

**FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ'DE  
GEN TEDAVİSİ AMAÇLI PLAZMİT  
DNA TAŞIYICI KATYONİK KATI-LİPİT  
NANO- veya MİKROPARTİKÜLLERİN  
HAZIRLANMASI ÇALIŞMALARI**

**Uzm. Ecz. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU  
DOKTORA TEZİ**

**FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ'DE  
GEN TEDAVİSİ AMAÇLI PLAZMİT  
DNA TAŞIYICI KATYONİK KATI-LİPİT  
NANO- veya MİKROPARTİKÜLLERİN  
HAZIRLANMASI ÇALIŞMALARI**

**Uzm. Ecz. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU**

Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği uyarınca  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda  
**DOKTORA TEZİ**  
olarak hazırlanmıştır.

**Danışman: Prof. Dr. E. Yasemin YAZAN**

Ocak 2005

## JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

**Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'** nun " Farmasötik Biyoteknoloji'de Gen Tedavisi Amaçlı Plazmit DNA Bağlanabilecek Katyonik Katı-Lipit Nano-veya Mikropartiküllerin Hazırlanması ve Tanınması Çalışmaları" başlıklı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 11.01.2005 tarihinde, aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir

ÜYE (Tez Danışmanı) : **Prof.Dr Yasemin YAZAN**

ÜYE : **Prof.Dr. Filiz ÖNER**

ÜYE : **Prof.Dr. Merih KIVANÇ**

ÜYE : **Yard.Doç.Dr. Müzeyyen DEMİREL**

ÜYE : **Yard.Doç.Dr. Lütfi GENÇ**

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 05.01.2005 tarih ve 01/1 Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

**Enstitü Müdürü**  
**Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK**



## ÖZET

Büyük DNA molekülleri, yalnızca katyonik lipit ve polimerler gibi sentetik vektörler kullanılarak hücre içine sokulabilmektedir. DNA-katyonik lipit partikülleri genellikle pozitif yüklüdür ve negatif yüklü biyolojik membranlarla etkileşerek hücreye geçerler.

Bu çalışmada, formülasyonu yapılan katı katyonik lipit mikropartiküllere plazmit (pUC18) bağlanmış ve *in vitro* jel elektroforezi ile plazmit bağlama oranları kontrolü yapılmıştır. Katyonik lipit partiküllerin karakterizasyonunda pH, çözünürlük, boyut dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmış, X-ışını kırınımı ve termal analiz yöntemleri kullanılmış ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan farklı formülasyonların süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş şekillerinin farklı sıcaklık koşullarında davranışları incelenmiştir.

Formülasyon hazırlanması sırasında uygulanan sıcaklıkla düşen zeta potansiyelin pDNA ile bağlanma oranında da azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Formülasyonların süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş şekillerinin, farklı koşullar altında partikül boyutlarında ve partikül dağılımlarında anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

Termal analiz sonucunda elde edilen verilerde, piklerin kaybolmaması ve yeni bir pikin ortaya çıkmaması, partiküler yapıda etkileşme veya geçimsizlik olmadığını göstermektedir.

Katyonik lipit oranı arttırıldıkça, artan özellikte zeta potansiyel değerleri saptanmıştır. Formülasyonların zeta potansiyellerinde taze hazırlanmış hallerine oranla oldukça anlamlı düşme gözlenmiştir.

Sonuç olarak, katı lipit nanopartiküller ile kararlı yapıda DNA kompleksleri oluşturabileceği ve yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda, hazırlanan formülasyonların genetik materyal taşıyabilme özelliğine sahip olduğu bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** katyonik katı lipit partikül, pDNA, *in vitro* değerlendirme

## ABSTRACT

Large DNA molecules can be delivered into cells only by using synthetic vectors like cationic lipids and polymers. DNA-cationic lipid particles are usually positively charged and permeate into the cells by interacting with the biological membranes.

In this study, plasmid (pUC18) was incorporated into solid lipid particles formulated and the incorporation ratios were controlled using *in vitro* gel electrophoresis. For the characterization of cationic lipid particles, pH, solubility, size distribution and zeta potential measurements were done, X-ray diffraction and thermal analysis methods were used and stability studies were achieved.

Behaviours of filtered, autoclaved and lyophilized forms of the different formulations prepared were investigated at various temperature conditions.

Decrease in zeta potential by the temperature applied during formulation preparation shows the decrease in pDNA incorporation ratio owing to the reduction in zeta potential.

No significant differences were observed in particle sizes and distributions of the filtered, autoclaved and lyophilized forms of the formulations under different conditions.

No loss in peaks and no appearance of new peaks in the data obtained as a result of thermal analysis shows that there is no interaction or incompatibility in particular structure.

Increase in zeta potential values was determined as the cationic lipid ratio was increased. Significant decrease in zeta potentials was observed in formulations relative to the freshly prepared form.

Conclusively, it was found that stable DNA complexes could be formed with solid lipid nanoparticles. It was also found as a result of *in vitro* studies that there is the capability of genetic material delivery of the formulations prepared.

**Key Words:** cationic solid lipid particle, pDNA, *in vitro* evaluation

## TEŞEKKÜR

Bana tüm bu çalışmam boyunca her türlü olanağı sağlayan, bilgi, yardım ve desteklerini esirgemeyen, sonsuz anlayış ve iyi niyet gösteren, danışman hocam Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında, bilgi, yardım ve deneyimlerinden yararlandığım Yardımcı Danışmanım Prof.Dr. Filiz ÖNER'e gösterdiği yakınlıktan ötürü sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı gerçekleştirmemde destek ve yardımlarını esirgemeyen Rektörümüz Prof. Dr. Engin ATAÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Partikül boyutu ve zeta potansiyel analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlayan, Anadolu Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü'nden Doç.Dr. Aydın DOĞAN'a ve bölüm elemanlarına yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgilerini ve yardımlarını gördüğüm bölüm arkadaşlarım, Yrd.Doç.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Araş. Gör. Uzm. Ecz. Ebru CENGİZ'e, Kimyager Sefa AVCIER'e, Araş. Gör.Uzm. Ecz. Ş. Berker SEVİN'e, Araş. Gör. Uzm. Ecz. Bahar Selen KALAVA'ya, Araş. Gör. Ecz. Evrim AKYIL'a ve Araş. Gör. Ecz. Murat S. BERKMAN'a çok teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, yüreklendiren ve bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan fedakar aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KATI LİPİT PARTİKÜLLER	4
2.1.1. KLN'lerin Üstünlükleri ve Sakıncaları	4
2.1.2. KLN'lerin Hazırlanma Yöntemleri	6
2.1.2.1. Yüksek Devirli Homojenizasyon ve Ultrason Yöntemi ile KLN'lerin Hazırlanması	6
2.1.2.2. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi ile KLN Hazırlanması	6
2.1.2.2.1. Sıcak homojenizasyon yöntemi	7
2.1.2.2.2. Soğuk homojenizasyon yöntemi	7
2.1.2.3. Çözücü Emülsifikasyonu/Uçurulması Yöntemi ile KLN Üretimi	8
2.1.2.4. Mikroemülsiyon Yöntemi ile KLN'lerin Hazırlanması	8
2.1.2.5. Diğer Yöntemler	9
2.1.2.5.1. Lipit nanopellet hazırlanması	9
2.1.2.5.2. Katı yağ kürelerin hazırlanması	9
2.1.2.5.3. Çöktürülmüş lipit partiküllerin hazırlanması	9
2.1.3. KLN'lerin Karakterizasyonu	9
2.1.3.1. Partikül Boyutları ve Dağılımı Tayini	10
2.1.3.2. Partikül Şekli Tayini	12
2.1.3.3. Zeta Potansiyel Ölçümü	12
2.1.3.4. Kristalizasyon ve Lipit Modifikasyonunun İncelenmesi	13

2.1.4.	Etkin Madde Yüklenmesi ve Hapsedilmesi	14
2.1.5.	Etkin Madde Salımı	15
2.1.6.	KLN'lerin Kararlılığı	16
2.1.7.	KLN'lerin Sterilizasyonu ve İkincil Üretim Basamakları	19
2.1.7.1.	Sterilizasyon	19
2.1.7.2.	Liyofilizasyon	20
2.1.7.3.	Püskürtterek Kurutma	21
2.1.8.	KLN'lerin Toksisitesi	21
2.1.9.	KLN'lerin Uygulama Alanları	21
<del>2.2.</del>	GEN TEDAVİSİ	23
2.2.1.	<i>Ex-vivo</i> Gen Tedavisi	25
2.2.2.	<i>In-vivo</i> Gen Tedavisi	25
2.2.3.	Gen Transfer Yöntemleri	25
2.2.3.1.	Viral Vektörler	26
2.2.3.2.	Retroviral Vektörler	26
2.2.3.3.	Adenovirüs Vektörler	27
2.2.3.4.	Adeno-İlişkili Virüs ( <i>adeno-associated virus</i> ) AAV Vektörler	27
2.2.3.5.	Herpes Simplex Virüsü	27
2.2.4.	Non-Viral Vektörler	28
2.2.4.1.	Çıplak DNA	29
2.2.4.2.	Katyonik Lipitler	29
2.2.4.2.1.	Tek değerlikli katyonik lipitler	30
2.2.4.2.2.	Çok değerlikli katyonik lipitler	32
2.2.4.2.3.	Guanidin içeren bileşenler	33
2.2.4.2.4.	Kolesterol türevleri	34
2.2.4.2.5.	Katyonik peptitler	34
2.2.4.2.6.	Yardımcı lipitler	34
2.2.4.3.	Lipozomlar	36
2.2.4.3.1.	DNA-Lipit kompleksleri	36
1.2.4.3.2.	DNA-Lipit komplekslerinin hücre işerisine alımı ve transfeksiyon	37
2.2.4.4.	Katyonik Polimerler	38



2.2.4.5.	Reseptör Aracılı Gen Transfer Yöntemleri	39
3.	MATERYAL ve YÖNTEMLER	40
3.1.	MATERYALLER	40
3.1.1.	Kullanılan Maddeler	40
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar	41
3.2.	YÖNTEMLER	42
3.2.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Çalışmalar	42
3.2.1.1.	Katyonik Lipit DOTAP® Üzerinde Yapılan Analizler	42
3.2.1.1.1.	Erime derecesi tayini	42
3.2.1.1.2.	Termal analiz	42
3.2.1.1.3.	Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonraki termal analiz	42
3.2.1.1.4.	Kullanılan lipit matrisler içerisindeki çözünürlük tayini	43
3.2.1.1.5.	X-Işını kırınım analizi	43
3.2.1.1.6.	Jel retardasyon deneyi	43
3.2.1.1.6.1.	Elektroforez işleminde kullanılan çözeltinin hazırlanması	43
3.2.1.1.6.2.	Elektroforez işlemi	44
3.2.1.1.6.2.	Jel retardasyon deneyinde kullanılan genetik materyal	45
3.2.1.1.7.	Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonraki jel retardasyon deneyi	46
3.2.1.1.8.	Zeta potansiyelin belirlenmesi	46
3.2.1.1.9.	Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonra zeta potansiyelin belirlenmesi	46
3.2.1.2.	Lipit Matrislerle Yapılan Çalışmalar	46
3.2.1.2.1.	Erime derecesi tayini	46

3.2.1.2.2.	Termal analiz	47
3.2.1.2.3.	X-Işını kırınım analizi	47
3.2.2.	KLN Hazırlama Ön Çalışmaları	47
3.2.2.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	47
3.2.2.1.1.	Katyonic lipit içermeyen ön formülasyonun hazırlanması	48
3.2.2.1.2.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların hazırlanması	48
3.2.2.1.3.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların sterilizasyonu	48
3.2.2.1.4.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların liyofilizasyonu	49
3.2.2.1.4.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların termal analizi	51
3.2.2.1.5.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesi	51
3.2.2.1.6.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların zeta potansiyellerinin belirlenmesi	52
3.2.2.1.7.	Katyonic lipit içeren ön formülasyonların partikül boyutu dağılımları	52
3.2.2.2.	Farklı Lipit Matrislerle Çalışılacak Formülasyonun Seçilmesi	52
3.2.3.	KLN'lerle Yapılan Çalışmalar	52
3.2.3.1.	Dynasan® 166, Gelucire® 33/01 ve Compritol® ATO 888 ile Hazırlanan KLN'ler	52
3.2.3.2.	KLN'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmaları	53
3.2.3.2.1.	Makroskobik incelemeler	53
3.2.3.2.2.	Şekilleri	53
3.2.3.2.3.	pH değerlerinin belirlenmesi	53
3.2.3.2.4.	Termal analizleri	53
3.2.3.2.5.	X-Işını kırınım analizi	54

3.2.3.2.6.	pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesi	54
3.2.3.2.7.	Escort™II ürünü ile KLN'lerin pDNA'ya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırılması	54
3.2.3.2.8.	Zeta potansiyellerin belirlenmesi	55
3.2.3.2.9.	pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyelleri	55
3.2.3.2.10.	Partikül boyutları ve dağılımları	56
3.2.3.2.11.	Saklama koşullarında kararlılık kontrolleri	56
3.2.3.2.12.	pDNA-Formülasyon komplekslerinin DNaz I enzimi ortamında kararlılığı	56
3.2.3.2.12.1.	Ekstraksiyon yöntemleri	58
4.	BULGULAR	60
4.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	60
4.1.1.	Analizlere Ait Katyonik Lipit DOTAP® Üzerinde Yapılan Bulgular	60
4.1.1.1.	Erime Derecesi Tayini Bulguları	60
4.1.1.2.	Termal Analiz Bulguları	60
4.1.1.3.	Formülasyon Sırasındaki Ortam Koşulları Uygulandıktan Sonraki Termal Analiz Bulguları	61
4.1.1.4.	Kullanılan Lipit Matrisler İçerisindeki Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular	61
4.1.1.5.	X-Işını Kırınım Analizi Bulguları	63
4.1.1.6.	Jel Retardasyon Deneyine Ait Bulgular	63
4.1.1.6.1.	Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonraki jel retardasyon deneyi bulguları	63
4.1.1.7.	Zeta Potansiyelin Belirlenmesine Ait Bulgular	66

4.1.2.	Lipit Matrislerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	66
4.1.2.1.	Erime Derecesi Tayini	66
4.1.2.2.	Termal Analiz Bulguları	66
4.1.2.3.	X-Işını Kırınım Analizi Bulguları	69
4.1.3.	Katı Lipit Ön Formülasyonların Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	70
4.1.3.1.	Termal Analiz Bulguları	70
4.1.3.2.	pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Belirlenmesi Bulguları	71
4.1.3.3.	Zeta Potansiyellerin Belirlenmesi Bulguları	74
4.1.3.4.	Partikül Boyutları ve Dağılımlarına Ait Bulgular	74
4.1.3.5.	Farklı Lipit Matrislerle Çalışılacak Formülasyonun Seçilmesi	77
4.1.4.	KLN'lerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	78
4.1.4.1.	KLN'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmalarının Bulguları	78
4.1.4.1.1.	Makroskobik incelemeleri	78
4.1.4.1.2.	Şekilleri	79
4.1.4.1.3.	KLN'lerin pH değerlerinin belirlenmesine ait bulgular	80
4.1.4.1.4.	KLN'lerin termal analiz bulguları	80
4.1.4.1.5.	KLN'lerin X-ışını kırınım analiz bulguları	80
4.1.4.1.6.	KLN'lerin pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesine ait bulgular	82
4.1.4.1.7.	Escort™II ürününün ile KLN'lerin pDNA'ya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırılmasına ait Bulgular	85
4.1.4.1.8.	KLN'lerin zeta potansiyellerin belirlenmesine ait bulgular	86
4.1.4.1.9.	pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyellerine ait bulgular	86

4.1.4.1.10.	KLN'lerin partikül boyutları ve dağılımları	87
4.1.4.1.11.	KLN'lerin saklama koşullarında kararlılık kontrollerine ait bulgular	91
4.1.4.1.11.1.	Termal analizleri	91
4.1.4.1.11.2.	Zeta potansiyelleri	96
4.1.4.1.11.3.	Partikül boyutu ve dağılımları	98
4.1.4.1.12.	pDNA-KLN komplekslerinin DNaz I enzimi ortamında ait bulgular	100 100
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	102
5.1.	TARTIŞMA	102
5.1.1.	Çalışılan Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler	102
5.1.1.1.	Katyonik Lipit DOTAP® Üzerinde Yapılan Analizlere Ait Değerlendirmeler	102
5.1.1.2.	Lipit Matrislerle Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler	104
5.1.1.3.	Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler	105
5.1.1.4.	Farklı Lipit Matrislerle Çalışılacak Formülasyonun Seçilmesi	107
5.1.2.	KLN'lerle Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler	107
5.1.2.1.	KLN'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler	107
5.1.2.1.1.	Saklama koşullarında kararlılık kontrolleri	108
5.1.2.1.2.	KLN'lerin pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesi değerlendirmeleri	110
5.1.2.1.3.	Escort™II ürününün ile KLN'lerin pDNA'ya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırılmasına ait değerlendirmeler	111
5.1.2.1.4.	KLN'lerin zeta potansiyelleri ile partikül boyutları ve dağılımlarına ait değerlendirmeler	111

5.1.2.1.5.	pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyel değerlendirmeleri	113
5.1.2.1.6.	pDNA-KLN komplekslerinin DNaz I enzimi ortamında kararlılığının değerlendirilmesi	113
5.2.	SONUÇ	116
6.	KAYNAKLAR	117

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
2.2.4.2.1. DOTMA ve DOTAP'ın Kimyasal Yapısı	31
2.2.4.2.1. Tek Değerlilikli CLIP-1, CLIP-6 ve CLIP-9 Katyonik Lipitlerin Kimyasal Yapıları	31
2.2.4.2.1. Simetrik Katyonik Lipitin Kimyasal Yapısı	32
2.2.4.2.2. Çok Dğerlilikli Katyonik Lipitlerin Kimyasal Yapısı	32
2.2.4.2.3. Guanidin İçeren Bileşenlerin Kimyasal Yapısı	33
2.2.4.2.4. DC-chol'ün Kimyasal Yapısı	34
2.2.4.2.6. Yardımcı Lipitlerin Kimyasal Yapıları	35
2.2.4.3.2. DNA-Lipit Komplekslerinin Hücre İçerisine Alımı	37
3.2.1.1.6.2. pUC18/19 Plazmitinin Haritası	45
3.2.2.1.4. Formülasyon Hazırlanmasında Tüm İşlemler ve İşlem Gören Formülasyon Kodları	50
4.1.1.2. DOTAP®'ın Termogramı	60
4.1.1.4. DOTAP®'ın Dynasan® 116 İçinde (A), ve Compritol® ATO 888 İçinde (C) Çözünürlük Tayini Termogramları	62
4.1.1.5. DOTAP®'ın X-Işını Kırınım Grafiği	63
4.1.1.6.1. DOTAP®'ın, Formülasyon Sırasındaki Ortam Koşulları Uygulandıktan Sonraki Jel Retardasyon Deneyi Görüntüleri	65
4.1.2.2. Dynasan® 116 (A), Gelucire 33/01 (B) ve Compritol® ATO 888'in (C) II. Isıtma Termogramları	68
4.1.2.3. Dynasan® 116 (A), Gelucire® 33/01 (B) ve Compritol® ATO 888'in (C) X-Işını Kırınım Analiz Grafikleri	69
4.1.3.1. Taze Hazırlanmış FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerin Termogramı	70

4.1.3.2.	Süzülmüş FIII, FIV, FV ve FVI Formülasyonların pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Görüntüsü	71
4.1.3.2.	Otoklavlanmış FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Görüntüsü	72
4.1.3.2.	Liyofilize Edilmiş FIII, FIV, FV ve FVI Formülasyonların pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Görüntüsü	73
4.1.3.3.	FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerinin Zeta Potansiyel Grafiği	74
4.1.3.4	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FIII KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	75
4.1.3.4	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FIV Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	76
4.1.3.4	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FV Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	76
4.1.3.4.	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FVI Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	77
4.1.4.1.2	Liyofilize Edilmiş FVI (A), GI (B) ve CI (C) KLN'lerin Işık Mikroskopunda Görünümleri	79
4.1.4.1.5.	Dynasan® 116 ile (A), Gelucire® 33/01 ile (B) ve Compritol® ATO 888 (C) ile Hazırlanan KLN'lerin X-Işını Kırınım Analizleri	81
4.1.4.1.6.	Süzülmüş, Liyofilize Edilmiş ve Otoklavlanmış FVI KLN'lerinin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Retardasyon Görüntüleri	82



4.1.4.1.6.	Süzülmüş, Liyofilize Edilmiş ve Otoklavlanmış GI KLN'lerinin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Retardasyon Görüntüleri	83
4.1.4.1.6.	Süzülmüş, Liyofilize Edilmiş ve Otoklavlanmış C1 KLN'lerinin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Retardasyon Görüntüleri	84
4.1.4.1.7.	Escort™II Ürününün ve FVI, GI, CI KLN'lerinin pDNA ile Oluşturdukları Komplekslerin Jel Görüntüleri	85
4.1.4.1.9.	pDNA- KLN Komplekslerinin Zeta Potansiyel Grafiği	87
4.1.4.1.10.	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FVI KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	88
4.1.4.1.10.	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) GI KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	89
4.1.4.1.10.	Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) CI KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri	90
4.1.4.1.11.1.	Liyofilize FVI Formülasyonunun 25°C'de (A), 4°C'de (B) ve 40°C'de (C) Aylara Göre Termogramları	93
4.1.4.1.11.1.	Liyofilize GI Formülasyonunun 25°C'de (A), 4°C'de (B) ve 40°C'de (C) Aylara Göre Termogramları	94
4.1.4.1.11.1.	Liyofilize CI Formülasyonunun 25°C'de (A), 4°C'de (B) ve 40°C'de (C) Aylara Göre Termogramları	95
4.1.4.1.12.	pDNA ve pDNA-Formülasyon Komplekslerinin DNaz I Enzimi Varlığındaki Kararlılığının Jel Görüntüsü	101

## ÇİZELGELER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
3.2.2.1.3.	Katyonik Lipit İçermeyen ve İçeren Formülasyonların İçerikleri ve Kodları	49
4.1.1.4.	DOTAP®'ın Kullanılan Lipit Matrisler İçerisindeki Erime ve Tekrar Kristallenme Dereceleri ve Enerjileri	61
4.1.1.6.1.	Katyonik Lipit Kodları, Uygulanan Ortam Koşulları, pDNA-DOTAP®(n) Oranları, Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları	64
4.1.1.7.	Katyonik Lipit DOTAP®'ın Formülasyon Koşulları Uygulanmadan ve Uygulandıktan Sonraki Zeta Potansiyel Değerleri	66
4.1.2.2.	Lipit Matrislerin Erime ve Tekrar Kristallenme Dereceleri ve Enerjileri	67
4.1.3.1.	Taze Hazırlanmış FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerin Erime ve Tekrar Kristallenme Dereceleri ve Enerjileri	70
4.1.3.2.	Süzülmüş KLN'lerin Kodu, pDNA:KLN Oranları, Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları	71
4.1.3.2.	Otoklavlanmış KLN'lerin Kodu, pDNA:KLN Oranları, Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları	72
4.1.3.2.	Liyofilize Edilmiş KLN'lerin Kodu, pDNA:KLN Oranları, Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları	73
4.1.3.3.	FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerinin Ortalama Zeta Potansiyel Değerleri ve Standart Hataları	74
4.1.3.4.	Süzülmüş, Otoklavlanmış ve Liyofilize Edilmiş FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerinin Partikül Dağılım Değerleri	75

4.1.4.1.6.	Süzülmüş, Liyofilize ve Otoklavlanmış FVI KLN'lerinin pDNA-KLN Oranları, Uygulama Noktaları ve Uygulama Alanları	82
4.1.4.1.6.	Süzülmüş, Liyofilize ve Otoklavlanmış GI KLN'lerinin pDNA-KLN Oranları, Uygulama Noktaları ve Uygulama Alanları	83
4.1.4.1.6.	Süzülmüş, Liyofilize ve Otoklavlanmış CI KLN'lerinin pDNA-KLN Oranları, Uygulama Noktaları ve Uygulama Alanları	84
4.1.4.1.7.	Escort™II Ürününün ve FVI, GI, CI KLN'lerinin pDNA ile Oluşturdukları Komplekslerin Miktarları ve Uygulama Alanları	85
4.1.4.1.8.	Süzülmüş, Otoklavlanmış ve Liyofilize FVI, GI ve CI KLN'lerinin Zeta Potansiyel Değerleri	86
4.1.4.1.9.	pDNA- KLN Komplekslerinin Zeta Potansiyel Değerleri	86
4.1.3.1.10.	Süzülmüş, Otoklavlanmış ve Liyofilize Edilmiş FVI, GI ve CI KLN'lerinin Partikül Boyutları ve Dağılım Değerleri	87
4.1.4.1.11.1.	FVI, GI ve CI Formülasyonlarına Ait Termal Analiz Sonuçları	92
4.1.4.1.11.2.	FIII ve FIV ve FV KLN'lerin Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Zeta Potansiyel Değerleri ve Standart Hataları	96
4.1.4.1.11.2.	FVI ve GI ve CI Formülasyonlarının Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Zeta Potansiyel Değerleri ve Standart Hataları	97
4.1.4.1.11.3.	FIII ve FIV ve FV Formülasyonlarının Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Partikül Boyutları ve Dağılım Değerleri	98

4.1.4.1.11.3.	FVI ve GI ve CI Formülasyonlarının Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Partikül Boyutları ve Dağılım Değerleri	99
4.1.4.1.12.	pDNA, pDNA-KLN Komplekslerinin ve DNaz I Enziminin Miktarları, Uygulama Hatları ve Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemi	100

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>C</b>	: Katyonik Lipit İçermeyen Compritol® ATO 888 ile Hazırlanmış KLN
<b>CI</b>	: Katyonik Lipit İçeren Compritol® ATO 888 ile Hazırlanmış KLN
<b>CI<sub>L</sub></b>	: Liyofilize Edilmiş CI KLN
<b>CI<sub>O</sub></b>	: Otoklavlanmış CI KLN
<b>Compritol® ATO 888</b>	: Gliserol Dibehehat
<b>DC-chol</b>	: Dimetil Aminoetan Karbamoil Kolesterol [ $3\beta$ ( <i>N</i> -( <i>N'</i> , <i>N'</i> -Dimetilaminoetan)-Karbamoil)Kolesterol]
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleotidlerden Oluşan Polimerdir ve Tüm Ökaryot Canlıların Genetik Maddesidir
<b>DNaz I</b>	: Çift Zincirli DNA'yı Ayıran veya Tek Zincirli DNA'yı Daha Küçük Parçalara Ayıran Endonükleaz Enzimi
<b>DODAB</b>	: Dioktadesildimetilamonyum Bromür
<b>DODAC</b>	: Dioktadesildimetilamonyum Klorür
<b>DOGS</b>	: Dioktadesilamidoglisil Spermin
<b>DOPE</b>	: Dioleilfosfatidiletanolamin
<b>DOSPA</b>	: 2,3-Dioleiloksi- <i>N</i> -(2(Spermin Karboksamido)etil)- <i>N,N</i> -Dimetil-1-Propanaminyum Trifluoroasetat
<b>DOTAP</b>	: <i>N</i> -[1-(2,3-Dioleiloksi) Propil]- <i>N,N,N</i> -Trimetilamonyum
<b>DOTAP®I</b>	: 43±1°C'ye Isıtılmış DOTAP®
<b>DOTAP®II</b>	: 43±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP®
<b>DOTAP®III</b>	: 73±1°C'ye Isıtılmış DOTAP®
<b>DOTAP®IV</b>	: 73±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP®
<b>DOTAP®V</b>	: 85±1°C'ye Isıtılmış DOTAP®
<b>DOTAP®VI</b>	: 85±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP®
<b>DOTMA</b>	: <i>N</i> -[1-(2,3-Dioleiloksi) Propil]- <i>N,N,N</i> -Trimetilamonyumklorür
<b>DPPEs</b>	: Dipamitoilfosfatidiletanolamin-PEG <sub>2000</sub>
<b>DSC</b>	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

<b>Dynasan® 116</b>	: Tripalmitin
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i> Bakterisi
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetikasit
<b>ELISA</b>	: Mikro Plaka Okuyucu
<b>ESCORT™II</b>	: Piyasa Ürünü Katyonik Lipozom
<b>FI</b>	: Katyonik Lipit İçermeyen Dynasan® 116 Lipiti ile Hazırlanmış KLN
<b>FIII</b>	: %0.20 DOTAP® İçeren Dynasan® 116 Lipiti ile Hazırlanmış KLN
<b>FIII<sub>L</sub></b>	: Liyofilize Edilmiş FIII KLN
<b>FIII<sub>O</sub></b>	: Otoklavlanmış FIII KLN
<b>FIV</b>	: %0.25 DOTAP® İçeren Dynasan® 116 Lipiti ile Hazırlanmış KLN
<b>FIV<sub>L</sub></b>	: Liyofilize Edilmiş FIV KLN
<b>FIV<sub>O</sub></b>	: Otoklavlanmış FIV KLN
<b>FV</b>	: %0.30 DOTAP® İçeren Dynasan® 116 Lipiti ile Hazırlanmış KLN
<b>FVI</b>	: %0.25 DOTAP® İçeren Dynasan® 116 Lipiti ile Hazırlanmış KLN
<b>FV<sub>L</sub></b>	: Liyofilize Edilmiş FV KLN
<b>FV<sub>O</sub></b>	: Otoklavlanmış FV KLN
<b>G</b>	: Katyonik Lipit İçermeyen Gelucire® 33/01 ile Hazırlanmış KLN
<b>Gelucire® 33/01</b>	: Yağ Asitlerinin Gliserol Esterleri
<b>GI</b>	: Katyonik Lipit İçeren Gelucire® 33/01 ile Hazırlanmış KLN
<b>GI<sub>L</sub></b>	: Liyofilize Edilmiş GI KLN
<b>GI<sub>O</sub></b>	: Otoklavlanmış GI KLN
<b>HEPES</b>	: N-(2-Hidroksietil)Piperazin-N'-(2-Etansülfonik Asit)
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>kb</b>	: Kilobaz 1000 Bazlık DNA Uzunluğu
<b>KLN</b>	: Katı Lipit Nanopartikül

<b>LD</b>	: Lazer Kırınımı
<b>LMV</b>	: Büyük Çok Katmanlı Taşıyıcı Lipozomal Sistem
<b>NMR</b>	: Nükleer Manyetik Rezonans
<b>PCS</b>	: Foton Korelasyon Spektroskopisi
<b>PI</b>	: Polidisperslik İndisi
<b>pDNA</b>	: Plazmit DNA
<b>SH</b>	: Standart Hata
<b>Span 85®</b>	: Sorbitan Trioleat
<b>SPSS</b>	: İstatistik Programı
<b>TE</b>	: Tris-HCl ve EDTA İçeren Genetik Madde Solüsyonu
<b>TLC</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>Tween 80®</b>	: Polioksietilen-20-Sorbitan Monooleate

## 1. GİRİŞ

Farmasötik Biyoteknoloji alanı hızla gelişmektedir. Farmasötik bilimler ve ilaç alanlarındaki bu çalışmalarda, yeni farmasötik tekniklerin ve ürünlerin oluşumu hızlanmıştır. Bu gelişme, moleküler biyoloji, moleküler genetik, (biyo-) mühendislik, protein, şeker ve nükleik asit kimyası ve azımsanmayacak oranda farmasötik bilimler gibi farklı bölümler arasındaki ilişkilerin sonucudur. Genel biyoteknoloji alanında, kullanılabilir bileşiklerin üretimi için mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar ya da bunların bölümleri kullanılmaktadır (1).

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemelerin doğal sonucu olarak, kalıtsal hastalıkların iyileştirilmesi (gen tedavisi) ile insan genomu projesi gündeme gelmiştir (2). Gen tedavisinde amaç, vücuttan alınan hücreler içinde yeni genetik materyalin tanıtılmasıyla, enfeksiyon ve genetik hastalıkların tedavisidir (3). Çok geniş olarak, fonksiyonel bir genin hastanın hücrelerine aktarmak suretiyle herhangi bir kalıtsal metabolik hastalığın (yani genetik düzensizlik ya da doğumsal kusur) düzeltilmesi ya da hücreye yeni bir fonksiyon kazandırılması gen tedavisi tanımı içerisine girmektedir (4). Ayrıca gen tedavisi, genetik defektlerin, kanser benzeri hastalıkların ve kronik viral enfeksiyonların tedavisini de ele almaktadır (5).

Canlı hücrelere gen aktarabilmek için bazı yöntemler geliştirilmiştir, ancak bunların büyük bölümü klinik uygulamalar için hala yetersizdir (6).

Hücre membranından DNA'nın aktarımı için en verimli yöntem viral vektörlerin kullanımınıdır. Ancak, viral vektörlerin kısa ve uzun dönemdeki risklerinin artmasından dolayı DNA taşınması için diğer başka stratejiler araştırılmaya başlanmıştır (5). Son on yıldır, gen transferi için yeni non viral sistemlerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır (5, 7). İlk geliştirilmiş non viral DNA vektör, bir katyonik lipid ve DNA kompleksidir (Lipoplex) (7). Katyonik lipidlerin, DNA'nın belkemiğini oluşturan negatif yüklü fosfatları ile etkileşimde bulunduğu, yükleri nötralize ettiği ve çok sıkı bir yapı içerisinde DNA'nın katlanması arttırdığına inanılmaktadır (5).

DNA-lipit kompleksleri, genelde, lipozom şeklinde hazırlanmıştır. Lipitler genelde, bir organik faz (kloroform, metilen klorür, metanol) ile karıştırılır; bu fazlar, vakumla, liyofilizasyon ve püskürterek kurutma yöntemleriyle



uzaklaştırılırlar. Elde edilen ince film, topak veya kuru toz şeklindeki lipit, bir sulu faz ile çalkalanarak ıslatılır ve büyük çok katmanlı taşıyıcılar (LMV) oluşturulur. Bu partiküllerde, organik çözücü kalıntılarından kurtulmak oldukça zordur (8).

Çalışmamızın amacı, farmasötik açıdan diğer ilaç taşıyıcı sistemlere birçok üstünlüğü olan katı lipit nanopartiküller sisteme, etkinliği *in vitro* ve *in vivo* olarak kanıtlanmış katyonik bir lipit yardımıyla katyonik özellik kazandırılarak, DNA'ya elektrostatik etkileşme ile bağlanabilecek yeni bir gen taşıyıcı sistem geliştirmektir.

Katı lipit nano- veya mikropartiküller, diğer kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlere (polimerik nanopartiküller, emülsiyonlar, lipozomlar) bir alternatif olarak ortaya konmuş partiküller taşıyıcı sistemlerdir (9, 10). Bu sistem hazırlama aşamalarında organik çözücüye gereksinim göstermemesi nedeniyle çözücü artıklarından kaçınmak amacıyla seçilmiştir. Bilindiği üzere, bu sistemler, sulu bir faz içinde erimiş lipitlerin emülsifikasyonu ile hazırlanmakta ve taşıyıcı matris olarak da oda sıcaklığında katı olan lipitler kullanılmaktadır (11).

Hazırlamayı düşündüğümüz partiküllere katyonik özellik kazandırmak için, lipozom formülasyonlarında en yaygın olarak kullanılan katyonik lipitlerden DOTAP (8) kullanılacaktır. Formülasyonu düşünülen katyonik katı lipit mikropartiküllerine plazmit DNA'sı (pUC18) elektrostatik etkileşme ile bağlanmaya çalışılacak ve jel elektroforezi ile plazmit bağlama oranları kontrol edilecektir.

Çalışmamızın ilk aşamasında, katı lipit partiküllerin hazırlanmasında lipit matris olarak Dynasan® 116 kullanılacaktır. Kararlı bir formülasyonun hazırlanmasının ardından, erime dereceleri birbirlerinden farklı Gelucire® 33/01 ve Compritol® ATO 888 lipit matrisleri ile katyonik katı lipit partiküller hazırlanması hedeflenmektedir.

Hazırlanan katyonik katı mikropartiküllerin, partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyelleri, kararlılıkları, DNA bağlama oranları ve DNaz I enzimine karşı DNA'yı koruma yetenekleri belirlenmeye çalışılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Son yıllarda, ilaç salımı için geliştirilmiş nanopartiküler sistemler, etkin moleküllerin uygulamaları için büyük bir potansiyel göstermiş ve etkin maddenin hedeflendirilebilmesi ve kontrollü salımın sağlanabilmesine olanak sağlamaları nedeniyle yaygın olarak çalışılmaktadır (11-13).

İstenilen amaç için en güvenilir kolloidal sistemin belirlenmesinde:

- İlaç yükleme kapasitesi,
- İlaç hedefleme olasılığı,
- Taşıyıcı sistemin *in vivo* davranışı (biyolojik ortam ile etkileşimi, parçalanma oranı, organizma içinde birikmesi),
- Akut ve kronik toksisitesi,
- Üretim ölçeğinin büyütülmesi,
- Saklama sırasındaki fiziksel ve kimyasal kararlılığı,
- Maliyeti,

gibi sorular artmaktadır. Ancak, çözümlenmesi için basit cevaplar yoktur (13-15).

Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin en önemli üstünlüğü, suda çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin biyoyararlanımını arttırabilmeleridir (13, 16, 17).

Sudaki çözünürlüğü yetersiz olan etkin maddeler için, mikron ve mikronaltı büyüklükte taşıyıcı sistemler geliştirmek amacı ile çalışmalar yapılmaktadır (11, 18). Bu amacın yanısıra, etkin maddenin hedef organa ulaştırılması ve kontrollü salım için de polimerik nanopartiküller ve mikroküreler, lipozomlar ve lipit emülsiyonlar hazırlanmaktadır (13, 18).

Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde, *in vitro* ortamda yapılan olumlu çalışmaların *in vivo* ortamda aynı oranda olumlu sonuçlar vermemesi sorun oluşturmaktadır. Sonuçların olumsuz olma nedenleri:

- Etkin maddenin yeterli düzeyde emilmemesi, hızlı metabolize veya elimine olması (örneğin, peptit ve proteinler) ve etkin madde dağılımı sırasında diğer dokularda toksik etki görülmesi (örneğin, kanser ilaçları),
- İntravenöz uygulama dışında, sulu dispersiyonda düşük etkin madde çözünürlüğü,
- Oral uygulamadan sonra, etkin madde plazma düzeyinin fazla yükselip alçılması sonucu uygun biyoyararlanımın sağlanamamasıdır.

Bu olumsuz etkenlerin ortadan kaldırılması için güvenilir ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmaktadır (13-15).

## 2.1. KATI LİPİT PARTİKÜLLER

1991'de, lipozom, yağ emülsiyonları ve katı partiküllerin üstünlükleri düşünülerek, suda güçlkle çözünen lipofilik etkin maddelerin intravenöz olarak uygulanması için alternatif sistem olarak *Katı Lipit Nanopartikül*'ler (KLN®) geliştirilmiştir (17, 19, 20).

Katı lipitten yapılmış nanopartiküller, lipofilik özellikteki etkin maddelerin parenteral, oral ve topik uygulanabilmesini sağlayan kolloidal taşıyıcı sistemlerdir (21-23). Genellikle, oda sıcaklığında katı olan, biyolojik olarak bozunabilen lipitlerle hazırlanırlar. Gliseritler (trilaurin, tristearin, trikaprin), yağ asitleri (stearik asit, behenik asit), kolesteril asetat ve mumlar (*cera flava*, apifil) gibi katı lipitler lipit matrisi oluştururlar (22, 24-26). KLN'ler, yüzey etkin madde içeren sulu çözeltide dağıtılmış, biyolojik olarak bozunabilen, büyük ölçeklerde kolay üretilen, yüksek ve uzun süreli fiziksel kararlılığa sahip, yükleme kapasitesi fazla, doğal gliseritler gibi nontoksik ve biyouyumlu olan sistemlerdir (19, 21, 22, 27, 28). KLN'ler, etkin maddelerin biyoyararlanımlarını arttırmak, duyarlı etkin maddelerin yapılarını korumak ve lipofilik etkin maddelerin kontrollü salım sistemlerini oluşturmak için hazırlanırlar (19, 22, 29).

Öncelikle, fizyolojik ve biyolojik olarak parçalanabilen bileşenler kullanılarak lipit matrislerin hazırlanması ile intravenöz sistemlerin hazırlanabileceği düşünülmüştür (20, 24). Böylece, KLN'ler, lipozomlara, polimerik nanopartiküllere ve emülsiyonlara alternatif ilaç taşıyıcı sistemler olarak sunulmaktadır (21, 30-32). KLN'ler, emülsiyon ve lipozomlara benzer ve fizyolojik olarak iyi tolere edilebilen maddelerden oluşurlar (18, 32, 33). Bunun yanı sıra, kontrollü ilaç salımını daha iyi sağlarlar (11, 34, 35). Polimerik nanopartiküllere benzer olarak, katı matris koruyucuları etkin maddeyi kimyasal degradasyona karşı korur ve etkin madde salım profilleri oldukça esnek olarak tasarlanabilir (34, 35).

### 2.1.1. KLN'lerin Üstünlükleri ve Sakıncaları

Lipozomlar, miseller, nanoemülsiyonlar, mikroemülsiyonlar ve KLN'ler düşük toksisite, etkin maddeleri iyi taşıyabilmeleri, yerel ve kontrollü olarak

salım yetenekleri, küçük partikül boyutları ve geniş terapötik indisleri nedeniyle, lipit koloidal sistemler olarak çok çalışılmaktadırlar (11, 36). KLN'ler, alternatif partiküler taşıyıcı sistemler olarak sayılan sistemlerden de daha üstün olmalarından dolayı ilgi toplamaktadır (19, 24, 37, 38).

Bu üstünlükler:

- Fizyolojik lipitler kullanılması,
- Organik çözücü gerektirmemesi,
- Uygulama alanlarının fazla olması (dermal, oral, *iv*),
- Büyük ölçekte üretime yol açan sıcak homojenizasyon tekniğinin kullanılabilmesi,
- Biyoyararlanımı arttırabilmeleri,
- Çevre etkilerine (ısı, ışık ) duyarlı olan etkin maddeleri koruyabilmeleri,
- Kontrollü salım ve hedeflendirilme yapılabilmesi,
- Monodispersitelerinin yüksek olması,
- Etkin madde kararlılığının fazla ve uzun süreli olması,
- Sıcaklığa dayanıklı olmaları,
- Dehidrate edildikten sonra tekrar yapılandırılabilme olasılığı,
- Moleküllere bağlanma kapasitelerinin yüksek olması,
- Toksisitelerinin az olması,
- Etkin madde konsantrasyonunun yüksek olması,
- Lipofilik, hidrofilik ve suda az çözünen etkin maddelerin yüklenebilmesi,
- Sterilizasyon (otoklav, gama ışınları ile veya filtre edilerek) sorunu olmaması,
- Ekonomik olması,
- Partikül boyutlarının küçük olmasıdır (13, 16, 20, 21, 24, 33, 39, 40).

Sakıncalı yanları ise:

- Partikül boyutunun zamanla büyümesi,
- Jelleşme eğiliminin olması,
- Katı lipitin beklenmedik polimorfik geçişleri,

- Katı lipitin kristal yapısından dolayı düşük bağlama kapasitesidir (16, 19, 41, 42).

### **2.1.2. KLN'lerin Hazırlanma Yöntemleri**

KLN'ler çok farklı yöntemlerle üretilirler. Bütün hazırlama yöntemlerinde yüzey etkin madde kullanılmaktadır ve süspansiyon içinde kümeleşme eğilimini etkileyen bileşiklere göre, pozitif, nötr veya negatif yüzey yüküne sahip partiküller oluşturulur (43).

#### **2.1.2.1. Yüksek Devirli Homojenizasyon ve Ultrason Yöntemi ile KLN'lerin Hazırlanması**

Yüksek devirli homojenizasyon ve ultrason, katı lipit nanodispersiyon hazırlamak için kullanılan yöntemlerdir. Her iki yöntem de kolaydır ve fazla uygulanır. Ancak, dispersiyon kalitesi mikropartikül içermeleri nedeniyle iyi değildir. Ayrıca, ultrason yöntemi kullanıldığında metal kontaminasyonu da görülebilir (13, 44)

Karışımlar, eriyik-emülsiyon tekniği ile yüksek hızda (örneğin, 20 000-25 000 rpm) belirli süre homojenize edilirler. Hazırlanan sıcak emülsiyon, belirli hızda (örneğin, 5 000 rpm) ve zamanda oda sıcaklığına getirilir. Yüksek hızda karıştırma, partikül boyutlarını nanometre boyutuna getirebilmektedir, ancak Polidisperslik indisi yüksek değerlerdedir. Emülsiyon oluşturma ve soğutma yöntemi partikül boyutunu etkilemektedir (13, 44).

#### **2.1.2.2. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi ile KLN Hazırlanması**

Yüksek basınçlı homojenizasyon parenteral nanoemülsiyonların hazırlanmasında kullanılmaktadır (13, 15). Diğer yöntemlerin aksine, yüksek miktarlarda üretim sağlayabilmektedir.

Yüksek basınç homojenizatörü, sıvıyı yüksek bir basınçla (100-2 000 bar), birkaç mikron büyüklüğünde olan dar bir delikten geçecek şekilde iter. Sıvı, çok yüksek hızda (1 000 km/saat'in üstünde) çok dar bir alandan geçmeye zorlanır. Oldukça yüksek yüzey gerilim ve sürtünme kuvveti etkisiyle, partikül mikronaltı boyutlara iner (13). % 5-10 aralığında lipit içeriğine sahip olan bir sıvıda herhangi bir homojenizasyon sorunu yaşanmaz. Lipit konsantrasyonu % 40 ve üzerinde olan formülasyonların bu yöntemle homojenize edilmesi oldukça kolaydır (45).

KLN üretiminde sıcak ve soğuk olmak üzere iki genel homojenizasyon yöntemi vardır.

#### **2.1.2.2.1. Sıcak homojenizasyon yöntemi**

KLN hazırlamada kullanılacak lipit, erime derecesinin yaklaşık 5°C-10°C üzerine ısıtılır. Etkin madde bu eriyik içinde çözündürülür. Etkin madde içeren (lipit içinde çözündürülmüş veya dağılmış) erimiş lipit ile yüzey etkin madde içeren sulu faz aynı sıcaklığa getirilir ve yüksek hızda karıştırılarak (Ultraturaks ile 8 000-15 000 rpm) hazırlanır (13, 45-48). Ancak, hazırlanan bu ön emülsiyonun partikül boyutu dağılımının homojenitesi düşüktür. Bu sorun homojenizatör kullanılarak giderilebilir (47, 49).

Homojenizasyon sırasında, lipitin erime derecesinin üzerinde olan sıcak ön emülsiyon, yüksek basınçla (100-2 000 bar), birkaç mikron boyutunda olan dar bir alandan geçmeye zorlanır (13, 45, 46). Sıcaklık, iç fazın viskozitesini düşürerek partikül boyutunu küçültür (50). Homojenizasyonun düşük basınç altında birkaç kez tekrarlanması en uygun olanıdır. Basınç ile sürtünme artar ve ortamın sıcaklığı yükselir (~ 500 bar için 10°C). Yüksek sıcaklık etkin maddelerin ve taşıyıcı sistemin degradasyonunu artırır. İşlemin 500-1500 bar'da 3-5 kez tekrarlanması yeterli görülmüştür (13, 24). Partikül boyutları 80-1000 nm arasında değişmektedir ve bu durum uygulanan basınca, sıcaklık ve tekrar sayısına göre değişiklik göstermektedir (28, 50). Basınç ve tekrar sayısı, elde edilen üründe koalesans oluşumuyla partiküllerin boyutunun büyümesine neden olabilir. Homojenize edilmiş ürün, lipitin sıvı hali nedeniyle nanoemülsiyondur. Katı lipit oluşumu, ürünün oda sıcaklığına veya oda sıcaklığı altına soğutulmasıyla gerçekleşir (13, 45).

#### **2.1.2.2.2. Soğuk homojenizasyon yöntemi**

Soğuk homojenizasyon diğer yöntemlerden daha az kullanılır (14, 15). Bu yöntem, sıcak homojenizasyon sırasında görülen etkin madde degradasyonu, homojenizasyon süresince sulu faz içinde etkin madde dağılması ve nanoemülsiyonun kristalizasyon basamağında çeşitli değişikliklerin ortaya çıkması sorunlarının giderilmesi amacıyla geliştirilmiştir (13, 51).

Bu yöntemde, ilk aşamada etkin madde erimiş lipit içerisinde çözündürülür veya dağıtılır. Daha sonra, kuru buz veya sıvı azot yardımıyla karışım aniden soğutulur (13). Fazla soğutma, lipit matriste etkin maddenin homojen dağılmasını ve lipitin kırılabilirliğinin artmasını sağlar. Etkin madde içeren lipit, öğütücüler yardımıyla, 50-100 µm boyutuna sahip mikropartiküller haline getirilerek, yüzey etkin madde içeren ve lipitin erime derecesinin altındaki (~5°C-10°C) çözelti içinde dağıtılır (13, 45, 46).

#### **2.1.2.3. Çözücü Emülsifikasyonu/Uçurulması Yöntemi ile KLN Üretimi**

Lipofilik madde, sulu faz içerisinde emülsifiye edilmiş, suyla karışmayan organik çözücü (örneğin, sikloheksan) içinde çözündürülür. Çözücünün uçurulmasıyla, sulu ortam içinde nanopartikül dispersiyonu oluşur (13, 26, 52, 53).

Sıcaklığın etkilerinin azaltılması için bu yöntem uygundur, ancak organik çözücü kullanılması en belirgin sakıncasıdır (13).

Lipit ve etkin maddenin organik çözücüde dağıtılması ve çözücünün ortamdaki uzaklaştırılmasıyla lipit içinde etkin maddenin homojen dağılması sağlanır (19, 53). Partikül boyutu organik çözücü içinde çözündürülmüş lipit konsantrasyonuna bağlıdır. Kloroform içinde çözündürülmüş trigliserit ile tripalmitin nanopartikülleri, sulu faz içinde yüksek basınç homojenizatörü ile emülsifiye edilmiş ve organik çözücü 40-60 mbar basınç altında uçurulmuştur. Partikül boyutu, yardımcı yüzey etkin madde olan lesitine bağlı olarak 30-100 nm arasında bulunmuştur (13).

#### **2.1.2.4. Mikroemülsiyon Yöntemi ile KLN'lerin Hazırlanması**

Bu yöntemle KLN elde edebilmek için iki basamak vardır: sıcak y/s mikroemülsiyonunun hazırlanması ve bu emülsiyonun mekanik karıştırıcı ile soğuk su ortamına (2°C-3°C) eklenerek (genellikle 140 nm civarında damlacıklar verebilen *droplet diameter* yardımıyla) disperse edilmesidir (13, 24, 26, 43, 54, 55).

Damlacıklar soğuk sulu ortam içinde kristalize olur ve KLN oluşur. Yüzey etkin maddelerin ortamdaki uzaklaştırılmasında, ultrafiltrasyon, ultrasantrifügasyon ve diyaliz olmak üzere üç farklı yol izlenebilir (24, 26, 29, 43, 55).

## **2.1.2.5. Diğer Yöntemler**

### **2.1.2.5.1. Lipit nanopellet hazırlanması**

Lipit nanopellet tekniğinde, ultrasonik banyo veya titanyum uç kullanılarak, eritilmiş lipitlerin sonikasyonu ile lipit nanopartiküller elde edilebilmektedir (26, 40). Yüksek hızlı karıştırıcılar, sonikasyon veya her ikisinin birlikte kullanımı ile nanometre boyutlarında pelletler hazırlanmıştır (29, 40). Tüm bu yöntemlerle hazırlanan partiküler sistemlerdeki en büyük sorun 5 µm'den büyük partiküllerin fazla olmasıdır; bu durum etkin maddenin iv verilmesine bir engel oluşturmaktadır (40).

### **2.1.2.5.2. Katı yağ kürelerin hazırlanması**

Bu yöntemde, katı lipit eritilir ve etkin madde eriyikte çözündürülür. Bu çözelti, fosfolipitlerin sudaki dispersiyonuna erime derecesinin üzerinde bir sıcaklıkta eklenir ve 2-5 dakika mekanik karıştırma veya sonikasyon yolu ile emülsiyon oluşturulur. Daha sonra, sistem buz banyosu içerisinde tutularak ve sabit bir karıştırma hızıyla karıştırılmaya devam edilerek hızla oda sıcaklığına soğutulur. Lipofilik partiküller fosfolipitlerle kaplanmış hidrofobik çekirdekleri oluşturur (26, 33).

### **2.1.2.5.3. Çöktürülmüş lipit partiküllerin hazırlanması**

Bu yöntemde, polimerik nanopartiküllerin elde edilmesinde kullanılan çözücü, buharlaştırma tekniğine benzer olarak lipit, kloroform veya benzeri bir organik çözücüde çözündürüldükten sonra, lesitin ve diğer yardımcı yüzey etkin maddeler yardımı ile sulu faz ile emülsifiye edilir. Organik fazın uçurulması ile lipit çökerek nanopartikülleri oluşturur (26). Çözücünün uçurulmasından sonra, sıcak su veya tampon çözeltisi eklenerek karıştırılır ve katı yağ kürecikleri elde edilir. Bu yöntemle hazırlanan sistemler, genellikle, mikrometre boyutundadır ve heterojen dağılıma sahiptirler. Ayrıca, organik çözücü kullanımına bağlı ve organik çözücü içinde yüksek oranda yüzey etkin madde varlığı nedeniyle sakıncaları vardır (26, 52).

## **2.1.3. KLN'lerin Karakterizasyonu**

KLN'lerin sulu dispersiyonlarında kullanılan lipitler ve yüzey etkin maddelerin, partikül boyutlarında, etkin madde salım profillerinde, uzun süreli



kararlılığın sağlanmasında veya enzimatik degradasyon hızında etkisi önemlidir (21).

### **2.1.3.1. Partikül Boyutları ve Dağılımı Tayini**

Kolloidal taşıyıcı sistem olan KLN'lerin karakterizasyonunda partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımı en önemli fizikokimyasal özelliklerdir (14, 56). Partikül boyutunun ufak olması kararlılığı yükseltmekte ve toksisitenin düşmesine neden olmaktadır (14, 43). Nanopartiküller, nanoküreler ve nanokapsüller gibi kolloidal sistemler 1 µm'nin altında partikül boyutuna sahiptir ve iyi formüle edilmiş sistemlerin mikronaltı ve dar partikül boyutu dağılımına sahip olmaları istenir (11).

Biyoyararlanım açısından, kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerinin üstünlükleri, genel olarak, partikül boyutlarının mikronaltıda olmasına bağlıdır (21). Taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu uygulama yollarına göre değişir (13, 15).

İntravenöz olarak kullanılacak olan KLN'lerin partikül boyutları kontrol edilebilmelidir. USP XXIII'de, küçük hacimdeki injeksiyonluk preparatlarda (100 mL veya daha az) 1 µm'ye eşit veya daha büyük boyutta 6 000 partikül bulunabileceği belirtilmektedir (11, 40). İntravenöz olarak uygulanacak partiküllerin 5 µm'den yukarı olması emboli nedenidir ve ölüme neden olabilir (11, 13, 40, 56, 57). Ayrıca, partikül boyutu, makrofajlar tarafından yakalanma durumunu ve biyolojik kararlılığı da etkilemektedir. Partikül boyutunun artmasıyla fagositoz artar, pinositoz azalır. Bu sonuçlar, partiküllerin biyodağılımlarını etkiler (11, 40). Bu nedenlerle, partikül boyutunun kontrolü ve nanopartiküllerin büyümesini önleyebilmek, KLN dispersiyonlarının hazırlanmasında önemli etkenlerdendir (24).

Kolloidal sistemlerde partikül boyutunun ve dağılımının belirlenmesi, hazırlanan sistemin uygulama amacına uygunluğunun tayin edilmesinde, kullanılan maddelerin ve yöntemlerin seçilmesinde ve katı lipit nanopartiküllerin kararlılıklarının incelenmesinde önemlidir (45). KLN'lerin boyutları, kullanılan lipit matris, etkin madde, yüzey etkin maddeler ve hazırlama yöntemi seçimine göre değişkenlik göstermektedir. Lipit konsantrasyonunun arttırılması partikül boyutunu arttırmaktadır (35).

Partikül boyutunu saptamak için sıklıkla kullanılan yöntemler arasında foton korelasyon spektroskopisi (PSC), lazer kırınımı (LD) ve Coulter Counter bulunmaktadır (38, 45).

PCS, parçacığın hareketi sonucunda yansıyan ışığın yoğunluğundaki değişimi ölçerek partikül boyutunu saptar. Bu yöntem ile, birkaç nanometreden 3 µm'ye kadar olan partiküllerin boyutları belirlenebilmektedir (22). PCS verileri ile birlikte elde edilen polidisperslik indisi (PI) verileri de, ayrıca, partikül boyutu dağılımı hakkında bilgi vermektedir. PI aralığı 0-1 arasındadır. PI, tekdüze dağılımda 0-0.5 aralığında değerler almaktadır (58-60).

Ufak partiküllerin saptanmasındaki güçlük olması ve kolloidal dispersiyonu kararsız hale getirecek elektrolitlere olan gereksinim nedeniyle, Coulter Counter yöntemi KLN'lerin partikül boyutu ölçümlerinde çok nadir kullanılmaktadır (13, 45).

Ufak partiküller, büyük partiküllere oranla, ışığı daha geniş açı ile yansıtırlar. LD, ışığın kırınım açısını partikül yarıçapına bağlı olarak belirleyerek ölçümü gerçekleştirir. Nanometreden milimetre boyutuna kadar (40 nm-2 mm) geniş bir aralıkta ölçüm gerçekleştirebilmesi LD'nin en önemli üstünlüğüdür (61). Polarizasyon Şiddetli Diferansiyel Saçılma (PIDS-Polarization Intensity Differential Scattering) teknolojisinin geliştirilmesi ile çok daha küçük partiküllerin boyutunun saptanmasına olanak sağlanmıştır (12, 45). LD ile elde edilen % 50 ortalama partikül boyutu, LD'nin geniş ölçüm aralığı nedeniyle, çoğu zaman, PCS verilerinden yüksek değerler alabilmektedir (61). Ancak, yine de, partikül boyutu analizlerinde her iki yöntemle de partikül boyutu görüntülü şekilde saptanmaktadır (12, 45). Her iki yöntem de partikül boyutunu ölçmez, parçacığın neden olduğu ışık kırınımından yola çıkarak partikül boyutunu hesaplar (13).

Bunların dışında, Field-Flow-Fractionation (FFF) yöntemi ile de katı lipit nanopartiküllerin partikül boyutları saptanabilmektedir. Partiküller doğrusal akım altında, dikey bir alanın yapısına bağlı olarak, kütlelerine, boyutlarına veya elektriksel iletkenliklerine göre ayrılmaktadır. Bu yöntemin PCS'e göre üstünlüğü ise, çok ufak partikül boyutu farklarına sahip olan partikülleri bile ayırdedilebilmesidir (13, 45).

### 2.1.3.2. Partikül Şekli Tayini

KLN şekillerinin belirlenmesinde, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (14, 59, 62), elektron mikroskobu (EM) (14, 59), ışık mikroskobu (LM) (63, 64) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılabilir (13, 23, 38, 65).

AFM, genellikle, KLN'lerin morfolojik yapılarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Düz bir silikon yüzeye sabitlenen partiküllerin şekilleri atomik kuvvet mikroskobu ile hiçbir vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmiştir (38, 66).

KLN'lere yüklenen etkin maddelerin yerleşim yerlerinin saptanması için Elektron Paramanyetik Rezonans yöntemi (EPR) kullanılmaktadır. Ayrıca, bu yöntemle KLN'lerin hücre ve dokularla olan etkileşimleri de araştırılabilir. Böylece, maddenin KLN'lerden hücrelere geçiş yolu da öğrenilmektedir (60, 67). Yüklenen maddenin fizikokimyasal özelliklerinin ve yapısının KLN dispersiyonları içindeki dağılımını da etkilediği gözönüne alınmalıdır (68).

### 2.1.3.3. Zeta Potansiyel Ölçümü

Zeta potansiyelin belirlenmesi koloidal dispersiyonların saklama sırasındaki kararlılıklarının öngörülmesine olanak sağlamaktadır (13, 45). Yapılan çalışmalarda ışık ve sıcaklığın KLN dispersiyonları üzerindeki etkisi araştırılmış ve yüksek oranda ışık ve sıcaklığa maruz kalmanın zeta potansiyelini ve dolayısıyla formülasyonların kararlılığını azalttığı belirtilmiştir (28).

KLN'ler süspansiyon halinde yüksek zeta potansiyel kararlılığı sağlamaktadırlar (13, 15). Yapılan çalışmalarda, zeta potansiyel değeri  $|30|-|60|$  mV arasında ise oldukça iyi elektrostatik kararlılık,  $|5|-|15|$  mV arasında flokülasyon oluşması ve  $|3|-|5|$  mV arasında da maksimum flokülasyon gözlenmiştir (11).

Bütün partiküller, dağıldığı sulu ortamlarla yüzeylerindeki yük nedeniyle bağlantı halindedir. Düşük pH değerlerinde yüksek agregasyon eğilimindeki bazı KLN'ler, noniyonik yüzey etkin maddeler yardımıyla gerçek zeta potansiyellerini koruyabilmektedir ve dolayısıyla agregasyona engel olunmaktadır (21, 63).

Sterik kararlılık sağlayan maddelerle hazırlanmış sistemlerde bu kural çok kesin değildir (11, 13). Sterik kararlılık sağlayan maddelerin (Poloxamer® 188 gibi) adsorpsiyonu ile partikülün gerilim alanındaki yüklerin hareketinin

engellenmesi sonucu zeta potansiyel düşer. Buna bağlı olarak da, partikül yükleri düşük olur ancak agregat oluşumu azdır (11, 28, 37).

#### **2.1.3.4. Kristalizasyon ve Lipit Modifikasyonunun İncelenmesi**

Lipit kristalizasyonu, KLN taşıyıcı sistemlerin etkinliği açısından oldukça önemli bir konudur (13). Kristal yapı katılar, sıvılara ve gazlara benzemezler. Kristalin katılar, erime dereceleriyle bağlantılı olarak katı durumdan sıvı hale geçerler (11, 42).

Katı lipitlerin eritilmesi ve sonra tekrar oda sıcaklığına soğutulması ile içine etkin madde hapsedilen lipitin, tekrar katılaşıp ilaç taşıyıcı sistem oluşturulması tekniği ile hazırlanan KLN'lerde, bu işlemler sırasında ortamda bulunan yüzey etkin maddeler, etkin maddeler veya diğer yardımcı maddelerden dolayı katı lipitin fiziksel özelliği değişir (26). Kristalizasyon derecesi ve lipit yapıda oluşan değişikliklerin değerlendirilmesi, doğrudan doğruya hapsedilen etkin maddeyi ve salım hızını etkilemektedir (13, 26). Üretimden sonra partiküllerin kristallenme oranları, kullanılan lipitin, yüzey etkin maddenin ve kullanılan kararlılık sağlayıcı maddelerin fonksiyonu ile değişebilir ve bu etkenler partiküllerin saklama süresince değişmesine neden olur (22, 41, 42).

Hazırlanan KLN'lerin erime dereceleri, kullanılan saf lipitin erime derecesinden düşüktür (19). Bu değişiklikler X-ışını kırınımı ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC- Differential Scanning Calorimetry) yöntemleri ile kolaylıkla saptanabilmektedir (13).

Kristalizasyon, soğutma derecesini farklılaştırarak veya lipit matrisine inhibitörlerin eklenmesiyle önlenir. Yapılan çalışmalarda, kristalizasyonun ve yağ asitleri kullanarak yağların polimorfik geçişlerinin engellenmesinde, yüzey etkin maddelerin ve saklama süresinin etkili olduğu bildirilmiştir (11, 50). Dolayısıyla, jelleşme eğilimli KLN'lerde lipit değişimlerini engellemek için Poloxamerler® kullanılmıştır (11, 19).

Genellikle, polimorfizmde kimyasal yapı aynıdır, ancak erime dereceleri, X-ışını kırınım şekli ve çözünürlük gibi termodinamik özellikler farklılık gösterir (11, 13). Uzun zincirli trigliserit nanopartiküllerinin kristalizasyon sonrası polimorfik geçişleri, kısa zincirli trigliseritlerden daha yavaştır. Küçük kristalin yapılarda polimorfik geçişlerin en hızlı olduğu görülmüştür (19). Gliseritlerde,  $\alpha$ ,

$\beta'$  ve  $\beta$  olmak üzere üç tip polimorfik şekil olduğu ve en kararlı şeklin  $\beta$  olduğu belirlenmiştir (11, 13).

#### **2.1.4. Etkin Madde Yüklenmesi ve Hapsedilmesi**

Etkin maddelerin KLN içine sokulması ile daha az değişken biyoyararlanım ve uzatılmış plazma düzeyleri sağlanır (17). Bu küçük partiküllerin genel adhesif özelliklerinden dolayı kontrollü salım sağlanabilmektedir (21). KLN'ler, lipofilik, hidrofilik ve suda çözünürlüğü az olan etkin maddeler için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler (20, 28, 38, 69).

KLN'lere yüklenebilen ve hapsedilen etkin madde miktarı, taşıyıcı sistemin tasarımı, hazırlama yöntemi ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (40, 50). Ayrıca, bu partiküller, uygulama yollarına bağlı olarak, etkin maddeyi kimyasal ve biyolojik degradasyondan koruyabilmektedir (70). Bu nedenle, nanopartiküler sistemler için kullanılacak olan lipid yapılar uygulama yollarına göre seçilmektedir (11, 13).

KLN'deki etkin madde molekülleri, katı lipidlerin içinde erimiş (24) veya dağılmış, partikül yüzeyine tutunmuş veya sterik ve fosfolipidik kararlılık sağlayan maddeler yardımıyla partikülün en dış tabakası içinde yer almış olabilirler (32, 40).

Etkin madde yükleme kapasitesine, etkin maddenin erimiş lipid içerisindeki çözünürlüğü ve karışabilirliği, katı lipid matrisin kimyasal ve fiziksel özelliği ile polimorfik durumu etkili olur (29, 33). Suda çözünen etkin maddenin yüklenmesi % 1-25 arasında ve yağda çözünen etkin maddenin yüklenmesi % 80'in üstünde olabilir (29).

Suda az çözünen etkin maddeler için, KLN dispersiyonlarının bağlama kapasiteleri, KLN'lerin kompozisyonuna bağlıdır ve genellikle suda az çözünen birçok madde için, erimiş lipitin içinde az çözünme ile sınırlandırılır (25). Sıvı lipidler, katı lipidlere oranla daha fazla etkin madde çözebilirler (16).

Etkin maddenin sistem içinde dağılımı ve KLN'lerin içerisindeki hareketliliği çok sınırlıdır. Bu durum, KLN'lerin potansiyel ilaç taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmesinde çok büyük önem taşımaktadır. KLN dispersiyonunda, bileşiğin fizikokimyasal özellikleri ve yapısı dağılımda etkilidir (25, 50).

Etkin maddenin lipit nanopartiküllere yüklenmesi üç şekilde mümkündür (26):

- Katı çözelti modeli,
- Çekirdek-kabuk modeli, etkin madde açısından zengin kabuk,
- Çekirdek-kabuk modeli, etkin madde açısından zengin çekirdek.

Soğuk homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan KLN'lerde, etkin madde lipit matris içinde dağılır ve katı bir çözelti oluşturur. Sıcak homojenizasyon yönteminde ise, sıcak etkin madde-lipit çözeltisinden etkin maddenin sulu faza geçmesi ve daha sonra soğuma sırasında tekrar katı lipit çekirdeğe partisyonu söz konusudur. Bu durumda, kabuk kısmında etkin madde birikimi sonucu etkin madde açısından zengin kabuk oluşur. Eğer lipit yeniden kristalize olmadan etkin madde çökerse, etkin madde açısından zengin çekirdek modeli gerçekleşir (26, 29).

#### 2.1.5. Etkin Madde Salımı

Yapılan birçok çalışmada, ilaç taşıyıcı sistemlerin üretim parametrelerinin belirlenmesi, uzun süreli kararlılığı, morfolojik karakterizasyonu ve *in vivo* toksisitesi araştırılmıştır. Bunlara ek olarak, etkin madde içermesi ve salımının geliştirilmesi de, planlanan ilaç taşıyıcı sistemin değerlendirilmesi ve oluşturulmasında önemli konulardır. Nanometre boyutundaki lipit partiküllerle yapılan çalışmalarda en temel sorun, etkin madde salımının partikülün parçalanması ile olması ve sürekli etkinin sağlanamamasıdır (12, 47).

Nanopartiküllerde, etkin maddenin tamamı genellikle ilk birkaç dakikada salınır veya başlangıçtaki hızlı etkin madde salımını takip eden sürekli ilaç salımını gösteren bifazik salım profili gözlenir. Hızlı etkin madde salımı, geniş yüzey alanı ve lipit nanopartiküller içinde etkin madde dağıtılmasının az olması sonucu ortaya çıkar (32).

KLN'lerin hücrelerle ve dokularla etkileşim oranı ve mekanizması hakkında teorik bilgi sınırlıdır (32). Bu bilgiler KLN'lerin tasarımı ve terapötik fonksiyonu için oldukça önemlidir. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin taşınma süreciyle önemli bağlantıları olduğu bilinirken, bu bağlantıların *in vivo* ortamdaki durumu tam olarak bilinmemektedir (32).

KLN'ler oda sıcaklığında katı haldedir; bu nedenle, içerdikleri etkin maddelerin hareketliliğinin azalması etkisi ile kontrollü salımını sağlarlar (47). Polimerik nanopartiküllere benzer şekilde, etkin maddenin lipit matrisle oluşturduğu bileşim, etkin maddenin kimyasal degradasyona karşı korunmasına ve oldukça esnek etkin madde salım profillerinin oluşmasına yol açarlar (18).

KLN'lerin, uygulamadan sonra homojen dağılması ürünün tekdüzeliğine (11), bileşimine ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (13, 32). KLN'lerden *in vivo* salım, lipit matrisin degradasyonu, etkin maddenin matristen difüzyonu (22) veya içerdiği etkin maddenin partiküllerin çatlaması ile salımı şeklinde olmaktadır (71).

Yapılan çalışmalar, *in vitro* salımın dakikalardan yedi haftanın üstüne kadar çeşitli zaman aralıklarında mümkün olduğunu göstermiştir (35). Salım kinetikleri, kolloidal boyuta ve salım koşullarına (*sink* veya *sink-olmayan* koşullar, salım ortamı gibi) bağlıdır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda, KLN'lerden salınan etkin madde miktarında enzimlerin payının önemli olduğu belirtilmiştir (22). Enzimler tarafından gerçekleştirilen degradasyonu önlemek için, kullanılan lipit ve yüzey etkin maddenin seçimi önemlidir. Bu seçim, salım profilinde istenilen yönde değişiklik yapılmasına olanak sağlayabilmektedir (13).

Etkin madde, hedeflendirilmiş hücre tarafından partikülün yakalanmasından sonra, taşıyıcı sistemlerden etki bölgesine difüze olabilir. Bunun gerçekleşebilmesi için, partikülün öncelikle hücrenin plazma membranında bulunan ve hücreyi dış etmenlerden koruyan engellerden geçmesi gerekmektedir. Transmembran ve hücre içi taşınma, etkin maddenin hücre içi aktivitesinde etkili rol oynar. Engelleri geçerek etkin maddenin hücre içine alınması için, serbest difüzyon, pasif taşınma, aktif taşınma ve endositoz (pinositoz, fagositoz) olmak üzere dört esas yol vardır (32).

#### **2.1.6. KLN'lerin Kararlılığı**

Lipitlerin kimyasal transformasyonunda, fiziksel özelliklerinde, sistemin yapısında, bağlanma ve salım kapasitelerinde, yüzeysel özelliklerinde ve *in vivo* etkinliklerinde zaman içerisinde değişiklikler olduğu gözlenmiştir (11).

Formülasyonların kararlılıklarının belirlenmesi, yeni lipit taşıyıcı sistem geliştirilirken ilk adımdır. Lipit sistemde kararlılık çalışması, birçok parametrenin

çok-disiplinli çalışılmasıyla sonuçlandırılabilir. Fizikokimyasal kararlılık, bileşenlerin seçimi ve bunların kimyasal yapılarıyla doğrudan ilişkilidir (11). Molekül ağırlığı yüksek olan bileşenler ve uzun zincirli moleküller, düşük ağırlıklı ve küresel yapıdaki moleküllere göre degradasyona daha duyarlıdır (13).

KLN'lerin kimyasal kararlılıkları dikkate alındığında, her zaman trigliserit hidrolizinin oluştuğu gözlenmiştir. Buna mono- veya digliseritler ile yağ asitleri neden olur. Ancak, KLN'lerin içindeki bölgeler, dış etkenlerden, dıştaki fosfolipitlerden çok daha az etkilenir. Ayrıca, dağıtılmış lipitin polimorfizmi ve kristalizasyon kinetiklerinden dolayı, KLN süspansiyonları diğer sistemlerle karşılaştırıldığında daha kararlı yapıdadırlar (11).

KLN'deki lipitlerin kristalizasyon süreci, jelleşme veya bağlı etkin maddenin partikül dışına çıkarılması gibi kararsızlık durumlarına neden olabilir. Çevrelenmemiş lipit kristallerin yüzeyleri, partiküller arası kristal büyümesine (21), partikül yüzey yükünün değişmesine (11, 19, 24) ve bu oluşumlar da jelleşme ve partikül boyutunun büyümesine yol açabilir (11).

Polimorfizm, katı dozaj şekillerinin kararlılıklarında etkili olan fiziksel degradasyonda çok önemlidir (11). Gliseritlerin en kararlı şekli  $\beta$  şeklindedir. Eriyen lipitin  $\alpha$  şeklinden  $\beta'$  şekline ve buradan da  $\beta$  şekline geçişi söz konusudur. Bu kararsız yapı, başlangıçtaki küresel yüzey yapılarını yavaş yavaş kaybederken, saklama süresince yükselen sıcaklıklarda en kararlı haline dönüşür (11, 13, 26).

Lipit yapıların değişmesiyle jelleşme oluşumu sonucunda zeta potansiyel düşer ve partikül boyutu büyür (11, 28). Pek çok çalışmada, jelleşmeyi, kristalizasyon oluşmasını sağlayan etkenlere (yüksek sıcaklık, ışık) benzer etkenlerin hızlandırdığı ve lipit fazın kristalizasyon derecelerinin geriye dönüşümsüz olan jelleşme derecesiyle doğrusallık gösterdiği belirtilmektedir (11).

KLN kararlılığının optimize edilebilmesi için, formülasyon işlemi sırasında oluşabilecek kararsızlık ve saklama ve biyolojik ortamlardaki kararsızlık mekanizmaları bilinmelidir. Partikül boyutu 1  $\mu\text{m}$ 'den büyük olanların sayısının artması fiziksel kararlılığın azalmasının göstergesidir (11).

KLN'lerin partikül boyutunu, lipit, yardımcı ve etkin madde kompozisyonu, formülasyon işlemi (sıcaklık, homojenizasyon yöntemi), sterilizasyon, dağıldığı ortam, dondurarak kurutma ve saklama koşulları gibi pek



çok etken etkilemektedir (11, 28, 70, 72). Sıcak homojenizasyon yönteminde, yüksek basınç kullanıldığından, dağılımı homojen olan ufak nanopartiküller elde edilmesinin ardından, partikül boyutundaki büyüme makroskobik olarak gözlemlenebilir ki bu durum kararlılığın bozulduğunun belirtisidir (11). Düşük pH değerlerinde de agregasyon ve büyük partikül boyutunun varlığı görülmüştür (21).

Mikrobiyolojik kararsızlık, sıvının bulanıklığını hızla artırır. Bulanıklık, süspansiyon partiküller arasında ışık geçirilmesi ve yansımalarıyla derecelendirilebilir. Bulanıklık, partiküller ile dağıldığı ortam arasında kırılma indislerindeki farklılığa ve partiküllerin heterojen dağılımına bağlıdır (11).

Uygulamalarda, dispersiyon ve agregasyon süreçlerinin anlaşılmasında anahtar görevi üstlenen zeta potansiyelin kontrolü, kolloidal dispersiyonun saklanması sırasında kararlılığın korunması hakkında da bilgi verir (11).

pH'daki azalma ile artan elektrolit konsantrasyonları zeta potansiyeli değiştirir ve kararlılığı bozar (21, 28). Kararsızlık durumunda kremalaşma veya koalesans görülebilir. Bitmiş ürün, homojen olmayan bir sistem haline dönüşmüş ve viskozite özellikleri değişmiş olabilir (11).

Formülasyonlarda amfifilik polimerler veya safra tuzları gibi yüzey etkin maddeler, fosfolipit benzeri lipit molekülleri oluşturabilmek için kullanılır. Fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidinasitol gibi fosfolipitlerin pH 7'deki konsantrasyonu %2'den (h/h) yüksek olduğu zaman zeta potansiyelde azalma görülmüştür (28). Negatif yüklü fosfolipitlerin miktarının artırılması, KLN'lerin yüzeyinin tamamen fosfolipit ile kaplanmasıyla zeta potansiyelin düşmesine ve kararsızlığa neden olmaktadır (11).

Saklama koşulları, kararlılığı etkileyen faktörlerdendir ve sıcaklık, ışık ve ambalaj maddesi gibi kararlılığı belirleyen faktörleri içermektedir. Sistemlere enerji (ısı ve ışık) girişi ile partikül boyutu büyür ve jelleşme görülür (19). Işıksız ve düşük ısıda zeta potansiyelin sabit kalabilmesi kolaylıkla sağlanabilmekte ve KLN dispersiyonları kararlılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, Compritol® (gliseril behenat) KLN'leri 8°C'de, karanlıkta ve silikonlanmış şişelerde 3 yıl kararlı kalabilmiştir (11, 28).

Alternatif olarak, sıvı dispersiyonlar, liyofilizasyon veya püskürterek kurutma ile kuru ürün haline dönüştürülebilirler. Ayrıca, sulu dispersiyonlarda

görülen flokülasyon gibi kararsızlık durumları yardımcı yüzey etkin madde kullanılarak engellenebilir (24).

### **2.1.7. KLN'lerin Sterilizasyonu ve İkincil Üretim Basamakları**

#### **2.1.7.1. Sterilizasyon**

Nanopartiküllerin sterilizasyonu paranteral uygulamalar için gereklidir (13, 14, 29, 40). Sterilizasyon, süzme, gama ışınları veya buhar ile sağlanabilir (13, 29, 72).

Otoklav ile buhar sterilizasyonu, sıcaklığa dayanıklı olan etkin maddelerle oluşturulmuş formülasyonlarda uygulanabilen basit bir yöntemdir. Bu yöntemle sterilizasyon, KLN dispersiyonları için uygundur (24). KLN'lerde buharla sterilizasyon, genellikle, 121°C'de ve 15-20 dakika uygulanmaktadır (13, 19, 24, 54, 73). Sıcaklığın etkisi sonucu lipitlerin erimesiyle su-içinde-yağ (y/s) emülsiyonları oluşur ve sıcaklığın düşürülmesiyle lipit tekrar kristallenir (13, 24). Yapılan çalışmalarda, KLN'lerin küresel yapıları genellikle korunmuş, çok belirgin olmayan boyut artışı gözlenmiştir (13, 24, 33, 72). Bu sonuç, bazı polimerik taşıyıcılarla karşılaştırıldığında bir üstünlüktür (24). Sterik kararlılık sağlayan yüzey etkin maddelerle formüle edilmiş KLN'lerin otoklavla sterilizasyonu az tercih edilmektedir (19, 24). Poloxamer® serileri ile hazırlanmış KLN'lerin otoklavlanması sonucu, partikül boyutunun büyüdüğü, zeta potansiyellerin pozitiften negatife düştüğü ve etkin madde hapsedilme oranında da düşmeler olduğu gözlenmiştir (19, 33). Partikül boyutunda görülen artış, sterilizasyon sıcaklığının polimerlerin kritik flokülasyon sıcaklığına çok yakın olması nedeniyledir. Bu nedenle, Poloxamer® serilerinin kullanıldığı formülasyonların ısı ile sterilize edilmemeleri veya sterilizasyon sıcaklığının azaltılması (örneğin, 100°C) ve buna bağlı olarak sterilizasyon süresinin uzatılması gerekmektedir (13, 45).

Gama ışınları ile sterilizasyon, bazı farmasötik preparatlar için uygun bir sterilizasyon yöntemidir ve en çok lipozomların sterilizasyonunda kullanılmaktadır (47). Isıya duyarlı maddelerin sterilizasyonu için de gama ışınları ile sterilizasyon alternatif bir yöntem olmaktadır (13). Lipit ve lipozomal yapılar üzerinde gama ışınlarının etkileri araştırılmış ve gama ışınları ile radyasyon süresince fosfolipitlerin kimyasal degradasyonlarının olduğu görülmüştür (36).

Gama ışınları, yüksek enerjileri nedeniyle serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu radikaller de formülasyondaki maddeler ile etkileşerek kimyasal farklılıklara neden olabilmektedir (13, 45). Sulu dispersiyonlarda flokülasyon oluşumu gözlemlendiği için kullanımı kısıtlıdır (73). Liyofilizasyon ve dondurmak veya serbest radikal tutucu eklenmesi ile degradasyon etkisi azaltılabilmektedir (36).

Süzme ile sterilizasyon yöntemi için yüksek basınca gerek vardır ve partikül boyutu 200 nm'nin altında olan formülasyonlarda kullanılmalıdır (13, 24, 45). Aksi halde, 200 nm'den büyük olan partiküller süzgeci tıkayabilir (24, 54).

#### **2.1.7.2. Liyofilizasyon**

Parenteral uygulama için, etkin madde yüklü KLN'ler dondurularak kurutulabilir (57, 74). Hidroliz eğilimi olan etkin maddelerin kimyasal kararlılıkları bir sorun oluşturmaktadır (30, 57). Ayrıca, saklama süresince dispersiyonlar içinde agregasyon ve partikül boyutunun büyümesi engellenmelidir. Her iki problemin çözümlenmesi için liyofilizasyon uygun bir yöntemdir. Dondurularak kurutulmuş formülasyon tekrar yapılandırıldığında, *iv* uygulama için kullanılan taşıyıcı sistemlerin özelliklerine sahip olmalıdır (57). Karbonhidratlar ve amino asitler gibi çeşitli kriyoprotektan maddeler, KLN'lerin dondurularak kurutulması veya dondurma-çözünme sırasında agregat oluşmasını engellemek için kullanılmaktadır (11, 74). Ayrıca, sterik kararlılık sağlayıcı maddeler de liyofilizasyon sırasında agregat oluşumunu önler (33). KLN süspansiyonlarının uzun süreli kurutulması iyi sonuç vermiştir. Bunun yanında, yavaş dondurmanın en iyi yöntem olduğu belirtilmiştir (11). En uygun liyofilizasyon parametreleri ve kriyoprotektan madde seçimi ve konsantrasyonu saptandığı takdirde, KLN'lerin kararlılıkları sağlanabilmektedir (11, 30, 74). Ancak, dondurularak kurutma işlemi süresince partikül boyutunun büyümesini önlemek KLN'lerde lipozom ve emülsiyonlardan daha zor görünmektedir (19, 74).

Liyofilize edilmiş etkin maddesiz KLN'ler, partikül boyutu dikkate alınarak, *iv* injeksiyon için güvenle kullanılabilir şekilde yeniden yapılandırılabilir. Etkin madde (örneğin, tetrakain, etomidat) bağlı ise, KLN'lerin yeniden yapılandırılmasında kalitenin bozulduğu görülmüştür (30). Oral ilaç alımı

için dondurularak kurutulan KLN'lerin partikül boyutlarının büyümesinin belirli sınırlar içerisinde olduğu belirlenmiştir.

### **2.1.7.3. Püskürterek Kurutma**

KLN'lerin *iv*, oral ve dermal uygulamalarının bazılarında, sıvı dispersiyonun kuru ürüne dönüştürülmesi kullanışlı ve bazen de gereklidir. KLN granülleri veya tozları, kapsül içinde, tablet içinde veya pelletler halinde kullanılabilir (56). KLN'ler, içerdikleri etkin maddenin hidrolizden, ısının ve ışığın etkisinden korunması için sulu dispersiyonlardan daha güvenlidirler. Uzun süreli kararlılığı sağlamak KLN ile mümkündür (11, 19).

Püskürterek kurutma yöntemi liyofilizasyona alternatif bir yöntemdir (13, 56). Liyofilizasyonla karşılaştırıldığında maliyeti daha düşüktür (13). Bu yöntem, gıda, kimyasal ve farmasötik endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Oluşan ürün *iv* olarak uygulamaya uygun olmalıdır. Partikül boyutunun bu uygulama yolu için gerekli olan boyutlarda olması gerekmektedir (56).

### **2.1.8. KLN'lerin Toksisitesi**

Bir etkin maddenin terapötik indisi, hedef hücredeki reseptörlerle özel etkileşimi ve bağlanması, hedeflendirilmediği dokuya mümkün olduğunca az bağlanması ve farmakolojik etkisinin güvenilirliğiyle değerlendirilir (32).

Lipit sistemler polimerik partiküllerle karşılaştırıldıklarında, fizyolojik lipitlerin bileşimleri olmaları nedeniyle, düşük toksisite üstünlüğüne sahiptir ve *iv* uygulamalar için güvenilirdir (11, 13, 75).

Etkin madde yüklenmemiş katı lipit nanopartikül formülasyonlarının hücreye geçişinin oldukça hızlı olduğu ve hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Etkin madde yüklü partiküllerin etkisinin ise, diğer kemoterapötik ajanlarla karşılaştırıldığında, yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (75, 76).

### **2.1.9. KLN'lerin Uygulama Alanları**

KLN'ler çeşitli uygulama yolları düşünülerek geliştirilmiş kolloidal terapötik sistemlerdir (32). Etkin madde bağlı KLN'lerin, *iv*, *im*, oral, topik, oftalmik, subkütan, dermal ve kısmen pulmoner uygulamalarda güvenilir oldukları rapor edilmiştir (28, 33, 56, 57, 74).

Etkin maddelerin *in vivo* etkileri, özellikleriyle tam anlamıyla belirlenememektedir. Ancak, taşıyıcı sistem, özel amaçlar için, etkin maddenin kontrollü ve yerel salımına imkan verir (13). KLN'ler özel doku alanlarına etkin maddelerin hedeflendirilmelerinde iyi birer araçtır (34). KLN'lerin *in vivo* ortamdaki davranışları, uygulama yolları ve biyolojik ortamdaki biyolojik etkileşmelerine bağlıdır. Biyolojik ortamda dağılım (partikül yüzeyine biyolojik maddelerin tutunması ve biyolojik ortamda KLN bileşenlerinin desorpsiyonu) ve enzimatik süreçler (örneğin, lipaz ve esteraz ile lipit degradasyonu) gibi biyolojik ortam ve KLN etkileşimleri söz konusudur (13, 39).

KLN'ler, parenteral uygulamalar için uygun özelliktedir. Parenteral uygulamada kullanılan geleneksel taşıyıcı sistemler olan emülsiyon ve polimerik nanopartiküllerin üstünlüklerinin toplandığı, partikül boyutları 50 nm'den 1000 nm'ye kadar değişiklik gösteren sistemlerdir (47) ve *iv* uygulama sonrasında fagositik hücreler tarafından fagosite edilirler (22).

Pulmoner uygulama için bugüne kadar yapılan çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Katı lipit nanopartiküllerin büyüklüğü çok düşük olduğu için, toz haldeyken akciğere doğrudan uygulama başarılı olmayacak ve uygulanan KLN'ler nefesle beraber dışarıya atılacaktır (29, 45). KLN'lerin sulu dispersiyonları nebulizatör yardımıyla veya kuru toz halinde kullanılabilir (33). Etkin madde bronşlarda depolanır ve kontrollü olarak salınır (29). Pulmoner yolla, yerel olarak veya sistemik tedavide antiastma ve antimikrobiyel olarak kullanılacak potansiyelde bulunmuştur (33).

Zimmermann ve Müller (21), KLN formülasyonlarının fiziksel kararlılıklarıyla ilgili yaptığı çalışmada, *in vitro* olarak GI ortamda, iyonik bağ ve değişik pH değerlerinin KLN'lerin kararlılığının bozulmasında etkili olduğu kanısına varmışlardır. Ancak, bu etkinin uygun lipit ve yüzey etkin madde konsantrasyonu ile azaltılabileceğini veya ortadan kaldırılabileceğini bildirmişlerdir (21, 77, 78).

KLN'ler diğer partiküler taşıyıcılarla karşılaştırıldığında, iyi tolere edilebilmeleri ve biyodegradasyon özellikleri ile oküler uygulamalarda adhezyon sonucu gözde daha uzun süre kalarak, görüntüyü bozmadan yüksek

biyoyararlanım göstermeleri ve beyine hedeflendirilebilmeleri açısından daha üstün sistemlerdir (29, 71).

KLN'ler, topik uygulamalar için de ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. Deri yüzeyinde film tabaka oluşturarak transepidermal su kaybını (TEWL-transepidermal water loss) azalttıkları rapor edilmiştir (31). Nemlendirmeyi artırarak etkin maddenin penetrasyonunun *Stratum corneum*'a doğru olmasını sağladıkları görülmüştür.

Son yıllarda, biyoteknolojik yöntemler ve genetik mühendisliğinin ilerlemesiyle farmasötik açıdan aktif polipeptitler geliştirilmiştir. Bu yeni terapötik biyomoleküller, büyük boyutları, kısa plazma yarılanma ömürleri ve hastalığın tedavisi sırasında uzun terapötik süreçte sık injekte edilmeleriyle karakterize edilirler (71). Son bir yıl içerisinde KLN'lerin gen tedavisine yönelik uygulamaları üzerine çalışmalar başlamıştır. Yalnızca birkaç peptit içeren KLN çalışması yapılmıştır. Peptitler, hidrofilik özellikleri nedeniyle KLN'lerin lipofilik matrisi içine kolayca giremez (71).

Aşıların uygulanmasından sonra immün yanıtın artırılması amacıyla kullanılan taşıyıcı sistemlere KLN'ler de eklenmiştir. Katı durumda olan nanopartiküllerdeki lipit bileşenlerin yavaş degradasyonu, KLN'lerin immün sistemde daha uzun süre kalmasını sağlamaktadır (29, 69).

## 2.2. GEN TEDAVİSİ

Gen teknolojisi ve Moleküler Genetikte son on yılda gerçekleştirilen ilerlemelerle pek çok kalıtsal hastalığın hem düzensizliğinin ortaya konması ve hem de tedavi yönünden çok olumlu adımlar atılmıştır (2, 79).

Gen tedavisi, DNA'nın kalıtsal materyal olarak belirlendiği 1944 yılından sonraki çalışmaların bir ürünü olarak ortaya çıkmıştır. Bu çalışmaların 50 yıldaki gelişmelerin büyük çoğunluğu son 15 yıllık döneme yığılmaktadır. 1953 yılında DNA'nın yapısının belirlenmesinden sonra 1961-1967 yılları arasında genetik kod anlaşılmiş ve 1968 yılında restriksiyon enzimleri bulunmuştur. 1973 yılında farklı genlerin tek bir canlı hücre içerisine sokulabilme teknikleri oluşturulmuş ve 1977 yılında rekombinant DNA teknikleri ile bakterilerde insan büyüme hormonu üretilmiştir. 1978 yılında insan insülin geni klonlanmış ve 4 yıl sonra da (1982) humilin ilk kez piyasaya sürülmüştür (2, 4).

Gen tedavisi çok geniş olarak tanımlanırsa, fonksiyonel bir genin hastanın hücrelerine aktarılacak suretiyle herhangi bir kalıtsal metabolik hastalığın (80, 81) (yani genetik düzensizlik ya da doğumsal kusur) düzeltilmesi ya da hücreye yeni bir fonksiyon kazandırılması (örn. immünostimulatör bir genin kanser hücrelerine aktarımı ile kendi kanserine karşı aşılması) şeklindeki gen tedavisi tanımı içerisinde tüm genetik hastalıkların tedavisinin yanında kanser enfeksiyon hastalıkları ve insan vücudundaki genetik modifikasyonlar sonucu oluşan oto-immün hastalıkların tedavi ya da önlenmesi de girmektedir (2, 3, 4, 82, 83, 84).

Yeni genetik materyal tümör hücrelerini öldürebilecek, immün cevabı artırabilecek veya hastalık yapabilecek bir ajana karşı koruyabilecek özellikte hazırlanmalıdır. (3, 81). Bu güçlendirilmiş genler, fonksiyon kaybı korumada, immün cevabı düzenlemede etkilidirler (85).

Gen terapide önemle bilinmesi gereken temel noktalar :

- Gen ekspresyonunun iyice anlaşılması,
- İlgili genin tanımlanması ve klonlanması,
- Hedef hücrenin iyi bilinmesi,
- Hedef hücreye genin transferi,
- Transfer sonrası genin uzun süre uygun ve yeterli şekilde ekspresyonu şeklinde özetlenebilir (84, 85).

Kalıtsal hastalıkların gen terapi yoluyla iyileştirilmesinde, somatik gen terapi ve *germline* gen terapi olmak üzere iki strateji kullanılmaktadır (2). Somatik gen terapide, genetik defekt kalıtsal hastalığı olan kişinin yalnızca somatik hücrelerinde düzeltilirken, *germline* gen terapide, genetik modifikasyon gamete yapılır. Gen terapide uygulama aşamasında olan bu iki yöntemde temel amaç normal genlerin hastanın hedef hücrelerine etkin bir şekilde transferidir (2, 85).

Gen tedavisinin iki temel özelliği bulunmaktadır. Bu özelliklerden ilki, normal bir genin hangi tür hücre veya dokuya transfer edileceğinin bilinmesidir. İkinci temel özellik gen veya nükleotit dizisinin önce hedef hücreye transferi daha sonra da hücre membranından geçerek genin eksprese olacağı çekirdek içine girmesidir (2, 85).

### 2.2.1. *Ex-vivo* Gen Tedavisi

*Ex vivo* gen tedavisinde amaç, dokular veya organlardaki biyolojik fonksiyon bozukluklarını gidermek veya tamir etmektir (86). Gen tedavisinde uygulanan *ex-vivo* yöntemde hastadan alınan hatalı hücreler doku kültüründe üretilip, normal genin bir vektör ile *in vitro* olarak aktarılmasından sonra hastaya geri verilmesiyle gerçekleşir. Transferi yapılan normal gen hedef hücrelerin kromozomundaki DNA'ya stabil olarak bağlanır (2, 86).

Canlı hücrelere gen transfer yöntemleri yaklaşık 20 yıldır uygulanmaktadır. Hedeflenen, etkin şekilde salım ve hedef hücre veya dokularda terapötik genlerin ekspresyonunun sağlanabilmesidir (85).

### 2.2.2. *In-vivo* Gen Tedavisi

*In vivo* gen tedavisi yönteminde ise, genetik materyal hastanın hücreler veya dokularına doğrudan transfer edilir. Bu durumda, gen ekspresyonu genellikle yüksek fakat geçici olmaktadır (2). Gen tedavisinin geniş bir uygulama alanı bulabilmesi için dokuya *in vivo* gen transfer yöntemlerinin gelişmesi gerekmektedir (4).

### 2.2.3. Gen Transfer Yöntemleri

Çok hızlı gelişmelere karşın gen transfer yöntemlerinin klinik uygulaması için hala sorunlar mevcuttur. Halen uygulanmakta olan gen transfer teknikleri kimyasal, fiziksel ve füzyon yöntemleri ile reseptör aracılı endositoz ve rekombinant virüs vektörleridir. Her tekniğin teorik olarak üstünlükleri ve sakıncaları vardır (4).

Yapılan çalışmalarda, üzerinde çalışılan hastalıkların yarısından fazlasını kanserler oluşturmaktadır. Genetik materyalin transfer edilebilmesi için öncelikle hedef hücrede nükleik asitleri salabilecek özellikte bir vektörle paketlenmesi gerekmektedir. Vektöre bağlanmış terapötik nükleik asitlerin hücre sitoplazmasına geçebilmesi ve oradan da çekirdeğin içine ulaşması gerekir. Bu durumda, hücre DNA'sına entegre olması ve istenilen proteinin ekspresyonunun üretiminin sağlanması istenir. Yabancı DNA'nın bu işlemleri gerçekleştirmesi veya hücre dışına atılması mümkündür (82).



Gen tedavisinde kullanılan vektörler biyolojik (viral vektörler) ve nonbiyolojik (non viral vektörler) sistemler olarak iki grupta sınıflandırılır. Her iki grupta bazı üstünlük ve sınırlamalar vardır (87).

### 2.2.3.1. Viral Vektörler

Biyolojik taşıyıcı sistemi olan virüsler, girdikleri hücreleri enfekte ederler ve kendi genetik mateyali bu hücrelere aktarırlar. Gen tedavisinde kullanılacak virüslerin, laboratuvarlarda patojen özellikleri uzaklaştırılır ve yüksek gen transfer etkinliklerinden faydalanılır (87).

İlk gen terapi klinik protokolü 1990'da başlamıştır. Adenozin Deaminaz (ADA) enzimi yetmezliği olan hücreden alınan T hücreleri içerisinde ADA geninin kopyası retroviral vektörleri ile sağlanmıştır (3).

1999 yılına kadar 300 klinik protokol dünya çapında 3 000 hasta üzerinde uygulanmıştır. Bunların çoğunluğunda viral vektörler kullanılmıştır. Bu vektörlerin % 60'dan fazlasını retroviral vektörler oluşturmaktadır (3).

Diğer yandan, viral vektörler dokulara ve hücrelere yönlendirilme yeteneğine sahiptirler ve viral vektörlerin üretimi ve saflandırılmaları en önemli noktalardır (85).

### 2.2.3.2. Retroviral Vektörler

Retroviral vektörler, klinikte gen salım sistemleri olarak en yaygın olarak kullanılan taşıyıcılardır (79, 82, 88, 89) ve bunların çoğunluğu *Moloney Murine Leukemia virüs (MuLV)* kökenlidir (4, 3,79, 85).

Bu vektörler transfer için arzu edilen genlere sahip (~ 6-8 kb uzunluğunda yabancı DNA), replikasyon yetenekli virüslerin üretimi için gerekli olan viral genlerin değiştirilmesi suretiyle elde edilmektedir (3, 4, 79, 82,).

Retroviral vektörler, glikoprotein yapılı kılıflara sahiptir ve bu özellikleri belirli doku hücrelerine yönlendirilebilmelerini (karaciğer), hedef hücre membranına yapışmalarını ve füzyonun gerçekleşmesini sağlamada önemli rol almaktadır (79, 90). Alternatif olarak bazı retrovirüsler, hedef hücreye bağlanarak endositoz yoluyla hücre içerisine alınırlar. Boyutları 90-140 nm olarak rapor edilmiştir (79, 91).

Retroviral vektörler *in vivo* olarak vücuda doğrudan uygulandıklarında insan bileşenleri tarafından çok çabuk yok edilme nedenlerinden dolayı, yarılanma

ömürleri kısaltmakta ve gen transferinin etkisi düşmektedir (3, 89). Ayrıca, konakçı hücrede bağışık yanıtı sebep olurlar (79).

#### **2.2.3.3. Adenovirüs Vektörler**

Adenovirüsler, üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan DNA virüsleridir. Bu adenovirüs vektör sistemi başlangıçta kistik fibroz hastalığını tedavi etmek amacıyla, sistik fibroz transmembran regülatör (CFTR) geninin solunum yolu hücrelerine transferi için kullanılmıştır. Ayrıca, CFTR geni adenoviral vektörlerle hayvanın solunum yoluna enjekte edilmiş, yine etkili bir gen transfer sonucuna ulaşılmıştır (4, 92).

Adenovirüs vektörler retroviral vektörlere göre çok yüksek oranda üretilebilir (89, 92) ve aerosol şeklinde kolayca uygulanabilirler. Kanser oluşumu ile ilgisi bulunmamıştır (4).

#### **2.2.3.4. Adeno-İlişkili Virüs (*adeno-associated virus*) AAV Vektörler**

Bu rekombinant virüsler, replikasyon defektif, insan 'bağımlı' parvovirüslerdir (4). AAV genomu, tek zincirli DNA molekülüdür ve yaklaşık 5 kb uzunluğundadır (4, 85, 93). Bu virüslerin membranları yoktur ve 18-26 nm boyutundadırlar. Reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınırlar ve çekirdeğe geçerler (94). İnsanlarda bu virüslere bağlı bir hastalık görülmemiştir. AAV' leri, kendi kendilerini replike edemezler, replikasyon için adeno veya herpes virüsü gibi bir başka virüslerin ko-enfeksiyonuna ihtiyaç duyarlar (87, 95, 96) ve ko-enfeksiyon oluşuncaya kadar latent durumda kalmaktadırlar (4, 94).

AAV hazırlanmaları sırasında diğer virüsler ile kontamine olma riski ve çok miktardaki üretimlerinin zorluğu yanında en büyük sakıncası, boyutlarının küçük olması nedeniyle küçük genleri (< 5 kb) taşıyabilmeleridir (85, 87, 94, 96).

#### **2.2.3.5. Herpes Simplex Virüsü**

Bu virüsler, son yıllarda dikkat çeken potansiyel vektörlerdir. HSV, periferik ve santral sinir sistemi nöronlarına kısmi olarak gen salımında kullanılan bir nörotropik virüstür (82).

Herpes Simplex Virüsü (HSV) genomunda, 152 kb uzunluğunda çift zincirli DNA taşırlar (85, 87, 94, 97). AAV tipi virüslerin aksine, büyük yabancı DNA (24-40 kb uzunluğunda ) moleküllerini taşıyabilirler (85, 87, 94). Bu kapasite, bir vektörle çoklu gen taşıyabilme ve salımını sağlayabilmektedir (87, 97, 98).

Öncelikle, HSV vektör konakçı hücreyi enfekte eder, kapsidi stoplazma içinde çözünür ve viral DNA çekirdekdeki porlardan geçerek taşınmış olur (98). Tümör hücrelerinin parçalanmasını uyarmak üzere bir genin transferi (intihar genler) veya tümörün parçalanmasını immünolojik olarak uyarılması sağlanır (4, 98). Ancak, Rekombinant Adenovirüs vektörleri gibi viral vektörlerin, etkinlik ve çok sayıda hedef hücreye ulaşma özellikleri gibi üstünlüklerinin yanısıra, çok fazla tipte immünolojik cevap oluşturmaları, transkribe olabilen viral genler içermeleri ve rekombinasyon veya komplementasyon olasılıkları en büyük sakıncalarıdır (83).

#### 2.2.4. Non-Viral Vektörler

Gen tedavisi, nükleik asitlerin hücre içerisine taşıyıcılar yardımıyla alınması ve bu genlerin bu hücre içerisinde ekspresyonunu içerir. Elektrostatik itme, hücre içinde DNA, RNA ve oligonükleotitlerin girmesine engel olduğundan, nükleik asitlerin içeriye alım ve salımı için bir vektöre ihtiyaç vardır (99, 100).

1999 yılında, viral gen transferiyle yapılan klinik çalışmanın ölümle sonuçlanmasının ardından (101), katyonik lipozomlar, organik polimerler, peptitler, çıplak DNA gibi non-viral sistemler, alternatif sistemler olarak geliştirilmeye başlanmıştır (100, 101, 102, 103, 104).

Sentetik non-viral vektörler lipopleks şekilde katyonik lipidler (105), polipleks şekilde katyonik polimerler veya katyonik lipidler ve polimerlerle oluşturulan lipopoliplekslerle nükleik asit zincirleriyle bağlantılı kompleksler oluşturabilen sistemlerdir (99, 106). Hayvan ve insan hücre kültürlerinde klinik denemelerde faz I ve faz II aşamasındadır (105). DNA'nın bu ajanlarla sıkıştırılması, hidrofobik özellik kazanmasında ve en önemlisi partikül boyutunun küçültülmesinde yardımcı olmuştur. Bu da hücre içerisine penetrasyonu sağlar ve DNA'nın bu kompleksler içerisinde oluşu onu nükleaz etkisinden de korur (107, 108).

Biyolojik olmayan non-viral vektörler, genellikle katyoniktir. Bunlar, negatif yüklü DNA ile elektrostatik olarak etkileşirler (103, 106, 109, 110). Bu etkileşim sonucunda oluşan komplekslerin toplam yüzey yükleri pozitifdir ve bu özellikleri komplekslerin negatif olan hücre membranına bağlanmasını ve endositoz ile hücre içine geçişi sağlar (87, 101, 107, 108, 110, 111).

İlk kimyasal gen salım formülasyonu 1987’de üretilmiştir. Katyonik bir lipit olan DOTMA ile füsogenik lipit DOPE’nin 1:1 oranında karıştırılmasıyla oluşturulan sistem “Lipofectin” olarak adlandırılmıştır (112, 113).

Non-viral vektörler, kolay ve çok miktarda üretilebilmeleri, patojen olmamaları, immün yanıt oluşturmamaları, büyük molekülü genetik materyali (109, 110, 114,) taşıyabilmeleri, viral vektörlere oranla daha uzun ömürlü olmaları ve kontaminasyon riski taşımamaları nedenleriyle üstünlükler taşır (106, 115, 84, 116, 104). Ancak, genellikle düşük etkinliğe sahiptirler ve hedef hücrelere yönlendirilmeleri güçtür (85, 107, 110, 113, 117, 118).

#### **2.2.4.1. Çıplak DNA**

Çıplak DNA’nın doğrudan uygulanmasında, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, kalsiyum fosfat çöktürmesi ve mikropartikül bombardımanı gibi yöntemler kullanılmaktadır (79, 81, 110). Sitoplazmadan hücre içersine geçiş, büyük molekülü maddesöz konusu olduğunda, porların çok küçük olması nedeniyle oldukça düşüktür (100).

#### **2.2.4.2. Katyonik Lipitler**

İlk sentetik katyonik lipit DOTMA’nın gen terapisinde kullanımının ardından bir çok katyonik lipit sentezlenmiştir (101). Katyonik lipitlerin yapılarında

- 1- Hidrofobik uç,
- 2- Zincir (linker),
- 3- Baş grup bulunmaktadır (7, 101, 105)

1- Hidrofobik uçlar, kolesterol veya uzun karbon zincirlerden oluşur. Katyonik lipitlerin nonpolar hidrokarbon parçaları olarak tanımlanabilir ve üç grupta sınıflandırılabilir (7, 101)

- Tek zincirli hidrokarbonlar: İyi bilinen yüzey etkin maddelerdir ve çözeltilerde miseller oluşturma yetenekleri vardır. Hücre için toksik olduklarından bunların gen terapisinde kullanımı çok sınırlıdır.
- Çift zincirli hidrokarbonlar: Sentezlenmiş katyonik lipitlerin çoğunluğunda görülür. Oleoil zincirde (C 18:1) doymamış alkil

zincirleri sıklıkla gözlemlenmiştir. Karbon sayısı 14, 16 ve 18 olduğunda yaygın olarak hidrokarbon zincirleri gözlenmiştir. *In vitro* koşullarda, ötevarım aktivitesi için alkil zincir uzunluğunun önemi araştırılmış ve hidroksietil katerner amonyum türevlerinin bir homolog serisi içindeki alkil zincir uzunluğunun ötevarım aktivitesini etkilediği gözlenmiştir (C14:0 > C18:1 > C16:0 > C18:0) (7, 119). Genelde, çift zincirli hidrokarbonlar, kendi kendine lipozom yapabilen çiftlerdir; ancak, katyonik lipitler ötevarımı arttırmak için formülasyonlarında yardımcı fosfolipitler ile birlikte kullanılırlar.

- Kolesterol: Bu bileşikler, kararlı katyonik lipozom formülasyonunu oluşturmak üzere, genellikle, çift bağlı amfifillerle karıştırılırlar.

**2- Zincir (linker):** Hidrofobik uç ile baş grup arasındaki kimyasal bölümdür. Linker, DNA'nın negatif yüklü fosfatları ve katyonik baş grup arasındaki bağlanmayı sağlamlaştırmada önemlidir. Çift zincirli hidrokarbonları içeren katyonik lipit yapısında, gliserolün 3-karbon iskeleti linker gibi kullanılır (örn: DOTMA, DOTAP). Kolesterol türevleri için, linker ve amino grup arasında ~ 3-6 atomlarının olduğu bölge aktivite için uygundur. Bunun yanısıra, parçalanmayan eter bağları içeren kolesterol türevleri, ester, amid ve karbomil bağları gibi biyolojik olarak parçalanmayan linker bağları içerenlerden daha toksiktir (7, 105, 119).

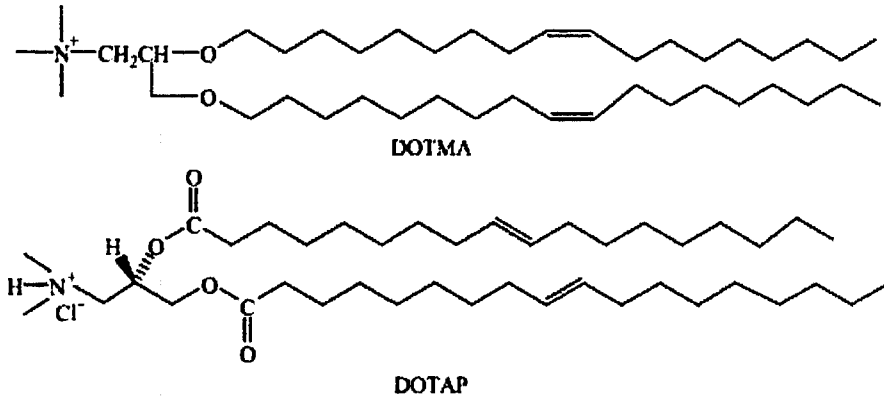
**3- Baş grup:** Gen transfer aktivitesini başlatan bölgedir (120). Genellikle guanidin, poliamino bileşenleri, poliamidoamin ve piridinyum içerir. Katyonik lipitin tek-değerlikli veya çok-değerlikli olup olmadığını baş gruptaki yük numarası belirler. Tek-değerlikli lipitlerin içindeki baş grubu, üçlü veya dördü amonyum gruplarından oluşur. Baş grubun kimyasal modifikasyonu incelenmiş, katerner amin dehidroksil grubu içeren 2,3-dialkiloksi katerner amonyum bileşimi sentezlenmiştir (7, 101, 105, 119). Bu bileşim, DOTMA ile kıyaslandığında, ötevarımda daha verimlidir. Nedeni, katerner aminde bir hidroksil grubunun eksik olmasıdır. Hidroksil grubu membran hidrasyonunu artırır (7, 101, 119).

#### **2.2.4.2.1. Tek değerlikli katyonik lipitler**

Tek değerlikli katyonik lipitler uzun yağ asit zincirleri içeren katerner amonyum tuzlarının yapısal özelliklerinden dolayı kolay lipozom

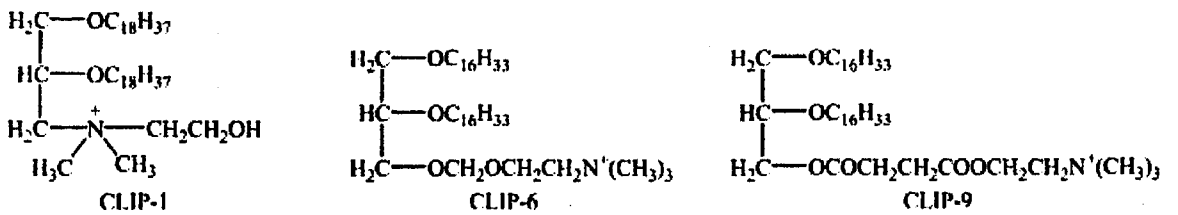
şekline getirilebilirler. İki zincir içeren bileşikler çift katmanlı (bilayer) yapı oluşturabilirler. DODAB ve DODAC tipik örnekleridir (101, 107, 120).

Tek zincirli kationik lipidlerin, çift zincirli (DOTMA gibi) kationik lipidlerden daha toksik ve düşük etkiye sahip olduğu görülmüştür (101, 107). Zincir boyu uzadıkça sitotoksiteleri artmaktadır (105).



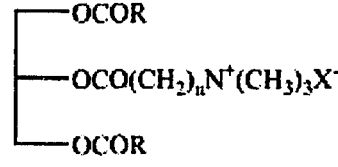
Şekil 1. DOTMA ve DOTAP'ın Kimyasal Yapısı

Tek değerlikli kationik lipidler DOPE veya kolesterol yardımcı lipidleri ile peritonal tümörlerde oldukça yüksek ötevarım göstermişlerdir (101, 107).



Şekil 2. Tek Değerlikli CLIP-1, CLIP-6 ve CLIP-9 Kationik Lipitlerin Kimyasal Yapıları

Ayrıca, CLIP-1, CLIP-6 ve CLIP-9 gibi yeni tek değerlikli kationik lipidlerde, hidrofobik ve polar bölüm arasındaki uzunluğun (linker) artması ile yüksek ötevarım etki gözlenmiştir (101, 107).



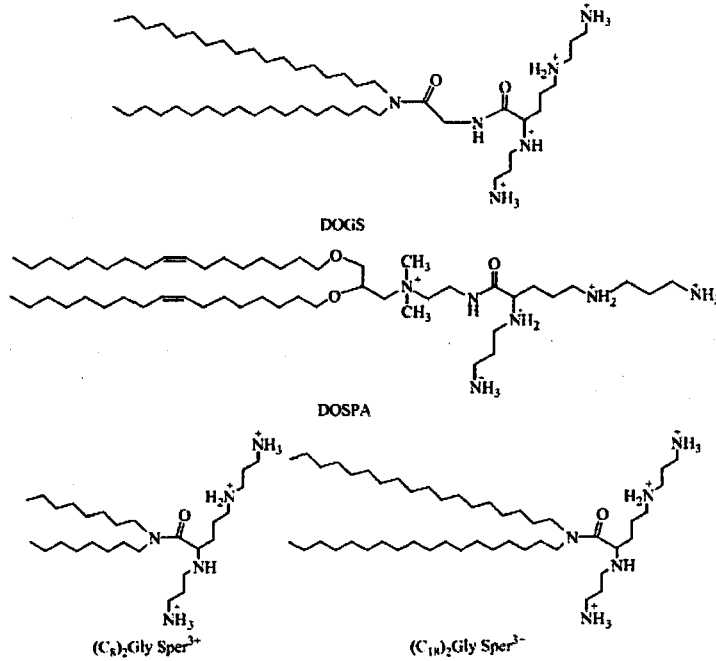
**Simetrik katyonik trigliserit**

**Şekil 3. Simetrik Katyonik Lipitin Kimyasal Yapısı**

Simetrik katyonik lipitlerle hazırlanmış lipozom-DNA komplekslerinde, sıcaklık karşısında DNA'nın korunduğu görülmüştür (101, 107).

#### 2.2.4.2.2. Çok değerlikli katyonik lipitler

Çok değerlikli katyonik lipitlerin, DNA'ya bağlanmaları diğer lipitlere oranla daha kuvvetlidir ve DNA'yı kompleks içerisinde daha iyi hapsedebilmektedirler. DOGS ile hazırlanan lipozomal sistemlerin santral sinir sistemi hastalıklarında az miktarda uygulanması ile yüksek ötevarım etkisinin gözlemlendiği bildirilmiştir (101). DOSPA, DPPES,  $(\text{C}_8)_2\text{Gly Sper}^{3+}$  ve  $(\text{C}_{18})_2\text{Sper}^{3+}$  gibi çok değerlikli katyonik lipitler etkin ötevarım için önerilmektedir (101).



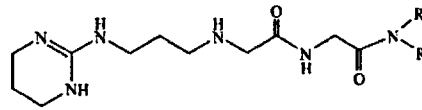
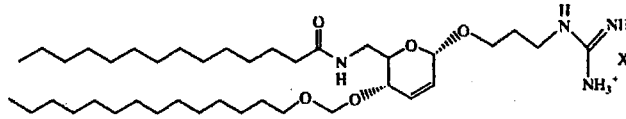
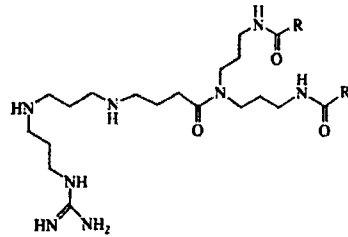
**Şekil 4. Çok Değerlikli Katyonik Lipitlerin Kimyasal Yapısı**

Ayrıca, doğal glisin betainlerin (GBs) türevleri olan çok değerlikli katyonik lipitlerle hazırlanan komplekslerle, fare hepatositlerinde yapılan çalışmada % 40'ın üzerinde gen ekspresyonu düşük toksisite ile başarılmıştır (101).

### 2.2.4.2.3. Guanidin içeren bileşenler

Guanidin ve tuzları ilaç ve organik sentezler için önemlidir. Bunlar katyonik lipitte katyonik baş grubu oluşturmada kullanılır. Üç tane guanidin içeren ötevarım ajanı sentezlenmiş ve bunlar memeli hücrelerinde en fazla tranfeksiyon etki gösteren iki baş grubu ve bir zincir kısmı bulunan bileşimler olarak bildirilmiştir. Toksisitesi yüksek deterjanlarla karşılaştırıldığında, *in vivo* kullanımları uygun bulunmuştur (101). Plazma membranında hidrofobik alanda dağılmamış glikoz yapısı ile hidrofobik guanidin bağlantısıyla oluşturulmuş yapı, DNA salım sistemlerinin tasarlanması için avantajlar sunar (101, 105).

Aminoglikozit ve türevleri olan katyonik lipitler tanımlanmıştır. Aminoşeker bazlı katyonik lipit, memeli hücrelerinde yüksek tranfeksiyon etki göstermiştir (101). Ayrıca, kanda karaciğer tarafından yakalanmadan uzun süre sirkülasyonda kalabilmektedirler (121).

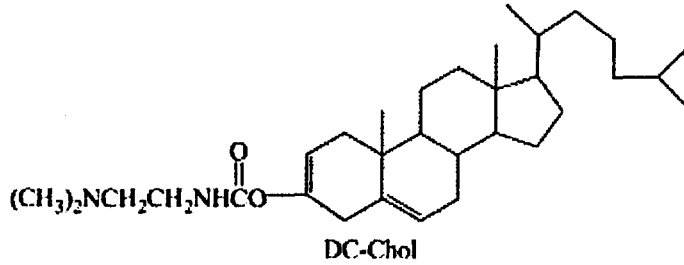


Şekil 5. Guanidin İçeren Bileşenlerin Kimyasal Yapısı



#### 2.2.4.2.4. Kolesterol türevleri

DC-chol kolesterol türevi, gen transferinde, genellikle DOPE ile karıştırılarak kullanılmıştır. Antisens oligonükleotitlerle konjugatlarının hücre içerisinde iyi dağıldığı ve çekirdeğe ulaştığı görülmüştür(101, 107). DC-chol katyonik lipozomu membran füzyonunda etkilidir (120). Yeni geliştirilen galaktozlanmış kolesterol türevleri ile hazırlanmış lipozom-DNA kompleksleri insan hepatoma HepG2 hücrelerinde düşük toksisite göstermiştir.



Şekil 6. DC-chol'ün Kimyasal Yapısı

Ayrıca, galaktozlanmış kolesterol türevleri kullanılarak hazırlanan lipozom-DNA komplekslerinin asialoglikoprotein reseptörleri ile hücre içine alındığı ve gen ekspresyonunun sağlandığı gözlenmiştir (101, 107).

#### 2.2.4.2.5. Katyonik peptitler

Viral proteinlerin aktif bölgelerinden alınarak sentetik olarak üretilmiş olan katyonik peptitler, DNA ile kompleks oluşturduklarında, virüsler kadar etkili bulunmuştur. Katyonik peptitler gen transferinde kullanılan amfifilik peptitlerdir. Pozitif yük taşıyan histidin, lizin veya arginin gibi amino asitlerdir.  $\alpha$ -helikel KALA peptiti hücre kültürlerinde başarıyla kullanılmış ilk peptittir (101, 122).

#### 2.2.4.2.6. Yardımcı lipitler

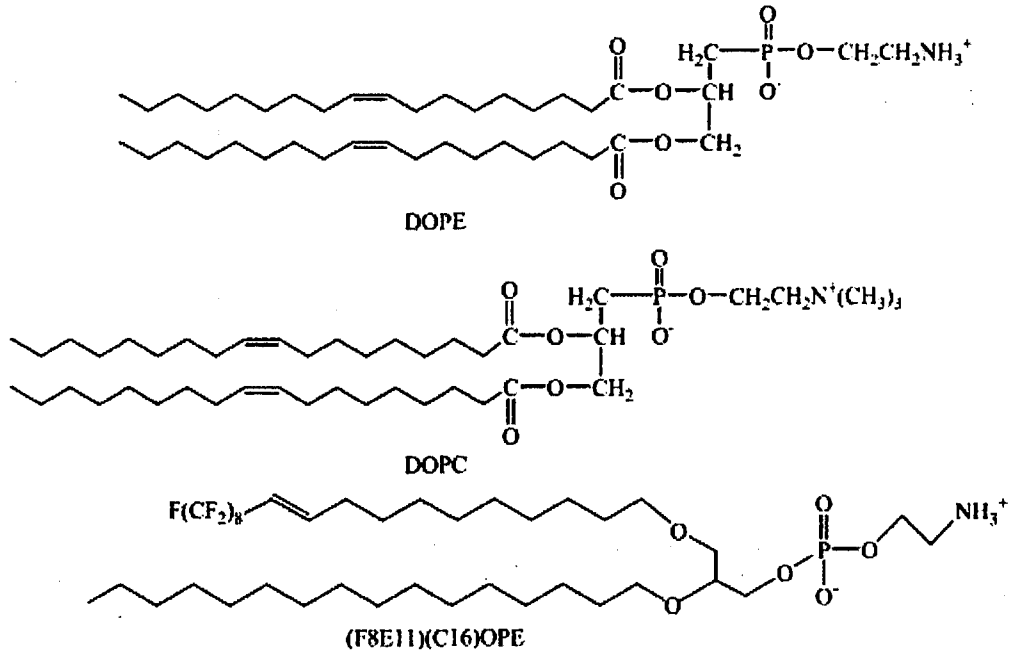
Katyonik lipitlerin çoğunluğu 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum propan (DOTAP) hariç, dioleoil fosfatidiletanolamin (DOPE) veya kolesterol gibi doğal lipitlerle oluşturulmuş lipozomlardır (107).

Optimal ötevarım sağlanabilmesi için katyonik lipit ile eşit miktarlarda yardımcı lipitlerin kullanılması gereklidir. DOPE genellikle katyonik lipitlerle oluşturulmuş lipozomlarda bu amaçla kullanılır (123). Fizyolojik ortamda, DOPE'nin moleküler yapısı ters hekzagonal fazların oluşumunu sağlamaktadır.

Bu non-bilayer fazların lipit-DNA ve endozomal membran arasında füzyonun oluşmasını sağladığına inanılmaktadır (117, 122, 106, 109). Bu etkileşim hücre sitoplazması içindeki endositik hücreyel yakalama (uptake) bölümlerinde, katyonik lipozom-DNA komplekslerinin transferini güçlendirmektedir (107, 124).

DNA ile bir kompleks oluşturulduğunda, lipozom yapısının tekrar düzenlendiği bir yapı oluşur. DOPE lipit katmanlarının bir formülasyon oluşturulmadan sıvı olarak verilmeleri ile kararlı hal göstermedikleri, plazmadaki lipozomal yapıdaki plazma proteinlerine bağlandıkları ve penetre oldukları saptanmıştır (101, 105).

Kolesterol gibi yüksüz lipitler ve türevleri, *in vivo* kullanımı da yüksek ötevarım sağlar. Kolesterol içeren lipozomların uygulanması sonucunda, diğer lipozomlarla karşılaştırıldığında bir çok organda yüksek ekspresyon gözlenmiştir (107).



Şekil 7. Yardımcı Lipitlerin Kimyasal Yapıları

### 2.2.4.3. Lipozomlar

Lipozomlar, amfifilik moleküllerin kendiliğinden oluşturduğu veziküler kolloid partiküllerdir (125).

Gen tedavisinde Lipopleks yaklaşımı, 1970'lerde nükleik asitlere ilk uygulanan yüksüz lipozomal salım sistemleridir. Yüksüz lipozomlar nükleik asitleri oldukça düşük düzeyde hapsedebilmişlerdir (124) ve hazırlanan lipozomların ne kadarının nükleik asit taşıdığı veya ne kadarının boş olduğunun yüzdeleri tam olarak belirlenememiştir (111).

DNA'nın negatif yük taşıması göz önüne alınarak, lipozomlara pozitif yük taşıyan katyonik lipitler eklenmiş ve pozitif yük taşıyan katyonik lipozomlar hazırlanmıştır. Böylece, bu sistemlerle, negatif yüklü nükleik asitlerin elektrostatik olarak etkileşimleriyle kompleks oluşturulması kolaylaştırılmıştır (117, 124). Ayrıca, oluşan komplekslerin pozitif yük taşıması, negatif yük taşıyan hücre membranlarıyla da elektrostatik olarak etkileşmesi sağlanarak gen transferi mümkün olmuştur (124, 126). Lipopleks ile hedef hücreler veya dokuların etkileşimi lipopleks içindeki katyonik lipit yönünden seçici değildir (81).

#### 2.2.4.3.1. DNA-Lipit kompleksleri

DNA-lipit kompleksinin yüksek ötevarım etkinliği, fizikokimyasal özelliklerine ve yapısına bağlıdır (7, 104, 81). Ayrıca, DNA-lipit kompleksinin morfolojisi ve yapısı katyonik lipitin ve DNA'nın fizikokimyasal özellikleri ile belirlenir (131).

Genellikle, kolesterol ve fosfolipitlerin oluşturduğu lipozomlar, küçük tek tabakalı taşıyıcılar (SUV small unilamellar vesicles), büyük tek tabakalı taşıyıcılar (LUV large unilamellar vesicles) (108), çok büyük tek tabakalı taşıyıcılar (GUV giant unilamellar vesicles) ve çok katmanlı taşıyıcılar (multilamellar vesicles) olarak büyüklüklerine ve membranlarının sayısına göre ayrılabilir (125, 106).

DNA'nın lipozomlarla oluşturdukları komplekslerde sıkıştırılması ve yoğunlaştırılması, özellikle katyonik lipitlerin yapısındaki baş grubun nükleik asit ile gerçekleşen elektrostatik ve iyonik etkileşmeyle olur. DNA, katyonik lipitler tarafından sarılır veya lipit katmanlar arasına sıkıştırılabilir (111, 127, 114).

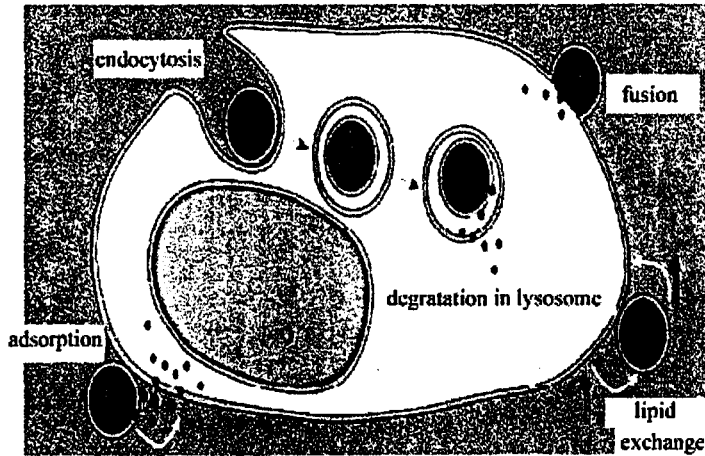
Kritik lipit:DNA yük oranının (yaklaşık 1:1 +/-) artması, lipit içerisine DNA'nın füzyonu (84) ve DNA'nın çökmesine neden olur. Sonuçta, DNA lipit

tabakalar arasında yakalanır (114, 117). DNA-lipit yükü arttırıldığında ve inkübasyon süresi uzatıldığında, lipozomlara bağlantılı lipitlerin, tek-tabakalı DNA'yı kaplamasını ve 'spagetti ve ettopu (meatball)' yapılarının oluşmasını sağlar (7, 128).

DC-chol/DOPE ile oluşturulan katyonik lipozom oluşumuna DNA eklenmesiyle, DNA'yı saran lipit katmanların oluşturduğu tübüler (spagetti modeli) yapılarda katyonik lipit-DNA lipopleksleri elde edilmiştir. Buna karşılık dairesel veya doğrusal DNA'nın DOTAP/DOPE ve DODAP/chol katyonik lipozomlarına eklenmesiyle, DNA'nın lipit katmanlar arasında sıkışmış (sandöviç modeli) çok katmanlı veya tek katmanlı yapıları gözlenmiştir (44). Bu da, DNA uzunluğunun taşıyıcı sistem oluşturma sırasında önemli olmadığını göstermiştir (111). Ayrıca, bağlanma işlevi, lipit ve nükleik asitlerde büyük yapısal değişiklikleri içerir ve bu durum kompleksin oluşmasını ve kararlılığı ortaya çıkarır (111).

#### 2.2.4.3.2. DNA-Lipit komplekslerinin hücre içersine alımı ve transfeksiyon

Hücre içine DNA-lipit komplekslerinin geçişi, endositoz ve hücre membranı ile doğrudan füzyonla mümkündür (Şekil 8) (84, 122, 100, 81).



Şekil 8. DNA-Lipit Komplekslerinin Hücre İçersine Alımı

DNA-lipit komplekslerin hücreye geçişinin büyük bir kısmının endositoz yoluyla ve sadece % 2'sinin kompleks-membran füzyonu ile olduğu bildirilmiştir. Katyonik lipozom-DNA kompleksi kullanılarak başarılı bir gen aktarmasının sağlanabilmesi için:

- Sistem içerisinde DNA'nın çok miktarda hapsedilmesi,
- Bu sistemin DNA'yı nükleaz yıkımlardan koruması,

- Kompleksin hücre yüzeyine tutunabilmesi,
- Endozomal membran ile kompleks arasında füzyonun gerçekleşmesi,
- Endozomlar tarafından yakalanması ve hücre içine alınabilmesi,
- Çekirdeğe ulaşarak gen ekspresyonunu sağlaması gerekir.

Komplekslerin hücre içerisine geçişi, negatif yüklü hücre membranı ile pozitif yük taşıyan katyonik taşıyıcıların elektrostatik etkileşmesiyle meydana gelir (99, 107, 126, 81). Yüksüz lipit DOPE endozomal membrandan lipopleksin füzyonuna yardımcı olduğundan lipopleks formülasyonları içerisinde sürekli olarak bulunmaktadır (99, 122).

*In vitro* ortamda birçok parametre ötevarımı etkiler. Bu parametreler katyonik lipit ve yardımcı lipit oranları, DNA ve katyonik lipit oranları ve hücrelere aktarılacak istenen DNA miktarını kapsamaktadır (129).

Öncelikle hücre içi ve hücre dışı engeller başarıyla geçilebilmeli ve gen ekspresyonu sağlanabilmelidir (40, 130, 122). Hücre içerisindeki bariyerler tarafından genetik materyalin çekirdeğe geçmesi zordur. Yapılan bir çalışmada, katyonik lipozomla COS-1 hücrelerinin sitoplazmasına geçirilen plazmitlerden sadece % 10'nun  $\beta$ -galaktosidaz ekspresyonu yaptığı gözlenmiştir (83, 107.). Bir başka çalışmada, plazmit taşıyan işaretlenmiş komplekslerin % 20-80'ni hücrelere adsorbe olduğu ve bunların ancak %1'nin çekirdekte görüldüğü belirlenmiştir (107). Dışarıdan DNA sokulmuş hücrelerin ekspresyon yetenekleri ve çekirdek içinde uzun süreli yaşamlarını sürdürmeleri çok değişik faktöre ve tiplerine bağlıdır (107). Örneğin, sağlıklı insan fibroblastlarına transfeksiyon oldukça zordur; çekirdekte yabancı DNA çok çabuk yok edilir. Bunun aksine, HeLa hücrelerine pDNA kolaylıkla aktarılır ve çekirdekte uzun süre kararlı kalır (107).

Difüzyon, molekül ağırlığı küçük bileşikler (<20 000-40 000) için basit taşınma mekanizmasıdır. Çekirdeğin porlarından (9 nm) moleküllerin geçişi aktif transport ile gerçekleşir (122).

#### **2.2.4.4. Katyonik Polimerler**

Katyonik polimerlerle DNA'nın oluşturduğu komplekslere polipleks adı verilmektedir. Bu sistemlerde kullanılan başlıca katyonik polimerler, polietilenimin, polilisin, poliamidoamin, dendrimerler, kitosan ve polialilamindir (107, 101, 129,116). Bu polimerlerin birçoğu, hayvan modellerinde oldukça

başarılı olmuş, ancak insanlarda henüz denenmemiştir. Yüksek molekül ağırlığına sahip, polidispersitesi yüksek katyonik polimerlerin karakterizasyonu oldukça zordur (99). Ancak, düşük molekül ağırlığına sahip katyonik peptitlerin kontrollü sentezlenmeleri ve istenilen saflıkta üretilmeleri mümkündür. Poliplekslerin 50-150 nm boyutu ve zeta potansiyelleri karakterize edilebilmektedir (99). Bu nanopartiküller kolaylıkla endositoz yoluyla hücre içersine alınabilir ve DNA salımını gerçekleştirebilirler. Hapsettikleri DNA'yı nükleaz depresyonuna karşı korurlar ve ester bağlarının ayrılmasıyla polimerin hidrolizi sonucu hücre içersinde DNA'yı salarlar (116).

#### **2.2.4.5. Reseptör Aracılı Gen Transfer Yöntemleri**

Hedef hücreleri içeren dokuya nükleik asit içeren vektörün direkt olarak uygulanmasıdır. Örneğin, tümör kütesine doğrudan enjeksiyon, sistik fibroz geni içeren vektörlerin aerosol olarak uygulanmasıdır (82, 110).

Bugün, pek çok araştırmacı, genlerin *in vivo* olarak bağlanabileceği, karaciğerle ilişkili asialoglikoprotein reseptörleri gibi spesifik hücre-yüzey reseptörleri üzerinde çalışmaktadır. Bu durum, reseptör bağlantılı endositozdur (RME). Makro moleküllerin etkili bir şekilde doğrudan füzyonunu sağlar (122). Bu sistemde DNA, bir hücre-yüzey reseptörüne bağlanacak olan bir hedef molekülle birleştirilir, endositoz uyarılır ve DNA memeli hücrelerine aktarılır. Bu yöntemlerden birisinde DNA'yı asialoglikoproteine bağlamak için poli-L-lisin kullanılmaktadır. Ayrıca, bu komplekse lizozomları yıkmak üzere bir adenovirüs de eklenmektedir (110). Böylece, DNA'nın sitoplazma içersinde bozulmadan canlı kalması sağlanmaktadır. Bu gen transfer sisteminin üstünlüğü retroviral veya adenoviral vektörlerle aktarılabilenlerden çok daha büyük DNA parçalarının bir virüs üzerine kaplanarak transferinin yapılabilmesidir. Bununla beraber, bu gen transfer sisteminde, partiküllerinin serum bileşenleri tarafından inaktive edildiği düşünülmektedir (4, 110).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. MATERYALLER

##### 3.1.1. Kullanılan Maddeler

Agar (granüle)	Difco, Amerika
Agaroz (Basica LE)	Prona, İspanya
Ampisilin	Mustafa Nevzat İlaç San.A.Ş., Türkiye
Asetik Asit, Glasiyel	Riedel-de Haen (Sigma-Aldrich Lab), Almanya
Bromofenol Mavisi	AMRESCO, Amerika
Compritol® ATO 888	Gattefossé, Fransa
DNaz I Enzimi	Fermentas, Litvanya
DOTAP®	Sigma, Almanya
Dynasan® 116	Condea, Almanya
EDTA	Sigma, Amerika
ESCORT™II Transfection reagent	Sigma, Amerika
Etanol (% 99.5)	Kimetsan, Türkiye
Etidyum Bromür	Amresco, Amerika
Fenol	Atabay, Türkiye
Gelucire® 33/01	Gattefossé, Fransa
Gliserol	Riedel-de Haen, Almanya
Glukoz	Sigma, Amerika
HEPES	Sigma, Almanya
Kalsiyum Klorür	Sigma, Amerika
Kloroform	Riedel-de Haen (Sigma-Aldrich Lab), Almanya

Polioksietilen-20-Sorbitan Monooleate (Tween® 80)	Amresco, America
Potasyum Asetat	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum Klorür	Merck, Almanya
Sorbitan Trioleat (Span 85)	Sigma, Amerika
Trizma Baz	Merck, Almanya

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Dondurucu	Arçelik Nofrost Elektronik
Elektroforez (Yatay)	Thermo EC Midicell Primo
Etüv 40°C	Venticell
Etüv 37°C	Memmert
Güç Kaynağı	Consort E 861
Jel Dokümantasyon Cihazı	Kodak Image Station 440CF
Liyofilizatör	Leybold-Heraeus
Mekanik Karıştırıcı	IKA Ultra-Turrax T 25
Mikrosantrifüj	Eppendorf Centrifuge 5417R
Otoklav	Hirayama HV-50L
Otomatik Mikropipetler (0.1-1000 µL)	Eppendorf Research
Partikül Boyutu Ölçer	Malvern NanoZS
pH Metre	Profi Lab pH 597
X-Işını Kırınım Cihazı	Rigaku Rint 2200
Spektrofotometre	Shimadzu
Su Banyosu	GFL 1052
Su Banyosu	PolyScience



Termal Analiz Cihazı	DSC 60, Shimadzu
Vorteks	IKA
Yatay Çalkalayıcı Su Banyosu	Nüve ST 402
Zeta Potansiyel Ölçer	Hirayama HV-50L

### 3.2. YÖNTEMLER

Mikro- ve nanopartiküllerin formülasyonlarında kullanılan katyonik lipit DOTAP<sup>®</sup>, lipit matrislerin ve plazmit DNA ile formülasyon komplekslerinin fizikokimyasal özellikleri incelenmiş, formülasyonlar hazırlanmış ve bu formülasyonlarda *in vitro* çalışmalar yapılmıştır.

#### 3.2.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Çalışmalar

##### 3.2.1.1. Katyonik Lipit DOTAP<sup>®</sup> Üzerinde Yapılan Analizler

Katyonik lipit DOTAP<sup>®</sup>, özelliklerinin, formülasyon aşamaları sırasındaki ortam farklılıklarına karşı değişimlerini saptamak amacıyla aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

###### 3.2.1.1.1. Erime derecesi tayini

DOTAP<sup>®</sup>, erime derecesi, kılcal tüp içerisinde, erime derecesi tayin cihazı ile saptanmıştır. İşlem üç kez tekrarlanmıştır.

###### 3.2.1.1.2. Termal analiz

DOTAP<sup>®</sup>, termal analizinde, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılmıştır. DOTAP<sup>®</sup>, 10<sup>-4</sup> hassasiyetle alüminyum örnek kabında ~5 mg tartılmış, kapak basınç yardımıyla kapatılmış ve sıkıştırılmıştır. Alüminyum referans kullanılarak, 10°C/dak ısı artışı ile 25°C'den 90°C'ye kadar çıkılmış ve -10°C/dak ısı azaltılması sağlanarak, 50 mL/dak azot gazı akış hızında termal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

###### 3.2.1.1.3. Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonraki termal analiz

DOTAP<sup>®</sup>, formülasyon hazırlanması sırasında kullanılan lipit matrislerin erime derecelerine göre belirlenen sıcaklıklarda (45°C, 73°C ve 85°C) ısıtılarak ve

yine aynı sıcaklıklara ısıtıldıktan sonra 121°C ve 1 atm basınç altında 15 dak otoklavlanarak, **Bölüm 3.2.1.1.2.**'de belirtildiği gibi, termal analizi yapılmıştır.

#### **3.2.1.1.4. Kullanılan lipit matrisler içerisindeki çözünürlük tayini**

DOTAP<sup>®</sup>, Dynasan<sup>®</sup>116, Gelucire<sup>®</sup>33/01 ve Compritol<sup>®</sup>ATO 888 içindeki çözünürlüğünün saptanması amacıyla, formülasyonlarda kullanılan oranlarda (% 4 lipit matris, % 0.35 DOTAP<sup>®</sup>) karışımlar hazırlanmış, formülasyon hazırlama aşamasındaki sıcaklıklara (45°C, 73°C ve 85°C) ısıtılmıştır. Bu karışımlar alüminyum örnek kaplarına ~10 mg konularak, kapların kapakları kapatılmış ve basınçla sıkıştırıldıktan sonra, aynı yöntemle termal analiz uygulanmıştır.

#### **3.2.1.1.5. X-Işını kırınım analizi**

Analiz, 4°C-40°C aralığında, 40 kV voltaj ve 20 mA akım şiddetinde yapılmıştır.

#### **3.2.1.1.6. Jel retardasyon deneyi**

DOTAP<sup>®</sup>'in 1 µg/1 µL konsantrasyondaki sulu çözeltisinin plazmit DNA'yı (pDNA) tutabilme yeteneği, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14 ve 1:16 oranlarında pDNA:DOTAP<sup>®</sup> kompleksleri oluşturularak, jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir.

Kompleks oluşumu, her bir mikrotüpte bulunan 2 µg pDNA üzerine belirtilen oranları sağlayacak şekilde 1 µg/1 µL konsantrasyondaki DOTAP<sup>®</sup> çözeltisi eklendikten sonra, 2 sn 1 400 rpm vorteks yardımıyla karıştırma ve 10 dakika oda ısısında etkileşime bırakılmasıyla sağlanmıştır. Kompleksler üzerine 5 µL yükleme tamponu eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır ve % 1.5 agaroz jelde 25 mV'da 2 saat yürütülerek saptanmıştır.

##### **3.2.1.1.6.1. Elektroforez işleminde kullanılan çözeltinin hazırlanması**

Tank Tamponu:

Agaroz jel elektroforezi çalışmaları sırasında tank tamponu olarak Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu kullanılmıştır. Bu tampon 50 kez konsantre stok (50x TAE) olarak hazırlanmış, elektroforez için 1x TAE tamponu kullanılmıştır. Tampon bileşimi aşağıda yer almaktadır.

* 50x TAE Tamponu Bileşimi	
Trizma baz.....	242 g
Glasiyal Asetik asit .....	57.1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0) .....	100 mL
Distile su .....k.m.....	1000 mL

#### Örnek Yükleme Tamponu:

Agaroz jele uygulanacak örnekleri kuyucuklara yüklemek için örnek yükleme tamponu kullanılmıştır. Örnek yükleme tamponu hazırlandıktan sonra mikrotübe bir miktar alınıp 4°C’de, geri kalanı da -20°C’de saklanmıştır.

* 1x Örnek Yükleme Tamponu Bileşimi	
Bromfenol mavisi.....	% 0.25
Gliserol (suda) .....	% 30

#### Etidyum Bromür Stok Çözeltisi:

Jele uygulanıp yürütülen DNA moleküllerinin görüntülenmesi için etidyum bromür (EtBr) kullanılmıştır. DNA moleküllerinin oluşturduğu bantlar EtBr ile boyamadan sonra ultraviyole (UV) ışık altında floresan vermektedir. EtBr stok çözeltisi 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve 4°C’de saklanmıştır. Jel yürütüldükten sonra 1 µg/mL EtBr içeren distile suda boyanarak görüntülenmiştir.

#### 3.2.1.1.6.2. Elektroforez işlemi

Elektroforez işlemi sırasında % 1.5 konsantrasyonda agaroz jel kullanılmıştır. 1.5 g agaroz tartılarak 100 mL TAE tamponu ile karıştırılmış ve ısıtıcı manyetik karıştırıcının ısıtıcı kısmı yardımıyla agaroz tamamen çözünene dek beklenmiştir. Bu çözelti jel tepsisi üzerine dökülmüş, jel polimerleştikten sonra tarak ve yan destekler çıkarılmıştır. Jel tepsisi tank içindeki yerine yerleştirilerek jelin üzerini tamamen örtecek şekilde tank tamponu ilave edilmiştir. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara yüklenmiş ve 25-80 Volt gerilim altında, 1.5-2 saat yürütülmüştür. Jel EtBr içeren distile suda

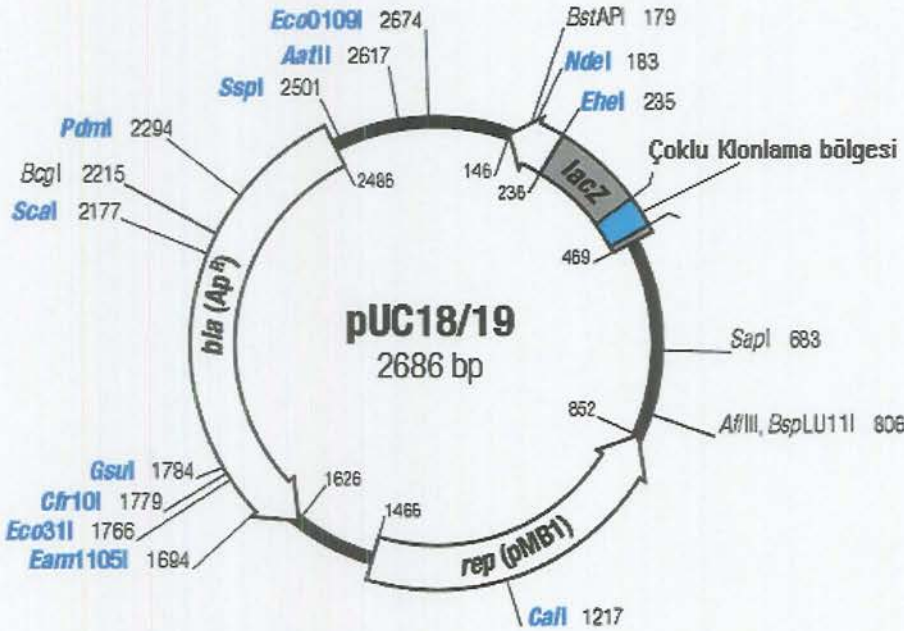
yaklaşık 1 saat bekletilmiş; yarım saat distile suda bekletilerek yıkanmış ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

### 3.2.1.1.6.2. Jel retardasyon deneyinde kullanılan genetik materyal

Çalışmalarımızda genetik materyal olarak pUC18 plazmiti kullanılmıştır. pUC plazmitleri, pBR322 plazmitlerine alternatif olarak kullanılırlar ve pBR322 plazmitine ampisilin direnç geni ve çoklu klonlama bölgesi eklenerek modifiye edilmesiyle elde edilirler. 13 klonlama bölgesi bulunan pUC18 plazmiti ~ 2.7 kb'dır (Şekil 9) (132, 133).

Bu plazmitlerin içerisinde genelde 5' ucunda LacZ geni ( $\beta$ -galaktozidaz) vardır (13, 14). Hücrelerde izopropiltiogalaktosid (IPTG) ile indüklendiklerinde aktif bir beta-galaktozidaz proteini (beta-Gal) oluşur (134). Renksiz bir madde olan X-Gal ( 5-bromo-4-kloro-3-indolyl-  $\beta$ -D-galaktozit) böyle hücrelerden oluşan kolonileri maviye boyar. (134). pUC18 plazmiti hücre içine aktarılabilmiş ise, X-Gal bulunduran plaklar üzerinde mavi koloniler oluşturur (133-135).

Taşıdığı bu özellikler nedeniyle, pUC18 plazmiti, *in vitro* çalışmaların değerlendirilmesinin ardından, planlanabilecek *in vivo* çalışmalarda formülasyonların transformasyon etkinliklerinin araştırılmasında yardımcı olabileceği düşüncesiyle seçilmiştir.



Şekil 9. pUC18/19 Plazmitinin Haritası

### 3.2.1.1.7. Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonraki jel retardasyon deneyi

DOTAP<sup>®</sup>, formülasyon sırasında lipit matrislerin erime derecelerine göre belirlenen sıcaklıklarda (45°C, 73°C ve 85°C ) ısıtılmış ve soğutulduktan sonra **Bölüm 3.2.1.1.6.**'da belirtilen koşullarda pDNA tutabilme yeteneği saptanmıştır. Otoklavın etkisinin belirlenmesi amacıyla, yine aynı sıcaklıklara getirilip soğutulan DOTAP<sup>®</sup>, 121°C ve 1 atm basınç altında 15 dak otoklavlandıktan sonra pDNA tutabilme yeteneği belirlenmiştir.

### 3.2.1.1.8. Zeta potansiyelin belirlenmesi

DOTAP<sup>®</sup>'ın µg/µL konsantrasyondaki sulu çözeltisi, NaOH ile pH 7.4'e ve NaCl ile 50 µS'e ayarlanmış distile su içinde dağıtıldıktan sonra elektriksel hareketliliği belirlenmiştir.

Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyele dönüştürülmesinde *Helmholtz-Smoluchowski* eşitliği kullanılmıştır. Ölçümler yapılmadan önce cihaz -50 mV lateks standart ile kalibre edilmiş ve tüm ölçümler 25°C'de 6 kez tekrarlanmıştır.

### 3.2.1.1.9. Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonra zeta potansiyelin belirlenmesi

DOTAP<sup>®</sup>, formülasyon sırasında lipit matrislerin erime derecelerine göre belirlenen sıcaklıklarda (45°C, 73°C ve 85°C ) ısıtılmış ve soğutulduktan sonra **Bölüm 3.2.1.1.8**'deki koşullarda zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Otoklavın etkisinin belirlenmesi amacıyla, yine aynı sıcaklıklara getirilip soğutulan DOTAP<sup>®</sup>, 121°C ve 1 atm basınç altında 15 dak otoklavlandıktan sonra zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

### 3.2.1.2. Lipit Matrislerle Yapılan Çalışmalar

Dynasan<sup>®</sup> 116, Gelucire<sup>®</sup> 33/01 ve Compritol<sup>®</sup> ATO 888 katı lipitlerinin özellikleri belirlenmiştir.

#### 3.2.1.2.1. Erime derecesi tayini

Her üç lipitin erime derecesi, kılcal tüp içerisinde, erime derecesi tayin cihazı ile belirlenmiştir. İşlemler üç kez tekrarlanmıştır.

### 3.2.1.2.2. Termal analiz

Her bir katı lipit,  $10^{-4}$  hassasiyetle alüminyum örnek kabında ~5 mg tartılmış, kapak basınç yardımıyla kapatılmış ve sıkıştırılmıştır. Alüminyum referans kullanılarak,  $10^{\circ}\text{C}/\text{dak}$  ısı artışı ile  $25^{\circ}\text{C}$ 'den  $90^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar çıkılmış ve  $-10^{\circ}\text{C}/\text{dak}$  ısı azaltılması sağlanarak tekrar  $25^{\circ}\text{C}$ 'ye inilerek, 50 mL/dak azot gazı akış hızında termal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1.2.3. X-Işını kırınım analizi

Analiz,  $4^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$  aralığında, 40 kV voltaj ve 20 mA akım şiddetinde yapılmıştır.

## 3.2.2. KLN Hazırlama Ön Çalışmaları

### 3.2.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Katyonik özellik taşıyan katı lipit partiküllerin hazırlanmasında su-içinde-yağ basit emülsiyon oluşturma tekniği kullanılmıştır.

Yapılan ön çalışmalarda, partiküllere katyonik özellik vermesi beklenen katyonik lipit DOTAP<sup>®</sup> kullanılmamıştır.

İlk aşamada, katı lipit matris olarak Dynasan 116<sup>®</sup> seçilmiş ve kararlı bir formülasyonun elde edilebilmesi için çalışmalar sürdürülmüştür. Formülasyonda iki farklı noniyonik yüzey etkin madde (Tween 80<sup>®</sup> ve Span 85<sup>®</sup>) ve distile su kullanılmıştır.

Katı lipit matris Dynasan 116<sup>®</sup>'nin formülasyon içindeki konsantrasyonu % 2-8, yüzey etkin maddelerin toplam konsantrasyonları (Tween 80<sup>®</sup>+Span 85<sup>®</sup>) % 3-5.2, ve yüzey etkin maddelerin kendi aralarında oranları 1:1-7:3 (Tween 80<sup>®</sup>-Span 85<sup>®</sup>) aralığında değiştirilerek farklı kombinasyonlarla formülasyon denemeleri yapılmıştır.

Karıştırma hızı 8 000 - 24 000 rpm'de ultratüraks ile ve süresi 1-5 dakikalar arasında denenmiştir. Literatür bilgilerine göre, formülasyon sıcaklığı katı lipitin erime derecesinin  $\sim 10 \pm 1^{\circ}\text{C}$  üzeri olarak belirlenmiştir (13). Formülasyonlar 20-100 g miktarlarında hazırlanmıştır.

### 3.2.2.1.1. Katyonik lipit içermeyen ön formülasyonun hazırlanması

Katı lipit, erime derecesinin  $\sim 10 \pm 1^\circ\text{C}$  üzerinde ( $73 \pm 1^\circ\text{C}$ ) su banyosunda ısıtılmıştır. Distile su üzerine eklenmiş yüzey etkin maddeler su banyosunda lipitle aynı sıcaklığa getirildikten sonra, su banyosunda ısınmakta olan lipit üzerine boşaltılmış ve 9 500 rpm'de 3 dakika karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, formülasyon su banyosundan çıkarılarak, çalışma ortamının düşük sıcaklığından kaynaklanan ani soğuma ile kaymaklaşmayı önlemek amacıyla strafor kutu içerisinde ortamın sıcaklığından izole edilerek soğumaya bırakılmıştır. Beher çapı ve formülasyon miktarının artmasıyla partikül boyutunun arttığı gözlemlendiğinden, formülasyonlar 20 g'lık porsiyonlarda, 4.5 -5 cm çaplı 100 mL'lik beherde hazırlanmıştır. Formülasyona **FI** kodu verilmiştir.

Formülasyonlarda kullanılan parametreler ve formülasyon kodları **Çizelge 1**'de verilmiştir.

### 3.2.2.1.2. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların hazırlanması

Formülasyon içindeki katyonik lipit konsantrasyonunu belirlemek amacıyla dört farklı formülasyon hazırlanmıştır.

**FI** formülasyonundaki yağ ve yüzey etkin madde miktarları sabit tutularak, % 0.20, % 0.25, % 0.30 ve % 0.35 oranlarında katyonik lipit yağlı faza katılarak farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonlarda kullanılan parametreler ve formülasyon kodları **Çizelge 1**'de verilmiştir.

### 3.2.2.1.3. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların sterilizasyonu

Katyonik lipit içeren formülasyonların, soğumaya bırakılmadan önce, 1/3'ü alınarak 0.2  $\mu\text{m}$  steril membran süzgeçten, aseptik ortamda, 1 mL'lik steril ampullere süzölmüş ve ampuller kapatılmıştır. Soğuma işlemi yine ortamdan izole edilerek gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonlar soğuduktan sonra, kalan miktarın yarısı 1 mL'lik ampullere doldurulmuş, ampuller kapatıldıktan sonra  $121^\circ\text{C}$ 'de, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmişlerdir.

Formülasyonlarda kullanılan parametreler ve formülasyon kodları **Çizelge 1**'de verilmiştir.

**Çizelge 1. Katyonik Lipit İçermeyen ve İçeren Formülasyonların İçerikleri ve Kodları**

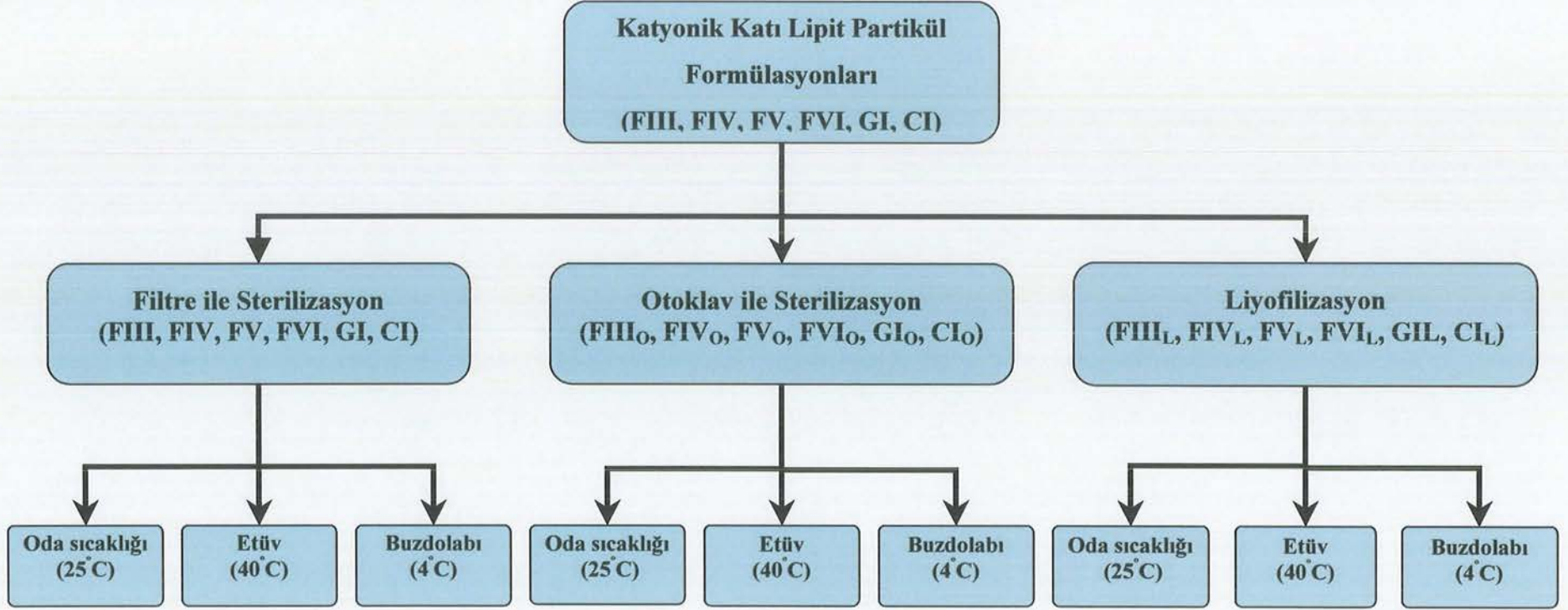
Formülasyon Kodu	Katı Lipit (% a/a)	Katyonik Lipit (% a/a)	Yüzey Etkin Madde (Tween 80®) (% a/a)	Yüzey Etkin Madde (Span 85®) (% a/a)	Distile Su (% a/a)	Üretim Sıcaklığı
FI	Dynasan® 116 4	-	2.8	1.2	ym 100	73 ± 1°C
FIII	Dynasan® 116 4	DOTAP® 0.20	2.8	1.2	ym 100	73 ± 1°C
FIV	Dynasan® 116 4	DOTAP® 0.25	2.8	1.2	ym 100	73 ± 1°C
FV	Dynasan® 116 4	DOTAP® 0.30	2.8	1.2	ym 100	73 ± 1°C
FVI	Dynasan® 116 4	DOTAP® 0.35	2.8	1.2	ym 100	73 ± 1°C
G	Gelucire® 33/01 4	-	2.8	1.2	ym 100	43 ± 1°C
GI	Gelucire® 33/01 4	DOTAP® 0.35	2.8	1.2	ym 100	43 ± 1°C
C	Compritol® ATO 888 4	-	2.8	1.2	ym 100	85 ± 1°C
CI	Compritol® ATO 888 4	DOTAP® 0.35	2.8	1.2	ym 100	85 ± 1°C

#### 3.2.2.1.4. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların liyofilizasyonu

Farklı oranlarda katyonik lipit DOTAP®'ı içeren formülasyonların 1/3'ü, 1 mL'lik ampullere 500 µL miktarlarda doldurulmuş, -24°C'de 4 saat bekletilerek dondurulmuş ve 9.4 mBar basınç altında -20°C'de 24 saat liyofilize edilerek ampuller kapatılmıştır.

Tüm işlemler ve işlem gören formülasyon kodları Şekil 10'da gösterilmiştir.





Şekil 10. Formülasyon Hazırlanmasında Tüm İşlemler ve İşlem Gören Formülasyon Kodları

#### **3.2.2.1.4. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların termal analizi**

Hazırlanan katyonik katı lipit mikro- ve nanopartiküllerin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmıştır. Süzülmüş, otoklavlanmış ve sulandırılmış liyofilize formülasyonlardan 10 µL (~10 mg) alınarak, basınca dayanıklı alüminyum örnek kaplarına konulmuş, kapakları sıkıştırılarak kapatılmıştır. Alüminyum referans kullanılarak, 10 °C/dak ısı artışı ile 25°C'den 90°C'ye kadar çıkılmış ve -10 °C/dak ısı azaltılması sağlanarak tekrar 25°C'ye inilerek, 50 mL/dak azot gazı akış hızında termal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.1.5. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesi**

Farklı oranlarda DOTAP® içeren formülasyonlar, süzülmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş olarak sınıflandırılarak, 1:5, 1:10, 1:15 ve 1:20 pDNA-formülasyon (a/a) oranlarında karışımlar hazırlanmıştır.

Formülasyonların pDNA'ya elektrostatik olarak bağlanma yetenekleri karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Süzgeçten süzülmüş formülasyonlardan, 2 µL pDNA (0.5 µg/1 µL) miktarı sabit tutularak, belirtilen oranlara karşılık gelecek formülasyonlar mikrotüplere eklenerek, vorteks yardımıyla 1400 rpm'de 2 sn karıştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra, mikrotüp içinde pDNA ve formülasyonların elektrostatik etkileşmeyi sağlayabilmesi için, 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 5 µL yükleme tamponu eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır. Bu karışımlar jele yüklenmiş ve 80 V'da 1.5 saat yürütülmüştür.

Otoklavlanmış formülasyonlara da aynı işlemler uygulanmıştır.

Liyofilize edilen formülasyonlar, distile su ile liyofilize edilmeden önceki miktarına (500 µL) ulaşacak şekilde vorteks yardımıyla karıştırılmış ve daha sonra yukarıda bahsedilen şekilde pDNA ile muamele edilerek jel elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2.1.6. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların zeta potansiyellerinin belirlenmesi**

Formülasyonlardaki partiküllerin yüzey yükleri, NaOH ile pH 7.4'e ve NaCl ile 50  $\mu\text{S}$ 'e ayarlanmış distile su içerisinde dağıtılarak ölçülmüştür. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyele dönüştürülmesinde, *Helmholtz-Smoluchowski* eşitliği kullanılmıştır. Ölçümler yapılmadan önce cihaz -50 mV lateks standart ile kalibre edilmiş ve tüm ölçümler 25°C'de 6 kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.2.1.7. Katyonik lipit içeren ön formülasyonların partikül boyutu dağılımları**

Örnekler, partikül boyutu ölçümleri için NaOH ile pH 7.4'e ve NaCl ile 50  $\mu\text{S}$ 'e ayarlanmış ve 0.2  $\mu\text{m}$ 'lik süzgeçten süzölmüş distile su içerisinde dağıtılmış ve cihazın kullanılıp-atılan kuvvetleri içinde ölçülmüştür.

### **3.2.2.2. Farklı Lipit Matrislerle Çalışılacak Formülasyonun Seçilmesi**

Dört farklı oranda (% 0.20, % 0.25, % 0.30 ve % 0.35) katyonik lipit içeren ön formülasyonların (FIII, FIV, FV ve FVI), termal analizleri, pDNA'ya bağlanma üstünlükleri, zeta potansiyelleri ile partikül boyutları ve dağılımı belirlenmiş ve değerlendirmeler sonucunda formülasyon seçimi yapılmıştır.

### **3.2.3. KLN'lerle Yapılan Çalışmalar**

Ön mikro- ve nanopartikül hazırlama çalışmalarıyla en uygun katyonik lipit içeren formülasyonun (FVI) belirlenmesinden sonra, katyonik lipitin farklı katı lipit matrislerle oluşturacağı formülasyonların etkinlikleri araştırılmıştır.

#### **3.2.3.1. Dynasan® 166, Gelucire® 33/01 ve Compritol® ATO 888 ile Hazırlanan KLN'ler**

Dynasan® 166, Compritol® ATO 888 katı lipitler ve yarı katı olan Gelucire® 33/01 kullanılarak üç ayrı KLN hazırlanmıştır. Ön formülasyon çalışmalarında belirlenen % 4 katı matris oranı, % 0.35 katyonik lipit DOTAP®, yüzey etkin maddeler ve distile su miktarları sabit tutularak, kullanılan lipitlerin erime derecelerinin  $10\pm 1^\circ\text{C}$  fazlası olmak üzere, formülasyon sıcaklığı (Dynasan® 116 için  $73^\circ\text{C}$ , Gelucire® 33/01 için  $45^\circ\text{C}$  ve Compritol® ATO 888 için  $85^\circ\text{C}$ ) ayarlanmıştır.

Dynasan® 116 , Gelucire® 33/01 ve Compritol® ATO 888 içinde eritilen katyonik lipit DOTAP®,ın üzerine, distile su içerisinde dağıtılmış yüzey etkin maddeler eklenmiş ve su banyosunda 3 dakika süre ile 9500 rpm' de karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi bittikten sonra, formülasyon su banyosundan çıkarılarak, strafor kutu içerisinde ortamın sıcaklığından izole edilerek soğumaya bırakılmıştır.

Formülasyonlarda kullanılan parametreler ve formülasyon kodları Çizelge 1'de verilmiştir.

Üç farklı lipit ile hazırlanan KLN, Bölüm 3.2.2.1.3.'de ve Bölüm 3.2.2.1.4.'de açıklandığı gibi sterilize ve liyofilize edilmiştir.

### **3.2.3.2. KLN'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmaları**

#### **3.2.3.2.1. Makroskobik incelemeler**

Hazırlanan tüm formülasyonların görünüşü, rengi ve yapısı makroskobik olarak incelenmiştir. Katı lipit mikro- ve nanopartikül dispersiyonlarında kıvam farkı ve faz ayrımı olup olmadığı da gözlenmiştir. Liyofilize katı lipit partiküller liyofilize tozun özelliklerine göre değerlendirilmiştir.

#### **3.2.3.2.2. Şekilleri**

% 0.35 katyonik lipit DOTAP® içeren FVI, GI ve CI KLN'lerin liyofilize edilmiş hallerinin şekilleri, ışık mikroskobu altında, 100X büyütmede ve immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Liyofilize formülasyonların partikül şekilleri, kaybettikleri su (~500 µL) ile vorteks yardımıyla süspande edildikten sonra incelenmiştir.

#### **3.2.3.2.3. pH değerlerinin belirlenmesi**

Formülasyonlardan 100 µL alınarak, NaOH ile pH 7.0'e ve NaCl ile 50µS iletkenliğe ayarlanmış, 10 mL distile su içerisinde dağıtılmış ve pH metre yardımıyla pH değerleri belirlenmiştir.

#### **3.2.3.2.4. Termal analizleri**

Hazırlanan katyonik katı lipit mikro- ve nanopartiküllerin termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmıştır. Süzölmüş ve otoklavlanmış

süspansiyon KLN'lerden 10 µL (~10 mg) ve liyofize KLN'lerden ~10mg alınarak, basınca dayanıklı alüminyum örnek kaplarına konulmuş, kapakları sıkıştırılarak kapatılmıştır. Alüminyum referans kullanılarak, 10°C/dak ısı artışı ile 25°C'den 90°C'ye kadar çıkılmış ve -10 °C/dak ısı azaltılması sağlanarak tekrar 25°C'ye inilerek, 50 mL/dak azot gazı akış hızında termal analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.3.2.5. X-Işını kırınım analizi**

FVI, GI ve CI KLN'lerinin liyofilize hallerinin X-ışını kırınım analizleri, 4°C-40 °C aralığında, 40 kV voltaj ve 20 mA akım şiddetinde yapılmıştır.

#### **3.2.3.2.6. pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesi**

FVI, GI ve CI KLN'lerinin pDNA'ya bağlanma oranları, süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş olmak üzere sınıflandırılarak belirlenmiştir. Liyofilize edilmiş KLN'lerin kaybettikleri su miktarı (~500 µL) ile vorteks yardımıyla tekrar süspansiyon hale getirilmiştir.

pDNA, 1 µg/100 µL konsantrasyon olacak şekilde 25 mM HEPES içinde seyreltilmiştir. 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 ve 1:7 pDNA-formülasyon (a/a) oranlarında, mikrotüp içerisinde 2 sn 1400 rpm'de vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra, elektrostatik etkileşmenin sağlanabilmesi için 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin bitiminde, 5 µL yükleme tamponu ile mikropipet yardımıyla karıştırılmış, örnekler jelle yüklenmiş ve 25V'da 2 saat yürütülmüştür. KLN'lerin jel üzerinde pDNA'ya bağlanma kapasiteleri jel dokümantasyon cihazı ile görüntülenerek belirlenmiştir.

#### **3.2.3.2.7. Escort™II ürünü ile KLN'lerin pDNA'ya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırılması**

Hazırlanan FVI, GI ve CI KLN'lerinin süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş halleri ile, katyonik lipozom olan Escort™II ürününün karşılaştırılması yapılmıştır.

1:1 oranında katyonik lipit DOTAP ve nötral lipit DOPE içeren piyasa ürünü liyofilize lipozom olan Escort™II ile belirli oranlarda pDNA ile mikrotüp

içerisinde, mikropipet yardımıyla karıştırılmış ve 10 dakika etkileşime bırakılmıştır.

FVI, GI ve CI KLN'leri ile etkileşime bırakılacak olan pDNA, konsantrasyon 1 µg/10 µL olacak şekilde 25 mM HEPES ile seyreltilmiştir. pDNA-KLN'lerin 1:2,1:4, 1:6 ve 1:10 oranındaki karışımları, mikrotüp içerisinde, 2 sn, 1400 rpm'de vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra, elektrostatik etkileşmenin sağlanabilmesi için oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

Süre bitiminde, her bir tüp içerisine 5 µL yükleme tamponu eklenerek, mikropipet yardımıyla karıştırılmış ve % 1.5 agaroz jele yüklenerek, 25 mV'da 2 saat yürütülmüştür.

#### **3.2.3.2.8. Zeta potansiyellerin belirlenmesi**

Formülasyonlardaki partiküllerin yüzey yükleri, pH 7.4'e NaOH ile ve 50 µS'e NaCl ile ayarlanmış distile su içerisinde dağıtılarak ölçülmüştür. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyele dönüştürülmesinde, *Helmholtz-Smoluchowski* eşitliği kullanılmıştır. Ölçümler yapılmadan önce cihaz -50 mV lateks standart ile kalibre edilmiş ve tüm ölçümler 25°C'de 6 kez tekrarlanmıştır.

#### **3.2.3.2.9. pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyelleri**

Bu çalışmada, KLN'lerin pDNA ile farklı oranlarda bekletilmesi sonucunda, pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyellerinde görülen değişimler incelenmiştir.

FVI, GI ve CI KLN'leri ile etkileşime bırakılacak olan pDNA, 25 mM HEPES ile 1 µg/10 µL oranda seyreltilmiştir ve 11 mikrotüpe 10 µL gelecek şekilde dağıtılmıştır. Bu karışım üzerine, herbir tüpe farklı miktarda [1, 2.5, 3.5, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40 ve 50 µL (≈ µg) ] KLN eklenmiştir. Oluşturulan 1:1, 1:2.5, 1:3.5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40 ve 1:50 oranlarındaki pDNA-KLN (a/a) karışımları mikrotüp içerisinde 2 sn, 1400 rpm'de vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra, elektrostatik etkileşmenin sağlanabilmesi için oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

Bu komplekslerden 30 µL alınarak, 1 mL pH 7.4 (NaOH ile ayarlanmış) ve 50 µS (NaCl ile ayarlanmış) distile su içinde dağıtılmış ve zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

#### **3.2.3.2.10. Partikül boyutları ve dağılımları**

Örneklerin partikül boyutu ölçümleri, 0.2 µm'lik süzgeçten süzölmüş distile su içinde dağıtımlarının ardından, cihazın kullanılıp-atılan küvetleri içinde yapılmıştır.

#### **3.2.3.2.11. Saklama koşullarında kararlılık kontrolleri**

Süzölerek, otoklavlanarak ve liyofilize edilerek renkli ampullere doldurulan formülasyonlar, buzdolabı (4±1°C), oda sıcaklığı (25±1°C) ve etüvde (40±1°C) saklanmıştır. 1, 3, 6 ve 9 aylık saklama sürelerinin sonunda, termal analizleri **Bölüm 3.2.3.2.4.**'de, zeta potansiyelleri **Bölüm 3.2.3.2.8**'de ve partikül boyutları ve dağılımları **Bölüm 3.2.3.2.9**'da belirtildiği şekilde tayin edilmiştir.

#### **3.2.3.2.12. pDNA-Formülasyon komplekslerinin DNaz I enzimi ortamında kararlılığı**

Çıplak pDNA, pDNA-Escort™II ve pDNA-KLN kompleksleri DNaz I enzimi ile muamele edilerek, nükleaz varlığında pDNA'nın kompleksler içerisindeki kararlılığı karşılaştırmalı olarak kontrol edilmiştir.

DNaz I enzimi ile muamele sonucunda, kompleksler içerisindeki pDNA'nın ne kadarının enzim etkisiyle ne kadarının ekstraksiyon işlemleri sırasında kaybolduğunun gözlenebilmesi için, DNaz I enzimi ile muamele edilmemiş çıplak pDNA ve pDNA bağlı komplekslere de ekstraksiyon işlemleri uygulanmıştır.

pDNA, konsantrasyon 1 µg/10 µL olacak şekilde 25 mM HEPES ile seyreltilmiştir ve bu çözelti her bir mikrotüpte 40 µL olacak şekilde dağıtılmıştır.

- pDNA'nın DNaz I enzimi ile muamelesi: 4 µg pDNA bulunan mikro tüp içerisine 4 Ü DNaz I enzimi eklenmiş, mikropipet yardımı ile karıştırılmış ve 10 dakika 37°C'de etkileşime bırakılmıştır. Tepkimeyi durdurmak için 40 µL 25mM EDTA çözeltisi eklenmiştir. 5 µL yükleme tamponu eklenerek jele uygulanmıştır.

- pDNA-Escort<sup>TM</sup>II komplekslerinin DNaz I enzimi ile muamelesi: 4 µg pDNA bulunan mikro tüp içerisine 16 µL Escort<sup>TM</sup>II eklenmiş, 2 sn, 1400 rpm'de vorteks yardımı ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika etkileşmeye bırakılmıştır. Süre bitiminde, 4 Ü DNaz I enzimi eklenmiş, mikropipet yardımı ile karıştırılmış ve 10 dakika 37°C'de etkileşime bırakılmıştır. Tepkimeyi durdurmak için 40 µL 25mM EDTA çözeltisi eklenmiştir ve I. Ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

Ekstraksiyon yönteminin pDNA-Escort<sup>TM</sup>II komplekslerine etkisinin belirlenebilmesi için, pDNA-Escort<sup>TM</sup>II kompleksleri yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanmış ve ortama DNaz I enzimi eklenmeden tüm yöntemler gerçekleştirilmiştir.

- pDNA-FVI komplekslerinin DNaz I enzimi ile muamelesi: 4 µg pDNA bulunan mikro tüp içerisine 40 µL FVI formülasyonu eklenmiş, 2 sn, 1400 rpm'de vorteks yardımı ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika etkileşmeye bırakılmıştır. Süre bitiminde, 4 Ü DNaz I enzimi eklenmiş, mikropipet yardımı ile karıştırılmış ve 10 dakika 37°C'de etkileşime bırakılmıştır. Tepkimeyi durdurmak için 40 µL 25mM EDTA çözeltisi eklenmiştir ve I. Ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

Ekstraksiyon yönteminin pDNA-FVI komplekslerine etkisinin belirlenebilmesi için, pDNA-FVI kompleksleri yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanmış ve ortama DNaz I enzimi eklenmeden tüm yöntemler gerçekleştirilmiştir.

- pDNA-GI komplekslerinin DNaz I enzimi ile muamelesi: 4 µg pDNA bulunan mikro tüp içerisine 40 µL GI formülasyonu eklenmiş, 2 sn, 1400 rpm'de vorteks yardımı ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika etkileşmeye bırakılmıştır. Süre bitiminde, 4 Ü DNaz I enzimi eklenmiş, mikropipet yardımı ile karıştırılmış ve 10 dakika 37°C'de etkileşime bırakılmıştır. Tepkimeyi durdurmak için 40 µL 25mM EDTA çözeltisi eklenmiştir ve II. ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.



Ekstraksiyon yönteminin pDNA-GI komplekslerine etkisinin belirlenebilmesi için, pDNA-GI kompleksleri yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanmış ve ortama DNaz I enzimi eklenmeden tüm işlemler gerçekleştirilmiştir.

- pDNA-CI komplekslerinin DNaz I enzimi ile muamelesi: 4 µg pDNA bulunan mikro tüp içerisine 40 µL CI formülasyonu eklenmiş, 2 sn, 1400 rpm'de vorteks yardımı ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika etkileşmeye bırakılmıştır. Süre bitiminde, 4 Ü DNaz I enzimi eklenmiş, mikropipet yardımı ile karıştırılmış ve 10 dakika 37°C'de etkileşime bırakılmıştır. Tepkimeyi durdurmak için 40 µL 25mM EDTA çözeltisi eklenmiştir ve III. ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

Ekstraksiyon yönteminin pDNA-CI komplekslerine etkisinin belirlenebilmesi için, pDNA-CI kompleksleri yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanmış ve ortama DNaz I enzimi eklenmeden tüm yöntemler gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.2.12.1. Ekstraksiyon yöntemleri

Lipit matrislerin ortamdan tamamen uzaklaştırılarak pDNA'nın serbest kalmasının sağlanabilmesi için, ekstraksiyon yöntemleri lipitlerin çözüldükleri ortamlar gözönüne alınarak belirlenmiştir.

I. Örnek üzerine 500 µL kloroform-alkol (1:1) karışımı eklenmiş, yavaşça karıştırılmış ve 15000 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiştir. Üst kısım atılmış ve çökelti üzerine 100 µL alkol (% 99.8) eklenerek, yine aynı hızda ve sürede santrifüj uygulanmıştır. Alkollü üst kısım atılmış ve çökelti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. 30 µL TE çözeltisi içinde çözülmüş ve 5 µL yükleme tamponu eklenerek jele uygulanmıştır.

II. Örnek üzerine 500 µL alkol (% 99.8) eklenmiş, yavaşça karıştırılmış ve 15000 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiştir. Üst kısım atılmış ve çökelti üzerine 100 µL alkol (% 99.8) eklenerek, yine aynı hızda ve sürede santrifüj uygulanmıştır. Alkollü üst kısım atılmış, çökelti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. 30 µL TE çözeltisi içerisinde çözülmüş ve yükleme tamponu eklenerek jele uygulanmıştır.

**III.** Örnek üzerine 500 µL kloroform-alkol (1:1) karışımı eklenmiş, yavaşça karıştırılmıştır. Compritol'ün tamamen çözünmesi için 500 µL kloroform daha eklenmiş ve 15000 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiştir. Üst kısım atılmış ve çökelti iki kez olmak üzere, 500 µL ve 100 µL alkol (% 99.8) ile aynı hızda ve sürede santrifüj uygulanarak yıkanmıştır. Alkollü üst kısım atılmış, çökelti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. 30 µL TE çözeltisi içerisinde çözüldürülmüş ve yükleme tamponu eklenerek jele uygulanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

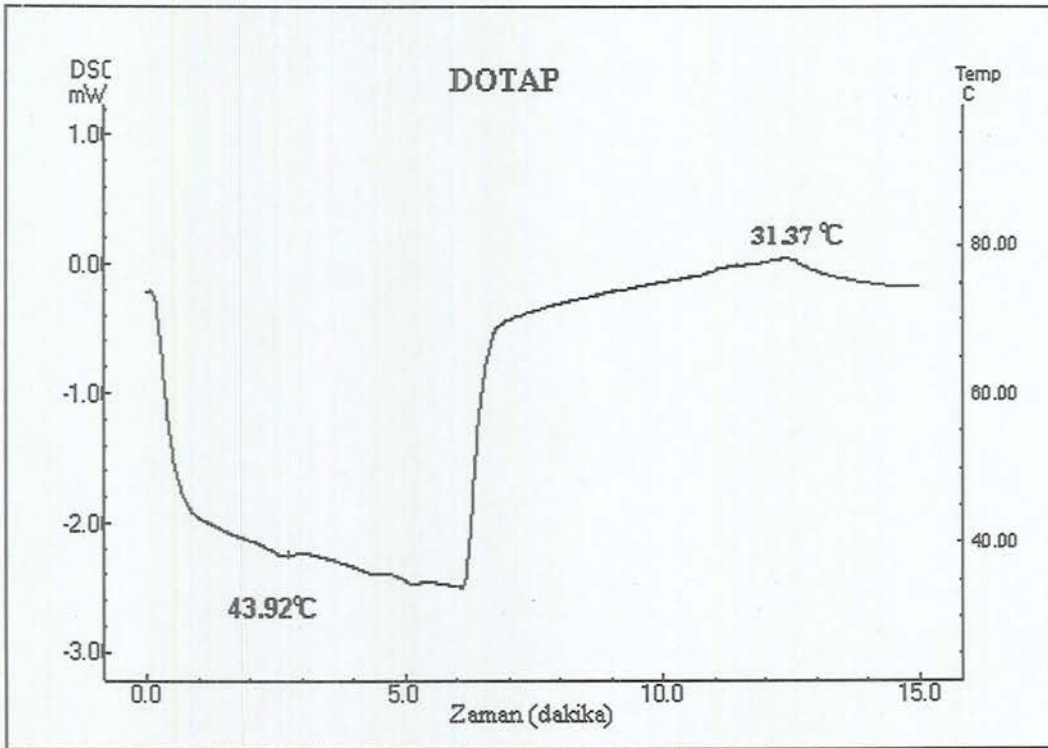
#### 4.1.1. Analizlere Ait Katyonik Lipit DOTAP® Üzerinde Yapılan Bulgular

##### 4.1.1.1. Erime Derecesi Tayini Bulguları

DOTAP®'ın erime derecesi, 40°C olarak bulunmuştur (n=3).

##### 4.1.1.2. Termal Analiz Bulguları

DOTAP®'ın termogramı Şekil 11'de verilmiştir. Bu termograma göre, erime derecesinin 43.92°C ve lipitin 1 g'ının erimesi için gerekli olan enerjinin 8.10 joul.g<sup>-1</sup> olduğu bulunmuştur. Soğutmadaki tekrar kristallenme noktası 31.37°C ve 1 g'ının tekrar kristallenmesi için kaybetmesi gereken enerji -107.64 joul.g<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır.



Şekil 11. DOTAP®'ın Termogramı

#### 4.1.1.3. Formülasyon Sırasındaki Ortam Koşulları Uygulandıktan Sonraki Termal Analiz Bulguları

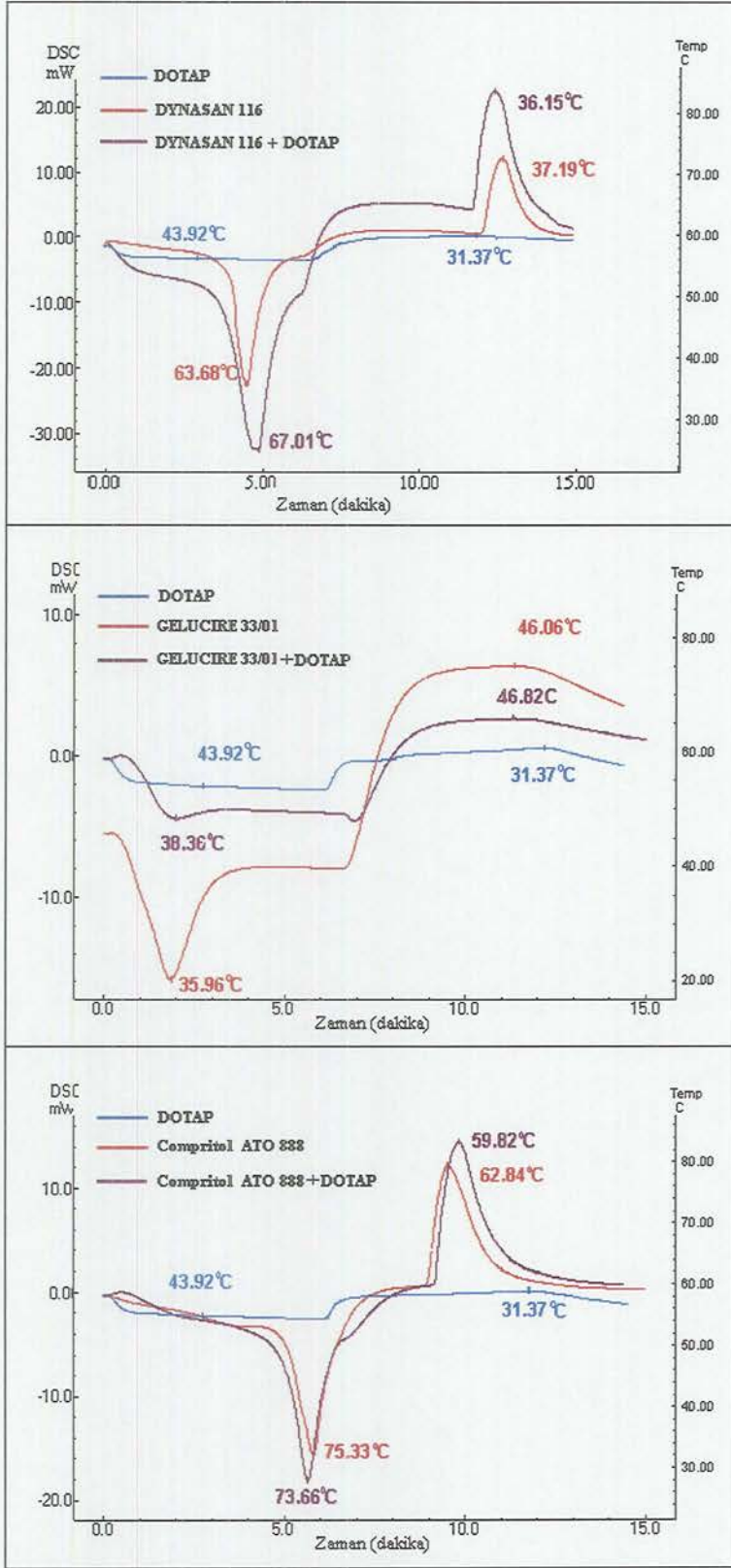
DOTAP<sup>®</sup>'in, formülasyon koşulları uygulandıktan sonraki termogramlarında analiz edilebilecek belirgin bir pik elde edilememiştir. Erime piki kaybolmuştur.

#### 4.1.1.4. Kullanılan Lipit Matrisler İçerisindeki Çözünürlük Tayinine Ait Bulgular

DOTAP<sup>®</sup>'in, Dynasan<sup>®</sup> 116, Gelucire<sup>®</sup> 33/01 ve Compritol<sup>®</sup> ATO 888 içindeki çözünürlüğünün saptanması amacıyla, formülasyonlarda kullanılan oranlarda (% 4 lipit matris, % 0.35 DOTAP<sup>®</sup>) karışımlar hazırlanmış, formülasyon hazırlama aşamasındaki sıcaklıklara (73°C, 45°C ve 85°C) ısıtıldıktan sonra elde edilen termogramları Şekil 12'de ve bu termogramlara göre erime dereceleri ve lipitlerin 1 g'ının erimesi için gerekli olan enerjiler ile soğutmadaki tekrar kristallenme noktaları ve 1 g'ın tekrar kristallenme için kaybedilmesi gereken enerjiler Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. DOTAP<sup>®</sup>'in Kullanılan Lipit Matrisler İçerisindeki Erime ve Tekrar Kristallenme Dereceleri ve Enerjileri

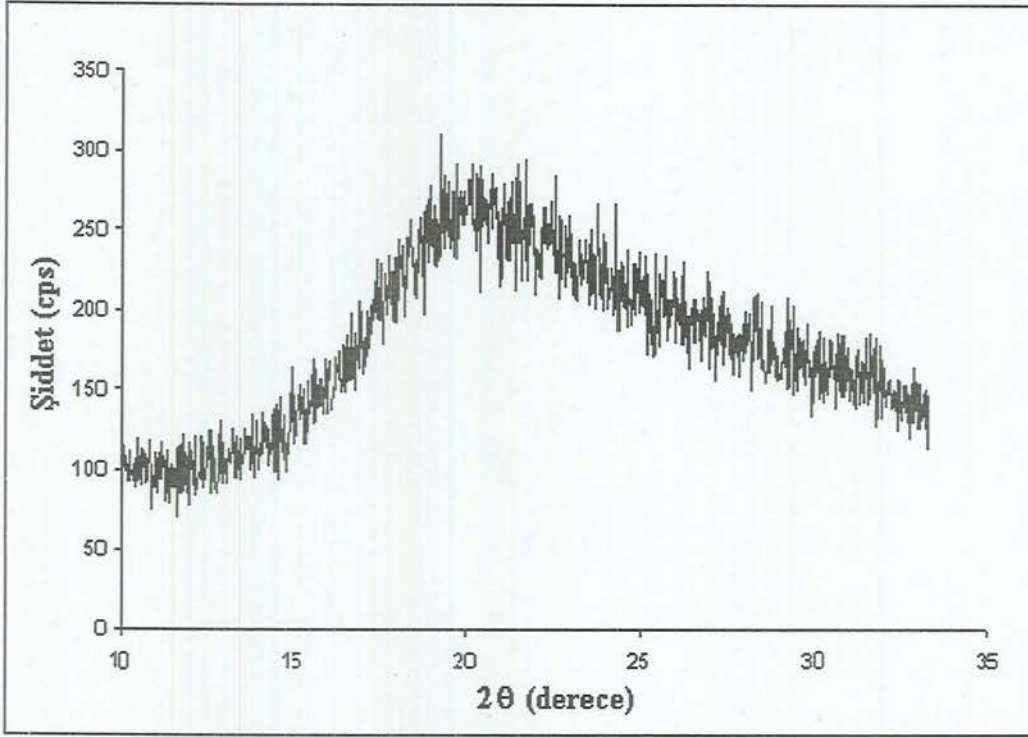
Lipit Matris	Erime Noktası (°C)	Enerji (jul.g <sup>-1</sup> )	Tekrar Kristallenme Noktası (°C)	Enerji (jul.g <sup>-1</sup> )
DOTAP <sup>®</sup> + Dynasan <sup>®</sup> 116	67.01	225.34	36.15	-103.66
DOTAP <sup>®</sup> + Gelucire <sup>®</sup> 33/01	38.36	14.59	46.82	-68.06
DOTAP <sup>®</sup> + Compritol <sup>®</sup> ATO 888	73.66	176.71	59.82	-174.22



Şekil 12. DOTAP®'ın Dynasan® 116 İçinde (A), Gelucire® 33/01 İçinde (B) ve Compritol® ATO 888 İçinde (C) Çözünürlük Tayini Termogramları

#### 4.1.1.5. X-Işını Kırınım Analizi Bulguları

X-ışını kırınım grafiği Şekil 13’de verilmiştir.



Şekil 13. DOTAP®'ın X-Işını Kırınım Grafiği

#### 4.1.1.6. Jel Retardasyon Deneyine Ait Bulgular

DOTAP®'ın  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  konsantrasyondaki sulu çözeltisinin plazmit DNA'ya elektrostatik etkileşme ile bağlanarak tutunabilme yeteneğini saptamak için, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile Çizelge 3'de belirtilen oranlarda pDNA-DOTAP® ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) kompleksleri oluşturulmuştur. Agaroz jel elektroforezi uygulandıktan sonraki fotoğrafı Şekil 14'deki Bant I'de görülmektedir.

##### 4.1.1.6.1. Formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonraki jel retardasyon deneyi Bulguları

Katyonik lipit olan DOTAP®'ın, formülasyon aşamaları sırasında pDNA'yı tutabilmesinde görülebilecek değişiklikler saptanmaya çalışılmıştır. Kullanılan lipit matrislerin erime derecelerine bağlı belirlenen farklı formülasyon sıcaklıkları uygulanmıştır. Ortam koşulları uygulanmış DOTAP® kodları,

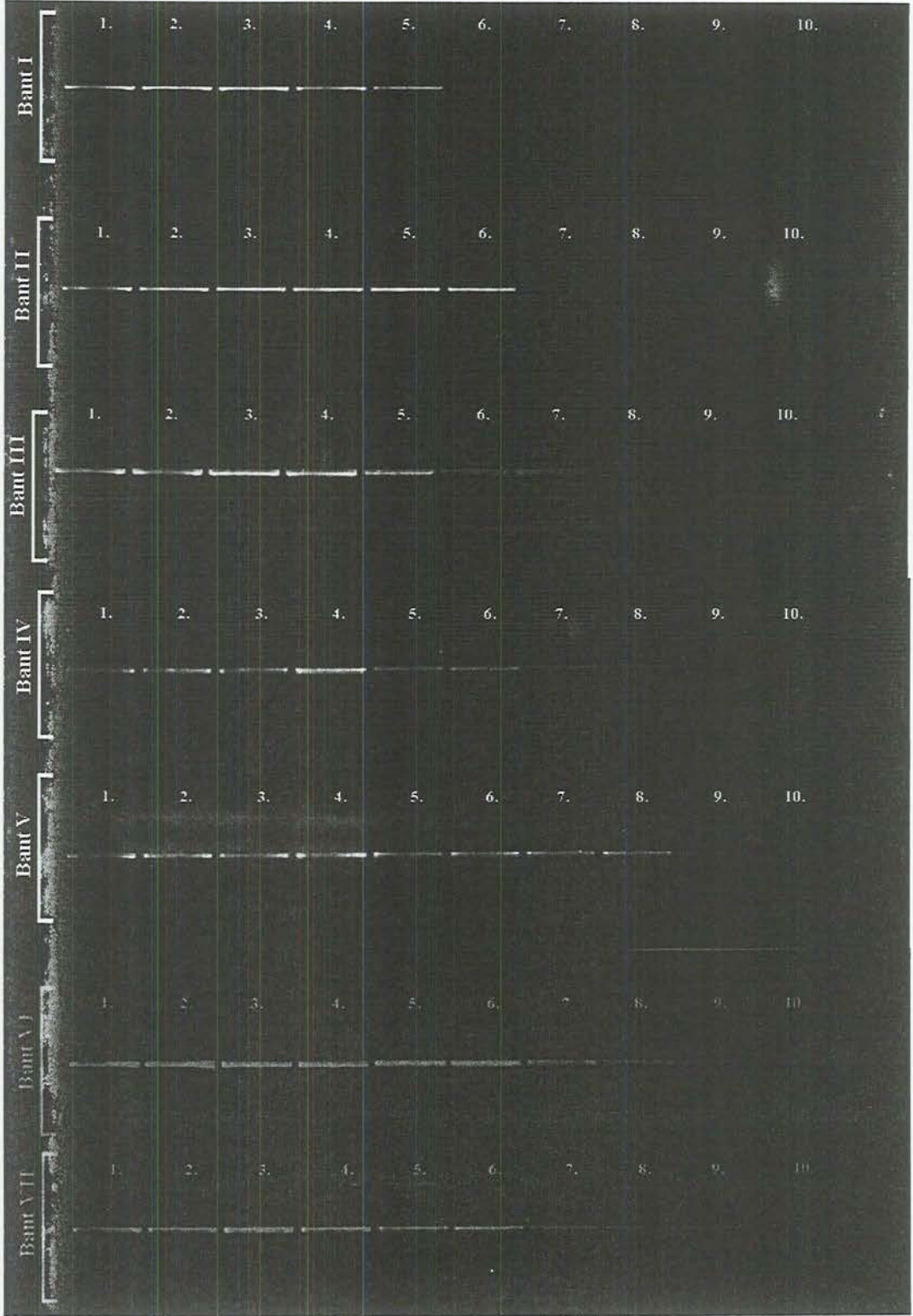
pDNA-DOTAP<sup>®</sup> oranları ve uygulama alanları **Çizelge 3**'de verilmiştir. Bu oranlarla hazırlanmış ve agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş komplekslerin görüntüleri, **Şekil 14**'deki **Bant II, III, IV, V, VI ve VII**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3. Katyonik Lipit Kodları, Uygulanan Ortam Koşulları, pDNA-DOTAP<sup>®</sup>(n) Oranları, Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları**

Katyonik Lipit Kodları [DOTAP <sup>®</sup> (n)]	Uygulanan Ortam Koşulları					Uygulanan Alanlar				
DOTAP <sup>®</sup>	-					Bant I				
DOTAP <sup>®</sup> I	43±1°C'ye Isıtılmış DOTAP <sup>®</sup>					Bant II				
DOTAP <sup>®</sup> II	43±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP <sup>®</sup>					Bant III				
DOTAP <sup>®</sup> III	73±1°C'ye Isıtılmış DOTAP <sup>®</sup>					Bant IV				
DOTAP <sup>®</sup> IV	73±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP <sup>®</sup>					Bant V				
DOTAP <sup>®</sup> V	85±1°C'ye Isıtılmış DOTAP <sup>®</sup>					Bant VI				
DOTAP <sup>®</sup> VI	85±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP <sup>®</sup>					Bant VII				
Uygulama Hattı	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
pDNA-DOTAP <sup>®</sup> (n) Oranı (µg/µg)	1:0	1:1	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14	1:16

► Jel Konsantrasyonu : % 1.5      ► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 25 Volt, 2 Saat

► Katyonik Lipit Tiplerinin Seyreltme Ortamı ve Konsantrasyonu : pH 7.4'e NaOH ile ayarlanarak otoklavlanmış distile su, µg/µL



Şekil 14. DOTAP®'ın, Formülasyon Sırasındaki Ortam Koşulları Uygulandıktan Sonraki Jel Retardasyon Deneyi Görüntüleri



#### 4.1.1.7. Zeta Potansiyelin Belirlenmesine Ait Bulgular

DOTAP<sup>®</sup>'ın (n), µg/µL konsantrasyondaki sulu çözeltileri, pH 7.4 (NaOH ile ayarlanmış) ve 50 µS (NaCl ile ayarlanmış) distile su içinde dağıtıldıktan sonra elde edilen zeta potansiyel değerleri Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Katyonik Lipit DOTAP<sup>®</sup>'ın Formülasyon Koşulları Uygulanmadan ve Uygulandıktan Sonraki Zeta Potansiyel Değerleri

Katyonik Lipit Kodları [DOTAP <sup>®</sup> (n)]	Uygulanan Ortam Koşulları	Zeta Potansiyel (mV) ± SH
DOTAP <sup>®</sup>	-	73.773 ± 0.518
DOTAP <sup>®</sup> I	43±1°C'ye Isıtılmış DOTAP <sup>®</sup>	72.873 ± 0.574
DOTAP <sup>®</sup> II	43±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP <sup>®</sup>	71.188 ± 0.544
DOTAP <sup>®</sup> III	73±1°C'ye Isıtılmış DOTAP <sup>®</sup>	71.490 ± 0.508
DOTAP <sup>®</sup> IV	73±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP <sup>®</sup>	70.778 ± 0.829
DOTAP <sup>®</sup> V	85±1°C'ye Isıtılmış DOTAP <sup>®</sup>	71.041 ± 0.577
DOTAP <sup>®</sup> VI	85±1°C'ye Isıtıldıktan Sonra Otoklavlanan DOTAP <sup>®</sup>	69.407 ± 0.396

n=6; SH : Standart Hata

#### 4.1.2. Lipit Matrislerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

##### 4.1.2.1. Erime Derecesi Tayini

Dynasan<sup>®</sup> 116, Gelucire<sup>®</sup> 33/01 ve Compritol<sup>®</sup> ATO 888'in erime dereceleri, sırasıyla, 63 °C, 33 °C ve 75 °C olarak belirlenmiştir (n=3).

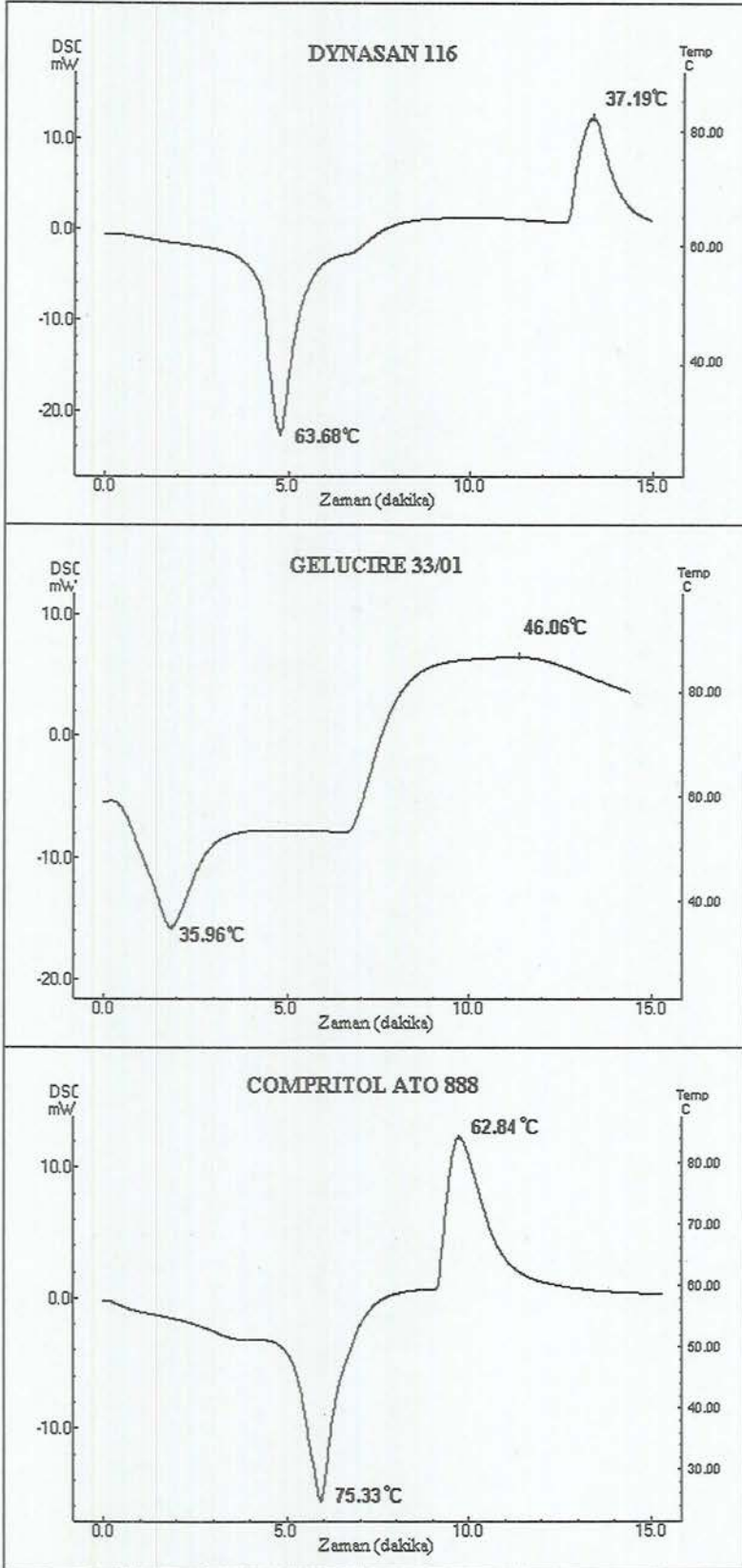
##### 4.1.2.2. Termal Analiz Bulguları

Öncelikle katı lipit partikülleri içeren süspansiyonların yağlı fazını oluşturan Dynasan<sup>®</sup> 116, Compritol<sup>®</sup> ATO 888 ve Gelucire<sup>®</sup> 33/01'in yapıları incelenmiştir. Formülasyonun hazırlanmasında bir kez ve DSC analizi sırasında ikinci kez sıcaklığa maruz kalacağından, yağlı fazlara iki kez ısıtma uygulanmıştır. Birinci ve ikinci ısıtmada lipitlerin erime noktaları, lipitlerin 1 g'ının erimesi için gerekli enerjiler ile birinci ve ikinci soğutmada tekrar

kristallenme noktaları ve lipitlerin 1 g'ının tekrar kristallenmesi için kaybetmesi gereken enerjiler **Çizelge 5**'de analiz termogramları ise **Şekil 15**'de verilmiştir.

**Çizelge 5. Lipit Matrislerin Erime ve Tekrar Kristallenme Dereceleri ve Enerjileri**

	Lipit Matris	Erime Noktası (°C)	Enerji (jul.g <sup>-1</sup> )	Tekrar Kristallenme Noktası (°C)	Enerji (jul.g <sup>-1</sup> )
<b>I. Isıtma</b>	Dynasan® 116	62.58	250.95	37.72	-162.74
	Gelucire® 33/01	38.69	47.40	42.96	-91.61
	Compritrol® ATO 888	73.56	63.91	61.09	-98.82
<b>II. Isıtma</b>	Dynasan® 116	63.68	149.82	37.19	-88.21
	Gelucire® 33/01	35.96	33.50	46.06	-16.32
	Compritrol® ATO 888	75.33	160.40	62.84	-104.05



A

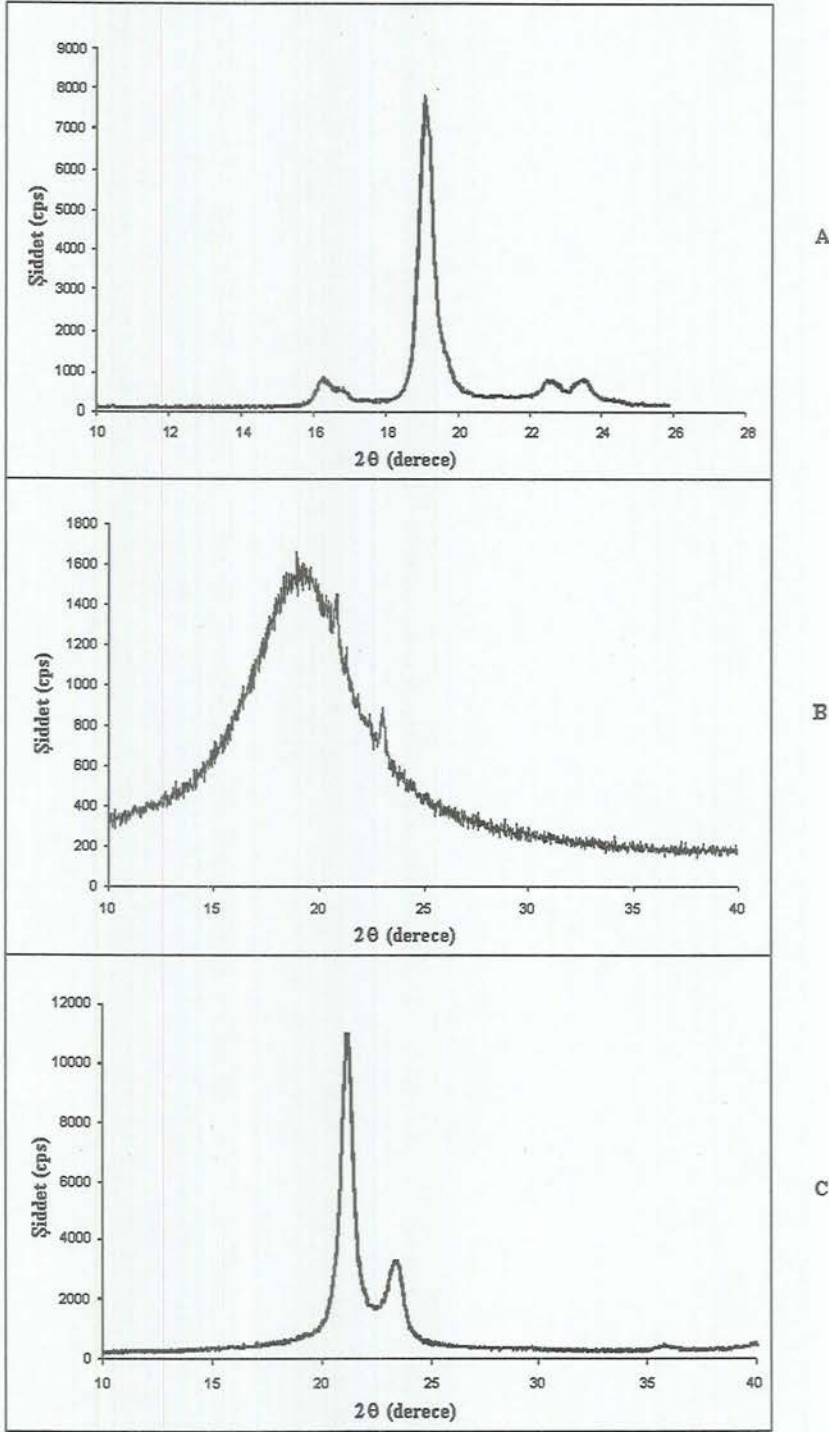
B

C

Şekil 15. Dynasan® 116 (A), Gelucire 33/01 (B) ve Compritol® ATO 888'in (C) II. Isıtma Termogramları

#### 4.1.2.3. X-Işını Kırınım Analizi Bulguları

Dynasan® 116, Gelucire® 33/01 ve Compritol® ATO 888'in X-ışını kırınım analizleri yapılmış ve grafikleri Şekil 16'de verilmiştir.



Şekil 16. Dynasan® 116 (A), Gelucire® 33/01 (B) ve Compritol® ATO 888'in (C) X-ışını Kırınım Analiz Grafikleri

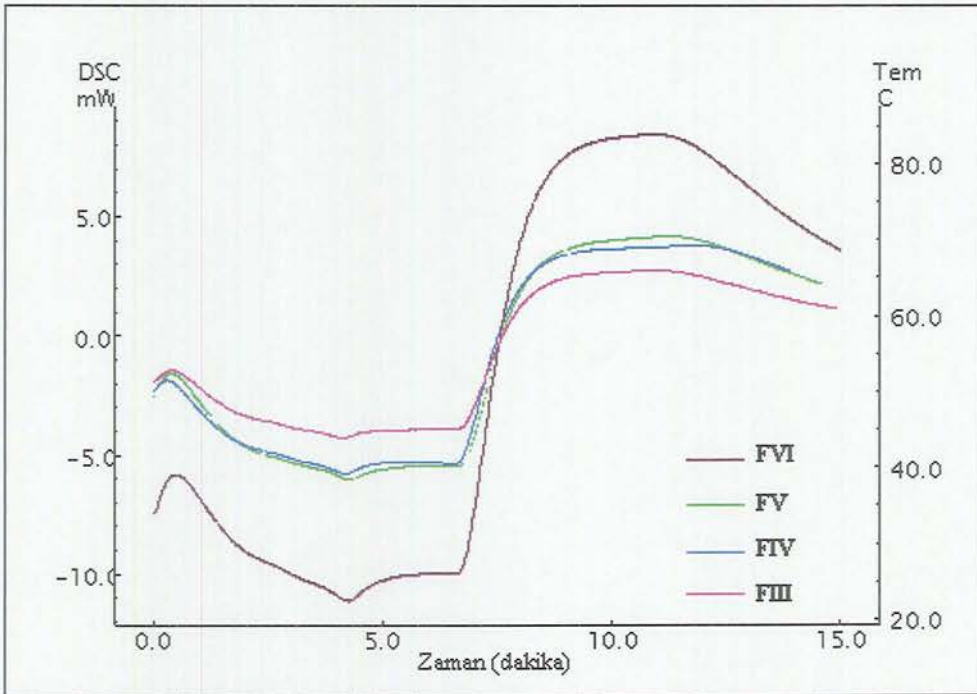
### 4.1.3. Katı Lipit Ön Formülasyonların Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

#### 4.1.3.1. Termal Analiz Bulguları

Taze hazırlanmış KLN dispersiyonlarının termogramları Şekil 17’de ve bu termogramlara göre, erime dereceleri ve lipitlerin 1 g’ının erimesi için gerekli olan enerjiler ile soğutmadaki tekrar kristallenme noktaları ve 1 g’ın tekrar kristallenme için kaybedilmesi gereken enerjiler Çizelge 6’da verilmiştir.

Çizelge 6. Taze Hazırlanmış FIII, FIV, FV ve FVI KLN’lerin Erime ve Tekrar Kristallenme Dereceleri ve Enerjileri

KLN Kodu	Erime Noktası (°C)	Enerji (jul.g <sup>-1</sup> )	Tekrar Kristallenme Noktası (°C)	Enerji (jul.g <sup>-1</sup> )
FIII	58.94	35.11	49.37	-96.77
FIV	61.24	16.60	39.56	-52.43
FV	60.39	48.53	46.56	144.10
FVI	59.35	24.30	50.90	-191.62



Şekil 17. Taze Hazırlanmış FIII, FIV, FV ve FVI KLN’lerin Termogramı

#### 4.1.3.2. pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Belirlenmesi Bulguları

Dört farklı oranda katyonik lipid DOTAP® içeren her bir formülasyon (FIII; %0.20, FIV; %0.25, FV; %0.30 ve FVI; %0.35), süzülen, otoklavlanan ve liyofilize edilen olmak üzere sınıflandırılarak, pDNA'ya elektrostatik olarak bağlanma yetenekleri karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Formülasyon kodları, pDNA-formülasyon oranları ve uygulama alanları **Çizelge 7-9**'da verilmiştir. Bu oranlarla hazırlanmış ve agaroz jel elektroforezi uygulanmış komplekslerin görüntüleri de, **Şekil 18-20**'deki **Bant I** ve **Bant II**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 7. Süzülmüş KLN'lerin Kodu (Fn), pDNA:KLN Oranları ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları (Bant I ve II)**

	Uygulama Hattı								
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Bant I	FIII 1:5	FIII 1:10	FIII 1:15	FIII 1:20	1 $\mu\text{g}$ pDNA	FIV 1:5	FIV 1:10	FIV 1:15	FIV 1:20
Bant II	FV 1:5	FV 1:10	FV 1:15	FV 1:20	1 $\mu\text{g}$ pDNA	FVI 1:5	FVI 1:10	FVI 1:15	FVI 1:20

► Jel Konsantrasyonu: % 1.5

► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 80 Volt, 1.5 Saat



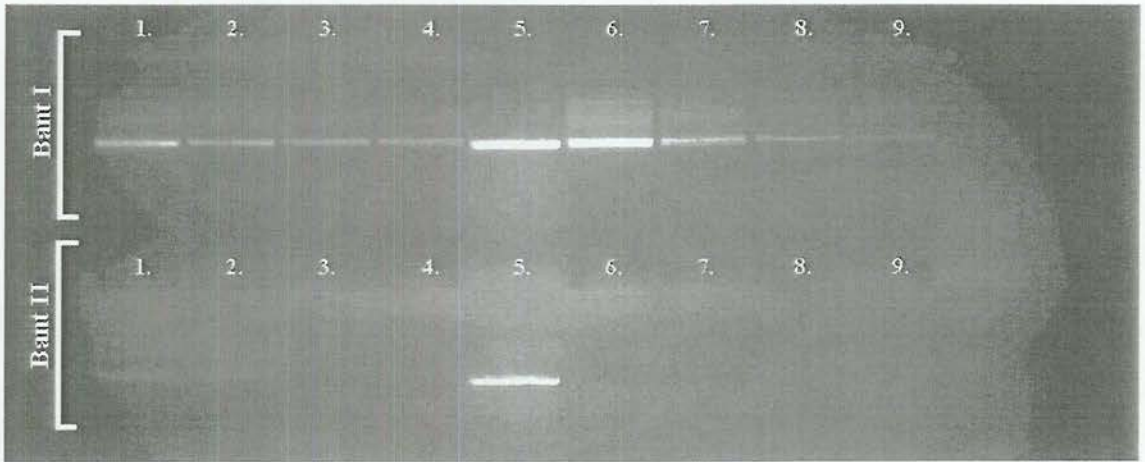
**Şekil 18. Süzülmüş FIII, FIV, FV ve FVI Formülasyonların pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Görüntüsü**

Çizelge 8. Otoklavlanmış KLN'lerin Kodu (Fn), pDNA:KLN Oranları ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları (Bant I ve II)

		Uygulama Hattı								
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Bant I		FIII 1:5	FIII 1:10	FIII 1:15	FIII 1:20	1 $\mu\text{g}$ pDNA	FIV 1:5	FIV 1:10	FIV 1:15	FIV 1:20
Bant II		FV 1:5	FV 1:10	FV 1:15	FV 1:20	1 $\mu\text{g}$ pDNA	FVI 1:5	FVI 1:10	FVI 1:15	FVI 1:20

► Jel Konsantrasyonu: % 1.5

► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 80 Volt, 1.5 Saat



Şekil 19. Otoklavlanmış FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Görüntüsü

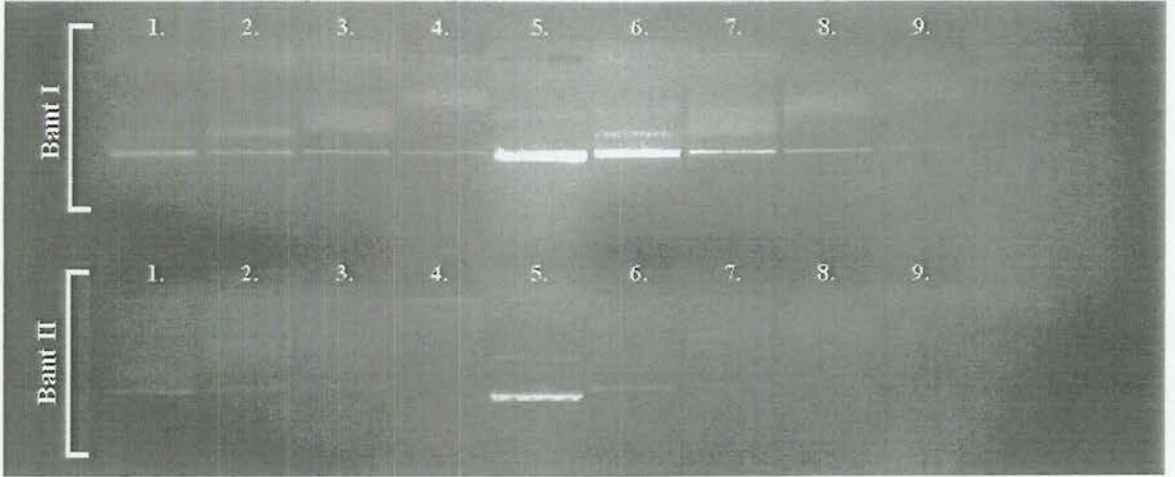
**Çizelge 9. Liyofilize Edilmiş KLN'lerin Kodu (Fn), pDNA:KLN Oranları ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), Uygulama Hattı ve Uygulama Alanları (Bant I ve II)**

		Uygulama Hattı								
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Bant I		FIII 1:5	FIII 1:10	FIII 1:15	FIII 1:20	1 $\mu\text{g}$ pDNA	FIV 1:5	FIV 1:10	FIV 1:15	FIV 1:20
Bant II		FV 1:5	FV 1:10	FV 1:15	FV 1:20	1 $\mu\text{g}$ pDNA	FVI 1:5	FVI 1:10	FVI 1:15	FVI 1:20

► Jel Konsantrasyonu: % 1.5

► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 80 Volt, 1.5 Saat

► Liyofilize Edilmiş Formülasyonların Seyreltme Ortamı: pH 7.4 distile su



**Şekil 20. Liyofilize Edilmiş FIII, FIV, FV ve FVI Formülasyonların pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Görüntüsü**



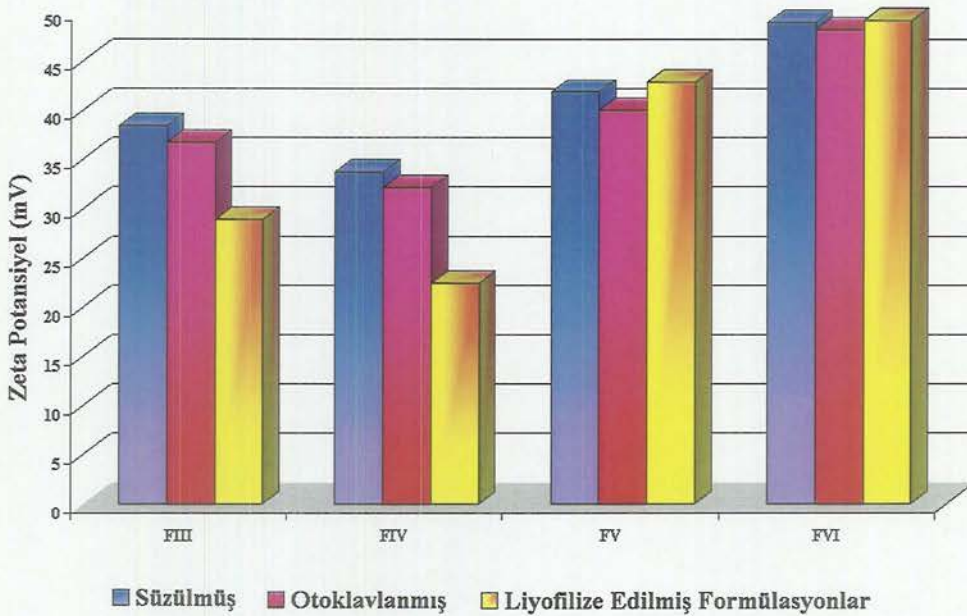
#### 4.1.3.3. Zeta Potansiyellerin Belirlenmesi Bulguları

Hazırlanan ön formülasyonların elektriksel hareketliliğinden hareketle hesaplanan zeta potansiyel değerleri **Çizelge 10**'da verilmiş ve **Şekil 21**'de gösterilmiştir.

**Çizelge 10. FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerinin Ortalama Zeta Potansiyel Değerleri ve Standart Hataları**

	FIII	FIII <sub>O</sub>	FIII <sub>L</sub>	FIV	FIV <sub>O</sub>	FIV <sub>L</sub>	FV	FV <sub>O</sub>	FV <sub>L</sub>	FVI	FVI <sub>O</sub>	FVI <sub>L</sub>
Zeta Potansiyel (mV)	38.35	36.69	28.89	33.73	32.09	22.45	41.85	39.97	42.83	48.90	48.15	49.10
SH	0.12	0.03	0.10	0.14	0.27	0.10	0.51	0.27	0.26	0.63	0.33	0.17

n=3; SH: Standart Hata



**Şekil 21. FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerinin Zeta Potansiyel Grafiğı**

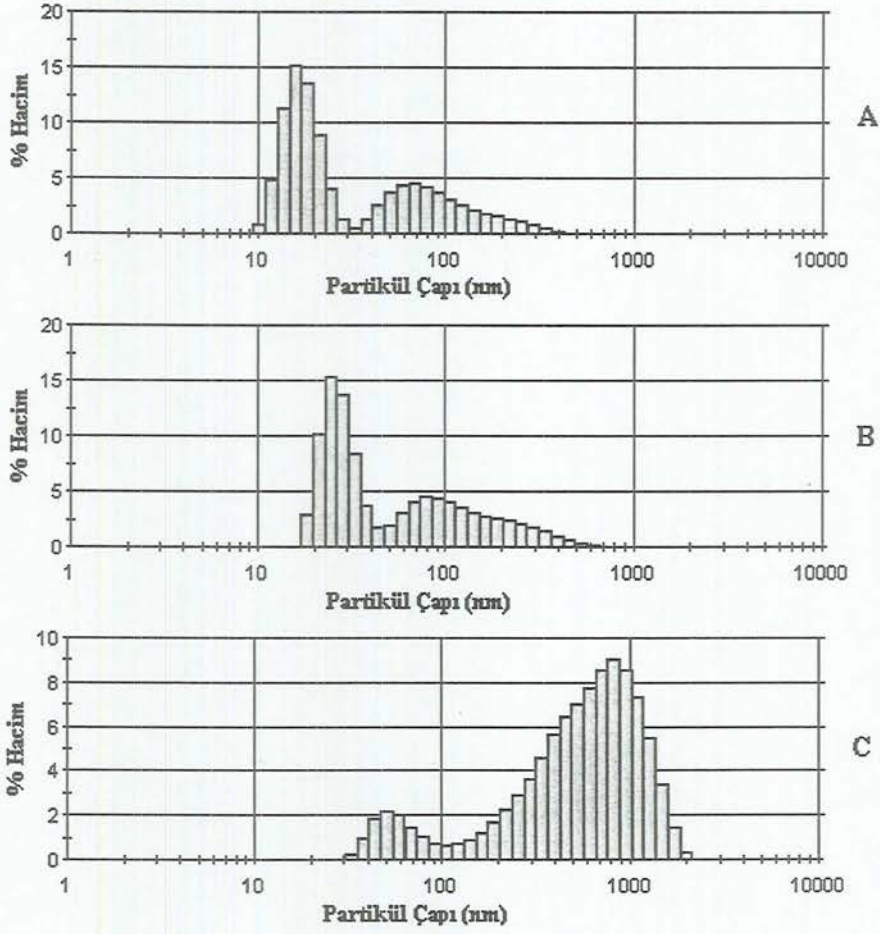
#### 4.1.3.4. Partiköl Boyutları ve Dağılımlarına Ait Bulgular

Hazırlanan farklı formöasyonların (FIII, FIV, FV ve FVI) ortalama partiköl boyutları ve dağılım değerleri **Çizelge 11**'de ve partiköl dağılım grafikleri de **Şekil 22-25**'de gösterilmiştir.

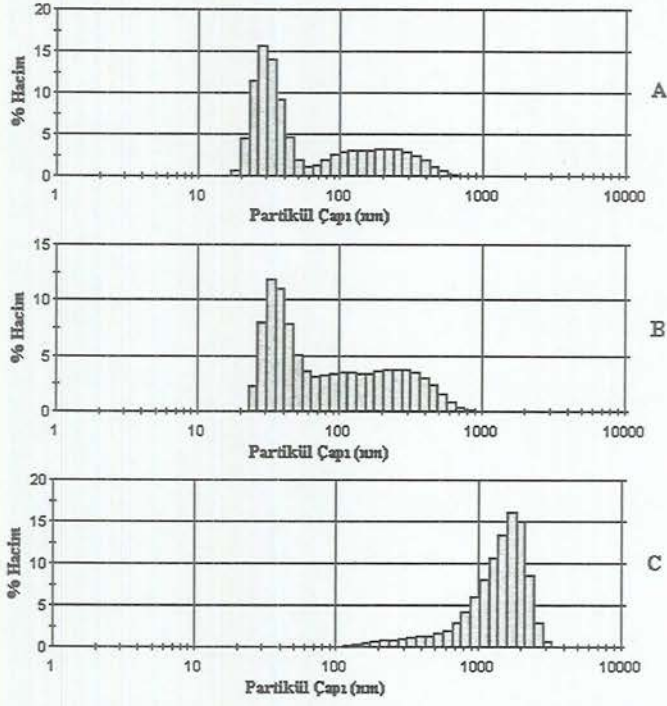
**Çizelge 11. Süzölmüş, Otoklavlanmış ve Liyofilize Edilmiş FIII, FIV, FV ve FVI KLN'lerinin Partiköl Dağılım Değerleri**

	FIII	FIII <sub>O</sub>	FIII <sub>L</sub>	FIV	FIV <sub>O</sub>	FIV <sub>L</sub>	FV	FV <sub>O</sub>	FV <sub>L</sub>	FVI	FVI <sub>O</sub>	FVI <sub>L</sub>
<b>Ortalama Büyüklük (nm)</b>	113.8	139.8	351.9	153.3	166.0	525.1	138.2	178.4	629.7	180.3	176.9	680.2
<b>PI</b>	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.7

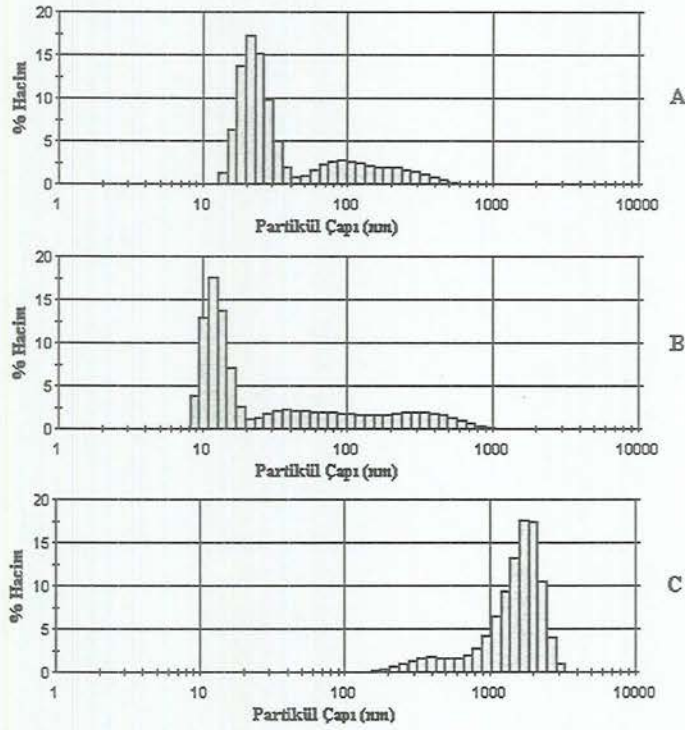
n=3; PI: Poldisperslik Indisi



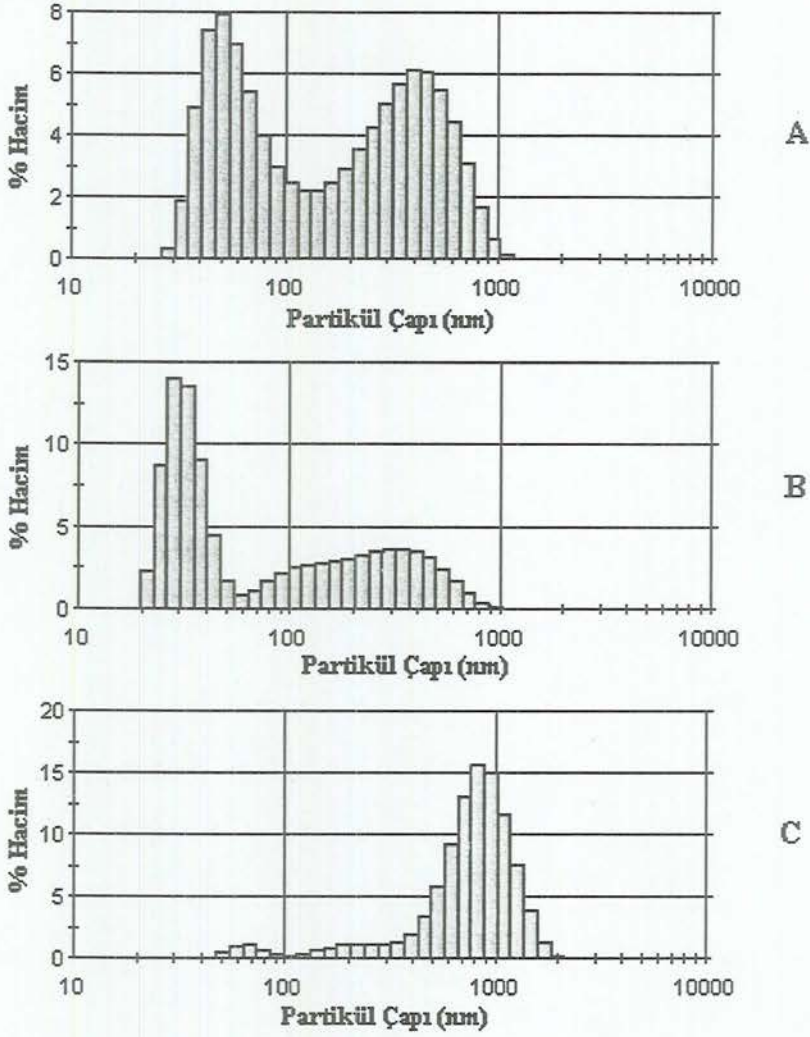
**Şekil 22. Süzölmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FIII KLN'lerinin Partiköl Boyutu Dağılım Grafikleri**



Şekil 23. Süzölmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FIV Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri



Şekil 24. Süzölmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FV Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri



Şekil 25. Süzülmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FVI Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri

#### 4.1.3.5. Farklı Lipit Matrislerle Çalışılacak Formülasyonun Seçilmesi

Hazırlanan ön formülasyonların termal analiz sonuçları ve partikül boyutları arasında belirgin farklılıklar görülmemiştir. FIII ve FIV formülasyonlarının liyofilize hallerinin zeta potansiyelleri 30 mV'un altında bulunmuştur. KLN'lerin, zeta potansiyel değeri  $|30|-|60|$  mV aralığında (11) oldukça iyi elektrostatik kararlılık gösterdikleri belirtilmektedir (11, 136, 137). FV ve FVI formülasyonlarının tüm hallerinin (süzülmüş, otoklavlanmış ve liyofilize

edilmiş) zeta potansiyellerinin 30 mV'un üzerinde bulunması ile uzun süreli kararlılığı sağlayabileceği düşünülmüştür.

pDNA bağlama açısından FVI formülasyonunun FV formülasyonuna üstünlüğü göz önüne alınmış ve bu nedenle en uygun formülasyon olarak FVI belirlenmiştir.

#### **4.1.4. KLN'lerle Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular**

Mikro- ve nanopartikül hazırlama ön çalışmalarıyla en uygun katyonik lipit içeren formülasyonun (FVI) belirlenmesinden sonra, katyonik lipitin farklı katı lipit matrislerle oluşturacağı formülasyonların etkinliklerinin araştırılması yapılmıştır.

##### **4.1.4.1. KLN'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmalarının Bulguları**

###### **4.1.4.1.1. Makroskobik incelemeleri**

Katı lipit mikro- ve nanopartikül süspansiyonları, beyaz renkte ve akıcı kıvamdadır. Dynasan® 116 ve Gelucire® 33/01 ile hazırlanan formülasyonlarla karşılaştırıldığında, Compritol® ATO 888 ile hazırlanmış formülasyonun rengi, diğer formülasyonların su ile seyreltilmiş haline benzemektedir, opak beyazdır ve daha akıcı kıvamdadır.

Otoklavlama işleminden sonra, formülasyonların görüntülerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Tüm formülasyonlarda faz ayrımı görülmemiştir.

Liyofilizasyon işlemi sonrasında, Dynasan® 116 ve Compritol® ATO 888 ile hazırlanmış formülasyonlar, beyaz köpüklü kalıntılar oluşturmuştur. Compritol® ATO 888 ile hazırlanmış formülasyon, Dynasan® 116 ile hazırlanmış liyofilize formülasyona oranla daha kıvamlı ve yapışkan haldedir. Her iki formülasyonun bu şekillerinin, liyofilize katyonik lipit DOTAP®'da görülen kılcal cam boru ile karıştırıldığında hacim küçülmesi, yarı katı özellik göstererek kılcal cam boruya sıvanması ve renkte sararma özelliklerini gösterdiği belirlenmiştir.

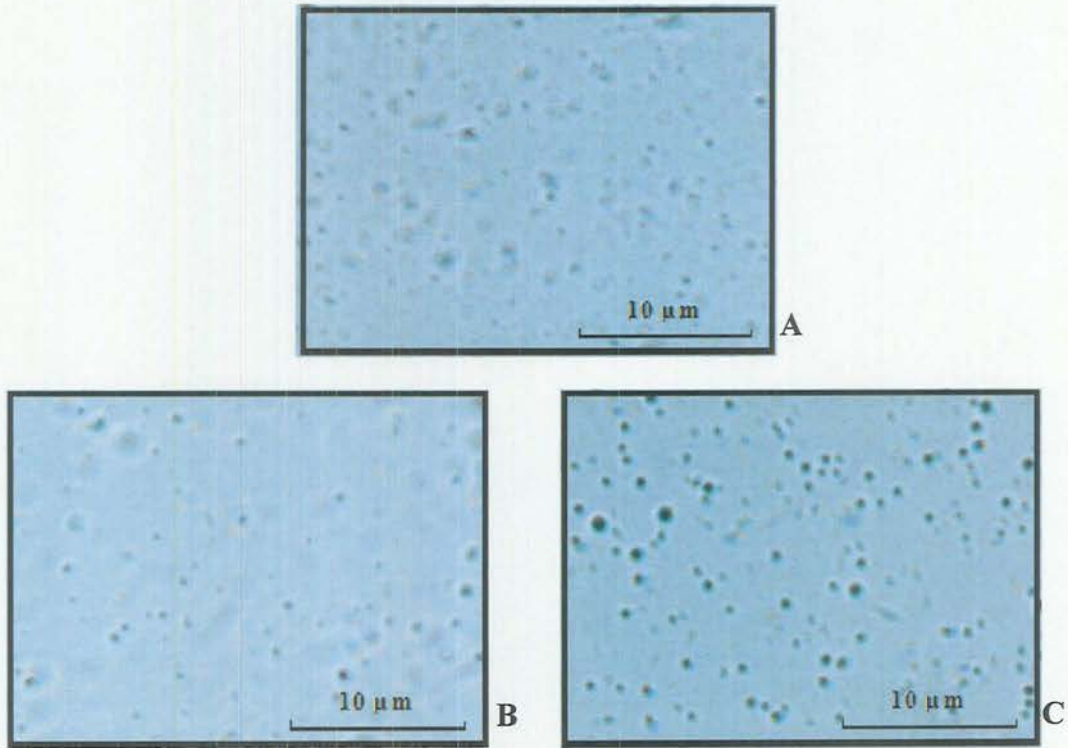
Katyonik lipit DOTAP® içermeyen Dynasan® 116 ve Compritol® ATO 888 ile hazırlanmış FI ve C formülasyonların liyofilize hallerinde renkte sararma gözlenmemesi nedeniyle, FVI ve CI formülasyonlarındaki bu renk değişimine DOTAP®'ın neden olduğu bilirlenmiştir.

Liyofilizasyon sırasında kaybettikleri su miktarı eklenerek tekrar süspende edilmeleri sırasında, Compritol® ATO 888'li formülasyon daha zor dağıtılmıştır. Tekrar süspende edilmiş halleri daha yoğun kıvam almıştır.

Gelucire® 33/01 ile hazırlanan formülasyon, liyofilizasyon işlemi sonrasında yarı katı ve bulanık bir jel kıvamında ampullerin tabanında küçük bir hacim kaplamıştır. Kılcal cam boru ile karıştırıldığında, viskoz sıvı hale gelmiştir. Su ile tekrar süspende edilmesi de çok çabuk olmuş ve kıvamının daha yoğun olduğu gözlenmiştir.

#### 4.1.4.1.2. Şekilleri

Işık mikroskobu ile FVI, GI ve CI kodlu formülasyonların liyofilize edilmiş hallerinin ışık mikroskobunda görülen şekilleri Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 26. Liyofilize Edilmiş FVI (A), GI (B) ve CI (C) KLN'lerin Işık Mikroskobunda Görünümleri

#### 4.1.4.1.3. KLN'lerin pH değerlerinin belirlenmesine ait bulgular

DOTAP® içeren ve içermeyen formülasyonların pH değerleri, FI için  $6.46 \pm 0.05$ ; FVI için  $6.23 \pm 0.04$ ; G için  $6.51 \pm 0.09$ ; GI için  $6.21 \pm 0.02$ ; C için  $6.46 \pm 0.02$  ve CI için  $6.05 \pm 0.00$  olarak bulunmuştur. pH 7.0'e ayarlanmış su içerisine formülasyonların eklenmesiyle pH da düşüş bulunmuştur.

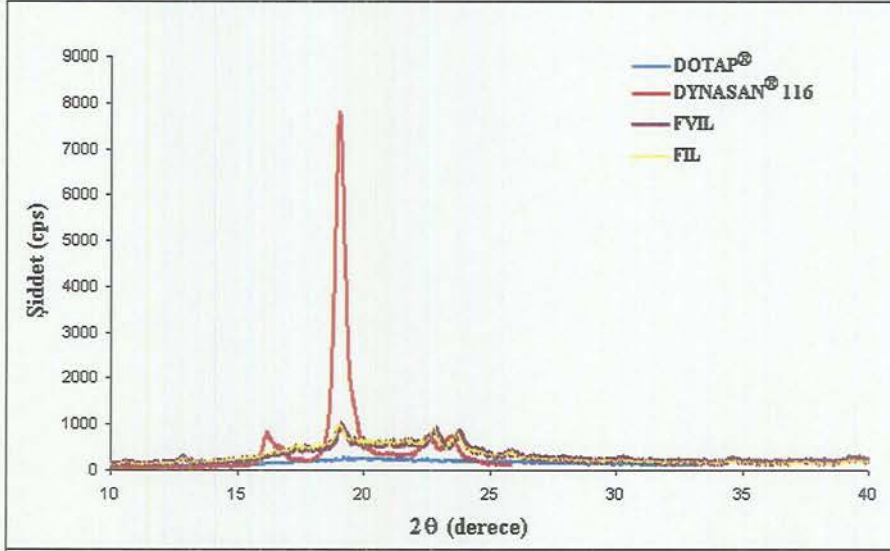
#### 4.1.4.1.4. KLN'lerin termal analiz bulguları

Kullanılan alüminyum kapların hacmine göre ayarlanan 10 µL (~10 mg) içindeki formülasyonda yer alan yağların miktarının çok düşük olması nedeniyle, ayrıca liyofilize edilmiş örneklerden (su ile muamele edilmemiş) ~10 mg alüminyum örnek kaplarına konarak termal analizleri gerçekleştirilmiş ve dikkate alınmıştır. Elde edilen sonuçlar, **Bölüm 4.1.4.1.11.**'de *Saklama Koşullarında Kararlılık Kontrollerinde* verilmiştir.

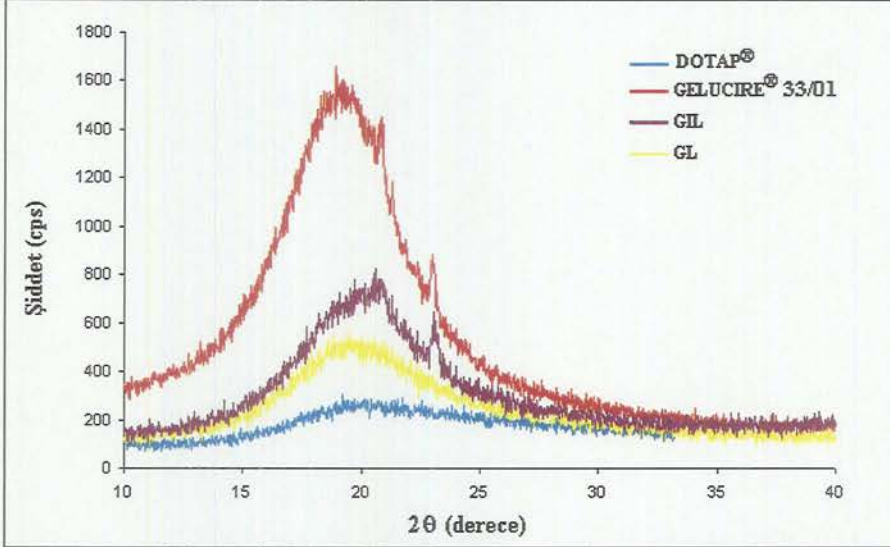
#### 4.1.4.1.5. KLN'lerin X-ışını kırınım analiz bulguları

Analizlerin katı örnek üzerinde yapılabilme imkanı nedeniyle, analizler formülasyonların liyofilize edilmiş şekilleri üzerinde yapılabilmiştir.

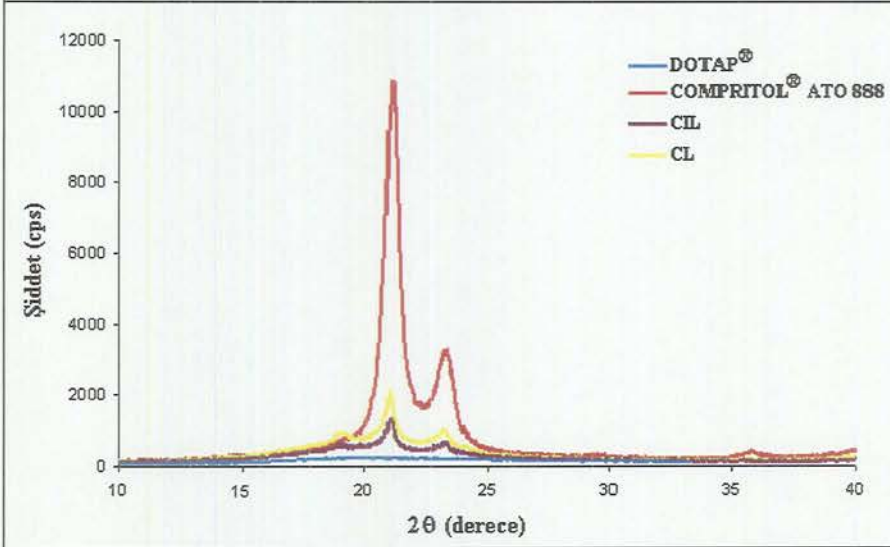
DOTAP® içeren ve içermeyen liyofilize formülasyonların X-ışını kırınım analizleri DOTAP® karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen grafikler **Şekil 27**'de verilmiştir.



A



B



C

Şekil 27. Dynasan<sup>®</sup> 116 ile (A), Gelucire<sup>®</sup> 33/01 ile (B) ve Compritol<sup>®</sup> ATO 888 (C) ile Hazırlanan KLN'lerin X-Işını Kırınım Analizleri



#### 4.1.4.1.6. KLN'lerin pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesine ait bulgular

Süzülmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş FVI, GI ve CI KLN'leri ile pDNA oranları Çizelge 12-14'de ve jel görüntüleri Şekil 28-30'da verilmiştir.

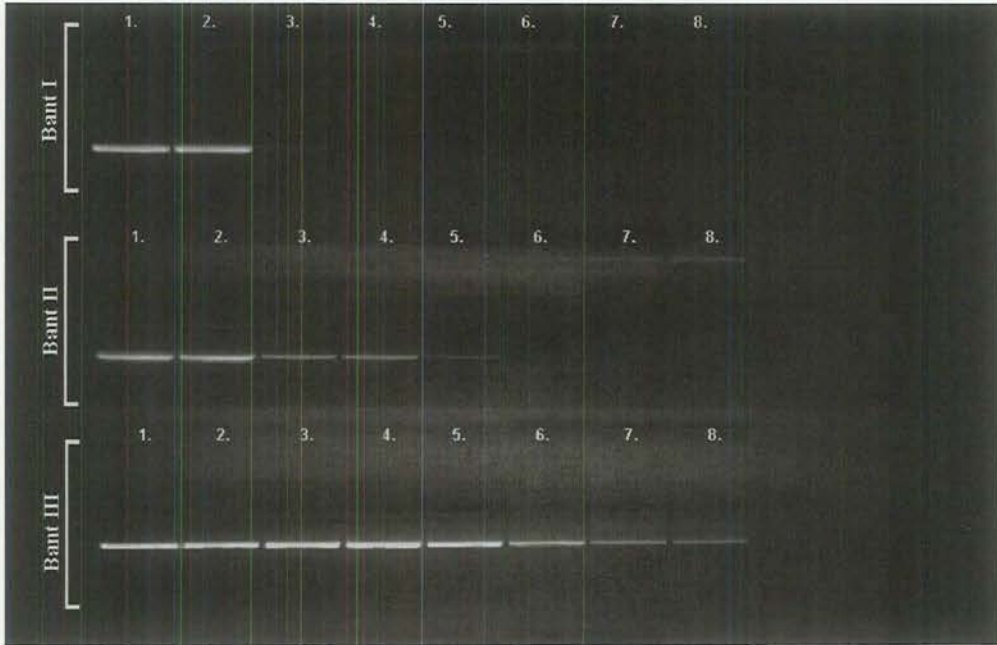
Çizelge 12. Süzülmüş, Liyofilize ve Otoklavlanmış FVI KLN'lerinin pDNA-KLN Oranları, Uygulama Noktaları ve Uygulama Alanları

	Uygulama Hattı	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
pDNA-Süzülmüş FVI ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Bant I	2 $\mu\text{g}$ pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
pDNA-Liyofilize FVI ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Bant II	2 $\mu\text{g}$ pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
pDNA-Otoklavlanmış FVI ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Bant III	2 $\mu\text{g}$ pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7

► Jel Konsantrasyonu : % 1.5

► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 25 Volt, 2 Saat

► Liyofilize Edilmiş Formülasyonların Seyreltme Ortamı: NaOH ile pH 7.4'e ayarlanarak otoklavlanmış distile su



Şekil 28. Süzülmüş, Liyofilize Edilmiş ve Otoklavlanmış FVI KLN'lerinin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Retardasyon Görüntüleri

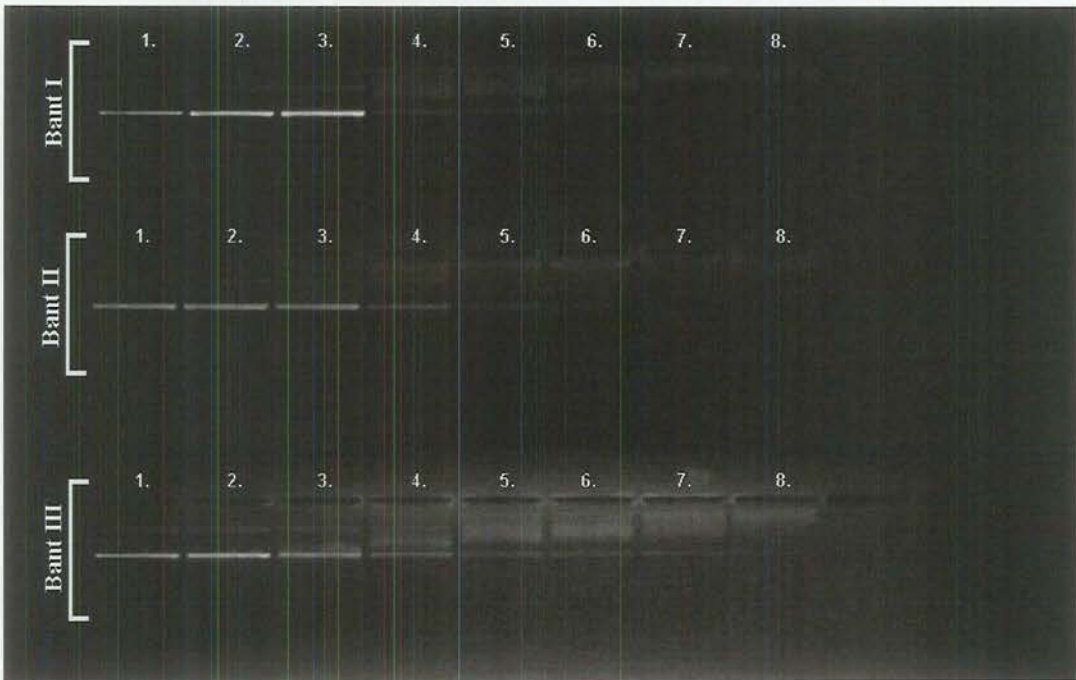
**Çizelge 13. Süzölmüş, Liyofilize ve Otoklavlanmış GI KLN'lerinin pDNA-KLN Oranları, Uygulama Noktaları ve Uygulama Alanları**

	Uygulama Hattı	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
pDNA-Süzölmüş GI ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Bant I	2 $\mu\text{g}$ pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
pDNA-Liyofilize GI ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Bant II	2 $\mu\text{g}$ pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
pDNA-Otoklavlanmış GI ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Bant III	2 $\mu\text{g}$ pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7

► Jel Konsantrasyonu : % 1.5

► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 25 Volt, 2 Saat

► Liyofilize Edilmiş Formölasyonların Seyreltme Ortamı: NaOH ile pH 7.4'e ayarlanarak otoklavlanmış distile su



**Şekil 29. Süzölmüş, Liyofilize Edilmiş ve Otoklavlanmış GI KLN'lerinin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Retardasyon Görüntüleri**

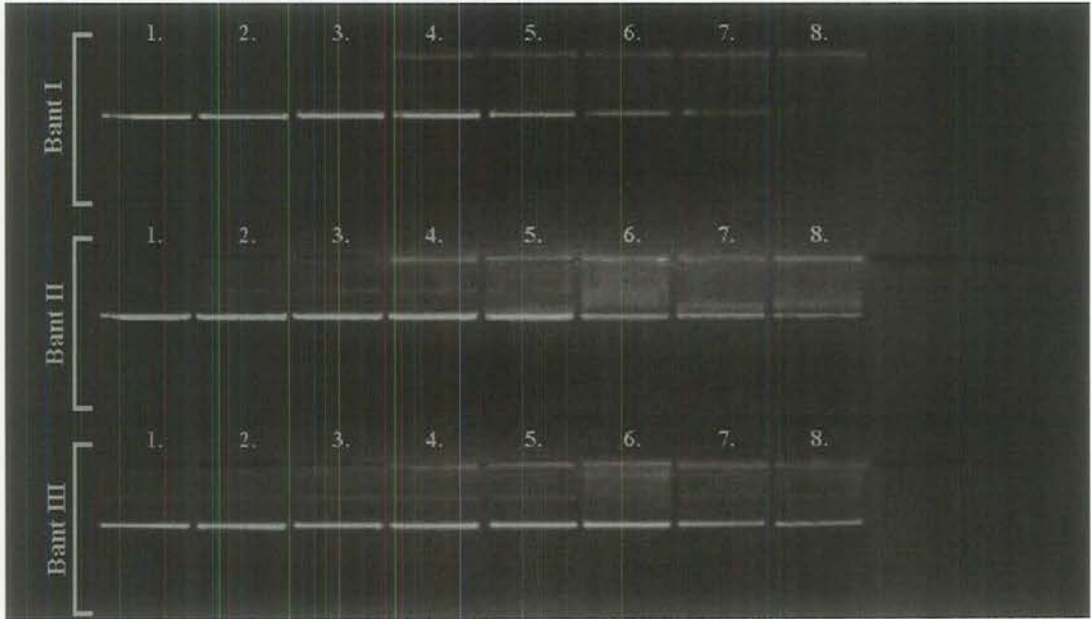
**Çizelge 14. Süzölmüş, Liyofilize ve Otoklavlanmış CI KLN'lerinin pDNA-KLN Oranları, Uygulama Noktaları ve Uygulama Alanları**

	Uygulama Hattı	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
pDNA-Süzölmüş CI (µg/µg)	Bant I	2 µg pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
pDNA-Liyofilize CI (µg/µg)	Bant II	2 µg pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
pDNA-Otoklavlanmış CI (µg/µg)	Bant III	2 µg pDNA	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7

► Jel Konsantrasyonu : % 1.5

► Uygulanan Gerilim ve Süresi : 25 Volt, 2 Saat

► Liyofilize Edilmiş Formölasyonların Seyreltme Ortamı: NaOH ile pH 7.4'e ayarlanarak otoklavlanmış distile su



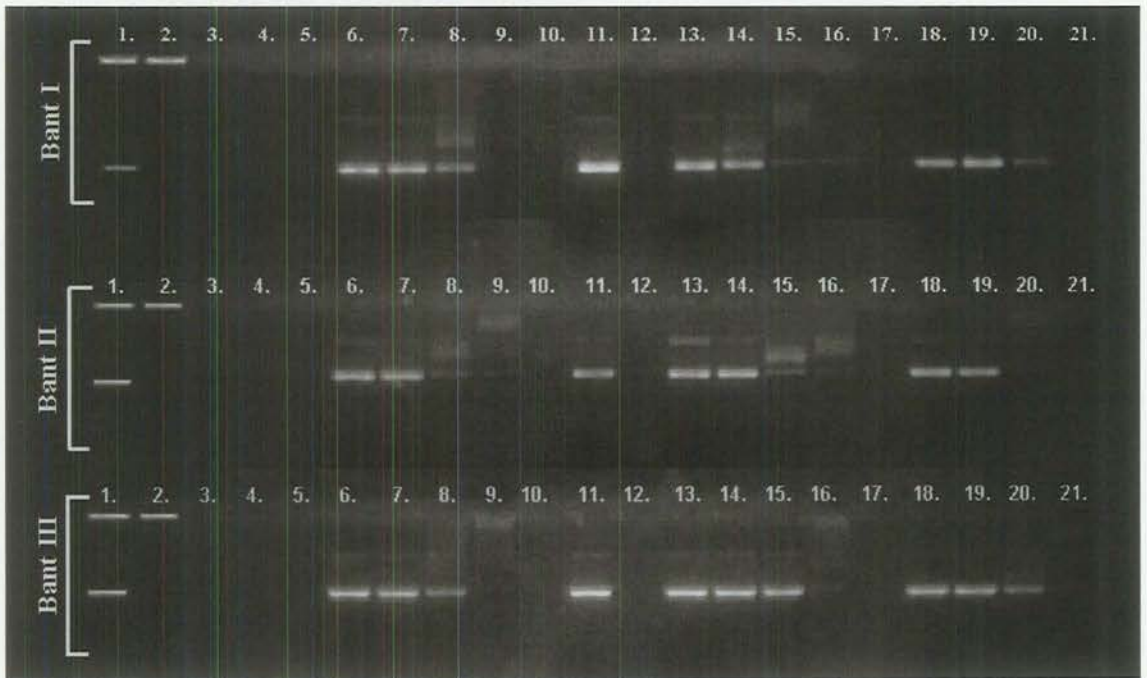
**Şekil 30. Süzölmüş, Liyofilize Edilmiş ve Otoklavlanmış CI KLN'lerinin pDNA'ya Bağlanma Oranlarının Jel Retardasyon Görüntüleri**

#### 4.1.4.1.7. Escort<sup>TM</sup>II ürününün ile KLN'lerin pDNA'ya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırılmasına ait Bulgular

1:1 oranında katyonik lipit DOTAP ve nötral lipit DOPE içeren piyasa ürünü liyofilize lipozom olan Escort<sup>TM</sup>II, Çizelge 15'de belirtilen oranlarda pDNA ile karıştırılmış ve etkileşime bırakılmıştır. Jel üzerindeki görüntüler ise, Şekil 31'de Bant I, Bant II ve Bant III'de görülmektedir.

Çizelge 15. Escort<sup>TM</sup>II Ürününün ve FVI, GI, CI KLN'lerinin pDNA ile Oluşturdukları Komplekslerin Miktarları ve Uygulama Alanları

	Uygulama Hattı																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>Oranlar (a/a)</b>	1:2	1:4	1:6	1:10	-	1:2	1:4	1:6	1:10	-	2 µg	-	1:2	1:4	1:6	1:10	-	1:2	1:4	1:6	1:10
<b>Bant I</b>	pDNA-Escort <sup>TM</sup> II				pDNA-FVI				pDNA			pDNA-FVI <sub>O</sub>				pDNA-FVI <sub>L</sub>					
<b>Bant II</b>	pDNA-Escort <sup>TM</sup> II				pDNA-GI				pDNA			pDNA-GI <sub>O</sub>				pDNA-GI <sub>L</sub>					
<b>Bant III</b>	pDNA-Escort <sup>TM</sup> II				pDNA-CI				pDNA			pDNA-CI <sub>O</sub>				pDNA-CI <sub>L</sub>					



Şekil 31. Escort<sup>TM</sup>II Ürününün ve FVI, GI, CI KLN'lerinin pDNA ile Oluşturdukları Komplekslerin Jel Görüntüleri

#### 4.1.4.1.8. KLN'lerin zeta potansiyellerin belirlenmesine ait bulgular

Süzülmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş FVI, GI ve CI formülasyonlarından alınan 30 µL'lik örnekler, pH 7.4 (NaOH ile ayarlanmış) ve 50 µS (NaCl ile ayarlanmış) 1 mL distile su içinde dağıtıldıktan sonra zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Zeta potansiyel değerleri Çizelge 16'da verilmiştir.

Çizelge 16. Süzülmüş, Otoklavlanmış ve Liyofilize FVI, GI ve CI KLN'lerinin Zeta Potansiyel Değerleri (mV)

Formülasyon Kodu	FVI	FVI <sub>0</sub>	FVI <sub>L</sub>	GI	GI <sub>0</sub>	GI <sub>L</sub>	CI	CI <sub>0</sub>	CI <sub>L</sub>
Zeta Potansiyel	48.90	48.15	49.10	58.17	56.90	59.38	35.91	34.61	28.90
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Standart Hata	0.63	0.33	0.17	0.38	0.46	0.60	0.49	0.19	0.27

n=3

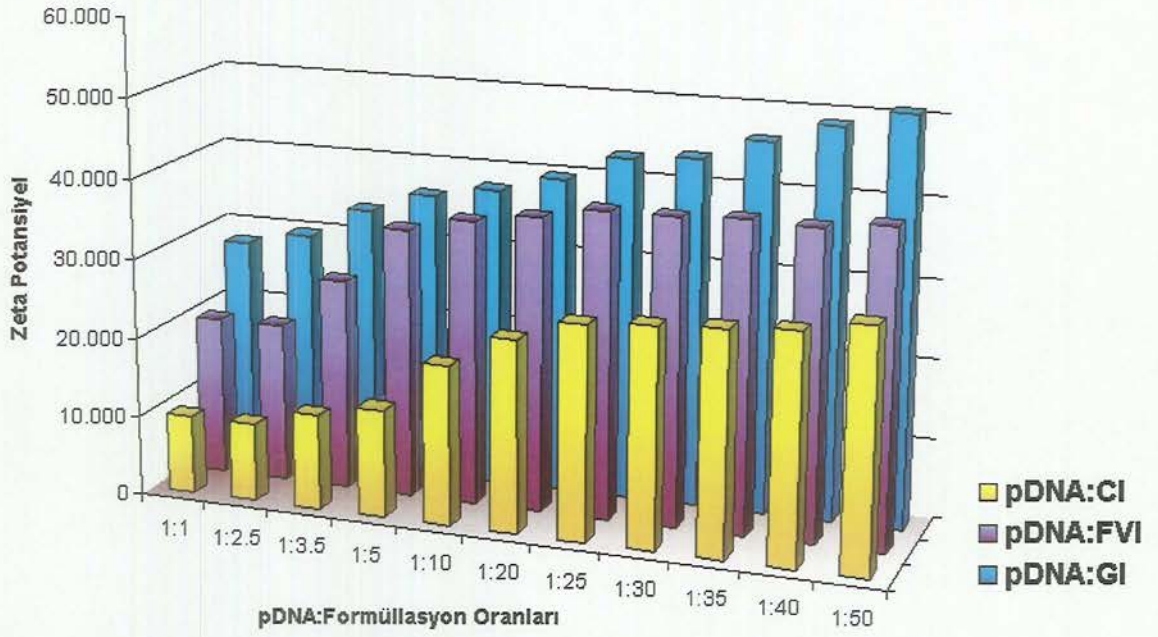
#### 4.1.4.1.9. pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyellerine ait bulgular

pDNA-formülasyon oranları ve zeta potansiyel değerleri Çizelge 17 ve grafiği Şekil 32'de verilmiştir.

Çizelge 17. pDNA- KLN Komplekslerinin Zeta Potansiyel Değerleri (mV)

KLN Kodları	pDNA-KLN Oranları (a/a)											Zeta Potansiyel ± SH
	1:1	1:2.5	1:3.5	1:5	1:10	1:20	1:25	1:30	1:35	1:40	1:50	
FVI	19.97 ± 0.20	20.06 ± 0.32	26.60 ± 0.36	33.90 ± 0.10	35.72 ± 0.31	36.94 ± 0.27	38.45 ± 0.32	38.50 ± 0.63	38.94 ± 0.25	38.71 ± 0.11	39.57 ± 0.23	
GI	27.91 ± 0.42	29.61 ± 0.52	33.62 ± 0.27	36.23 ± 0.11	37.68 ± 0.19	39.69 ± 0.51	42.99 ± 0.30	43.60 ± 0.07	46.37 ± 0.13	48.86 ± 0.28	50.94 ± 0.21	
CI	9.83 ± 0.23	9.86 ± 0.02	11.98 ± 0.14	13.63 ± 0.20	20.08 ± 0.19	24.21 ± 0.20	26.98 ± 0.20	27.55 ± 0.11	28.14 ± 0.01	28.68 ± 0.22	30.21 ± 0.52	

n=3; SH : Standart Hata



Şekil 32. pDNA- KLN Komplekslerinin Zeta Potansiyel Grafiği

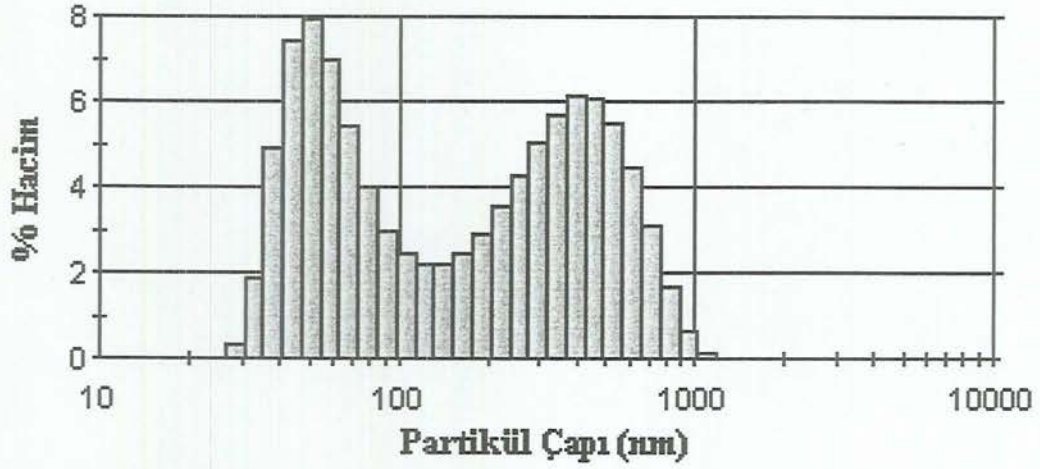
#### 4.1.4.1.10. KLN'lerin partikül boyutları ve dağılımları

FVI, GI ve CI KLN'lerinin partikül boyutu ve dağılım değerleri Çizelge 18'de ve partikül dağılım grafikleri de Şekil 33-35'de gösterilmiştir.

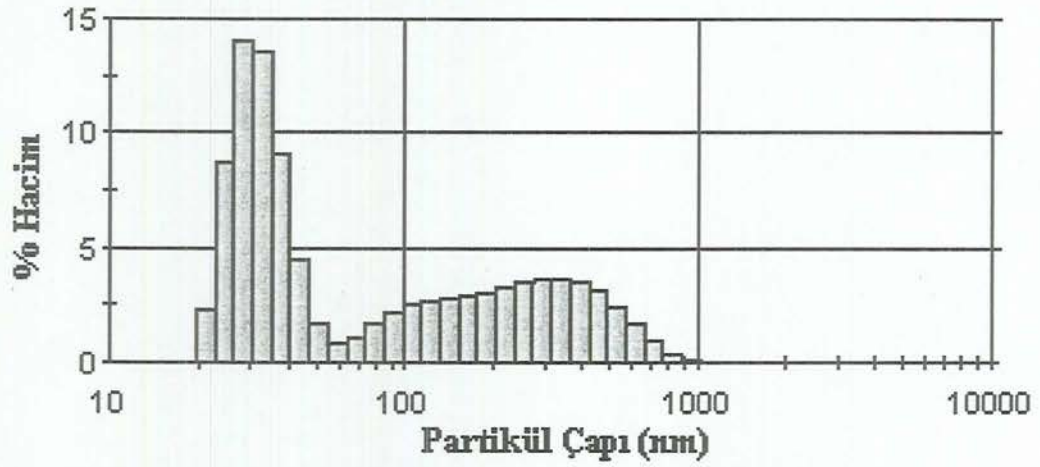
Çizelge 18. Süzülmüş, Otoklavlanmış ve Liyofilize Edilmiş FVI, GI ve CI KLN'lerinin Partikül Boyutları ve Dağılım Değerleri

	FVI	FVI <sub>o</sub>	FVI <sub>L</sub>	GI	GI <sub>o</sub>	GI <sub>L</sub>	CI	CI <sub>o</sub>	CI <sub>L</sub>
<b>Ortalama</b>									
<b>Büyüklik (nm)</b>	180.30	176.90	680.20	166.80	185.30	664.20	297.20	218.00	614.70
<b>PI</b>	0.30	0.29	0.73	0.26	0.36	0.60	0.48	0.37	1.00

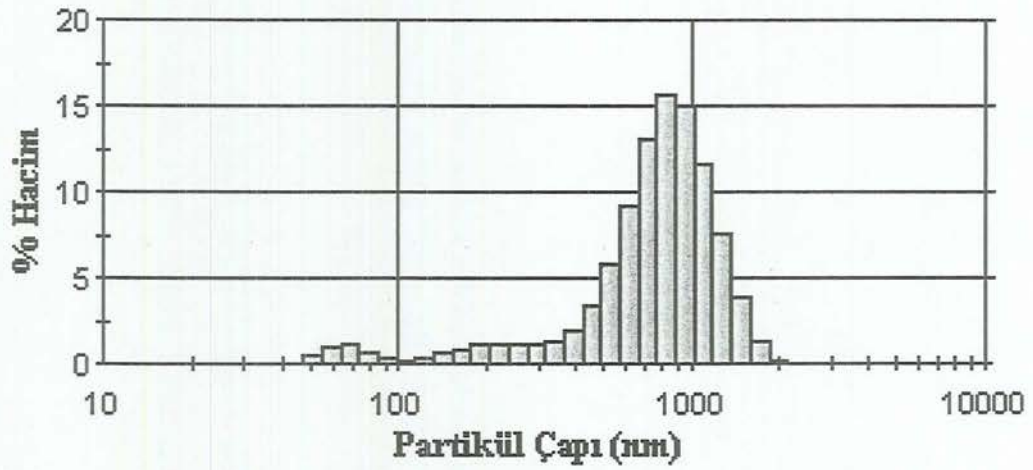
n=3; PI: Polidisperslik İndisi



A

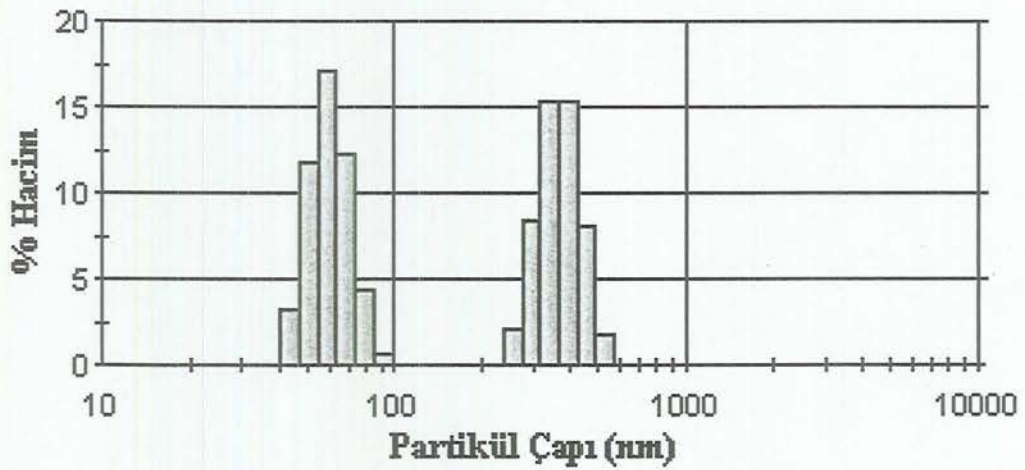
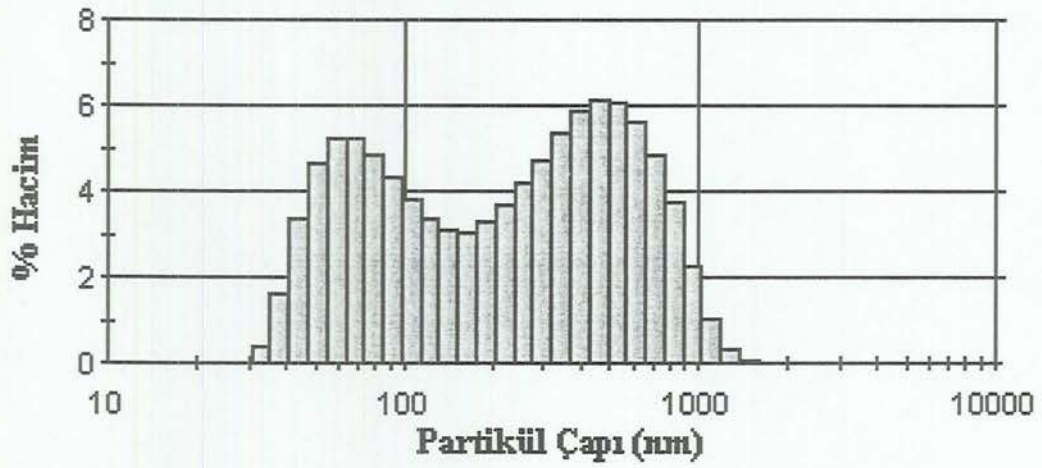
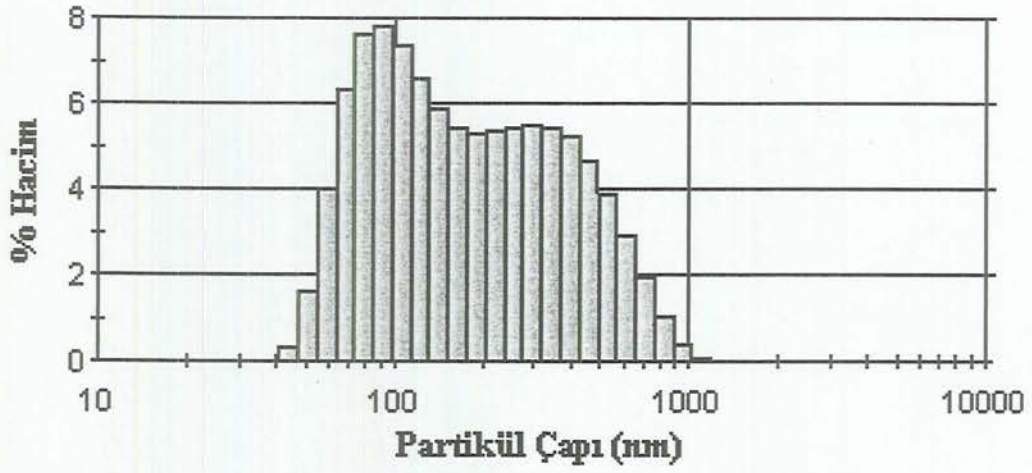


B



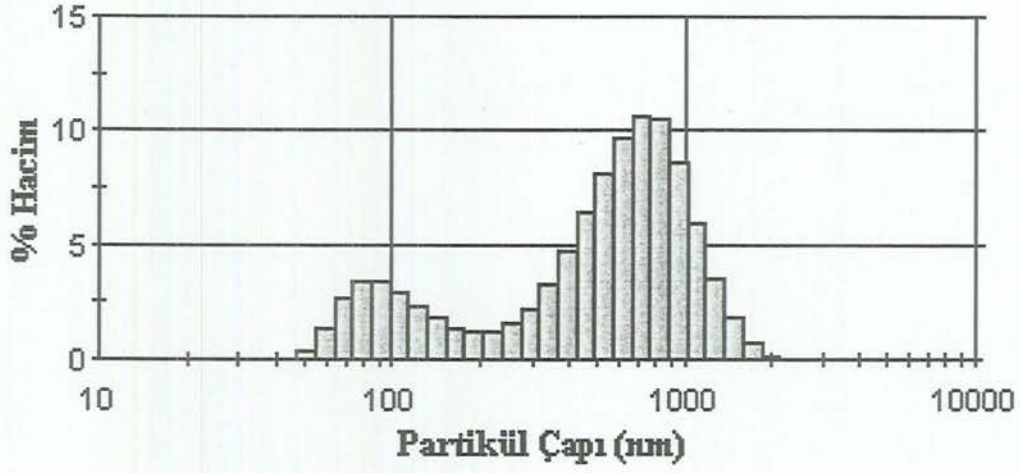
C

Şekil 33. Süzölmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) FVI KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri

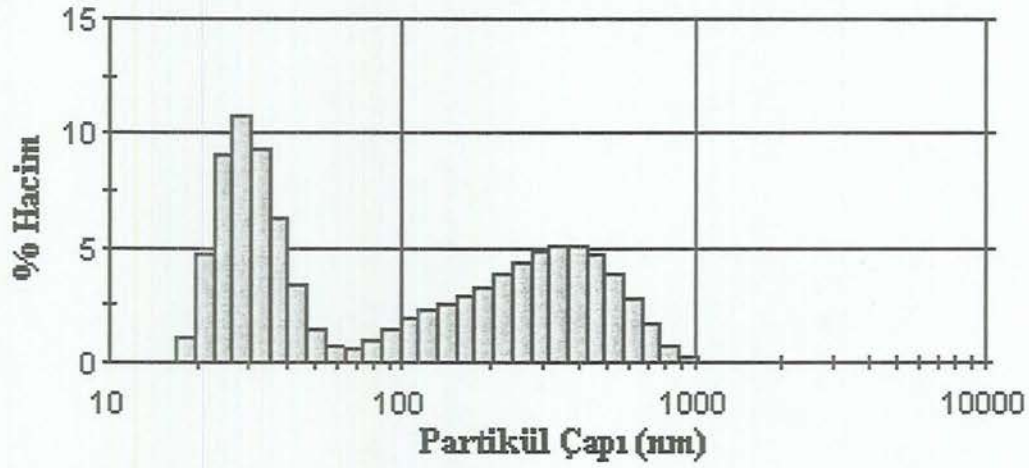


Şekil 34. Süzölmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) GI KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri

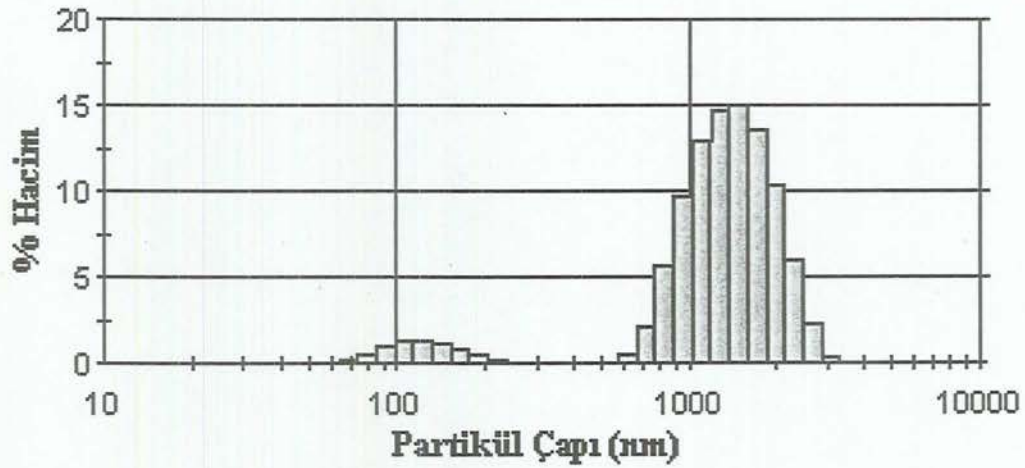




A



B



C

Şekil 35. Süzölmüş (A), Otoklavlanmış (B) ve Liyofilize Edilmiş (C) CI KLN'lerinin Partikül Boyutu Dağılım Grafikleri

#### **4.1.4.1.11. KLN'lerin saklama koşullarında kararlılık kontrollerine ait bulgular**

##### **4.1.4.1.11.1. Termal analizleri**

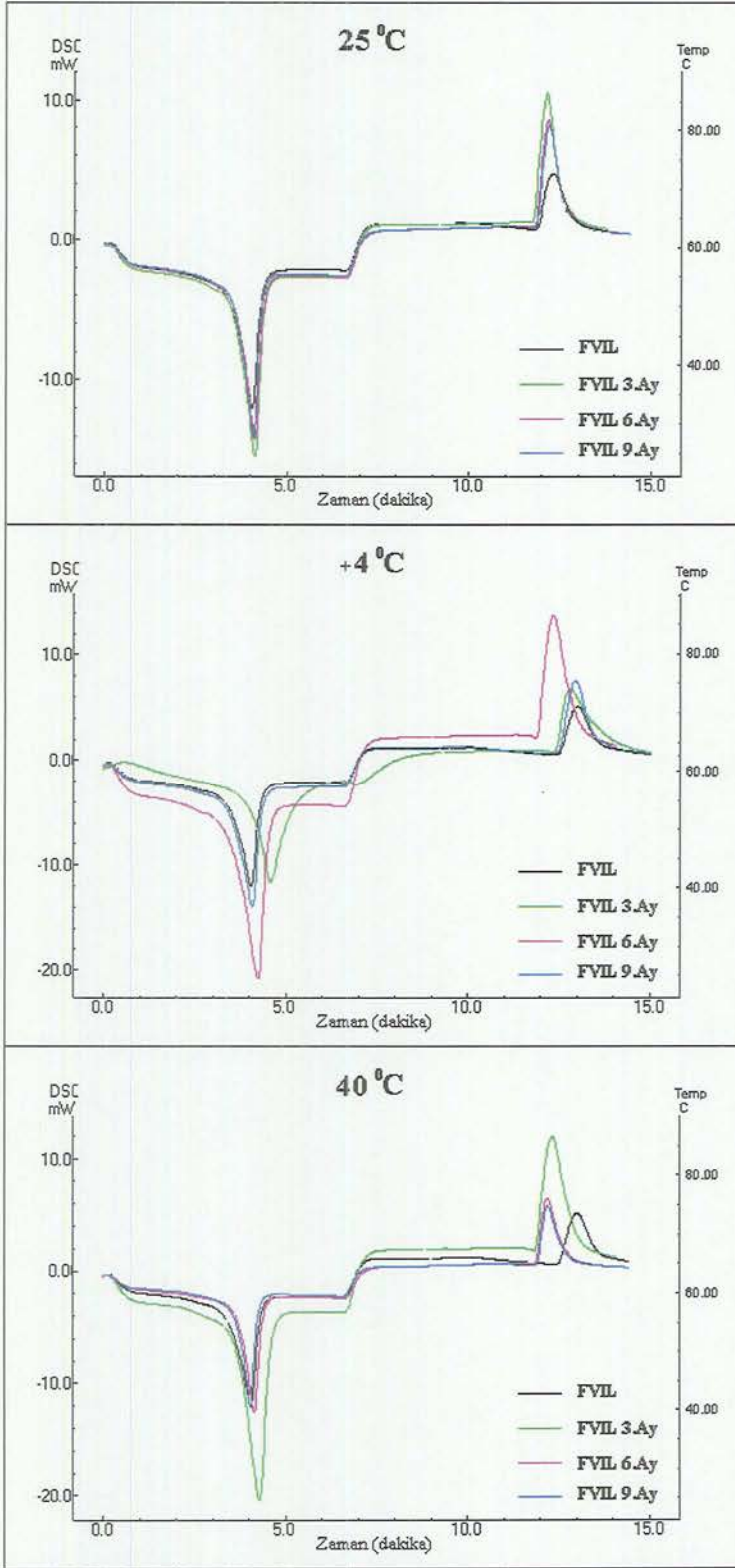
Süzülerek, otoklavlanarak ve liyofilize edilerek renkli ampüllere doldurulan formülasyonların, buzdolabı ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), oda sıcaklığı ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) ve etüvde ( $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) saklanmaları sırasında, 1, 3, 6 ve 9 aylık sürelerin sonunda, termal analizleri, zeta potansiyelleri ve partikül boyutları elde edilmiştir. Zeta potansiyel değerleri ve partikül boyutlarının ölçüm sonuçları SPSS programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Hazırlanan KLN'lerin (FVI, GI ve CI) erime dereceleri ve lipitlerin 1 g'ının erimesi için gerekli olan enerjiler ile, soğutmada tekrar kristallenme noktaları ve 1 g'ının tekrar kristalizasyonu için kaybetmesi gereken enerjiler **Çizelge 19**'da verilmiştir.

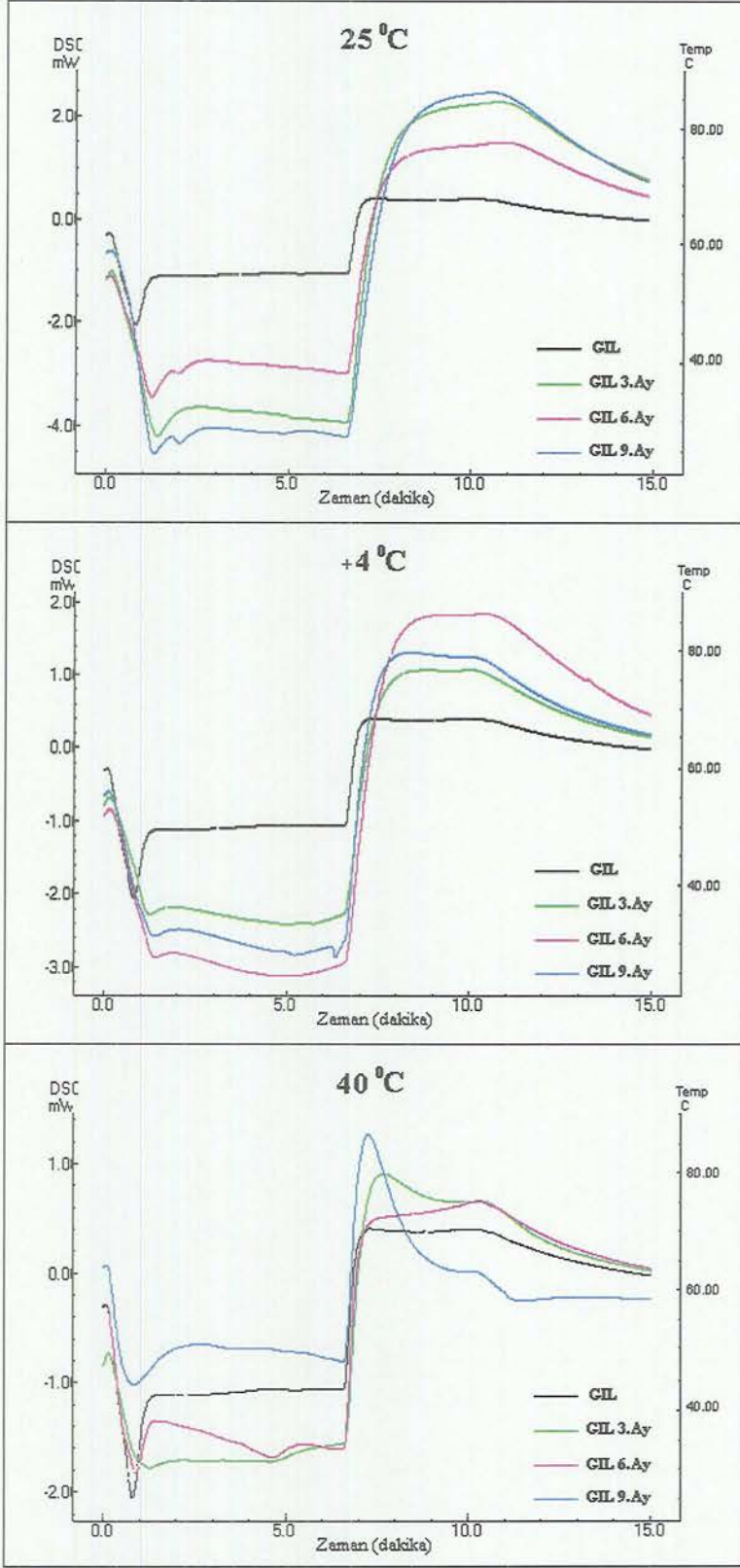
Tekrar sulandırılmadan termal analiz yapılan ve belirgin pik veren liyofilize haldeki FVI, GI ve CI KLN'lerine ait termal analiz termogramları **Şekil 36-38**'de gösterilmiştir.

Çizelge 19. FVI, GI ve CI Formülasyonlarına Ait Termal Analiz Sonuçları

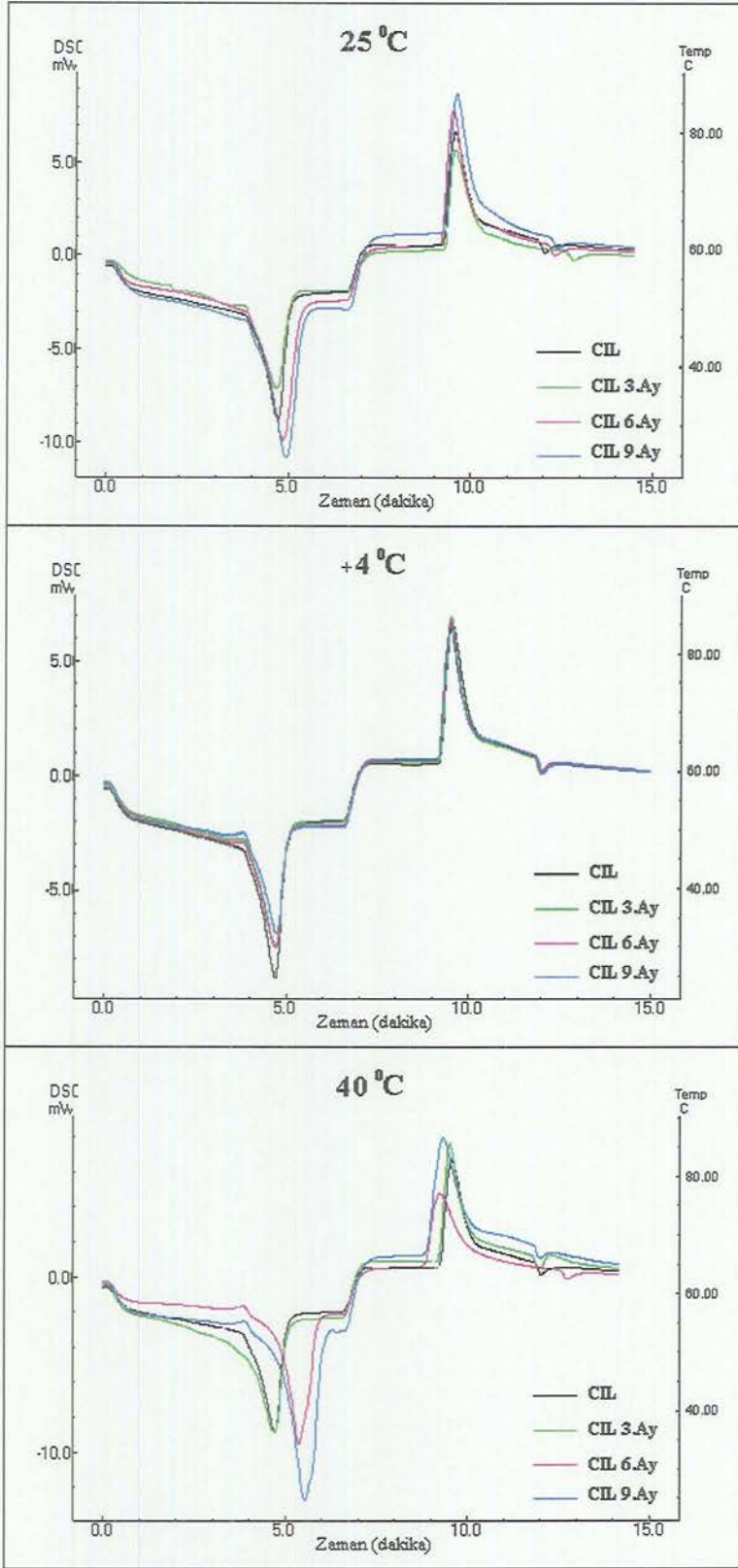
Zaman			1.gün				3.Ay				6.Ay				9.Ay				
İşlem			Isıtma		Soğutma		Isıtma		Soğutma		Isıtma		Soğutma		Isıtma		Soğutma		
			Erime Noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Rekristalizasyon noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Erime Noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Rekristalizasyon noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Erime Noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Rekristalizasyon noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Erime Noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	Rekristalizasyon noktası (°C)	Enerji (joule.g <sup>-1</sup> )	
Formülasyon Kodu	ODA	FVI	59.35	24.30	50.90	-191.62	64.93	30.82	44.72	-167.54	61.37	46.95	56.65	-215.52	60.60	42.85	55.99	-187.77	
		FVI <sub>o</sub>	58.91	26.55	53.48	-239.24	59.86	51.88	51.08	-219.62	59.56	33.63	42.21	-21.60	61.46	33.87	59.50	-174.71	
		FVI <sub>L</sub>	60.72	90.88	37.66	-45.02	60.64	90.15	37.09	-50.93	60.72	102.28	37.10	-53.15	60.63	92.87	37.55	-52.13	
	ETÜV	FVI	59.35	24.30	50.90	-191.62	60.55	15.24	46.24	154.66	60.77	42.39	59.99	-29.49	57.82	41.12	51.69	-149.54	
		FVI <sub>o</sub>	58.91	26.55	53.48	-239.24	60.33	33.54	52.73	-164.61	60.94	361.07	57.53	-279.93	61.59	292.10	57.10	-1.31	
		FVI <sub>L</sub>	60.72	90.88	37.66	-45.02	62.43	88.34	36.20	-53.89	61.15	90.84	37.03	-50.24	60.37	64.49	37.72	-38.11	
	BUZ DOLABI	FVI	59.35	24.30	50.90	-191.62	60.32	374.35	61.53	-1.30	59.7	330.41	59.76	-1.61	60.14	203.35	54.20	-1.41	
		FVI <sub>o</sub>	58.91	26.55	53.48	-239.24	59.44	43.30	56.90	-24.49	60.75	260.57	45.64	-167.57	60.09	297.50	58.67	-1.32	
		FVI <sub>L</sub>	60.72	90.88	37.66	-45.02	62.75	155.30	36.36	-71.58	61.11	85.37	36.38	-50.96	60.94	94.54	37.51	-55.05	
Formülasyon Kodu	ODA	GI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		G <sub>o</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GI <sub>L</sub>	30.18	25.79	54.98	-4.23	33.14	6.67	52.34	-77.89	31.67	11.75	50.93	-51.23	32.44	3.25	53.90	-57.74	
	ETÜV	GI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		G <sub>o</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GI <sub>L</sub>	30.18	25.79	54.98	-4.23	32.13	25.26	-	-	31.20	7.59	53.47	-9.07	29.03	11.38	-	-	
	BUZ DOLABI	GI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		G <sub>o</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		GI <sub>L</sub>	30.18	25.79	54.98	-4.23	32.25	9.02	58.88	-12.52	33.37	1.04	55.18	-55.14	33.44	7.11	-	-	
Formülasyon Kodu	ODA	CI	68.77	616.49	47.15	-188.60	-	-	-	-	73.86	26.44	51.64	-188.40	75.14	34.14	47.10	-150.57	
		C <sub>o</sub>	68.33	22.37	49.37	-19.45	72.96	37.99	51.52	-169.20	-	-	-	-	71.64	34.63	48.65	-148.13	
		CI <sub>L</sub>	67.29	91.95	60.79	-55.84	67.44	109.47	61.11	-56.25	68.60	118.26	61.76	-58.57	69.36	149.15	61.16	-69.77	
	ETÜV	CI	68.77	616.49	47.15	-188.60	73.74	42.07	50.60	-164.88	75.46	34.82	47.55	-162.65	75.39	27.58	48.44	-136.47	
		C <sub>o</sub>	68.33	22.37	49.37	-19.45	71.30	67.32	61.17	-255.41	71.72	39.21	47.37	-155.14	72.16	35.88	47.27	-134.70	
		CI <sub>L</sub>	67.29	91.95	60.79	-55.84	67.05	122.38	61.42	-48.50	73.63	111.63	64.41	-56.28	74.54	83.00	65.62	-62.19	
	BUZ DOLABI	CI	68.77	616.49	47.15	-188.60	72.32	36.26	48.94	-140.25	71.79	34.99	48.99	-134.21	71.31	59.96	50.39	-232.68	
		C <sub>o</sub>	68.33	22.37	49.37	-19.45	73.85	29.31	48.44	-128.21	73.87	33.09	51.29	-166.63	-	-	-	-	
		CI <sub>L</sub>	67.29	91.95	60.79	-55.84	67.28	61.76	61.33	-28.77	67.26	126.80	61.43	-59.14	67.65	110.82	61.42	57.25	



Şekil 36. Liyofilize FVI Formülasyonunun 25°C'de (A), 4°C'de (B) ve 40°C'de (C) Aylara Göre Termogramları



Şekil 37. Liyofilize GI Formülasyonunun 25°C'de (A), 4°C'de (B) ve 40°C'de (C) Aylara Göre Termogramları



Şekil 38. Liyofilize CI Formülasyonunun 25°C'de (A), 4°C'de (B) ve 40°C'de (C) Aylara Göre Termogramları

#### 4.1.4.1.11.2. Zeta potansiyelleri

FIII, FIV ve FV ön formülasyonlarının ve FVI, GI ve CI KLN'lerin aylara göre belirlenen ortalama zeta potansiyel değerleri Çizelge 20-21'de verilmiştir.

Çizelge 20. FIII ve FIV ve FV KLN'lerin Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Zeta Potansiyel Değerleri ve Standart Hataları

		0. Ay		3. Ay		6. Ay		9. Ay	
		Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH
25°C	FIII	38.353	0.122	27.780	0.553	14.540	0.472	6.105	0.128
	FIII <sub>O</sub>	36.693	0.029	21.070	0.406	12.517	0.207	5.540	0.245
	FIII <sub>L</sub>	28.890	0.095	15.793	0.162	8.360	0.921	-26.293	0.317
40°C	FIII	38.353	0.122	33.453	0.306	18.360	0.236	11.617	0.265
	FIII <sub>O</sub>	36.693	0.029	28.267	0.217	17.850	0.285	5.386	0.013
	FIII <sub>L</sub>	28.890	0.095	16.760	0.202	14.630	0.098	4.990	0.123
4°C	FIII	38.353	0.122	28.927	0.224	17.567	0.198	13.970	0.224
	FIII <sub>O</sub>	36.693	0.029	13.290	0.127	14.380	0.148	11.920	0.278
	FIII <sub>L</sub>	28.890	0.095	11.467	0.033	22.353	0.098	13.130	0.312
25°C	FIV	33.730	0.136	21.800	0.183	19.640	0.407	19.530	0.098
	FIV <sub>O</sub>	32.087	0.268	23.080	0.427	19.700	0.407	9.763	0.078
	FIV <sub>L</sub>	22.450	0.095	20.773	0.156	10.370	0.440	4.320	0.149
40°C	FIV	33.730	0.092	22.110	0.167	19.320	0.398	12.300	0.265
	FIV <sub>O</sub>	32.087	0.932	20.370	0.251	10.980	0.407	8.800	0.121
	FIV <sub>L</sub>	22.450	0.342	10.113	0.125	10.970	0.431	5.605	0.098
4°C	FIV	33.730	0.092	25.687	0.163	22.300	0.321	18.200	0.241
	FIV <sub>O</sub>	32.087	0.932	27.613	0.310	21.940	0.345	13.200	0.312
	FIV <sub>L</sub>	22.450	0.342	21.823	0.263	20.520	0.232	12.800	0.210
25°C	FV	41.847	0.511	41.647	0.020	29.000	0.150	16.760	0.219
	FV <sub>O</sub>	39.967	0.269	29.010	0.501	22.657	0.341	14.630	0.092
	FV <sub>L</sub>	42.830	0.264	26.360	0.320	22.987	0.607	5.150	0.214
40°C	FV	41.847	0.511	38.840	0.462	28.100	0.275	17.850	0.265
	FV <sub>O</sub>	39.967	0.269	39.400	0.398	27.700	0.387	13.970	0.241
	FV <sub>L</sub>	42.830	0.264	28.920	0.128	12.210	0.198	5.996	0.312
4°C	FV	41.847	0.511	32.225	0.485	23.140	0.335	18.360	0.452
	FV <sub>O</sub>	39.967	0.269	39.553	0.322	27.360	0.259	14.540	0.265
	FV <sub>L</sub>	42.830	0.264	30.143	0.218	23.420	0.423	5.700	0.321

n=3; SH: Standart Hata

**Çizelge 21. FVI ve GI ve CI Formülasyonlarının Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Zeta Potansiyel Değerleri ve Standart Hataları**

		0. Ay		3. Ay		6. Ay		9. Ay		12. Ay	
		Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH	Zeta Potansiyel	SH
25°C	FVI	48.900	0.630	47.510	0.404	39.390	0.630	28.920	0.263	21.697	0.421
	FVI <sub>0</sub>	48.150	0.332	47.757	0.217	45.417	0.276	28.100	0.176	26.040	0.121
	FVI <sub>L</sub>	49.100	0.174	39.803	0.457	32.333	0.547	28.100	0.176	21.147	0.393
40°C	FVI	48.900	0.63	46.800	0.682	43.753	0.679	34.383	0.030	26.117	0.545
	FVI <sub>0</sub>	48.150	0.332	34.640	0.651	42.993	0.286	33.910	0.383	32.530	0.219
	FVI <sub>L</sub>	49.100	0.174	39.630	0.738	38.320	0.070	31.487	0.491	21.480	0.356
4°C	FVI	48.900	0.630	47.630	0.411	37.167	0.638	39.680	0.231	35.167	0.792
	FVI <sub>0</sub>	48.150	0.332	49.060	0.425	36.260	0.357	34.335	0.331	34.357	0.577
	FVI <sub>L</sub>	49.100	0.174	43.777	0.398	39.540	0.530	38.520	0.153	31.100	0.533
25°C	GI	58.167	0.379	50.753	0.426	47.510	0.404	28.920	0.263	21.697	0.421
	GI <sub>0</sub>	56.900	0.461	50.190	0.217	45.417	0.276	26.040	0.121	28.100	0.176
	GI <sub>L</sub>	59.380	0.604	53.490	0.433	45.910	0.363	32.333	0.547	21.147	0.393
40°C	GI	58.167	0.379	52.630	0.490	46.800	0.679	21.263	0.534	26.117	0.545
	GI <sub>0</sub>	56.900	0.461	52.717	0.107	42.993	0.286	33.910	0.383	32.530	0.219
	GI <sub>L</sub>	59.380	0.604	53.817	0.203	39.540	0.070	41.263	0.534	38.520	0.491
4°C	GI	58.167	0.379	48.323	0.638	47.630	0.411	39.680	0.231	42.120	0.792
	GI <sub>0</sub>	56.900	0.461	52.150	0.357	48.790	0.722	49.060	0.425	46.120	0.577
	GI <sub>L</sub>	59.380	0.604	46.950	0.398	45.720	0.417	38.320	0.530	31.487	0.153
25°C	CI	35.910	0.489	33.233	0.284	22.353	0.921	22.450	0.095	-	-
	CI <sub>0</sub>	34.617	0.192	33.570	0.777	33.057	0.568	26.923	0.073	-	-
	CI <sub>L</sub>	28.900	0.272	28.530	0.669	19.640	0.236	12.740	0.365	-	-
40°C	CI	35.910	0.489	32.127	0.390	23.467	0.110	20.773	0.202	-	-
	CI <sub>0</sub>	34.617	0.192	32.087	0.690	27.500	0.358	22.150	0.345	-	-
	CI <sub>L</sub>	28.900	0.272	28.830	0.148	17.767	0.800	9.789	0.533	-	-
4°C	CI	35.910	0.489	35.373	0.118	29.400	0.280	22.120	35.910	-	-
	CI <sub>0</sub>	34.617	0.192	33.673	0.192	27.447	0.296	20.533	34.617	-	-
	CI <sub>L</sub>	28.900	0.272	25.167	0.712	18.658	0.583	13.903	28.900	-	-

n=3; SH: Standart Hata



#### 4.1.4.1.11.3. Partikül boyutu ve dağılımları

FIII, FIV ve FV ön formülasyonlarının ve FVI, GI ve CI KLN'lerin aylara göre belirlenen partikül boyutları ve Polidisperslik indisi değerleri Çizelge 22 ve Çizelge 23'de verilmiştir.

Çizelge 22. FIII ve FIV ve FV Formülasyonlarının Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Partikül Boyutları ve Dağılım Değerleri

		0. Ay		3. Ay		6. Ay		9. Ay	
		Ortalama Büyüklik	PI	Ortalama Büyüklik	PI	Ortalama Büyüklik	PI	Ortalama Büyüklik	PI
25°C	FIII	113.80	0.21	293.20	0.81	154.40	0.28	158.80	0.28
	FIII <sub>O</sub>	139.80	0.27	162.80	0.28	155.00	0.27	199.00	0.31
	FIII <sub>L</sub>	351.90	0.41	630.90	0.70	412.00	0.25	696.10	0.45
40°C	FIII	113.80	0.21	174.30	0.39	156.70	0.28	185.80	0.26
	FIII <sub>O</sub>	139.80	0.27	167.20	0.38	157.90	0.29	200.00	0.14
	FIII <sub>L</sub>	351.90	0.41	814.50	0.07	837.30	0.80	744.20	0.44
4°C	FIII	113.80	0.21	151.90	0.29	149.40	0.36	157.60	0.12
	FIII <sub>O</sub>	139.80	0.27	156.70	0.27	163.70	0.34	187.40	0.27
	FIII <sub>L</sub>	351.90	0.41	617.50	0.60	573.40	0.44	445.30	0.42
25°C	FIV	153.30	0.25	219.90	0.47	166.00	0.29	159.30	0.32
	FIV <sub>O</sub>	166.00	0.29	178.30	0.38	161.90	0.28	165.90	0.28
	FIV <sub>L</sub>	525.10	0.52	1053.00	0.95	522.20	0.30	672.20	0.85
40°C	FIV	153.30	0.25	169.30	0.27	156.00	0.27	225.80	0.25
	FIV <sub>O</sub>	166.00	0.29	165.90	0.28	157.20	0.28	186.40	0.27
	FIV <sub>L</sub>	525.10	0.52	619.40	0.39	796.00	0.57	713.20	0.44
4°C	FIV	153.30	0.25	171.10	0.30	176.90	0.30	185.60	0.26
	FIV <sub>O</sub>	166.00	0.29	173.10	0.30	169.40	0.37	169.80	0.24
	FIV <sub>L</sub>	525.10	0.52	639.60	0.65	643.00	0.48	788.20	0.54
25°C	FV	138.20	0.26	174.10	0.28	167.30	0.28	215.30	0.26
	FV <sub>O</sub>	178.40	0.29	170.30	0.28	172.60	0.27	182.20	0.26
	FV <sub>L</sub>	629.70	0.47	447.00	0.92	528.80	0.17	532.70	0.21
40°C	FV	138.20	0.26	176.60	0.27	170.40	0.29	195.80	0.30
	FV <sub>O</sub>	178.40	0.29	253.90	0.43	189.80	0.36	192.40	0.29
	FV <sub>L</sub>	629.70	0.47	886.20	0.46	863.80	0.62	754.90	0.52
4°C	FV	138.20	0.26	190.20	0.42	180.70	0.38	156.30	0.34
	FV <sub>O</sub>	178.40	0.29	248.40	0.47	184.40	0.40	213.50	0.33
	FV <sub>L</sub>	629.70	0.47	646.50	0.25	704.70	0.61	568.40	0.69

n=3; PI : Polidisperslik İndisi

**Çizelge 23. FVI ve GI ve CI Formülasyonlarının Farklı Ortamlarda Aylara Göre Ortalama Partikül Boyutları ve Dağılım Değerleri**

		0. Ay		3. Ay		6. Ay		9. Ay		12. Ay	
		Ortalama	PI	Ortalama	PI	Ortalama	PI	Ortalama	PI	Ortalama	PI
		Büyüklik		Büyüklik		Büyüklik		Büyüklik		Büyüklik	
25°C	FVI	180.30	0.30	175.00	0.27	172.60	0.27	176.20	0.28	170.70	0.31
	FVI <sub>0</sub>	176.90	0.29	174.40	0.34	220.00	0.44	172.60	0.33	161.20	0.35
	FVI <sub>L</sub>	680.20	0.73	1165.00	0.73	707.00	0.50	10620	0.79	783.00	0.50
0											
40°C	FVI	180.30	0.30	177.70	0.38	169.60	0.28	232.10	0.41	199.60	0.40
	FVI <sub>0</sub>	176.90	0.29	211.80	0.47	167.50	0.27	173.90	0.28	224.40	0.42
	FVI <sub>L</sub>	680.20	0.73	956.30	0.49	707.00	0.50	656.00	0.19	596.80	0.29
4°C	FVI	180.30	0.30	182.30	0.29	183.10	0.36	172.80	0.29	188.80	0.31
	FVI <sub>0</sub>	176.90	0.29	182.10	0.29	185.20	0.34	210.00	0.43	182.60	0.36
	FVI <sub>L</sub>	680.20	0.73	1141.00	0.82	774.20	0.66	608.70	0.52	580.70	0.61
25°C	GI	166.80	0.26	120.70	0.22	120.40	0.23	112.20	0.33	116.10	0.25
	GI <sub>0</sub>	185.30	0.36	123.40	0.24	123.40	0.24	107.70	0.24	110.80	0.24
	GI <sub>L</sub>	664.20	0.60	342.00	0.52	446.10	0.48	218.00	0.44	177.30	0.34
40°C	GI	166.80	0.26	117.10	0.19	124.50	0.23	109.00	0.22	112.10	0.24
	GI <sub>0</sub>	185.30	0.36	119.60	0.23	119.60	0.23	108.00	0.23	112.70	0.26
	GI <sub>L</sub>	664.20	0.60	446.10	0.45	289.30	0.61	265.20	0.39	265.80	0.35
4°C	GI	166.80	0.26	121.00	0.23	121.10	0.24	110.80	0.25	111.20	0.31
	GI <sub>0</sub>	185.30	0.36	191.50	0.39	120.70	0.22	112.20	0.23	130.00	0.34
	GI <sub>L</sub>	664.20	0.60	457.90	0.57	364.10	0.47	320.00	0.57	306.60	0.51
25°C	CI	297.20	0.48	184.90	0.39	185.90	0.40	184.30	0.42	-	-
	CI <sub>0</sub>	218.00	0.37	192.50	0.32	189.20	0.32	183.70	0.32	-	-
	CI <sub>L</sub>	614.70	1.00	1767.00	1.00	519.70	0.59	521.30	0.64	-	-
40°C	CI	297.20	0.48	177.90	0.31	166.90	0.30	159.80	0.30	-	-
	CI <sub>0</sub>	218.00	0.37	177.00	0.28	162.30	0.35	160.70	0.31	-	-
	CI <sub>L</sub>	614.70	1.00	563.40	0.73	1837.00	1.00	941.60	1.00		
4°C	CI	297.20	0.48	184.90	0.39	185.90	0.40	184.30	0.42	-	-
	CI <sub>0</sub>	218.00	0.37	192.50	0.32	189.20	0.32	183.70	0.32	-	-
	CI <sub>L</sub>	614.70	1.00	1767.00	1.00	519.70	0.59	521.30	0.64	-	-

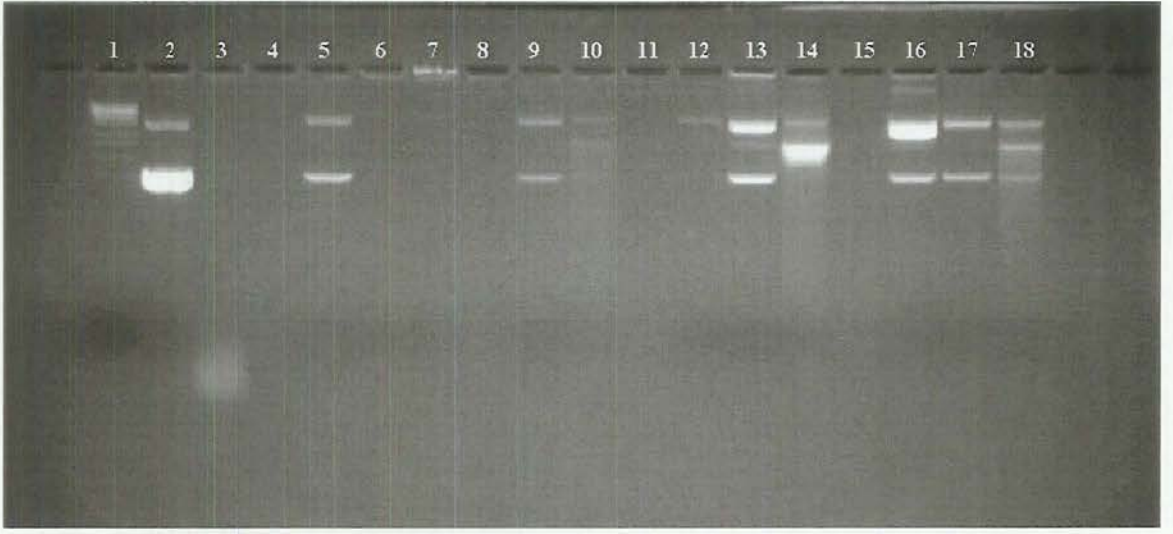
n=3; PI : Polidisperslik İndisi

**4.1.4.1.12. pDNA-KLN komplekslerinin DNaz I enzimi ortamında kararlılığına ait bulgular**

pDNA, pDNA-KLN kompleksleri ve DNaz I enziminin miktarları Çizelge 24’de ve jel görüntüleri Şekil 39’da verilmiştir.

**Çizelge 24. pDNA, pDNA-KLN Komplekslerinin ve DNaz I Enziminin Miktarları, Uygulama Hatları ve Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemi**

	Uygulanan Örnek	Miktar	Ekstraksiyon Yöntemi	
Uygulama Hatları	1	DNA Marker	10 µL	-
	2	pDNA	4 µg	-
	3	pDNA + DNaz I	4 µg + 4 Ü	-
	4	-	-	-
	5	pDNA	4 µg	I
	6	pDNA-Escort™II	4 µg:16 µg	I
	7	pDNA-Escort™II + DNazI	4 µg:16 µg + 4 Ü	I
	8	-	-	-
	9	pDNA-FVI	4 µg:40 µg	I
	10	pDNA-FVI + DNaz I	4 µg:40 µg + 4 Ü	I
	11	-	-	-
	12	pDNA	4 µg	II
	13	pDNA-GI	4 µg:40 µg	II
	14	pDNA-GI + DNaz I	4 µg:40 µg + 4 Ü	II
	15	-	-	-
	16	pDNA	4 µg	III
	17	pDNA-CI	4 µg:40 µg	III
	18	pDNA-CI + DNaz I	4 µg:40 µg + 4 Ü	III



**Şekil 39. pDNA ve pDNA-Formülasyon Komplekslerinin DNaz I Enzimi Varlığındaki Kararlılığının Jel Görüntüsü**

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. TARTIŞMA

#### 5.1.1. Çalışılan Maddelerle Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler

##### 5.1.1.1. Katyonik Lipit DOTAP® Üzerinde Yapılan Analizlere Ait Değerlendirmeler

X-ışını kırınımı, kristal yapılardaki atomların yerleşimleri ve kristal tabakaları arasındaki uzaklığın belirlenmesinde önemli bir kimyasal analiz yöntemidir. Bu yöntem, metallerin, polimer maddelerin ve diğer katıların fiziksel özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına imkan tanır (138). Yapılan X-ışını kırınım analizi sonucunda DOTAP®'ın amorf yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 13).

DOTAP®'ın yapısında sıcaklığın etkisi, DSC termal analiz yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen termogramlarda, pik altında kalan alan, tepkimede emilen veya açığa çıkan ısı ile, pik yükseklikleri ise tepkime hızı ile doğru orantılıdır. Piklerin integrali, örnek maddesinin aldığı veya verdiği ısı miktarına eşittir (139).

DOTAP®'la yapılan DSC termal analizinde çok küçük pik elde edilmiştir (Şekil 11). 43.92°C'deki pik endotermik erime geçişine, 31.37°C'ye ait pik ise ekzotermik kristallenmeye aittir. Termogramda erime pikinden sonra gözlenen hareketlenme maddenin ısı ile bozunduğunun göstergesidir (139). Bu nedenle, formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonra yapılan DSC analizlerinde DOTAP®'ın belirgin piklerinin elde edilemediği düşünülmektedir. Ayrıca, termal analiz yöntemi, DOTAP®'ın kullanılan matrisler içerisindeki davranışını (Şekil 12) belirlemede yardımcı olmuştur. KLN'lerinin hazırlanması sırasında kullanılan DOTAP® ve lipit matrisler, formülasyonlarda yer alan oranlarda (% 4 lipit matris, % 0.35 DOTAP®) karıştırıldıktan sonra, formülasyon hazırlama sıcaklığına (73°C, 45°C ve 85°C) ısıtılmıştır ve soğutulmuştur. Daha sonra, formülasyonlara DSC analizi sırasında uygulanan 25°C'den 90°C'ye ısıtılarak soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlarda, DOTAP® ve Dynasan®116'ın erime derecesi 67.01°C, DOTAP® ve Gelucire® 33/01'in 38.36°C, DOTAP® ve Compritol® ATO 888'in ise 73.66°C ve bu karışımların 1 gramının erimesi için gerekli enerjiler,

sırasıyla, 225.34 joule.g<sup>-1</sup>, 14.59 joule.g<sup>-1</sup> ve 176.71 joule.g<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır; soğutmadaki kristallenme noktalarının, sırasıyla, 36.15°C, 46.82°C ve 59.82°C ve 1 gramının tekrar kristallenmesi için kaybedilmesi gereken enerjilerin -103.66 joule.g<sup>-1</sup>, -68.06 joule.g<sup>-1</sup> ve -174.22 joule.g<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen termogramlarda piklerin kaybolmaması ve yeni bir pikin ortaya çıkmaması, oluşan yapıda etkileşme veya geçimsizlik olmadığını göstermiştir (26). 25°C-90°C aralığında DOTAP®'a ait pikin gözlenmemesinin nedeni, ikinci ısıtma sonrasında DOTAP'ın belirgin bir pik vermemesinin sonucudur. DOTAP®'ın DSC termogramında, 90°C'ye ısıtılması sırasında görülen bozunmalar ve ikinci ısıtma sırasında ve formülasyon sırasındaki ortam koşulları uygulandıktan sonra belirgin bir pik elde edilememesi, sıcaklığın DOTAP® üzerinde olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, DOTAP®'ın pDNA ile elektrostatik etkileşmesi üzerine sıcaklığın etkisinin araştırılmasına gerek duyulmuştur.

DOTAP® sulu ortamlarda dağıtıldığında kendi kendine lipozom oluşturabilmektedir (7, 34). DOTAP® su içinde konsantrasyon µg/µL olacak şekilde dağıtılmış ve ortama Çizelge 3'de belirtilen oranlarda pDNA eklenerek pDNA-DOTAP® kompleksleri oluşturulmuştur. Herhangibir işlem uygulanmadan doğrudan doğruya su ile µg/µL konsantrasyonda hazırlanmış DOTAP®, 1:10 (pDNA-DOTAP®) oranında pDNA'ya tamamen bağlanabilmiş ve jel içerisinde pDNA'nın hareketini engellemiştir (Şekil 14). DOTAP® I 1:12 (pDNA-DOTAP®I) oranında ve DOTAP® II 1:14 (pDNA-DOTAP®II) oranında aynı etkiyi gösterebilmiştir. DOTAP® III, DOTAP® IV, DOTAP® V ve DOTAP® VI ancak 1:16 oranında (pDNA-DOTAP) pDNA'yı hareketsiz hale getirebilmiştir. Formülasyon sırasında uygulanan sıcaklıkların (43°C, 73°C, 85°C) artması, DOTAP®'ın etkisinde azalmaya neden olmuştur. Otoklavlama işlemi sonucunda da DOTAP®'ın pDNA'yı bağlama etkisinin giderek azaldığı gözlenmiştir. Ancak, uygulanan ilk sıcaklığın, DOTAP®'ın pDNA'ya bağlanma etkisini kaybetmesinde daha etkili olduğunu görülmüştür.

Kolloidal partiküller dağıldıkları ortamlardan iyon adsorbe ederler ve her partikül pozitif veya negatif yüklü oluşuna göre, aksi yöndeki iyonlarla

çevrilebilirler. Tek tabakalı moleküler (monomoleküler) bir tabaka oluştururlar ve bu tabakanın etrafında da partiküle bağlı olmayan, hareketli ikinci bir iyon tabakası yer alır. Bu tabakaya *Helmutz çift tabakası* veya *difüze çift tabaka* denmektedir. Çift tabakanın dışında da pozitif iyonların negatif iyonlara eşit olduğu nötral bir alan bulunmaktadır ve partikülün yüzeyi ile bu nötral bölge arasındaki potansiyel farkına zeta potansiyeli denmektedir (136, 140).

Ölçümler partiküllerin bir elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerinden yararlanılarak zetametre ile yapılır. Partiküllerin hücrelerarası göçü sonucunda oluşan ağırlık değişimlerine dayanan gravimetrik veya *lazer-dropper* ölçümü esasına göre elektroforetik hareket ölçüldükten sonra, ortamın viskozluğu ve dielektrik sabitesi de biliniyorsa, *Helmholtz-Smoluchowski* eşitliğinden yararlanılarak zeta potansiyel hesaplanır:

$$Z = \frac{4\pi\eta \cdot (9.104) \cdot V}{D \cdot E}$$

- Z : Zeta potansiyel  
V/E : Elektroforetik hareketlilik  
 $\eta$  : Viskozluk  
D : Ortamın dielektrik sabitesi (136).

Zeta potansiyel, katyonik lipit ile DNA'nın elektrostatik etkileşmesinde de önemli parametrelerden birisidir (32). Su içinde konsantrasyon  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  olacak şekilde dağıtılmış, herhangi bir işlem uygulanmamış ve formülasyon koşulları uygulanmış DOTAP<sup>®</sup>'in zeta potansiyelleri zetametre kullanılarak ve *Helmholtz-Smoluchowski* eşitliğinden yararlanılarak belirlenmiştir.

Formülasyon sıcaklıklarının artışı ile DOTAP<sup>®</sup>'in zeta potansiyellerinde istatistiksel olarak belirgin bir düşme gözlenmemiştir ( $p \geq 0.05$ ).

#### 5.1.1.2. Lipit Matrislerle Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler

KLN'ler ile yapılan birçok çalışmada katı lipit olarak tercih edilen Dynasan<sup>®</sup> 116 (65, 141) ve Compritol<sup>®</sup> ATO 888'in (142, 143) erime dereceleri, sırasıyla, 63°C ve 75°C olarak ve yarı katı özellikte olan Gelucire<sup>®</sup> 33/01'inki (144) 33°C olarak belirlenmiştir. DSC analizleriyle yapılan termal analiz sonucunda elde edilen erime ve tekrar kristallenme dereceleri sonuçları, literatür

bilgileri ve madde spesifikasyonları ile karşılaştırıldığında uyumlu oldukları görülmüştür (42, 68, 69, 144).

X-Işını kırınım analizi sonucunda Dynasan® 116 ve Compritol® ATO 888'in kristalin ve elucire® 33/01'in amorf yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 16).

### 5.1.1.3. Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler

Ön formülasyon çalışmalarında, katı lipit olarak Dynasan 116® seçilmiştir. Farklı oranlarda lipit ve yüzey etkin madde ile oluşturulan formülasyonların partikül boyutlarının ve faz ayrımı, kaymaklaşma, jelleşme ve çökelti oluşmaması gibi makroskobik özelliklerinin değerlendirilmesi sonucunda en kararlı KLN dispersiyonu seçilmiş ve FI kodu verilmiştir.

Formülasyona katyonik özellik kazandıracak ajan olarak seçilen katyonik lipit DOTAP®, dört farklı oranda (% 0.20, % 0.25, % 0.30 ve % 0.35) FI formülasyonuna dahil edilerek ön formülasyonlar (FIII, FIV, FV ve FVI) hazırlanmıştır. Ön formülasyonların termal analizleri sonucunda, erime derecelerinin 58.94°C ve 61.24°C arasında ve tekrar kristallenme noktalarının da 39.56°C ve 50.90°C arasında olduğu saptanmıştır. Ön formülasyonların tümünün erime derecelerinin, DOTAP®,ın Dynasan®116 içindeki çözünürlük tayini çalışmalarında elde edilen erime derecesinden (63.68°C) düşük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 19). Bu durum, erime derecesi düşük olan yağın lipit matris içindeki konsantrasyonunun artmasıyla karışımın erime derecesinde görülen düşmeye, nanometre aralığında olan küçük partikül boyutu ile geniş yüzey alana veya yüzey etkin madde varlığına bağlanabilir (143). Ayrıca, DOTAP® ve Dynasan®116 karışımlarının tekrar kristallenme derecesi (36.15°C) ile ön formülasyonların tekrar kristallenme noktaları arasında fark gözlenmiştir. Ufak partikül ve yüzey alanının kristalizasyon noktasını da etkilediği bildirilmiştir (42). Elde edilen sonuçlar, literatür bilgileriyle paralellik göstermektedir. Diğer taraftan, formülasyonların termogramlarında herhangi bir polimorfik değişim görülmemiştir (Şekil 17).

Ön formülasyonların pDNA bağlama oranlarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, dört farklı oranda katyonik lipit içeren herbir formülasyon, süzülen, otoklavlanan ve liyofilize edilen olmak üzere sınıflandırılmış ve pDNA'ya



elektrostatik olarak bağlanma yetenekleri karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Elde edilen görüntülere göre, % 0.20 oranında DOTAP® içeren FIII formülasyonunun DNA'yı tutabilme özelliğinin en düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 18-20). Uygulama alanından yürüme mesafesine kadar farklı bölgelerde bantlar gözlenmiş ve uygulama alanlarındaki formülasyon miktarının artırılmasıyla pDNA'nın boyutunun büyüdüğü görülmüştür. Bu büyüme, DNA'nın süper sarmal şekinden açık halkasal şekle dönüştüğünü göstermektedir. Süper sarmal DNA konformasyonu iyonik ortama bağlıdır ve bu ortamlarda partikül büyümesi gösterir (145).

Çift zincirli DNA kıvrılmış, *supercoil* ve kıvrımsız konformasyonlar gösterebilen ve esneyebilen yapıdadır (146). Lipozomal DNA-lipit komplekslerinde, tabakalar arasında DNA'nın sıkıştırılması veya hegzagonal kolonların oluşmasıyla yüksek kararlılık görülür (147). Bu katmanların yüzeyinin rölatif neminin azalması ve pozitif yükün artması, DNA'nın konformasyonunun değişmesine yol açar. Saf DOTAP ve DOTAP/DOPE lipozomlarıyla yapılmış bir çalışmada, DOTAP veya DOTAP/DOPE ile elektrostatik etkileşimde bulunan DNA oranının 1'in üzerine (lipozom:DNA $\geq$ 1) çıkması ile, süper sarmal şeklin yavaş yavaş açılmaya başladığı ve DNA konformasyonunda farklılıklar görüldüğü bildirilmiştir (147). İşlemlerin etkisi dikkate alındığında, liyofilize formülasyonlar, süzölmüş ve otoklavlanmış formülasyonlara göre, pDNA'nın konformasyonunun bozulmasında daha etkilidir.

Formülasyonların hepsinde lipit oranı arttıkça bağlanmanın arttığı gözlenmiştir. FV ve FVI KLN'leri, FIII ve FIV KLN'lerine göre daha fazla bağlanma göstermiştir. Sonuç olarak, en yüksek katyonik lipit DOTAP® miktarını (% 0.35) içeren FVI KLN'lerinin, pDNA bağlama yeteneği en yüksek olan formülasyon olduğu belirlenmiştir. Liyofilize FVI KLN'lerinde de aynı özellikler gözlenmektedir. Ancak, otoklavlanmış FVI KLN'lerinde, sıcaklığın DOTAP® üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle, pDNA bağlama yeteneğinde düşme vardır.

Zeta potansiyel, pratikte, süspansiyonların değerlendirilmesinde önemle dikkate alınan ölçüttür (136). Hazırlanan formülasyonların kararlılığının sağlanabilmesi için (11), pDNA ile partiküllerin elektrostatik etkileşmelerinin

oluşturulabilmesi ve bu etkileşme sonucunda oluşan kompleksin hücre membranına bağlanabilmesi (99, 107) amacıyla partiküllerin belirli bir zeta potansiyele sahip olması gerekmektedir. Hazırlanan ön formülasyonlarda, artan DOTAP® miktarına bağlı olarak, zeta potansiyellerde 38.35 mV'dan 48.90 mV'a varan artış gözlenmiştir.

Partikül boyutu DNA-polimer, lipit kompleksleri ve lipozomları hazırlarken en önemli parametrelerden birisidir (100). Yapılan çalışmalarda, hücreler ve dokular tarafından partiküllerin yakalanmasında boyutun çok önemli olduğu belirtilmiştir (116). Ön formülasyonların partikül boyutları, 113.8 nm-138.2 nm aralığında bulunmuştur. Gen tedavisi amacı ile hazırlanan formülasyonlarda, bazı hücre tiplerinin ancak mikronaltı boyuttaki partikülleri yakalayabildikleri (105) gözönüne alınacak olursa, bu çalışmada hazırlanan ön formülasyonların partikül boyutları bu amaç için uygun özelliktedir.

#### **5.1.1.4. Farklı Lipit Matrislerle Çalışılacak Formülasyonun Seçilmesi**

Hazırlanan ön formülasyonların termal analiz sonuçları ve partikül boyutları arasında belirgin farklılıklar görülmemiştir. Ancak, FVI formülasyonu, diğer formülasyonlara göre uygun sınırlar içinde zeta potansiyeline sahip olması nedeniyle uzun süreli kararlılığı sağlayabilme (3, 11) olasılığı ve pDNA bağlama yeteneğinin üstünlüğü düşünülerek en uygun formülasyon olarak belirlenmiştir.

#### **5.1.2. KLN'lerle Yapılan Çalışmalara Ait Değerlendirmeler**

##### **5.1.2.1. KLN'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmalarına Ait Değerlendirmeler**

KLN formülasyonlarının ve lipit maddelerin X-ışını kırınımları karşılaştırılarak lipit yapısındaki değişiklikler belirlenebilmektedir. Uygulanan işlemler sonucu ortaya çıkan değişimler, maddenin iç yapısı incelenerek açıklanabilir. Bu incelemeler arasında olan X-ışını kırınım tekniği ile analiz yapıldığında maddenin fiziksel durumu hakkında bilgi edinilebilir. Doğada kristalin yapıya sahip bütün maddelerin (saf veya karışım halde) herbirisi kendine özgü kırınım modeli oluşturur ve dolayısıyla X-ışını kırınımı analizi de bu gerçeğe dayanır (29).

Bu çalışmada, katyonik lipit içeriğinin lipitin fiziksel durumuna olan etkisi, X-ışını kırınım analizi ile kristal özellikleri incelenerek araştırılmıştır. Bu yönde karşılaştırma yapabilmek amacıyla, öncelikle, kullanılan katı lipitlerin ve katyonik lipitin analizleri yapılmıştır. Daha sonra, hazırlama yöntemi ile katyonik lipit kullanımından oluşabilecek değişiklikleri izlemek amacıyla üçü katyonik lipitsiz (FI, G ve C) ve 3'ü katyonik lipitli (FVI, GI ve CI) olmak üzere hazırlanan 6 formülasyon üzerinde inceleme yapılmıştır (Şekil 27).

Referans ve deneysel piklerin herbiri bir düzlem ailesini temsil ettiğinden, karşılaştırma yapılan bileşiğin pikleri, formülasyonlara ait piklerle karşılaştırılarak karşılaştırılabilir. Bu doğrultuda yapılan incelemelerde, Dynasan® 116 ve Compritol® ATO 888'in saf hallerinde görülen kristalin yapının formülasyon içerisinde bozunmadığı, ancak kırınım düzenlerinde pik şiddetlerinde azalma gerçekleştiği görülmüştür. Benzer sonuçlar literatürde de gözlenmektedir (4, 142, 141). Gelucire® 33/01'in yapısında görülen kristalin yapıya ait pikin, katyonik lipit konulmadan hazırlanmış formülasyonda (C) kaybolduğu gözlenmiştir. Ancak, DOTAP® içeren formülasyonlarda pik belirgin bir şekilde görülmüştür. Bu durum da, DOTAP®,'ın formülasyon işlemleri sırasında Gelucire® 33/01'in kristalin yapısının korunmasında yardımcı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, X-ışını kırınım düzenleri, formülasyonlarda izlenen düzenler ile karşılaştırıldığında, benzer  $2\theta$  açılarında çakışan piklerin varlığı saptanmıştır. Böylece, kullanılan maddelerin yapısında, formülasyonların hazırlanışından kaynaklanabilecek herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda, katyonik lipit (DOTAP®) kullanımının da katı lipit üzerinde yapısal değişiklikler oluşturmadığı izlenmiştir. Oluşan yapılara yönelik tüm yorumlar yalnızca X-ışını kırınım analizi ile yapılamayacağından, formülasyonlara ait DSC verileri de dikkate alınmıştır.

#### **5.1.2.1.1. Saklama koşullarında kararlılık kontrolleri**

DSC yöntemi, lipit nanopartiküller gibi kristal yapılu maddelerin erime ve tekrar kristallenme davranışlarını belirlemek için kullanılır. Kristal yapıda oluşan polimorfizm, kristal düzeni ve camsı geçiş gibi sıcaklığa bağlı değişimler, kristal yapının sıcaklığa bağlı bozunması sonucu ortaya çıkmaktadır. DSC analizleri, katı

çözeltiler, basit ötektik karışımlar gibi katı dispersiyonları anlamak veya etkin madde-lipit etkileşimlerini belirlemek için çok yararlıdır (143).

FVI KLN'lerinin süzölmüş ve otoklavlanmış dispersiyonlarının erime derecelerinde, zamana bağlı olarak küçük artışlar gözlenmiştir. Bu durum, zaman içerisinde partiköl boyutunda görölen büyüme ile veya kristalin yapıdaki değişiklerle ilişkilendirilebilir. Katı lipit partiköller genellikle karakteristik  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\beta$  modifikasyonları gösterir. Erime derecelerinde görölen artış, lipitin  $\beta$  şeklinden daha kararlı olan  $\beta$  şekline geçtiğini ve partiköllerin kristalizasyonlarının arttığını göstermektedir. Jelleşen sistemler yüksek kristalin özellik gösterirler ve bu durum sistemdeki enerji (ısı, ışık) değişikliğine bağlıdır (141). Buzdolabında bekletilen liyofilize FVI formölasyonunun termogramında görölen kaymalar, trigliseritlerin düşük sıcaklıklarda kararsız yapı ( $\alpha$  modifikasyonları) göstermelerine bağlanabilir (141). Erime derecesinin en az değişimi oda sıcaklığındaki liyofilize FVI KLN'lerde gerçekleşmiştir ve dolayısıyla liyofilize FVI KLN'ler için en uygun saklama ortamı oda sıcaklığıdır.

Süzölmüş, otoklavlanmış GI KLN dispersiyonlarının termal analizlerinde belirgin pikler elde edilememiştir. Ancak, liyofilize GI KLN'leri ile yapılan termal analiz çalışmalarında, endotermik pikler ile büyük çoğunluğunda ekzotermik pikler elde edilebilmiştir (Şekil 37). Oda sıcaklığında saklanan liyofilize GI KLN'lerinde, 3. ay sonunda erime piklerinin yanısıra görölen küçük hareketlenme, erime derecesinden yüksek sıcaklıkta ortaya çıkmıştır. Bu hareketlenme, liyofilize GI KLN'lerinde polimorfizmin ortaya çıktığını göstermektedir (143). Küçük partiköl boyutu polimorfik geçişleri arttırmaktadır (142).

Termal analizlerde endotermik veya ekzotermik bir pikin kaybolması veya yeni bir pikin ortaya çıkması etkileşme ve geçimsizlik olarak değerlendirilir (26). 4°C'de saklanan liyofilize GI KLN'lerde 25°C'dekilerden daha yüksek dercede polimorfik yapı görölmüştür. Bu polimorfik yapının 3. ayda da görölməsi, lipit partiköllerde etkileşme ve geçimsizliğin ilk aylarda başladığını, ancak şiddetin geçen süreyle fazla artmadığını göstermektedir. 40°C'de saklanan liyofilize GI KLN'lerde de 4°C'deki polimorfik yapılar gözlenmiştir. Bu yapılar geçen zaman içerisinde 4°C'dekinden daha belirgin özelliktedir. Polimorfik yapıların

oluşmasında sıcaklığın etkisinin olduğu görülmüştür. Liyofilize GI KLN'lerinin kararlılığı için en uygun sıcaklığın 4°C olduğu belirlenmiştir.

Otoklavlanmış ve süzölmüş CI formölasyonlarının erime derecelerinde, tüm saklama koşullarında, saf Compritol® ATO 888 ve DOTAP® karışımının erime derecesine yaklaşan değışimler görölmüştür. Bu durum, yapının kristallendiğini ve sistemin jelleşme eğiliminde olduğunu göstergesidir (42). CI KLN'lerindeki değışimlerin 3. ay öncesinden başladığı görölmüştür (Çizelge 19). 3. ay sonunda, 40°C'de saklanan liyofilize CI KLN'lerinin erime ve kristallenme derecelerindeki artışın, 25°C ve 4°C'de saklanan liyofilize CI KLN'lerinininkinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 40°C'de saklanan liyofilize CI KLN'lerinde, 3. ay sonunda polimorfik yapılara da rastlanmıştır (Şekil 38). Termal analiz sonucunda, CI KLN'lerinin liyofilize halde 4°C'de saklanmasının, kararlılığın sağlanması için uygun koşul oluşturduğu görölmüştür.

#### 5.1.2.1.2. KLN'lerin pDNA'ya bağlanma oranlarının belirlenmesi değlendirmeleri

Süzölmüş, liyofilize edilmiş ve otoklavlanmış FVI, GI ve CI KLN'lerinin pDNA bağlama yetenekleri, jel retardasyonu yöntemi ile değlendirilmiştir (Şekil 28-30).

Süzölmüş FVI formölasyonunun 1:4 [pDNA-FVI (a/a)] oranında pDNA'ya tamamen bağlandığı ve pDNA'nın hareketini engellediği görölmüştür. Uygulama alanında ışığa gözlenmemesi, süzölmüş taze formölasyonun pDNA'ya kuvvetli iyonik bağla bağlanarak, EtBr ile pDNA bağlanmasını engellendiğini göstermektedir. Ayrıca, akım şiddeti 25 V'a düşürülmesine rağmen, jel elektroforezi işlemi sırasında gözle görülebilir şekilde, formölasyonun pDNA'yı da alarak uygulama alanından çıkması ve anota doğru hareket etmesi oluşan pDNA-FVI komplekslerinin pozitif yük taşıdığıının göstergesidir.

Süzölmüş GI formölasyonu, 1:7 [pDNA-GI (a/a)] oranında pDNA'yı hareketsiz hale getirebilmiştir. 1:3 [pDNA-GI (a/a)] oranından 1:6 oranına kadar olan bağlama oranı, formölasyon miktarı arttıkça kademeli olarak artmıştır. Bant II'de (Şekil 29) görüldüğü üzere, pDNA'ya bağlanma yeteneği, liyofilize formölasyonlarda süzölmüş GI formölasyonuna göre daha yüksektir. Liyofilize GI

formülasyonu 1:5 [pDNA-GI<sub>L</sub> (a/a)] oranında pDNA'yı tamamen hareketsiz hale getirebilmiştir. Otoklavlanmış GI formülasyonunda, sıcaklığın etkinlik kaybına neden olduğu, 1:7 [pDNA-GI<sub>O</sub> (a/a)] oranında da, çok az da olsa pDNA'nın formülasyondan sıyrılarak jelde hareket etmesiyle açıklanabilir.

CI formülasyonunun, FVI ve GI formülasyonlarında kullanılan oranlarda, elektrostatik etkileşmelerinin çok zayıf olduğu jel üzerindeki görüntülerle belirlenmiştir. Süzölmüş, liyofilize edilmiş ve otoklavlanmış CI'lerin pDNA'ı tamamen tutamadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, pDNA'ya bağlanarak hareketsiz hale getirebilen en etkin formülasyonların, süzölmüş formülasyonlardan FVI, liyofilize edilmiş ve otoklavlanmış formülasyonlardan GI oldukları belirlenmiştir. Süzölmüş FVI KLN'lerinin, liyofilize ve otoklavlanmış GI KLN'lerine üstünlüğü görölmüştür.

#### **5.1.2.1.3. Escort™II ürününün ile KLN'lerin pDNA'ya bağlanma yeteneklerinin karşılaştırılmasına ait değerlendirmeler**

1:1 oranında katyonik lipit DOTAP® ve nötral lipit DOPE içeren piyasa ürünü liyofilize lipozom olan Escort™II, Çizelge 15'de belirtilen oranlarda pDNA ile karıştırılmış ve etkileşime bırakılmıştır. Süzölmüş, liyofilize edilmiş ve otoklavlanmış FVI, GI ve CI KLN'leri ile pDNA bağlama kapasiteleri oranları sabit tutularak karşılaştırılmıştır. Sonuçta, GI formülasyonunun liyofilize şeklinin, Escort™II'nin pDNA'ya elektriksel etkileşme ile bağlanarak hareketini engellemesine en yakın formülasyon olduğu gözlenmiş ve tüm formülasyonlarda 1:10 oranlarında otoklavlanmış formülasyonların etkilerinin yetersiz kaldığı kanısına varılmıştır (Şekil 31).

#### **5.1.2.1.4. KLN'lerin zeta potansiyelleri ile partikül boyutları ve dağılımlarına ait değerlendirmeler**

Hazırlanan tüm formülasyonların (FIII, FIV, FV, FVI, GI ve CI), süzölmüş, liyofilize ve otoklavlanmış hallerinin, 25°C', 4°C' ve 40°C'deki saklama koşullarında zeta potansiyelleri ile partikül boyutları ve dağılımları ölçölüp, bu koşullar altında en kararlı formülasyonlar istatistiksel olarak değerlendirilerek belirlenmeye çalışılmıştır.

FIII, FIV ve FV formülasyonunun süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş bütün şekillerinin, 9 aylık süre sonunda, zeta potansiyellerinde belirgin düzeyde düşme gözlenmiştir (Çizelge 20). Taze hazırlanmış formülasyon ile 9. ay sonunda farklı ortamlarda (25°C, 40°C ve 4°C) bekletilmiş formülasyonların zeta potansiyel değerlerindeki düşme özellikle 40°C’de çok daha yüksek düzeydedir ( $p \leq 0.001$ ). Formülasyonlar ilk 3 ay içerisinde zeta potansiyellerini koruyabilmişler, ancak 6. ay sonunda bu değerlerde hızla azalma olmuştur. Liyofilize edilmiş formülasyonların, 4°C’de zeta potansiyellerindeki kaybın diğer ortamlara oranla daha az olduğu görölmüştür. Liyofilize şekildeki formülasyonlar 40°C’de en belirgin zeta potansiyel kaybını göstermişlerdir.

FVI, GI ve CI formülasyonlarının süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş şekillerinin, farklı ortamlarda (25°C, 40°C ve 4°C), ilk 3 ay içinde zeta potansiyellerinde belirgin ( $p \geq 0.05$ ) bir düşme gözlenmemiştir (Çizelge 21). GI formülasyonu tüm ortamlarda bu özelliğini 6. ay sonuna kadar korumuştur. 9. ve 12. aylarda ise, taze hazırlanmış hallerine oranla oldukça anlamlı düşme ( $p \leq 0.01$ ) gözlenmiştir. Bu düşme, oda sıcaklığındaki aylara oranla etüv ve buzdolabında daha azdır.

FVI ve CI formülasyonlarının zeta potansiyelleri, taze hazırlanmış halleri ile karşılaştırıldığında, 9. ayda ileri düzeyde ( $p \leq 0.001$ ) azalma gerçekleştiği görölmüştür.

FIII, FIV ve FV formülasyonlarının süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş şekillerinin, farklı koşullar altında (25°C, 40°C ve 4°C), partiköl boyutlarında ve partiköl dağılımlarında (PI) anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir (Çizelge 21). Formülasyonların farklı şekillerinin saklama koşullarının, partiköl boyutuna belirgin ( $p \geq 0.05$ ) bir etkisi saptanmamıştır.

FVI, GI ve CI formülasyonlarının tüm şekillerinin (süzölmüş, otoklavlanmış ve liyofilize edilmiş), farklı ortamlarda, partiköl boyutlarında ve PI’larında anlamlı bir artış gözlenmemiştir (Çizelge 22).

Bu sonuçlar, ortam koşullarına rağmen (25°C, 40°C ve 4°C) yapıda herhangi bir başkalaşımın (jelleşme gibi) olmadığını göstermektedir.

#### 5.1.2.1.5. pDNA-KLN komplekslerinin zeta potansiyel değerlendirmeleri

Lipit miktarının artırılarak eklenmesi ile yapılan ölçümler sonucunda, oluşan komplekslerin zeta potansiyel değerlerinde artış gözlenmiştir. Daha önce yapılmış olan jel retardasyon deneylerinden çıkartılan sonucu destekleyen bu değerler, formülasyonların artan miktarlarda eklenmesi ile bağlanma oranlarının artmasına ve kararlı komplekslerin oluşmasına da neden olduğunu göstermektedir.

GI formülasyonu zeta potansiyeli en yüksek olan formülasyondur ve CI formülasyonu ile karşılaştırıldığında, pDNA ile bağlanma yeteneği oldukça yüksek düzeydedir. FVI ve CI formülasyonlarının 1:10 oranında pDNA ile oluşturdukları komplekslerin zeta potansiyelleri ile 1:50 oranındaki zeta potansiyelleri arasında belirgin bir artış gözlenmemektedir. Ancak, GI formülasyonunda ortama eklenen formülasyon miktarı arttıkça, zeta potansiyelde de artış görülmektedir.

#### 5.1.2.1.6. pDNA-KLN komplekslerinin DNaz I enzimi ortamında kararlılığının değerlendirilmesi

DNaz I (deoksiribonükleaz I) glikoprotein karakterinde bir endonükleazdır. Restriksiyon endonükleaz olarak tanımlanan bu enzimler, çift veya tek iplikçikli DNA'yı oligonükleotit ve mononükleotitlere ayırıştırır (19, 27, 68).

Terapötik gen uygulamalarında, vektörler taşıdığı maddeyi çevre etkilerinden korumalıdır. Bu etmenlerin en önemlisi DNaz yıkımıdır. pDNA'nın nükleazlardan korunması, *in vitro* olduğu kadar *in vivo*'da da gen salımının etkinliğinde kritik faktörlerdendir. pDNA'nın lipitlerle veya polimerlerle kompleksleşmesinin genel amacı, DNA'nın enzimatik yıkımdan korunmasıdır (32, 45, 70, 59).

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların pDNA bağlama özelliklerinin belirlenmesinin ardından, *in vitro* olarak DNaz I enzim yıkımına karşı koruma özelliği araştırılmıştır.

3. noktaya uygulanan pDNA üzerinde ekstraksiyon işlemleri yapılmamıştır. Enzimin etkisiyle çok küçük parçalara bölünen pDNA'nın



ekstraksiyon işlemleri sırasında geri kazanılması mümkün olmadığından, EDTA eklendikten sonra kuyucuğa yükleme tamponu eklenerek uygulama yapılmıştır. 3. hatta görülen leke (Şekil 39), pDNA'nın enzim ile tamamen parçalandığını göstermektedir.

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda, pDNA miktarında kayıp olduğu (5. ve 12. noktalar) ve pDNA'nın süper sarmal yapısının değiştiği (16. nokta) belirlenmiştir.

6. ve 7. noktalarda leke görülmemesinin, pDNA-Escort™II kompleksinden pDNA'nın uzaklaştırılmasında ekstraksiyon yönteminin başarısızlığından mı yoksa Escort™II'un pDNA'yı koruyamamasından mı kaynaklandığının belirlenmesi nedeniyle enzim etkisi yorumlanamamıştır.

9. nokta, FVI formülasyonundan pDNA'nın ekstre edildiğini göstermektedir; ancak, 2. noktada gözlenen bant ile karşılaştırıldığında, pDNA'nın bir kısmının ekstraksiyon işlemleri sırasında kaybedildiği gözlenmiştir. 10. noktada, enzimin pDNA-FVI kompleksi üzerindeki etkisi görülmektedir. Bu noktada, üç bant ve simir görülmektedir. 12. nokta, çıplak pDNA'nın II ekstraksiyon yönteminde çok büyük miktarının kaybolduğunu, 13. noktada görülen lekeler ise, pDNA-GI kompleksinden pDNA'nın geri kazanıldığını göstermektedir. pDNA'nın GI formülasyonundan uzaklaştırılması sırasında, ekstraksiyon işleminin, pDNA'nın konformasyonel yapısında oranları değiştirdiğini göstermektedir. 14. noktada ortama enzimin eklenmesiyle, süper sarmal yapının kaybolduğu ve farklı pDNA konformasyonlarının oluştuğu gözlenmiştir.

16. noktada, III ekstraksiyon işleminin çıplak pDNA üzerindeki etkisi gözlenmektedir. Bu işlem, pDNA'nın süper açık halkasal yapısının büyük bir bölümünün açılmasını sağlamıştır. 2. noktada pDNA ile karşılaştırıldığında, sarmal yapının süper sarmal yapıya oranla daha yoğun olduğu gözlenmektedir. 17. noktada, pDNA'nın CI ile oluşturduğu kompleks yapıdan pDNA'da kayıp olduğu görülmekte, ancak tamamen yok olmadığı anlaşılmaktadır. 18. noktada, ortama eklenen DNaz I enziminin etkisi gözlenmektedir.

10., 13., 14. ve 18. noktalarda beliren farklı bantların, pDNA'nın organizmaya alındıktan sonra nasıl etki ile ortaya çıkacağı bilinmemektedir. Bu yorumun yapılabilmesi için, bu yapının organizma içine alındıktan sonraki fonksiyonlarının değerlendirilebileceği *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Formülasyonlarla oluşturduğu komplekslerden, pDNA'nın enzim olmaksızın ekstraksiyonu işlemleri sırasında da konformasyonel değişiklikler oluşmuştur. Bu şekilde değerlendirme yapılırsa, GI ile CI formülasyonlarının DNaz I enzimine karşı pDNA'nın büyük bir bölümünü koruyabildiği sonucu çıkarılabilir.

## 5.2. SONUÇ

Hazırlanan ön formülasyonlarda yapılan zeta potansiyel ölçümleri, formülasyonlara eklenen DOTAP® miktarının artmasıyla zeta potansiyellerin arttığını göstermiştir. Bu sonuç, DOTAP®'ın eklenmesiyle katı lipit partiküllere katyonik özellik kazandırıldığına göstergesidir.

Katyonik lipit DOTAP® eklenerek üç farklı lipit matrisle (Dynasan® 116, Gelucire®33/01 ve Compritol® ATO 888) hazırlanan KLN'lerin pDNA'ya elektrostatik etkileşimle bağlandığı saptanmıştır.

Formülasyon işlemi sırasındaki ortam koşullarının uygulanmasının ardından yapılan termal analiz sonucu, sıcaklığın DOTAP® üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Lipit matrisler ile DOTAP® karışımlarının yapılarında etkileşim veya geçimsizlik olmaması DOTAP®'ın, lipit matrisler içerisinde çözünür özellikte olduğunu işaret etmektedir.

KLN'lerde otoklav ile sterilizasyon işleminden sonra zeta potansiyellerde düşme olduğu belirtilmiştir (18). Bu işlem sonucunda, hazırlanan KLN'lerin zeta potansiyellerinde düşme gözlenmiştir. Ancak, partikül boyutlarında, farklı ortamlarda (25°C, 40°C ve 4°C) kararlılık kontrolleri sonucunda, belirgin bir farklılaşma olmaması, zeta potansiyellerin oluşan yapıyı koruyabilecek özellikte olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık, ışık etkisinde olduğu gibi enerji girişi sağlar ve lipitin kristal yapısında değişikliklere neden olur. Yüksek sıcaklık, zeta potansiyelin düşmesine ve kararsızlığın artmasına yol açar (19). Liyofilize FVI, GI ve CI KLN'lerinin kristal yapıları açısından en kararlı yapıyı gösterdikleri belirlenmiştir. En uygun saklama koşulu, liyofilize FVI KLN'leri için 25°C, liyofilize GI ve CI KLN'leri için ise 4°C olarak belirlenmiştir.

GI KLN'leri, zeta potansiyeli diğer formülasyonlardan yüksek olması nedeniyle, pDNA'ya bağlanmada üstünlük göstermiştir. FVI KLN'lerinin pDNA ile oluşturdukları komplekslerde, pDNA'yı DNaz I enzimine karşı koruma kapasitesinin GI ve CI KLN'lerine göre düşük olduğu saptanmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

1. HOEKSTRA, W.P.M. and SMEEKENS, S.C.M., *Molecular Biotechnology, Pharmaceutical Biotechnology*, D.J.A.Crommelin and R.D.Sindelar (ed.), Vol. 1, p.1-22, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997.
2. SOLAK, M., BAĞCI, H., ŞENGİL, A.Z. and ÖZTAŞ, S., *Rekombinant DNA Teknolojisi Temel İlkeleri ve Uygulama Alanları*, Moleküler Genetik ve Recombinant DNA Teknolojisi (Temel Bilgiler), M.Solak (ed.), s.2, Uyum Ajans, Ankara, 2000.
3. CANNON, P.M. and ANDERSON, W.F., *Retroviral Vectors for Gene Therapy*, Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies, N.S.Templeton and D.D.Lasic M. (ed.), Vol. 1, p.1-15. Dekker Inc., New York Basel, 2000.
4. BAŞARAN, N., *Gen Tedavisi*, Tıbbi Genetik Ders Kitabı, N.Başaran (ed.), Böl.22, s.398-414, Güneş&Nobel Kitap Evi, İstanbul, 1999.
5. WALKER, S., SOFIA, M.J., KARARLA, R., KOGAN, N.A., WIERICHS, L., LONGLEY, C.B., BRUKER, K., AXELROD, H.R., MIDHA, S. and BABU, S., *Cationic Facial Amphiphiles: A Promising Class of Transfection Agents*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 1585-1590 (1996).
6. BAŞARAN, N., *Genetik Danışma*, Tıbbi Genetik Ders Kitabı, N.Başaran (ed.), Böl.21, s.392-397, Güneş&Nobel Kitap Evi, İstanbul, 1999.
7. CHESNOY, S. and HUANG, L., *Structure and Function of Lipid-DNA Complexes for Gene Delivery*, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **29**, 27-47 (2000).
8. LASIC, D.D. and TEMPLETON, N.S., *Bioorganic Colloids: Macromolecules, DNA, Self-Assembled Particles, and Their Complexes*, Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies, N.S.Templeton and D.D.Lasic, M. (ed.), Vol. 12, p.241-266. Dekker Inc., New York Basel, 2000.
9. WESHES, H., EHLERS, S., MEHNERT, W., HAHN, H. and MÜLLER, R.H., *Solid Lipid Nanoparticles Determination of In Vivo Toxicity*, Proceedings of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, Budapest, 489-490 (1995).
10. MÜLLER, R.H. and MEHNERT, W., *Potential of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery*, Proceeding of the 1st World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics Pharmaceutical Technology APGI/APV, Budapest, 463-464 (1995).

11. HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B. and PROUST, J.E., *Physico-chemical Stability of Collaoidal Lipid Particles, Biomaterials*, **24**, 4283-4300 (2003)
12. GÜRSOY, A.Z., *Kontrollü Salım Sistemlerinin Tıp Alanındaki Uygulamalarının Alışılmış İlaç Şekillerine Üstünlükleri, Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy (ed.), s.3-6, Kontrollü Salım Derneği Yayını, İstanbul, (2002).
13. MEHNERT, W. and MADER, K., *Solid Lipid Nanoparticles; Production, Characterization and Application, Advanced Drug Delivery Reviews*, **47(2-3)**, 165-196 (2001).
14. DEMİREL, M. and YAZAN, Y., *Katı Lipid Nanopartiküller (SLN), FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, **25**, 167-179 (2000).
15. MÜLLER, R.H., *Particulate Systems for The Controlled Delivery of Active Compounds in Pharmaceutics and Cosmetics, Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, J.E. Diederichs and R.H.Müller (ed.), Vol. 5(1), p. 75-90, Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 1998.
16. JORES, K., MEHNERT W., DRECHSLER, M., BUNJES, H., JOHANN, C. and MÄDER, K., *Investigations on the Structure of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles by Photon Correlation Spectroscopy, Field-Flow Fractionation and Transmission Electron Microscopy, Journal of Controlled Release*, **95**, 217-227 (2004).
17. HEIATI, H., TAWASHI, R., SHIVERS, R.R. and PHILLIPS, N.C., *Solid Lipid Nanoparticles as Drug Carriers. I. Incorporation and Retention of the Lipophilic Prodrug 3'-Azido-3'-Deoxythymidine Palmitate', International Journal of Pharmaceutics*, **146(1)**, 123-131 (1997).
18. MÜLLER, R.H., DINGLER, A., SCHNEPPE, T. and GOHLA, S., *Large-Scale Production of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanosuspensions (DissoCubes)*, Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology, Donalt L. Wise (ed.), pp.359-376, 2003.
19. VENKATESWARLU, V. and MANJUNATH, K., *Preparation Characterization and In Vitro Release Kinetics of Clozapine Solid Lipid Nanoparticles, Journal of Controlled Release*, **95(3)**, 627-638 (2004).
20. LUKOWSKI, G., KASBOHM, J., PFLEGEL, P., ILLING, A. and WULFF, H., *Crystallographic Investigation of Cetylpalmitate Solid Lipid Nanoparticles, International Journal of Pharmaceutics*, **196**, 201-205 (2000).

21. ZIMMERMANN E. and MÜLLER R.H., *Elektrolyte - and pH – Stabilities of Aqueous Solid Lipid Nanoparticle (SLN™) Dispersions in Artificial Gastrointestinal Media*, *European Journal of Biopharmaceutics*, **52**, 203-210 (2001).
22. OLBRICH, C., KAYSER, O. and MÜLLER, R.H., *Lipase Degradation of Dynasan 114 and 116 Solid Lipid Nanoparticles (SLN)—Effect of Surfactants, Storage Time and Crystallinity*, *International Journal of Pharmaceutics*, **237**, 119-128 (2002).
23. RUNGE, S.A. and MÜLLER, R.H., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN™) for Oral Administration-Drug Incorporation and Degradation*, *Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems*, J.E. Diederichs-R.H. Müller (ed.), s. 91-100, Stuttgart, 1998.
24. SCHWARZ, C., MEHNERT, W., LUCKS, J. S. and MÜLLER, R. H., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery. I. Production, Characterization and Sterilization*, *Journal of Controlled Release*, **30**, 83-96 (1994).
25. AHLIN, P., KRISTL, J., SENTJURC, M., STRANCAR, J. and PECAR, S., *Influence of Probe Structure on its Distribution in SLN Dispersions*, *International Journal of Pharmaceutics*, **196**, 241-244 (2000).
26. YAZIKSIZ İŞCAN, Y., *Deriye Uygulanan Katı Lipit Partiküllerin Formülasyonu ve İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.
27. SHAHGALDIAN, P., GUALBERT, J., AISSA, K. and COLEMAN, A.W., *A Study of the Freeze-Drying Conditions of Calxarene Based Solid Lipid Nanoparticles*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **55**, 181-184 (2003).
28. FREITAS, C. and MÜLLER, R.H., *Effect of Light and Temperature on Zeta Potential and Physical Stability in Solid Lipid Nanoparticle (SLN™) Dispersions*, *International Journal of Pharmaceutics*, **168**, 221-229 (1998).
29. KAŞ, H.S., *İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler, Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy (ed.), s.65-102, Kontrollü Salım Derneği Yayını, İstanbul, 2002.
30. SCHWARZ, C. and MEHNERT, W., *Freeze-Drying of Drug-free and Drug-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN)*, *International Journal of Pharmaceutics*, **157** (2), 171-179 (1997).
31. LIPPACHER, A., MÜLLER, R. H. and MÄDER, K., *Semisolid SLN™ Dispersions for Topical Application: Influence of Formulation and*

- Production Parameters on Viscoelastic Properties, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **53**, 155-160 (2002).
32. KRISTL, J., VOLK, B., AHLIN, P., GOMBA, K. and ENTJURC, M., *Interactions of Solid Lipid Nanoparticles with Model Membranes and Leukocytes Studied by EPR, International Journal of Pharmaceutics*, **256**, 133-140 (2003).
  33. SANNA, V., KIRSCHVINK, N., GUSTIN, P., GAVINI, E., ROLAND, I., DELATTRE, L. and EVRARD, B., *Preparation and In Vivo Toxicity Study of Solid Lipid Microparticles as Carrier for Pulmonary Administration, AAPS PharmSciTech*, **5(2)**, Article 27 (2003). (<http://www.Aapspharmascitech.org>)
  34. SCHÖLER C., HAHN H., MÜLLER R.H. and LIESENFELD O., *Effect of Lipid Matrix and Size of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) on the Viability and Cytokine Production of Macrophages, International Journal of Pharmaceutics*, **231**, 167-176 (2002).
  35. OLBRICH C. and MÜLLER R.H., *Enzymatic Degradation of SLN- Effect of Surfactant and Surfactant Mixtures, International Journal of Pharmaceutics*, **180**, 31-39 (1999).
  36. STENSRUD, G., REDFORD, K., SMISTAD, G. and KARLSEN, D J., *Effects of Gamma Irradiation on Solid and Lyophilised Phospholipids, Radiation Physics and Chemistry*, **56**, 611-622 (1999).
  37. HEIATI, H., TAWASHI, R. and PHILLIPS, N.C., *Solid Lipid Nanoparticles as Drug Carriers: II. Plasma Stability and Biodistribution of Solid Lipid Nanoparticles Containing The Lipophilic Prodrug 3'-Azido-3'-Deoxythymidine Palmitate in Mice, International Journal of Pharmaceutics*, **174(1-2)**, 71-80 (1998).
  38. DUBES, A., PARROT-LOPEZ, H.,DEGOBERT, G., FESSI, H., SHAHGELDIN, P. and COLEMAN, A.W., *Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy Imaging of Solid Lipid Nanoparticles Derived from Amphiphilic Cyclodextrins, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **55(3)**, 279-282 (2003).
  39. GUALBERT, J., SHAHGALDIAN P. and COLEMAN, A.W., *Interactions of Amphiphilic Calix[4]arene-Based Solid Lipid Nanoparticles with Bovine Serum Albumin, International Journal of Pharmaceutics*, **257**, 69-73 (2003).
  40. DEMİREL, M., *Piribedil Katı Lipid Nanopartiküllerinin Formülasyonu ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1999.

41. FREITAS, C., LUCKS, J. S. and MÜLLER, R. H., *Effect of Storage Conditions on Long-Term Stability of "Solid Lipid Nanoparticles" (SLN) in Aqueous Dispersions*, Proceeding 1st World Meeting APGI/APV, Budapest, (1995).
42. FREITAS, C. and MÜLLER, R.H., *Correlation Between Long-Term Stability of Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and Crystallinity of the Lipid Phase*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **47**, 125-132 (1999).
43. HEYDENRECICH, A.V., WESTMEIER, R., PEDERSEN, N., POULSEN, H.S. and KRISTENSEN, H.G., *Preparation and Purification of Cationic Solid Lipid Nanospheres-Effects on Particle Size, Physical Stability And Cell Toxicity*, *International Journal of Pharmaceutics*, **224**, 83-87 (2003).
44. MÜLLER, R.H., MEHNERT, W., LUCKS, J.S., SHWARZ, C., MÜHLEN, A., WEYHERS, H., FREITAS, C. and RÜHL, D., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN)-an Alternative Colloidal Carrier System for Controlled Drug Delivery*, *European Journal of Biopharmaceutics*, **41(1)**, 62-69 (1995).
45. MÜLLER, R. H., MADER, K. and GOHLA, S., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery- a Review of the State of the Art*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 161-177, (2000).
46. MÜLLER, R. H., LIPPACHER A. and GOHLA, S., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as a Carrier System for the Controlled Release of Drugs*, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, D. Wise (ed.), s. 377-391, 2000.
47. MÜHLER A, SCHWARZ C. and MEHNERT W., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery – Drug Release and Release Mechanism*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **45**, 149-155 (1998).
48. CAVALLÌ, R., CAPUTO, O. and GASCO, M.R., *Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanospheres Containing Paclitaxel*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10(4)**, 305-309 (2000).
49. MÜLLER, R. H., MEHNERT, W., DINGLER, A., RUNGE, S. A., MÜHLEN, A zur and FREITAS, C., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>, Lipoparls<sup>TM</sup>)-Present State of Development*, *International Symposium on Controlled Release Bioactive Materials*, **24**, s. 923-924 (1997).
50. JENNING, V., THÜNEMANN, A.F. and GOHLA, S.H., *Characterisation of a Novel Solid Lipid Nanoparticle Carrier System Based on Binary*



- Mixtures of Liquid and Solid Lipids, International Journal of Pharmaceutics*, **199(2)**, 167-177 (2000).
51. DEMİREL, M., YAZAN, Y., MÜLLER, R. H., KILIÇ, F. and BOZAN, B., *Formulation and In Vitro-In Vivo Evaluation of Piribedil Solid Lipid Micro- and Nanoparticles, Journal of Microencapsulation*, **18(3)**, 359-371 (2001).
  52. HOU, D., XIE, CS., HUANG, K. and ZHU, CH., *The Production and Characteristics of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs), Biomaterials*, **24**, 1781-1785 (2003).
  53. SHAHGALDIAN, P., SILVA, E., COLEMAN, A.W., RATHER, B. and ZAWOROTKO, M.J., *Para-Acyl-Calix-Arene Based Solid Lipid Nanoparticles (Slns): a Detailed Study of Preparation and Stability Parameters, International Journal of Pharmaceutics*, **253(1-2)**, 23-38 (2003).
  54. MARENGO, E., CAVALLI, R., CAPUTO, O., RODRIGUEZ, L. and GASCO, M.R., *Scale-Up of the Preparation Process of Solid Lipid Nanospheres. Part I, International Journal of Pharmaceutics*, **205**, 3-13 (2000).
  55. HEYDENREICH, A.V., WESTMEIER, R., PEDERSEN, N., POULSEN, H.S. and KRISTENSEN, H. G., *Preparation and Purification of Cationic Solid Lipid Nanospheres—Effects on Particle Size, Physical Stability and Cell Toxicity, International Journal of Pharmaceutics*, **254(1)**, 83-87 (2003).
  56. FREITAS, C. and MÜLLER, R.H., *Spray-Drying of Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>), European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **46**, 145-151 (1998).
  57. ZIMMERMANN, E., MÜLLER, R.H. and MÄDER, K., *Influence of Different Parameters on Reconstitution of Lyophilized SLN, International Journal of Pharmaceutics*, **196**, 211-213 (2000).
  58. AHLIN, P., KRISTL, J. and SMID-KORBAR, J., *Optimization of Procedure Parameters and Physical Stability of Solid Lipid Nanoparticles in Dispersions, Acta Pharmaceutica*, **48**, 259-267 (1998).
  59. DINGLER, A., BLUM, R. P., NIEHUS, H., MÜLLER, R. H. and GOHLA, S., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>/ Lipopearls<sup>TM</sup>)- a Pharmaceutical and Cosmetic Carrier for the Application of Vitamin E in Dermal Products, Journal of Microencapsulation*, **16(6)**, 751-767 (1999).

60. AHLIN, P., SENTJURC, M., STRANCAR, J. and KRISTL, J., *Location of Lipophilic Substances and Ageing of Solid Lipid Nanoparticles Studied by EPR*, *S.T.P. Pharma Sciences*, **10(2)**, 125-132 (2000).
61. WISSING, S. A., LIPPACHER A. and MÜLLER, R. H., *Investigations on the Occlusive Properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN)*, *Journal of Cosmetic Science*, **52**, 313-324 (2001).
62. DINGLER, A., LUKOWSKI, G., PFLEGEL, P., GOHLA S. and MÜLLER, R. H., *Production of Solid Lipid Nanoparticles (SLNTM) from Cosmetic Lipids and Surfactants*, 2nd World Congress on Emulsion, Bordeaux, 4-2-297 (1997).
63. MÜLLER, R. H. and HEINEMANN, S., *Fat Emulsions for Parenteral Nutrition. I: Evaluation of Microscopic and Laser Light Scattering Methods for the Determination of Physical Stability*, *Clinical Nutrition*, **11**, 223-236 (1992).
64. MÜLLER, R. H. and HEINEMANN, S., *Fat Emulsions for Parenteral Nutrition II: Characterisation and Physical Long-Term Stability of Lipofundin MCT/LCT*, *Clinical Nutrition*, **12**, 298-309 (1993).
65. WESTESEN, K. and SIEKMANN, B., *Investigation of the Gel Formation of Phospholipid-Stabilized Solid Lipid Nanoparticles*, *International Journal of Pharmaceutics*, **151**, 35-45 (1997).
66. MÜHLEN, A., MÜHLEN, E., NIEHUS, H. and MEHNERT, W., *Characterisation of Solid Lipid Nanoparticles by Atomic Force Microscopy*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2**, 178 (1994).
67. SENTJURC, M., AHLIN, P., STRANCAR, J. and KRISTL, J., *Investigation of Solid Lipid Nanoparticles by EPR*, [www.ibmb.uni.wroc.pl/sentjurc.htm](http://www.ibmb.uni.wroc.pl/sentjurc.htm)
68. AHLIN, P., KRISTL, J., SENTJURC, M., STRANCAR, J. and PECAR, S., *Influence of Spin Probe Structure on its Distribution in SLN Dispersions*, *International Journal of Pharmaceutics*, **196(2)**, 241-244 (2000).
69. ALMEIDA, A.J., RUNGE, S. and MÜLLER, R.H., *Peptide-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Influence of Production Parameters*, *International Journal of Pharmaceutics*, **149(2)**, 255-265 (1997).
70. JENNING, V. and GOHLA, S., *Comparison of Wax and Glyceride Solid Lipid Nanoparticles (SLN®)*, *International Journal of Pharmaceutics*, **196(2)**, 219-222 (2000).

71. HU, F.Q., HONG, Y. and YUAN, H., *Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Containing Peptide*, *International Journal of Pharmaceutics*, Article in Press
72. SCHWARZ, C. and MEHNERT, W., *Sterilization of Drug-Free and Tetracaine-Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN)*, Proceedings 1st World Meeting APGI/APV, s.485-486, Budapest, 1995.
73. CENGİZ, E., *Titanyum Dioksit İçeren Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve İn Vitro Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2003.
74. SCHWARZ, C., MEHNERT, W. and MÜLLER, R.H., *Lyophilization of Solid Lipid Nanoparticles (SLN)*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2**, 177 (1994).
75. MÜLLER, R. H., RÜHL, D., RUNGE, S., SCHULZE-FORSTER, K. and MEHNERT, W., *Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant*, *Pharmaceutical Research*, **14(4)**, 458-462 (1997).
76. MIGLIETTA, A., CAVALLIB, R., BOCCA, C., GABRIELA, L. and GASCO, M.R., *Cellular Uptake and Cytotoxicity of Solid Lipid Nanospheres (SLN) Incorporating Doxorubicin or Paclitaxel*, *International Journal of Pharmaceutics*, **210(1-2)**, 61-67 (2000).
77. RUNGE, A.S. and MÜLLER, R.H., *Solid Lipid Nanoparticles (SLN™) for Oral Administration Drug Incorporation and Degradation*, Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems, J.E.Diederichs & R.H.Müller (ed.), pp.91-100, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1998.
78. PETERS, K. and MÜLLER, R.H., *Nanosuspensions-a Novel Formulation of Poorly Soluble Drugs*, Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems, J.E.Diederichs & R.H.Müller (ed.), pp. 101-108, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1998.
79. Mc TAGGART, S. and AL-RUBEAI, M., *Retroviral Vectors for Human Gene Delivery*, *Biotechnology Advances*, **20(1)**, 1-31 (2002).
80. MOK, K.W.C., LAM, A.M.I., and CULLIS, P.R., *Stabilized Plasmid-Lipid Particles: Factors Influencing Plasmid Entrapment and Transfection Properties*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1419(2)**, 137-150 (1999).
81. ZABNER, J., *Cationic Lipids Used in Gene Transfer*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **27(1)**, 17-28 (1997).

82. WALS, G., *Nucleic Acid Therapeutics*, Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology, J., Wiley & Sons (ed.), Vol. 11, p.386, Wiley & Sons Ltd., England 1999
83. ZABNER, J., FASBENDER, AL J., MONINGER, T., POELLINGER, K.A. and WELSH, M.J., *Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid*, Journal of Biological Chemistry, **270(32)**, 18997-19007 (1995).
84. PIRES, P., SIMÕES, S., NIR, S., GASPAR, R., DÜZGÜNEŞ, N. and de LIMA, M.C.P., *Interaction of Cationic Liposomes and Their DNA Complexes with Monocytic Leukemia Cells*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1418(1)**, 71-84 (1999).
85. WU, N. and ATAANI, M.M., *Production of Viral Vectors for Gene Therapy Applications*, *Current Opinion in Biotechnology*, **11( 2)**, 205-208 (2000).
86. CHANCELLOR, M.B., YOSHIMURA N., PRUCHNIC, R. and HUARD, J., *Gene Therapy Strategies for Urological Dysfunction*, *Trends in Molecular Medicine*, **7(7)**, 301-306 (2001).
87. EL-ANEED, A., *An Overview of Current Delivery Systems in Cancer Gene Therapy*, *Journal of Controlled Release*, **94(1)**, 1-14 (2004).
88. KIM, S.H., KIM, S. and ROBBINS, P.D., *Retroviral Vectors*, *Advances in Virus Research*, **55**, 545-563 (2000).
89. PAN, Y., ZHAI, P., DASHTI, A.M., WU, S., LIN, X. and WU, M., *A Combined Gene Delivery by Co-Transduction of Adenoviral and Retroviral Vectors for Cancer Gene Therapy*, *Cancer Letters*, **184(2)**, 179-188 (2002).
90. LAVILLETTE, D., RUSSELL, S.J. and COSSET, F-L., *Retargeting Gene Delivery Using Surface-Engineered Retroviral Vector Particles*, *Current Opinion in Biotechnology*, **12(5)**, 461-466 (2001).
91. WU, X., WAKEFIELD, J.K., LIU, H., XIAO, H., KRALOVICS, R., PRCHAL, J.T. and KAPPES, J.C., *Development of a Novel Trans-Lentiviral Vector That Affords Predictable Safety*, *Molecular Therapy*, **2(1)**, 47-55 (2000).
92. HACKETT, N.R., CRYSTAL, R., *Adenovirus Vectors for Gene Therapy*, Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies, N.S.Templeton and D.D.Lasic, M. (ed.), Vol. 2, p.1-15. Dekker Inc., New York Basel, 2000.

93. BOUT, A., *Gene Therapy*, Pharmaceutical Biotechnology, D.J.A. Crommelin and R.D.Sindelar (ed.), Vol.7, p.167-182, Harwood Academic publishers, Amsterdam 1997
94. PONDER, K.P., *Vectors of Gene Therapy*, An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy, T.F.Kresina, Vol.12, p.398-409, A.J.Wiley&Sons, INC., Publication 2001
95. SANLIOGLU, A.D., KARACAY, B., BENSON, P.K., ENGELHARDT, J.F. and SANLIOGLU, S., *Novel Approaches to Augment Adeno-Associated Virus Type-2 Endocytosis and Transduction*, *Virus Research*, **104(1)**, 51-59 (2004).
96. BOILLEE, S. and CLEVELAND, D.W., *Gene Therapy for ALS Delivers*, *Trends in Neurosciences*, **27(5)**, 235-238 (2004).
97. BODINE, D.M., *Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells*, *Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies*, N.S.Templeton and D.D.Lasic, M. (ed.), Vol. 19, p.383-404, Dekker Inc., New York Basel, 2000.
98. BLÖMER, U., VERMA, I.M., GAGE, F.H., *Gene Transfer to the Central Nervous System*, *Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies*, N.S.Templeton and D.D.Lasic, M. (ed.), Vol. 25, p.489-506, Dekker Inc., New York Basel, 2000.
99. MONTIER, T., DELÉPINE, P., PICHON, C., FÉREC, C., PORTEOUS, D.J. and MIDOUX, P., *Non-Viral Vectors in Cystic Fibrosis Gene Therapy: Progress and Challenges*, *Trends in Biotechnology*, **22(11)**, 586-592 (2004).
100. JÄÄSKELÄINEN, I., PELTOLA, S., HONKAKOSKI, P., MÖNKKÖNEN, J. and URTTI, A., A Lipid Carrier with a Membrane Active Component and a Small Complex Size are Required for Efficient Cellular Delivery of Anti-Sense Phosphorothioate Oligonucleotides, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10(3)**, 187-193 (2000).
101. ZHANG, S., XU, Y., WANG, B., QIAO, W., LIU, D. and LI, Z., *Cationic Compounds Used in Lipoplexes and Polyplexes for Gene Delivery*, *Journal of Controlled Release*, **100(2)**, 165-180 (2004).
102. WANG, J., GUO, X., XU, Y., BARRON, L. and SZOKA F.C.Jr., *Synthesis and Characterization of Long Chain Alkyl Acyl Carnitine Esters. Potentially Biodegradable Cationic Lipids for Use in Gene Delivery*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **41(13)**, 2207-2215 (1998).

103. CSÖGÖR, NACKEN, M., SAMETI, M., LEHR, C.-M. and SCHMIDT, H., *Modified Silica Particles for Gene Delivery, Materials Science and Engineering: C*, **23(1-2)**, 93-97 (2003).
104. BOUKHNIKACHVILI, T., AGUERRE-CHARIOL, O., AIRIAU, M., LESIEUR, S., OLLIVON, M. and VACUS, J., *Structure of In-Serum Transfecting DNA-Cationic Lipid Complexes, FEBS Letters*, **409(2)**, 188-194 (1997).
105. DASS, C.R., *Biochemical and Biophysical Characteristics of Lipoplexes Pertinent to Solid Tumour Gene Therapy, International Journal of Pharmaceutics*, **241(1)**, 1-25 (2002).
106. KOLTOVER, I., SALDITT, T. and SAFINYA, C.R., *Phase Diagram, Stability, and Overcharging of Lamellar Cationic Lipid-DNA Self-Assembled Complexes, Biophysical Journal*, **77(2)**, 915-924 (1999).
107. ZHDANOV, R.I., PODOBED, O.V. and VLASSOV, V.V., *Cationic Lipid-DNA Complexes—Lipoplexes—for Gene Transfer and Therapy, Bioelectrochemistry*, **58(1)**, 53-64 (2002).
108. PALMER, L.R., CHEN, T., LAM, A.M.I., FENSKE, D.B., WONG, K.F., MACLACHLAN, I. and CULLIS, P.R., *Transfection Properties of Stabilized Plasmid-Lipid Particles Containing Cationic PEG Lipids, Biochimica et Biophysica Acta*, **1611(1-2)**, 204-216 (2003).
109. CARACCILO, G., CAMINITI, R., NATALI, F. and CASTELLANO, A.C., *A New Approach for the Study of Cationic Lipid-DNA Complexes by Energy Dispersive X-Ray Diffraction, Chemical Physics Letters*, **366(3-4)**, 200-204 (2002).
110. TROS de ILARDUYA, C., ARANGO, M.A., MORENO-ALIAGA, M.J. and DÜZGÜNEŞ, N., *Enhanced Gene Delivery In Vitro and In Vivo by Improved Transferrin-Lipoplexes, Biochimica et Biophysica Acta*, **1561(2)**, 209-221 (2002).
111. WOODLE, M.C. and SCARIA, P., *Cationic Liposomes and Nucleic Acids, Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **6(1)**, 78-84 (2001).
112. KLINK, D., SCHINDELHAUER, D., LANER, A., TUCKER, T., BEBOK, Z., SCHWIEBERT, E.M., BOYD, A.C. and SCHOLTE, B.J., *Gene Delivery Systems—Gene Therapy Vectors for Cystic Fibrosis, Journal of Cystic Fibrosis*, **3(2)**, 203-212 (2004).
113. NORMAN, J.A., HOBART, P., MANTHORPE, M., FELGNER, P. and WHEELER, C., *Development of Improved Vectors for DNA-Based Immunization and Other Gene Therapy Applications, Vaccine*, **15(8)**, 801-803 (1997).

114. ALMOFTI, M.R., HARASHIMA, H., SHINOHARA, Y., ALMOFTI, A., BABA, Y. and KIWADA, H., Cationic Liposome-Mediated Gene Delivery: Biophysical Study and Mechanism of Internalization, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **410(2)**, 246-253 (2003).
115. ANCHORDOQUY, T.J., CARPENTER, J.F. and KROLL, D.J., *Maintenance of Transfection Rates and Physical Characterization of Lipid/DNA Complexes After Freeze-Drying and Rehydration*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **348(1)**, 199-206 (1997).
116. PRABHA, S., ZHOU, W.-Z., PANYAM, J. and LABHASETWAR, V., Size-Dependency of Nanoparticle-Mediated Gene Transfection: Studies with Fractionated Nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, **244(1-2)**, 105-115 (2002).
117. BIRCHALL, J.C., KELLAWAY, I.W. and MILLS, S.N., *Physico-Chemical Characterisation and Transfection Efficiency of Lipid-Based Gene Delivery Complexes*, *International Journal of Pharmaceutics*, **183(2)**, 195-207 (1999).
118. FILION, M.C. and PHILLIPS, N.C., *Major Limitations in the Use of Cationic Liposomes for DNA Delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, **162(1-2)**, 159-170 (1998).
119. ABERLE, A.M., TABLIN, F., ZHU, J., WALKER, N.J., GRUENERT, D.C. and NANTZ, M.H., A Novel Tetraester Construct That Reduces Cationic Lipid-Associated Cytotoxicity. Implications for the Onset of Cytotoxicity, *Biochemistry*, **37(18)** 6533-6540 (1998).
120. LEBEDEVA, I., BENIMETSKAYA, L., STEIN, C.A. and VILENCHIK, M., Cellular Delivery of Antisense Oligonucleotides, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50(1)**, 101-119 (2000).
121. ISHIWATA, H., SUZUKI, N., ANDO, S., KIKUCHI, H. and KITAGAWA, T., Characteristics and Biodistribution of Cationic Liposomes and Their DNA Complexes, *Journal of Controlled Release*, **69(1)**, 139-148 (2000).
122. HARASHIMA, H., SHINOHARA, Y. and KIWADA, H., *Intracellular Control of Gene Trafficking Using Liposomes as Drug Carriers*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13(1)**, 85-89 (2001).
123. YOO, H.S., KWON, S.M., KIM, Y.J., CHUNG, H., KWON, I.C., KIM, J. and JEONG, S.Y., Cationic Lipid Emulsions Containing Heavy Oils for the Transfection of Adherent Cells, *Journal of Controlled Release*, **98(1)**, 179-188 (2004).

124. WALKER, S., SOFIA, M.J., AXELROD, H.R., *Chemistry and cellular aspects of cationic facial amphiphiles*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **30(1-3)**, 61-71 (1998).
125. GARCIA-CHAUMONT, CH., SEKSEK, O., GRZYBOWSKA, J., BOROWSKI, E. and BOLARD, J., *Delivery Systems for Antisense Oligonucleotides*, *Pharmacology & Therapeutics*, **87(2-3)**, 255-277 (2000).
126. WONG, F.M.P., BALLY, M.B. and BROOKS, D.E., *Electrostatically Mediated Interactions Between Cationic Lipid-DNA Particles and an Anionic Surface*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **366(1)**, 31-39 (1999).
127. VAYSSE, L. and ARVEILER, B., *Transfection Using Synthetic Peptides: Comparison of Three DNA-Compacting Peptides and Effect of Centrifugation*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1474(2)**, 244-250 (2000).
128. PODRORNIK, R., STREY, H.H., PARSEGIAN, V.A., *Molecular Interactions in Lipids, DNA, and DNA-Lipid Complexes*, Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies, N.S.Templeton and D.D.Lasic, M. (ed.), Vol. 11, p. 209-239, Dekker Inc., New York Basel, 2000.
129. HOFLAND, H.E.J., SHEPHARD, L. and SULLIVAN, S.M., *Formation of Stable Cationic Lipid/DNA Complexes for Gene Transfer*, *Proceedings of the National Academy Sciences*, **93**, 7305-7309 (1996).
130. PIVA, R., LAMBERTINI, E., PENOLAZZI, L., FACCILOLO, M.C., LODI, A., AGUIARI, G., NASTRUZZI, C. and del SENNO, L., *In Vitro Stability of Polymerase Chain Reaction-Generated DNA Fragments in Serum and Cell Extracts*, *Biochemical Pharmacology*, **56(6)**, 703-708 (1998).
131. KREISS, P., CAMERON, B., RANGARA, R., MAILHE, P., AGUERRE-CHARRIOL, O., AIRIAU, M., SCHERMAN, D., CROUZET, J. and PITARD, B., *Plasmid DNA Size does not Affect the Physicochemical Properties of Lipoplexes but Modulates Gene Transfer Efficiency*, *Nucleic Acids Research*, **27**, 3792-3798 (1999).
132. KENNEDY, M.T., POZHARSKI, E.V., RAKHMANOVA, V.A., MACDONALD, R.C., *Factors Governing the Assembly of Cationic Phospholipid-DNA Complexes*, *Journal Biophysics*, **78(3)**, 1620-1633 (2000).
133. *pUC Plasmids*, Sigma Kataloğu, s.1621, (1998).
134. BAYSAL, K., 'Klonlama' Protein Yapı İşlev İlişkilerinin İncelenmesinde Güçlü Bir Teknik: Yönlendirilmiş Mutagenез, Marmara Araştırma Merkezi



Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Lisansüstü Uygulamalı Eğitim Kurs Kitapçığı, s.37-38, 1998.

135. *subcloning the insert in a puc18 plasmi*, <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~binder/thesis/node47.html>, (2001).
136. ÖNER, F., *Süspansiyonlar*, Farmasötik Teknoloji –Temel Konular ve Dozaj Şekilleri-, A.Z. Gürsoy (ed), Bölüm 20, s.257-272. Kontrollü Salım Sistemler Derneği, İstanbul 2004.
137. WESTESEN, K., SIEKMANN, B., *Investigation of the Gel Formation of Phospholipid-Stabilized Solid Lipid Nanoparticles*, International Journal of Pharmaceutics, **151** (1), s. 35-45 (1997).
138. YILDIZ.,A., GENÇ, Ö., BEKTAŞ, S., *X-Işınları Yöntemleri*, Enstrümantal Analiz Yöntemleri, 2. Baskı, Bölüm 6, s.129-148, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, Ankara, 1997.
139. YILDIZ.,A., GENÇ, Ö., BEKTAŞ, S., *Termal Analiz Yöntemleri*, Enstrümantal Analiz Yöntemleri, 2. Baskı, Bölüm 14, s.273-284, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, Ankara, 1997.
140. CELEBİ., N., *Koloitler*, Farmasötik Teknoloji –Temel Konular ve Dozaj Şekilleri-, A.Z. Gürsoy (ed), Bölüm 19, s.245-255. Kontrollü Salım Sistemler Derneği, İstanbul 2004.
141. SOUTO, E. B., WISSING, S. A., BARBOSA, C. M. MÜLLER, R. H., *Evaluation of the Physical Stability of SLN and NLC Before and After Incorporation Into Hydrogel Formulations*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **58** (1), 83-90 (2004).
142. JENNING, V., GOHLA, S., *Comparison of Wax and Glyceride Solid Lipid Nanoparticles (SLN®)*, International Journal of Pharmaceutics, **196**, 219-222 (2000).
143. JENNING, V., THÜNEMANN, A. F., GOHLA, S. H., *Characterisation of a Novel Solid Lipid Nanoparticle Carrier System Based on Binary Mixtures of Liquid and Solid Lipids*, International Journal of Pharmaceutics, **199**(2), s. 167-177 (2000)
144. Specifications Sheet Gelucire® 33/01, Gattefosse (200).
145. RYBENKOV, V. V., VOLOGODSKII A. V., COZZARELLI, N. R., *The Effect of Ionic Conditions on the Conformations of Supercoiled DNA. I. Sedimentation Analysis*, Journal of Molecular Biology, **267** (2), 299-311 (1997).

146. MAZUR, J., JERNIGAN, R. L., SARAI, A., *Conformational Effects of DNA Stretching*, *Molecular Biology*, **37** (2), 277-287 (2003).
147. ZUIDAM, N. J., BARENHOLZ, Y., MINSKY, A., *Chiral DNA Packaging in DNA-Cationic Liposome Assemblies*, *FEBS Letters*, **457**, 419-422 (1999).