

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERMAL UYGULAMA AMACIYLA DNA TAŞIYICI SİSTEMLERİN**  
**HAZIRLANMASI**

**Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Uğur KARAGÖZ**

**İZMİR**

**2014**



**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DERMAL UYGULAMA AMACIYLA DNA TAŞIYICI SİSTEMLERİN**  
**HAZIRLANMASI**

**Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Uğur KARAGÖZ**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Gülten KANTARCI**

**İZMİR**

**2014**



## DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Prof. Dr. A. Gülten KANTARCI



(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Gökhan ERTAN



Üye : Prof. Dr. Makbule AŞIKOĞLU

**Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:** 29.12.2014

## ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi ve manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol gösteren, sorumluluk bilinci ile yetişmemi sağlayan saygıdeğer hocam ve danışmanım Prof. Dr. A. Gülten KANTARCI'ya,

Eğitimim sırasında Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında her türlü çalışmamı destekleyen maddi ve manevi yardımını esirgemeyen Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeki Topçu'ya,

Tez projemin önemli bir bölümü olan hücre kültürü çalışmalarında bana laboratuvarlarını açan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cumhuriyet Gündüz'e ve tüm çalışmalarında bana yardımcı olan, desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Vildan Bozok Çetintaş'a,

Formülasyonlarımın karakterizasyon denemelerimi gerçekleştirebilmem için Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarını kullanmama izin veren Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Özgen Özer'e, partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümlerinde kullandığım Malvern Zetasizer Nano ZS cihazından faydalanmamı sağladığı için Prof. Dr. H. Yeşim Karasulu'ya, in vitro salım çalışmalarında kullandığım Logan Instruments Franz Difüzyon hücreleri ile deneylerimde bana yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Neslihan Üstündağ Okur'a,

Desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Yücel Başpınar'a,

Çalışmalarım süresince yardım ve destekleriyle yanımda olan dostlarım ve aynı zamanda çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Mustafa Kotmakçı, Araş. Gör. Hasan Akbaba, Araş. Gör. Gülşah Erel, Araş. Gör. Gizem Yaylı, Araş. Gör. Esra Öztürk, Uzm. Biyolog Müge Şenarısoy, Araş. Gör. Dr. Sevil Zencir ve Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör.'si İsmail Öztürk'e,

Beni hayatım boyunca destekleyen, sevgi ve fedakarlıklarını esirgemeyen aileme,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İzmir, 2014

Uğur KARAGÖZ

# ÖZET

## DERMAL UYGULAMA AMACIYLA DNA TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI

Tez çalışmamızın amacı dermal uygulamaya uygun özelliklere sahip DNA(deoksiribonükleik asit) taşıyıcı sistemler geliştirerek, özelliklerini belirlemek; optimal olarak seçilen formülasyonların transfeksiyon etkinliklerini ve dermal uygulanabilirliklerini saptamaktır.

Ön formülasyon denemelerinde mikroemülsiyon formülasyonu için Labrafac PG, Labrafac Lipophile ve Peceol yağları ile Plurol Oleique CC, Lauraglycol FCC, Lauraglycol 90, Capryol PGMC, Labrafil M sürfaktan olarak kullanılmıştır. KLN (Katı lipit nanopartikül) formülasyonu için yağ olarak Precirol ATO 5, katyonik özellik kazandırmak için Esterquat-1, CTAB, DDAB katyonik maddeleri ile çalışılmıştır. Faz diyagramları oluşturulduktan sonra, berrak sistemler oluşturan formülasyonlar seçilerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Mikroemülsiyon formülasyonlarında damlacık boyutu, KLN'lerde partikül boyutu 100 nm'nin altında olan formülasyonlar seçilerek, salım çalışmaları ve hücre kültüründe transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.

Mikroemülsiyon formülasyonu için katyonik madde olarak kitozan seçilmiştir. Kitozan, doğal bir biyopolimer olması, toksik olmaması nedeniyle ve deriye kolayca adsorbe olabilme yeteneğinden dolayı tercih edilmiştir. Oluşturulan mikroemülsiyonun iç sulu fazına kitozan eklenerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. KLN formülasyonu için EQ1(Esterquat-1) en uygun katyonik madde olarak saptanmıştır. Mikroemülsiyon formülasyonu S/Y türünde olduğu, yüksek oranda yağ içerdiği için jel görüntülemesi gerektiren denemeler gerçekleştirilememiştir. KLNeq (EQ1 içeren KLN formülasyonu) formülasyonu için karakterizasyon çalışmalarının ardından SDS teşvikli DNA salım çalışması yapılarak, formülasyonun DNA'yı salma etkinliği test edilmiştir. Daha sonra DNazI (Deoksiribonükleaz) koruma çalışmasıyla formülasyonun DNA'yı nükleaz parçalamasından koruyup korumadığı araştırılmıştır. Deneylerin sonucunda KLNeq formülasyonun DNA'yı hem koruduğu, hem de SDS'e maruz kaldığında salabildiği

belirlenmiştir. Bu denemelerde optimal kompleksleşme oranı DNA:KLN 1:1 (h/h) olarak saptanmıştır.

İn vitro salım çalışmalarıyla KLNeq formülasyonun selüloz membrandan geçişi araştırılmıştır. Franz difüzyon hücreleriyle yapılan bu denemede reseptör kompartmandan alınan örneklerde ilk yarım saat sonucunda 5 µg/mL konsantrasyonunda DNA saptanmıştır. 24 saatlik denemenin ardından 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24. saatlerde alınan örnekler liyofilize edilerek 10 kat konsantre hale getirildikten sonra DNA konsantrasyonları tekrar ölçülmüştür. Bu ölçümlerde ilk yarım saat için DNA konsantrasyonu 18,1 µg/mL bulunmuştur.

L929 fare fibroblast hücre kültürü çalışmalarıyla formülasyonların toksisitesi araştırılmış, toksik olan dozlar belirlenmiştir. KLNct (CTAB içeren KLN formülasyonu) formülasyonunun uygulanan tüm dozlarında formülasyonun toksik olduğu saptanmış, KLNeq ve ME (Mikroemülsiyon) formülasyonlarında uygulanan dozlar içinde 5 µL doz uygun kabul edilmiştir. Toksik olmayan formülasyonlar hücre kültürüne uygulandıktan sonra floresan mikroskopta görüntüleri alınmıştır. pEGFP-C1 plazmit DNA'nın hücrelere aktarıldığı, yeşil floresans proteinin varlığının gözlenmesiyle belirlenmiştir.

KLNeq ve KLNeq.DNA (EQ1 içeren ve DNA ile kompleksleştirilmiş KLN formülasyonu) formülasyonlarının TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) görüntülemeleri yapılmıştır, ancak ME (Mikroemülsiyon) ve ME.DNA (DNA içeren Mikroemülsiyon formülasyonu) formülasyonları yüksek yağ içerikleri sebebiyle görüntülenememiştir. KLNeq formülasyonunun stabilitesi 2 ay boyunca takip edilmiştir. Bu süre boyunca partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri alınmıştır. ME formülasyonu da aynı süre zarfında görsel olarak izlenmiş ve yapısında hiçbir değişme görülmemiştir.

Sonuç olarak, geliştirilen küçük partikül boyutuna sahip ME.DNA ve KLNeq.DNA sistemler, gen tedavisi amacıyla transdermal uygulamalar için önerilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** mikroemülsiyon; katı lipit nanopartikül; DNA taşıyıcı sistem; salım çalışması; transfeksiyon



# ABSTRACT

## PREPARATION OF DNA DELIVERY SYSTEMS FOR DERMAL APPLICATIONS

The aim of this study was to develop and characterize DNA delivery systems suitable for dermal applications, and to determine transfection efficiency of optimal formulations.

In pre-formulation studies Labrafac PG, Labrafac Lipophile and Peceol were used as oils, Plurol Oleique CC, Lauraglycol FCC, Lauraglycol 90, Capryol PGMC, Labrafil M were used as surfactants for microemulsion formulation. Precirol ATO 5 was used as oil for solid lipid nanoparticle formulation, Esterquat-1, CTAB and DDAB as cationic materials used for gaining cationic specialities. Transparent formulations were selected for characterization studies after forming ternary phase diagrams. Formulations which have droplet and particle sizes below 100 nm were selected for further experiments such as *in vitro* release and transfection studies.

Chitosan was selected as cationic substance for microemulsion formulation because of its ability to easily adsorb to the skin and its non-toxic natural biopolymer character. Characterization studies were carried out after adding chitosan to internal water phase of microemulsions. Esterquat1 was the most suitable cationic material for solid lipid nanoparticle formulation. Experiments that requiring gel imaging could not be carried out for microemulsion formulation because of its type (w/o) and high oil content. DNA release capacity of KLNeq.DNA formulation was examined with SDS-induced release study after its characterization studies. Then, protection from nuclease degradation was investigated with DNaseI protection study. As the result of all studies, release of DNA from KLNeq.DNA complexes in the presence of SDS and protection against DNaseI were proven. Optimal complexation ratio of DNA:KLN was determined as 1:1 (v/v).

*In vitro* release of DNA from KLNeq.DNA system through cellulose membrane was investigated. 5 µg/mL DNA was found in the samples that was taken from receptor compartment at the 30th minute from the beginning of Franz diffusion cell trials. Release study was repeated with 10 fold concentrated samples, and then in 30th minute 18,1 µg/mL DNA concentration was determined.

Toxicity of formulations was investigated on L929 mouse fibroblasts cells. All applied doses of the KLNct formulation were found toxic. 5  $\mu$ L dosage of KLNeq.DNA and ME.DNA was found non-toxic and applicable. Fluorescent images of non-toxic formulations taken after applying cell culture study. Transfection of pEGFP-C1 plasmid DNA to cells were determined by observing the presence of green fluorescent protein.

TEM imaging of KLNeq and KLNeq.DNA formulations were carried out, but because of microemulsions high oil content, their TEM images could not be obtained. Stability of KLNeq formulation was observed for 2 months by measuring particle size, PDI and zeta potential values. Microemulsion formulation was visually monitored at the same time and no changes were determined.

As the result, developed ME.DNA and KLNeq.DNA systems with particle sizes below 100 nm may be suggested for transdermal gene therapy applications.

**Keywords:** microemulsion; solid lipid nanoparticle; DNA delivery system; release study; transfection

# İçindekiler

Şekiller Dizini .....	Xi
Tablolar Dizini.....	xiii
Kullanılan Kısaltmalar .....	XIV
<b>I. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Deri Hakkında Genel Bilgiler .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Derinin Yapısı.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. Epidermis.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.1. Bazal Tabaka (Stratum Germinativum).....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.2. Prickle Tabakası (Stratum Spinosum).....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.3. Granüler Tabaka (Stratum Granulosum) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.4. Stratum Lucidum.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.5.Boynuzsu Tabaka (Stratum Corneum) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2. Dermis .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3. Hipodermis .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Deriden Geçiş Yolları.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1. Transselüler Yol.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2. İnterselüler Yol .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.3. Porlardan Geçiş.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Gen Tedavisi.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Gen Tedavisi Yöntemleri.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.1. Eşey Hücre Gen Tedavisi .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.2. Somatik Hücre Gen Tedavisi.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.1. Virüsler .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2. Non-Viral Yöntemler .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2.1. Çıplak DNA Enjeksiyonu .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN) .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Katı Lipit Nanopartiküllerin Özellikleri.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Katı Lipit Nanopartiküllerin Avantaj Ve Dezavantajları.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Katı Lipit Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3.1.1. Sıcak Homojenizasyon .....</b>	<b>13</b>

3.3.1.2. Soğuk Homojenizasyon.....	13
3.3.2. Mikroemülsiyon Yöntemi.....	14
3.3.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi. ....	14
3.3.4. Yüksek Hızda Karıştırma ve/veya Ultrasonikasyon Yöntemi.....	15
3.4. Katı Lipit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	15
3.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini.....	15
3.4.2. Partikül Şekli Tayini.....	15
3.4.3. Zeta Potansiyel Ölçümü .....	15
3.5. Katı Lipit Nanopartiküllerin Stabilitesi.....	16
3.6. Katı Lipit Nanopartiküllerin Liyofilizasyonu .....	16
3.7. Katı Lipit Nanopartiküllerin Sterilizasyonu .....	17
3.8. Katı Lipit Nanopartiküllerin Toksisitesi.....	17
3.9. Katı Lipit Nanopartiküllerden Etkin Madde Salımı .....	17
3.10. Katı Lipit Nanopartikülleri Uygulama Yolları .....	18
3.10.1. Topikal Uygulama.....	18
3.10.2. Oral Uygulama .....	19
3.10.3. Parenteral Uygulama.....	19
3.10.4. Pulmoner Uygulama .....	19
3.10.5. Oküler Uygulama.....	19
3.10.6. Aşı Adjuvanı.....	19
4. Mikroemülsiyonlar .....	20
4.1. Mikroemülsiyonların Yapısı .....	21
4.2. Mikroemülsiyonların Formülasyonu .....	22
4.3. Mikroemülsiyonların Uygulama Yolları.....	24
4.3.1. Oral Uygulama.....	24
4.3.2. Topikal ve Transdermal Uygulama .....	24
4.3.3. Diğer Uygulama Yolları .....	24
5. Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB) .....	25
6. Franz Difüzyon Hücresi .....	26
II. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler .....	28
1.1. Kullanılan Kimyasallar Listesi .....	28
1.2. Kullanılan Kitler .....	29

1.3. Kullanılan Cihazlar.....	29
2. Yöntemler .....	31
2.1. Plazmit DNA Seçimi .....	31
2.1.1. Plazmit DNA'nın Çoğaltılması .....	31
2.1.1.1. Besi Yeri Hazırlanması.....	32
2.1.1.2. Bakteri Stoğu .....	33
2.1.1.3. Kompetan Hücre Hazırlanması .....	33
2.1.1.4. Transformasyon .....	33
2.1.2. Plazmit DNA İzolasyonu .....	34
2.1.2.1. Deney Öncesi İşlemler.....	34
2.1.2.2. Deney Basamakları .....	34
2.1.3. Plazmit DNA'nın Karakterizasyonu .....	35
2.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi İle Analiz .....	35
2.1.3.2. Restriksiyon Enzimleri İle Kesim .....	36
2.1.3.3. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	38
2.2. Formülasyon Çalışmaları .....	38
2.2.1. Katı Lipit Nanopartikül (KLN) Formülasyonunun Hazırlanması ...	38
2.2.1.1. Yağ/Su (Y/S) Mikroemülsiyon Hazırlanması .....	38
2.2.1.2. Mikroemülsiyondan Dilüsyon İle KLN Hazırlanması.....	38
2.2.2. Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması .....	39
2.2.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları.....	39
2.2.2.2. Üçgen Faz Diyagramı Oluşturma .....	39
2.2.2.3. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Katyonik Madde Eklenmesi... 40	
2.3. Formülasyonların DNA İle Kompleksleştirilmesi.....	40
2.3.1. Mikroemülsiyon Formülasyonunun DNA İle Kompleksleştirilmesi. 40	
2.3.2. KLN Formülasyonunun DNA İle Kompleksleştirilmesi .....	41
2.4. Formülasyonların Karakterizasyonu .....	42
2.4.1. Partikül Boyutu Dağılımı Analizi.....	42
2.4.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü .....	42
2.4.3. Ph Ölçümü .....	42
2.4.4. Refraktif İndeks ve Viskozite Ölçümleri .....	42
2.4.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) İle Analiz .....	43
2.5. SDS Teşvikli DNA Salım Çalışması.....	43

2.6.	DNaz I Enziminden Korumanın Araştırılması .....	44
2.7.	Hücre Kültürü Çalışmaları .....	45
2.7.1.	Sitotoksisite Çalışması .....	45
2.7.2.	Transfeksiyon Yeteneğinin Araştırılması .....	46
2.7.3.	Transfeksiyon Etkinliğinin Flow(Akım) Sitometri Yöntemiyle Saptanması .....	46
2.8.	İn-Vitro Salım Çalışması .....	47
2.9.	Stabilite Çalışması .....	47
III.	BULGULAR .....	48
1.	Plazmit DNA Eldesine Ait Bulgular .....	48
2.	Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular .....	48
2.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları .....	48
2.1.1.	Mikroemülsiyon Formülasyonuna Ait Ön Formülasyon Çalışması .	48
2.1.2.	KLNeq Formülasyonuna Ait Ön Formülasyon Çalışması .....	49
2.2.	DNA-KLN Kompleksleşme Denemeleri .....	51
2.3.	Ph, Viskozite ve Refraktif İndeks Ölçümleri .....	52
2.4.	Partikül Büyüklüğü Dağılımı, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Ölçümleri .....	52
3.	SDS Teşvikli DNA Salım Çalışması .....	53
4.	DNaz I Enziminden Korumanın Araştırılması .....	55
5.	Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular .....	55
6.	Transfeksiyon Yeteneğinin Floresans Mikroskopta Gözlenmesi .....	60
7.	Flow(Akım) Sitometri Yöntemine Ait Bulgular .....	60
8.	İn-Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular .....	60
9.	Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular .....	60
10.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleri .....	64
IV.	TARTIŞMA .....	66
V.	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	72
	Kaynaklar .....	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Derinin Yapısı .....	3
Şekil 2: Derinin Tabakaları .....	4
Şekil 3: Deriden geçiş yolları .....	7
Şekil 4: Adenovirüs'ün yaşam döngüsü .....	9
Şekil 5: Retrovirüs'ün yaşam döngüsü .....	10
Şekil 6: Y/S, S/Y ve geçişli(bicontinuous) mikroemülsiyonların yapısı .....	22
Şekil 7: Mikroemülsiyon oluşum alanları .....	23
Şekil 8: HLB sisteminin Emülsiyon oluşumuna etkisi .....	26
Şekil 9: Franz difüzyon hücresi .....	27
Şekil 10: pEGFP-C1 plazmit gen haritası .....	31
Şekil 11: Elde edilen plazmit DNA'nın enzim kesimleri ile kontrolüne ilişkin jel görüntüsü.....	48
Şekil 12: Mikroemülsiyon formülasyonuna ait faz diyagramı.....	49
Şekil 13: KLN formülasyonuna ait faz diyagramı .....	50
Şekil 14: DNA-KLN kompleksleşme denemesine ilişkin jel görüntüsü .....	51
Şekil 15: DNA içeren formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı.....	53
Şekil 16: KLNeq formülasyonuna ait SDS teşvikli DNA salım çalışması agaroz jel görüntüsü.....	54
Şekil 17: KLNeq ve KLNct formülasyonlarının kompleksleşmelerinin ve SDS teşvikli salım yeteneklerinin karşılaştırılması .....	54
Şekil 18: DNaz I koruma testine ilişkin agaroz jel görüntüsü .....	55
Şekil 19: DNA yüklenmiş ve yüklenmemiş mikroemülsiyon formülasyonunun belirtilen dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	56
Şekil 20: KLNeq formülasyonunun (DNA ile kompleksleştirilmiş ve kompleksleştirilmemiş) belirtilen dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	57
Şekil 21: DNAct formülasyonunun (DNA ile kompleksleştirilmiş ve kompleksleştirilmemiş) belirtilen dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	58
Şekil 22: ME.DNA ve KLNeq.DNA formülasyonları için 3 ve 5 µL dozlarının % canlılık grafikleri.....	59
Şekil 23: Flow Sitometride transfekte ve transfekte olmayan hücrelerin karşılaştırılması .....	61
Şekil 24: Transfekte olan L929 fare fibroblast hücrelerinin floresans mikroskop görüntüsü.....	62

Şekil 25: Zamana bağılı olarak KLNeq.DNA formülasyonundan salınan DNA miktarı .....	63
Şekil 26: KLNeq formülasyonunun zamana bağılı partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değişimi.....	64
Şekil 27: KLNeq ve KLNeq.DNA formülasyonlarının CTEM görüntüleri .....	65



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Mikroemülsiyonlar ile Klasik emülsiyonların karşılaştırılması .....	20
Tablo 2: HLB değerleri ile emülgatör kullanımı arasındaki ilişki .....	25
Tablo 3: Luria-Bertani Sıvı Besi Yeri (LB) .....	32
Tablo 4: Luria-Bertani Katı Besi Yeri (LBA).....	32
Tablo 5: Plazmit DNA kontrolü amacıyla Enzim Kesimi deneyi için kullanılan maddeler ve miktarları .....	37
Tablo 6: Enzim kesimi sonrası örneklerin jele yüklenmesi .....	37
Tablo 7: Mikroemülsiyon formülasyonu seçiminde kullanılan maddeler .....	39
Tablo 8: Üçgen faz diyagramı oluşturmak için kullanılan maddeler ve miktarları ...	40
Tablo 9: DNA:KLN Kompleks Hazırlanması.....	41
Tablo 10: SDS teşvikli DNA salım çalışması .....	44
Tablo 11: DNaz I koruma deneyi.....	45
Tablo 12: KLN için üçgen faz diyagramı çiziminde kullanılan formülasyon yüzdeleri .....	50
Tablo 13: KLNeq formülasyonu için Y/S mikroemülsiyonunun hazırlanması .....	51
Tablo 14: Formülasyonların Partikül boyutu, PDI ve Zeta potansiyelleri .....	52
Tablo 15: KLNeq formülasyonunun partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksinin belirli zaman aralıklarıyla ölçümüne ilişkin sonuçlar .....	60
Tablo 16: Nanodrop cihazından alınan ölçüm sonuçları .....	63

## Kullanılan Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklaması
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksi riboNükleik Asit
pDNA	Plazmit DNA'sı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EQ1	Esterquat-1
EtBr	Etidyum Bromür
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Fosfat tamponlu fizyolojik tuz çözeltisi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Sür/Kos	Sürfaktan-Kosürfaktan karışımı
TAE	Tris-Asetat-EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
XTT	Sodium3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonicacid.
KLN	Katı Lipit Nanopartikül
ME	Mikroemülsiyon
ME.DNA	pDNA'sı içeren mikroemülsiyon formülasyonu
KLN.DNA	pDNA'sı ile kompleleştirilmiş katı lipit nanopartikül formülasyonu
KLNeq.DNA	pDNA'sı ile kompleleştirilmiş, katyonik madde olarak esterquat-1 içeren katı lipit nanopartikül formülasyonu
KLNct.DNA	pDNA'sı ile kompleleştirilmiş, katyonik madde olarak CTAB içeren katı lipit nanopartikül formülasyonu
UV	UltraViyole
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Y/S	Yağ/Su mikroemülsiyonu
S/Y	Su/Yağ mikroemülsiyonu
HLB	Hidrofil-Lipofil Denge
LB	Luria-Bertani sıvı besi yeri

LBA	Luria-Bertani katı besi yeri
UP su	Ultra Saf su
L	Lesitin
T80	Tween 80
EtOH	Etanol
(h/h) veya (h:h)	Hacim/Hacim oranını temsil etmektedir
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
CTEM	Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu
PDI	Polidispersite İndeksi
YFP	Yeşil Floresan Protein
SS	Standart Sapma
rpm	Devir/Dakika

## GİRİŞ

DNA aktarımı ile tedavi yöntemleri son yıllarda özellikle eczacılık ve tıp alanında büyük önem kazanmaktadır. Gen tedavisinin genel amacı, hastalıklı genleri tespit edip yerine sağlıklı kopyalarını yerleştirmektir. Bu yöntemdeki temel sorun gen aktarımı yollarıdır. Gen aktarımı için viral ve non-viral sistemler geliştirilmiştir. Viral yolların immunojeniteye yol açabilmesi yüzünden non-viral sistemler daha çok tercih edilmektedir.

Çalışmamızda da tercih ettiğimiz non-viral sistemler, DNA ile kompleksleşerek veya DNA'yı içerisine alıp taşıması, bu yol ile dış etkenlerden koruması ve saklama kolaylıkları sebebiyle seçilmiştir. Katı lipit nanopartiküller ve mikroemülsiyonlar non-viral DNA aktarımı için oldukça uygun yöntemlerdir. Bu sistemlere katyonik madde ilavesi mümkün olduğundan DNA'yı sisteme entegre etmek zor değildir.

Dermal yolla DNA aktarımı uygulama kolaylığı açısından, oral ve parenteral yola göre daha üstündür. Katı lipit nanopartiküller ve mikroemülsiyonlar, bünyelerinde bulunan deriden geçişi arttırıcı maddeler ve kontrollü salım sağlayabilmeleri nedeniyle bu yol için en uygun sistemlerdir.

Bu tez çalışmasının amacı, dermal verilise uygun katyonik katı lipit nanopartikül ve mikroemülsiyon sistemleri hazırlayarak bu sistemlere DNA entegre edip özelliklerini belirlemek, DNA salım ve transfeksiyon etkinliklerini test etmektir.

## **I. GENEL BİLGİLER**

### **1. Deri Hakkında Genel Bilgiler**

Deri, vücudu dış çevreden koruyan bir kılıf oluşturur ve altındaki dokuların su kaybını önler. Deri vücut hareketi sonucunda kalıcı kıvrımlar oluşturmayacak kadar esnek ancak uyarıları algılayabilecek kadar incedir. Derinin aynı zamanda sentez, metabolizma ve vücut sıcaklık kontrolünü sağlayan ter salgısının üretimi ve terleme yoluyla atık su ürünlerinin atılımı gibi ek görevleri de vardır. Deri vücudu antijenik uyarılardan korur (1).

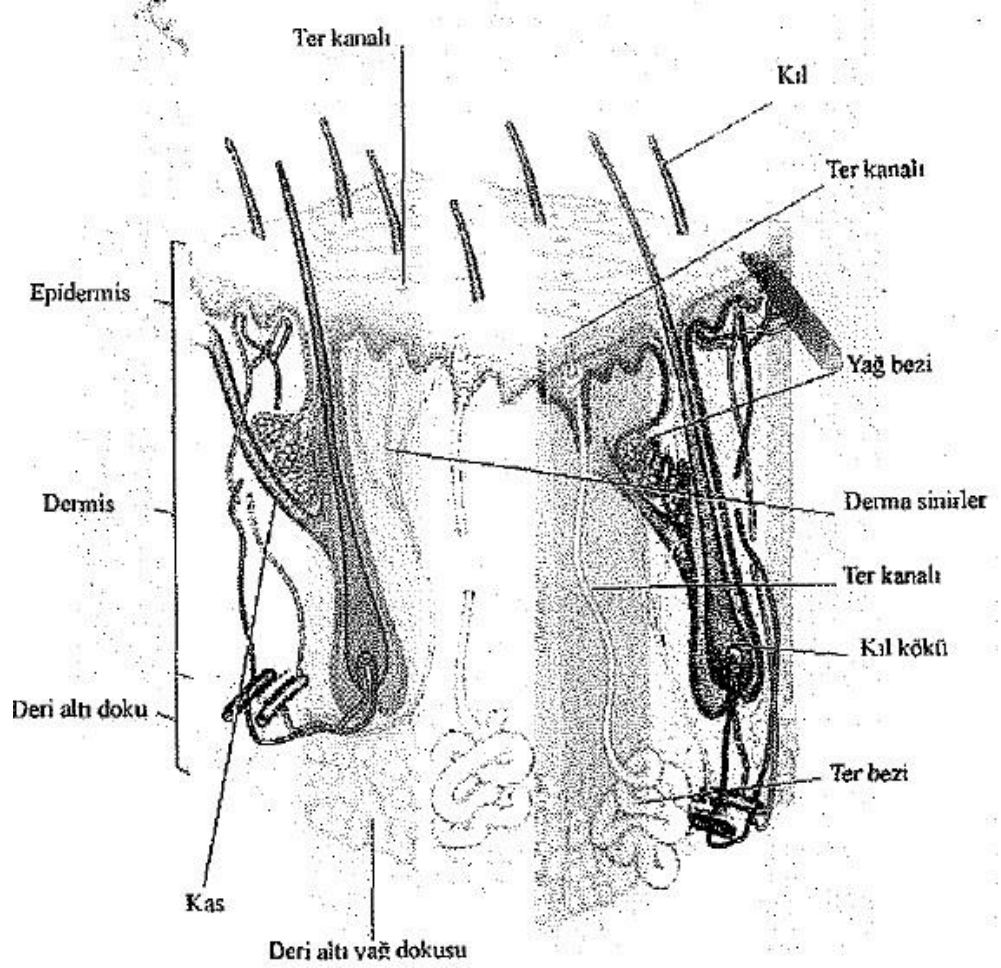
Deri, insan vücudundaki en büyük organdır. Enjeksiyonlar ve oral aktarım yollarına kıyasla, ilaç uygulamasında acısız bir arayüz sağlar (2). Deri, 0.5-3 mm kalınlığında bir organdır. 1.7-2 m<sup>2</sup> büyüklüğündedir. Bütün vücudu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere karşı korur. Vücut sıcaklığını korumada termostat gibi rol oynar. Kan basıncını denetler. Ayrıca UV ışınlarına karşı iyi bir koruma sağlar. Derinin yüzeyi bir asit mantosuyla kaplıdır. pH'ı 5.2-5.6 arasındadır. Ayrıca yüksek miktarda kalsiyum iyonu içerir (3). Derinin yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.

#### **1.1. Derinin Yapısı**

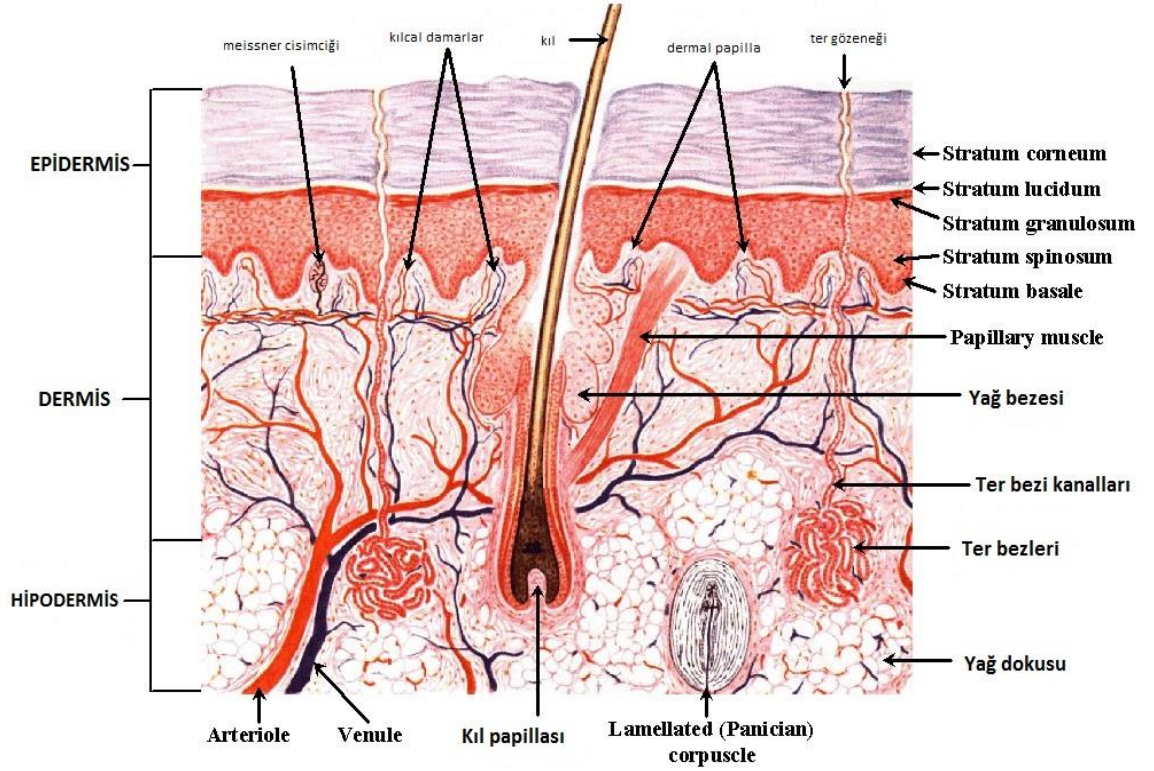
Deri başlıca 3 tabakadan meydana gelir. Bunlar dıştan içe doğru:

- Epidermis
- Dermis
- Hipodermis

Derinin tabakaları Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Derinin Yapısı (1).



Şekil 2: Derinin Tabakaları (4).

### 1.1.1. Epidermis

Derinin en dış tabakasıdır. Deri yüzeyine ilaç uygulandığında, ilaç ya epidermisten ya da kıl ve ter kanalları gibi uzantılardan deri altına geçecektir (5). Kan damarı ve lenfatik sistem içermez. Ağrının algılanması için bazı sinir sonlanmaları içerir. Kalınlığı bulunduğu bölgeye göre 150-180  $\mu\text{m}$  arasında değişir (1). Yaklaşık olarak üç haftada epidermisin tümü yenilenir (3). Epidermis 5 tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar içten dışa doğru şu şekilde sıralanırlar:

- Bazal tabaka (stratum germinativum)
- Prickle tabakası (stratum spinosum)
- Granüler tabaka (stratum granulosum)
- Stratum lucidum
- Boynuzsu tabaka (stratum corneum)

#### **1.1.1.1.Bazal Tabaka (Stratum Germinativum)**

Epidermisin en derin tabakasıdır. Diğer tabakalara göre daha hızlı bölünen, çoğalabilen hücreleri içerir ve bu bitişik hücreler deri yüzeyine doğru ilerleyerek farklılaşır ve diğer tabakaları oluşturacak şekilde yer değiştirir. Bu hücreler bu tabakada iken yuvarlak veya yumurta şeklindedirler. Dermise, hemidesmosom adı verilen bağlantı birimleri ile, birbirlerinde de desmosom denilen bağlantı birimleri ile bağlanmışlardır. Deri pigmentini oluşturan melanositler de bu tabakada mevcuttur (1).

#### **1.1.1.2.Prickle Tabakası (Stratum Spinosum)**

Bazal tabaka hücreleri stratum spinosum'a çıktıkça, şekilleri daha da yuvarlaklaşır. Bunlar komşu hücrelerle bağlantıyı sağlayan, keratin filamentler içeren, hücrelerarası bağlantı yapılarıdır (1).

#### **1.1.1.3.Granüler Tabaka (Stratum Granulosum)**

Bu tabakadaki üç ya da beş hücre kalınlığında düzleşmiş hücreler, keratinizasyonun ilk bulgularını gösterir. Bu tabaka canlı epidermisin en dış sınırındır. Hidrofilik maddelerin difüzyonu için önemli bir bariyer değildir. Ancak stratum corneum zedelenirse difüzyonu sınırlayan bir bariyer haline gelebilir (1).

#### **1.1.1.4.Stratum Lucidum**

Bu hücreler, sadece avuç içi ve ayak tabanı gibi derinin çok kalın olduğu belirli bölgelerde görülebilir (1).

#### **1.2.1.5.Boynuzsu Tabaka (Stratum Corneum)**

Epidermisin en dış tabakasıdır ve 6-15  $\mu\text{m}$  kalınlığındadır. 15-25 kat ölü, yassılaştırmış, uzamış ve tamamen keratinize olmuş korneositleri içerir. Bazal tabakada stern hücreleri denilen ana hücrelerin mitoz bölünme ile çoğalmasıyla genç, yeni hücreler oluşur ve yaşlı hücreler deri yüzeyine doğru yönlendirilir. Bu hücreler farklılaşma (differentiasyon) aşamalarına uğradıkça epidermisin üst tabakalarına geçerler. Farklılaşma 30-40  $\mu\text{m}$  çapında, ancak 0.5  $\mu\text{m}$ 'den daha az kalınlıkta boynuzsu hücrelerin oluşumu ile sonlanır. Yeni boynuzsu hücreler stratum corneum'a geldiklerinde üstteki hücreler pul pul deri yüzeyinden atılırlar. Stratum



corneum 15 günde bir kendini yeniler. Stratum corneum'un %40'ı proteindir. Bunun da %80'i fibröz (lifsi) protein olan keratindir.

Stratum corneum'daki lipit miktarı ve cinsi bulunduğu vücut bölgesine göre değişir. Genel olarak permeabilitenin stratum corneum'daki lipitlere göre belirlendiği/değiştiği kabul edilir (1).

Stratum corneum deri için en dış ve ana fiziksel bariyerdir, bu yüzden derinin altına bir maddenin geçişi için limitleyici basamaktır. Bunun tersine deriden su atılımı için de ana bariyer stratum corneum'dur. Stratum corneumdaki düzleşmiş, anükleer, proteince zengin korneositler extraselüler lipid matrikste sıkıca paketlenmiş halde ikili tabaka halindedirler. Bu düzene 'bricks and mortar' (tuğla ve harç) düzeni denmektedir (6).

### **1.1.2. Dermis**

Dermis, epidermisin altında yer alır. Ondan 5-10 misli daha kalındır. Burada hücre sayısı azdır; buna karşılık kollajen denen oluşumlar vardır. Bunlar, lif demetleri şeklindedir. Görevleri, kan ve lenf kapillerlerini fiziksel olarak destek ve korumadır. Ayrıca bazı bezler, bağışıklık yönünden etkin hücreler ve sinir uçları da buradadır (3).

Nispeten daha az yağ hücresi içeren fibröz bir yapıdadır. Dermis, mast hücreleri ve makrofajlar yoluyla enflamatuvar reaksiyonun ve immün yanıtın oluşumunu sağlar. Dermiste 3 tür bez vardır:

- Pilosebase bezler (saç folikülleri ve yağ bezleri)
- Ekrin bezler (terlemeden sorumludur)
- Apokrin bezler (1).

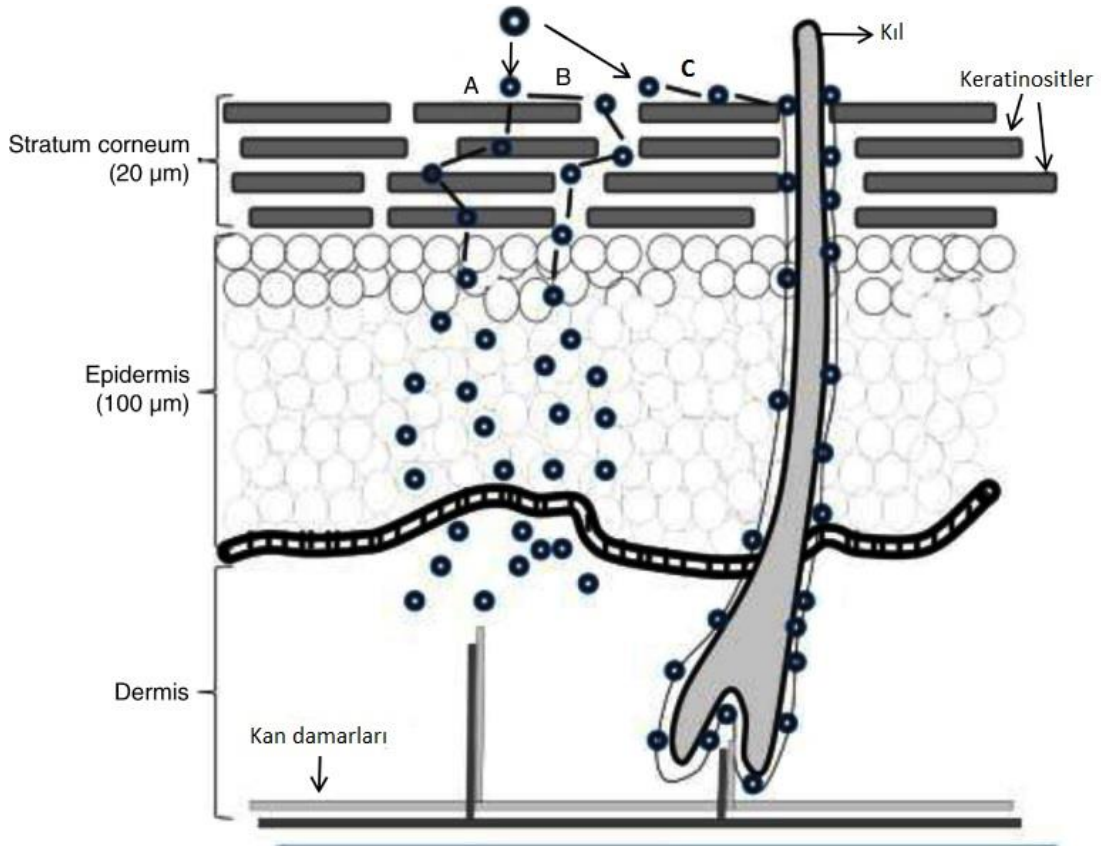
### **1.1.3. Hipodermis**

Bu doku dermisin hemen altındadır ve büyük miktarda yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşur. Fiziksel destek verir, kolajenler yoluyla deriye esneklik sağlar ve ısı yalıtımını temin eder (1). Ayrıca ana sinirler, ter bezleri, arterler, venler ve lenfler hipodermiste yer alır (3). Kalınlığı birkaç milimetreye kadar olabilir. Deri ile alt katmanlarındaki yapılar arasındaki bağlantıyı sağlar (kas ve kemik gibi) (5).

## 1.2. Deriden Geçiş Yolları

Deriden geçiş 3 yol ile olmaktadır (1). Bunlar;

- Transselüler yol
- İnterselüler yol
- Porlardan geçiş ‘tir (şekil 3).



şekil 3: Deriden geçiş yolları (7)

A-Transselüler yol, B-İnterselüler yol, C-Porlardan geçiş

### 1.2.1. Transselüler Yol

Bu yolda madde bariyer hücrelerin içinden geçer. Hücreler büyük ölçüde keratinositlerden oluşmuřtur. Keratin ve keratohiyalin bu hücreleri hemen hemen

geçirmez yapar. Bu yoldan daha ziyade polar olmayan maddeler geçebilir (1). Fazla tabakayı geçmek zorunluluğu, bu yolu “yavaş” bir geçiş yolu yapar. Küçük molekül ağırlıklı maddeler için uygun olabilir (3).

### **1.2.2. İnterselüler Yol**

Bu yolu izleyebilmek için, moleküller önce derideki lipit faza geçmelidirler (partisyon) sonra da difüze olmalıdırlar (3).

Stratum corneum'daki lipit bileşenlerine partisyon yeteneğinin stratum corneum'dan permeabiliteyi saptamada önemli bir parametre olduğu ileri sürülmüştür. Oktanol/su dağılımına dayalı çalışmalar interselüler yolun, penetrasyonun ana yolu olduğunu desteklemektedir (1).

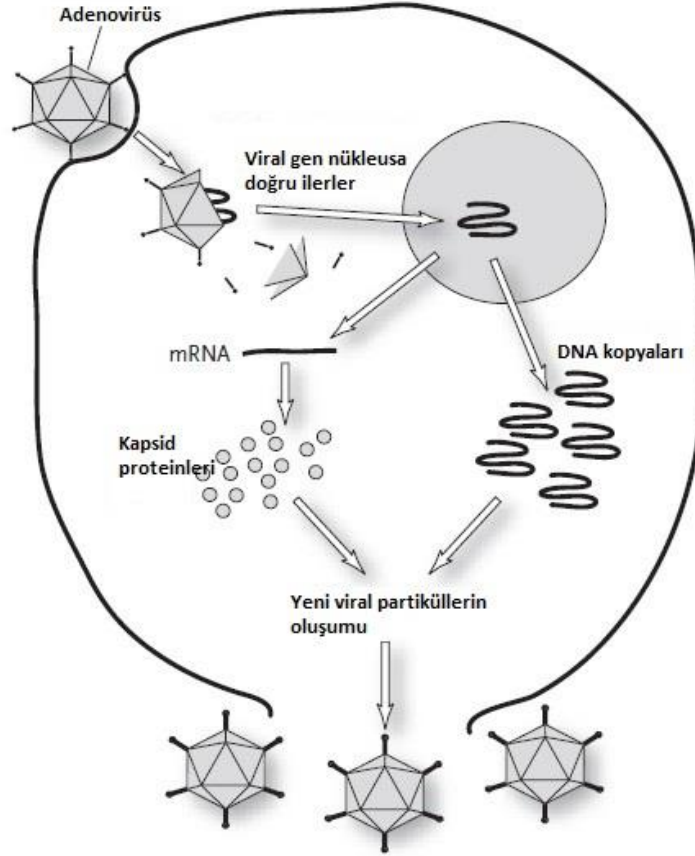
### **1.2.3. Porlardan Geçiş**

Etkin maddeler kıl folikülleri ve ter bezi yoluyla deriden geçebilirler. Özellikle yüklü moleküller bu yolu kullanırlar (3). Düşük dirençli, kısa bir yan geçit yoludur. Kıl foliküllerinin kesit alanları deri yüzey alanının %0,1-0,2' sini kapsar. Deride kıl folikülü sayısı fazla olduğunda, deriden penetrasyonda belirgin bir artma saptanmıştır. Aynı zamanda ter ve yağ kanallarından oluşan yolların, geçişte önemli bir yol oluşturabileceği iddaa edilmiştir (1).

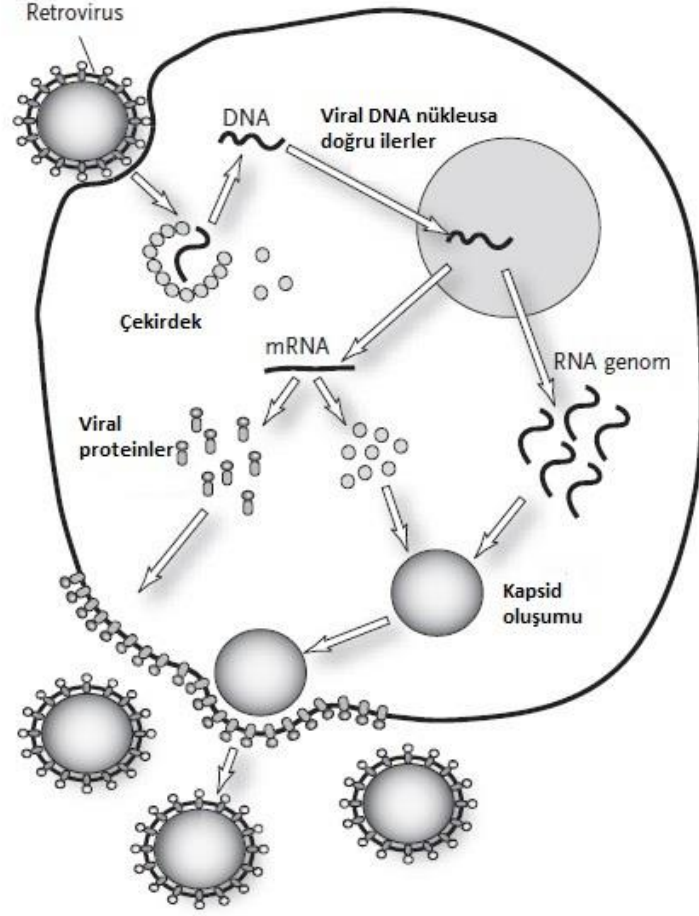
## **2. Gen Tedavisi**

Bir çok hastalık, kalıtsal metabolik hasarlar ve tümörler de dahil, hala tam olarak tedavi edilememektedir. Yaklaşık 15 yıl önce, bu tür hastalıklara yönelik, ilgili bölgelere gen transferi yoluyla tedavi amaçlı projeler üretilmeye başlanmıştır. Gen tedavisi, hücrelere genetik bir materyalin uygun bir yöntemle transfer edilerek hastanın tedavi edilmesidir. Eğer bir mutasyon, enzimin işlevini engelleyecek bir hasara yol açarsa, o enzimin substratı ürüne dönüşmeyecektir. Bu durum hücre hasarına veya toksik bir ürün oluşumuna yol açabilir. Enzimin bozulmamış haliyle tedavi mümkün olmayacaktır, çünkü proteinler hücre membranını geçememektedirler. Bunun aksine teoride; yabancı genleri, virüsleri vektör olarak kullanarak (genellikle adenovirüsler veya retrovirüsler) hücre içinde taşıyabilmek mümkündür. Bunların gen ürünleri hasarlı enzimi yenileyebilir veya toksik ürünü zararsız bir ürüne dönüştürebilir. Bir başka yaklaşım da antisens DNA kullanımındır.

Bu yaklaşım spesifik selüler proteinler ve böylece onların translasyonunu önlemek için mRNA ile hibridize olan polinükleotitleri kapsamaktadır (8).



Şekil 4: Adenovirüs'ün yaşam döngüsü (9).



Şekil 5: Retrovirüs'ün yaşam döngüsü (9).

## 2.1.Gen Tedavisi Yöntemleri

### 2.1.1. Eşey Hücre Gen Tedavisi

Genetik bir bozukluğu önlemek için eşey hücrelerinin (sperm ya da yumurta) genleri değiştirilmesi şeklinde olan tedavidir. Bu tip tedavide genlerde yapılan değişiklik kuşaktan kuşağa aktarılabilir. Bu yüzden bir çok etik ve teknik sorun sebebiyle bir çok ülkede yasaklanmıştır (10).

### 2.1.2. Somatik Hücre Gen Tedavisi

Bu yöntemde hedef doku hastanın somatik hücreleridir. Yani tedavi tamamen hastanın kendisine yöneliktir ve gelecek nesiller üzerinde kalıcı bir etkisi yoktur.

Bu tedavi ex-vivo ve in-vivo olmak üzere iki şekilde yapılır. Ex-vivo tedavide hastadan alınan hücreler bir laboratuvar ortamında çoğaltılır ve iyileştirici genler bu hücrelere bir vektör yardımıyla aktarılır. İyileştirici genleri başarıyla içine almış hücreler seçilir ve çoğaltılır. Çoğaltılan bu hücreler tekrar hastaya nakledilir. In-vivo tedavide ise iyileştirici genler doğrudan hastaya aktarılır (11).

## **2.2.Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler**

### **2.2.1. Virüsler**

Tüm virüsler konakçalarına bağlanır ve genetik materyallerini kendi replikasyon döngülerinin bir parçası olarak konakçı hücreye tanıtırlar. Bu genetik materyal, daha fazla virüs kopyasının oluşturulması için gerekli bilgileri içermektedir. Konakçı hücre bu bilgileri uygular ve virüs kopyalarını oluşturur. Bazı virüs türleri genomlarını konakçının sitoplazmasına aktarırlar, fakat hücreye girmezler. Diğerleri hücre membranının protein molekülleri gibi görünerek penetre olur ve hücreye girerler.

İki ana tip virüs enfeksiyonu mevcuttur: litik ve lizogenik. DNA'nın aktarılmasından kısa süre sonra litik döngüdeki virüsler hızlıca daha fazla virüs üretir ve hücreden taşarak daha fazla hücreyi etkiler. Lizogenik virüsler kendi DNA'larını konakçı hücreye sokarlar ve bir tetikleyici ile karşılaşana kadar yıllarca burada kalabilirler. Bir tetikleyici ile karşılaşıldığında DNA salınır ve yeni virüsler üretilir.

### **2.2.2. Non-Viral Yöntemler**

Non-viral yöntemler, viral yöntemlere göre bir takım avantajlara sahiptir. Basit büyük ölçekli üretim ve düşük konak immunojenitesi bunlardan sadece ikisidir. Transfeksiyon ve gen ekspresyonundaki düşüklük non-viral yöntemlerin dezavantajları sayılıyordu, fakat vektör teknolojisindeki son gelişmelerle transfeksiyon etkinliği viral yöntemler seviyesine ilerlemiştir.

#### **2.2.2.1.Çıplak DNA Enjeksiyonu**

Non-viral yöntem transfeksiyon için en uygun yöntemdir. Klinik deneyler çıplak DNA'nın intramusküler enjeksiyonunda başarılı sonuçlar vermiştir, yine de ekspresyon diğer yöntemlere göre daha düşüktür. Plazmitlerle yapılan denemelere ek olarak, çıplak PCR (polimeraz zincir tepkimesi) ürünü ile de deneme yapılmıştır.

Bunun sonucunda da benzer ya da daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Çıplak DNA'nın hücreye alımı genelde verimsizdir. Bunun için bir çok yöntem geliştirilmiştir ve hala yeni yöntemler ortaya konmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları; elektroporasyon, sonoporasyon, gen tabancası yöntemleridir (12).

### **3. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)**

Katı lipit nanopartiküller, 1991 yılında mevcut koloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak ortaya atılan, yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağın katı lipitle değiştirilmesiyle oluşan katı nanopartiküllerdir. Yağ/su tipi mikroemülsiyonların dondurarak kurutulması veya katı lipit ve lipit karışımlarının yüksek basınçla homojenizasyonu sonucu oluşan, kolloit boyutta, yüzeyinde tek tabaka halinde fosfolipit molekülü bulunan bir katı hidrofobik çekirdekten ibaret, lipozom ve nanopartikül arasında bir yapı olan, ilaç taşıyıcısı olarak kullanılan katı partiküllerdir (13).

#### **3.1.Katı Lipit Nanopartiküllerin Özellikleri**

Katı lipit nanopartiküller, parenteral, oral, oküler ve topikal olarak uygulanabilen, partikül boyutu 50-1000 nm arasında olan, otoklavda sterilize edilebilen, kontrollü ve sürekli dağılım sağlayan, fiziksel stabilitesi yüksek olan taşıyıcılardır (13). KLN'ler genel olarak katı lipitler, emülgatörler ve sudan oluşmaktadırlar. Lipit dispersiyonu stabilize etmek için yüklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak bütün emülgatör tipleri kullanılabilir. %1-5 oranında emülgatör/yardımcı emülgatör kompleksi ile stabilizasyon sağlanabilir. Emülgatör, uygulama yoluna göre seçilir. Emülgatör olarak kullanılan maddelere örnek olarak; lesitinler, poloksamerler, polisorbattlar verilebilir (14).

#### **3.2.Katı Lipit Nanopartiküllerin Avantaj ve Dezavantajları**

Bu sistemlerin üstünlükleri arasında, koloidal büyüklükte olmaları, biyolojik olarak geçimli olmaları, hidrofilik ve lipofilik ilaçların yüklenebilmesi, üretim için gerekli aletlerin basit olması, sterilize edilebilir olmaları ve dondurarak kurutulabilir olmaları sayılabilir. Limitasyonları arasında ise hazırlamada kullanılan sıcak homojenizasyon yönteminde kullanılan yüksek sıcaklığın her etkin madde için uygun olmayışı ve yüksek konsantrasyonda yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin madde kullanımı gösterilebilir (13).

KLN'ler ilk olarak lipozomlara ve emülsiyonlara alternatif olarak geliştirilmişlerdir. Lipozomların bazı avantajları olmasına rağmen (hem hidrofilik hem hidrofobik aktif maddelerin enkapsülasyonu, düşük toksisite ve yüksek terapötik etkinlik) uygulamada başarı oranı yüksek değildir. Bunun nedenleri lipozomların elde edilme yollarındaki karmaşıklık, ölçekleme zorluğu, kısıtlı stabilite ve üretiminin pahalı olmasıdır. KLN'lerin diğer sistemlere göre üstünlüğü ise yukarıda sayılan olumsuzlukları minimuma indirmesidir (düşük sitotoksisite, yüksek transfeksiyon kapasitesi, biyolojik sistemlerde üstün stabilite, geliştirilmiş ölçeklenebilirlik) (15).

### **3.3.Katı Lipit Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri**

#### **3.3.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi**

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi KLN üretimi için en uygun ve etkili yöntemlerden biridir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilir.

##### **3.3.1.1.Sıcak Homojenizasyon**

Etkin madde, erime noktasının 5-10°C üzerinde bir sıcaklığa getirilmiş lipit içerisinde çözündürülür veya çözülür. Etkin madde içeren eriyik, sıcak sulu yüzey etkin madde çözeltisi içinde dağıtılır. Elde edilen ön-emülsiyon homojenizatörden geçirilir. Elde edilen yağ/su nano-emülsiyonu oda sıcaklığına soğutulur. Bu şekilde lipit katılarak katı lipit nanopartiküller elde edilir.

Sıcak homojenizasyon yöntemi, yüksek sıcaklığa maruz kalınan sürenin çok kısa olması nedeniyle ısıya duyarlı maddelere de uygulanabilir. Yüksek sıcaklığa çok duyarlı olan maddeler ile hidrofilik özellikteki maddeler içeren KLN'ler soğuk homojenizasyon yöntemiyle hazırlanırlar (13).

##### **3.3.1.2.Soğuk Homojenizasyon**

Etkin madde içeren lipit eriyiği soğutulur. Bu işlem için kuru buz ya da sıvı nitrojen kullanılabilir. Katı lipit yaklaşık 50-100 µm boyutundaki lipit mikropartiküllere öğütülür ve soğuk yüzey etkin madde çözeltisinde dağıtılır. Elde edilen ön-süspansiyon oda sıcaklığında veya oda sıcaklığının altında homojenize



edilir. Sonuçta katı lipit nanopartiküller elde edilir. Bu yöntem, lipitlerin erimesini önler veya en aza indirirken, hidrofilik ilaçların sulu fazda kaybını da engeller (13).

Soğuk homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon yönteminde ortaya çıkan; sıcaklıkla etkin madde degradasyonunun indüklenmesi, homojenizasyon sırasında etkin maddenin sulu fazda dağılması, nanoemülsiyonun lipit rekristalizasyonunun güçlüğü gibi problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir (16).

### **3.3.2. Mikroemülsiyon Yöntemi**

Mikroemülsiyon yönteminde yağ asitleri ve trigliserit 50-70°C'de eritilir. Su/yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde lipofilik faz ile aynı sıcaklığa ısıtılır. Sulu fazın lipofilik faza eklenmesi sonucunda transparan, termodinamik olarak dayanıklı bir sistem olan Y/S mikroemülsiyonu elde edilir. Oluşan mikroemülsiyon özel bir sistem ile ısı kaybı olmaksızın, soğuk su ortamında (2-3°C) dağıtılır (13). Sıcak mikroemülsiyon:soğuk su hacim oranı 1:20 – 1:50 arasında değişebilmektedir. İhtiyaca göre dispersiyon 2-3 kez diafiltrasyon ve dia-ultrafiltrasyon yöntemiyle yıkanır. Dispersiyon otoklavda (121°C/2 bar/15') sterilize edildikten sonra dondurularak kurutulur (16).

### **3.3.3. Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi**

Lipit, su ile karışmayan organik bir çözücüde çözülür ve bu çözelti, bir sulu faz içinde emülsifiye edilir. Çözücü vakum altında buharlaştırılarak, lipit nanopartikülleri çöktürülür. Bu yöntemde ısı uygulanmaması, yöntemin en büyük avantajıdır. Bu nedenle yüksek sıcaklıklarda bozulan maddeler için uygun bir yöntemdir. Ancak organik çözücü kullanılması yöntemin büyük bir dezavantajıdır. Bu yöntem ile elde edilen ürünün ortalama partikül büyüklüğü, organik fazdaki lipitin konsantrasyonuna bağlıdır (16).

Çözücü difüzyon yönteminde su ile kısmen karışabilen çözücüler (benzil alkol, etil format vb.) kullanılmaktadır. Lipit, su ile doyurulmuş çözücüde çözülür ve yüksek sıcaklıktaki, çözücü ile doyurulmuş sulu emülgatör çözeltisi ile emülsifiye edilir. Aşırı miktarda (1:5 – 1:10 oranlarında) suyun eklenmesinden sonra, organik çözücünün emülsiyon damlacıklarından sürekli faza difüzyonu nedeniyle KLN'ler

çöker. Oldukça seyreltik olan dispersiyon, ultrafiltrasyon veya diafiltrasyon ile daha konsantre hale getirilebilir (17).

#### **3.3.4. Yüksek Hızda Karıştırma ve/veya Ultrasonikasyon Yöntemi**

Bu iki yöntem genellikle birlikte kullanılmakta ve yüksek sıcaklık gerektirmektedir. Yüksek hızda karıştırma yönteminin mikrometre boyutuna varan büyüklüklerde partikül boyutu dağılımı vermesi bu yöntemin dezavantajıdır. Ayrıca saklama sırasında büyük partikül boyutu, stabilite problemlerine yol açmaktadır. Ultrasonikasyon yöntemi kullanılıyorsa metal kontaminasyonu göz önünde bulundurulmalıdır. KLN üretimi için bu iki yöntem modifiye edilmiştir (16). Organik çözücüye ihtiyaç duyulmayan, yüksek kalitede KLN üretimine uygun bir yöntemdir (17).

#### **3.4.Katı Lipit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

KLN'lerin karakterizasyonunda; partikül büyüklüğü ve dağılımı, partikül şekli, zeta potansiyel gibi özellikleri incelenmektedir.

##### **3.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini**

Partikül büyüklüğü ve dağılımı, koloidal taşıyıcı sistemlerin en önemli fizikokimyasal özelliğidir. Hazırlama yöntemi parametreleri, partikül büyüklüğü ve dağılımını etkileyen en önemli parametrelerdir. Basıncın ve devir sayısının artırılması ile partiküllerin büyüklüğünde azalma olduğu gözlenmiştir. Üretimde kullanılan emülgatörün tipi ve miktarı da partikül büyüklüğünü etkilemektedir. Genellikle emülgatör miktarını belli bir orana kadar arttırmak, ortalama partikül büyüklüğünü azaltmaktadır (14). KLN'lerin partikül boyutları foton korelasyon spektroskopisi ve lazer difraksiyon yöntemleriyle tayin edilir. Genellikle partikül boyutu 80-1000 nm arasında olmaktadır. Atomik kuvvet mikroskobu ile çekirdek ve çeperin ayrılması mümkün olmuştur (13).

##### **3.4.2. Partikül Şekli Tayini**

KLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve elektrom mikroskobu kullanılabilir.

##### **3.4.3. Zeta Potansiyel Ölçümü**

KLN'lerin zeta potansiyelinin ölçümü kolloidal sistemlerde saklama dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir. Yüksek zeta potansiyel, partiküllerin yüklü olması nedeniyle partikül agregasyonunu önlemektedir (13).

### **3.5.Katı Lipit Nanopartiküllerin Stabilitesi**

Kimyasal ve fiziksel stabiliteden beklentiler, hidroliz gibi parçalanma reaksiyonlarından ve başlangıç parçacık boyutu değişiminden formülasyonu korumak olarak tanımlanabilir (16). Stabil KLN dispersiyonunun, sulu ortamda, saklama süresince agregatlar oluşturmadan dispers halde bulunması gerekmektedir. KLN süspansiyonları üzerinde yapılan çalışmalar optimum koşullar altında (karanlık, 8°C sıcaklık, 1. kalite cam, azot gazı atmosferi) 6 aydan 3 yıla kadar kararlı kalabildiklerini göstermiştir (18). KLN'lerin stabilitesi, süper soğutulmuş eriyikler olmaları, farklı modifikasyonları ve küresel olmayan şekilleri nedeniyle, diğer kolloidal sistemlerden farklı olarak değerlendirmek gereklidir. Jel yapının oluşması, parçacık boyutundaki artış ve etkin maddenin taşıyıcı lipitten dışarı sızması, saklama sırasında karşılaşılan en büyük sorunlardır (16).

Erimiş lipitin, lipit kristaline dönüşmesi parçacık yüzeyinde artışa ve hapsedilme oranında azalmaya neden olarak stabilite problemlerini arttırmaktadır (16).

Sıvı dispersiyonun, kuru toz şeklinde bir ürüne dönüştürülmesi faydalı ve sıklıkla da gerekli olmaktadır. Elde edilen kuru ürün, sıvı haldeki şeklinden daha iyi fiziksel ve kimyasal stabiliteye sahip olmaktadır. Ayrıca bu şekilde KLN tozları, kapsüller içine doldurulabilmekte tablet olarak basılabilmekte veya pelletler içerisine hapsedilebilmektedir (16).

### **3.6.Katı Lipit Nanopartiküllerin Liyofilizasyonu**

Sulu KLN süspansiyonlarına alternatif olarak, kimyasal ve fiziksel kararlılığı arttırmak için kullanılabilen yöntemlerden birisi dondurarak kurutmadır. Katı şekle dönüştürmek formülasyonları Ostwald olgunlaşmasına ve hidrolize karşı korur (16).

Dondurarak kurutma sırasında osmolarite ve pH değerlerinde farklılıklar ortaya çıkabilir. Tekrar çözünmede ise, parçacık agregasyonu ve parçacık boyutunda artış gözlenebilmektedir (16). Dondurma sırasında su kristallenirken, çözünmüş

haldeki etkin madde konsantrasyonu ötektik karışım düzeyine erişene kadar artar. Bu durumda, ortamda elektrolit varlığı ve zeta potansiyelin azalması agregasyonun en önemli nedenleri olarak da kabul edilmektedir (19) ve dondurarak kurutmadan sonra parçacıkların tekrar dağıtılması gerektiği durumlarda sorunlar yaşanabilmektedir.

Sulu KLN dispersiyonlarını kuru hale getirmek için bir diğer yöntem olarak da püskürterek kurutma kullanılabilir. Bu yöntem dondurarak kurutmaya göre daha ucuz bir yöntemdir. Yüksek sıcaklık, kayma gerilimi ve kısmi erime parçacık boyutunda değişime neden olabilmektedir. Püskürterek kurutma yönteminin 70°C'nin üzerindeki lipitler için uygun olduğu belirlenmiştir (16). Püskürterek kurutma sırasında karşılaşılabilecek en büyük sorun KLN dispersiyonunun püskürtme süresi içinde donmasıdır.

### **3.7. Katı Lipit Nanopartiküllerin Sterilizasyonu**

Katı lipit nanopartiküllerin sterilizasyonunda formülasyona bağlı olarak otoklav, gama ışınları veya filtrasyon kullanılabilir. Bu yöntemlerin uygun olmadığı durumlarda da aseptik üretim önerilmektedir (16).

### **3.8. Katı Lipit Nanopartiküllerin Toksikitesi**

Etkin madde taşıyıcı sistemler için toksisite ve bileşenlerin durumu en önemli konulardır. Bileşenlerin durumu KLN'leri uygulama yoluna bağlı olarak değerlendirilmelidir. Topikal ve oral uygulamalar en problemsiz yollardır. Ancak kullanılan yüzey etkin maddenin cinsine ve miktarına göre toksisite değişebilmektedir. Uygulama yolu da göz önüne alındığında, az miktarda mikropartikül oluşumunun toksik yanıtı sebep olamayacağı bildirilmiştir (20).

Hem in-vitro hem de in-vivo çalışmalarda KLN'lere karşı iyi tolerans gözlenmiştir. Hücre kültüründe KLN içeren süspansiyonların, KLN'siz olanlara oranla canlılık oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir (21).

### **3.9. Katı Lipit Nanopartiküllerden Etkin Madde Salımı**

KLN'lerden salım hızı; geniş yüzey alanına, küçük molekül büyüklüğü nedeniyle yüksek difüzyon katsayısına, matriksin düşük viskozitesine ve kısa difüzyon mesafesine bağlanmaktadır. KLN'lerden etkin madde salımı, üretim yöntemine ve kullanılan lipitlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Sıcak

homojenizasyon yöntemiyle elde edilen KLN'lerde sürekli ve kontrollü salım ile birlikte patlama etkisi görülmektedir. Üretim sıcaklığı veya yüzey etkin madde konsantrasyonu değiştirilerek patlama etkisi değiştirilebilmektedir. Artan sıcaklık ve artan yüzey etkin madde konsantrasyonu ile patlama etkisi de artmaktadır. Bu şartlarda sulu fazda ilacın çözünürlüğünün artması patlama etkisinin artmasına neden olmaktadır. Yüzey etkin madde konsantrasyonu azaltılarak ve partikül büyüklüğü artırılarak sürekli ve kontrollü salım ile minimum patlama etkisi görülebildiği gösterilmiştir (13).

Çalışmalarda karşılaşılan en temel etkin madde salım probleminin, salımda patlama etkisi olduğu gözlenmiştir (22). Yumuşak çeper/sert çekirdek modelinde ilacın salımı için kısa mesafe olduğundan patlama etkisi gözlenir. Lipit matriks/katı dispersiyon şeklinde olan yapılarda ise yaklaşık 6 haftaya kadar varan sürekli salım gözlenmektedir (13). Yani ilaç dış kabukta ise patlama etkisine, çekirdeğe yerleşmiş ise uzatılmış salıma neden olmaktadır. Bu nedenle, etkin maddenin sudaki çözünürlüğü, üretim esnasında kontrol edilebilirse, salımda patlama etkisinin engellenebileceği düşünülmüştür (22).

### **3.10. Katı Lipit Nanopartikülleri Uygulama Yolları**

KLN'ler topikal, oral, parenteral, pulmoner ya da oküler olarak uygulanabilir.

#### **3.10.1. Topikal Uygulama**

Kimyasal olarak dayanıklı olmayan ilaçların korunması için deride film oluşturma etkisiyle örtme özelliğinden yararlanır. Bu genellikle kozmetik ürünlerde tercih edilen bir yoldur. Oklüzyon etkisiyle derinin hidrasyonunu artırır ve kırışıklıkların önlenmesini sağlar (13). Güneş kremleri, UV bloke ediciler KLN'lere hapsedilebilmektedir. KLN'lerin kendilerinin de güneşten koruyucu etkisi olduğu gözlenmiş ve güneş kremleri ile sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir (23). Jennings ve arkadaşları (13) ise A ve E vitaminlerini KLN'ler içerisine hapsederek topikal olarak uygulamışlardır. Westesen ve arkadaşları da Retinol'ü KLN içerisinde hapsederek topikal olarak uygulayabilmişlerdir (13).

Topikal uygulamada KLN'lerin sağladığı en büyük avantajlar; kimyasal olarak dayanıksız bileşiklerin KLN'ler içerisinde hapsedilerek korunması ve etkin maddenin kontrollü salımının sağlanmasıdır (20). Düşük partikül ağırlıkları

sayesinde *stratum corneum* ile yakın temas kurarak, enkapsüle edilen etkin maddenin deriye transferini kolaylaştırır. KLN'lerin deride oluşturduğu film tabakası sayesinde transdermal su kaybını önlediği belirtilmiştir. Bu sayede derideki su oranı yükselerek, atopik egzema semptomları azaltılır ve derinin sağlıklı görünümü sağlanır. KLN'ler aktif maddenin penetrasyonunu ve transportunu hızlandırır, özellikle lipofilik maddelerde, böylece bu maddelerin derideki konsantrasyonu yoğunlaşır. Bu da belirtilen taşıyıcılar için sürekli salımı mümkün kılar (24).

### **3.10.2. Oral Uygulama**

KLN'lerdeki katı yağ, oral kullanım sonucunda normal besin yağı gibi absorbe olduğundan yüksek biyoyararlanım gösterir. Genellikle mide barsak sistemi rahatsızlıklarında kullanılırlar (13). KLN'ler oral yolla doğrudan sulu dispersiyon halinde, tablet, pellet, kapsül, kaşe gibi dozaj şekillerine dönüştürülerek uygulanabilir.

### **3.10.3. Parenteral Uygulama**

İnraarterial uygulamada yağda çözünen kortikoidler kullanılır. Bunlar katı lipit nanopartiküllerin çekirdeğinde çözülür (13). Polimerik nanopartiküllerin kullanıldığı bütün parenteral uygulamalarda KLN'ler kullanılabilir (20).

### **3.10.4. Pulmoner Uygulama**

KLN'ler küçük boyutta olmaları, nefes verme ile hemen dışarı atılmaları nedeniyle toz halde pulmoner yolla uygulanmazlar. Sulu dispersiyon şeklinde nebulizer ile verilirler. Etkin madde bronşlarda ve alveollerde depolanır ve kontrollü olarak ilacı salarlar (13).

### **3.10.5. Oküler Uygulama**

KLN'lerin adezyonu sonucunda gözde daha uzun süre kalarak, görüntüyü bozmadan, yüksek ilaç konsantrasyonunun elde edilmesi sağlanmaktadır (13).

### **3.10.6. Aşı Adjuvanı**

Adjuvanlar, aşılamada immün cevabı arttırmak için kullanılmaktadırlar. Etkin madde yüklenmiş KLN'ler de aşı adjuvanı olarak kullanılabilirler (17). Katı halde olan nanopartiküllerde lipit bileşenlerinin yavaş degradasyonu immün sistemde

daha uzun süre kalmasını sağlamaktadır (13). Geleneksel adjuvanlara kıyasla KLN'ler biyodegradasyona uğramaları ve vücut tarafından iyi tolere edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptir (20).

#### 4. Mikroemülsiyonlar

Mikroemülsiyonlar, iç faz damlacık çapı 10-200 nm büyüklüğüne sahip, termodinamik olarak dayanıklı, düşük viskoziteli, saydam ve kendiliğinden oluşan sistemlerdir (25). Tindal etkisi sonucu mavi görünüme sahip olan mikroemülsiyonlarda dispersiyon çok iyi demektir. Etkin madde çözünürlüğünü artırma potansiyelleri, sahip oldukları uzun raf ömürleri, hazırlama kolaylıklarından dolayı ilaç taşıyıcı sistem olarak sıkça tercih edilmektedirler (26). Genellikle yağ fazı, su fazı, sürfaktan(yüzey etkin madde) ve ko-sürfaktan olmak üzere dört faz içerirler (25). Sürfaktan ko-sürfaktan oranı 1:1 ve 1:9 arasında değişebilmektedir (26). Bazen ko-sürfaktan kullanmadan da oluşabilmektedirler. Bunlar kendiliğinden emülsiyon oluşturabilen sistemler (SEDDS- Self Emulsifying Drug Delivery System) olarak tanımlanmaktadır. Bu sistemler yağ ve sürfaktanın karıştırılması ile oluşurlar ve emilimi düşük olan etkin maddelerin biyoyararlanımını artırırlar (25).

Mikroemülsiyonların en büyük avantajı kolayca hazırlanıp uygulanmalarıdır. Bunun yanında, vücutta kalış sürelerinin uygun olması, ilaç yükleme kapasitelerinin yüksek olması, sürfaktan ve kosürfaktan etkisiyle hücre permeabilitesini arttırmaları ve dolayısıyla emilimi kolaylaştırmaları tercih edilme nedenleri arasındadır (25). Mikroemülsiyonlar ile klasik emülsiyonlar arasındaki farklar *Tablo 1'* de gösterilmiştir.

Tablo 1: Mikroemülsiyonlar ile Klasik emülsiyonların karşılaştırılması

Özellik	Mikroemülsiyon	Klasik Emülsiyonlar
İç fazın damlacık büyüklüğü	0,2 µm'den küçük	0,2 – 10 µm arasında
Görünüş	Saydam	Süt görünümünde
Oluşum	Kendiliğinden oluşur	Enerji vermek gerekir
Stabilite	Termodinamik olarak dayanıklı	Termodinamik olarak dayanıksız

Mikroemülsiyonların oluşması için bazı koşulların sağlanması gerekmektedir;

- Yağ ve suyun birbiri içinde kendiliğinden karışarak emülsifiye olabilmesi için yağ-su arayüzeyindeki gerilimin çok düşük ( $10^{-3}$  N/m'den küçük) olması gerekmektedir.
- Sürfaktanın konsantrasyonu optimum olmalıdır.
- Mikroemülsiyonun dayanıklı olması için arayüzey akıcı ve esnek olmalıdır (25).

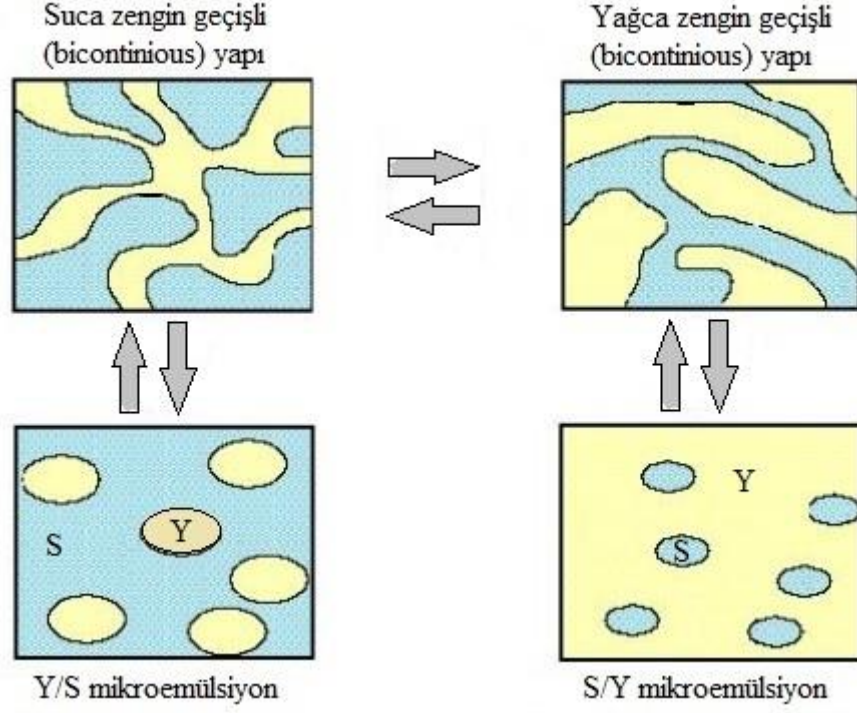
Mikroemülsiyonların viskoziteleri, genellikle psödoplastik akış gösteren makroemülsiyonların aksine, Newton akış modeline uygunluk gösterir. Jelleşme ile mikroemülsiyonun viskozitesini modifiye etmek mümkündür. Etkin maddenin dağılım katsayısı, salım hızı üzerinde büyük etkiye sahiptir. Bunun yanında faz hacimleri oranı, dağılmış fazın partikül boyutu, taşıyıcı sistemle etkin madde etkileşimi ve etkin maddenin sulu ve yağlı fazdaki dispersiyonu da salım hızını etkiler (26).

#### **4.1.Mikroemülsiyonların Yapısı**

Mikroemülsiyonlar su içinde yağ (Y/S), yağ içinde su (S/Y) ve geçişli (bicontinuous) olmak üzere üç tipte olabilirler. S/Y ve Y/S tipteki mikroemülsiyonlarda, partiküllerin etrafında sürfaktan ve ko-sürfaktandan oluşan bir film bulunmaktadır. Y/S mikroemülsiyon sisteminde dış faz sudur ve amfifil moleküllerin hidrofobik kısımları yağ damlacığının içine yönelmiş, hidrofilik kısımları ise dış faza yönelmiş halde bulunmaktadır. S/Y mikroemülsiyon sisteminde ise dış faz yağdır, amfifilik molekülün hidrofobik kısmı dış faza, hidrofilik kısmı ise su damlacığının içine yönelmiş durumdadır. Hem su hem yağ oranının yüksek olduğu durumlarda ise geçişli (bicontinuous) mikroemülsiyonlar oluşmaktadır. Bu modelde yağ ve su fazları amfifilce zengin bir tabaka ile ayrılmış durumdadır. Bu mikroemülsiyon çeşitleri arasındaki ilişki *Şekil 6*'da gösterilmiştir.

Yağ ve su fazları arasındaki düşük yüzeylerarası gerilim, sürfaktan kosürfaktan oranının ayarlanmasıyla sağlanmaktadır. Mikroemülsiyonların viskozite, partikül büyüklüğü ve şekli, kondüktivite ve dielektrik ölçümü sistemin yapısı ve dinamik özellikleri hakkında bilgi vermektedir (25).





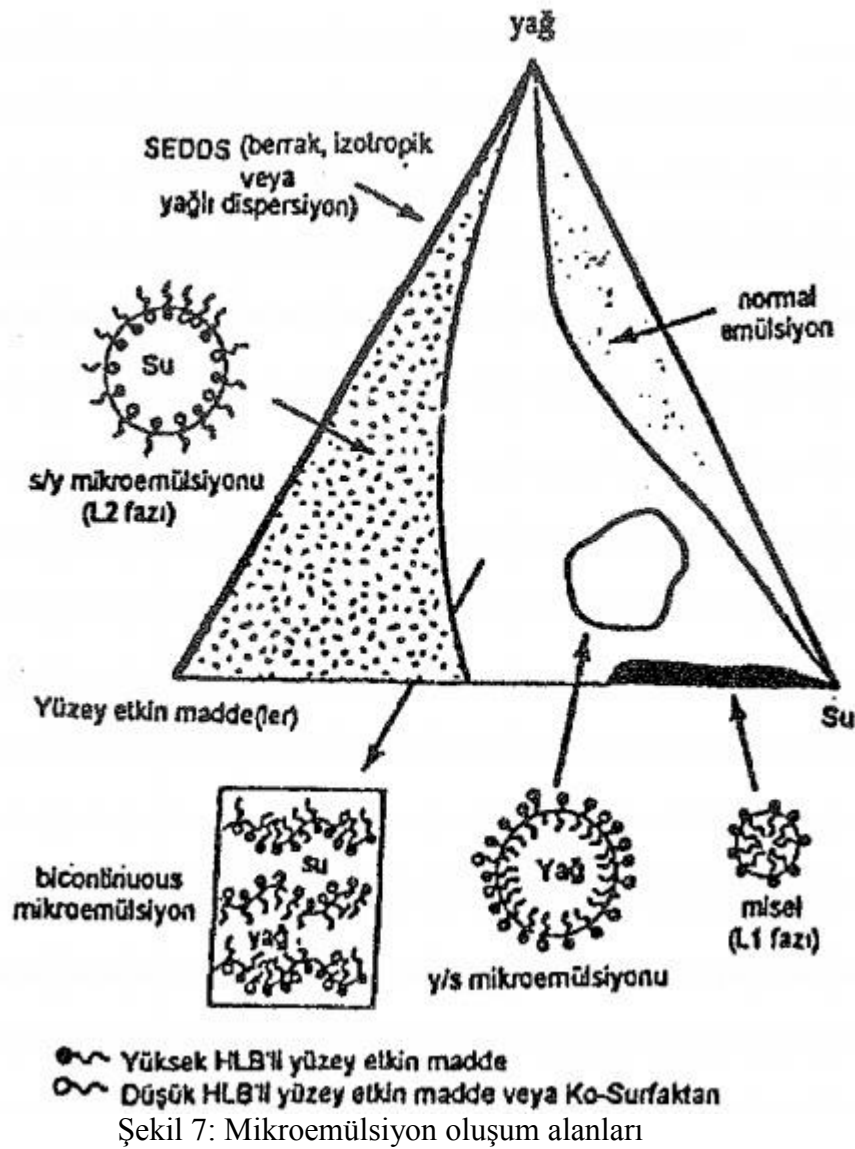
Şekil 6: Y/S, S/Y ve geçişli(bicontinuous) mikroemülsiyonların yapısı.

#### 4.2.Mikroemülsiyonların Formülasyonu

Makroemülsiyonlarda kullanılan HLB sistemi ile yüzey etkin maddelerin belirlenmesi işlemi mikroemülsiyonlarda uygulanamamaktadır. Dolayısıyla mikroemülsiyon formülasyonu ampirik olarak gerçekleşmektedir.

Mikroemülsiyon formülasyonunun belirlenmesinde en önemli işlem üçgen faz diyagramı çizimidir. Çizilen diyagramda uygun mikroemülsiyon alanı belirlendikten sonra formülasyondaki bileşenler saptanabilir. Faz diyagramlarının çizilmesi için en uygun ve en uygulanabilir yöntem titrasyondur. Titrasyon ile çok sayıda karışımın kısa sürede incelenmesine olanak sağlanmaktadır. Titrasyon için belli miktarda sürfaktan/kosürfaktan karışımı yağla karıştırılarak tek fazlı bir çözelti oluşturulur. Daha sonra sabit sıcaklık ve karıştırma hızında su ile titrasyon yapılır ve her su eklenmesinde sistem berraklık, akış özellikleri ve kararlılık açısından incelenir (26). Sisteme su ilave edildiği zaman S/Y mikroemülsiyonları oluşmaktadır. Su damlacıkları sürfaktan/kosürfaktan karışımının yüzeylerarası tabakası tarafından

çevrenir ve dayanıklı hale gelir. Sisteme su ilave edilmeye devam edildiğinde sıvı kristaller meydana gelir. Su molekülleri sürfaktanın çifte tabakası arasında kalır. Su miktarı artırıldığında tabakalı yapı kırılır ve sürfaktan/kosürfaktan ara yüzey filmi tarafından sarılan yağ damlacıklarını içeren geçişli yapı meydana gelir.



### **4.3.Mikroemülsiyonların Uygulama Yolları**

Mikroemülsiyonlar kontrollü ilaç salımını sağlamalarının yanında, bazı durumlarda ilaçların etkinliğini de arttırmaktadırlar.

#### **4.3.1. Oral Uygulama**

En çok tercih edilen yoldur. Emilimin artırılması ve toksisitenin azaltılması tercih edilmelerinde önemli bir rol oynamaktadır. S/Y tipi mikroemülsiyon şeklinde uygulandığında insülin, vasopressin ve siklosporinin oral biyoyararlanımının arttığı görülmüştür (25). Suda az çözünen maddelerin çözünürlüğünü arttırmaları, peptit ve protein yapıdaki maddeleri de enzimatik parçalanmadan korumaları açısından da tercih edilmektedirler (26).

#### **4.3.2. Topikal ve Transdermal Uygulama**

Mikroemülsiyonların kolay uygulanmaları açısından topikal uygulanmaları tercih edilmektedir. Bu yolla uygulanan mikroemülsiyonların klasik emülsiyon ve jellere göre daha etkili olduğu ispatlanmıştır (25). Etkin maddenin ilk geçiş etkisinden korunmasına yönelik yapılan çalışmalarda transdermal geçiş in vitro olarak incelendiğinde, yüzeyleyerası alanın artmasına bağlı olarak makroemülsiyonlara oranla daha hızlı ve etkili bir geçiş gözlenmiştir (26).

#### **4.3.3. Diğer Uygulama Yolları**

Mikroemülsiyonlar parenteral, oküler, rektal ve pulmoner olarak da uygulanabilmektedirler (25).

Partikül boyutlarının düşük olması nedeniyle parenteral geçişe uygunluk göstermektedirler. Böylece suda az çözünen maddeler mikroemülsiyon sistemi içinde intravenöz olarak verilebilmektedir.

Lesitin kullanılarak hazırlanan mikroemülsiyonlarda, suda çözünen etkin maddelerin çözünürlüğünün su ve lesitine bağlı olduğu görülmüş ve damlacık boyut dağılımının pulmoner uygulamaya uygun olduğu belirlenmiştir (26).

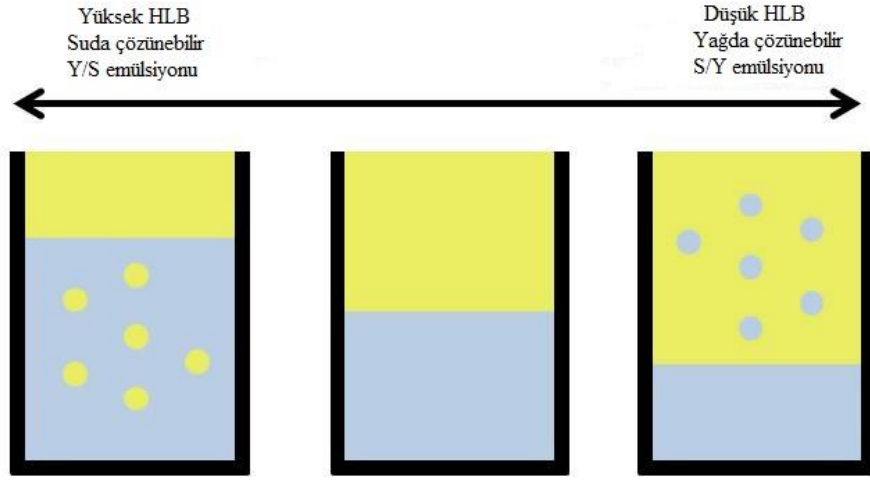
## 5. Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB)

1949 yılında Griffin tarafından ortaya atılan ve 1957’de Davies tarafından geliştirilen hidrofilik-lipofilik denge (HLB) sistemi, emülsiyon yapıcıların seçimi için kullanılan en yaygın yöntemdir. Bir sürfaktanın HLB değeri, molekülün farklı bölgelerindeki değerlerin hesaplanması ile onun ne kadar hidrofilik ya da hidrofobik olduğunun belirlenmesi esasına dayanır (27).

Emülsiyon yapıcıların HLB değeri 0-20 arasında değerlendirilir ve hidrofilik gurubun mol yüzdesinin 5’e bölünmesi ile hesaplanır. Dolayısıyla 20’ye doğru gidildikçe hidrofilik özellik artar (26). HLB değerleri ile emülsiyon yapıcı maddelerin kullanımı arasındaki ilişki *Tablo 2*’de gösterilmiştir. Emülsiyon yapıcıların ne tür bir emülsiyon oluşturacağı HLB değerine bakılarak kararlaştırılabilir (26). HLB sisteminin emülsiyon oluşumundaki etkisi *Şekil 8*’de gösterilmiştir.

Tablo 2: HLB değerleri ile emülgatör kullanımı arasındaki ilişki

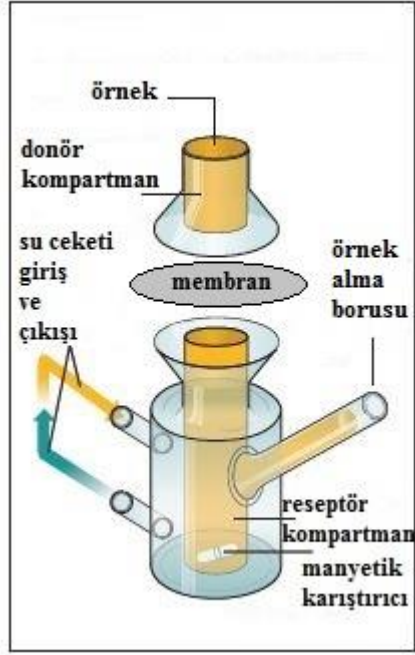
Hidrofobik (yağda çözünebilir)	0		
	1		
	2	köpük önleyici maddeler	S/Y emülsifiye edici maddeler
	3		
	4		
5			
6			
suda dağılıbilir	7	ıslatıcı ve yayıcı maddeler	
	8		
	9		
	10		
Hidrofilik (suda çözünebilir)	11	deterjanlar	Y/S emülsifiye edici maddeler
	12		
	13		
	14		
	15		
	16	çözündürücü maddeler	
	17		
	18		
	19		
20			



Şekil 8: HLB sisteminin Emülsiyon oluşumuna etkisi  
(Sarı bölgeler yağ, mavi bölgeler su olarak temsil edilmektedir)

## 6. Franz Difüzyon Hücresi

İn vitro salım çalışmalarında en çok kullanılan yöntem Franz difüzyon hücresidir. Bunlar dikey, yatay ya da birden fazla sistem birarada çalışacak şekilde tasarlanmış olabilirler. Ya su banyosuna oturtularak, ya da ısıtma ceketleri yardımıyla sabit sıcaklıkta (37°C) çalıştırılırlar. Franz hücresine geçecek maddeyi içeren donör kompartman, reseptör kompartmandan bir membran ile ayrılır. Reseptör kompartmandaki madde miktarının artışı, membrandan difüze olan madde miktarının ölçülmesi ve zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile belirlenir (1). Örnek bir Franz difüzyon hücresi Şekil 9’da gösterilmiştir. Franz difüzyon hücreleri, kullanılan derinin geçirgenliğini test etmelerinin yanında, ilaç-etkin madde-formülasyon arasındaki ilişki hakkında da bilgi verir. Bunların yanında toksisite ve kalite kontrol çalışmaları hakkında ön bilgi oluşturulabilir. Franz difüzyon hücrelerinde insan ve hayvan derisinin yanısıra sentetik membranlar da kullanılabilir (28).



Şekil 9: Franz difüzyon hücresi

## II. GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

#### 1.1.Kullanılan Kimyasallar Listesi

Maddeler	Marka, Üretici, Ülke
DDAB, CTAB, Tween 80, Kitozan (orta moleküler ağırlıklı), Fenol , 1-propanol, Span 80	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Soya lesitini (%90 fosfatidil kolin), PBS tabletleri (pH 7.4) (1tb/200ml)	Applichem GmbH, Darmstadt, Almanya
DMEM, FBS, Tripsin, L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin	Biological Industries Ltd. Beit-Haemek, İsrail
Precirol ATO5 (T <sub>m</sub> 55°C), Labrafac PG, Labrafac Lipophile, Plurol Oleique CC, Lauraglycol FCC, Lauraglycol 90, Capryol PGMC, Labrafil M, Peceol	Gattefosse, Cedex, Fransa
DNaz I	Biolabs, New England, ABD
Etanol	Merck KgaA Darmstadt, Almanya
Glasiyel asetik asit	Atabay Kimya Tic. San. Aş., İstanbul, Türkiye
Esterquat-1	Gerbu Biotechnik GmbH, Heidelberg, Almanya
Agaroz (moleküler biyoloji çalışmalarında kullanım amaçlı)	Conda laboratories, Madrid, İspanya ve BioShop, Burlington, ON, Kanada
Tris bazı, EDTA, SDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Etidyum bromür	Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
pEGFP-C1 plasmid DNA	Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD
DNA moleküler ağırlık standartları (100 bp, 1000 bp), DNazI	Fermentas, ThermoFischer Scientific co., Waltham, Massachusetts, ABD

## 1.2.Kullanılan Kitler

<b>Kit</b>	<b>Üretici, Ülke</b>
XTT cell proliferation Kit	Biological Industries Ltd., Beit-Haemek, İsrail
Invitrogen Plasmid Maxiprep	Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD

## 1.3.Kullanılan Cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Marka ve Model, Üretici, Ülke</b>
Flow Sitometre	Accuri C6, BD Biosciences, San Jose, CA, ABD
Liyofilizatör	Labconco, Kansas City, ABD
UV/Vis Spektrofotometre	nanoVette DU 730, Beckman Coulter, Brea, California, ABD
Santrifüj	Rotofix 32A, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Micro 200R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Almanya
Hassas Terazi	Shimadzu ATX224, Kyoto, Japonya
Hassas Terazi	BP121S, Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya
Dijital ısıtıcılı manyetik karıştırıcı	MTOPS HSD 180, Misung Scientific Corp. Ltd., Kore
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	WiseStir MSH-20A, Wisd Laboratory Instruments, Wertheim, Almanya
Su banyosu	E 100 RE 107, Lauda, Königshofen, Almanya
Santrifüj	Hettich EBA 12, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Almanya
Mikrodalga fırın	Kenwood MW 440, Kenwood corp., Tokyo, Japonya
Mikrodalga fırın	MW211W, Ariston, İtalya
Ultra Saf Su cihazı	Elga Purelab Classic, Veolia water technologies, Paris, Fransa
Viskozimetre	Programmable DV-III+Rheometer ve SV-10, Brookfield Engineering Laboratories inc., Massachusetts, ABD
Refraktif indeks ölçüm cihazı	DR301-95, Krüss optronic, Hambur, Almanya
ZetaSizer	NanoZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, İngiltere
ZetaSizer	380 ZLS, PSS Nicomp, Florida, ABD
Transdermal test sistemleri	Franz difüzyon hücreleri, Logan instruments corp.,



	Somerset,ABD
Spektrofotometre	Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., NY, ABD
Çoklu vorteks	Genius 3, IKA-Werke, Staufen, Almanya
Vorteks	MS 1 minishaker, IKA-Werke, Staufen, Almanya
Ayarlanabilir güç kaynağı	EC 1000-90, Thermo Fisher Scientific Inc., NY, ABD
İnkubatör	Innova 42, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, ABD
İnkubatör	Gerhardt Thermoshake, Thermo Fisher Scientific Inc., NY, ABD
Biyogüvenlik kabini	Class II BSC, Esco technologies inc., Hatboro, ABD
Mikropipet	Thermo Fisher Scientific Inc., NY, ABD
Mikropipet	Eppendorf, Hamburg, Almanya
Mikropipet	Axygen inc., CA, ABD
Mikropipet	Isolab, Wertheim, Almanya
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat, Cedex, Fransa
Yatay elektroforez sistemi	EC Maxicell Primo EC340, Thermo Fisher Scientific Inc., NY, ABD
pH metre	Seven Go Duo SG 23, Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre
pH metrik prob	Inlab Expert Pro ISM, Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre
pH metrik mikro prob	Inlab Micro Pro ISM, Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre
Su banyosu	1130S, VWR, Pennsylvania, ABD
CO <sub>2</sub> İnkubatörü	Forma <sup>®</sup> Direct Heat, Thermo Fisher Scientific Inc., NY, ABD
Yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu (ODTÜ MERLAB)	FEI Tecnai G <sup>2</sup> Spirit Bio (TWIN), FEI scientific and technical instruments, Oregon, ABD
Derin dondurucu (-80°C)	New Brunswick, İngiltere

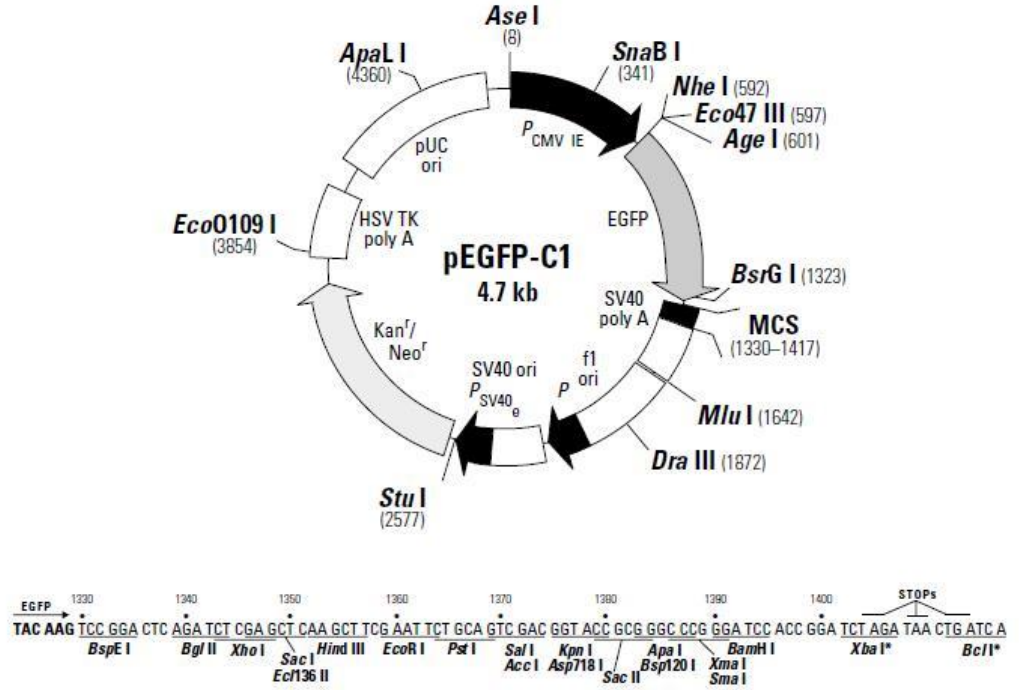
## 2. Yöntemler

### 2.1. Plazmit DNA Seçimi

Çalışmada kullanılan genetik materyal; yeşil floresans protein kodlayan 4731 kb molekül ağırlığına sahip pEGFP-C1 plazmid DNA'sıdır. Bu plazmidin gen haritasının bir kısmı Şekil 10'da gösterilmiştir. Tamamına <http://www.addgene.org/> adresinden ulaşmak mümkündür (29).

pEGFP-C1 Vector Information  
GenBank Accession #: U55763

PT3028-5  
Catalog #6084-1



Şekil 10: pEGFP-C1 plazmit gen haritası.

#### 2.1.1. Plazmit DNA'nın Çoğaltılması

Plazmit DNA'nın çoğaltılması çalışmalarında *Escherichia coli* JM 109 hücreleri kullanılmıştır.

### 2.1.1.1.Besi Yeri Hazırlanması

**Tablo 3: Luria-Bertani Sıvı Besi Yeri (LB)**

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Miktar (gram)</b>
Bacto-Tripton	10
Bacto – Maya ekstraktı	5
NaCl	10

Tabloda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp, üzerine 950 mL distile su eklenmiştir. pH: 7.0'ye 5 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlanmıştır.

121°C'de 15 dakika otoklav ile sterilizasyon yapıldıktan sonra besiyerinin 50-55°C'ye kadar soğuması beklenmiş ve antibiyotik çözeltisi 20 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde eklenmiştir.

**Tablo 4: Luria-Bertani Katı Besi Yeri (LBA)**

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Miktar (gram)</b>
Bacto-Tripton	10
Bacto – Maya ekstraktı	5
NaCl	10
Agar	17.5

Tabloda verilen maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp, üzerine 950 mL distile su eklenmiştir. pH: 7.0'ye 5 N NaOH ile ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edilmiş, 90x15'lik petri kaplarına 20-25 mL arası olacak şekilde göz kararı dökülerek katılması beklenmiştir.

Sterilizasyon yapıldıktan sonra besiyerinin 50-55°C'ye kadar soğuması beklenmiş ve antibiyotik çözeltisi 20 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde

eklenmiştir. Daha sonra 90x15'lik petri kaplarına 20-25 mL arası olacak şekilde göz kararı dökülerek katılaşması sağlanmıştır.

#### **2.1.1.2.Bakteri Stoğu**

Bakteri kültürü, plazmitin taşıdığı direnç genine uygun antibiyotik içeren (kanamisin) LB besi yerinde 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Konfluentlik oranı %70'in üzerinde olana kadar büyüyen kültürden 500 µl steril dondurma tüpü alınıp üzerine %50'lik steril gliserol çözeltisi eklenmiş ve -86 °C'de saklanmak üzere dondurucuya bırakılmıştır.

#### **2.1.1.3.Kompetan Hücre Hazırlanması**

Kompetan hücreler, Sambrook ve Maniatis'in protokolü örnek alınarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (Sambrook ve ark., 1989) (30).

- E. coli JM 109 hücreleri LB katı besi yerine aktarılmış ve 37°C'de 10-12 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- 50 mL'lik steril ortama 10 mL LB sıvı besi yeri konularak, katı besi yerinde üretilmiş bakterilerden tek koloni ekim yapılmış ve yatay çalkalayıcı üzerinde 37°C'de 10-12 saat inkübasyona bırakılmıştır.

- Inkübasyon sonucu çoğalan bakteri süspansiyonundan 50 µL alınarak, 50 mL'lik falkon tüpü içerisindeki 10 mL LB sıvı besi yerine ekim yapılmıştır. Yatay çalkalayıcıda çalkalanarak, 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

- Bakteri süspansiyonu 3000 rpm (devir/dk)'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve bakteri pelleti elde edilmiştir. Pellet üzerine 1.5 mL 50 mM CaCl<sub>2</sub> çözeltisi konularak süspande edilmiş ve 1 saat buz üzerinde bekletilmiştir.

- Bakteri süspansiyonu 1 saat sonunda 5000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiş ve pellet elde edilmiştir. Pellet üzerine 1.5 mL 50 mM CaCl<sub>2</sub> çözeltisi konularak, yeniden süspande edilmiştir.

- Süspansiyon, buz içerisinde 1 gece bekletilmiş ve kompetan bakteri hücresi hazırlanmıştır.

#### **2.1.1.4.Transformasyon**

Transformasyon işlemi, Sambrook ve Maniatis'in protokolü örnek alınarak aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Sambrook ve ark., 1989) (30).

- 5 µL plazmit DNA üzerine 200 µL kompetan bakteri eklenip karıştırılmıştır.

- Karışım sırasıyla, buz üzerinde 35 dakika, 42°C'deki su banyosunda 1.5 dakika ve tekrar buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra karışım üzerine 800 µL sıvı LB besi yeri konmuş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

- İnkübasyondan sonra 50 µL örnek, kanamisin içeren LB Agar plağı üzerine ekilerek, 37°C'lik etüvde bir gece inkübe edilmiştir.

Daha sonra plak üzerinde büyüyen bakteri kolonilerinden bir tanesi seçilip, steril eküvyonla kanamisin içeren LB sıvı besi yerine ekilmiştir. 37°C'de ve 150 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde bir gece inkübe edilerek elde edilen bakteri solüsyonundan plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır.

### **2.1.2. Plazmit DNA İzolasyonu**

Bakterilerden plazmit DNA izolasyonu, The PureLink® HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit kullanılarak yapılmıştır.

#### **2.1.2.1. Deney Öncesi İşlemler**

- Aşağıda belirtilen tüm işlem basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- Santrifüj işlemleri 12000 rpm'de yapılmıştır.
- İzolasyon öncesinde resüspanسیون çözeltisine RNazA eklenmiştir.
- 100-200 mL transforme *E. coli* kültürü kullanılmıştır.
- 2.1.2.2 numaralı başlık altında parantez içerisinde belirtilen tampon kodları kitin kendisine aittir, sadece bu deney içerisinde değerlendirilmiştir.

#### **2.1.2.2. Deney Basamakları**

1. Dengeleme. 30 mL dengeleme tamponu(EQ1), doğrudan filtrasyon kartuşuna eklenir(kartuş, kit içerisinde mevcuttur). Çözeltinin kolondan yer çekimi etkisiyle akması beklenir.
2. Hasat. Bakterilerin gece boyu ürettiği LB kültürü 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
3. Süspande etmek. Hücre pelletine deney öncesinde RNazA eklenmiş resüspanسیون tamponundan (R3) 10 mL eklenir ve alt-üst edilerek hassas karıştırma ile hücre süspansiyonu homojen hale getirilir.
4. Lizis. 10 mL lizis tamponu (L7) eklenir. Karışım homojen hale gelene kadar tüp alt-üst edilerek karıştırılır. Vorteks edilmez. Tüp oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılır.
5. Çökelti. 10 mL çökeltme tamponu (N3) eklenir. Eklendikten sonra zaman geçirmeden tüp alt-üst edilerek karıştırılır. Vorteks edilmez.

6. Süzme. Çöken lizat kolona transfer edilir. Yerçekimi etkisiyle lizatın kolondan geçmesi beklenir. Kolon 10 mL yıkama tamponu (W8) ile yıkanır. Tamponun da yerçekimi etkisiyle kolondan tamamen süzülmesi beklenir.
7. Yıkama. İç kısımdaki filtrasyon kartuşu atılır. Kolon 50 mL yıkama tamponu (W8) ile yıkanır. Tampon süzüldükten sonra kartuştan geçen sıvı atılır.
8. Elüsyon. HiPure filtre kolonunun altına 50 mL steril santrifüj tüpü konur. 15 mL elüsyon tamponu (E4) kolondan geçirilir. Yerçekimi etkisiyle solüsyonun tamamının kolondan geçmesi beklenir. Kolon atılır. Elüsyon tüpü saflaştırılmış DNA'yı içermektedir.

#### ***Santrifüj ile DNA'yı Çöktürme:***

- I. Çöktürme. Eluat üzerine 10.5 mL izopropanol eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra tüp 12000 rpm'de 30 dakika (4°C) santrifüjlenir. Supernatant atılır.
- II. Yıkama. Pellet üzerine 5 mL %70'lik etanol eklenir. Tüp 12000 rpm'de 5 dakika (4°C) santrifüjlenir. Süpernatant atılır.
- III. Süspande etmek. Pellet 10 dakika açıkta kurumaya bırakılır. 500 µL Tris-EDTA tamponu saflaştırılmış DNA'ya eklenir.  
Plazmit DNA -20°C'de saklanır.

#### **2.1.3. Plazmit DNA'nın Karakterizasyonu**

İzole edilen plazmit DNA'nın doğruluğundan emin olmak amacıyla, plazmit DNA'nın taşıdığı restriksiyon enzimi tanıma dizilerine göre, restriksiyon enzimleri kesimleriyle agaroz jel elektroforezinde doğrulama yapılmıştır.

##### **2.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi ile Analiz**

###### **Agaroz jelin hazırlanması:**

- Örnek sayısına uygun boyutta tarak seçilip kasete yerleştirilmiştir.
- 70 mL hacimdeki kaset kullanılacak olup, %1 (a/h)'lik jel hazırlanacaktır. 0,7 g agaroz tartılıp üzerine 70 mL TAE elektroforez tamponu eklenmiştir.
- Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak kaynatılmış ve agarozun tamamen çözülmesi sağlanmıştır.
- Jelin 50°C'ye kadar soğuması beklenip, soğuduktan sonra 10 taraklı kasete dökülüp yoğunlaştırılmıştır.

- Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarılır ve jeli içeren kaset, TAE içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

#### **Yükleme Boyası İçeriği:**

- %0.03 bromofenol mavisi (BFM)
- %0.03 Ksilen siyanol FF (XC)
- %60 gliserol
- %1 SDS
- 100 mM EDTA (pH: 7.6)

#### **Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Jelin Görüntülenmesi:**

- Örnekler 12 µL hacimlerde jele yüklenmiştir.
- İlk kuyucuğa 4 µL moleküler ağırlık standardı yüklenmiştir.
- Elektrotlar uygun kutuplara bağlandıktan sonra elektroforez başlatılmış, 100 volt 1 saat olacak şekilde deneme yapılmıştır. 1 saat dolduktan sonra güç kaynağı otomatik olarak kapanmıştır.
- Jel daha önceden hazırlanmış olan Etidyum Bromür çözeltisi ile 8 dakika hafif çalkalamalı olarak yıkanmış, daha sonra aynı şekilde saf su ile 4 dakika yıkanmıştır.
- Yıkama bittikten sonra jel UV transilluminatör ile 260 nm’de görüntülenmiştir.

**Etidyum Bromür Çözeltisinin Hazırlanması:** 10 mg/mL stok EtBr çözeltisinden 1 L’lik şişeye 35 µL alınarak 700 mL su ile karıştırılmıştır. Son konsantrasyonu 0.5 µg/mL’dir.

#### **2.1.3.2. Restriksiyon Enzimleri ile kesim**

pEGFP-C1’in *Şekil 10*’da verilen gen haritası incelenerek *HindIII*, *NdeI* ve *PvuII* restriksiyon enzimleri ile kesimler yapılarak incelenmesine karar verilmiştir. *HindIII* ve *NdeI* kullanılan plazmit DNA içerisinde tek noktadan kesim yapmaktadır. *PvuII* enziminin ise bu pDNA içerisinde iki farklı yerde tanıma dizisi yer almaktadır. *NdeI* enziminin tanıma dizisi ‘CATATG’ *PvuII* enziminin tanıma dizisi ‘CAGCTG’dir (31). pEGFP-C1 plazmit DNA’sının gen haritasından belirtilen baz dizileri bulunmuş ve enzimlerin kesim noktaları belirlenmiştir (29). Bu noktalar *NdeI* enzimi için 234, *PvuII* enzimi için 2251 ve 2861. bazlardır.

Tablo 5: Plazmit DNA kontrolü amacıyla Enzim Kesimi deneyi için kullanılan maddeler ve miktarları

<i>HinIII+NdeI</i> ( Biolabs)		<i>PvuII</i> (Fermentas)	
Kontrol pDNA	İzole pDNA	Kontrol pDNA	İzole pDNA
2 µL DNA	5 µL DNA	2 µL DNA	5 µL DNA
2 µL NEB-2 Buffer (10x)	2 µL NEB-2 Buffer (10x)	1 µL <i>PvuII</i>	1 µL <i>PvuII</i>
1 µL <i>HindIII</i>	1 µL <i>HindIII</i>	1 µL Buffer G (10x)	1 µL Buffer G (10x)
1 µL <i>NdeI</i>	1 µL <i>NdeI</i>	6 µL UP Su	6 µL UP Su
14 µL UP Su	14 µL UP Su		
37°C'de 90' inkübasyon			

Tablo 6: Enzim kesimi sonrası örneklerin jele yüklenmesi

No	Örnek	İçerik	Jele yüklenen
1	1 kb DNA Ladder	4 µL(Gene Ruler-#SM0313)	4 µL
2	pEGFP-C1 Kontrol	2 µL+8 µL UP Su+4 µL 6xBoya	12 µL  (100 V/saat)
3	pEGFP-C1 İzole	5 µL+5 µL UP Su+4 µL 6xBoya	
4	<i>PvuII</i> Kontrol	10 µL Enzim kesim stoğu + 4 µL 6xboya	
5	<i>PvuII</i> İzole	10 µL Enzim kesim stoğu + 4 µL 6xboya	
6	<i>HinIII+NdeI</i> Kontrol	10 µL Enzim kesim stoğu + 4 µL 6xboya	
7	<i>HinIII+NdeI</i> Kontrol	10 µL Enzim kesim stoğu + 4 µL 6xboya	
8	<i>HinIII+NdeI</i> İzole	10 µL Enzim kesim stoğu + 4 µL 6xboya	
9	<i>HinIII+NdeI</i> İzole	10 µL Enzim kesim stoğu + 4 µL 6xboya	



### **2.1.3.3.Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Biyolojik bir kaynaktan saflaştırılan nükleik asitlerdeki kontaminasyonu belirlemek amacıyla 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanları ölçülür. A260/A280 oranının 1.8'e yakın olması örneklerde kontaminasyonun olmadığını göstermektedir. 1.8'in altında olması protein kontaminasyonu ya da izolasyon sırasında kullanılan fenolden kaynaklanıyor olabilir. 1.8'in üzerinde olması ise RNA varlığını gösterir. Saf RNA örneklerinde A260/A280 oranı 2'ye çok yakındır.

İzole edilen plazmit DNA'ların konsantrasyonu nanoVette UV/Vis spektrofotometre ile belirlenmiştir. Konsantrasyonu belirlenen DNA'ların bir kısmı -20°C'de saklanmış, bir kısmı yakın zamanda kullanılmak üzere konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde seyreltikten sonra saklanmıştır. Seyreltme işlemi UP su ile yapılmıştır.

## **2.2.Formülasyon Çalışmaları**

### **2.2.1. Katı Lipit Nanopartikül (KLN) Formülasyonunun Hazırlanması**

#### **2.2.1.1.Yağ/Su (Y/S) Mikroemülsiyon Hazırlanması**

Y/S mikroemülsiyonu için katı yağ olarak Precirol ATO 5, hidrofilik sürfaktan olarak Tween 80, lipofilik sürfaktan olarak Lesitin, kosürfaktan olarak etanol (%99) kullanılmıştır. Faz diyagramları yardımıyla Precirol ATO 5'in erime sıcaklığının 10°C üzerinde (65°C), aynı sıcaklıkta UP su ile farklı miktarlarda yapılan titrasyonlar ile berrak alanlar saptanmıştır.

#### **2.2.1.2.Mikroemülsiyondan Dilüsyon ile KLN Hazırlanması**

Hazırlanan mikroemülsiyon bir su ceketine oturtularak sıcaklık preciorol'un erime sıcaklığının 10°C üzeri olan 65°C'ye ayarlanmıştır. Toplam ağırlığı 4 g olan karışımın manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak sıcaklığının 65°C'ye ulaşması beklenmiş ve sıcak mikroemülsiyon oluşturulmuştur. Bir yandan da buz banyosu içerisindeki behere 20 mL UP su doldurulmuş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazır bekletilmiştir.

10 mL'lik bir şırınga, şırınga için özel hazırlanmış ısıtıcı su ceketine oturtulmuştur. Mikroemülsiyon yeterli sıcaklığa ulaşmış homojen hale geldiğinde, şırıngaya aktarılmıştır. Şırınga, su ceketinden çıkarılmadan içerisindeki

mikroemülsiyon formülasyonu iğne yardımıyla hızlıca behere boşaltılmıştır. Sıcak mikroemülsiyonun, soğuk suya boşaltılması ile nanopartiküller halinde katılması sağlanmıştır. Seyreltme oranı 1:5 (h/h)'dir.

## 2.2.2. Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması

### 2.2.2.1.Ön Formülasyon Çalışmaları

Formülasyonda kullanılmak üzere çeşitli yağ, sürfaktan ve kosürfaktanlar değişen oranlarda denenmiştir. Denemelerde kullanılan maddelerin listesi *Tablo 7* da verilmiştir.

Tablo 7: Mikroemülsiyon formülasyonu seçiminde kullanılan maddeler

YAĞ	SÜRFAKTAN	KOSÜRFAKTAN
Peceol	Plurol Oleique CC	Etanol
Labrafac Lipophile	Tween 80	1-Propanol
Labrafac PG	Span 80	
	Lauraglycol 90	
	Lauraglycol FCC	
	Capryol PGMC	
	Labrafil M	

Tablo 7'de belirtilen maddelerin karışımları S/Y tipi mikroemülsiyon formülasyonuna göre HLB değeri 3-6 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.

### 2.2.2.2.Üçgen Faz Diyagramı Oluşturma

Üçgen faz diyagramı oluşturmak için Mehmet Ali Ege ve arkadaşlarının geliştirdiği bir program kullanılmıştır (32). Oluşturulan üçgen faz diyagramındaki mikroemülsiyon oluşum bölgesinin ağırlık merkezine dayanarak optimum formülasyon belirlenmiş ve geliştirilmiştir.

Yağ olarak *Peceol* (HLB:1), sürfaktan olarak *Plurol Oleique* (HLB:6) ve *Tween 80* (HLB:15), kosürfaktan olarak *Etanol* seçilmiştir. Bu maddelerin seçilme nedeni oluşturdukları S/Y mikroemülsiyon sistemlerinin berrak görünümde olmasıdır. Diğer maddelerle yapılan denemeler bu açıdan olumlu sonuçlanmamıştır.

Tablo 8: Üçgen faz diyagramı oluşturmak için kullanılan maddeler ve miktarları

	Peceol (g)	Plurol Oleique (g)	Tween 80 (g)	Etanol (g)
I	0.74	0.30	0.10	0.40
II	0.80	0.45	0.15	0.40
III	1.00	0.30	0.10	0.40
IV	0.90	0.41	0.14	0.55
V	0.80	0.45	0.15	0.60
VI	0.70	0.49	0.16	0.65
VII	0.60	0.45	0.15	0.60

Tablo 8'de gösterildiği gibi farklı oranlarda yağ, sürfaktan, kosürfaktan karışımları hazırlanarak sabit sıcaklık ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) ve karıştırma hızında (300 rpm) UP su ile titre edilerek formülasyonun bulandığı noktalar saptanmıştır. UP su eklenmesi 10  $\mu\text{L}$ 'lik miktarlarla gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde formülasyonun içerisinde barındırabildiği maksimum su miktarı hesaplanmıştır.

### 2.2.2.3. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Katyonik Madde Eklenmesi

Katyonik madde olarak lineer bir aminopolisakkarit olan *kitozan* seçilmiştir. Kitozan, toksik olmayan doğal bir polimer olduğu için geliştirilecek formülasyonun vücutta yabancı bir madde olarak algılanmayacağı düşünülmektedir. Ayrıca sahip olduğu katyonik yükü nedeniyle formülasyonla (-) yüklü DNA'nın kompleksleşmesini kolaylaştıracağı düşünülmüştür.

Literatür taramalarına göre kitozanın formülasyona eklenmesinde en uygun yolun asetik asit ile çözülerek sulu fazda eklenmesi olduğu saptanmıştır (33). Bu yöntemle göre kitozan ayrı bir sulu çözelti olarak hazırlanmıştır. Çözelti % 0.3 kitozan %1 asetik asit içermektedir. Bu çözelti UP su katılmadan hazırlanan formülasyon üzerine su fazı olarak eklenmiştir.

## 2.3. Formülasyonların DNA ile Kompleksleştirilmesi

### 2.3.1. Mikroemülsiyon Formülasyonunun DNA ile Kompleksleştirilmesi

Formülasyon daha önce hesaplanan miktarlarda hazırlanıp, kitozan iç sulu fazda çözülerek, 320  $\mu\text{L}$  hacminde kitozanlı su fazı eklendiğinde formülasyonda bulanma gözlenmiştir. Bulanıklığın gözlenmediği, formülasyonun stabil kaldığı en yüksek iç faz miktarı 290  $\mu\text{L}$  olarak belirlenerek çalışmalara devam edilmiştir.

### 2.3.2. KLN Formülasyonunun DNA ile Kompleksleştirilmesi

Tablo 9’da belirtilen DNA:KLN oranlarına göre kompleksleşme çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra jel görüntüsüne dayanarak optimum DNA:KLN oranına karar verilip deneylere bu oran ile devam edilmiştir.

Tablo 9: DNA:KLN Kompleks Hazırlanması

A					B	C		D
No	DNA:KLN	DNA* (µl)	KLN (µl)	UP SU (µl)		6x BOYA (µl)	Toplam Hacim (µl)	
1	MAS	4	-	18		4	26	
2	KLN	-	10	12		4	26	
3	pDNA	2	0	20		4	26	
4	1:1	2	2	18		4	26	
5	1:2	2	4	16		4	26	
6	1:3	2	6	14		4	26	
7	1:4	2	8	12		4	26	
8	1:5	2	10	10		4	26	
9	1:7	2	14	8		4	26	
10	1:10	2	20	-		4	26	

\* DNA çalışma çözeltisinin konsantrasyonu 100µg/ml  
(MAS: Moleküler Ağırlık Standardı, BOYA: %30 gliserol)

A.

- Tablodaki örnekler için tüpler hazırlanır (500µl eppendorf)
- Her tüpe tabloda belirtilen miktarda su eklenir.
- Her tüpe tabloda belirtilen miktarda KLN eklenir.
- Her tüpe tabloda belirtilen miktarda DNA çalışma çözeltisi eklenir.

B.

- Tüpler 25°C sıcaklıkta, 30 dakika boyunca, 300 rpm’de karıştırarak inkübe edilir.

C.

- İnkübasyon süresi sonunda her tüpe 4µl jel yükleme boyası (%30 gliserol) eklenir ve karıştırılır.

- Karışımdan 18 µl jele yüklenir

D.

- Örnekler %1'lik agaroz jelde, 60 dakika boyunca, 80 voltta yürütülür
- 10 dk EtBr çözeltisiyle jel boyanır
- 5 dk suyla yıkanır
- Jel görüntüleme cihazında görüntü alınır

## **2.4. Formülasyonların Karakterizasyonu**

### **2.4.1. Partikül Boyutu Dağılımı Analizi**

Partikül boyutu ölçümü için Malvern Zetasizer cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ile çalışmaktadır. Prensibi 633 nm dalga boyundaki lazer ışığının örnek ile etkileştikten sonra 173°'lik bir açı ile saçılan ışığın şiddetinin okunmasına dayanmaktadır. Cihaz yazılımından alınan sonuçlar Microsoft Excel programı kullanılarak ifade edilmiştir.

Ölçümlerde tek kullanımlık polistiren küvetler kullanılmıştır. Ölçüm sıcaklığı 25°C'dir. Formülasyonlar 10 kat seyreltilerek ölçüm yapılmıştır.

### **2.4.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü**

Zeta potansiyeli ölçümleri için Malvern Zetasizer cihazı kullanılmıştır. Örnekler zeta küvetlerine doldurularak ölçüm alınmıştır. Ölçüm sıcaklığı 25°C'dir. Cihaz yazılımından alınan sonuçlar Microsoft Excel programı yardımıyla ifade edilmiştir.

### **2.4.3. pH Ölçümü**

pH ölçümleri Mettler Toledo Seven Go Duo SG 23 cihazı ile 25±1°C'de gerçekleştirilmiştir.

### **2.4.4. Refraktif İndeks ve Viskozite Ölçümleri**

Refraktif indeks ve viskozite değerleri, Malvern Zetasizer cihazında partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü yaparken gerekli olacağı için önceden ölçülmüştür.

Refraktif indeks ölçümü için Krüss DR301-95 cihazı kullanılmıştır.

Viskozite ölçümleri için Brookfield Programmable DV-III cihazı denenmiş, örnekler yeteri kadar viskoz olmadığı için Brookfield SV-10 cihazında ölçüm alınmıştır.

#### **2.4.5. TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) ile Analiz**

TEM analizleri için Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı (ODTÜ MERLAB)'ndaki CTEM (Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu) cihazı kullanılmıştır. Görüntüleme 200 mesh karbon film kaplı ızgara ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma 120 kV'da yapılmıştır. Örnekler ızgaralar üzerine damlatılıp oda sıcaklığında kurutulduktan sonra görüntülenmiştir.

#### **2.5.SDS Teşvikli DNA Salın Çalışması**

DNA:KLN, 1:1 ve 1:2 oranlarında taze hazırlanmıştır. SDS stok çözeltisinden(%30) %10 ve %5'lik olmak üzere iki seyreltme yapılmıştır. 12 adet eppendorf tüpü hazırlanıp Tablo 10'de belirtilen miktarlarda DNA, KLN ve Su eklenir ve santrifüj yardımıyla karışması sağlanır. Daha sonra 30 dakika boyunca çalkalayıcıda (300 rpm) inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra SDS eklenir ve 5 dakika boyunca çalkalayıcıda (100 rpm) inkübasyona bırakılır. Daha sonra 3 µL %25 gliserol eklenir ve jelle yüklenir. İlk kuyucuğa moleküler ağırlık standardı yüklenmiştir. 75 dakika, 100 V, %1 agaroz jelle yürütülür. 10 dakika EtBr çözeltisi ile daha sonra 5 dakika distile su ile yıkanır ve jel görüntüleme cihazında görüntü alınır.

Tablo 10: SDS teşvikli DNA salım çalışması

	DNA ( $\mu$ L)	KLN ( $\mu$ L)	SDS %5 ( $\mu$ L)	UP Su ( $\mu$ L)	Totaldeki % SDS
1	Moleküler Ağırlık Standardı				
2	2	2	0	6	0
3	2	2	1	5	0,5
4	2	2	2	4	1
5	2	2	3	3	1,5
6	2	2	4	2	2
7	2	2	5	1	2,5
8	2	4	0	4	0
9	2	4	1	3	0,5
10	2	4	2	2	1
11	2	4	3	1	1,5
12	2	4	4	0	2
13	2	4	2,5 (SDS %10)*	1,5	2,5

\*örnek miktarını ayarlayabilmek için 13 numaralı kuyucukta %10'luk SDS kullanıldı.

## 2.6. DNaz I Enziminden Korumanın Araştırılması

Bir gün önceden hazırlanmış olan KLN, deney esnasında DNA ile farklı oranlarda kompleksleştirilmiştir. Deneyde iki farklı firmanın (Biolabs ve Fermentas) ürünü olarak iki DNaz I enzimi kullanılmıştır. Deneyde DNA:KLN oranı 1:1 ve 2:1 olarak kullanılmıştır. İki farklı enzim için ikişer farklı konsantrasyon denenmiştir. SDS oranı %1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunun için SDS stok çözeltisinden (%30) % 6'lık SDS hazırlanıp denemede bu çözelti kullanılmıştır. Jel yükleme içeriği *Tablo 11*'de gösterilmiştir. Tampon deney içerisinde 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. 2.5  $\mu$ L DNA için 1 IU konsantrasyonunda enzim kullanılmıştır.

Tablo 11: DNaz I koruma deneyi

	DNA ( $\mu\text{L}$ )	KLN ( $\mu\text{L}$ )	UP SU ( $\mu\text{L}$ )		DNaz I* ( $\mu\text{L}$ )		%6'lık SDS ( $\mu\text{L}$ )	
1	pEGFP-C1 kontrol							
2	DNA + DNaz I							
3	2	2	6	A	1	B	2	C
4	4	2	4		1		2	
5	2	2	6		1		2	
6	4	2	4		1		2	
7	2	2	6		0.5		2	
8	4	2	4		0.5		2	
9	2	2	6		0.5		2	
10	4	2	4		0.5		2	

\*0.5  $\mu\text{L}$  DNaz I(RNaz içermeyen) + 1.2  $\mu\text{L}$  10x tampon + 10.8  $\mu\text{L}$  UP SU

3,4,7,8 numaralı örneklerde Biolabs; 5,6,9,10 numaralı örneklerde Fermentas marka DNaz I-RNaz içermeyen kullanılmıştır.

A. 30 dakika oda sıcaklığında 3000 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir.

B. 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir.

C. Örnekler %1 agaroz jelde 60 dakika boyunca 100 voltta yürütülmüştür. Elektroforez işlemi bittikten sonra 10 dakika EtBr ile boyama ve 5 dakika distile su ile yıkama yapılmış ve görüntü alınmıştır.

## 2.7.Hücre Kültürü Çalışmaları

### 2.7.1. Sitotoksiste Çalışması

DNA:KLN kompleksleri yeşil floresans protein kodlayan pEGFP-C1 plazmiti kullanılarak DNA:KLN 1:1 (h/h) olacak şekilde geliştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak formülasyonlar 1 gün önceden hazırlanarak kompleksleştirme işlemi deneyden 1 saat önce yapılmıştır. Çalışmada L-929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. DNA ile kompleksleştirilmiş ve kompleksleştirilmemiş formülasyonların toksisitesi ayrı ayrı 3, 5, 7, 10, 15 ve 20  $\mu\text{L}$ 'lik dozlar halinde denenmiştir. Besiyeri olarak MEM-Eagle kullanılmış, ek olarak aşağıdaki maddeler eklenmiştir:

- L-glutamin
- Penisilin-streptomisin



- %10 FBS
- Tripsin

96 kuyucuklu plaka kullanılarak hücre konsantrasyonu 6000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ayarlanmıştır.  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat boyunca %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanlarına tutunması sağlanmıştır. Hücrelerin tutunması mikroskop ile kontrol edildikten sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve yukarıda belirtilen dozlar taze besiyeri içerisinde seyreltilerek üçlü tekrarlar halinde 96 kuyucuklu plakaya yüklenmiştir. Dozlar eklendikten sonra tüm kuyucukların hacimleri eşit olacak şekilde besiyeri ile tamamlanmıştır. Bu işlemden sonra formülasyonun hücreler üzerindeki toksisitesini gözlemlemek üzere yukarıda belirtilen şartlar altında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra hücreler üzerindeki ortam alınarak, hücreler PBS ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra taze besi yeri eklenmiş ve bu besiyerinin üzerine aktive edilmiş XTT (hücre çoğaltma kiti) solüsyonundan her kuyucuğa 50  $\mu\text{L}$  eklenmiştir. XTT eklendikten sonra 2.5 saat boyunca  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyondan sonra çoklu plaka okuyucuda absorbans değerleri (A450 – A630) ölçülmüştür. Formülasyonların uygulandığı kuyucuklarda görülen absorbans değerleri ile kontrol hücrelerinin (formülasyon eklenmeyen kuyucuklar) absorbans değerleri karşılaştırılarak formülasyonların toksisitesi hesaplanmıştır.

### **2.7.2. Transfeksiyon yeteneğinin araştırılması**

Toksik olmadığı saptanan dozlarda formülasyonlar hücre kültürüne uygulanmıştır. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği floresans mikroskopta DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyama ve floresans görüntüleme ile kontrol edilmiştir. DAPI, zarar görmemiş hücre membranından geçerek nukleusa bağlanır ve canlı hücrelerin floresan mikroskopta mavi görünmesini sağlar.

### **2.7.3. Transfeksiyon Etkinliğinin Flow(akım) Sitometri Yöntemiyle Saptanması**

L929 fare fibroblast hücreleri ve formülasyonlar 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve 24 saat boyunca  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda ortam uzaklaştırılıp 100  $\mu\text{L}$  PBS ile yıkama yapılmıştır. PBS

uzaklaştırıldıktan sonra 50 µL Tripsin eklenip 5 dakika  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li ortamda inkübe edilerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Hücrelerin kalkmış olduğu mikroskop ile kontrol edildikten sonra 100 µL PBS eklenerek karışım eppendorf tüplerine aktarılmıştır. 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilen karışımın süpernatantı atılıp 100 µL PBS eklenerek hafifçe vorteks edilmiştir. Accuri C6 Flow Cytometer cihazında okuma yapılmıştır.

## **2.8.İn-Vitro Salım Çalışması**

İn vitro salım çalışması Franz Difüzyon Hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Membran olarak 12000 dalton cutoff selüloz membran kullanılmıştır. Donör kompartmana 400 µL KLNeq.DNA 1:1 (h/h) formülasyonu, reseptör kompartmana 5 mL PBS (10 mM, pH:7.4) eklenmiştir. Deney  $37^{\circ}\text{C}$  ve 600 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde reseptör kompartmandan 1 mL hacminde örnekler alınmıştır. Eksilen 1 mL yerine aynı miktarda PBS, örnek alındıktan hemen sonra eklenmiştir (34). Kontrol olarak 400 µL'ye UP Su ile seyreltilen 200 µL pDNA kullanılmıştır.

Ayrıca alınan örneklerden 200'er µL ayrılarak 6 saatlik liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu. Tamamen liyofilize hale geldiklerinde 20 µL UP Su eklenerek 10 kat konsantre hale getirildikten sonra spektrofotometrede absorbansları okundu.

260/280 ve 260/230 nm dalga boylarında nanodrop spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılarak donör kompartmandan reseptör kompartmana geçen DNA miktarı tespit edilmiştir.

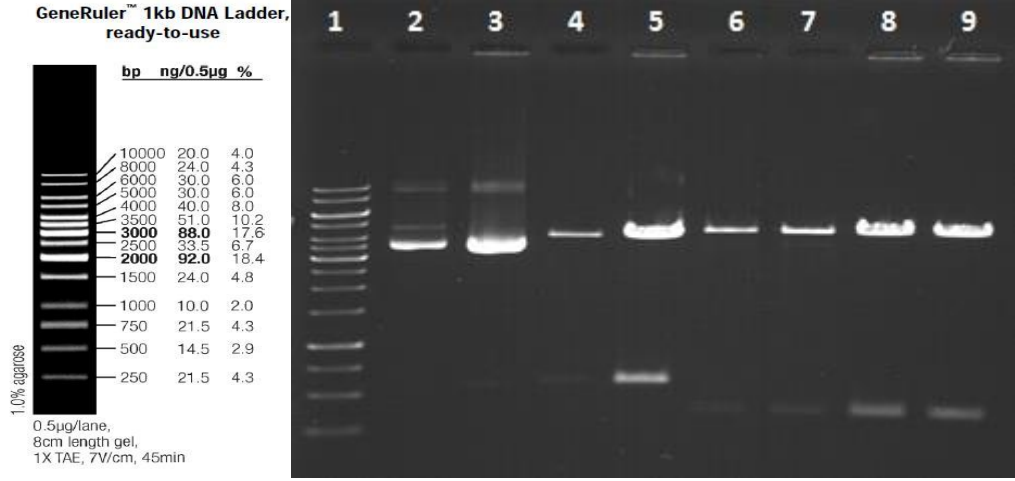
## **2.9.Stabilite Çalışması**

Taze hazırlandığında partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçülen KLNeq.DNA formülasyonu oda sıcaklığında ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) karanlıkta saklanmış ve 6 hafta boyunca gözlenmiştir. Aynı süre zarfında 15 günde bir olmak üzere partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Bu ölçümler için PSS Nicomp 380 ZLS cihazı kullanılmıştır.

ME formülasyonu ve ME.DNA formülasyonu 8 hafta boyunca yukarıda belirtilen koşullarda saklanarak görsel olarak izlenmiştir.

### III. BULGULAR

#### 1. Plazmit DNA Eldesine Ait Bulgular



Şekil 11: Elde edilen plazmit DNA'nın enzim kesimleri ile kontrolüne ilişkin jel görüntüsü  
(1: Moleküler ağırlık standardı, 2: Kontrol DNA, 3: İzole DNA, 4: Kontrol PvuII, 5: İzole PvuII, 6-7: Kontrol HindIII+NdeI, 8-9: İzole HindIII+NdeI)

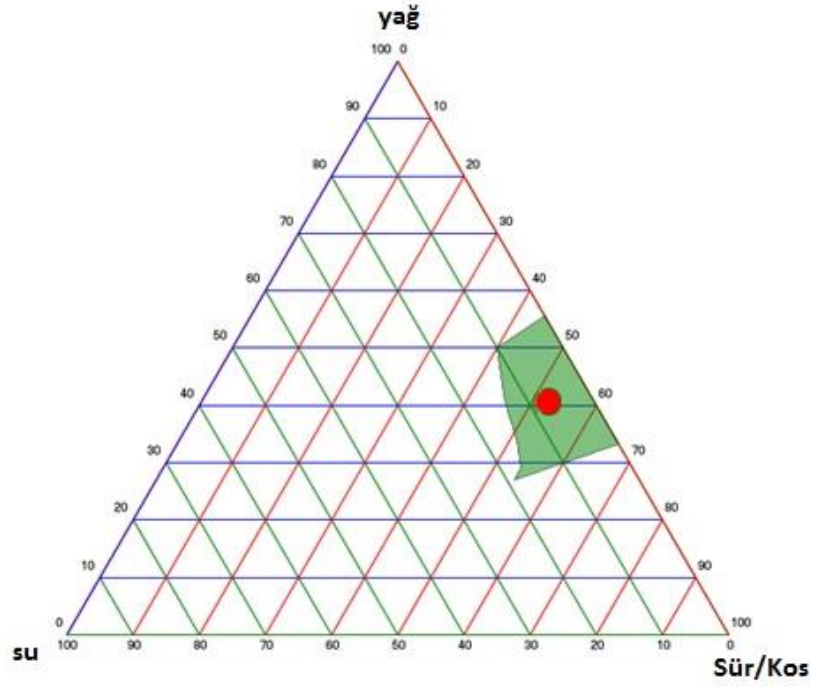
Elde edilen plazmit DNA'nın konsantrasyonu 991,99 µg/mL ölçülmüş ve 50 µL'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır. Kullanılacağı zaman konsantrasyonu 100 µg/mL olarak ayarlanmıştır. Bu işlem için 1.5 mL'lik eppendorf tüpü kullanılmış; 50 µL konsantre DNA, UP Su ile 496 µL'ye tamamlanmıştır.

#### 2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

##### 2.1.Ön Formülasyon Çalışmaları

##### 2.1.1. Mikroemülsiyon Formülasyonuna Ait Ön Formülasyon Çalışması

Mikroemülsiyon formülasyonuna ait faz diyagramı Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12: Mikroemülsiyon formülasyonuna ait faz diyagramı  
(yağ: Peceol, su: UP Su, Sür/Kos: Plurol oleique-Tween 80/EtOH)

Bu faz diyagramından yola çıkılarak hazırlanan formülasyon şu şekildedir (2 g için):

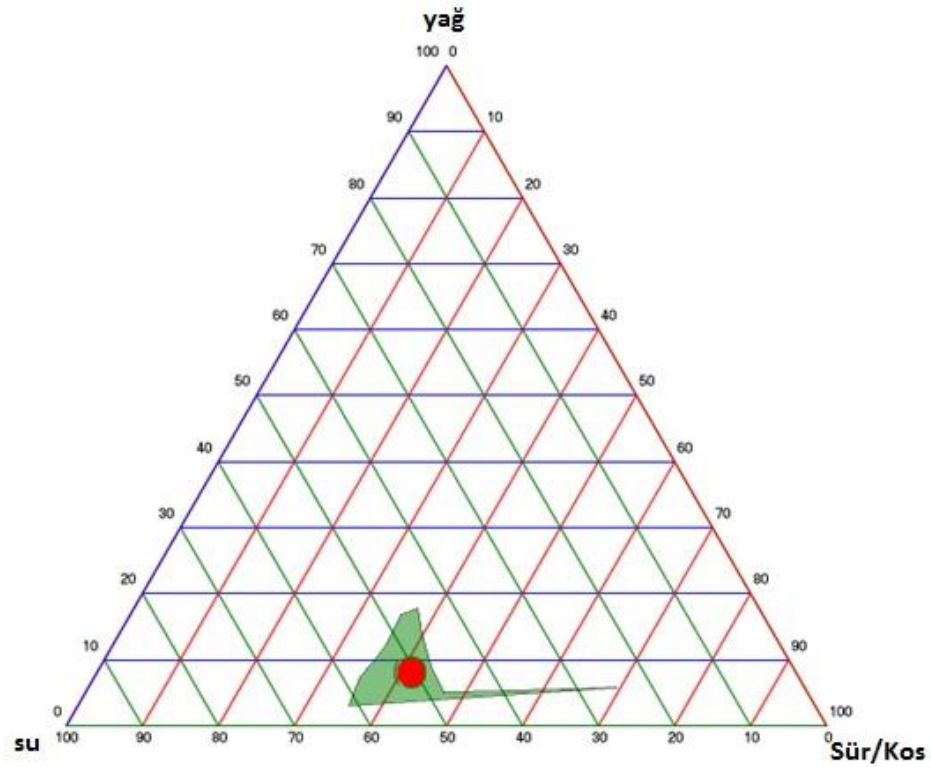
- 0,56 g Peceol
- 0,14 g Tween 80
- 0,42 g Plurol oleique
- 0,56 g Etanol (absolut)
- 0,32 g UP Su

### 2.1.2. KLNeq Formülasyonuna Ait Ön Formülasyon Çalışması

KLNeq formülasyonu için Sür/Kos 1:2 oranında çizilen faz diyagramı Şekil 13'de, bu faz diyagramının çizilmesinde kullanılan oranlar Tablo 12'de gösterilmiştir. Bu faz diyagramından en uygun formülasyon olarak Tablo 13'de gösterilen oranlar seçilmiştir.

Tablo 12: KLN için üçgen faz diyagramı çiziminde kullanılan formülasyon yüzdeleri

	% Yağ	% Sür/Kos	% Su
1	5.10151	47.05882	47.83967
2	9.108717	43.48678	47.40451
3	11.27563	41.7426	46.98178
4	13.8869	39.87115	46.24195
5	17.74931	37.23696	45.01372
6	16.97288	35.60805	47.41907
7	12.5404	36.00517	51.45443
8	9.63035	35.65175	54.7179
9	7.317073	34.93312	57.7498
10	3.010683	35.77209	61.21722
11	5.823419	69.44271	24.73388



Şekil 13: KLN formülasyonuna ait faz diyagramı

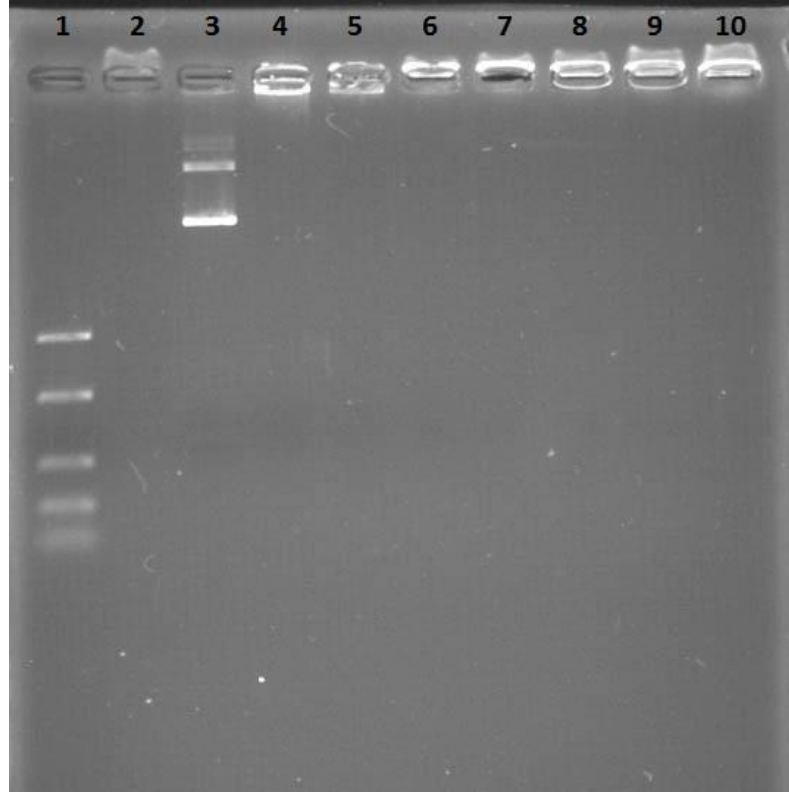
(yağ: Precirol ATO 5, su: UP Su, Sür/Kos: Tween 80-Lesitin/EtOH)

Tablo 13: KLNeq formülasyonu için Y/S mikroemülsiyonunun hazırlanması

					Sür/Kos içeriği (3 g için)		
maddeler	Precirol	EQ1	UP su	Sür/Kos	Tween 80	Lesitin	EtOH
miktar(g)	0,1	0,056	2,4	1,44	0,67	0,33	2

## 2.2.DNA-KLN kompleksleşme denemeleri

Kompleksleşme çalışması Tablo 9'da gösterildiği oranlarda gerçekleştirilmiştir. Denemenin sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14: DNA-KLN kompleksleşme denemesine ilişkin jel görüntüsü

(1: Moleküler Ağırlık Standardı, 2: KLN, 3: pDNA, 4: DNA:KLN 1:1, 5: DNA:KLN 1:2, 6: DNA:KLN 1:3, 7: DNA:KLN 1:4, 8: DNA:KLN 1:5, 9: DNA:KLN 1:7, 10: DNA:KLN 1:10)

### 2.3.pH, Viskozite ve Refraktif İndeks Ölçümleri

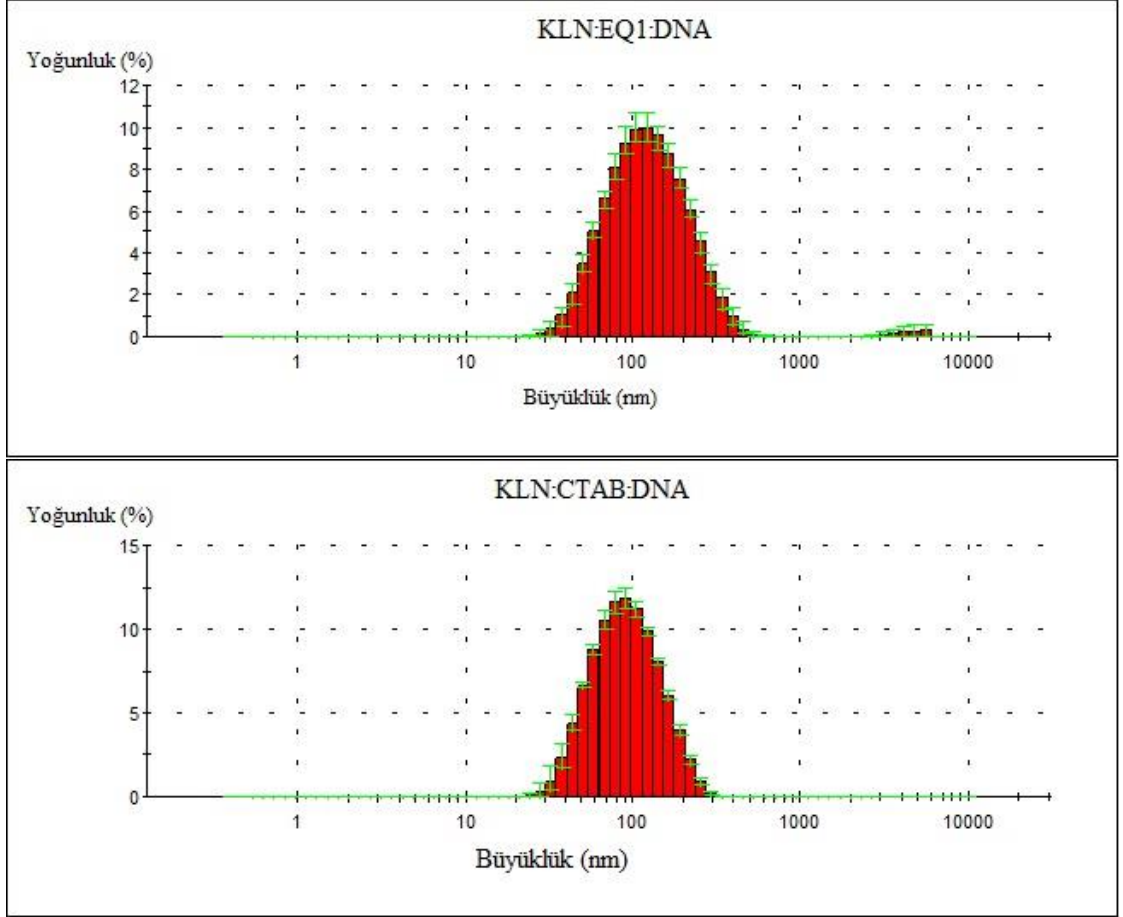
KLNeq ve ME formülasyonlarının pH'ları sırasıyla 3,9 ve 3,4 olarak ölçülmüştür. ME formülasyonunun viskozite ve refraktif indeks değerleri sırasıyla 36,0 cP ve 1,42 nD'dir

### 2.4.Partikül Büyüklüğü Dağılımı, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tablo 14: Formülasyonların Partikül boyutu, PDI ve Zeta potansiyelleri

Örnek adı	Partikül Büyüklüğü (nm) ( $\pm$ SS)	PDI ( $\pm$ SS)	Zeta Potansiyel (mV) ( $\pm$ SS)
<b>KLN:CTAB</b>	44,9 ( $\pm$ 0,77)	0,394 ( $\pm$ 0,011)	44,000 ( $\pm$ 0,16)
<b>KLN:EQ1</b>	104,7 ( $\pm$ 1,25)	0,309 ( $\pm$ 0,004)	47,333 ( $\pm$ 2,32)
<b>KLN:CTAB:DNA</b>	72,9 ( $\pm$ 2,00)	0,266 ( $\pm$ 0,001)	45,933 ( $\pm$ 3,26)
<b>KLN:EQ1:DNA</b>	98,9 ( $\pm$ 0,28)	0,287 ( $\pm$ 0,003)	41,567 ( $\pm$ 0,32)

Mikroemülsiyon formülasyonu yoğun yağ içeriği nedeniyle ölçümlerde sonuç vermemektedir. Bu sebeple iç fazın damlacık boyutu için ölçüm alınmış ve 12,7 nm bulunmuştur.

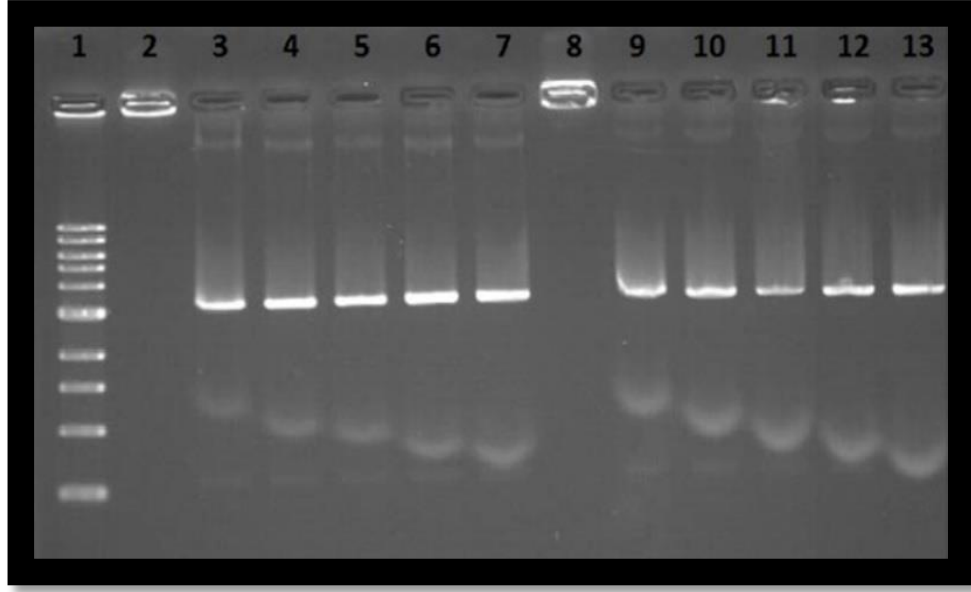


Şekil 15: DNA içeren formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı

### 3. SDS Teşvikli DNA Salım Çalışması

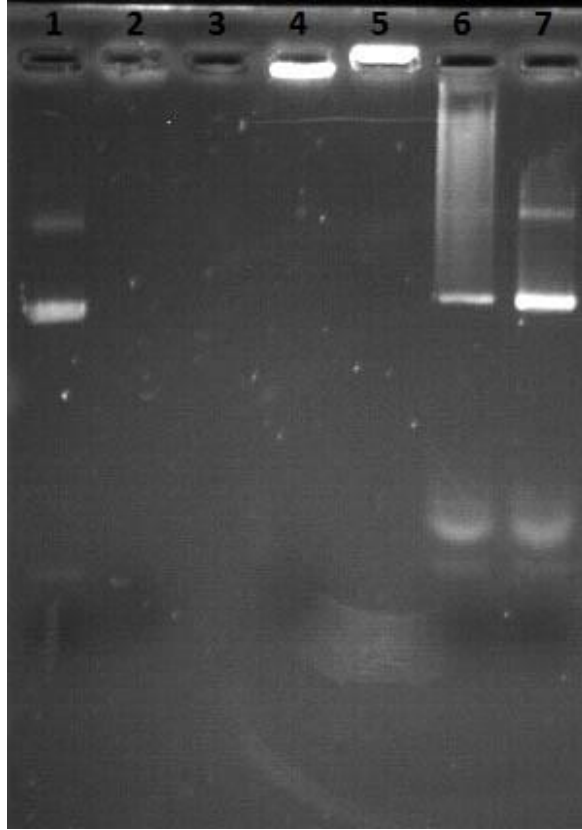
Bölüm 2.5’de gösterildiği şekilde hazırlanıp jele yüklenen örneklerin agaroz jel görüntüsü Şekil 16’de gösterilmiştir.





Şekil 16: KLNeq formülasyonuna ait SDS teşvikli DNA salım çalışması agaroz jel görüntüsü

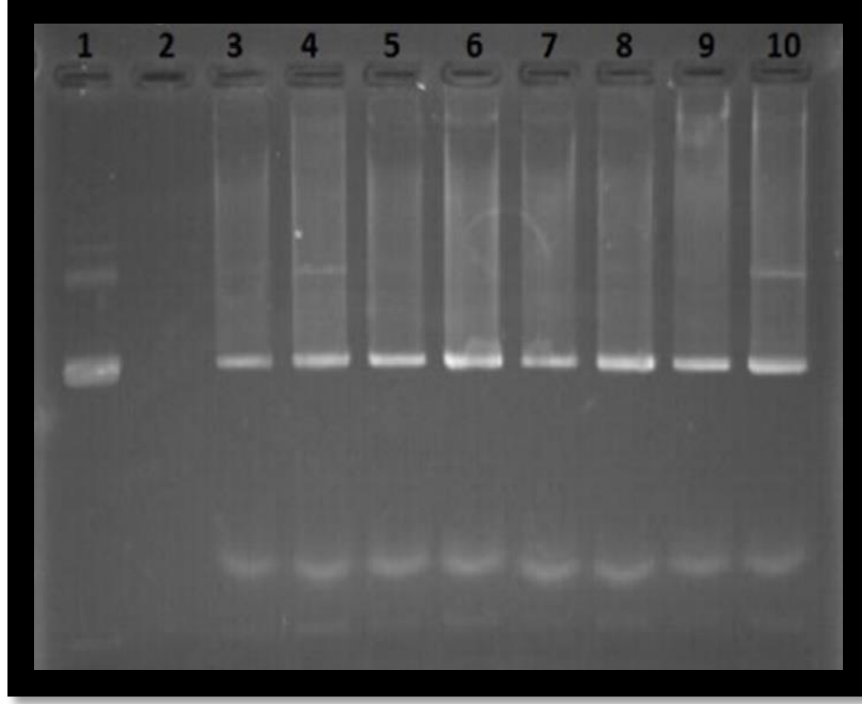
(1: MAS, 2,8: %0 SDS, 3,9: %0,5 SDS, 4,10: %1 SDS, 5,11: %1,5 SDS, 6,12: %2 SDS, 7,13: %2,5 SDS, 2-7: DNA:KLN 1:1, 8-13 DNA:KLN 1:2)



Şekil 17: KLNeq ve KLNct formülasyonlarının kompleksleşmelerinin ve SDS teşvikli salım yeteneklerinin karşılaştırılması (1: pDNA, 2: KLNeq, 3: KLNct, 4: KLNeq.DNA, 5: KLNct.DNA, 6: KLNeq.DNA+%1 SDS, 7: KLNct.DNA+%1 SDS)

#### 4. DNaz I Enziminden Korumanın Araştırılması

Bölüm 2.6'da gösterildiği şekilde hazırlanıp jele yüklenen örneklerin agaroz jel görüntüsü *Şekil 18*'de gösterilmiştir.

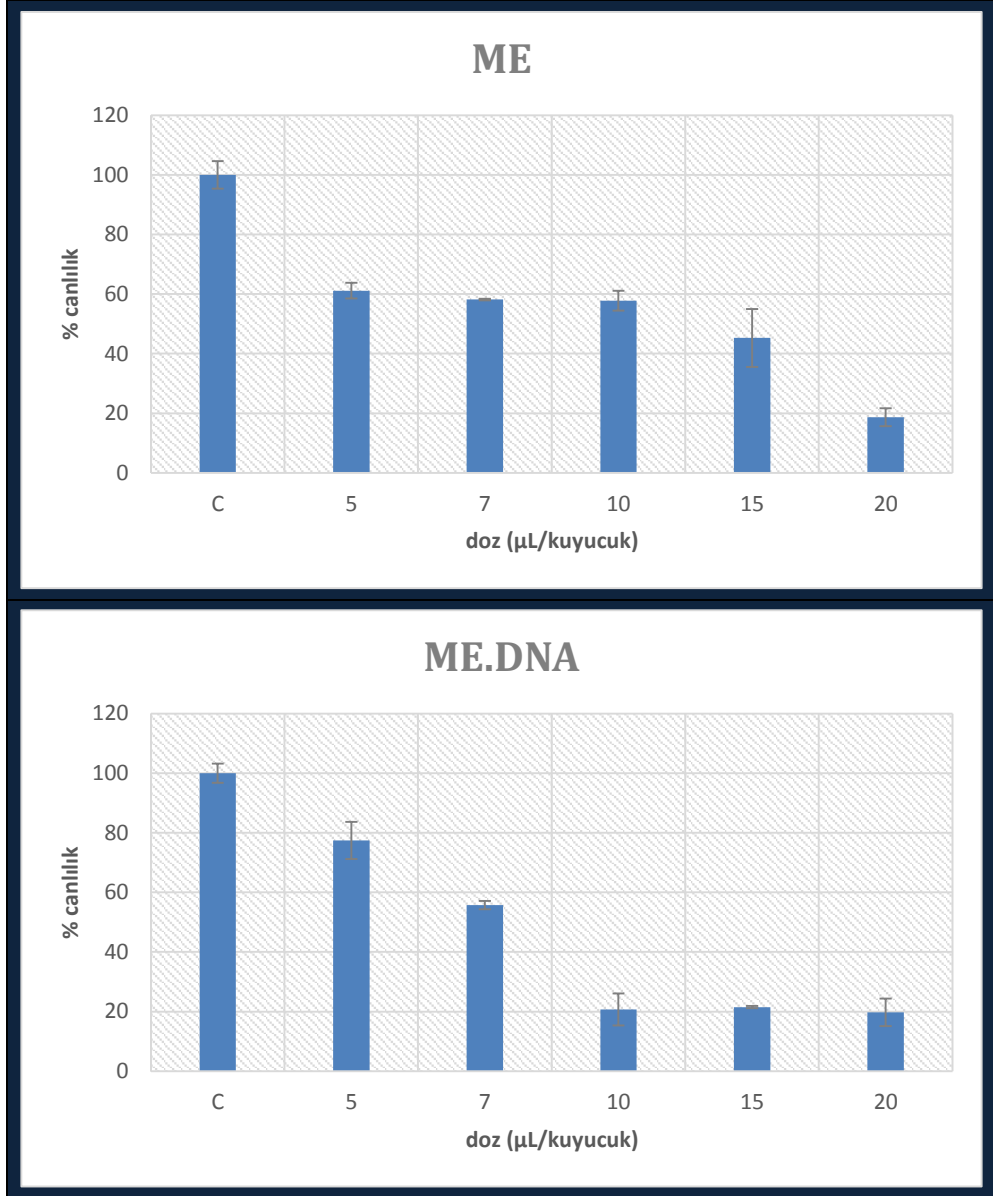


Şekil 18: DNaz I koruma testine ilişkin agaroz jel görüntüsü

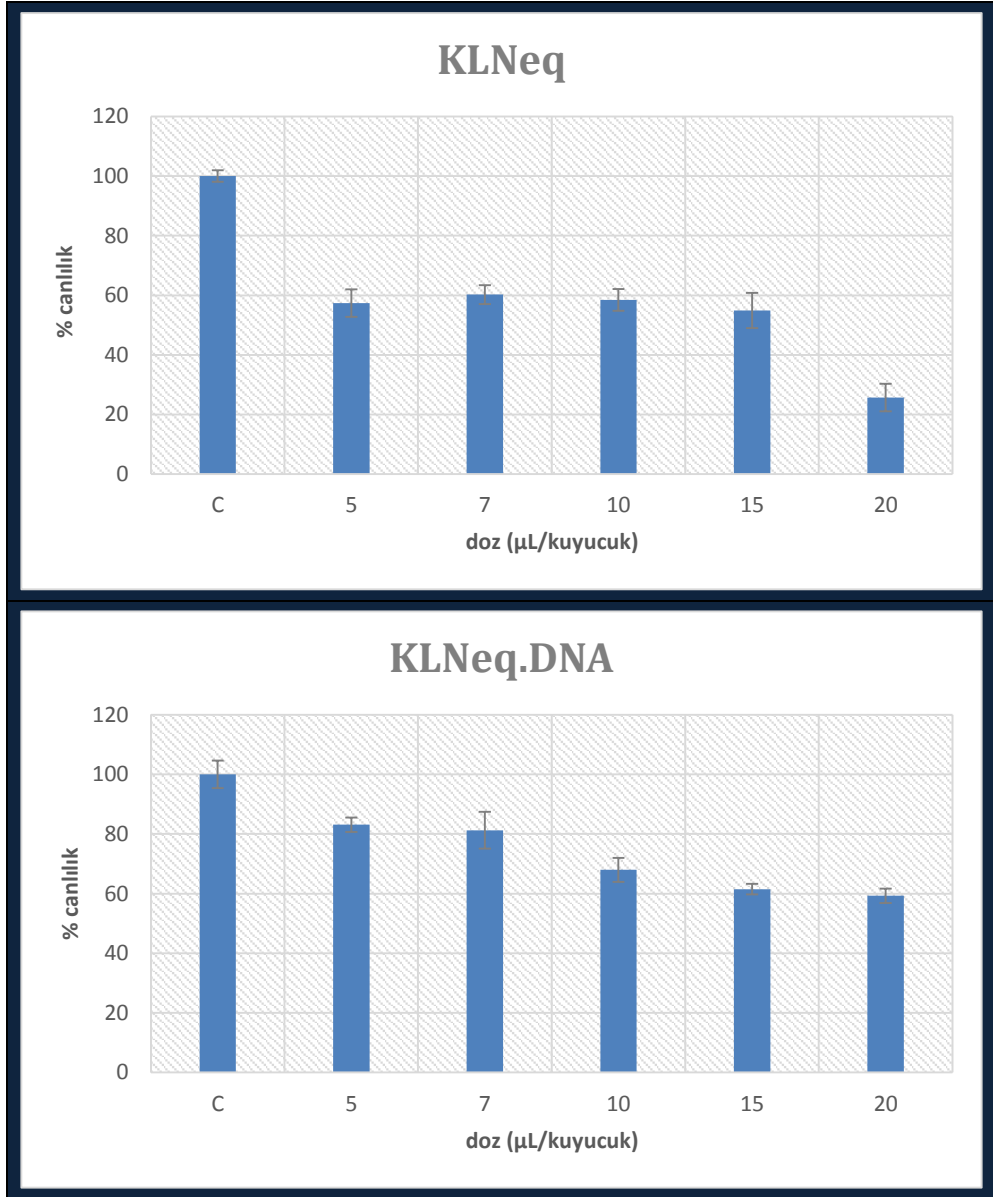
(1: DNA kontrol, 2: DNA+DNaz, 3-5-7-9: DNA:KLN 1:1, 4-6-8-10: DNA:KLN 2:1, 3-4-7-8: biolabs, 5-6-9-10: fermentas)

#### 5. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

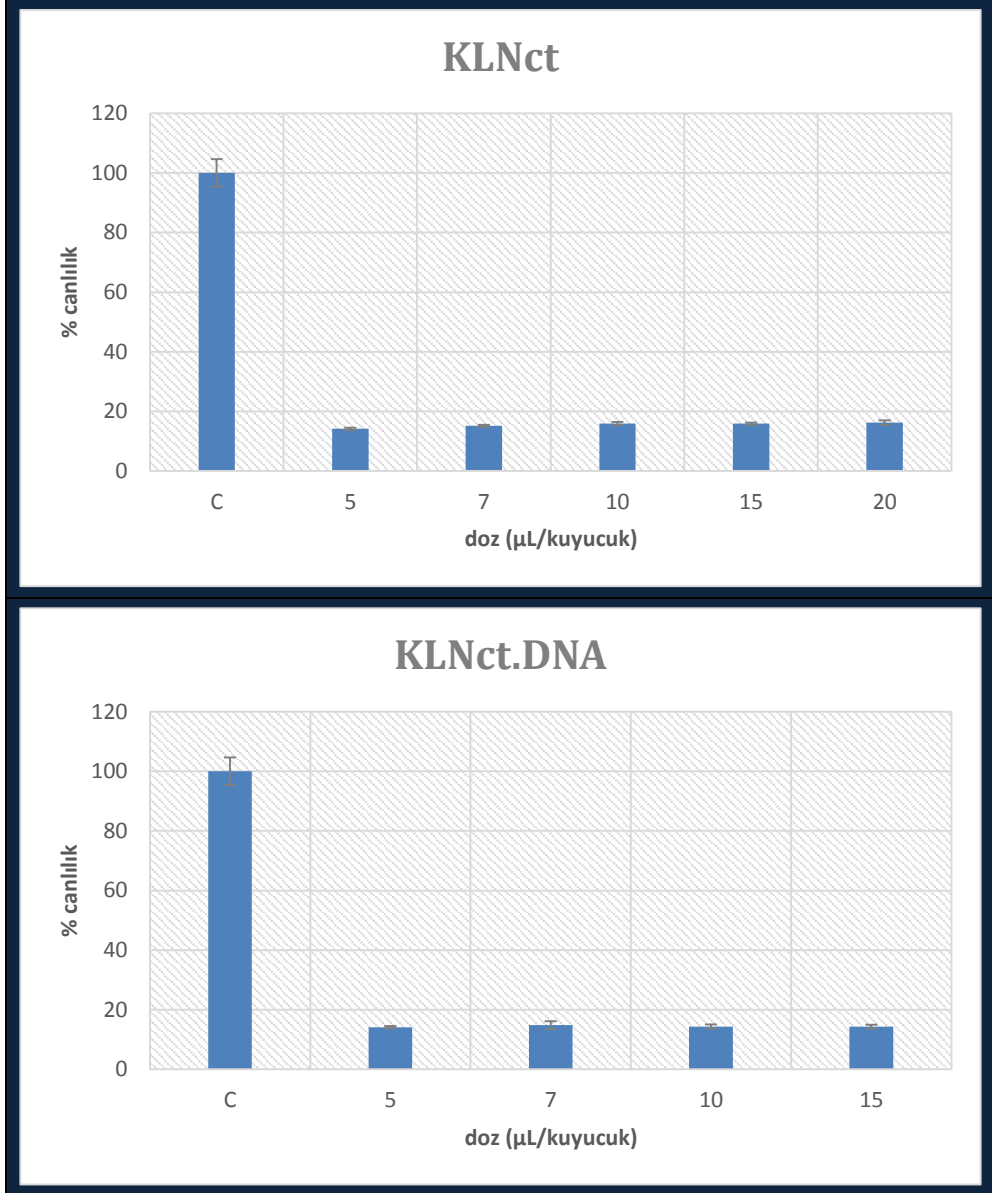
Hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen absorbanlarla hesaplanan % canlılık değerlerine göre oluşturulan grafikler aşağıda verilmiştir. Hücre kültürü kontrolü olarak kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri %100 alınarak hesaplamalar yapılmıştır.



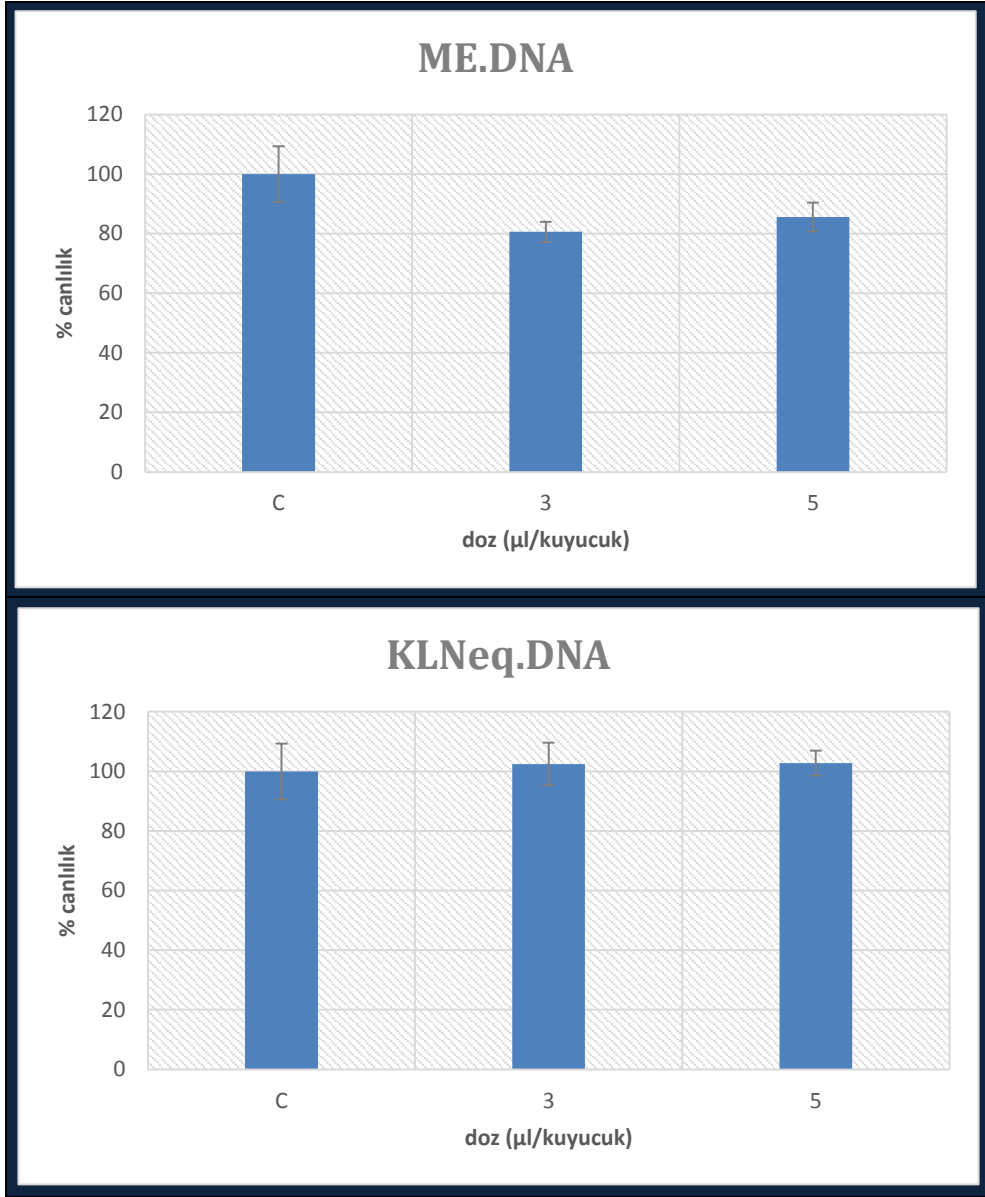
Şekil 19: DNA yüklenmiş ve yüklenmemiş mikroemülsiyon formülasyonunun belirtilen dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 20: KLNeq formülasyonunun (DNA ile kompleksleştirilmiş ve kompleksleştirilmemiş) belirtilen dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 21:DNAct formülasyonunun (DNA ile kompleksleştirilmiş ve kompleksleştirilmemiş) belirtilen dozlarının hücre canlılığı üzerine etkisi



Şekil 22: ME.DNA ve KLNeq.DNA formülasyonları için 3 ve 5 µL dozlarının %canlılık grafikleri

## 6. Transfeksiyon Yeteneğinin Floresans Mikroskopta Gözlenmesi

Transfeksiyon sonrası floresans mikroskopta alınan görüntüler Şekil 24’de gösterilmiştir. A, C, E ve G olarak kodlanan resimler DAPI boyama, karşılıklıdakiler aynı örneklerin (sırasıyla B, D, F ve H) yeşil floresans görüntüleridir.

## 7. Flow(Akım) Sitometri Yöntemine Ait Bulgular

Transfeksiyon etkinliği için akım sitometresi cihazının yazılımında yeşil folerasan protein kodlayan plazmit için uygun olan FL1-A grafiği kullanılmıştır. Yazılımdan alınıp yorumlanan grafikler Şekil 23’de gösterilmiştir. Kontrol olarak çıplak DNA kullanılmıştır.

## 8. İn-Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

Franz difüzyon hücrelerinden alınan örneklerin konsantrasyonları Tablo 16’de gösterilmiştir. Bu absorbanslar baz alınarak liyofilize edilen ve edilmeyen örneklerin salım grafiği oluşturulmuştur (Şekil 25).

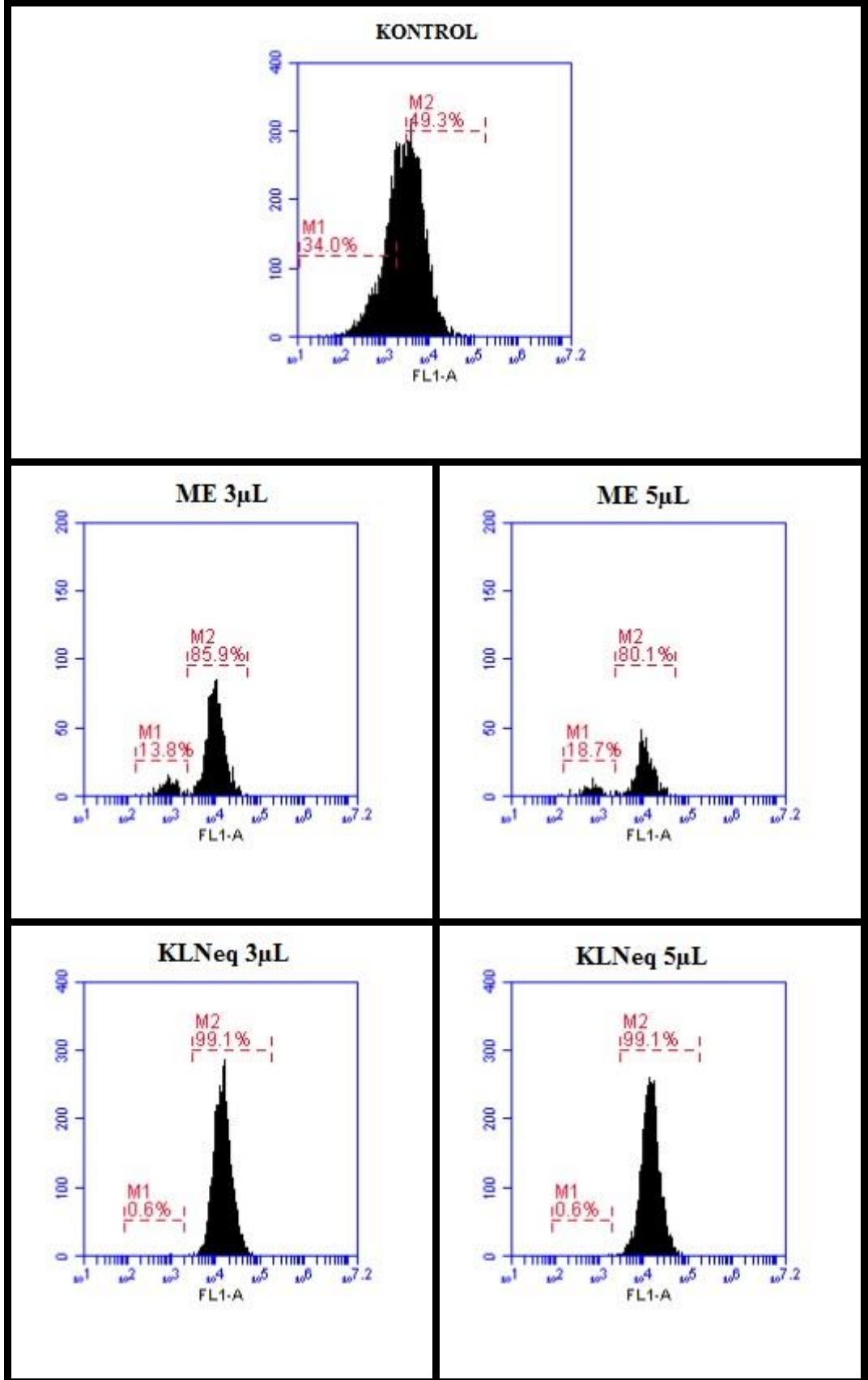
## 9. Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Tablo 15: KLNeq formülasyonunun partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksinin belirli zaman aralıklarıyla ölçümüne ilişkin sonuçlar

	<b>Partikül Boyutu (nm)</b>	<b>Polidispersite İndeksi</b>	<b>Zeta potansiyeli (mV)</b>
<b>1. gün</b>	87,3	0,238	10,20
<b>15. gün</b>	96,8	0,203	9,3
<b>30. gün</b>	93,8	0,241	13,15
<b>45. gün</b>	77,8	0,251	

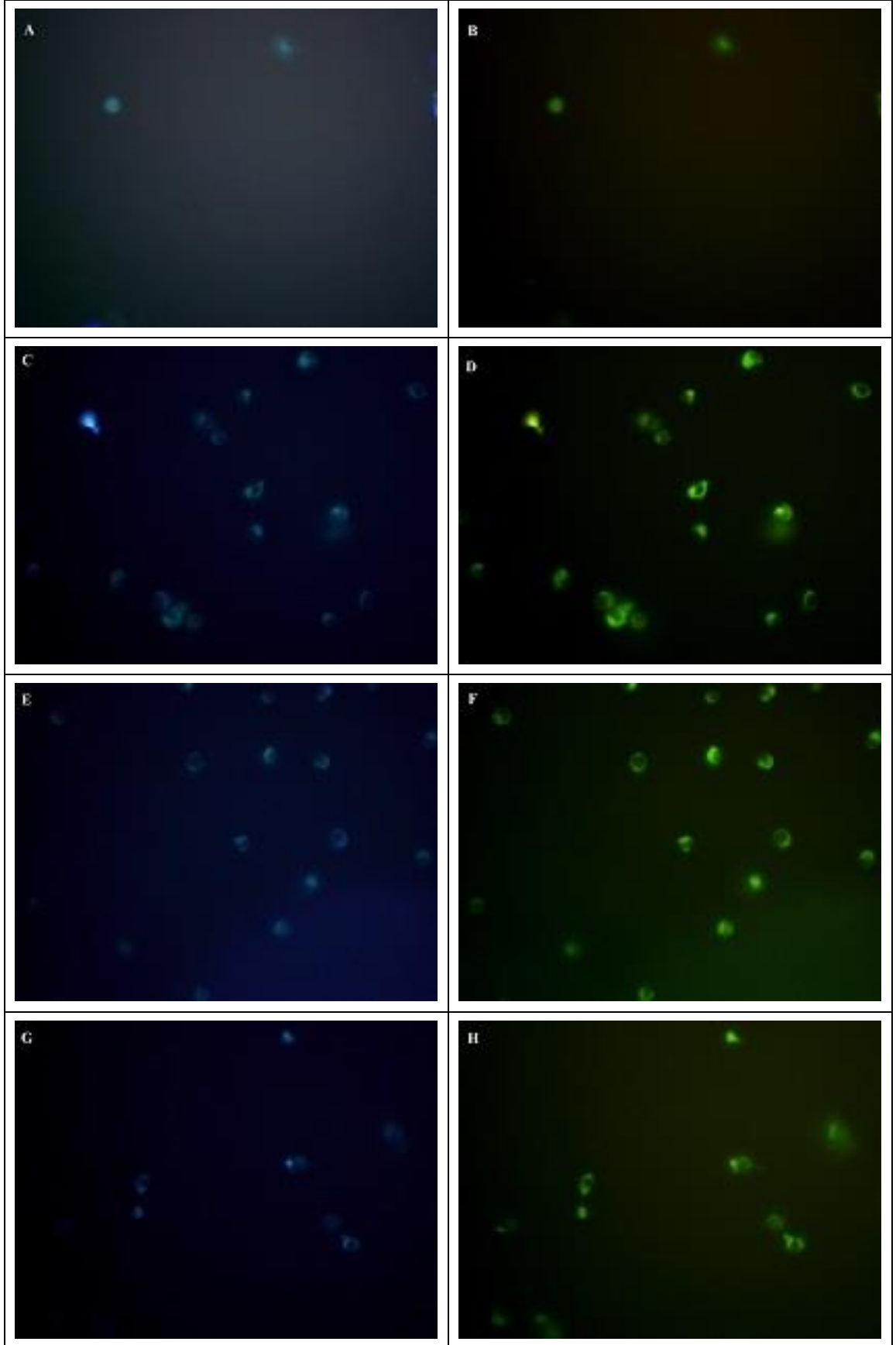
Stabilite çalışmalarına ait bulgular *Tablo 15*’de gösterilmiştir. 45. gün zeta potansiyel değeri okunamamıştır. 60. gün formülasyonda bulanma gözlenmiştir. İstatistiksel değişim Şekil 26’de grafiksel olarak ifade edilmiştir.

Mikroemülsiyon çalışmaları iki ay boyunca görsel olarak izlenmiş ve stabilitesinde bir değişme gözlenmemiştir.



Şekil 23: Flow Sitometride transfekte ve transfekte olmayan hücrelerin karşılaştırılması (M1: YFP negatif, M2: YFP pozitif)(Kontrol: pDNA+L929 hücreleri)

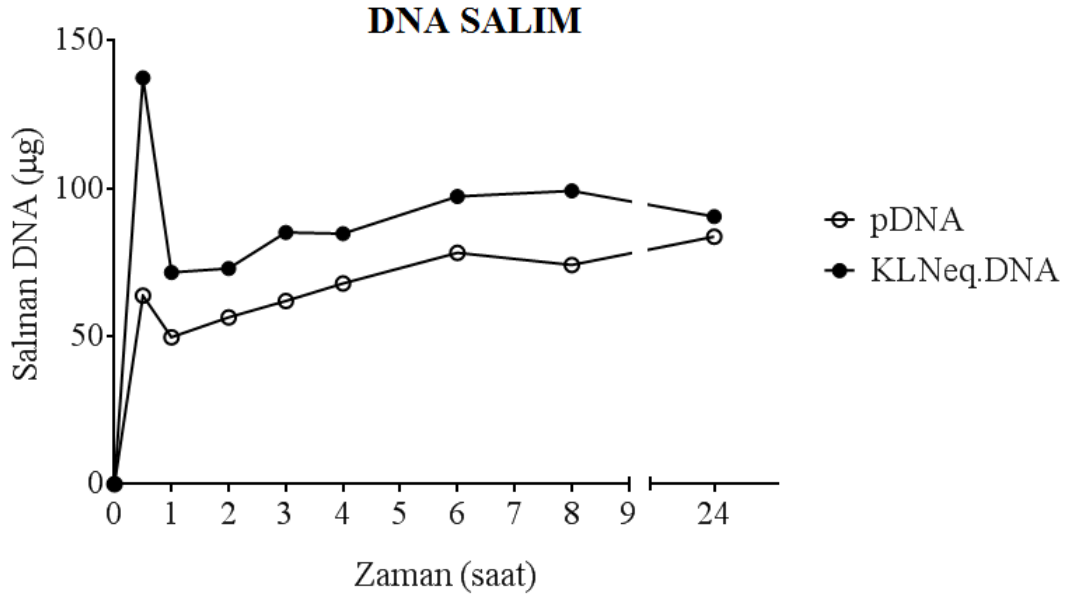




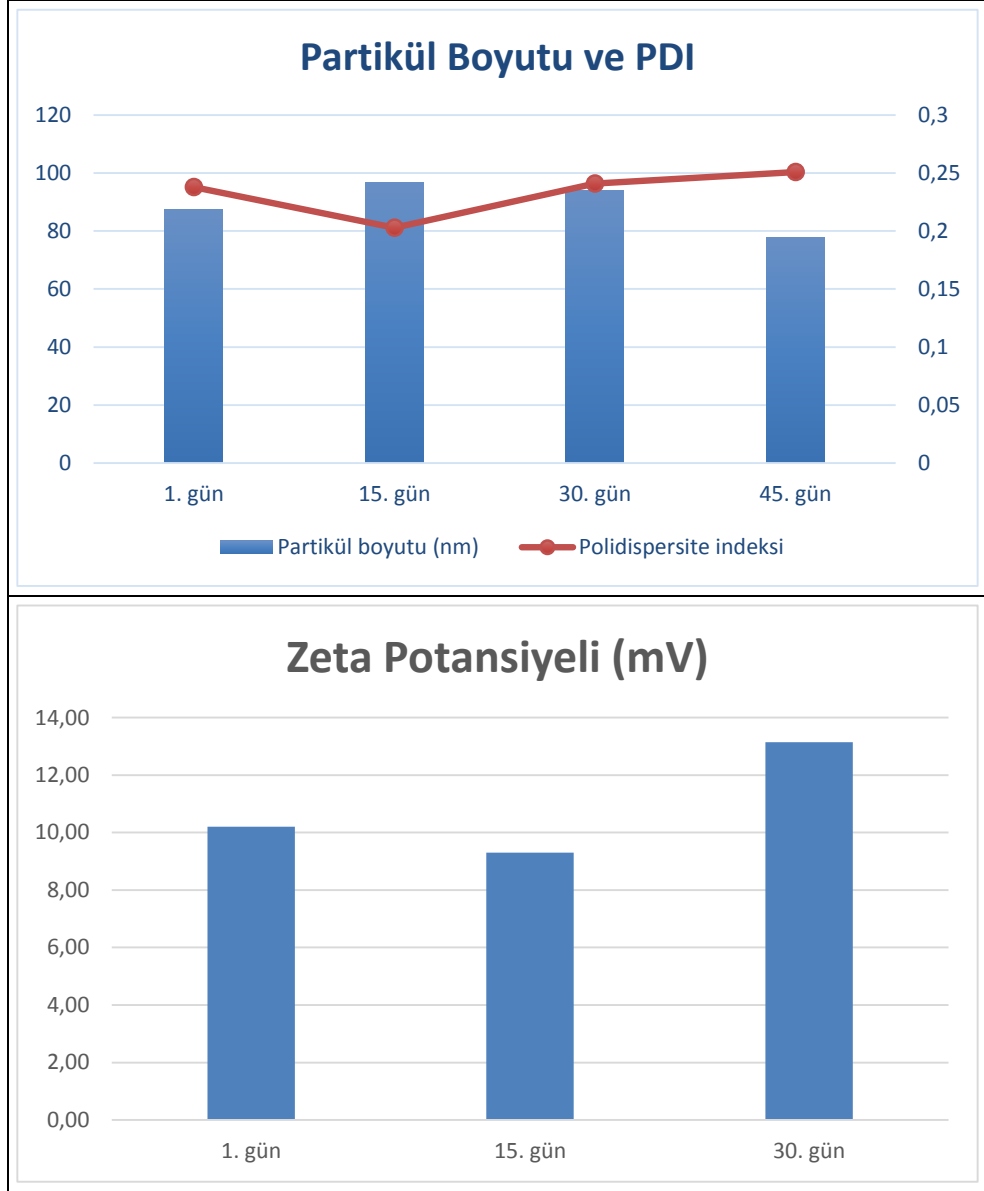
Şekil 24: Transfekte olan L929 fare fibroblast hücrelerinin floresans mikroskop görüntüsü (A ve B: Mikroemülsiyon formülasyonu, C ve D: KLNeq 3  $\mu$ L, E ve F: KLNeq 5  $\mu$ L, G ve H: Kontrol(DNA+L929 hücreleri) )

Tablo 16: Nanodrop cihazından alınan ölçüm sonuçları

Zaman Aralığı (saat)	KONTROL (pDNA) (LİYOFİLİZASYON)			KLNeq:DNA KOMPLEKS (LİYOFİLİZASYON)		
	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280 (nm)	260/230 (nm)	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280 (nm)	260/230 (nm)
0,5	127,6	1,41	0,76	275	1,41	0,68
1	74	1,51	0,81	88,2	1,52	0,69
2	72,5	1,54	0,84	73,3	1,45	0,72
3	69,2	1,49	0,72	83	1,49	0,79
4	67,2	1,41	0,7	65,7	1,65	0,97
6	74,4	1,56	0,74	77,7	1,62	1,07
8	51,3	1,39	0,58	65,9	1,43	0,77
24	60,3	1,55	0,71	35,3	1,45	0,53



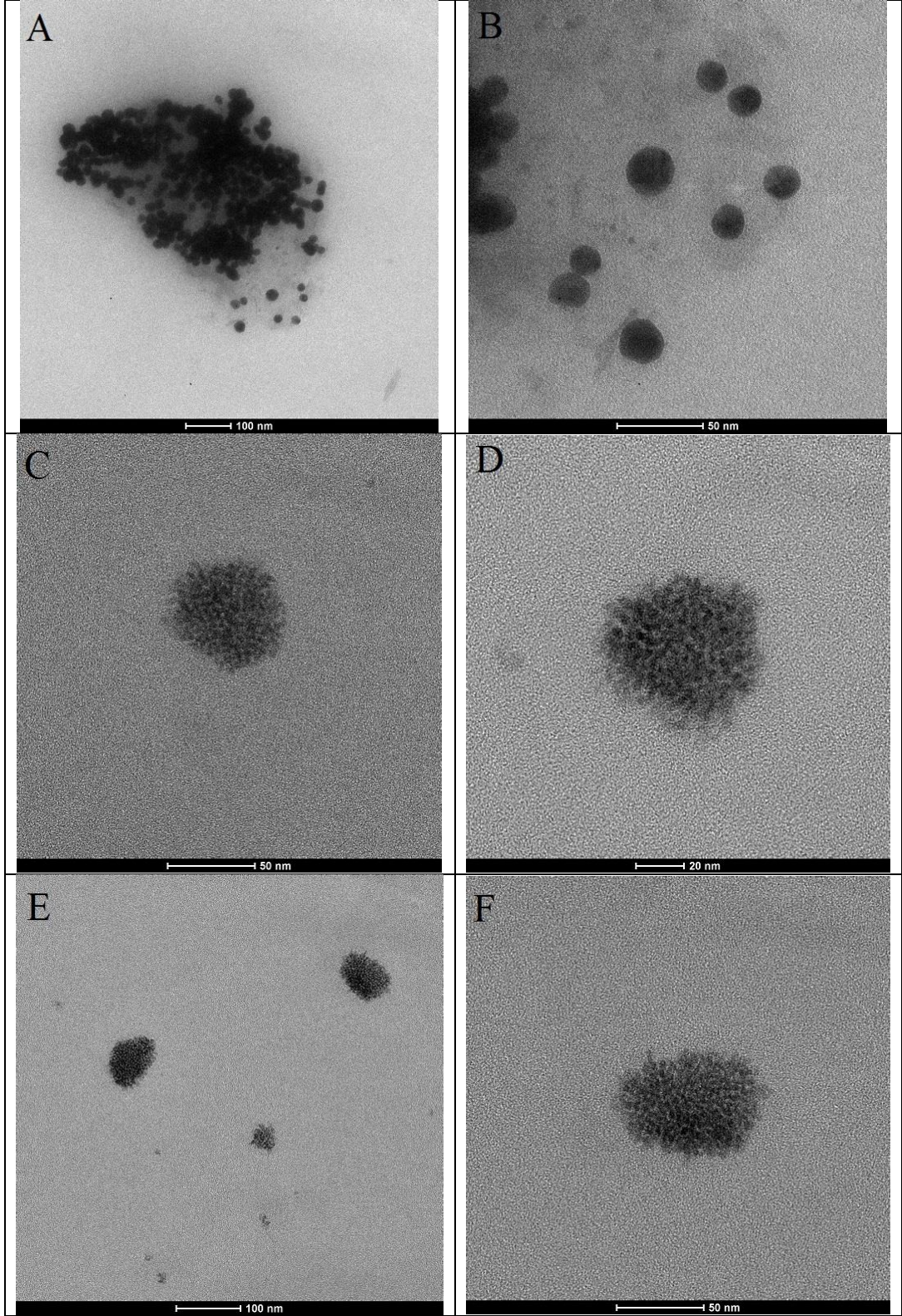
Şekil 25: Zamana bağlı olarak KLNeq.DNA formülasyonundan salınan DNA miktarı



Şekil 26: KLNeq formülasyonunun zamana bağlı partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değişimi

## 10. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleri

KLNeq ve KLNeq.DNA kompleksine ait CTEM görüntüleri Şekil 27'da gösterilmiştir. A ve B kodlu olan görüntüler KLNeq formülasyonuna aittir. C,D,E ve F kodlu görüntüler DNA ile 1:1(h:h) oranında kompleks yapılmış KLNeq formülasyonuna aittir. Mikroemülsiyon formülasyonu yoğun yağ içeriği nedeniyle görüntülenememiştir.



Şekil 27: KLNeq ve KLNeq.DNA formülasyonlarının CTEM görüntüleri  
(A,B: KLNeq , C,D,E,F: KLNeq.DNA)

#### IV. TARTIŞMA

Plazmit DNA saflaştırması için invitrogen plazmit maxiprep hazır kit kullanılmıştır. Maxiprep kit kullanıldığı için DNA saflaştırması denemelerin en başında yapılmış ve yeteri kadar plazmit DNA elde edilmiştir (35). *NdeI* ve *HindIII* enzimleri kullanılan pDNA dizisinde tek noktadan kesim yapabilen enzimlerdir. Bu nedenle çift enzim kesimi şeklinde kullanılmışlardır. *PvuII* enziminin ise aynı pDNA içerisinde iki farklı tanıma dizisi yer almaktadır. Enzim tanıma dizileri Şekil 10'da gösterilmiştir. Enzim kesimleri ile yapılan deney Tablo 6'da belirtilmiştir, sonuç olarak Şekil 11'deki jel görüntüsü elde edilmiştir. İzole edilen DNA ile kontrol DNA'nın aynı oranda jelde yürüdüğü görülmektedir (Şekil 11'de 2. ve 3. kuyucuk). İzole edilen DNA daha yüksek konsantrasyonda olduğu için daha fazla ışığa yapmıştır. *PvuII* enzimiyle kesilmiş kontrol pDNA ve izole edilen pDNA 4 ve 5. kuyucuklarda görülmektedir. *PvuII* enziminin pDNA üzerindeki kesim yerleri 2861. ve 2251. bazlardır. Yani *PvuII* enzimiyle kesilen 4700 kb'lık pEGFP-C1 plazmit DNA'sının 610 ve 4090 kb'lık iki lineer DNA parçası oluşturması gerekmektedir. 4 ve 5. kuyucuklara bakıldığında bu büyüklükteki parçalar görülmektedir. 6-7 ve 8-9. kuyucuklarda *HindIII* ve *NdeI* enzimi birlikte kullanılmıştır. Her iki enzim de tek noktadan kesim yapmaktadır ve bu noktalar sırasıyla 1352 ve 234. bazlardır. Bu kuyucuklarda görülen bantların aynı hizada olması izole ve kontrol DNA'nın aynı olduğunu göstermektedir. Yine iki kesim noktası olduğu için iki lineer DNA parçası beklenmektedir ve bunlar 1118 ve 3582 kb büyüklüğündedir. Jel görüntüsünde bu büyüklüklerin yaklaşık olarak sağladığı görülmektedir.

DNA taşıyıcı olarak mikroemülsiyon formülasyonu geliştirilmesindeki amaç; mikroemülsiyonların termodinamik olarak dayanıklı, transparan ve DNA taşımaya uygun, kendiliğinden oluşan sistemler olmasıdır (36). Deriden geçişi ve DNA'nın formülasyona yüklenebilmesini kolaylaştıran kitozan gibi maddeler mikroemülsiyonların yapısına kolayca katılabilmektedir (37). S/Y türü mikroemülsiyonların viskozitesi yüksek olduğundan deri üzerinde daha uzun süre kalabilmektedir. Ayrıca suda çözünebilir maddeleri iç fazında hapsederek dış etkilere korunmasını ve yapısının bozulmamasını sağlamaktadır (38). Bahsedilen bu nedenlerden dolayı mikroemülsiyonlar topikal ve transdermal uygulamaya uygun sistemlerdir. Ön formülasyon çalışmaları olarak çeşitli yağ-sürfaktan-kosürfaktan karışımları (Tablo 7) denenmiştir. Süürfaktan olarak berrak sistem oluşumunu

sağladığı için Plurol Oleique seçilmiş HLB değeri düşük olduğundan bu değer için yukarı çekilmesi için tween 80 ikinci sürfaktan olarak kullanılmıştır. Seçilen formülasyon içeriği ve bu içeriğin seçildiği alanı gösteren faz diyagramı Şekil 12'de gösterilmiştir. ME formülasyonunun HLB değeri içerdiği maddelerin HLB değerine ve bunların formülasyondaki yüzdelere göre 5,63 olarak hesaplanmıştır (39).

KLN formülasyonu için Precirol ATO5 yağı kullanılmıştır. Kosürfaktan olarak etanolün seçilme sebebi toksik özellik göstermemesi ve formülasyondaki lesitini kolayca çözebilmesidir. Formülasyona DNA yüklenerek hücrelere DNA aktarımı amaçlandığı için, geliştirilecek formülasyonların partikül boyutlarının 100 nm'den küçük olması hedeflenmiştir. Geliştirilen KLN formülasyonuna CTAB ilavesiyle 44,9 nm ve EQ1 ilavesiyle ise 104,7 nm boyutunda partiküller elde edilmiştir. Boyut dağılımının genişliğini belirten PDI değerinin yaklaşık 0,3 olarak ölçülmesi de formülasyonun yüksek polidispersiteye sahip olmadığını göstermektedir. Polidispersite indeksi, partikül büyüklüğü dağılımının standart sapması olarak tanımlanabilir. Yani partikül boyutları arasında çok büyük farklılık yoktur (40). Katyonik madde eklenmesindeki amaç; anyonik yapıya sahip olan KLN formülasyonuna katyonik yük kazandırarak, yapısındaki fosfat gurupları sebebiyle negatif bir yüke sahip olan DNA ile iyonik etkileşimler sonucu kompleksleşmesini sağlamaktır (15,41). CTAB düşük partikül boyutu nedeniyle uygun görülse de toksisite çalışmaları sonucunda aşırı derecede toksik bulunduğundan çalışma için uygun olmadığına karar verilmiştir. Katyonik maddelerin formülasyonların toksisitesini arttırdığı sıkça görülmektedir (41). Bu yüzden toksisitesi düşük olan bir katyonik madde ile çalışmak faydalı olacaktır. EQ1 ile hazırlanan formülasyonun zeta potansiyeli (47,3 mV) DNA ile kompleks oluşturmak için uygun bulunmuştur. Zeta potansiyel değerinin 25 mV'un üzerinde olması DNA:KLN kompleksleşmesi için yeterli görülmektedir (41). DNA:KLN kompleksleşme oranını optimize etmek için çeşitli oranlar (1:1 ile 1:10 arası) denenmiş 1:1 (h/h) oranı uygun bulunmuştur (Şekil 14). Tüm kuyucuklardaki ışın miktarının aynı olduğu ve DNA'nın formülasyondan ayrılmayıp jelde yürümediği görüldüğünden kompleksleşmenin başarılı olduğu gözlenmiştir. 4 numaralı kuyucuktan sonra, komplekslerin verdiği ışınımın kuyucuğun üst tarafında olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin komplekslerdeki KLN oranının artmasıyla, komplekslerin taşıdığı katyonik özelliğin de buna paralel olarak artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın önem

arz etmesinin nedeni maksimum DNA bağlanması için optimum KLN:DNA oranının belirlenmesi gerekliliğidir (41). SDS teşvikli DNA salım çalışmasında DNA:KLN oranı 1:1 ve 1:2 (h/h) olarak deneme yapılmıştır. Artan SDS oranlarıyla deneme gerçekleştirilmiştir (toplamda %0,5 ile %2,5 arası). Şekil 16'da görüldüğü üzere 2 ve 8 numaralı SDS içermeyen kuyucuklarda DNA kuyucuğun dışına çıkamamış, yani salınmamıştır. Diğer tüm oranlarda DNA'nın SDS varlığında salındığı görülmektedir. DNazI koruma deneyi için SDS oranı olarak %1 ile çalışılmıştır. DNazI koruma deneyinde sonuçların daha güvenilir olması için 2 farklı markanın ürünü(Fermentas ve Biolabs) enzimler kullanılmıştır. DNA:KLN oranı olarak 1:1 ve 2:1 (h/h) olmak üzere 2 oran denenmiştir. Şekil 18'de 2 numaralı kuyucukta çıplak DNA ve DNazI enzimi karşılaştırıldığında, enzimin pDNA'yı parçaladığı görülmektedir. Sonraki kuyucuklarda DNA açık sarmal ve küçük miktarlarda nick DNA halinde görülmektedir. Uygulanan örneklerde formülasyonun DNA'yı DNaz tarafından parçalanmaktan koruduğu net bir şekilde görülmektedir. Yapılan denemeler sonucunda KLNeq formülasyonunun DNA'yı hem DNazI enziminden koruduğu hem de başarılı bir şekilde salabildiği görülmektedir. Jel görüntülemesi gerektiren bu denemeler ME formülasyonu ile yapılamamıştır. Bunun nedeni, ME formülasyonunun yoğun yağ içeriği sebebiyle, jele yüklendiğinde jelin kuyucuğundan dışarı çıkarak tampon içerisinde dağılmasıdır.

L929 fare fibroblast hücreleri ile yapılan toksisite çalışmaları sonucunda Şekil 19'da görüldüğü üzere ME formülasyonu ile 5, 7 ve 10  $\mu$ L'lik dozlarda %60 civarı; ME.DNA formülasyonu ile 5 ve 7  $\mu$ L'lik formülasyonlarda sırasıyla %80 ve %60 civarı bir canlılık görülmüştür. Daha yüksek dozlarda canlılığın azaldığı, yani formülasyonunun toksisitesinin arttığı görülmüştür. 5  $\mu$ L doz uygulamasında görülen %60 canlılık oranının, formülasyona DNA yüklendiğinde %80'e çıktığı görülmüş, bu sebeple ME.DNA formülasyonunun 5  $\mu$ L olarak hücre kültürüne uygulanması için uygun olduğuna karar verilmiştir. Şekil 20'de görüldüğü gibi KLNeq formülasyonu uygulandığında 5, 7, 10, 15  $\mu$ L dozlarda yaklaşık %60 oranında hücre canlılığı saptanmıştır. Formülasyona 1:1 (h/h) oranında DNA yüklendiğinde toksisitenin azaldığı, dolayısıyla hücre canlılığının arttığı gözlenmiştir. KLNeq.DNA formülasyonu için 5 ve 7  $\mu$ L dozlarının %80 canlılık göstermesi nedeniyle hücre kültürüne uygulanabileceğine karar verilmiştir. Şekil 21'de ise KLNct ve KLNct.DNA formülasyonlarının uygulanan tüm dozlarının L929 hücreleri için toksik

olduğu görülmektedir. Bunun üzerine KLNct formülasyonunun pDNA ile kompleks yapıp yapmadığı araştırılmış,

Şekil 17’de başarılı bir şekilde kompleksleştiği görülmüştür. Bu sebeple daha sonraki çalışmalar için uygulanabilir bulunmamıştır. Uygulanabilir bulunan formülasyonların(ME.DNA ve KLNeq.DNA) 3 ve 5 µL dozları L929 fare fibroblast hücreleriyle tekrar denenmiştir (Şekil 22). Belirtilen grafikteki sonuçlardan anlaşıldığı üzere bu formülasyonlar için 3 ve 5 µL dozlarda canlılık oranı çok yüksektir. Plazmit DNA’nın hücrelere aktarılması, yani transfeksiyon yeteneği, floresans mikroskop ile görüntülenerek incelenmiştir. Şekil 24’te görüldüğü üzere KLNeq ve ME formülasyonları L929 fare fibroblast hücreleri için transfeksiyon yeteneğine sahiptir. Şekil 24A ve Şekil 24B’de görüldüğü gibi ME formülasyonu uygulanan kültürde görüntülenene alanda daha az hücre bulunmaktadır. Bunun nedeni katyonik madde olan kitozan ve DNA’nın iç sulu faza hapsedilmesidir. Yani iç sulu faz yüzdesi formülasyonun geneline oranla çok düşük olduğundan DNA miktarı da KLNeq formülasyonuna göre daha düşüktür. Flow sitometri sonuçlarına göre, ME.DNA formülasyonunun kontrol (çıplak DNA) uygulamasından daha fazla hücreyi transfekte ettiği gözlenmiştir (Şekil 23). Ayrıca ME.DNA formülasyonunun 3 µL dozu, 5 µL dozuna göre yaklaşık %6 daha fazla transfeksiyon etkinliği göstermiştir. Bunun nedeni daha düşük dozda sistemin toksisitesinin azalmasıdır. KLNeq formülasyonunda ise %99 ile çok başarılı bir transfeksiyon gözlenmiştir (Şekil 23). Çıplak DNA ile saptanan transfekte hücrenin yaklaşık 2 katı kadar transfekte hücre hesaplanmıştır. Transfeksiyon etkinliği testi sonuçlarına göre ME.DNA ve KLNeq.DNA sistemlerinin her ikisi de başarılıdır.

İn vitro salım çalışmaları Franz difüzyon hücrelerinde 12000 dalton cutoff selüloz membran kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tampon olarak PBS kullanılmasının nedeni, literatür taramaları sonucunda dermal çalışmalarda en yaygın PBS tamponunun kullanıldığının görülmesidir (42-44). Bölüm 2.8’de belirtilen aralıklarla alınan örnekler +4°C’de saklanarak, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’na ait Nanodrop spektrofotometresi ile belirtilen absorbanslarda DNA konsantrasyonu ölçülmüştür. DNA konsantrasyonları anlamsız olduğundan dolayı alternatif bir metod olarak liyofilizasyon işlemi yapılarak örneklerin konsantre şekilde ölçülmesi sağlanmıştır. +4°C’de saklanan örneklerin bir kısmı ayrılıp liyofilize edildikten sonra 10 kat süspende hale getirilip tekrar



Nanodrop cihazında ölçüm alınmıştır. Liyofilizasyon işlemi sonucunda örneklerden sadece su uzaklaştırıldığı için, PBS tampon içeriği liyofilize haldeki örneklerin içeriğinde bulunmaktadır. Bu nedenle 10 kat konsantre süspansiyon haline getirme işlemi UP Su kullanılarak yapılmıştır. Tablo 16'de konsantre örneklerde saptanan DNA konsantrasyonu gösterilmiştir. KLNeq.DNA örneğinin konsantrasyonu kontrol pDNA örneğinin konsantrasyonundan yüksek ölçülmüştür. Bu da göstermektedir ki, KLNeq formülasyonu pDNA'nın selüloz membrandan geçiş etkinliğini arttırmaktadır. Tabloda görülen A260/A280 absorbans değerlerinin 1,8'e yakın olması protein kontaminasyonunun çok az olduğu ya da olmadığını göstermektedir. A260/A230 değerinin 1'e yakın olması da alınan absorbansların DNA'ya ait olduğunu ispatlamaktadır. Bu denemenin sonucunda elde edilen zamana bağlı olarak konsantrasyon değişim grafiği Şekil 25'te gösterilmiştir.

Stabilite çalışmalarına ait bulgular Tablo 15'de verilmiş bu sonuçlar grafiğe geçirilerek Şekil 26'da irdelenmiştir. KLNeq formülasyonunun 45 gün süresince PDI ve Zeta potansiyelinde büyük bir değişme görülmemiş, partikül boyutunda küçük bir azalma gözlenmiştir. Del Pozo-Rodriguez'in çalışmasında (45) görüldüğü üzere KLN formülasyonları için 2 aylık bir süreçte partikül boyutlarında %30-40 arasında bir azalma mümkündür. Bizim çalışmamızda bu azalma 45 gün sonra %10 civarındadır. Ayrıca Del Pozo-Rodriguez'in çalışmasında görüldüğü gibi KLN formülasyonlarının stabilite sürecinde zeta potansiyel değerlerinde sapmalar bulunmaktadır. 45.gün ölçümlerinden sonra formülasyonun yapısı gözle görülür bir şekilde bozularak, berrak olan yapı bulanık sütsü bir yapıyı andıran görünüm kazanmıştır. Stabilite çalışmalarındaki Partikül boyutu, PDI, Zeta potansiyel değerlerinde ve görünümde benzer sonuçlar diğer çalışmalarda da görülmektedir (46-48). Mikroemülsiyon formülasyonu hem DNA'lı hem DNA'sız olarak gözlenmiş 60 gün boyunca görünümünde bir değişme olmamıştır.

KLNeq ve KLNeq.DNA formülasyonlarının TEM analizi sonuçları Şekil 27'da görülmektedir. Mikroemülsiyon formülasyonu yoğun yağ içeriğinden dolayı kurutulamadığından dolayı görüntülenememiştir. Partiküllerin küresel ve birbirine benzer yapılarda olduğu görülmektedir, bu yapı formülasyonun stabil bir sistem olduğunu göstermektedir (48). KLNeq formülasyonuna ait A ve B şekillerinde partiküllerin birbirine yakın oldukları görülmektedir. Bunun sebebi örneklerin kurutulmuş olarak görüntülenmesidir. Partikül boyutlarının 100 nm'nin altında olduğu

görülmektedir. Zetasizer cihazı ile ölçtüğümüz sonuçlar partikül boyutu dağılımını 100 nm civarında göstermekteydi. Şekil 27A ve Şekil 27B’de görüldüğü gibi formülasyonda 100 nm’den küçük partiküller de bulunmaktadır. KLNeq.DNA formülasyonuna ait Şekil 27C- F görüntülerinde DNA ile kompleksleşen partiküllerin boyutunun 50 nm civarında olduğu görülmektedir. Şekil 27A ve Şekil 27B ile Şekil 27C-F karşılaştırıldığında, DNA içeren ve içermeyen formülasyonlardaki partiküllerin morfolojisi arasındaki farklılık belirgin bir şekilde görülmektedir. Dolayısıyla Şekil 27’den yola çıkılarak kompleksleşmenin başarılı olduğu sonucuna da varılabilir.

## V. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 2 farklı katyonik madde (EQ1 ve CTAB) kullanılarak mikroemülsiyon yöntemiyle KLN formülasyonları ve katyonik madde olarak kitozan kullanılarak ME formülasyonu elde edilmiştir. KLN formülasyonlarının partikül boyutu DNA ile kompleksleşme işleminden sonra hedeflendiği gibi 100 nm'nin altında ölçülmüştür. Zeta potansiyeli 30 mV'un üzerinde elde edilmiştir.

KLN formülasyonları SDS teşvikli DNA salım ve DNazI koruma çalışmaları ile test edilmiş ve sistemin DNA'yı DNazI enziminden koruduğu ve SDS teşvikiyle salabildiği saptanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında ME.DNA ve KLNeq.DNA formülasyonlarının toksik olmadığı, KLNet formülasyonunun ise toksik olduğu bulunmuştur. Hücreler floresan mikroskopta incelenerek formülasyonların transfeksiyon yetenekleri, akım sitometri cihazında sayımları yapılarak da transfeksiyon etkinlikleri incelenmiştir. Bu işlemler sonucunda geliştirilen formülasyonların transfeksiyon yeteneklerinin ve transfeksiyon etkinliklerinin çıplak DNA'ya göre yüksek olduğu görülmüştür.

KLNeq ve KLNeq.DNA formülasyonlarının partikül boyutu ve morfolojileri CTEM görüntüleme ile incelenerek yaklaşık 50 nm boyutunda oldukları ve DNA yüklenmesiyle yüzey görünümünün farklılaştığı tespit edilmiştir.

İn vitro salım çalışması ile KLNeq.DNA formülasyonu içerisindeki DNA'nın 12000 dalton cutoff selüloz membran'dan geçebildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak tezin amacı olan dermal yolla kullanıma uygun DNA taşıyıcı sistemler olarak KLNeq.DNA ve ME.DNA formülasyonları geliştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Değim T. Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar. In: Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Acartürk F ve ark. editors. Modern Farmasötik Teknoloji. Ankara : Türk Eczacılar Birliđi Eczacılık Akademisi Yayını, 2009: s. 337-361.
2. Li J, Li X, Zhang Y, Zhou XK, Yang HS, Chen XC et. al. Gene therapy for psoriasis in the K14-VEGF transgenic mause model by topical transdermal delivery of interleukin-4 using ultradeformable cationic liposome. Journal of Gene Medicine 2010;12:481-490.
3. Gürsoy AZ. Transdermal Sistemler. In: Gursoy AZ editor. Kontrollü Salım Sistemleri. İstanbul : Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 2002; s. 239-260.
4. Health Medicine and Anatomy Reference Pictures [internet] [cited: 2013 11 28]. Available from: <http://healthfavo.com/wp-content/uploads/2013/09/labeled-skin-diagrams.gif>.
5. Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modelling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. Advanced Drug Delivery Reviews 2013;65:152-168.
6. Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W et. al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2011;63:470-491.
7. Nano-Reviews [internet] [cited: 2014 08 21]. Available from: <http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/article/viewFile/21521/31190/109068>.
8. Koolman J, Roehm KH. Secon Edition. Color Atlas of Biochemistry. Stuttgart, Germany: Thieme; 2005.
9. Panno J. Gene Therapy: Threating deseases by reparing genes. New York, USA: Facts on file inc. ; 2005.
10. Strachnan T, Read AP. Human Molecular Genetics 3rd edition. Andover, Hampshire, UK: Garland Science/Taylor & Francis group; 2004.
11. Mavilio F, Ferrari G. Genetic modification of somatic stem cells. Science and Society 2008;9/1:64–69.

12. Murakami T, Sunada Y. Plasmid DNA Gene Therapy by Electroporation: Principles and Recent Advances. *Current gene therapy* 2011;11:447-56.
13. Kaş HS. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler. Gürsoy AZ editor. *Kontrollü Salım Sistemleri*. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 2002:65-95.
14. Demirel M, Yazan Y. Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000;25:167-169.
15. Carillo C, Sanchez-Hernandez N, Garcia-Montoya E, Perez-Lozano P, Sune-Negre JM, Tico JR et. al. DNA Delivery via Cationic Solid Lipid Nanoparticles (SLNs). *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 49:157-165.
16. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 47:165-196.
17. Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56:1257-1272.
18. Freitas C, Lucks JS, Müller RH. Effect of storage conditions on long-term stability of "solid lipid nanoparticles"(SLN) in aqueous dispersions.. Budapest : Proceedin 1st world meeting AGPI/APV, 9/11 may 1995.
19. Schwarz C, Menhert W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded Solid Lipid Nanoparticles(SLN). *International Journal of Pharmaceutics* 1997; 157:171-179.
20. Müller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles(SLN) for Controlled Drug Delivery- a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50:161-167.
21. Muller RH, Maaßen S, Weyhers H, Specht F, Lucks JS. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 1996; 138:85-94.
22. Muhlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics* 1998; 45:149-155.
23. Wissing SA, Müller RH. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release* 2002; 81:225–233.
24. Vaghasiya H, Kumar A, Sawant K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafinehydrochloride. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 49:311–322.

25. Çelebi N. Emülsiyonlar. In:Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Acartürk F ve ark. Modern farmasötik teknoloji. Ankara : Fersa matbaacılık ltd. şti., 2007: p. 277-295.
26. Yazan Y. Emülsiyon sistemler. In: Gürsoy AZ editor. Kontrollü salım sistemleri. İstanbul : Kontrollü salım sistemleri derneği yayını, 2002: p. 133-146.
27. Griffin WC. Classification of Surface-Active Agents by 'HLB'. Journal of the Society of Cosmetic Chemists 1949;5:311-326.
28. Ng SF, Rouse J, Sanderson D, Eccleston G. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. Pharmaceutics 2010;2:209-223.
29. addgene [internet]. 2014[cited: 2014 12 3] Available From: [http://www.addgene.org/browse/sequence\\_vdb/2487/](http://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2487/).
30. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
31. New England Biolabs inc. [internet]. 2014[cited: 2014 12 3]. Available From: <https://www.neb.com>.
32. Ege MA, Karasulu HY, Güneri T. Triangle Phase Diagram Analysis Software. 2004.
33. Shaji J, Jain V, Lodha S. Chitosan: A Novel Pharmaceutical Excipient. International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences 2010;1:11-28.
34. Lankea SSS, Kolli CS, Stroma JG, Bangaa AK. Enhanced transdermal delivery of low molecular weight heparin by barrier perturbation. International Journal of Pharmaceutics 2009;365:26-33.
35. Life Technologies web site [internet]. 2014[cited: 2014 12 3]. Available From: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K210017>.
36. Heuschkel S, Goebel A, Neubert HHR. Microemulsions - Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery 2008;97: 603-631.
37. Lee PW, Hsu SH, Tsai JS, Chen FR, Huang PJ, Ke CY et. al. Multifunctional core-shell polymeric nanoparticles for transdermal DNA delivery and epidermal Langerhans cells tracking. Biomaterials 2010;31:2425–2434.
38. Barolia B, Lo'pez-Quintelac MA, Delgado-Charrod MB, Fadda AM, Blanco-Me'ndez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. Journal of Controlled Release 2000;69:209-218.

39. PharmCalc. [internet] .2006[cited: 2014 12 4]. Available From: [http://www.al-nasir.com/www/PharmCalc/mob\\_exec\\_calc.php?ID=hlb](http://www.al-nasir.com/www/PharmCalc/mob_exec_calc.php?ID=hlb).
40. Gaur PK, Mishra S, Bajpai M, Mishra A. Enhanced Oral Bioavailability of Efavirenz by Solid Lipid Nanoparticles: In Vitro Drug Release and Pharmacokinetics Studies 2014;363404:1-9.
41. Fabregas A, Sanches-Hernandez N, Tico JR, Garcia-Montoya E, Perez-Lozano P, Sune-Negre J et. al. A new optimized formulation of cationic solid lipid nanoparticles intended for gene delivery: Development, characterization and DNA binding efficiency of TCERG1 expression plasmid. *International Journal of Pharmaceutics* 2014;473:270-279.
42. Degim IT, Pugh WJ, Hadgraft J. Skin Permeability Data: Anomalous Results. *International Journal of Pharmaceutics* 1998;170:129-133.
43. Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Domenech J. Assessment of Diclofenac Permeation With Different Formulations: Anti-inflammatory Study of A Selected Formula. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003;19:203-210.
44. Jain SK, Chourasia MK, Soni V, Jain A, Jain NK. Solid Lipid Nanoparticles Bearing Flubiprofen for Transdermal Delivery. *Drug Delivery* 2005;12:207-215.
45. Pozo-Rodríguez AD, Solinís MA, Gascón AR, Pedraz JL. Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009;71: 181–189.
46. Bosea S, Michniak-Kohn B. Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013;48/3:442-452.
47. Bosea S, Duc Y, Takhistovc P, Michniak-Kohn B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;441:56-66.
48. Dolatabadi JEN, Hamishehkar H, Eskandania M, Valizadeh H. Formulation, characterization and cytotoxicity studies of alendronate sodium-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2014;117:21-28.
49. Kinahana DJ, Daltona TM, Davies MR. Measurement of substrate thermal resistance using DNA denaturation temperature. *International Journal of Thermal Sciences* 2010;49/2:333–339.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Ankara'nın Altındağ ilçesinde doğdum. İlk öğrenimimi Demirlibahçe İlk Öğretim okulunda tamamladıktan sonra Keşan Anadolu Lisesinde lise eğitimimi tamamladım. 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünü kazandım. 2011 yılında Lisans eğitimimi bitirdim. 2013 yılından itibaren Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaktayım.

**e-posta:** [ugurkaragoz87@gmail.com](mailto:ugurkaragoz87@gmail.com)