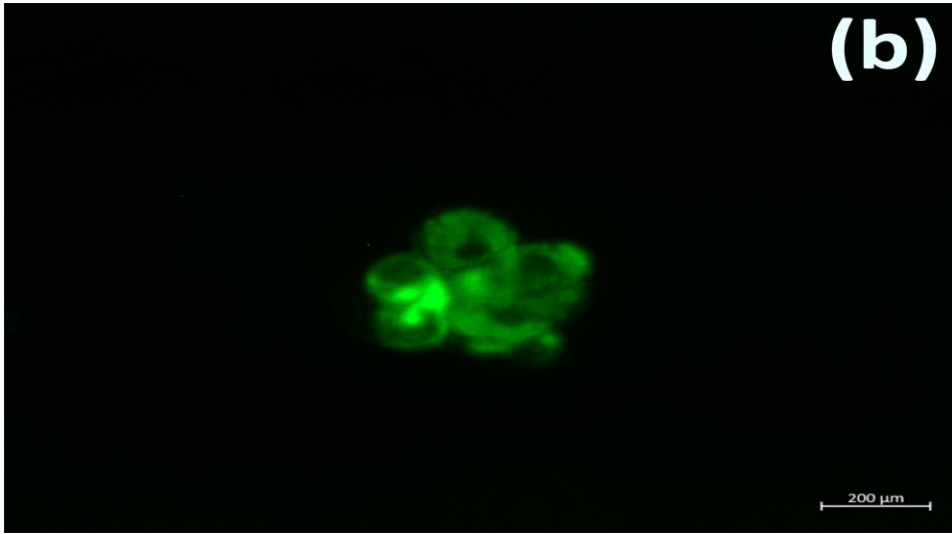
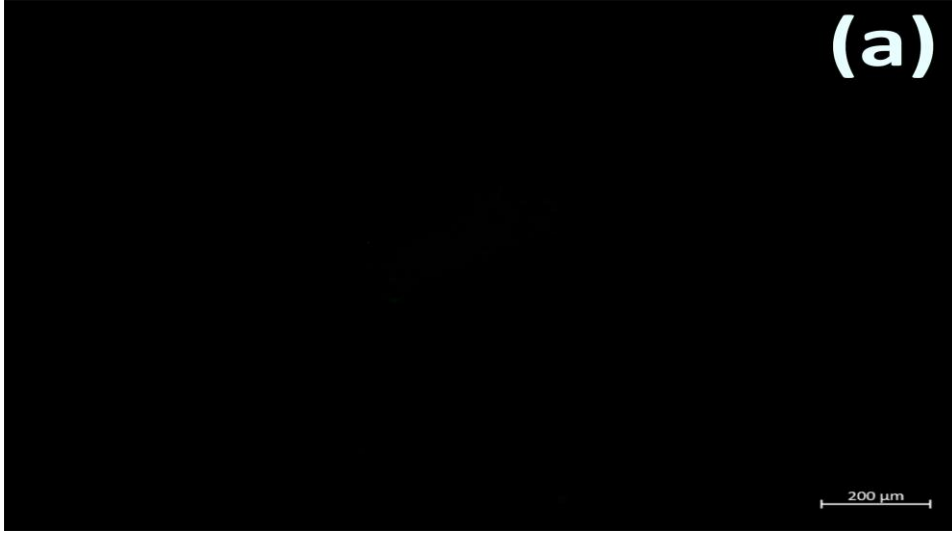
Şekil 4.5 PLGA NP ilavesi ve 1 ile 3 dk ultrasonikasyon uygulamalarının hücre canlılığına etkisi

4.3 Yonca Hücre Kültüründe PLGA NP'lerin Hücreyel Alımı ve Dağılımı

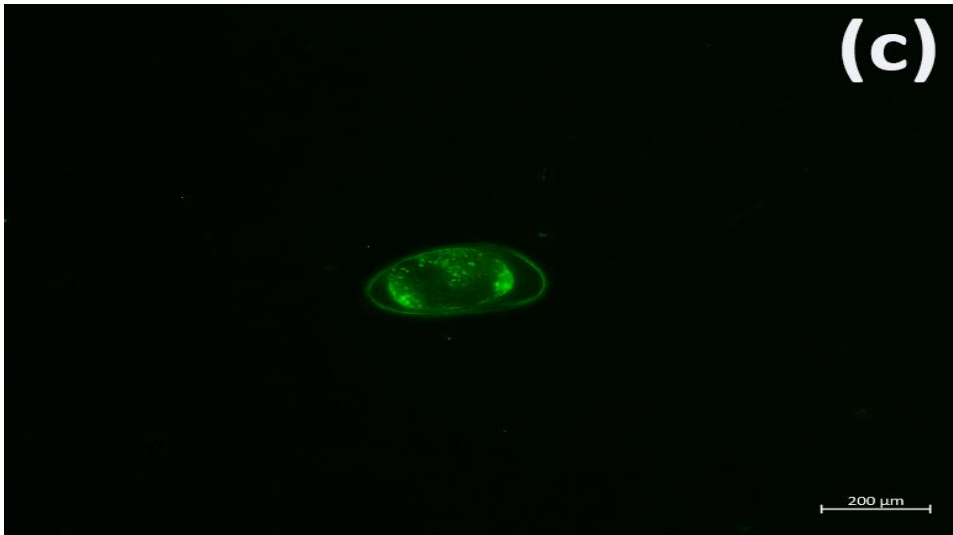
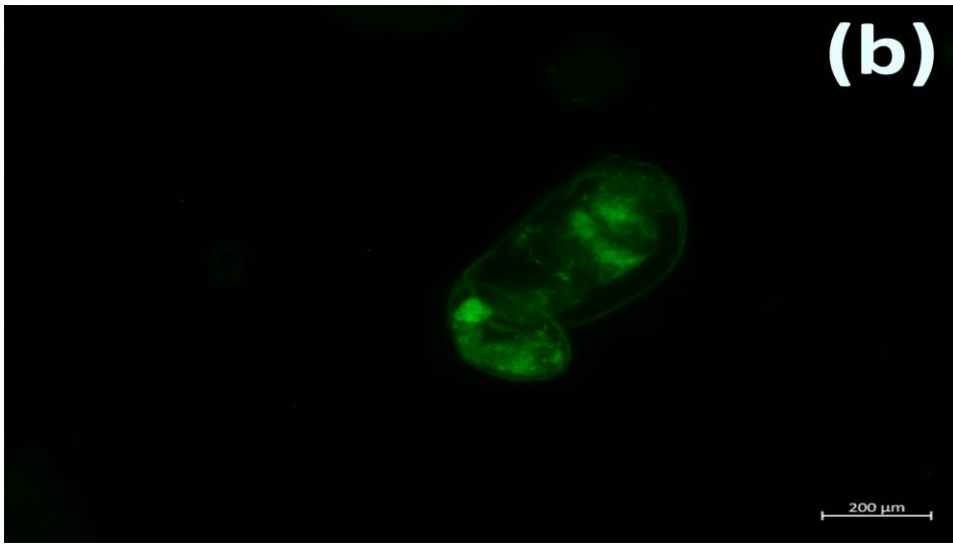
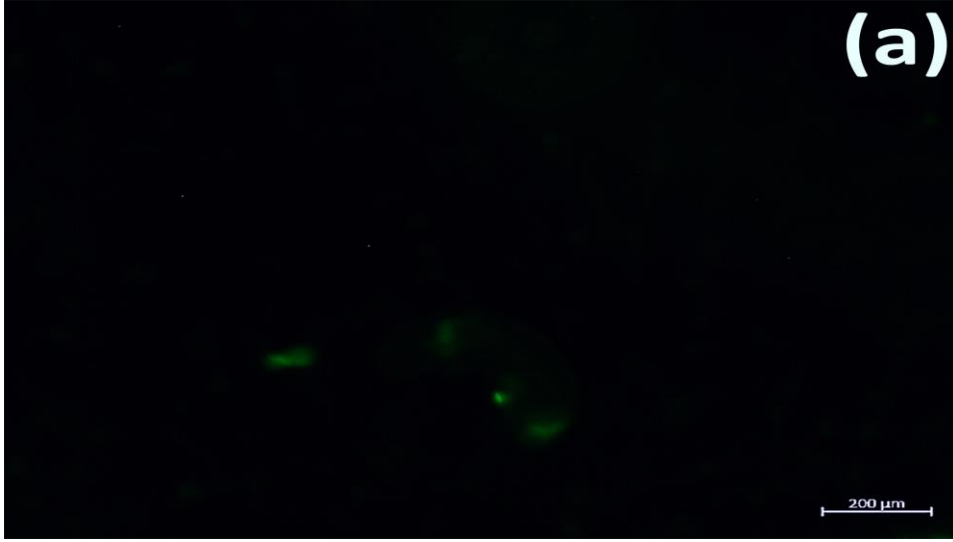
Sonraki çalışmada, ultrasonikasyon zamanı ve inkübasyon sürelerinin yonca hücrelerinde PLGA NP'lerinin alımına ve dağılımına etkileri incelendi. PLGA NP'lerin hücreyel girişini gözlemlemek için, yonca hücre kültür süspansiyonları floresans probu olan FITC ile yüklü PLGA NP'lerle inkübe edildi. Bu NP'ler hücre süspansiyon kültürlerine eklenerek 1 ve 3 dk sonike edildiler. Ultrasonikasyon sonrası 0, 30, 60 min süre ile inkübe edilen kültürlerde NP'lerin hücreye giriş yüzdesi ve dağılımı incelendi.

Sonike edilmeyen yonca süspansiyon hücreleri (kontroller) hiçbir floresans emisyonu göstermezken, 1 veya 3 dk'lık ultrasonikasyon yapılan süspansiyon hücreleri ise belirgin bir floresans emisyon gösterdi. Yonca hücre süspansiyon hücrelerine FITC-yüklü PLGA NP'lerin 1 dk'da zamana bağlı girişi (Şekil 4.6 a-c) ve 3 dk'da zamana bağlı girişi (Şekil 4.7 a-c) floresans mikroskopi ile gözlemlendi.

PLGA NP'lerin hücreler tarafından 3 dk ultrasonikasyon uygulamasında hemen alındığı gözlenirken 1 dk ultrasonikasyon uygulamasında ise hücrelerin içinde düşük yoğunlukta floresans emülsiyon görüldü. Her iki uygulama süresinde de daha uzun süren inkübasyonlarda (30-60 dk ve 24 saat), bu floresans yuvarlak gövdelerin daha belirgin ve büyümüş olduğu görüldü. PLGA NP'lerin uygulamasından 24 saat sonra, floresans dağılımı ve hücre içi lokalizasyonu, 60 dk'lık PLGA NP'lere benzer şekilde gözlemlendi.



Şekil 4.6 1 dk ultrasonikasyon uygulamasında FITC-yüklü PLGA NP'lerin zamana bağlı hücreye girişine ait floresans mikroskop görüntüleri. a) 0, b) 30 ve c) 60 dk sonra



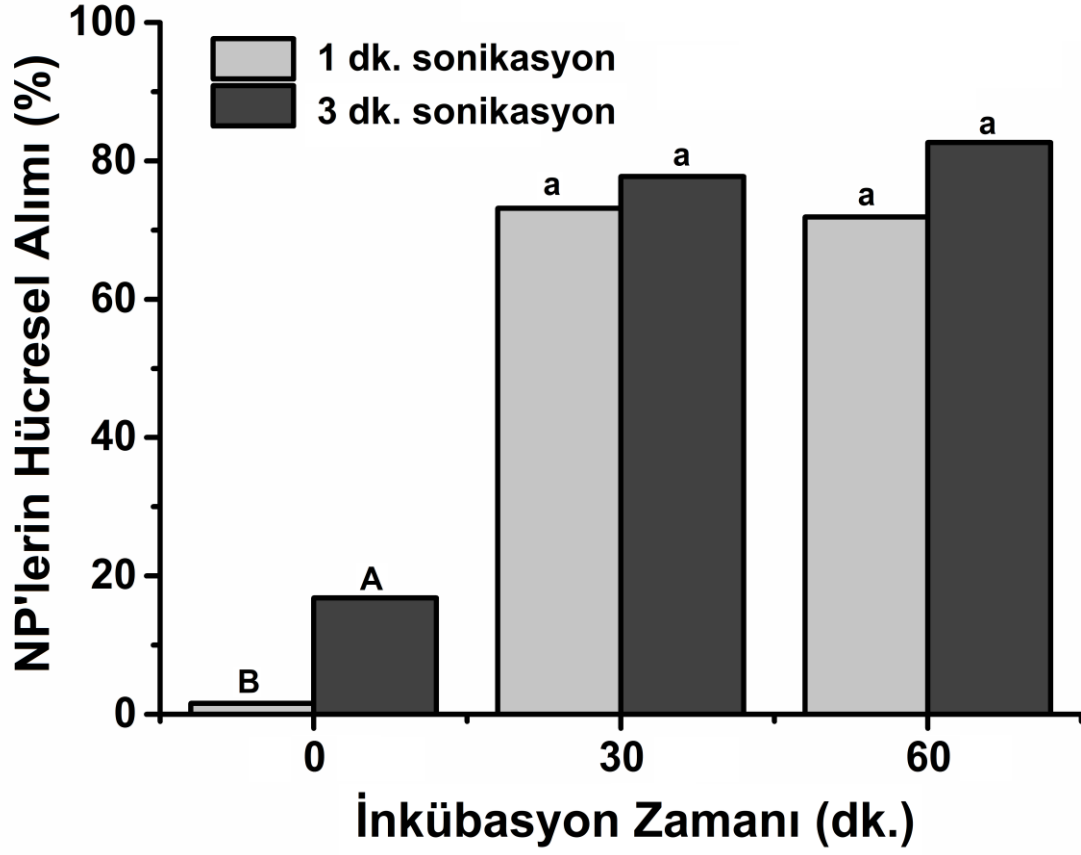
Şekil 4. 7 3 dk ultrasonikasyon uygulamasında FITC-yüklü PLGA NP'lerin zamana bağlı hücreye girişine ait floresans mikroskop görüntüleri. a) 0, b) 30 ve c) 60 dk sonra

Ultrasonikasyon zamanına göre hücrel alım yüzde (%) olarak hesaplandı. Ultrasonikasyon uygulama süreleri ve inkübasyon zamanının NP'lerin hücrel alımına etkisi ile ilgili yapılan istatistiksel analizde; ultrasonikasyon süreleri arasında anlamlı farklılık bulunmazken inkübasyon süreleri arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulundu. Ultrasonikasyon ve inkübasyon sürelerinin etkileşimi açısından ise sadece 0 dk inkübasyon arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,01$).

İnkübasyon süresi arttıkça NP'lerin hücreye girişinin arttığı belirlenmiştir. 0 dk da ortalama % 8.79 giriş gözlenirken 30 ve 60 dk'da sırasıyla % 76.44 ve % 77.28 oranında giriş tespit edilmiştir. 30 ve 60 da inkübasyon süreleri istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır (çizelge 4. 3).

1 dk ultrasonikasyon uygulamasında 0 dk inkübasyon sonucunda %1.59, 3 dk ultrasonikasyon uygulaması ve 0 dk inkübasyonda ise %16.00 NP girişi gözlenmiştir. NP girişi 1 dk'lık ultrasonikasyonla 30 dk'lık inkübasyonda %75.15 ve 3 dk'lık ultrasonikasyonda 30 dk'lık inkübasyonda %77.73 olmuştur. 60 dk inkübe edilen hücrelerde ise, 1 dk'da %71.9 ve 3 dk'da %82.66 hücrel alım tespit edilmiştir (Çizelge 4.3; Şekil 4.8). Sonuçlar, ultrasonikasyon uygulaması ve inkübasyon süresinin, yonca hücreleri tarafından FITC yüklü PLGA NP'lerin hücrel alım verimliliğini arttırdığını göstermektedir.

Yonca süspansiyon hücrelerinin FITC yüklü PLGA NP'ler ile 3 dk sonikasyon ve 60 dk inkübasyon sonrasında NP'lerin hücrel dağılımı TEM çalışmaları ile ayrıca analiz edildi. Gözlemlerde, NP'lerin hücre duvarından ve zarından içeri girdiği/geçtiği görülmektedir. Ayrıca NP'lerin hücre içlerine dağıldıkları ve esas olarak sitoplazmada lokalize oldukları görülmektedir (Şekil 4.9 a-e). Buna ek olarak, az sayıda PLGA NP'lerin çekirdekte ve çekirdekçikte bulunduğu da gözlenmiştir (Şekil 4. 9 a, e). NP'ler, fiksasyon ve gömme işleminde gerçekleştirilen aşırı yıkama nedeniyle hücre duvarı ve hücre zarının dışında görülmediler (Şekil 4. 9 b). TEM analizlerinde, 45-95 nm arasında boyuta sahip NP'lerin hücreye girerek lokalize oldukları görülmektedir (Şekil 4.9 c, d).

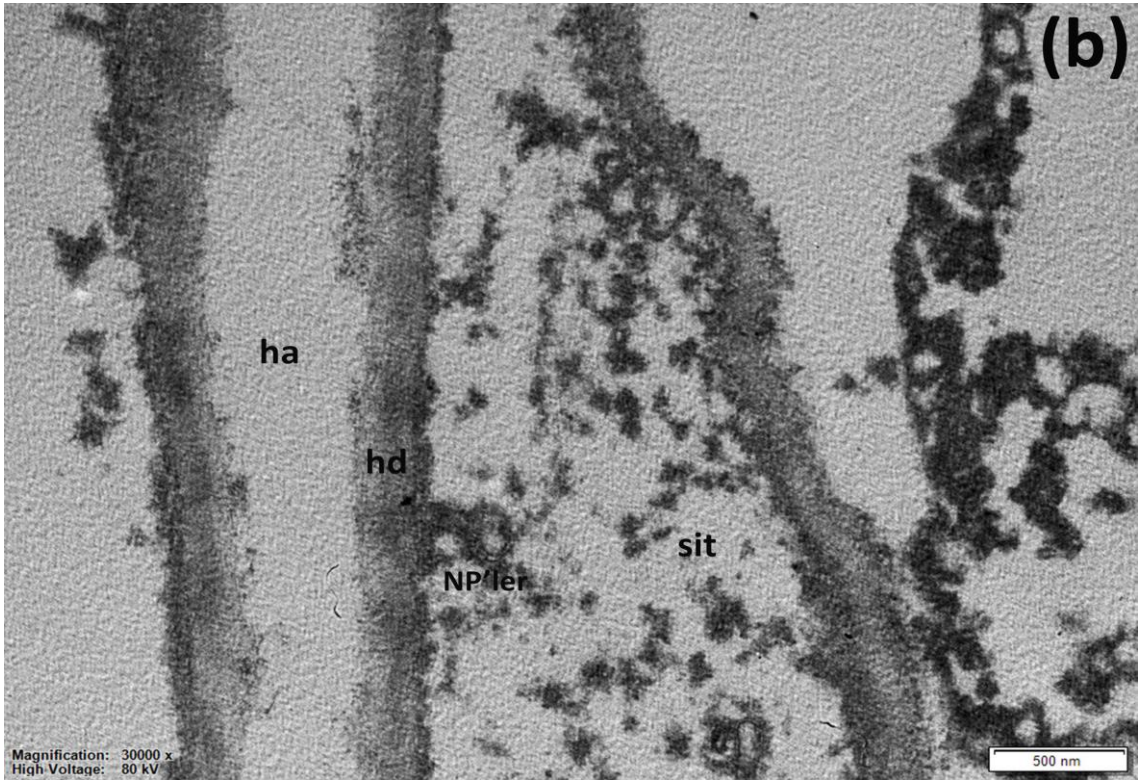
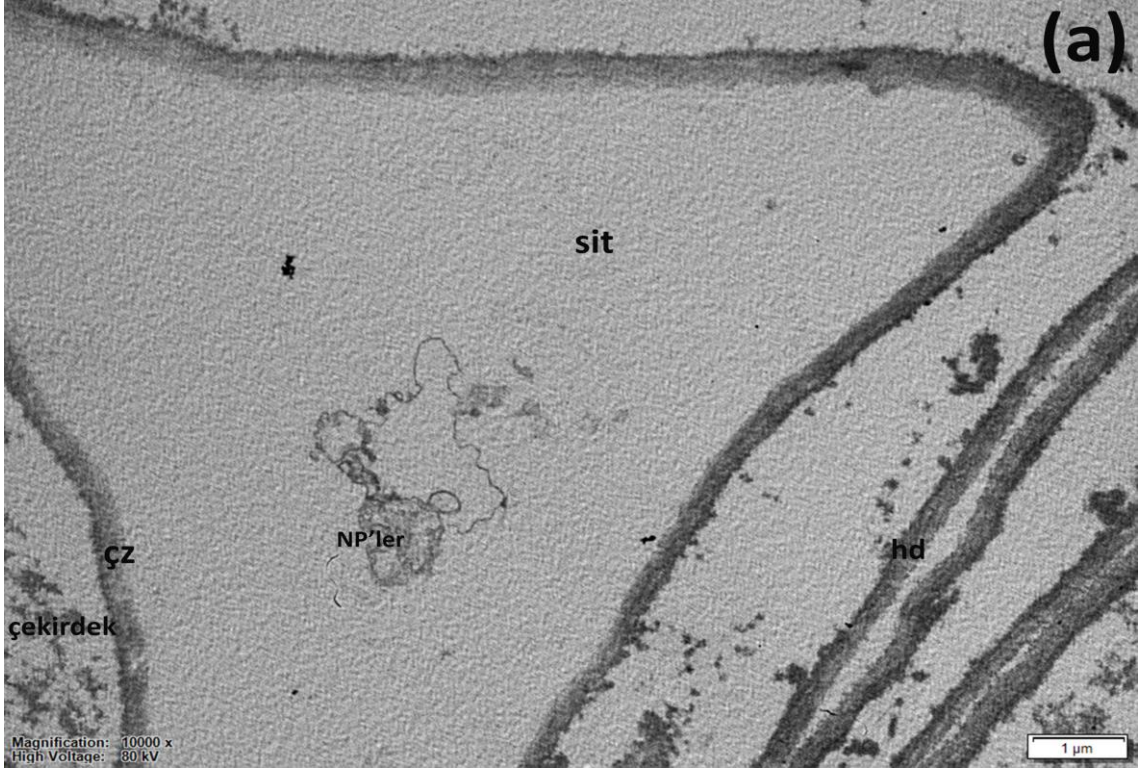


Şekil 4. 8 Farklı ultrasonikasyon uygulama ve inkübasyon sürelerinin FITC yüklü PLGA NP'lerin hücresel alımına etkisi

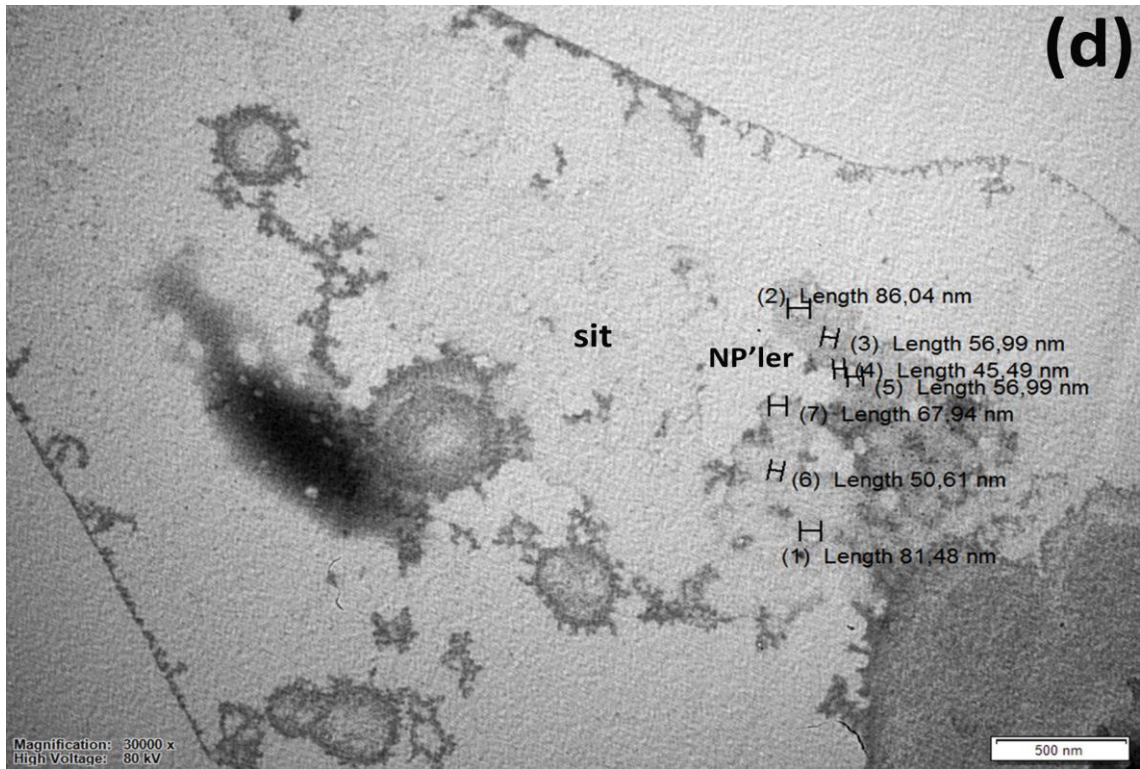
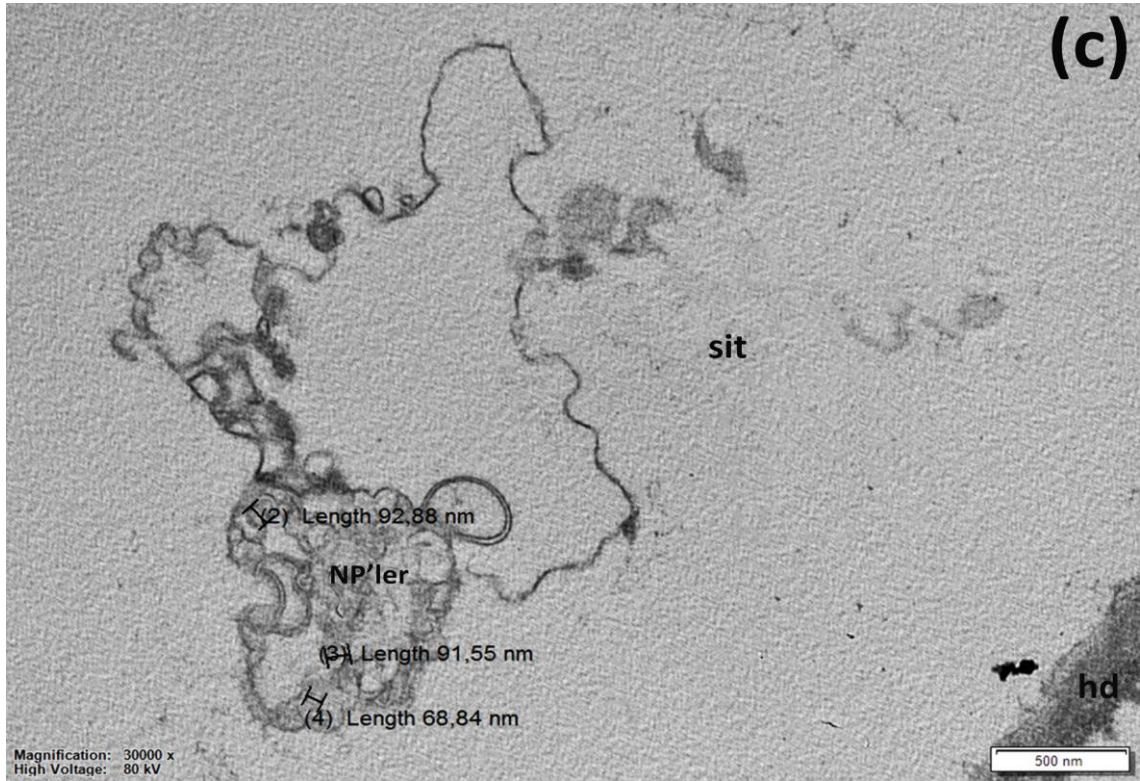
Çizelge 4. 3 Farklı ultrasonikasyon ve inkübasyon sürelerinin FITC yüklü PLGA NP'lerin hücresel alımına etkisi

PLGA NP'lerin hücreye girişi (%)			
İnkübasyon Süresi (dk)	Ultrasonikasyon Süresi (dk)		
	0	30	60
1	1.59 B	75.15	71.9
3	16.00 A	77.73	82.66
Ortalama	8.79 b	76.44 a	77.28 a

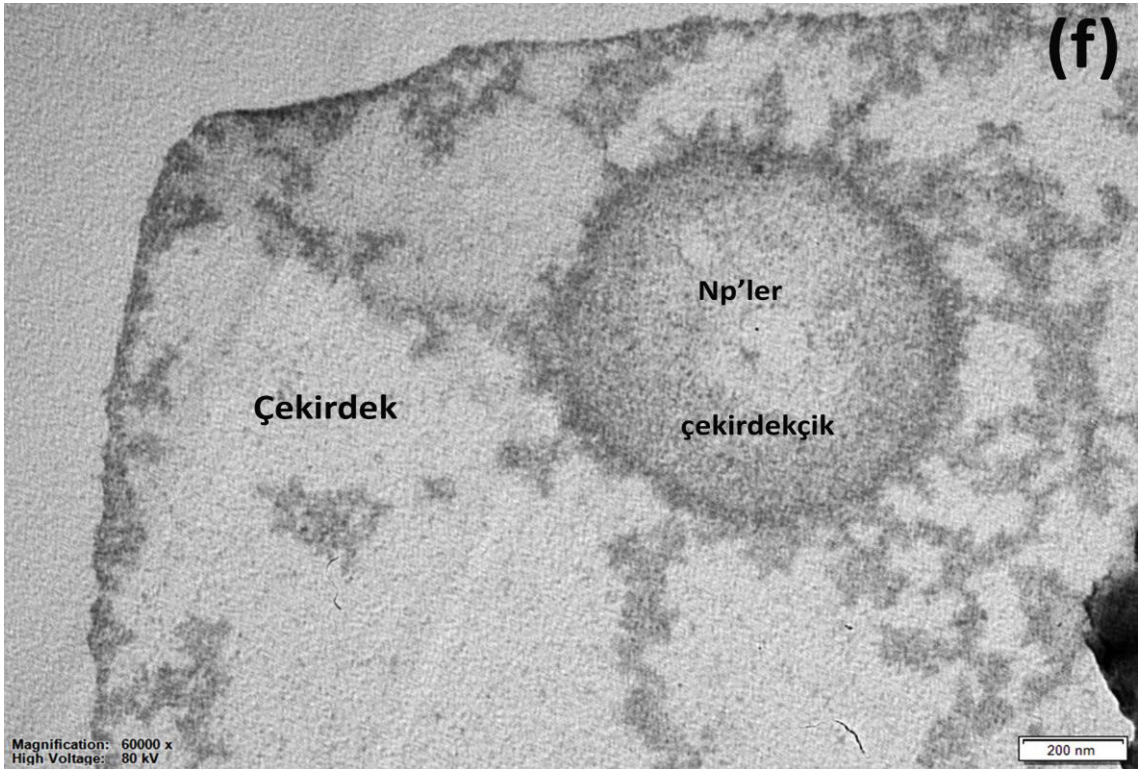
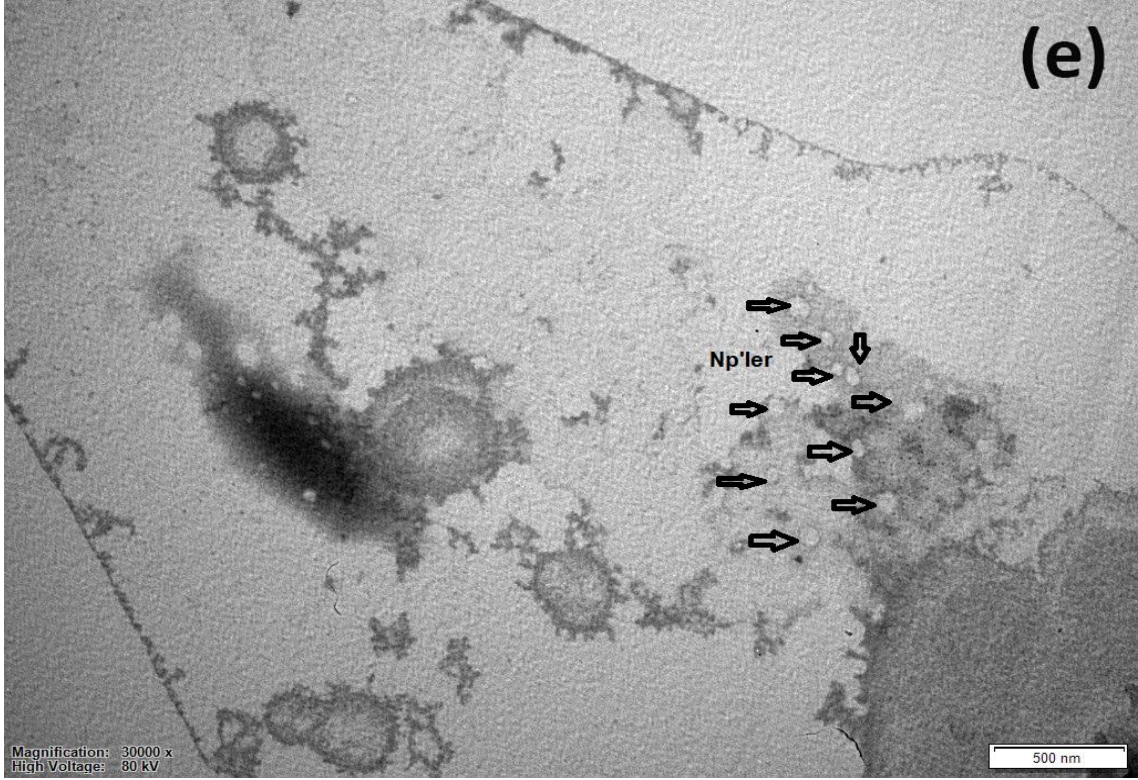
Büyük veya küçük harflerle gösterilen gruplar arasındaki ortalamalar arasında fark $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.9 PLGA NP'lerin hücreye girişi ve dağılımına ait TEM görüntüleri. a) hücre duvarı (hd) ve membrandan geçen PLGA NP'ler, b) PLGA NP'leri hücre arasında (ha), hücre duvarı ve membranda tespit edilemediler c) ve d-e) sitoplazmada (sit), f) Çekirdek - çekirdek zarı (çz) ve çekirdekte tespit edilen PLGA NP'ler. Barlar 1 um (a); 500 nm (b, c, d ve e); ve 200 nm (f)



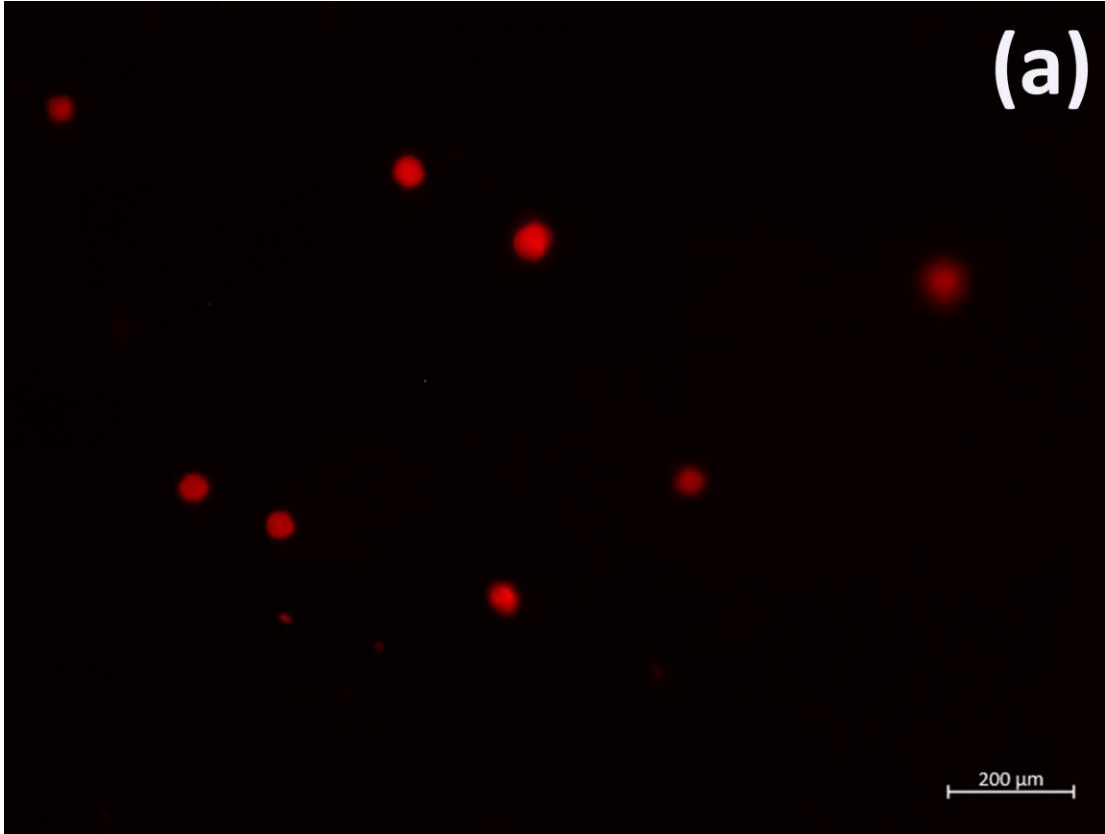
Şekil 4.9 PLGA NP'lerin hücreye girişi ve dağılımına ait TEM görüntüleri. a) hücre duvarı (hd) ve membrandan geçen PLGA NP'ler, b) PLGA NP'leri hücre arasında (ha), hücre duvarı ve membranında tespit edilemediler c) ve d-e) sitoplazmada (sit), f) Çekirdek - çekirdek zarı (çz) ve çekirdekçikte tespit edilen PLGA NP'ler. Barlar 1 um (a); 500 nm (b, c, d ve e); ve 200 nm (f) (devamı)



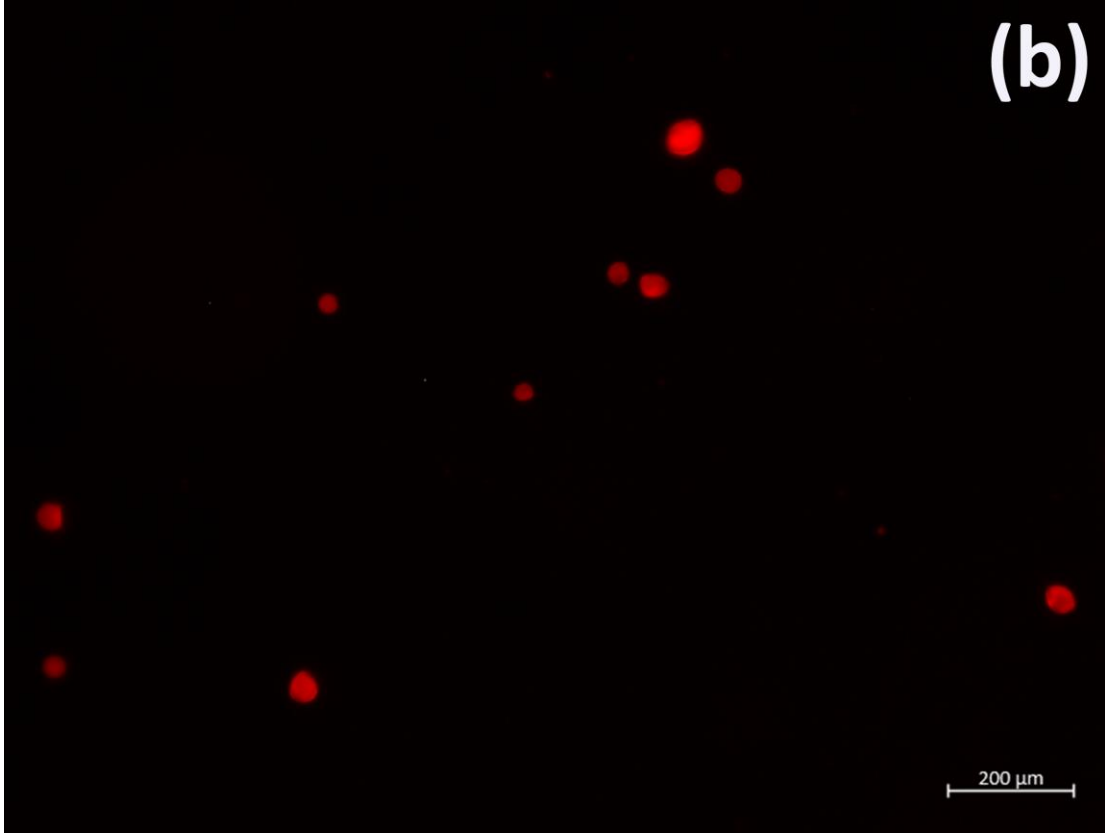
Şekil 4.9 PLGA NP'lerin hücreye girişi ve dağılımına ait TEM görüntüleri. a) hücre duvarı (hd) ve membrandan geçen PLGA NP'ler, b) PLGA NP'leri hücre arasında (ha), hücre duvarı ve membranında tespit edilemediler c) ve d-e) sitoplazmada (sit), f) Çekirdek - çekirdek zarı (çz) ve çekirdekçikte tespit edilen PLGA NP'ler. Barlar 1 μ m (a); 500 nm (b, c, d ve e); ve 200 nm (f) (devamı)

4.4 PLGA NP'lerin Yonca Hücrelerinde Genotoksik Potansiyeli

Comet protokolü, tek tip hücrelerde DNA kırılmasının saptanması için çok hassas bir uygulamadır [266]. 15 mg l^{-1} PLGA NP'lerle muamele edilen hücre kültürleri, 3 dk boyunca sonike edildi ve 60 dk inkübasyon sonrası çekirdekler, comet prosedürü ile incelendi. Ortalama 100 çekirdek üstünde yapılan mikroskopik incelemelerde, Şekil 4.10'da (a-d) gösterildiği gibi, DNA iplikçik kopmaları (kuyruklu yıldızlar), kontrol hücrelerindeki hasar seviyesine kıyasla, PLGA NP'lere maruz kalan hücrelerde 1 saat boyunca indüklenmediği görüldü. Sonuçlar, PLGA NP'lerinin yonca hücrelerinde genotoksik potansiyele sahip olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.1 Comet uygulamasına ait floresans mikroskobu görüntüleri (a-d). Bar= 200 μm



Şekil 4.1 Comet uygulamasına ait floresans mikroskobu görüntüleri (a-d). Bar= 200 μm
(devamı)



Şekil 4.1 Comet uygulamasına ait floresans mikroskobu görüntüleri (a-d). Bar= 200 μm
(devamı)

4.5 Tartışma ve Öneriler

PLGA NP'ler, hormonlar [272], [273], nükleik asitler, peptitler, proteinler [129] ve küçük molekül yapıları ilaçların [274] potansiyel nano taşıyıcıları olarak özellikle tıpta yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak tarım ve bitki biyoteknolojisinin sayısız uygulama olanağına rağmen, PLGA NP'ler ve bitkiler arasındaki etkileşim yeterince araştırılmamıştır. Özellikle PLGA NP'lerin bitki hücrelerine alımı ile ilgili çok az sayıda çalışma vardır [42], [275]. Bitkilerde PLGA NP'lerin alınımı ve dağılımı konusunda sadece *V. vinifera* bitkisinde çalışma mevcuttur [42].

Çalışmamızda kullanılan PLGA NP'lerin boyut ölçümleri ve SEM görüntüleri, NP'lerin küresel, pürüzsüz morfolojiye ve monodisperse boyut dağılımına sahip olduğunu, büyüklüklerinin ise 40-600 nm arasında değiştiğini göstermiştir. Sentezlenen PLGA NP'lerin karakteristik özelliklerinin aynı sentez yöntemini kullanan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu tespit edilmiştir [270], [271]. Çalışmada araştırılan en önemli kısım ise

bu NP'lerin hücrelere girişi ve lokalizasyonudur. Yapılan literatür taramalarında NP'lerin hücrelere nüfuzunu etkileyen en önemli faktörlerin NP çeşidi ve bitki türü olduğu belirtilmiştir [14], [31]. Bu çalışmada yonca bitkisi hücrelerine PLGA NP'lerinin alımı ve lokalizasyonu ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca, farklı sürelerde uygulanan ultrasonikasyon ve inkübasyonun PLGA NP'lerin hücrelere girişini nasıl etkilediği belirlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalar, düşük yoğunluklu ultrasonikasyon seviyelerinin, hücreler üzerinde çeşitli ölümcül olmayan mekanik ve biyolojik etkilere yol açtığını ve bitki biyoteknolojisi ve genetik mühendisliğinde düşük yoğunluklu ultrasonikasyon uygulamalarının kullanıldığını göstermektedir [256]. Önceki çalışmalarda, hücrelerin %90'ının ultrasonik işlemeyle 7-11 dk'da [256] ve 20 dk'ya kadar %90'dan fazla [160] hasar gördüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada ise 3 dk'dan fazla ultrasonikasyon kullanıldığında hücre canlılığının çarpıcı şekilde azaldığı bulunmuştur. Özellikle, 7 ila 9 dk ultrasonikasyonda hücrelerin ~%70'inde hücre hasarı tespit edilmiştir. Sonuçlar, 1 ila 3 dk'lık PLGA NP'lerin ultrasonikasyonda hücrelerde hasarının minimum olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla elde edilen sonuçların, önceki çalışmalarla uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Daha önce yapılan PLGA NP'lerin görselleştirme çalışmalarında (konfokal mikroskop analizi); kumarin 6 yüklü PLGA NP'lerin, hepatosit (C3A) ve fibroblast (3T6) insan hücre hatları [276] ve *V. vinifera* bitki hücre hatları tarafından [42] hücre olarak alımında doygunluğa 2-3 saatte ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmalarda NP'lerin hücre içine girişlerinin zamanla daha büyük ve daha belirgin floresans yuvarlak gövdeler olarak görüldüğü belirtilmiştir. Bu çalışmada da zaman içinde kümelenen FITC-yüklü PLGA NP'lerin, inkübasyon süresi arttıkça hücrelerin içinde daha net bir şekilde yuvarlak floresans ışımaya yaptığı görüldü.

Valetta ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, kumarin-6-yüklü PLGA NP'lerin *V. vinifera'da* zamana bağlı hücre alımının, hızla gerçekleştiği bildirilmiştir. 5-10 dk sonra küçük, yüksek floresans yuvarlak gövdeleri ve hücrelerin içinde düşük yoğunlukta gözlemlendiği, artan inkübasyon zamanlarında (20-60 dk), kümeleşen bu floresans yuvarlakların daha az sayıda ve daha büyük görüldüğü bildirilmiştir. PLGA NP'lerin 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonrasında, floresans dağılımının 60 dk'da gözlenen

benzer olduğu belirtilmiştir [42]. Bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmama ile birlikte, PLGA NP'lerin hücreye alınımında 3 dk ultrasonikasyon uygulamasının, 1 dk. lık ultrasonikasyondan daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Özellikle 0 dk inkübasyonda 3 dk NP girişinin, istatistiksel olarak 1 dk 'ya oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ultrasonikasyon sonrası inkübasyon sürelerinin PLGA NP'lerin hücreye alınımında etkili olduğu ancak 30 dk inkübasyon sonrası NP alınım yüzdesinde artışa rağmen istatistiksel bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

Ultrasonikasyon olarak da bilinen bu ultrasonik dalgalar, oluşturduğu akustik kaviteasyon yoluyla hücre zarının geçirgenliğini geçici [224] olarak değiştirerek çeşitli biyoetkiler üretebilmektedir [213], [219], [225], [226]. Bu ultrasonik dalgalar hücre duvarında, hücre zarında ve nükleer zarda geçici kanalları indükleyebildiğinden [277], [278] NP'lerin hücre duvarı ile etkileşime girerek mevcut gözeneklerin genişlemesini veya yeni gözeneklerin oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmada uygulanan ultrasonikasyonun FITC-yüklü PLGA NP'lerin yonca hücrelerine alınım verimini önemli ölçüde arttırdığı söylenebilir.

Hücre duvarının varlığı, bitki hücrelerinin NP alınımında hücre duvarı gözeneklerinden daha büyük NP'lerin alınımını engelleyen bir bariyerdir. Literatür, en büyük hücre duvarı gözeneklerinin 5-20 nm çapında olduğunu bildirmektedir [41], [279], [280], [281]. Valetta ve arkadaşları (2014) PLGA NP'lerin *V. vinifera* hücrelerine alınımı ile ilgili yaptıkları çalışmalarda TEM analizi sonuçlarına göre sadece 30-50 nm'de küçük çaplara sahip PLGA NP'lerinin 4 günlük hücrelere nüfuz edebileceğini göstermiştir. Liu ve ark. 2008 yılında yaptığı çalışmada Poli-L-lizin kaplı nişasta NP'lerin 3-5 dk boyunca 120 W-40 kHz ultrasonikasyonu altında *Dioscorea zigerensis* bitki hücrelerine, normal şekilde girdiğini bildirmiştir [256]. Başka bir çalışmada, hPAMAM-G2 dendrimer NP'leri kullanılarak yonca hücrelerinde gen aktarım etkinliğini artırmak için 0,5-3 dk'lık ultrasonikasyon kullanılabileceği bildirilmiştir [160]. Sonuçlar, NP'lerin hücre duvarlarından, plazma membranlarından ve nükleer membranlardan ultrasonikasyon uygulamaları yoluyla geçebileceğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında TEM analizi sonuçlarında, 100 nm çapa kadar PLGA NP'lerin yonca hücrelerine nüfuz edebildiği tespit edilmiştir. Bu farkın nedenlerinden biri, bu tez

çalışmasında kullanılan hücrelerin, hücre duvarlarının henüz tam olarak oluşturulmamış olmasıdır (5-6 günlük). Daha büyük boyutta NP'lerin penetrasyon nedenleri ayrıca, ultrasonikasyon kullanımı ile de açıklanabilir. Ultrasonik dalga hücre duvarında, hücre zarında ve nükleer zarında anlık kanalları indükleyebilir [277], [278]. Ayrıca hücrede endositoz, aquaporinler, iyon kanalları veya hücre zarına ulaştıklarında taşıyıcı proteinlere bağlanma yoluyla hücreye türüne bağlı olarak hücre içine girebileceklerini öne sürmüşlerdir [41], [280], [281]. Ek olarak, hücrelere nüfuz edebilen NP'lerin büyüklüğü, bitki türlerine, hücre tipine ve hücre büyüme fazlarına bağlı olarak değişebilmektedir [28], [29], [31], [282]. Çalışmamızda literatürden farklı bitki türünün kullanılması ve ultrasonikasyon uygulaması, bu bulgularımızı desteklemektedir.

NP'lerin kullanımındaki dikkate değer bir artış, toksikolojik etkilerinin dikkatli bir şekilde incelenmesini gerektirmektedir. MTT protokolü ile sitotoksikite, Comet protokolü ile genotoksikitenin ölçümü sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Ancak NP'lerle toksikolojik çalışmalar genellikle hayvan modellerinde ve hücre hatlarında yapılmakta iken [283], nadiren bitkilerde [284] yapıldığı görülmüştür. PLGA'nın, hayvanlarda ilaç dağıtım sistemlerinde güvenle kullanılabildiği ve memeli hücrelerinde sitotoksik veya genotoksik olmadığı bildirilmiştir [285]. Bu tez çalışmasında PLGA NP'lerle 1 ve 3 dk ultrasonikasyon sonrası inkübe edilen yonca hücrelerinde sitotoksikite görülmemiştir. Benzer sonuçlar *V. Vinifera* da tespit edilmiş [42] olup bu çalışmayla uyumlu olduğu görülmüştür.

Genotoksikite ile yapılmış bitkisel çalışmalar irdelendiğinde olursak; Ag-NP'ler (*A. cepa* ve *V. faba*) [286], ZnO-NP'ler ve CeO₂-NP'ler (*Glisine maks*) [287] ve TiO₂-NP'ler (*A. cepa*, *N. tabacum*, *Z. mays* ve *V. narbonensis*) [288] gibi metal NP'lerin bitkiler üzerindeki genotoksik potansiyeli çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bununla birlikte, 2013'de Santos ve ark. [289] CdSe / ZnS kuantum noktalarının *M. sativa*'daki DNA'ya zarar verdiğini göstermişlerdir.

Yapılan bu çalışma ile ilk kez yonca bitkisinde PLGA NP'lerin sitotoksik etkileri yanında genotoksik potansiyeli incelenmiş ve PLGA'nın yonca hücrelerinde genotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Yakın gelecekte, tarım ve bitki araştırmaları için NP'lerin geliştirilmesi çok daha fazla önem kazanacaktır ve pestisit uygulamalarından, gübre kullanımına ve hatta genetik dönüşüm için nükleik asit nakledilmesine olanak tanıyacaktır [50]. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, PLGA NP'lerin bitkilerde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin olmadığını göstermiştir. Bu nedenle tarımsal uygulamalarda PLGA NP'lerin güvenle kullanılabilceği düşünülmektedir. Ayrıca bitkilere gen aktarımında kullanılan yöntemlerin dezavantajları alternatif yöntem olarak NP sistemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Geleneksel sistemlerin etkinliğini arttırmada ultrasonikasyon uygulamaları olumlu sonuçlar vermiştir [160], [216], [218], [220], [221], [223], [231], [232], [242], [244], [245]. Bu çalışmada en uygun ultrasonikasyon süresi belirlenmiş olup, daha büyük boyutlu PLGA NP'lerin hücreye girmesi sağlanarak verimlilik artırılmıştır. Sonuçlar, ultrasonikasyon uygulamasının özellikle bitki gen aktarımında DNA-partikül boyutunun büyüklüğünün getirdiği soruna çözüm olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma, günümüzde bitkilerde kararlı transformasyonun sağlanmasında öncü peptit veya dendrimerlerin kullanılmasına olanak tanınması açısından bir alternatif protokol olarak sunulabilir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Shojaei, T.R. Salleh, M.A.M. Tabatabaei, M. Mobli, H. Aghbashlo, M. Rashid, S.A. ve Tan, T., (2019). Applications of Nanotechnology and Carbon Nanoparticles in Agriculture, ed. Synthesis, Technology and Applications of Carbon Nanomaterials. Elsevier, 247-277.
- [2] Köksal, F., (2014). Nanobilim ve Nanoteknoloji. Nobel Akademik Yayıncılık, 351 sayfa, Ankara.
- [3] Kaya, H. B. Demirci, M. ve Tanyolac, B., (2014) Genetic structure and diversity analysis revealed by AFLP on different *Echinochloa* spp. from northwest Turkey lant systematics and evolution, 300:1337-1347.
- [4] Tanyolaç, M.B. Kaya, H.B. Soya, S. Akkale, C., (2010). "Biyoteknoloji ve Biyoinformatik (16.Bölüm)", Moleküler Biyoloji, Genişletilmiş 2.Baskı, ss.601-669, Nobel Yayınevi, Ankara,
- [5] Taylor, N.J. ve Fauquet, C.M., (2002). "Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology", DNA and cell biology, 21: 963-977.
- [6] Gelvin, S.B., (2003). "Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool", Microbiology and molecular biology reviews, 67: 16-37.
- [7] Bao, W. Wang, J. Wang, Q. O'Hare, D. ve Wan, Y., (2016). "Layered double hydroxide nanotransporter for molecule delivery to intact plant cells", Scientific reports, 6: 26738.
- [8] Sone, T. Nagamori, E. Ikeuchi, T. Mizukami, A. Takakura, Y. Kajiyama, S.i. Fukusaki, E.-i. Harashima, S. Kobayashi, A. ve Fukui, K., (2002). "A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads", Journal of Bioscience and Bioengineering, 94: 87-91.
- [9] Nakano, A. Suzuki, G. Yamamoto, M. Turnbull, K. Rahman, S. ve Mukai, Y., (2005). "Rearrangements of large-insert T-DNAs in transgenic rice", Molecular genetics and genomics, 273: 123-129.

- [10] Wada, N. Kajiyama, S.i. Khemkladngoen, N. ve Fukui, K., (2011). "A novel gene delivery system in plants with calcium alginate micro-beads", *Plant Transformation Technologies*, Wiley-Blackwell, Oxford.
- [11] Cunningham, F.J. Goh, N.S. Demirer, G.S. Matos, J.L. ve Landry, M.P., (2018). "Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering", *Trends in biotechnology*, 36: 882-897.
- [12] Etxeberria, E. Gonzalez, P. Baroja-Fernandez, E. ve Romero, J.P., (2006). "Fluid phase endocytic uptake of artificial nano-spheres and fluorescent quantum dots by sycamore cultured cells: evidence for the distribution of solutes to different intracellular compartments", *Plant signaling & behavior*, 1: 196-200.
- [13] Silva, A.T. Nguyen, A. Ye, C. Verchot, J. ve Moon, J.H., (2010). "Conjugated polymer nanoparticles for effective siRNA delivery to tobacco BY-2 protoplasts", *BMC plant biology*, 10: 291.
- [14] Xia, B. Dong, C. Zhang, W. Lu, Y. Chen, J. ve Shi, J., (2013). "Highly efficient uptake of ultrafine mesoporous silica nanoparticles with excellent biocompatibility by *Liriodendron* hybrid suspension cells", *Science China Life Sciences*, 56: 82-89.
- [15] Liu, Q. Chen, B. Wang, Q. Shi, X. Xiao, Z. Lin, J. ve Fang, X., (2009). "Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells", *Nano letters*, 9: 1007-1010.
- [16] Dong, C. Shi, J. Lu, Y. Chen, J. ve Xia, B., (2011). "Interaction characteristics of the co-incubation between CdSe/ZnS quantum dots and *Liriodendron* hybrids suspension cells by PEG-mediation", *Scientia Sinica Vitae*, 41: 494-501.
- [17] Wang, Q. Chen, J. Zhang, H. Lu, M. Qiu, D. Wen, Y. ve Kong, Q., (2011). "Synthesis of water soluble quantum dots for monitoring carrier-DNA nanoparticles in plant cells", *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 11: 2208-2214.
- [18] Ying, L. CUI, H.-x. Yu, S. Yao, L. ve HUANG, J.-l., (2011). "Transient expression of exogenous gene into plant cell mediated by PEI nanovector", *Agricultural sciences in China*, 10: 820-826.
- [19] Pasupathy, K. Lin, S. Hu, Q. Luo, H. ve Ke, P.C., (2008). "Direct plant gene delivery with a poly (amidoamine) dendrimer", *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 3: 1078-1082.
- [20] Serag, M.F. Kaji, N. Tokeshi, M. ve Baba, Y., (2012). "Introducing carbon nanotubes into living walled plant cells through cellulase-induced nanoholes", *RSC Advances*, 2: 398-400.
- [21] Tang, F. Li, L. ve Chen, D., (2012). "Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery", *Advanced materials*, 24: 1504-1534.
- [22] Tan, X.-m. Lin, C. ve Fugetsu, B., (2009). "Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells", *Carbon*, 47: 3479-3487.

- [23] Santos, A.R. Miguel, A.S. Tomaz, L. Malhó, R. Maycock, C. Patto, M.C.V. Fevereiro, P. ve Oliva, A., (2010). "The impact of CdSe/ZnS quantum dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture", *Journal of nanobiotechnology*, 8: 24.
- [24] Kutlu, C., (2011). *Beyin Tümörlerinin Tedavisi İçin Çift Etkili Doku İskelesi-Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [25] Makadia, H.K. ve Siegel, S.J., (2011). "Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier", *Polymers*, 3: 1377-1397.
- [26] Danhier, F. Ansorena, E. Silva, J.M. Coco, R. Le Breton, A. ve Pr at, V., (2012). "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications", *Journal of Controlled Release*, 161: 505-522.
- [27] Zhu, H. Han, J. Xiao, J.Q. ve Jin, Y., (2008). "Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants", *Journal of Environmental monitoring*, 10: 713-717.
- [28] Lin, D. ve Xing, B., (2008). "Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles", *Environmental science & technology*, 42: 5580-5585.
- [29] Lin, S. Reppert, J. Hu, Q. Hudson, J.S. Reid, M.L. Ratnikova, T.A. Rao, A.M. Luo, H. ve Ke, P.C., (2009). "Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants", *Small*, 5: 1128-1132.
- [30] Lee, W.M. An, Y.J. Yoon, H. ve Kweon, H.S., (2008). "Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles", *Environmental toxicology and chemistry*, 27: 1915-1921.
- [31] Wild, E. ve Jones, K.C., (2009). "Novel method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants", *Environmental science & technology*, 43: 5290-5294.
- [32] Tekeoglu, M. ve Edit r ,  ., (2013). *Biyoteknolojiye Giriş*, 3. Baskıdan çeviri, Palme Yayıncılık, İstanbul.
- [33] Zaytseva, O. ve Neumann, G., (2018). *Penetration and Accumulation of Carbon-Based Nanoparticles in Plants*, ed. *Phytotoxicity of Nanoparticles*. Springer, 103-118.
- [34] Medina-Pérez, G. Fernández-Luque o, F. Vazquez-Nuñez, E. López-Valdez, F. Prieto-Mendez, J. Madariaga-Navarrete, A. ve Miranda-Ar mbula, M., (2019). "Remediating Polluted Soils Using Nanotechnologies: Environmental Benefits and Risks", *Environmental Benefits and Risks. Polish Journal of Environmental Studies*, 28: 1013-1030.
- [35] Mukhopadhyay, S.S., (2014). "Nanotechnology in agriculture: prospects and constraints", *Nanotechnology, science and applications*, 7: 63-71.

- [36] Byerlee, D. Garcia, A.F. Giertz, A. Palmade, V. ve Palmade, V., (2013). "Growing Africa—Unlocking the potential of agribusiness: Main report", Washington, DC: World Bank. <http://documents.worldbank.org/curated/en/2013/03/17427481/growing-africa-unlocking-potential-agribusiness>, 1.
- [37] Fao, F., (2012). "Agriculture Organization of the United Nations. 2012", FAO statistical yearbook.
- [38] Tilman, D., (2002). "Agricultural sustainability and intensive production practices.", *Nature communications*, 418: 671-677.
- [39] De Oliveira, J.L. Campos, E.V.R. Bakshi, M. Abhilash, P. ve Fraceto, L.F., (2014). "Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises", *Biotechnology advances*, 32: 1550-1561.
- [40] Sabourin, V., (2015). "Commercial opportunities and market demand for nanotechnologies in agribusiness sector", *Journal of technology management & innovation*, 10: 40-51.
- [41] Nair, R. Varghese, S.H. Nair, B.G. Maekawa, T. Yoshida, Y. ve Kumar, D.S., (2010). "Nanoparticulate material delivery to plants", *Plant Science*, 179: 154-163.
- [42] Valletta, A. Chronopoulou, L. Palocci, C. Baldan, B. Donati, L. ve Pasqua, G., (2014). "Poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles uptake by *Vitis vinifera* and grapevine-pathogenic fungi", *Journal of Nanoparticle Research*, 16: 2744.
- [43] Hussain, H.I. Yi, Z. Rookes, J.E. Kong, L.X. ve Cahill, D.M., (2013). "Mesoporous silica nanoparticles as a biomolecule delivery vehicle in plants", *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1676.
- [44] Shang, Q. Shi, Y. Zhang, Y. Zheng, T. ve Shi, H., (2013). "Pesticide-conjugated polyacrylate nanoparticles: novel opportunities for improving the photostability of emamectin benzoate", *Polymers for Advanced Technologies*, 24: 137-143.
- [45] Perez, J.J. ve Francois, N.J., (2016). "Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers", *Carbohydrate polymers*, 148: 134-142.
- [46] Saharan, V. Sharma, G. Yadav, M. Choudhary, M.K. Sharma, S. Pal, A. Raliya, R. ve Biswas, P., (2015). "Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato", *International journal of biological macromolecules*, 75: 346-353.
- [47] Chhipa, H., (2017). "Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture", *Environmental chemistry letters*, 15: 15-22.
- [48] Choudhary, R.C. Kumaraswamy, R. Kumari, S. Sharma, S. Pal, A. Raliya, R. Biswas, P. ve Saharan, V., (2017). "Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.)", *Scientific reports*, 7: 9754.

- [49] Sadeghi, R. Rodriguez, R.J. Yao, Y. ve Kokini, J.L., (2017). "Advances in nanotechnology as they pertain to food and agriculture: benefits and risks", *Annual review of food science and technology*, 8: 467-492.
- [50] Cifuentes, Z. Custardoy, L. de la Fuente, J.M. Marquina, C. Ibarra, M.R. Rubiales, D. ve Pérez-de-Luque, A., (2010). "Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon-coated nanoparticles through the root of different crop plants", *Journal of nanobiotechnology*, 8: 26.
- [51] Reis, C.P. Neufeld, R.J. Ribeiro, A.J. ve Veiga, F., (2006). "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2: 8-21.
- [52] Kreuter, J., (2007). "Nanoparticles—a historical perspective", *International journal of pharmaceutics*, 331: 1-10.
- [53] Brunner, T.J. Wick, P. Manser, P. Spohn, P. Grass, R.N. Limbach, L.K. Bruinink, A. ve Stark, W.J., (2006). "In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility", *Environmental science & technology*, 40: 4374-4381.
- [54] Ju-Nam, Y. ve Lead, J.R., (2008). "Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications", *Science of the Total Environment*, 400: 396-414.
- [55] Agudelo, D. Kreplak, L. ve Tajmir-Riahi, H., (2016). "tRNA conjugation with chitosan nanoparticles: An AFM imaging study", *International journal of biological macromolecules*, 85: 150-156.
- [56] Shi, Y. Van Der Meel, R. Theek, B. Oude Blenke, E. Pieters, E.H. Fens, M.H. Ehling, J. Schiffelers, R.M. Storm, G. ve Van Nostrum, C.F., (2015). "Complete regression of xenograft tumors upon targeted delivery of paclitaxel via Π - Π stacking stabilized polymeric micelles", *ACS nano*, 9: 3740-3752.
- [57] Svenson, S. Case, R.I. Cole, R.O. Hwang, J. Kabir, S.R. Lazarus, D. Lim Soo, P. Ng, P.-S. Peters, C. ve Shum, P., (2016). "Tumor selective silencing using an RNAi-conjugated polymeric nanopharmaceutical", *Molecular pharmaceutics*, 13: 737-747.
- [58] Tiwari, J.N. Tiwari, R.N. ve Kim, K.S., (2012). "Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices", *Progress in Materials Science*, 57: 724-803.
- [59] Khan, I. Saeed, K. ve Khan, I., (2017). "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities", *Arabian Journal of Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- [60] Zhao, H. Lin, Z.Y. Yildirimer, L. Dhinakar, A. Zhao, X. ve Wu, J., (2016). "Polymer-based nanoparticles for protein delivery: design, strategies and applications", *Journal of Materials Chemistry B*, 4: 4060-4071.

- [61] Wang, L. Li, F. Dang, L. Liang, C. Wang, C. He, B. Liu, J. Li, D. Wu, X. ve Xu, X., (2016). "In vivo delivery systems for therapeutic genome editing", *International journal of molecular sciences*, 17: 626.
- [62] Kim, I.-Y. Joachim, E. Choi, H. ve Kim, K., (2015). "Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11: 1407-1416.
- [63] Acosta, E., (2009). "Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery", *Current opinion in colloid & interface science*, 14: 3-15.
- [64] Li, Z. Percival, S.S. Bonard, S. ve Gu, L., (2011). "Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects", *Molecular nutrition & food research*, 55: 1096-1103.
- [65] Chen, P.-C. Liu, X. Hedrick, J.L. Xie, Z. Wang, S. Lin, Q.-Y. Hersam, M.C. Dravid, V.P. ve Mirkin, C.A., (2016). "Polyelemental nanoparticle libraries", *Science*, 352: 1565-1569.
- [66] Lu, J. Low, K.-B. Lei, Y. Libera, J.A. Nicholls, A. Stair, P.C. ve Elam, J.W., (2014). "Toward atomically-precise synthesis of supported bimetallic nanoparticles using atomic layer deposition", *Nature communications*, 5: 3264.
- [67] Hu, X. Hu, J. Tian, J. Ge, Z. Zhang, G. Luo, K. ve Liu, S., (2013). "Polyprodrug amphiphiles: hierarchical assemblies for shape-regulated cellular internalization, trafficking, and drug delivery", *Journal of the American Chemical Society*, 135: 17617-17629.
- [68] Shimomura, M. ve Sawadaishi, T., (2001). "Bottom-up strategy of materials fabrication: a new trend in nanotechnology of soft materials", *Current opinion in colloid & interface science*, 6: 11-16.
- [69] Whitesides, G.M. ve Grzybowski, B., (2002). "Self-assembly at all scales", *Science*, 295: 2418-2421.
- [70] Tadros, T. Izquierdo, P. Esquena, J. ve Solans, C., (2004). "Formation and stability of nano-emulsions", *Advances in colloid and interface science*, 108: 303-318.
- [71] Zhong, Q. ve Jin, M., (2009). "Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion", *Food Hydrocolloids*, 23: 2380-2387.
- [72] Chen, Y.-C. Yu, S.-H. Tsai, G.-J. Tang, D.-W. Mi, F.-L. ve Peng, Y.-P., (2010). "Novel technology for the preparation of self-assembled catechin/gelatin nanoparticles and their characterization", *Journal of agricultural and food chemistry*, 58: 6728-6734.
- [73] Grzelczak, M. Vermant, J. Furst, E.M. ve Liz-Marzan, L.M., (2010). "Directed self-assembly of nanoparticles", *ACS nano*, 4: 3591-3605.
- [74] Yi, K. Cheng, G. ve Xing, F., (2006). "Gelatin/tannin complex nanospheres via molecular assembly", *Journal of Applied Polymer Science*, 101: 3125-3130.
- [75] Özcan, İ., (2008). "Kemiğe Hedeflemek İçin Sentezlenen Biyolojik Parçalanabilen Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Tasıyıcı Sistemlerin

Tasarımı ve In Vitro–In Vivo Değerlendirilmesi", Ege Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

- [76] Derman, S. ve Akdeste, Z.M., (2013). "Polymeric nanoparticles", *Sigma*, 31: 107-120.
- [77] O'Donnell, P.B. ve McGinity, J.W., (1997). "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28: 25-42.
- [78] Lü, J.-M. Wang, X. Marin-Muller, C. Wang, H. Lin, P.H. Yao, Q. ve Chen, C., (2009). "Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology", *Expert review of molecular diagnostics*, 9: 325-341.
- [79] Vauthier, C. ve Bouchemal, K., (2009). "Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles", *Pharmaceutical research*, 26: 1025-1058.
- [80] Kumar, K.S. ve Jaikumar, V., (2011). "Gold and iron oxide nanoparticle-based ethylcellulose nanocapsules for cisplatin drug delivery", *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10: 415-424.
- [81] Akagi, T. Baba, M. ve Akashi, M., (2011). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine, ed. *Polymers in nanomedicine*. Springer, 247: 31-64.
- [82] Rao, J.P. ve Geckeler, K.E., (2011). "Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters", *Progress in polymer science*, 36: 887-913.
- [83] Allemann, E. Gurny, R. ve Doelker, E., (1993). "Drug-loaded nanoparticles: preparation methods and drug targeting issues", *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 39: 173-191.
- [84] Murakami, H. Kobayashi, M. Takeuchi, H. ve Kawashima, Y., (2000). "Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles", *Powder technology*, 107: 137-143.
- [85] Konan, Y.N. Gurny, R. ve Allémann, E., (2002). "Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles", *International journal of pharmaceuticals*, 233: 239-252.
- [86] Tamber, H. Johansen, P. Merkle, H.P. ve Gander, B., (2005). "Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 357-376.
- [87] Mundargi, R.C. Babu, V.R. Rangaswamy, V. Patel, P. ve Aminabhavi, T.M., (2008). "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives", *Journal of Controlled Release*, 125: 193-209.
- [88] Julienne, M. Alonso, M. Gomez Amoza, J. ve Benoit, J., (1992). "Preparation of poly (D, L-lactide/glycolide) nanoparticles of controlled particle size

- distribution: application of experimental designs", *Drug development and industrial pharmacy*, 18: 1063-1077.
- [89] Yoo, H.S. Oh, J.E. Lee, K.H. ve Park, T.G., (1999). "Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release", *Pharmaceutical research*, 16: 1114-1118.
- [90] Muthu, M., (2014). "Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview", *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 3: 266-273.
- [91] Wei, X. Gong, C. Gou, M. Fu, S. Guo, Q. Shi, S. Luo, F. Guo, G. Qiu, L. ve Qian, Z., (2009). "Biodegradable poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol) copolymers as drug delivery system", *International journal of pharmaceutics*, 381: 1-18.
- [92] Sah, H., (1999). "Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation", *Journal of Controlled Release*, 58: 143-151.
- [93] Panyam, J. Dali, M.M. Sahoo, S.K. Ma, W. Chakravarthi, S.S. Amidon, G.L. Levy, R.J. ve Labhasetwar, V., (2003). "Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D, L-lactide-co-glycolide) nano-and microparticles", *Journal of Controlled Release*, 92: 173-187.
- [94] Tsai, M.L. Bai, S.W. ve Chen, R.H., (2008). "Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle", *Carbohydrate polymers*, 71: 448-457.
- [95] Treuel, L. Eslahian, K. Docter, D. Lang, T. Zellner, R. Nienhaus, K. Nienhaus, G. Stauber, R. ve Maskos, M., (2014). "Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16: 15053-15067.
- [96] Gao, Y. Chen, K. Ma, J.-l. ve Gao, F., (2014). "Cerium oxide nanoparticles in cancer", *OncoTargets and therapy*, 7: 835-840.
- [97] Gürsoy, A., (2002). "Kontrollü salım sistemleri", *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği yayını*, İstanbul, 406s.
- [98] Cirpanli, Y. Bilensoy, E. Calis, S. ve Hincal, A., (2007). "Stabilization of camptothecin in PLGA nanoparticles", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1: 18-19.
- [99] Onelli, E. Prescianotto-Baschong, C. Caccianiga, M. ve Moscatelli, A., (2008). "Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold", *Journal of experimental botany*, 59: 3051-3068.
- [100] Kong, X.-f. Yang, B. Xiong, H. Zhou, Y. Xue, S.-g. Xu, B.-q. ve Wang, S.-x., (2014). "Selective removal of heavy metal ions from aqueous solutions with surface functionalized silica nanoparticles by different functional groups", *Journal of Central South University*, 21: 3575-3579.

- [101] Poma, A. Colafarina, S. Fontecchio, G. ve Chichiriccò, G., (2014). Transgenerational effects of NMs, ed. Nanomaterial. Springer, 811: 235-254.
- [102] Miralles, P. Church, T.L. ve Harris, A.T., (2012). "Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants", Environmental science & technology, 46: 9224-9239.
- [103] Sabir, S. Arshad, M. ve Chaudhari, S.K., (2014). "Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications", The Scientific World Journal, 2014: 1-8.
- [104] Grillo, R. Clemente, Z. de Oliveira, J.L. Campos, E.V.R. Chalupe, V.C. Jonsson, C.M. de Lima, R. Sanches, G. Nishisaka, C.S. ve Rosa, A.H., (2015). "Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: the influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity", Journal of hazardous materials, 286: 562-572.
- [105] Mishra, S. Keswani, C. Abhilash, P. Fraceto, L.F. ve Singh, H.B., (2017). "Integrated approach of agri-nanotechnology: challenges and future trends", Frontiers in plant science, 8: 471.
- [106] Bobo, D. Robinson, K.J. Islam, J. Thurecht, K.J. ve Corrie, S.R., (2016). "Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date", Pharmaceutical research, 33: 2373-2387.
- [107] Grillo, R. dos Santos, N.Z.P. Maruyama, C.R. Rosa, A.H. de Lima, R. ve Fraceto, L.F., (2012). "Poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation", Journal of hazardous materials, 231: 1-9.
- [108] Kashyap, P.L. Xiang, X. ve Heiden, P., (2015). "Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture", International journal of biological macromolecules, 77: 36-51.
- [109] Kollarigowda, R.H., (2017). "Recent view on pectin-based polysaccharide nanoscience and their biological applications", Nano LIFE, 7: 2.
- [110] Kheiri, A. Jorf, S.M. Malhipour, A. Saremi, H. ve Nikkhah, M., (2016). "Application of chitosan and chitosan nanoparticles for the control of Fusarium head blight of wheat (*Fusarium graminearum*) in vitro and greenhouse", International journal of biological macromolecules, 93: 1261-1272.
- [111] Sun, C. Shu, K. Wang, W. Ye, Z. Liu, T. Gao, Y. Zheng, H. He, G. ve Yin, Y., (2014). "Encapsulation and controlled release of hydrophilic pesticide in shell cross-linked nanocapsules containing aqueous core", International journal of pharmaceutics, 463: 108-114.
- [112] Kumar, S. Kumar, D. ve Dilbaghi, N., (2017). "Preparation, characterization, and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles", Environmental Science and Pollution Research, 24: 926-937.
- [113] Chauhan, N. Dilbaghi, N. Gopal, M. Kumar, R. Kim, K.-H. ve Kumar, S., (2017). "Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of

- hexaconazole", International journal of biological macromolecules, 97: 616-624.
- [114] Elieh-Ali-Komi, D. ve Hamblin, M.R., (2016). "Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials", International journal of advanced research, 4: 411-427.
- [115] Khan, F.I. Rahman, S. Queen, A. Ahamad, S. Ali, S. Kim, J. ve Hassan, M.I., (2017). "Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives", Applied microbiology and biotechnology, 101: 3513-3536.
- [116] Pelegrino, M.T. de Araújo, D.R. ve Seabra, A.B., (2018). "S-nitrosoglutathione-containing chitosan nanoparticles dispersed in Pluronic F-127 hydrogel: Potential uses in topical applications", Journal of Drug Delivery Science and Technology, 43: 211-220.
- [117] Yang, F.-L. Li, X.-G. Zhu, F. ve Lei, C.-L., (2009). "Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)", Journal of agricultural and food chemistry, 57: 10156-10162.
- [118] Pradhan, S. Roy, I. Lodh, G. Patra, P. Choudhury, S.R. Samanta, A. ve Goswami, A., (2013). "Entomotoxicity and biosafety assessment of PEGylated acephate nanoparticles: a biologically safe alternative to neurotoxic pesticides", Journal of Environmental Science and Health, Part B, 48: 559-569.
- [119] Pereira, A.E. Grillo, R. Mello, N.F. Rosa, A.H. ve Fraceto, L.F., (2014). "Application of poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment", Journal of hazardous materials, 268: 207-215.
- [120] González, J.W. Yeguerman, C. Marcovecchio, D. Delrieux, C. Ferrero, A. ve Band, B.F., (2016). "Evaluation of sublethal effects of polymer-based essential oils nanoformulation on the german cockroach", Ecotoxicology and environmental safety, 130: 11-18.
- [121] Mondal, P. Kumar, R. ve Gogoi, R., (2017). "Azomethine based nanochemicals: development, in vitro and in vivo fungicidal evaluation against *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*", Bioorganic chemistry, 70: 153-162.
- [122] Tong, Y. Wu, Y. Zhao, C. Xu, Y. Lu, J. Xiang, S. Zong, F. ve Wu, X., (2017). "Polymeric nanoparticles as a metolachlor carrier: water-based formulation for hydrophobic pesticides and absorption by plants", Journal of agricultural and food chemistry, 65: 7371-7378.
- [123] Soppimath, K.S. Aminabhavi, T.M. Kulkarni, A.R. ve Rudzinski, W.E., (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", Journal of Controlled Release, 70: 1-20.
- [124] Pascoli, M. Lopes-Oliveira, P.J. Fraceto, L.F. Seabra, A.B. ve Oliveira, H.C., (2018). "State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with

- agricultural applications: a minireview", *Energy, Ecology and Environment*, 3: 137-148.
- [125] Kumari, A. Yadav, S.K. ve Yadav, S.C., (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 75: 1-18.
- [126] Prokop, A. ve Davidson, J.M., (2008). "Nanovehicular intracellular delivery systems", *Journal of pharmaceutical sciences*, 97: 3518-3590.
- [127] Vert, M. Mauduit, J. ve Li, S., (1994). "Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity", *Biomaterials*, 15: 1209-1213.
- [128] Orunoğlu, M., (2014). "Deneysel Sıçan Beyin Tümörü Modelinde Polilaktik-Ko-Glikolik Asit (Plga) Nanopartikülüne Yüklü Curcuminin Etkisinin İzlenmesi" Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.
- [129] Panyam, J. ve Labhasetwar, V., (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 329-347.
- [130] Blanco, M. ve Alonso, M., (1997). "Development and characterization of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 43: 287-294.
- [131] Gentile, P. Chiono, V. Carmagnola, I. ve Hatton, P., (2014). "An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering", *International journal of molecular sciences*, 15: 3640-3659.
- [132] Schöll, I. Boltz-Nitulescu, G. ve Jensen-Jarolim, E., (2005). "Review of novel particulate antigen delivery systems with special focus on treatment of type I allergy", *Journal of Controlled Release*, 104: 1-27.
- [133] Faraji, A.H. ve Wipf, P., (2009). "Nanoparticles in cellular drug delivery", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17: 2950-2962.
- [134] Chaudhari, K.R. Kumar, A. Khandelwal, V.K.M. Ukawala, M. Manjappa, A.S. Mishra, A.K. Monkkonen, J. ve Murthy, R.S.R., (2012). "Bone metastasis targeting: a novel approach to reach bone using Zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel", *Journal of Controlled Release*, 158: 470-478.
- [135] Ho, M.L. Fu, Y.C. Wang, G.J. Chen, H.T. Chang, J.K. Tsai, T.H. ve Wang, C.K., (2008). "Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite", *Journal of Controlled Release*, 128: 142-148.
- [136] Varma, M.V. Kaushal, A.M. Garg, A. ve Garg, S., (2004). "Factors affecting mechanism and kinetics of drug release from matrix-based oral controlled drug delivery systems", *American Journal of drug delivery*, 2: 43-57.
- [137] Santo, V.E. Duarte, A.R.C. Gomes, M.E. Mano, J.F. ve Reis, R.L., (2010). "Hybrid 3D structure of poly (d, l-lactic acid) loaded with chitosan/chondroitin

- sulfate nanoparticles to be used as carriers for biomacromolecules in tissue engineering", *The Journal of Supercritical Fluids*, 54: 320-327.
- [138] Mahmoudifar, N. ve Doran, P.M., (2010). "Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglycolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions", *Biomaterials*, 31: 3858-3867.
- [139] Thevenot, P.T. Nair, A.M. Shen, J. Lotfi, P. Ko, C.-Y. ve Tang, L., (2010). "The effect of incorporation of SDF-1 α into PLGA scaffolds on stem cell recruitment and the inflammatory response", *Biomaterials*, 31: 3997-4008.
- [140] Hsu, S.-h. Chan, S.-H. Chiang, C.-M. Chen, C.C.-C. ve Jiang, C.-F., (2011). "Peripheral nerve regeneration using a microporous polylactic acid asymmetric conduit in a rabbit long-gap sciatic nerve transection model", *Biomaterials*, 32: 3764-3775.
- [141] Chronopoulou, L. Cutonilli, A. Cametti, C. Dentini, M. ve Palocci, C., (2012). "PLGA-based nanoparticles: effect of chitosan in the aggregate stabilization. A dielectric relaxation spectroscopy study", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 97: 117-123.
- [142] Faisant, N. Siepmann, J. ve Benoit, J., (2002). "PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15: 355-366.
- [143] Kundu, J. Chung, Y.-I. Kim, Y.H. Tae, G. ve Kundu, S., (2010). "Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release", *International journal of pharmaceutics*, 388: 242-250.
- [144] Kumar, S. Dilbaghi, N. Saharan, R. ve Bhanjana, G., (2012). "Nanotechnology as emerging tool for enhancing solubility of poorly water-soluble drugs", *BioNanoScience*, 2: 227-250.
- [145] Seabra, A. ve Duran, N., (2015). "Nanotoxicology of metal oxide nanoparticles", *Metals*, 5: 934-975.
- [146] Dalai, S. Iswarya, V. Bhuvaneshwari, M. Pakrashi, S. Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A., (2014). "Different modes of TiO₂ uptake by *Ceriodaphnia dubia*: Relevance to toxicity and bioaccumulation", *Aquatic toxicology*, 152: 139-146.
- [147] Pakrashi, S. Dalai, S. Sabat, D. Singh, S. Chandrasekaran, N. ve Mukherjee, A., (2011). "Cytotoxicity of Al₂O₃ nanoparticles at low exposure levels to a freshwater bacterial isolate", *Chemical research in toxicology*, 24: 1899-1904.
- [148] Kumar, A. Pandey, A.K. Singh, S.S. Shanker, R. ve Dhawan, A., (2011). "Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*", *Free Radical Biology and Medicine*, 51: 1872-1881.
- [149] Sohaebuddin, S.K. Thevenot, P.T. Baker, D. Eaton, J.W. ve Tang, L., (2010). "Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent", *Particle and fibre toxicology*, 7: 22.

- [150] Siddiqui, M.A. Ahamed, M. Ahmad, J. Khan, M.M. Musarrat, J. Al-Khedhairi, A.A. ve Alrokayan, S.A., (2012). "Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin", *Food and chemical toxicology*, 50: 641-647.
- [151] Chairuankitti, P. Lawanprasert, S. Roytrakul, S. Aueviriyavit, S. Phummiratch, D. Kulthong, K. Chanvorachote, P. ve Maniratanachote, R., (2013). "Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways", *Toxicology in vitro*, 27: 330-338.
- [152] Li, J.J. Hartono, D. Ong, C.-N. Bay, B.-H. ve Yung, L.-Y.L., (2010). "Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles", *Biomaterials*, 31: 5996-6003.
- [153] Gulati, N. ve Gupta, H., (2012). "Two faces of carbon nanotube: toxicities and pharmaceutical applications", *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 29: 65-88.
- [154] Aryal, S. Hu, C.-M.J. ve Zhang, L., (2009). "Polymer– cisplatin conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery", *ACS nano*, 4: 251-258.
- [155] Ghosh, M. Ghosh, I. Godderis, L. Hoet, P. ve Mukherjee, A., (2019). "Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842: 132-145.
- [156] Chichiricò, G. ve Poma, A., (2015). "Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants", *Nanomaterials*, 5: 851-873.
- [157] Sardoiwala, M.N. Kaundal, B. ve Choudhury, S.R., (2018). "Toxic impact of nanomaterials on microbes, plants and animals", *Environmental chemistry letters*, 16: 147-160.
- [158] Husen, A. ve Siddiqi, K.S., (2014). "Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application", *Nanoscale research letters*, 9: 229.
- [159] Bennett, B.L. Littlejohn, L.F. Kheirabadi, B.S. Butler, F.K. Kotwal, R.S. Dubick, M.A. ve Bailey, J.A., (2014). Management of External Hemorrhage in Tactical Combat Casualty Care: Chitosan-Based Hemostatic Gauze Dressings. *TCCC Guidelines Change 13-05*: 12-29.
- [160] Amani, A. Zare, N. Asadi, A. ve Zakaria, R.A., (2018). "Ultrasound-enhanced gene delivery to alfalfa cells by hPAMAM dendrimer nanoparticles", *Turkish Journal of Biology*, 42: 63-75.
- [161] Klug, W.S., (2011). "Genetik Kavramlar, çev", Editörü: Cihan Öner et al. Ankara: Palme Publishing.
- [162] Briefs, I., (2017). "Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years" *ISAAA Brief No. 53*. ISAAA: Ithaca, NewYork.
- [163] Rashid, A.H.A. ve Lateef, D.D., (2016). "Novel techniques for gene delivery into plants and its applications for disease resistance in crops", *American Journal of Plant Sciences*, 7: 181-193.

- [164] Braun, A.C. ve Laskaris, T., (1942). "Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth-promoting substances", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 28: 468-477.
- [165] Anami, S. Njuguna, E. Coussens, G. Aesaert, S. ve Van Lijsebettens, M., (2013). "Higher plant transformation: principles and molecular tools", *International Journal of Developmental Biology*, 57: 483-494.
- [166] Rai, M. Deshmukh, S. ve Gade, A., (2012). "Strategic Nanoparticle-mediated gene transfer in plants and animals-a novel approach", *Current Nanoscience*, 8: 170-179.
- [167] Baur, A. Kaufmann, F. Rolli, H. Weise, A. Luethje, R. Berg, B. Braun, M. Baeumer, W. Kietzmann, M. ve Reski, R., (2005). "A fast and flexible PEG-mediated transient expression system in plants for high level expression of secreted recombinant proteins", *Journal of biotechnology*, 119: 332-342.
- [168] Wang, H. Wang, W. Zhan, J. Huang, W. ve Xu, H., (2015). "An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes", *Scientia Horticulturae*, 191: 82-89.
- [169] Tan, B. Xu, M. Chen, Y. ve Huang, M., (2013). "Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114: 11-18.
- [170] Barampuram, S. ve Zhang, Z.J., (2011). Recent advances in plant transformation, ed. *Plant Chromosome Engineering*. Springer, 701: 1-35.
- [171] Davey, M.R. Anthony, P. Power, J.B. ve Lowe, K.C., (2005). "Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives", *Biotechnology advances*, 23: 131-171.
- [172] Cao, J. Yao, D. Lin, F. ve Jiang, M., (2014). "PEG-mediated transient gene expression and silencing system in maize mesophyll protoplasts: a valuable tool for signal transduction study in maize", *Acta physiologiae plantarum*, 36: 1271-1281.
- [173] Saumonneau, A. Laloi, M. Lallemand, M. Rabot, A. ve Atanassova, R., (2011). "Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid", *Journal of experimental botany*, 63: 1495-1510.
- [174] Zhang, Y. Su, J. Duan, S. Ao, Y. Dai, J. Liu, J. Wang, P. Li, Y. Liu, B. ve Feng, D., (2011). "A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes", *Plant methods*, 7: 30.
- [175] Allison, Lizabeth A., (2012) "Recombinant DNA technology and molecular cloning". *Fundamental Molecular Biology*, Wiley-Blackwell, Oxford.
- [176] Graessmann, A. Graessmann, M. Hoffmann, H. ve Niebel, J., (1974). "Inhibition by interferon of SV40 tumor antigen formation in cells injected with SV40 cRNA transcribed in vitro", *FEBS letters*, 39: 249-251.

- [177] Capecchi, M.R., (1980). "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells", *Cell*, 22: 479-488.
- [178] Mehier-Humbert, S. ve Guy, R.H., (2005). "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 733-753.
- [179] Das, A. Gupta, P. ve Chakraborty, D., (2015). "Physical methods of gene transfer: Kinetics of gene delivery into cells: A Review", *Agricultural Reviews*, 36: 61-66.
- [180] Celis, J.E., (1984). "Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques", *Biochemical Journal*, 223: 281-291.
- [181] Sanford, J.C., (1988). "The biolistic process", *Trends in biotechnology*, 6: 299-302.
- [182] Gordon-Kamm, W.J. Spencer, T.M. Mangano, M.L. Adams, T.R. Daines, R.J. Start, W.G. O'Brien, J.V. Chambers, S.A. Adams, W.R. ve Willetts, N.G., (1990). "Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants", *The Plant Cell*, 2: 603-618.
- [183] Klein, T.M. Arentzen, R. Lewis, P.A. ve Fitzpatrick-McElligott, S., (1992). "Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment", *Bio/technology*, 10: 286-291.
- [184] Rivera, A.L. Gomez-Lim, M. Fernandez, F. ve Loske, A.M., (2012). "Physical methods for genetic plant transformation", *Physics of life reviews*, 9: 308-345.
- [185] VanBuren, R. ve Ming, R., (2014). Sequencing and assembly of the transgenic papaya genome, ed. *Genetics and genomics of papaya*. Springer, 187-203.
- [186] Klein, T.M., (2011). "Particle bombardment: An established weapon in the arsenal of plant biotechnologists", *Plant Transformation Technologies*, Wiley-Blackwell, Oxford.
- [187] Nakamura, H. ve Funahashi, J., (2013). "Electroporation: past, present and future", *Development, growth & differentiation*, 55: 15-19.
- [188] Fromm, M.E. Taylor, L.P. ve Walbot, V., (1986). "Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation", *Nature*, 319: 791-793.
- [189] Rivera, A.L. Magana-Ortiz, D. Gomez-Lim, M. Fernandez, F. ve Loske, A.M., (2014). "Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast", *Physics of life reviews*, 11: 184-203.
- [190] Bahi, M. Tsaloglou, M.-N. Mowlem, M. ve Morgan, H., (2010). "Electroporation and lysis of marine microalga *Karenia brevis* for RNA extraction and amplification", *Journal of The Royal Society Interface*, 8: 601-608.
- [191] Fromm, M. Taylor, L.P. ve Walbot, V., (1985). "Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 5824-5828.

- [192] Mischke, S. Saunders, J.A. ve Owens, L., (1986). "A versatile low-cost apparatus for cell electrofusion and other electrophysiological treatments", *Journal of biochemical and biophysical methods*, 13: 65-75.
- [193] Potter, H. ve Heller, R., (2018). "Transfection by electroporation", *Current protocols in molecular biology*, 121(9.3): 1-13.
- [194] Tsong, T.Y., (1989). *Electroporation of cell membranes*, ed. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. In: Neumann E., Sowers A.E., Jordan C.A. (eds) Springer, Boston, MASpringer, 149-163.
- [195] Uchida, M. Natsume, H. Kobayashi, D. Sugibayashi, K. ve Morimoto, Y., (2002). "Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a Helios™ gun system", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25: 690-693.
- [196] Gehl, J., (2003). "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research", *Acta Physiologica Scandinavica*, 177: 437-447.
- [197] Chang, D. ve Reese, T.S., (1990). "Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy", *Biophysical journal*, 58: 1-12.
- [198] Neumann, E. Schaefer-Ridder, M. Wang, Y. ve Hofschneider, P., (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields", *The EMBO journal*, 1: 841-845.
- [199] Xiayi, K. Xiuwen, Z. Heping, S. ve Baojian, L., (1996). "Electroporation of immature maize zygotic embryos and regeneration of transgenic plants", *Transgenic research*, 5: 219-221.
- [200] Kaeppler, H.F. Gu, W. Somers, D.A. Rines, H.W. ve Cockburn, A.F., (1990). "Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells", *Plant cell reports*, 9: 415-418.
- [201] Akram, Z. Ali, S. Ali, G.M. Zafar, Y. Shah, Z.H. ve Alghabari, F., (2016). "Whisker-mediated transformation of peanut with chitinase gene enhances resistance to leaf spot disease", *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16: 108-114.
- [202] Arshad, M. Zafar, Y. ve Asad, S., (2013). *Silicon Carbide Whisker-Mediated Transformation of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)*, ed. *Transgenic Cotton*. Springer, 958: 79-92.
- [203] Coffee, R. ve Dunwell, J.M., (1994). *Transformation of plant cells: Google Patents, USOO5302523A 11 Patent Number: (45) Date of Patent: 5,302,523.*
- [204] Dalton, S. Bettany, A.J. Timms, E. ve Morris, P., (1998). "Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures", *Plant Science*, 132: 31-43.

- [205] Rakoczy-Trojanowska, M., (2002). "Alternative methods of plant transformation-a short review", Cellular and molecular biology letters, 7: 849-858.
- [206] Wang, K. Drayton, P. Frame, B. Dunwell, J. ve Thompson, J., (1995). "Whisker-mediated plant transformation: an alternative technology", In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 31: 101-104.
- [207] Mutsuddy, B.C., (1990). "Abstract", Journal of the American Ceramic Society, 73: 2747-2749.
- [208] Rao, A.Q. Bakhsh, A. Kiani, S. Shahzad, K. Shahid, A.A. Husnain, T. ve Riazuddin, S., (2009). "The myth of plant transformation", Biotechnology advances, 27: 753-763.
- [209] Songstad, D. Somers, D. ve Griesbach, R., (1995). "Advances in alternative DNA delivery techniques", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40: 1-15.
- [210] Vaughan, G.L. Jordan, J. ve Karr, S., (1991). "The toxicity, in vitro, of silicon carbide whiskers", Environmental research, 56: 57-67.
- [211] Svensson, I. Artursson, E. Leanderson, P. Berglind, R. ve Lindgren, F., (1997). "Toxicity in vitro of some silicon carbides and silicon nitrides: whiskers and powders", American journal of industrial medicine, 31: 335-343.
- [212] Yamagishi, N. Terauchi, H. Kanematsu, S. ve Hidaka, S., (2006). "Biolistic inoculation of soybean plants with soybean dwarf virus", Journal of virological methods, 137: 164-167.
- [213] Trick, H. ve Finer, J., (1998). "Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue", Plant cell reports, 17: 482-488.
- [214] Quan, Z. Yongping, Z. Guangdong, W. Weiming, G. ve Zhiguo, Z., (2011). "Sonication assisted Agrobacterium-mediated transformation of chalcone synthase (CHS) gene to spring *Dendrobium cultivar 'Sanya'*", African Journal of Biotechnology, 10: 11832-11838.
- [215] Sawahel, W. ve Fukui, K., (1995). "Gene cloning in plants: innovative approaches", BioTechniques, 19: 105-114.
- [216] Georgiev, M.I. Ludwig-Müller, J. Alipieva, K. ve Lippert, A., (2011). "Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation", Plant cell reports, 30: 859-866.
- [217] Deshayes, A. Herrera-Estrella, L. ve Caboche, M., (1985). "Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid", The EMBO journal, 4: 2731-2737.
- [218] Subramanyam, K. Subramanyam, K. Sailaja, K. Srinivasulu, M. ve Lakshmidivi, K., (2011). "Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration", Plant cell reports, 30: 425-436.

- [219] Liu, Y. Yang, H. ve Sakanishi, A., (2006). "Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation", *Biotechnology advances*, 24: 1-16.
- [220] de Oliveira, M.L.P. Febres, V.J. Costa, M.G.C. Moore, G.A. ve Otoni, W.C., (2009). "High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration", *Plant cell reports*, 28: 387.
- [221] Liu, Z. Park, B.-J. Kanno, A. ve Kameya, T., (2005). "The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene", *Molecular Breeding*, 16: 189.
- [222] Joersbo, M. ve Brunstedt, J., (1990). "Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication", *Plant cell reports*, 9: 207-210.
- [223] Joersbo, M. ve Brunstedt, J., (1992). "Sonication: a new method for gene transfer to plants", *Physiologia Plantarum*, 85: 230-234.
- [224] Bommannan, D. Menon, G.K. Okuyama, H. Elias, P.M. ve Guy, R.H., (1992). "Sonophoresis. II. Examination of the mechanism (s) of ultrasound-enhanced transdermal drug delivery", *Pharmaceutical research*, 9: 1043-1047.
- [225] Miller, D.L. Pislaru, S.V. ve Greenleaf, J.F., (2002). "Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation", *Somatic cell and molecular genetics*, 27: 115-134.
- [226] Tachibana, K. Uchida, T. Ogawa, K. Yamashita, N. ve Tamura, K., (1999). "Induction of cell-membrane porosity by ultrasound", *The Lancet*, 353: 1409.
- [227] Trick, H.N. ve Finer, J.J., (1997). "SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation", *Transgenic research*, 6: 329-336.
- [228] Wyber, J.A. Andrews, J. ve D'emanuele, A., (1997). "The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells", *Pharmaceutical research*, 14: 750-756.
- [229] Frame, B.R. Drayton, P.R. Bagnall, S.V. Lewnau, C.J. Bullock, W.P. Wilson, H.M. Dunwell, J.M. Thompson, J.A. ve Wang, K., (1994). "Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation", *The Plant Journal*, 6: 941-948.
- [230] Subramanyam, K. Arunachalam, C. Thaneswari, R.M. Sulaiman, A.A. Manickavasagam, M. ve Ganapathi, A., (2015). "Highly efficient *Agrobacterium*-mediated in planta genetic transformation of snake gourd (*Tricosanthes cucumerina* L.)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123: 133-142.
- [231] Yenchon, S. ve Te-chato, S., (2015). "Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated gene transformation of oil palm secondary somatic embryo", *Kasetsart Journal, Natural Science*, 49: 319-326.
- [232] Beranová, M. Rakouský, S. Vávrová, Z. ve Skalický, T., (2008). "Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation

efficiency in flax (*Linum usitatissimum L.*)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94: 253-259.

- [233] Tang, W. Sederoff, R. ve Whetten, R., (2001). "Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda L.*) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*", *Planta*, 213: 981-989.
- [234] Sawahel, W.A., (1996). "Ultrasound-mediated stable transformation of potato tuber discs", *Biotechnology techniques*, 10: 821-824.
- [235] Darbani, B. Farajnia, S. Toorchi, M. Zakerbostanabad, S. Noeparvar, S. ve Stewart, C., (2008). "DNA-delivery methods to produce transgenic plants", *Biotechnology*, 7: 385-402.
- [236] Zeqiri, B., (2003). "Exposure criteria for medical diagnostic ultrasound: II. Criteria based on all known mechanisms:(NCRP Report No. 140) National Council on Radiation Protection and Measurements (NCRP), 2002", *Ultrasound in Medicine and Biology*, 29: 1809-1810.
- [237] Zarnitsyn, V. Rostad, C.A. ve Prausnitz, M.R., (2008). "Modeling transmembrane transport through cell membrane wounds created by acoustic cavitation", *Biophysical journal*, 95: 4124-4138.
- [238] Santarem, E. Trick, H. Essig, J. ve Finer, J., (1998). "Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression", *Plant cell reports*, 17: 752-759.
- [239] Zhang, L.-J. Cheng, L.-M. Xu, N. Zhao, N.-M. Li, C.-G. Yuan, J. ve Jia, S.-R., (1991). "Efficient transformation of tobacco by ultrasonication", *Bio/technology*, 9: 996-997.
- [240] Weber, S. Friedt, W. Landes, N. Molinier, J. Himber, C. Rousselin, P. Hahne, G. ve Horn, R., (2003). "Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus L.*): assessment of macerating enzymes and sonication", *Plant cell reports*, 21: 475-482.
- [241] Zaragoza, C. Munoz-Bertomeu, J. ve Arrillaga, I., (2004). "Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT", *Plant cell reports*, 22: 832-838.
- [242] Kumar, V. Sharma, A. Narasimha Prasad, B.C. Bhaskar Gururaj, H. ve Aswathanarayana Ravishankar, G., (2006). "*Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment", *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 349-357.
- [243] Trick, H.N., (1997). "Recent advances in soybean transformation", *Plant Tissue Cult. Biotech.*, 3: 9-26.
- [244] González, E.R. de Andrade, A. Bertolo, A.L. Lacerda, G.C. Carneiro, R.T. Defávani, V.A.P. Labate, M.T.V. ve Labate, C.A., (2002). "Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system", *Functional plant biology*, 29: 97-102.

- [245] Pathak, M.R. ve Hamzah, R.Y., (2008). "An effective method of sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of chickpeas", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 65-71.
- [246] Tang, W. Lin, J. ve Newton, R.J., (2007). "Okadaic acid and trifluoperazine enhance Agrobacterium-mediated transformation in eastern white pine", *Plant cell reports*, 26: 673-682.
- [247] Greenleaf, W.J. Bolander, M.E. Sarkar, G. Goldring, M.B. ve Greenleaf, J.F., (1998). "Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection", *Ultrasound in medicine & biology*, 24: 587-595.
- [248] Lawrie, A. Brisken, A. Francis, S. Cumberland, D. Crossman, D. ve Newman, C., (2000). "Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery", *Gene therapy*, 7: 2023-2027.
- [249] Lu, Q. Liang, H.D. Partridge, T. ve Blomley, M.J., (2003). "Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage", *Gene therapy*, 10: 396-405.
- [250] Rai, M. Bansod, S. Bawaskar, M. Gade, A. dos Santos, C.A. Seabra, A.B. ve Duran, N., (2015). Nanoparticles-based delivery systems in plant genetic transformation, ed. *Nanotechnologies in Food and Agriculture*. Springer, 209-239.
- [251] Torney, F. Trewyn, B.G. Lin, V.S.-Y. ve Wang, K., (2007). "Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants", *Nature nanotechnology*, 2: 295-300.
- [252] Martin-Ortigosa, S. Peterson, D.J. Valenstein, J.S. Lin, V.S.-Y. Trewyn, B.G. Lyznik, L.A. ve Wang, K., (2014). "Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular Cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision", *Plant physiology*, 164: 537-547.
- [253] Finiuk, N. Buziashvili, A. Burlaka, O. Zaichenko, A. Mitina, N. Miagkota, O. Lobachevska, O. Stoika, R. Blume, Y. ve Yemets, A., (2017). "Investigation of novel oligoelectrolyte polymer carriers for their capacity of DNA delivery into plant cells", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131: 27-39.
- [254] Zhao, X. Meng, Z. Wang, Y. Chen, W. Sun, C. Cui, B. Cui, J. Yu, M. Zeng, Z. ve Guo, S., (2017). "Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers", *Nature plants*, 3: 956-964.
- [255] Hao, Y. Yang, X. Shi, Y. Song, S. Xing, J. Marowitch, J. Chen, J. ve Chen, J., (2013). "Magnetic gold nanoparticles as a vehicle for fluorescein isothiocyanate and DNA delivery into plant cells", *Botany*, 91: 457-466.
- [256] Liu, J. Wang, F.-h. Wang, L.-l. Xiao, S.-y. Tong, C.-y. Tang, D.-y. ve Liu, X.-m., (2008). "Preparation of fluorescence starch-nanoparticle and its application as plant transgenic vehicle", *Journal of Central South University of Technology*, 15: 768-773.

- [257] Burlaka, O. Pirko, Y.V. Yemets, A. ve Blume, Y.B., (2015). "Plant genetic transformation using carbon nanotubes for DNA delivery", *Cytology and genetics*, 49: 349-357.
- [258] Naqvi, S. Maitra, A. Abdin, M. Akmal, M. Arora, I. ve Samim, M., (2012). "Calcium phosphate nanoparticle mediated genetic transformation in plants", *Journal of Materials Chemistry*, 22: 3500-3507.
- [259] Chang, F.-P. Kuang, L.-Y. Huang, C.-A. Jane, W.-N. Hung, Y. Yue-ie, C.H. ve Mou, C.-Y., (2013). "A simple plant gene delivery system using mesoporous silica nanoparticles as carriers", *Journal of Materials Chemistry B*, 1: 5279-5287.
- [260] Jiang, L. Ding, L. He, B. Shen, J. Xu, Z. Yin, M. ve Zhang, X., (2014). "Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA", *Nanoscale*, 6: 9965-9969.
- [261] Demirer, G.S. Zhang, H. Matos, J. Chang, R. Chio, L. Staskawicz, B. ve Landry, M.P., (2018). "High aspect ratio nanomaterials enable biomolecule delivery and transgene expression or silencing in mature plants", *Nature Nanotechnology*, 14: 456-464.
- [262] Kumar, M.R. Muzzarelli, R.A. Muzzarelli, C. Sashiwa, H. ve Domb, A., (2004). "Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives", *Chemical reviews*, 104: 6017-6084.
- [263] Skoog, D.A. ve West, D.M., (1981). "Principles of Instrumental Analysis, Saunders Golden Sunburst Series, Edition 2, Saunders College Pub, Philadelphia.
- [264] Liu, Y. Peterson, D.A. Kimura, H. ve Schubert, D., (1997). "Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction", *Journal of neurochemistry*, 69: 581-593.
- [265] Abe, K. ve Matsuki, N., (2000). "Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT", *Neuroscience research*, 38: 325-329.
- [266] Singh, N.P. McCoy, M.T. Tice, R.R. ve Schneider, E.L., (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Experimental cell research*, 175: 184-191.
- [267] Fidan, A., (2008). "DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektrofrezisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi", *Fen Bilimleri Dergisi*, 8: 41-52.
- [268] Dhawan, A. Bajpayee, M.M. Pandey, A.K. ve Parmar, D., (2003). "Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment", *Sigma*, 1077: 1-10.
- [269] Bancroft, J.D. Floyd, A.D. ve Suvarna, S.K., (2013). "Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques" 7th Edition, Churchill Livingstone Elsevier, Oxford.

- [270] Ananta, J.S. Paulmurugan, R. ve Massoud, T.F., (2016). "Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation", *Neurological research*, 38: 51-59.
- [271] Roy, M. Pal, R. ve Chakraborti, A.S., (2017). "Pelargonidin-PLGA nanoparticles: Fabrication, characterization, and their effect on streptozotocin induced diabetic rats" *Indian Journal of Experimental Biology*, 55: 819-830.
- [272] Mohammadi-Samani, S. ve Taghipour, B., (2015). "PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches", *Pharmaceutical development and technology*, 20: 385-393.
- [273] Hariharan, S. Bhardwaj, V. Bala, I. Sitterberg, J. Bakowsky, U. ve Kumar, M.R., (2006). "Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy", *Pharmaceutical research*, 23: 184-195.
- [274] Brannon-Peppas, L. ve Blanchette, J.O., (2012). "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 206-212.
- [275] Palocci, C. Valletta, A. Chronopoulou, L. Donati, L. Bramosanti, M. Brasili, E. Baldan, B. ve Pasqua, G., (2017). "Endocytic pathways involved in PLGA nanoparticle uptake by grapevine cells and role of cell wall and membrane in size selection", *Plant cell reports*, 36: 1917-1928.
- [276] Chronopoulou, L. Massimi, M. Giardi, M.F. Cametti, C. Devirgiliis, L.C. Dentini, M. ve Palocci, C., (2013). "Chitosan-coated PLGA nanoparticles: a sustained drug release strategy for cell cultures", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 103: 310-317.
- [277] Miller, D.L. ve Thomas, R.M., (1993). "Ultrasonic gas body activation in Elodea leaves and the mechanical index", *Ultrasound in Medicine and Biology*, 19: 343-351.
- [278] Deng, C.X. Sieling, F. Pan, H. ve Cui, J., (2004). "Ultrasound-induced cell membrane porosity", *Ultrasound in medicine & biology*, 30: 519-526.
- [279] Fleischer, A. O'Neill, M.A. ve Ehwald, R., (1999). "The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II", *Plant physiology*, 121: 829-838.
- [280] Navarro, E. Baun, A. Behra, R. Hartmann, N.B. Filser, J. Miao, A.-J. Quigg, A. Santschi, P.H. ve Sigg, L., (2008). "Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi", *Ecotoxicology*, 17: 372-386.
- [281] Rico, C.M. Majumdar, S. Duarte-Gardea, M. Peralta-Videa, J.R. ve Gardea-Torresdey, J.L., (2011). "Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain", *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: 3485-3498.

- [282] Hischemöller, A. Nordmann, J. Ptacek, P. Mummenhoff, K. ve Haase, M., (2009). "In-vivo imaging of the uptake of upconversion nanoparticles by plant roots", *Journal of biomedical nanotechnology*, 5: 278-284.
- [283] Wise Sr, J.P. Goodale, B.C. Wise, S.S. Craig, G.A. Pongan, A.F. Walter, R.B. Thompson, W.D. Ng, A.-K. Aboueissa, A.-M. ve Mitani, H., (2010). "Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells", *Aquatic toxicology*, 97: 34-41.
- [284] Moreno-Olivas, F. Gant, V.U. Johnson, K.L. Peralta-Videa, J.R. ve Gardea-Torresdey, J.L., (2014). "Random amplified polymorphic DNA reveals that TiO₂ nanoparticles are genotoxic to *Cucurbita pepo*", *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 15: 618-623.
- [285] Setyawati, M.I. Khoo, P.K.S. Eng, B.H. Xiong, S. Zhao, X. Das, G.K. Tan, T.T.Y. Loo, J.S.C. Leong, D.T. ve Ng, K.W., (2013). "Cytotoxic and genotoxic characterization of titanium dioxide, gadolinium oxide, and poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblasts", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101: 633-640.
- [286] Kumari, M. Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N., (2009). "Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*", *Science of the Total Environment*, 407: 5243-5246.
- [287] López-Moreno, M.L. de la Rosa, G. Hernández-Viezcas, J.Á. Castillo-Michel, H. Botez, C.E. Peralta-Videa, J.R. ve Gardea-Torresdey, J.L., (2010). "Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants", *Environmental science & technology*, 44: 7315-7320.
- [288] Castiglione, M.R. Giorgetti, L. Geri, C. ve Cremonini, R., (2011). "The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L", *Journal of Nanoparticle Research*, 13: 2443-2449.
- [289] Santos, A.R. Miguel, A.S. Macovei, A. Maycock, C. Balestrazzi, A. Oliva, A. ve Fevereiro, P., (2013). "CdSe/ZnS Quantum Dots trigger DNA repair and antioxidant enzyme systems in *Medicago sativa* cells in suspension culture", *BMC biotechnology*, 13: 111.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Esmâ ULUSOY
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.01.1976, Gölhisar-BURDUR
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
E-posta : esmaefe@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyoloji	19 Mayıs Üniversitesi, Samsun	2005
Lisans	Biyoloji Eğitimi (İngilizce)	Marmara Üniversitesi, İstanbul	1998
Lise	Fen	Şehit Ali İhsan Kalmaz Lisesi, Isparta	1992

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2010 – Halen	Kadir Has Anadolu Lisesi, İstanbul	Biyoloji Öğretmeni
2006 – 2010	Prof. Faik Somer Anadolu Lisesi, İstanbul	Biyoloji Öğretmeni
2003 – 2006	Milli Piyango Anadolu Lisesi, Samsun	Biyoloji Öğretmeni

Ocak- Temmuz 2003	19 Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Samsun	Biyoloji Bölümü (Histoloji Lab. Dersi Asistanlığı- Gönüllü)
Ocak- Temmuz 2002	19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun	Patoloji Teknikeri (Gönüllü)
1998 – 2003	Atakent İlköğretim Okulu, Samsun	İngilizce Öğretmeni

YAYINLARI

Makale

1. Ulusoy, E. ve Eren, B., (2006). "Histological changes of liver glycogen storage in mice (*Mus musculus*) caused by high-protein diets", *Histology and histopathology*, 21: 925-930.
2. Ulusoy, E. ve Eren, B., (2008). "Histological changes on liver glycogen storage in mice (*Mus musculus*) caused by unbalanced diets", *Clinical medicine. Pathology*, :1 69–75.
3. Ulusoy, E. Derman, S. ve Erisen, S., (2019). "The Cellular Uptake, Distribution and Toxicity of Poly (lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles in *Medicago sativa* Suspension Culture". *Rom. Biotechnol. Lett.*, Accepted, December, 18, 2018. DOI: 10.26327/RBL2019.253

Bildiri

1. Ulusoy, E. ve Eren, B., (2006). "Farelerin (*Mus musculus*) Karaciğer Glikojen Depoları Üzerine Yüksek-Protein Diyetlerinin Işık Mikroskobu Düzeyinde Araştırılması", 6 / 26-30 Haziran 2006, XVIII. **Ulusal Biyoloji Kongresi**, Kuşadası, Aydın. Bildiri sunumu
2. Ulusoy, E., Güven, T. and Erişen, S. (2016). "Gene therapy and stem cell interventions: A bioethical perspective", ICFAS 2016 22nd to 26th August 2016 **International Congress on Fundamental and Applied Sciences / Istanbul, Turkey**. Bildiri sunumu

Proje

- 1. DOP Proje-** Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araş. Koordinatörlüğü, (2018-Halen) “Yonca-*Medicago sativa*- Süspansiyon Kùltürlerinde Floresans İşaretli Poli (Laktik-ko-glikolik) Asit NP’lerinin Hücreye Alımı ve Dağılımının Araştırılması.
- 2. Bilim ve Toplum Projesi,** TÜBİTAK Ortaöğretim Proje Yarışması TÜBİTAK-Asya Bölge sergisi finalisti- 07.04.2009, **Proje yürütücüsü.**
- 3. Erguvan Çevre Ödülleri Finalisti,** İstanbul Çevre ve Orman Müdürlüğü- 09.04.2008, **Proje yürütücüsü.**
- 4. Avrupa Birliğı Projesi,** Ulusal Ajans, Comenius Projesi – Ağustos 2012 -2014, **Uzman.**

ÖDÜLLERİ

- 1. Bilim ve Toplum Etkinliğı,** İstanbul Milli Eğitim Müdürlüğü, Eğitimde İyi Örnekler- 2018 Paylaşım Sergisi "Bağımsız Yaşam Bir Seçimdir" adlı proje ile 100 proje arasına girdi, **Proje yürütücüsü.**