

T.C  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DNA TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRME AMACIYLA MANYETİK  
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Tuba YILMAZ

İZMİR

2012



T.C  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DNA TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRME AMACIYLA MANYETİK  
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi

Tuba YILMAZ

1. Danışman: Doç. Dr. Gülten Kantarcı
2. Danışman: Yard. Doç. Dr. Devrim Demir Dora

İZMİR

2012



## ÖNSÖZ

Son yıllarda gen aktarımı alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tıp, eczacılık, tarım ve birçok alanda gen aktarım çalışmaları hızla devam etmektedir. Gen aktarımında önemli parametreler; istenen genin uygun bir aktarım yöntemiyle, biyolojik bariyerlerden etkilenmeden, nükleer porlardan geçerek ve etkin bir şekilde aktarılabilmesidir. Ayrıca ilgili genin, istenen bölgeye hedeflenmesi de sistemik toksisitenin azalması, gen aktarımının veriminin artması yönünden önemli bir parametredir.

Bu tez çalışmasında manyetik katı lipid nanopartikül formülasyonu üzerinde çalışılmıştır. Manyetik katı lipid nanopartiküller, organizmaya verildiğinde dışarıdan manyetik alan uygulanarak aktif hedefleme yapılması için formülasyon hazırlanmıştır. Bu çalışmanın farklı yönü çoklu emülsiyon sistemde manyetik katı lipid nanopartikül oluşturulmasıdır.

Bu tez çalışması, kimyasal gen taşıyıcı sistemleri geliştirerek bir adım daha ileriye götürmek, bilimsel çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla yapılmıştır.

Tez çalışmamda, biyoteknoloji alanını sevdiğim ve bu alana ilgi duyduğum için beni yüksek lisans programına kabul eden değerli hocam Prof. Dr. Zeki Topçu'ya, çalışmalarım sırasında çok fazla emek veren, benim için zaman harcayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Gülten Kantarcı'ya ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli hocam Yard. Doç. Dr. Devrim Demir'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bilgileriyle bana deneysel çalışmalarımı destekleyen değerli arkadaşlarım doktora öğrencileri Hasan Akbaba ve Mustafa Kotmakchiev'e teşekkürlerimi sunarım.

Titre imli örnek manyetometresi (VSM) ile manyetik özellik ölçümlerimi İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi'nde gerçekleştiren sayın Doç. Dr. Yusuf Selamet'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tez çalışmaları sırasında eczanemle ilgilendiği ve bana bu konuda destek olduğu için Ecz. Barbaros Kılınçkaya'ya ve eğitimim süresince bana ellerinden gelen tüm desteği veren aileme çok teşekkür ederim.

## Ç NDEK LER

EK LLER D Z N .....	viii
TABLolar D Z N .....	x
KISALTMALAR.....	xii
G R VE AMAÇ.....	1
BÖLÜM I-TEOR K B LG LER.....	3
I.1.Gen Tedavisi.....	3
I.1.1.Tarihçe.....	4
I.1.2.Gen Tedavisi Uygulanan Hastalıklar.....	7
I.1.2.1.Monogenetik Kalıtsal Bozukluklar.....	7
I.1.2.2.Multifonksiyonel Bozukluklar.....	8
I.1.3.Gen Tedavisi Yöntemleri.....	9
I.1.4.Gen Tedavisi Yakla ımları .....	9
I.1.4.1.E ey Hücre Gen Tedavisi .....	9
I.1.4.2.Somatik Hücre Gen Tedavisi.....	10
I.1.5.Gen Ta ıyıcı Sistemler.....	10
I.1.5.1.Biyolojik (Viral) Ta ıyıcı Sistemler .....	10
I.1.5.1.1.Retroviral Vektörler.....	11
I.1.5.1.2.Adenoviral Vektörler .....	12
I.1.5.1.3.Herpes Simpleks Virüsü (HSV).....	13
I.1.5.1.4.Adeno li kili Virüs (AAV).....	14
I.1.5.1.5.Poxvirüs .....	14
I.1.5.2.Biyolojik Olmayan (Viral Olmayan) Ta ıyıcı Sistemler .....	15
I.1.5.2.1.Fiziksel Yöntemler.....	15
I.1.5.2.1.1. Ç ıplak DNA'nın Do rudan Enjeksiyonu.....	15
I.1.5.2.1.2.Elektroporasyon ve Nükleofeksiyon.....	15
I.1.5.2.1.3.Biyolistik Gen Tabancası.....	16
I.1.5.2.1.4.Ultrason.....	16
I.1.5.2.2.Kimyasal Sistemler.....	16
I.1.5.2.2.1.Katyonik Lipidler.....	17
I.1.5.2.2.2.Katyonik Peptidler .....	18
I.1.5.2.2.3.Katyonik Polimerler.....	18
a. Poli-(L-Lizin) ve Kopolimerleri.....	19
b. Polietilenimin(PEI) .....	20
c. Kitosan Polimeri .....	20
d. Jelatin .....	21

I.1.5.2.2.4.Lipozomlar.....	21
I.1.5.2.2.5.Emülsiyonlar.....	21
a. Çoklu Emülsiyonlar.....	23
b. Mikroemülsiyonlar.....	24
c. Florokarbon Emülsiyonlar .....	25
d. Submikro Emülsiyonlar .....	25
e. Kuru Mikroemülsiyon.....	25
I.1.5.2.2.6.Dendrimerler.....	26
I.1.5.2.2.7.Nanopartiküller.....	26
I.1.6.Viral Gen Ta ıyıcı Sistemlerin Önündeki Engeller .....	26
I.1.6.1.DNA'nın Hücresel Birle mesi.....	26
I.1.6.2.Viral Olmayan Gen Ta ıma Sistemlerinin Hücre çine Alınması .....	27
I.1.6.3.Viral Olmayan Gen Ta ıma Sistemlerinin Hücreler Arası Trafi i.....	27
I.1.6.5.Plazmit DNA'nın Hücresel Lokalizasyonu .....	29
I.1.6.6.Viral Olmayan Ta ıyıcı Sistemlerin Toksisitesi .....	29
I.2.Katı Lipid Nanopartiküller (KLN).....	29
I.2.1.KLN'lerin Avantajları .....	31
I.2.2.KLN'lerin Dezavantajları .....	32
I.2.3.KLN Hazırlama Yöntemleri .....	32
I.2.3.1.Mikroemülsiyon Yöntemi.....	32
I.2.3.2.Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi.....	33
a. Sıcak Homojenizasyon.....	33
b. So uk Homojenizasyon .....	34
I.2.3.3.Yüksek Hızda Karı tırma ve/veya Ultrasonikasyon Yöntemi .....	34
I.2.3.4.Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi .....	35
I.2.4.KLN'lerin Karakterizasyonu .....	36
I.2.4.1.Partikül Büyüklü ü ve Da ılım Tayini.....	36
I.2.4.2.Partikül ekli Tayini.....	37
I.2.4.3. Zeta Potansiyel Ölçümü.....	37
I.2.5.KLN'lerin Stabilitesi .....	37
I.2.6.KLN'lerin Sterilizasyonu.....	38
I.2.7.KLN'lerden Etkin Madde Salımı.....	38
I.2.8.KLN'lerin Uygulama Yolları .....	39
a. Oral Uygulama.....	39
b. Parenteral Uygulama.....	39
c. Topikal Uygulama.....	40



d. Pulmoner Uygulama .....	40
e. Oküler Uygulama.....	40
f. A ılarda Adjuvan Olarak Uygulama.....	41
g. Etkin Madde Hedefleme .....	42
I.3.Manyetizma .....	43
I.3.1.Maddenin Manyetizmi.....	43
I.3.1.1. Diamanyetik Maddeler .....	43
I.3.1.2. Paramanyetik Maddeler .....	43
I.3.1.3.Ferromanyetik Maddeler .....	44
I.3.1.4.Antiferromanyetik Maddeler .....	44
I.3.1.5.Ferrimanyetik Maddeler .....	44
I.3.2. Manyetik Nanopartiküller.....	45
I.3.2.1.Manyetik Nanopartikül Sentezleme Yöntemleri .....	45
I.3.2.1.1.Ortak Çöktürme .....	45
I.3.2.1.2.Mikroemülsiyon.....	46
I.3.2.1.3.Hidrotermal Sentez .....	46
I.3.2.1.4.Termal Parçalanma .....	46
I.3.2.2.Demir Oksit Yapılar .....	47
I.3.2.2.1.Maghemite .....	48
I.3.2.2.2.Hematite.....	48
I.3.2.2.3.Manyetit.....	48
BOLÜM II-DENEYSEL KISIM .....	50
II.1.Materyal ve Metod .....	50
II.1.1. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler.....	50
II.1.2. Kullanılan Araç-Gereçler .....	51
II.2. Deneysel Çalışmalar.....	51
II.2.1. Manyetik KLN Formülasyonlarının Hazırlanması.....	51
II.2.1.1. Ön Formülasyon Çalışmaları.....	51
II.2.1.1.1. S/Y Mikroemülsiyonun Hazırlanması.....	52
II.2.1.1.1.1. Sürfaktan Olarak Span 85 ve Polaksamer 188 Kullanılarak S/Y Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması.....	52
II.2.1.1.1.2. Sürfaktan Olarak Span 80 ve Tween 80 Kullanılarak S/Y Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması.....	54
II.2.1.1.2. Sürfaktan Olarak Tween 80 Kullanılarak Y/S Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması .....	55
II.2.1.1.3. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Denemeleri.....	56

II.2.1.1.3.1. F <sub>3</sub> Formülasyonu ile Yapılan Deneme .....	56
II.2.1.1.3.2. F <sub>6</sub> Formülasyonu ile Yapılan Deneme .....	57
II.2.1.1.4. Ön Formülasyon Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen S/Y/S Çoklu Emülsiyon Formülasyonu .....	57
II.2.1.1.4.1. Seçilen Formülasyonun Karakterizasyon Çalışmaları.....	58
II.2.1.1.4.1.1. Seçilen Formülasyonun Partikül Büyüklüğü Ölçümü .....	58
II.2.1.1.4.1.2. Seçilen Formülasyonun Zeta Potansiyeli Ölçümü.....	58
II.2.1.1.5. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sisteme Katyoniklik Kazandırılarak, Katyonik KLN Elde Edilmesi .....	59
II.2.1.1.6. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sisteme Manyetik Özellik Kazandırılarak KLN Elde Edilmesi .....	60
II.2.1.1.6.1. D <sub>1</sub> Su Fazına Alkali lavesi ile Fazlar Arasındaki İyon Geçişi Sa lanarak Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalışması .....	60
II.2.1.1.6.2. ç Su Fazına Alkali lavesi ile Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalışması.....	61
II.2.2. Hazırlanan Manyetik DNA:KLN Kompleksleri ile Yapılan Çalışmalar.....	62
II.2.2.1. Taze Hazırlanan DNA:mKLN Kompleks Oluşumunun Araştırılması .....	63
II.2.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Te vikli DNA Salım Çalışmaları: .....	65
<b>BÖLÜM III-BULGULAR</b> .....	<b>67</b>
III.1. Ön Formülasyon Çalışmaları .....	67
III.1.1. S/Y Mikroemülsiyon Hazırlanması.....	67
III.1.2. Y/S Mikroemülsiyon Hazırlanması.....	68
III.1.3. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Formülasyon Denenmesi .....	69
III.2. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sistemde Elde Edilen KLN'lerin Karakterizasyonu.....	70
III.3. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sisteme Katyoniklik Kazandırılarak, Katyonik KLN Elde Edilmesi ve Seçilen Formülasyonun Karakterizasyonu.....	70
III.4. Katyonik KLN'lere Manyetik Özellik Kazandırılması .....	71
III.4.1. D <sub>1</sub> Su Fazına Alkali lavesi ile Fazlar Arasındaki İyon Geçişi Sa lanarak Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalışması .....	71
III.4.2. ç Su Fazına Alkali lavesi ile Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalışması .....	72
III.5. Manyetik KLN:DNA Komplekslerinin Hazırlanması .....	75
III.5.1. Taze Hazırlanan Manyetik KLN:DNA Komplekslerinin Agaroz Jel Elektroforezi .....	75
III.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi Sonucu 1:15, 1:16, 1:17 (h/h) DNA:mKLN Komplekslerinin Partikül Büyüklük ve Zeta Potansiyel Ölçümü .....	76
III.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Te vikli DNA Salım Çalışmaları .....	76
<b>BÖLÜM IV-TARTI MA</b> .....	<b>78</b>
<b>BÖLÜM-V. SONUÇ VE ÖNER LER</b> .....	<b>82</b>

ÖZET .....	83
ABSTRACT.....	85
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇM .....	95

## EK LLER D Z N

### BÖLÜM I.

ekil I. 1. DDAB'ın kimyasal yapısı .....	17
ekil I. 2. Katyonik peptid-DNA komplekslerinin biyolojik bariyerden geçi için ematik gösterimi .....	18
ekil I. 3. Poli-L-Lizin (PLL)'in kimyasal yapısı .....	19
ekil I. 4. Dorsal Polietilenimin (PEI)'in kimyasal yapısı .....	20
ekil I. 5. Kitosan polimerinin kimyasal yapısı .....	21
ekil I. 6. Span 80'in kimyasal yapısı (a), Polaksamer 188'in kimyasal yapısı (b) a:80 b:27 .....	22
ekil I. 7. Tween 80'in kimyasal yapısı .....	24
ekil I. 8. DNA'nın sitozolden taşınması .....	28
ekil I. 9. Kompritol'ün kimyasal yapısı .....	31
ekil I. 10. Esterquat 01'in kimyasal yapısı .....	31
ekil I. 11. Manyetit kristal yapısı sağ üstteki atom demir .....	49

### BÖLÜM II.

ekil II. 1. pEGFP-C1 gen haritası .....	63
---	----

### BÖLÜM III.

ekil III. 1. Katı lipid olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188, ko-sürfaktan olarak Propanol 1 kullanılarak oluşturulan faz diyagramı, gri alanlar S/Y mikroemülsiyon alanlarını göstermektedir .....	67
ekil III. 2. Katı lipid olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve tween 80, ko-sürfaktan olarak Propanol 1 kullanılarak oluşturulan faz diyagramı, gri alanlar S/Y mikroemülsiyon alanlarını göstermektedir .....	68

ekil III. 3. Katı lipid olarak kompritol, sürfaktan olarak Tween 80, ko-sürfaktan olarak Etanol kullanılarak olu turulan faz diyagramı, gri alanlar Y/S mikroemülsiyon alanlarını göstermektedir.....	69
ekil III. 4. mKLN formülasyonunun partikül büyüklü ü grafi i.....	73
ekil III. 5. mKLN formülasyonunun zeta potansiyeli ölçüm grafi i .....	73
ekil III. 6. mKLN'lerin manyetik özelli i.....	74
ekil III. 7. mKLN'lerin manyetik özelli i.....	74
ekil III. 8. Manyetik alanda mKLN'lerin manyetik özelli i.....	75
ekil III. 9. Manyetik DNA:KLN komplekslerinin agaroz jel elektroforez foto rafı	75
ekil III. 10. Manyetik DNA:KLN komplekslerinden sabit SDS konsantrasyonunda DNA'nın salımını gösteren agaroz jel foto rafı.....	77

## TABLolar D Z N

### BÖLÜM I.

Tablo I. 1 Gen tedavisinin tarihçesi .....	6
Tablo II. 2 Manyetik nanopartikül sentezleme yöntemleri, avantajları ve dezavantajları .....	47

### BÖLÜM II.

Tablo II. 1. Deneysel kısımda kullanılan biyolojik ve kimyasal maddeler.....	50
Tablo II. 2. Deney kısmında kullanılan araç- gereçler.....	51
Tablo II. 3. Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon formülasyonlarının içerik yüzdeleri....	53
Tablo II. 4. Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon sistemlerin distile su ile titrasyonları sonucu elde edilen formülasyon içerikleri.....	53
Tablo II. 5. Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon formülasyonlarının içerik yüzdeleri....	54
Tablo II. 6. Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon sistemlerin distile su ile titrasyonları sonucu elde edilen formülasyon içerikleri.....	55
Tablo II. 7. Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak T 80 ve ko-sürfaktan olarak Etanol kullanılarak hazırlanan Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarının içerik yüzdeleri.....	56
Tablo II. 8 DNA:mKLN kompleksle tırme, agaroz jel içeri i.....	65
Tablo II. 9 Agaroz jel elektroforezi sonucu seçilen örnek 19, 20, ve 21 no'lu kuyucuklardaki komplekslerin partikül büyüklü ü ve zeta potansiyel ölçümü hazırlanmasında kullanılan içerik miktarları.....	65

Tablo II. 10 SDS salım çalı ması agaroz jel içeri i.....	66
--	----

### **BÖLÜM III.**

Tablo III. 1. F <sub>17</sub> formülasyonunun partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri .....	70
--	----

Tablo III. 2. Katyonik F <sub>17</sub> formülasyonuna Esterquat ilavesiyle elde edilen KLN'lerin partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri .....	71
---	----

Tablo III. 3. Dı su fazına alkali ilavesiyle hazırlanan farklı F <sub>17</sub> formülasyonlarının partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri .....	72
--	----

Tablo III. 4. Manyetik F <sub>17</sub> formülasyonunun partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri .....	73
---	----

Tablo III. 5. Örnek 19, 20 ve 21'in partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri .....	76
--	----

## KISALTMALAR

KLN	Katı lipid nanopartikül
DNA	Deoksiribonükleik asit
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HSV	Herpes Simpleks Virüsü
AAV	Adeno li kili Virüs
RNA	Ribonükleik asit
ADA	Adenozin deaminaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SCID	A ır kombine immün yetmezlik
PLL	Poli-L-Lizin
PEI	Poli-etilenimin
DOGS	Dioktadesilamidoglisil spermin
DDAB	Dimetildioktadesil amonyum bromür
Chol	Kolesterol
PLA	Polilaktik asit
PACA	Polisiyanoakrilat
ER	Endoplazmik retikulum
GRAS	Generally recognized as safe
HPH	Yüksek basınçlı homojenizasyon
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi
LD	Lazer kırılım yöntemi
AFM	Atomik kuvvet mikroskopisi
HLB	Hidrofilik lipofilik balans



FMF	Ailesel akdeniz anemisi
AAT	Alfa-1-antitripsin
DOTAP	2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
BFM	Bromofenol mavisi
XC	Ksilen siyanol
PDI	Polidispersite indeksi
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi
M.A.S.	Moleküler a ırlık standardı
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
VSM	Titre imli örnek manyetometresi
PEG	Polietilen glikol
TOB	Tobramisin

## **G R VE AMAÇ**

Son yıllarda gen aktarımı, ba ta tıp ve eczacılık olmak üzere birçok alanda giderek önem kazanmaktadır. Genlerin tanımlanması ve genetik mühendisli indeki geli meler sonucu, tanımlanan genlerin aktarılması a amasına gelinmi tir. Gen tedavisinin temel amacı, hücrelerin hastalı a yol açan eksik ya da kusurlu genleri yerine sa lıklı kopyalarını yerle tirmektir. Gen tedavisinin temel sorunu gen aktarımıdır. Bu amaçla viral ve viral olmayan gen aktaran sistemler geli tirilmi tir. Viral ta ıyıcı sistemler etkin olmalarına kar ın immunojenite problemleri vardır ve organizmada hastalı a yol açabilmektedirler. Viral olmayan ta ıyıcı sistemler fiziksel yöntemler ve kimyasal sistemler olarak ayrılır. Fiziksel yöntemlerin uygulanması basit ve kolay uygulanabilir olmalarına kar ın, uygulama alanları sınırlıdır. Kimyasal sistemler ise son yıllarda yo un ara tırma konusu olan gen ta ıyıcı sistemlerdir. Bu sistemler DNA'yla kompleks olu turan ya da DNA'yı içine alarak ta ıyan sistemlerdir. Viral olmayan ta ıyıcı sistemler, formülasyonlarının hazırlanması, depolanmaları, saklanmaları kolay oldu u için tercih edilmektedirler. Bu sistemlerin toksisitele ri dü üktür. Viral olmayan gen ta ıyıcı sistemler büyük ölçekte hazırlanabilirler ve hedeflenebilirler.

Bu özelliklerinden dolayı, bu çalı mada viral olmayan ta ıyıcı sistem olan katı lipid nanopartiküllerden (KLN) yararlanılmak istenmi tir. KLN'ler, s/y/s çoklu emülsiyon yönteminden faydalanılarak hazırlanmı tir. Hedefleme i lemi ise KLN'lere kimyasal yöntemden yararlanılarak manyetik özellik kazandırılarak yapılmı tir. Manyetik hedefleme pahalı olmasına kar ın, sistemik dola ımda kolay elimine olan DNA gibi etkin maddeler için uygun bir yöntem oldu u için seçilmi tir.

Çalı manın amacı, çoklu emülsiyon yönteminden yararlanılarak katyonik katı lipid nanopartiküller (KLN) elde etmek; daha sonra bu KLN'lere manyetik özellik kazandırarak pDNA yüklemek ve gen tedavisi için taşıyıcı bir sistem oluşturmaktır.

## **BÖLÜM I-TEORİK BİLGİLER**

### **I.1.Gen Tedavisi**

Moleküler tıp dalının tedavi ya da bir başka deyişle “genetik modifikasyon” kısmını oluşturan tüm uygulamaları kapsayan genel bir terimdir (31).

Gen tedavisi, hücrelere bir genetik materyalin (çoğunlukla bir DNA parçasının) uygun bir yöntemle transfer edilerek hastanın tedavi edilmesidir. DNA parçasının hücre içine sokulması için “transfeksiyon” adı verilir (26). Hücre içindeki gene ise transfer edilmiş gen anlamına gelen “transgen” adı verilir. Bu gen aslında doğrudan bir genin (cDNA - komplementer DNA'nın) kısaltılmış bir versiyonudur (49).

Transgen, konak hücrenin çekirdeğine ulaşır; burada kodladığı proteini sentezlemek için önce okunur, mRNA sentezlenir, sonra mRNA ribozomlara taşınır ve sentez burada gerçekleşir. Transgen, girdiği hücre DNA'sı dışında bir yere yerleşebilir. Bu durumda “epizomal” yerleşimden söz edilir. Eğer transgen girdiği konak hücrenin DNA yapısına katılırsa, o DNA'da yabancı genin katılımıyla edinsel bir mutasyon oluşur. Bu durum “insertional mutagenesis” olarak ifade edilir (59).

İnsan gen tedavisi yalnızca genetik bozukluğun belirlendiği ve normal genlerin izole edilip klonlanabildiği hastalıklar için geçerli bir tedavi türüdür. Gen tedavisi yaklaşımları belirli bir hücre grubunun davranışlarını ya da fonksiyonlarını değiştirmeye yöneliktir. Bu sebeple "insan gen tedavisi" genetik materyalin belirli genetik bozukluğu düzeltmek amacıyla hastalara uygulanması olarak da tanımlanabilir. Bütün hastalıklar göz önüne alındığında şu an bile bu sayı oldukça yüküktür. Doğrudan genetik değişiklikler maya, bakteri, meyve sinekleri ve bazı memeliler üzerinde başarıyla gerçekleştirilmiştir. Fakat bu güne kadar bozuk

genlerin aktivitesinin düzeltilmesinde veya direkt olarak insan genomunun de i tirilmesi gibi tekniklerde ba arılı olunamamı tır (34).

Gen tedavisi, e ey hücresi ve vücut hücresi gen tedavisi olmak üzere iki ana ba lıkta incelenir. E ey hücresi gen tedavisinde, genetik bir bozuklu u önlemek için e ey hücrelerinin genleri de i tirilir. Bu tip tedavide, genlerde yapılan de i iklik ku aktan ku a a aktarılabilece inden, olası bir e ey hücresi gen tedavisi hem etik, hem de teknik sorunlar yaratacaktır (57). Somatik hücre gen tedavisi e ey hücrelerini etkilemez, sadece ilgili ki iyi etkiler. Günümüzde yapılan gen tedavisi çalı malarının ço u vücut hücresi gen tedavisini kapsamaktadır (6).

### **I.1.1.Tarihçe**

Genetik mühendisli i kavramı yeni bir kavram olmayıp ilk defa 6. Uluslararası Genetik Kongresi'nde bitki ve hayvan ıslahı uygulamaları konusunda kullanılmı tır (39). 1960'lı yılların ba ında yabancı DNA transfer çalı maları için uygun memeli hücre kültürlerinin tanımlanıp karakterize edilmesi ile bu kavram bugünkü anlamına daha uygun hale gelmi tir. 1960'ların sonlarına do ru, Papova virüs SV40 ve Polyomavirüs'ün do al ya am döngüleri üzerinde yapılan çalı malarla hücre sel alım mekanizmaların anla ılması ve eksojen genetik materyalin birle tirilmesi konusunda geli meler ya anmı tır (11).

1972 yılında bazı bilim adamları tarafından, iki farklı türe ait DNA fragmanlarını birle tirerek kasıtlı olarak üretilmi “ilk rekombinant DNA” molekülü (rDNA) olu turulması ba arılmı tır. 1973 yılında rDNA molekülleri ilk kez bakteri hücresinde e lenip ço altılmı tır (47).

1974 yılında Rekombinant DNA Tavsiye Komitesi kurulmu tur. Bu komite 1976 yılında ilk klavuzunu yayınlamı tır (62). 1977 yılında rekombinant DNA teknolojileri sayesinde bölme genlerinin ke fi gerçeikle tirilmi tir.

1980 yılında ilk olarak rekombinant DNA teknolojileri olmadan, genetik seçimi geleneksel metodlar ile yapılmış bir bakteri suyunun ya da yaban bir organizma olarak ilk kez patent alınması, ikinci olarak ise tipik bir rekombinant DNA molekülü yapımına ilişkin bir patent olmak üzere iki patent kararıyla yeni biyolojik tekniklerin önemi vurgulanmıştır (33). Yine 1980 yılında ilk deneysel kalıtım deneyi fare deney hücreleri üzerinde yapılmıştır (4).

1981 yılında retroviral vektörler gen tedavisinde önemli bir ilerleme olmuş, retrovirüslerin yaşam döngüsü ve transdüksiyon kapasitesi açıklanmıştır (53).

1982 yılında rekombinant DNA teknolojisi ilk olarak prenatal dönemde orak hücre anemisi hastalığının belirlenmesinde kullanılmıştır (30).

İnsanda ilk gen tedavisi denemesi 1990 yılında Dr. French Anderson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi. Ex vivo gen terapisi stratejisinin kullanıldığı yöntemde, adenzin deaminaz enziminin (ADA) eksikliğinden kaynaklanan hastalığın tedavisi amaçlanmıştır. ADA eksikliği, çok nadir rastlanan genetik bir hastalıktır. Normal bir ADA geninin ürettiği enzim, savunma sisteminin, normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. ADA eksikliği olan hastalarda genin yaban tipi kopyası yoktur ve sahip olunan yetersiz ya da mutant kopyalarsa, düşük seviyeli ADA enzimini üretememektedirler. ADA eksikliğiyle doğan çocuklarda, ciddi boyutlarda bir savunma sistemi sorunu vardır ve sık sık ağır enfeksiyonlara yakalanırlar. En ufak bir virüs enfeksiyonu bile yaşamal tehlike yaratabilir. Eğer tedavi edilmezse, hastalık genellikle çocuğun birkaç yıl içinde ölümüyle sonuçlanır (3).

Malign beyin tümörlerinde gen tedavisi ise, 1992'de Oldfield ve arkadaşları gerçekleştirilmiştir. Tümör hücrelerinin herpes simpleks virüsünün timidin kinaz

(HSV-tk) geni ile transdüksiyonu takiben bir nükleotid analogu olan gansiklovir (GSV) tedavisi sonucunda tümör hücrelerinin öldüğü ilk kez Moolten tarafından gösterildi. Daha sonra bu yöntemle beyin tümörlerinin invitro ve invivo ortamlarda deneysel hayvan ve insan çalışmaları yapılmış ve öldüğü rapor edilmiştir (58).

**Tablo I. 1Gen tedavisinin tarihçesi**

<b>Yıl</b>	<b>Olay</b>
1944	DNA' nın katılsal bir materyal olarak belirlenmesi
1953	DNA' nın yapısal özelliklerinin belirlenmesi
1961-1967	Genetik kodun anlaşılması
1968	Restrüksiyon enzimlerinin bulunması
1973	Farklı genlerin tek bir hücre içine aktarılması
1974	Bakterilerde insan büyüme hormonu üretilmesi
1978	İnsana ait insulin geninin klonlanması
1983	Humulin' in ilk kez piyasaya sürülmesi,PCR geliştirilmesi
1985	Kistik Fibrosis için ilk genetik tedavi yönteminin belirlenmesi
1986	Supressor genlerin ortaya çıkması
1990	İnsan Genom Projesi' nin başlatılması
1990	İlk gen terapisi

## **I.1.2.Gen Tedavisi Uygulanan Hastalıklar**

Bu yöntemle birçok hastalık tedavi edilmektedir. Gen tedavisi uygulanacak kalıtsal bozukluklar, monogenetik ve multifonksiyonel olarak incelenebilir.

### **I.1.2.1.Monogenetik Kalıtsal Bozukluklar**

Mendelyen kuralına göre kalıtılan tek gen hastalıkları kromozomlar üzerinde yer alan tek bir gendeki defektten kaynaklanır. Mutasyon olarak adlandırılan bu defektler sonucunda oluşan genetik hastalıklarda kalıtım modeli; otozomal veya gonozomal kromozomlardaki genlerden köken almasına göre değişmektedir. Ayrıca otozomal kalıtsal hastalıklar, hastalığın ortaya çıkması için gerekli olan ve bir çift otozomal kromozom üzerinde bulunan aynı lokustaki tek bir genin veya her ikisinin mutasyona uğraması durumuna göre tanımlamakta ve tekrarlama riskleri farklılık göstermektedir. -Talasemi (Akdeniz anemisi), orak hücre anemisi, kistik fibrozis, ailesel akdeniz ateşi (FMF), hemokromatozis, Alfa-1 Antitripsin (AAT) yetmezliği tek gen bozukluğuna bağlı bazı kalıtsal hastalıklardır (25).

Örneğin, Hemofili A hastalığında faktör VIII konsantreleri infüzyonuyla kanamaların durdurulması ve pıhtılaşma kaskadının onarılması sağlanmıştır. Gen tedavisiyle mutasyona uğramış faktör VIII geni normal faktör VIII geni ile değiştirilerek teorik olarak daha uzun süreli tedavi sağlanabilir, hastalık zayıflatılıp gerekli olan faktör VIII konsantrisi giderilebilir. Tek gen bozukluklarında somatik gen tedavisi basit görünmesine rağmen, gen tedavisi stratejileri ancak mutant gen ve normal muadili klonlandıktan sonra geliştirilebilir. Fakat bazı tek gen hastalıklarında değiştirilen protein hastalık patogenezinin doğrudan katılmamaktadır. Diğer tek gen hastalıkları için tek tedavi edici yaklaşım; anormal protein sentezinin önlenmesi şeklinde klasik gen tedavisinden daha az duyarlılık gösteren yaklaşımdır (52).



### **I.1.2.2.Multifonksiyonel Bozukluklar**

Multifonksiyonel olarak kalıtılan hastalıklar bir veya daha fazla gen mutasyonu ile çevresel faktörlerin birlikte etkileimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu hastalıklar tüm genetik bozukluklar içinde insidansı ve prevalansı en yüksek olan grubu olurlar. Multifaktöriyel olarak kalıtılan hastalıklar arasında nöral tüp defektleri, yarık damak-yarık dudak malformasyonları, doğuştan kalça çıkığı, şizofreni, esansiyel hipertansiyon, koroner kalp hastalıkları, diabetes mellitus, alerjik hastalıklar, konjenital kalp hastalıkları önemli bir yer tutmaktadır.

Multifonksiyonel olarak kalıtılan hastalıklarda mutasyona uğrayan gen sayısı genelde belli değildir. Tek başlarına, mutasyona uğradıklarında zararlı bir etki ortaya çıkarmayan birkaç minör genin hepsinde birden mutasyon olmasıyla kümülatif bir etki ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca major gen mutasyonları ve çevre faktörlerinin de birlikte etkileimi sonucu hastalıklar ortaya çıkabilmektedir.

Örneğin; aterosklerotik kalp rahatsızlığı, konjestif kalp yetmezliği, arteriyel zedelenme sonrası intimal hiperplazi, diabetes mellitus ve romatoid artrit multifonksiyonel bozukluklardır. Bu hastalıklarda ayrıntılı bir şekilde patofizyolojik özelliğin belirlenmesi spesifik genler ve terapötik yarar sağlayan genler için belirlenmelidir. Anjioplasti; restozis intimal hiperplazi sonrası vasküler düz kas hücre migrasyonu, proliferasyonu ve extraselüler sıvı despozisyonu ile karakterizedir. Bu arteriyel zedelenme yanıtının olumsuz vasküler duvarın incilmesi ve lümenin nihai daralmasıyla sonuçlanır. Matriksin düz kas hücrelerinden uzaklaşması ve farklılaşmayı önleyici genlerin transferi hasarlı bölgede restenozis oluşmasını önlemeye yardımcı olabilir (36).

Bu tip karmaşık hastalıklarda diğer olası gen tedavisi uygulaması ise ilaçta yardımcı sistemlerin kullanılmasıdır. Örnek olarak insülin genleri uygulaması diyabetli

hastalarda dü ünülebilir. Diyabetik hastanın günlük insülin injeksiyonunu ortadan kaldırmak amacıyla teoride insülin sentez eden otolog hücrelerin üretilmesi ile hiperglisemi sonucu olu an serum glikoz konsantrasyonunun kontrolü sa lanabilir (51).

### **I.1.3.Gen Tedavisi Yöntemleri**

Günümüzde gen tedavisi; gen ilavesi, gen düzenlenmesi ve gen cerrahisi gibi farklı yakla ımlarla yapılmaktadır. Gen ilavesi, hücreye genin yeni versiyonunun yerle tirilmesi; gen düzenlemesi, zaten yerinde olan bir genin de i tirilmesi; gen cerrahisi, belirli bir genin çıkarılıp yerine normal genin yerle tirilmesi ekinde yapılmaktadır (41).

### **I.1.4.Gen Tedavisi Yakla ımları**

Gen tedavisi, e ey hücre ve somatik hücre gen tedavisi olmak üzere iki ekinde incelenir.

#### **I.1.4.1.E ey Hücre Gen Tedavisi**

Genetik bir bozuklu u önlemek için e ey hücrelerinin (sperm ya da ovum) genleri de i tirilmesi ekinde bir tedavidir. Bu tip tedavide, genlerde yapılan de i iklik ku aktan ku a a aktarılabilece inden, olası bir e ey hücresi gen tedavisi hem etik, hem de teknik sorunlar yarataca ından imdilik birçok ülke de insan üzerinde uygulanması yasaklanmı tır (64).

### **I.1.4.2.Somatik Hücre Gen Tedavisi**

Bu uygulamada gen tedavisi için hedef alınan doku yalnızca hastanın bünyesel (somatik) dokularıdır. Tedavi kişinin tamamen kendisine yöneliktir ve hastanın ileri nesilleri üzerinde kalıcı hiçbir etkisi yoktur (45). Doğal olarak çevresel hatalıkların tedavisine yönelik gen tedavisi uygulamalarının tümü ve genetik hastalıklara yönelik uygulanan tedavi yöntemlerinin büyük çoğunluğu somatik gen tedavisine dahildir.

Bu tedavi ex vivo ve in vivo olmak üzere iki başlıkta incelenebilir:

Ex vivo gen tedavisinde, hastadan alınan hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılır ve bir vektör aracılığıyla iyileştirici genler bu hücrelere nakledilir. Daha sonra, genleri belirli bir şekilde içine almış hücreler seçilir ve çoğaltılır. Sonradan amadaysa, çoğaltılan bu hücreler tekrar hastaya nakledilir. Ex vivo tedavi hücre dışı tedaviyi kapsar. In vivo gen tedavisinde ise genleri taşıyan vektörler doğrudan kana ya da dokulara verilir.

### **I.1.5.Gen Taşıyıcı Sistemler**

Gen tedavisinde genel amaç yabancı genetik materyalin belirli hücrelere taşınmasını sağlayan etkin ve toksik olmayan genetik materyali iyi saklayan taşıyıcıların geliştirilmesi ve genetik materyalin hedeflenen hücreye belirli bir şekilde aktarımının yapılmasıdır. Gen tedavisi eczacılık, tıp, biyokimya gibi birçok alanda dünya çapında araştırılan önemli bir konudur. Gen taşıyıcı sistemler biyolojik sistemler ve biyolojik olmayan sistemler olarak iki farklı kategoride ele alınabilir.

#### **I.1.5.1.Biyolojik (Viral) Taşıyıcı Sistemler**

Biyolojik taşıyıcı sistemler olarak kullanılan canlılar virüslerdir. Virüsler doğal genetik yapıları dolayısıyla genetik materyali kendilerinde saklayıp hücreleri enfekte

etme ve genlerini transfer etme yeteneğine sahiptir. Tüm DNA ve RNA virüsleri gen taşıyıcı olarak evrimleşmişlerdir. Gen tedavisinde kullanılan virüsler laboratuvar ortamında patojenitesinden arındırılmış ve yüksek gen aktarma özellikleri devam ettirilmiştir. Bütün bunlara rağmen üretimlerinin oldukça zor olması, toksik olmaları, immün yanıt oluşturmaları ve taşıyabilecekleri genetik materyal boyutunun sınırlı olması dolayısıyla kullanımları sınırlanmıştır. En çok kullanılan viral vektörler ilerleyen bölümlerde açıklanmıştır.

#### **I.1.5.1.1.Retroviral Vektörler**

Retrovirüs taşıyıcı sistemler virüslerin sahip oldukları hayati genler ile terapötik genlerin yer değiştirilmesi ile geliştirilmiştir. Retrovirüsler küçük RNA virüsleridir.

Retroviral vektörler ikilemiş-yeterli veya ikilemiş-kusurlu olabilirler. İkilemiş kusurlu vektörlerden deneysel çalışmalar için en yaygın seçenektir, çünkü viral ikileme ve paketleme için gerekli genler çıkarılmış veya bazı genlerle değiştirilmiştir. Bu virüsler hedef hücrelerini enfekte edebilir ve taşıdıkları yükü teslim edebilirler ama hücrenin parçalanması ve ölümü ile tipik bir sonuç alınır.

Benzer şekilde, replikasyon-yetkin viral vektörler virion sentezi için gerekli tüm genlere sahiptirler ve enfeksiyon baktıktan sonra kendilerini çoğaltmaya devam edebilirler. Bu vektörlerdeki viral genomlar çok daha uzun olduğu için, replikasyon kusurlu viral vektörlerdekine kıyasla hücre içine ulaştırılmak istenen DNA enjeksiyonunun uzunluğu sınırlıdır, Viral vektöre bağlı olarak, maksimum DNA parça uzunluğu genelde 8-10 kb kadardır. Bu durum çoğaltma genomik dizinin kullanımını kısıtlasa da, cDNA dizileri rahatlıkla sıralanabilir.

Moloney retrovirüs gibi retrovirüslerin ba lıca sakıncası, transdüksiyon olabilmesi için hücrelerin aktif olarak bölünüyor olma gereksinimidir. Bunun sonucu olarak, nöron gibi hücreler retrovirüs enfeksiyonu ve transdüksiyonuna çok dirençlidir. Ayrıca, ensersiyon mutagenesi bir endi e konusudur, çünkü konak genomunun içine entegrasyon kansere yol açabilir (9).

Retroviral vektörlerin uygulama alanları:

- Kronik Granülamatoz
- Ailesel Hiperkolesterolemi
- Fanconi Anemisi
- Gaucher Hastalığı
- Hunter Sendromu
- SCID (A ır Kombine İmmün Yetmezlik)

#### **I.1.5.1.2. Adenoviral Vektörler**

Adenovirüsler solunum yolu, sindirim yolu ve göz enfeksiyonlarınınayol açar. İnsanlar genelde adenovirüslerle sık sık karşılaşmaları için bu virüsler hızla immün tepkilere yol açar, bunun da potansiyel olarak tehlikeli sonuçları olabilir.

Adenovirüsler, enfekte ettikleri hücrelerin kromozomlarına entegre olmayan çift sarmal DNA virüsleridir. Bu özellik onların temel ara tırmada kullanılmasını sınırlar ama adenoviral vektörler bazen in vitro deneylerde kullanılırlar.

Adenoviral vektörler, 1990'da ilk gen transfer deneyleri ile birlikte kistik fibrozisin gen tedavisinde akciğer dokusuna afiniteleri nedeniyle kullanılmı lardır. Bölünmeyen hücrelere genetik materyali nakletme yetenekleri nedeniyle ailesel hiperkolesterolemide, nörolojik ve kardiyovasküler sistem hastalıklarında kullanılmaları amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. İmmünojeniteleri nedeniyle

konakçıda inflamasyon ve toksik tepkilere yol açabilmektedirler. Bu etkilerden sorumlu olan E2 geni çıkarılarak vektör üretme çalışmaları yapılmaktadır (20). Adenovirüslerle yüksek titrede vektör oluşturulabilmektedir (10-12 pfn/ml). Ayrıca 7-8 kb genetik madde taşıyabilmektedirler.

Adenoviral vektörlerin kullanım alanları:

- Kistik Fibrosis
- Yara iyileştirilmesinde

### **I.1.5.1.3. Herpes Simpleks Virüsü (HSV)**

Herpes ailesi virüsleri insanların göz, dudak ve vajina mukozasında enfeksiyona sebep olur. Hayat döngülerinde sensör genleri enfekte eder ve nöron hücreleri aracılığıyla göç ederler ve belirti göstermeyen enfeksiyonlara neden olurlar. Bu özellikleri ile genlerin beyin tümörlerine taşınması için oldukça uygundur. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde terapötik gen aktarımı için geliştirilmiş, büyük DNA virüsleridir. Konakçı genomuna entegre olmamaları, nörodejeneratif beyin hastalıklarda kullanılabilir olmaları, virus genomunun büyük olması (transgen büyüklüğü -35kb) gibi avantajları vardır. Bu virüslerle gen tedavisi kısa süreli ama yüksek titrede sağlanabilmektedir. İmmünojeniteleri ve sitopatik özellikleri sınırlayıcı faktörlerdir (29).

HSV'nin uygulama alanları:

- Parkinson Hastalığı
- Alzheimer Hastalığı
- Huntington Hastalığı
- Epilepsi
- Lesch-Nyhan Sendromu
- Multiple Skleroz
- Beyin tümörleri

#### **I.1.5.1.4. Adenovirüs (AAV)**

Replikasyon için yardımcı virüsün ko-enfeksiyonuna ihtiyaç duyan, patojenik olmayan küçük DNA virüsleridir. Küçük olduğu için normalde bile çoğalmak için yardımcı virüse gereksinim duyar ve taşıyabileceği genetik madde küçüktür (4kb). Bölünmeyen hücrelere genomunu entegre edebilmektedir. Normal virüsün 19. kromozomun q kolunda özgün integrasyon bölgesi olduğu halde vektör halindeyken bu özellik kaybolmaktadır. Bu bölgeye affinite virüsün kendi genleri olduğu sürece korunmaktadır. Hepatosit ve nöronlara entegre olabilir (19).

AAV uygulama alanları:

- Kemik iliği hücreleri
- Lenfosit türevli hücreler
- Solunum yolu epitelyal hücreleri
- Kistik Fibrosis-Faz I
- Nörodejeneratif hastalıklar
- Hemofili B hastalığı-Faz I

#### **I.1.5.1.5. Poxvirüs**

Poxvirüsleri a1 olarak çiçek hastalığının eradikasyonunda kullanılmırlardır. Çift zincirli DNA virüsleridir ve bölünen, bölünmeyen tüm hücreleri enfekte edebilirler. HSV'ler gibi poxvirüsler de büyük genoma (186 kb) sahiptirler ayrıca 25 kb'a kadar olan büyüklükte transgenik sekans barındırabilme kapasiteleri vardır. Çiçek hastalığı a1 içindeki uzun yıllardır kullanımı, düşük toksisitesi, yüksek taşıma kapasitesi bu vektörlerin avantajıdır (50).

### **I.1.5.2.Biyolojik Olmayan (Viral Olmayan) Ta ıyıcı Sistemler**

Biyolojik olmayan sistemler fiziksel ve kimyasal yöntem olmak üzere ikiye ayrılır.

#### **I.1.5.2.1.Fiziksel Yöntemler**

Bu yöntemlerde çıplak DNA molekülünün direkt olarak sitoplazmaya aktarımı söz konusudur. Endozomal ve lizozomal amaçlar atlandı ndan dolayı enzimatik degradesyona kar ı DNA korunmu olur. Fiziksel yöntemler genellikle topikal gen tedavisi uygulamalarında kullanılmaktadır. Bu yöntemler ilerleyen bölümde incelenmi tir.

##### **I.1.5.2.1.1. Çıplak DNA'nın Do rudan Enjeksiyonu**

En basit gen aktarım yöntemidir. Plazmit DNA do rudan dokulara veya sistemik dola ıma enjekte edilir (24). DNA enjeksiyonu ile gen aktarımında, enjeksiyon dozu ve süresi etki profili bakımından oldukça önemlidir (28).

##### **I.1.5.2.1.2.Elektroporasyon ve Nükleofeksiyon**

Elektroporasyon, hücelere veya dokulara kısa zamanlı çok kuvvetli elektrik akımı uygulayarak, hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar olu turulması i lemidir.Bu geçi ken durumda zar, hücelere DNA, enzim, antibadi ve di er makromolekül geçi ine izin verir. Dü ük dozda ve optimize edilmi elektriksel parametreler kullanılarak, hücre tipine spesifik çözeltiler yardımıyla DNA'nın hücre çekirde ine hızlı bir ekilde hücre bölünmesine ba lı olmadan ula tırılması i lemine nükleofeksiyon adı verilir (8).



### **I.1.5.2.1.3.Biyolistik Gen Tabancası**

Mikro büyüklükteki tungsten veya altın parçacıkları DNA ile kaplanıp, gen tabancası kullanılarak, helyum basıncı ile yüksek hızla hücrelere gönderilmektedir (68).

Biyolistik transfeksiyon verimini etkileyen parametreler:

- Partiküllerin büyüklü ü
- Hedef uzaklı ı
- Vakum bölmesinin geni li i
- Hücre kültür plaklarının büyüklü ü
- Helyum basıncı
- Yarık uzaklı ı
- Makrota ıyıcının hareket mesafesi

### **I.1.5.2.1.4.Ultrason**

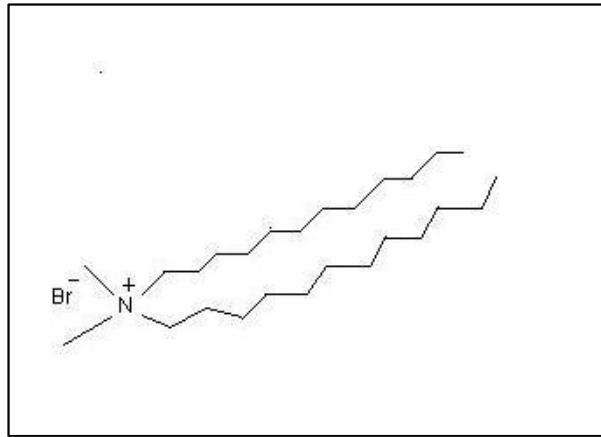
Terapötik ultrason uygulaması membran geçirgenli ini artırmaktadır. DNA yüklü içi gaz dolu albumin mikrobaloncuk ticari ürünü Optison buna örnek olarak verilebilir (54).

### **I.1.5.2.2.Kimyasal Sistemler**

Kimyasal ta ıyıcı sistemler genel olarak katyonik karakterdedir. Katyonik karakter negatif yüklü DNA ile elektrostatik etkile im sa lar. Katyonik olan bu sistemler negatif yüklü hücre yüzeyiyle etkile irler ve genellikle fagositoz ile hücre içine alınırlar. Bu sistemlerin etkinlikleri toksisiteleri, partikülbüyüklikleri, zeta potansiyelleri, vücutta da ılma bölgeleri gibi özelliklere ba lıdır. A a ıda viral olmayan ta ıyıcı sistemler ana ba lıklar halinde anlatılmı tır (5).

### I.1.5.2.2.1.Katyonik Lipidler

Katyonik lipidler, DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileerek negatif yükü nötralize ederler. DNA'nın daha sıkı bir yapı haline gelmesini sağlarlar. Katyonik lipidler genel olarak hidrofilik baş kısım, hidrofobik lipid kısmı ve başlayıcı kısımdan oluşan amfifilik moleküllerdir. Hidrofilik baş grubu pozitif yük taşıyarak ve negatif yüklü DNA ile etkileşir. Başlayıcı kısım, lipidin biyoparçalanabilirliğini ve kimyasal stabiliteyi belirleyen bölümdür. Hidrofobik lipid kısmı, miseller yapının oluşumuna katılır ve hücre membranını etkiler (21).



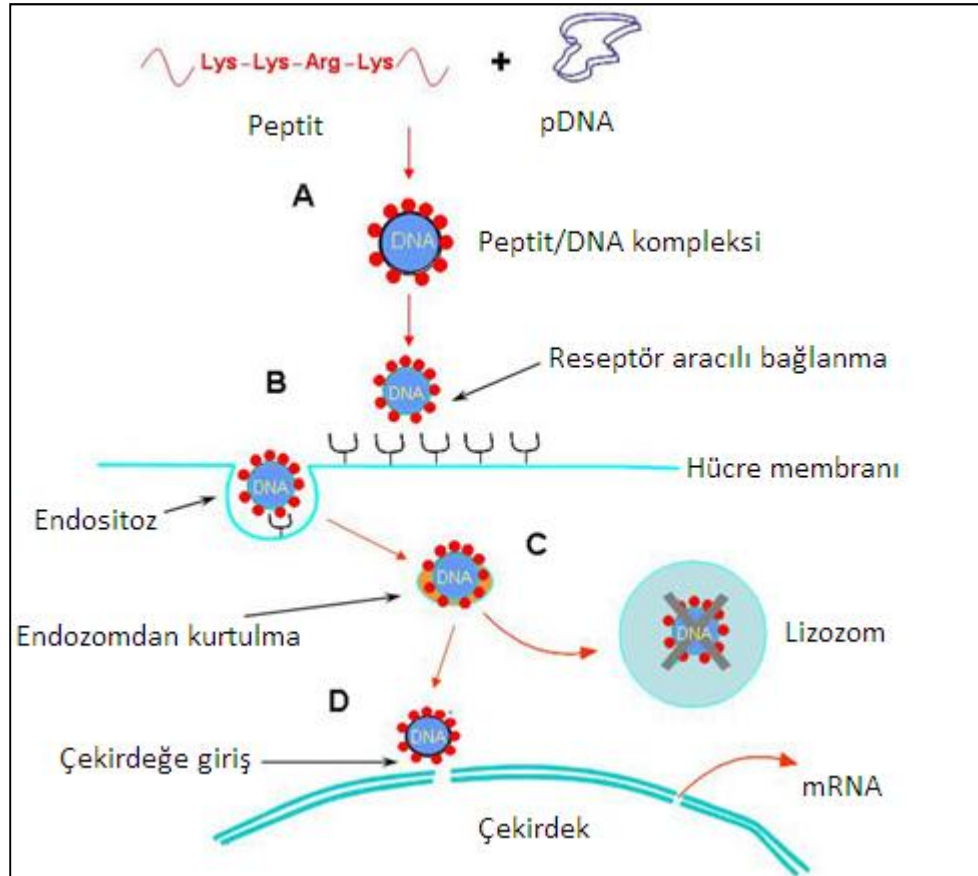
**ekil I. 1.** DDAB'ın kimyasal yapısı

En çok kullanılan ticari lipid formülasyonundan bazıları şunlardır:

- DOGS: Dioktadesilamidoglisil spermin
- DDAB: Dimetildioktadesil amonyum bromür
- Chol: Kolesterol

### I.1.5.2.2.2.Katyonik Peptidler

DNA ta ıyıcı sistem olarak kullanılan peptidler lizin, arjinin, histidin gibi pozitif yüklü aminoasitler içerirler. Bu pozitif yüklü aminoasit yapıları nedeniyle DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla elektrosatik çekime girerler. Kondense olmu peptid-DNA kompleksleri, spesifik hücre reseptörlerine ba lanarak ya da spesifik hücre çe itlerine ba lanarak hücre içine alınırlar (37).



**ekil I. 2.** Katyonik peptid-DNA komplekslerinin biyolojik bariyerden geçişininematik gösterimi

### I.1.5.2.2.3.Katyonik Polimerler

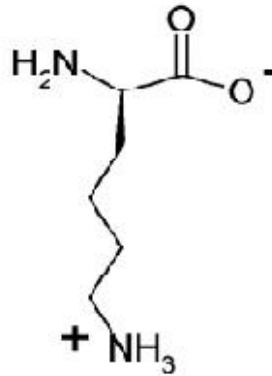
Katyonik polimerler, DNA'ya elektrosatik etkileşimle ba lanarak polimer-plazmid kompleksleri (polyplexes) oluşturur katyonik polimerlerin ortak özellikleri

sitotoksik olmalarıdır. Toksikitelemi moleköl a ırlı ına ve bile imlerine ba lıdır. Toksikitelemi polimerin yük yo unlu u de i tirilerek azaltılabilir. Genellikle katyonik blok ve hidrofilik blok içeren blok kopolimerler DNA ba layan transfeksiyon ajanı olarak kullanılır.

#### a. Poli-(L-Lizin) ve Kopolimerleri

Polilizin DNA ile fizyolojik ko ullarda kar ıla tı ında, çözünmeyen bir kompleks olu turur. Bu kompleks, yüzeyindeki fazla pozitif yük nedeniyle lipid, protein gibi serum bile enleriyle ya da negatif yüklü hücre membranıyla non spesifik olarak etkile ebilir. Hücreye spesifik gen ta ıyıcı olarak kullanmak için sterik engel etkisini azaltmak amacıyla, hidrofilik polisakkarit yan zincirleri içeren polilizin graft polimerleri sentezlenmi tir. Örne in hyaluronik asit içeren kopolimerler DNA'yı karaci er sinusoidal endotelial hücrelerine ta ımak için spesifik olarak hazırlanmı tır (16). Polilizin kopolimerlerinden bazıları unlardır:

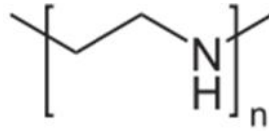
- Galaktozlanmı Poli-(L-Lizin)(Gal-PLL)
- Poli-(L-Lizin) ve Polietilen Glikolün Kopolimerleri
- Poli-(L-Lizin) ve Arabinogalaktan'ın DendriTIC Graft Kopolimerler



ekil I. 3. Poli-L-Lizin (PLL)'inkimyasal yapısı

### b. Polietilenimin(PEI)

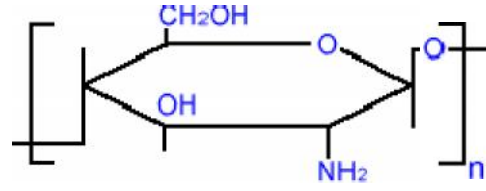
DNA taşımasında tek başına veya viral proteinlerle kompleks halinde kullanılmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı PEI'ler, moleküler ağırlığı yüksek, katyonikliği yüksek dallanmış polimerlerdir. Diğer polikasyonik moleküllerle kıyaslandığında sitotoksisiteyi fazladır (32). Sitotoksisiteyi azaltmak için az dallanmış, moleküler ağırlığı düşük ve partikül büyüklüğü dağılımı dar PEI sentezlenmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı PEI'nin vitro ekleme gen aktarımı yapılarında sitotoksisite gözlemlenmemiştir.



**ekil I. 4.**Doğrusal Polietilenimin (PEI)'in kimyasal yapısı

### c. Kitosan Polimeri

Kitosan doğal bir polisakkarit olan kitinden deasetilasyonla elde edilir. Biyolojik olarak geçimli, toksik olmayan ve biyoparçalanabilir yapıda olmasından dolayı gen taşımadada en çok tercih edilen polimerlerden biridir. Aynı zamanda ucuz olması, kolay bulunabilirliği, biyoadheziv özelliği nedeniyle tercih sebebidir. Kitosan suda çözünmez, pH 6.5'in altındaki dilüe asit çözeltilerinde çözünür. Katyonik yapıda bir poliamin olmasından dolayı DNA'ya yüksek afinite gösterir. Biyoteknoloji, kozmetik, biyomedikal gibi alanlarda geniş bir klanlıma sahiptir (16).



**ekil I. 5.**Kitosan polimerinin kimyasal yapısı

#### **d. Jelatin**

Jelatin kollajenin denatüre formudur. 35-40°C’de jelle me özelli i olan bir poliamfolittir. pH 5’in altında pozitif yüklüdür. DNA ile koaservat olu turmak için kompleksle ebilir. Çapraz ba lanmadan sonra olu an koaservat, iyonik gücü yüksek çözeltilerde stabildir.

#### **I.1.5.2.2.4.Lipozomlar**

Kolloidal ta ıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlaryakla ık 0,02-3,5 mikrometre çapında küresel veziküllerdir. Lipid çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan olu urlar. Lipit çift tabaka tek veya çok sayıda olabilir.

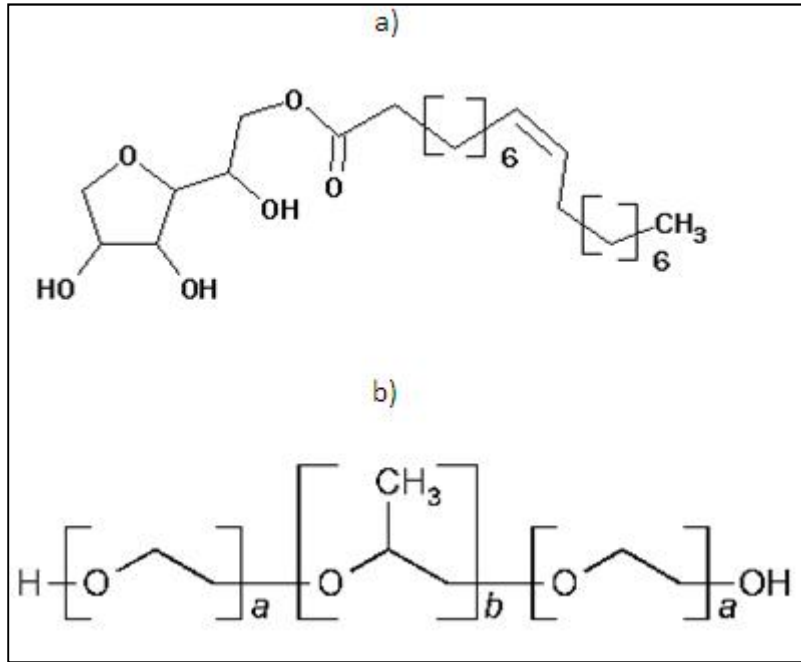
DNA’yı veya ta ıdı ı ilaç moleküllerini sulu iç fazlarına hapsederek nükleazlar tarafından parçalanmasına engel olurlar. çerisine hapsetti i etkin maddenin farmakokineti ini de i tirirler (22).

Son yıllarda plasmit DNA veya antisensoligonükleotitlerin hücrelere katyonik lipozomlarla verilmesinin viral vektörlere üstünlük gösterdi i bildirilmi tir. (-) yüklü plazmitin katyonik lipozomlarla elektrostatik etkile ime girdi i sonuç olarak hücreye füzyon yoluyla verildi i saptanmı tır.

#### **I.1.5.2.2.5.Emülsiyonlar**

Birbiri ile karı mayan iki sıvıdan birinin emülgatörler vasıtası ile di er sıvı içinde damlacıklar halinde da ılması ile olu an iki fazlı heterojen sistemlerdir.

Emülsiyon formülasyonunda temel olarak, lipofilik sıvı hidrofilik sıvı ve yüzey etkin madde bulunur. Yüzey etkin maddelere düşük HLB değerinde, daha çok yağ fazında çözünebilmekte ve dayanıklı S/Y emülsiyonlar oluşturabilmektedir. Örnek olarak non-iyonik bir sorbitan yağ asidi esteri olan Span 85 verilebilir. Yüksek HLB değerinde ise dayanıklı Y/S emülsiyon oluşturabilirler. Bu tip yüzey etkin maddelere örnek olarak Poloksamer 188 verilebilir. Katyonik lipidler, yağlar, nötral fosfolipidler ve non-iyonik sürfaktanlar kullanılarak emülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır (12).



**ekil I. 6.** Span 80'in kimyasal yapısı (a), Poloksamer 188'in kimyasal yapısı (b) a:80 b:27

### **Spesifik emülsiyon tipleri unlardır:**

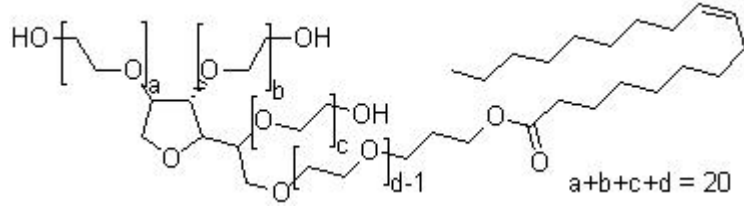
- Çoklu emülsiyonlar
- Mikroemülsiyonlar
- Florokarbon emülsiyonlar
- Kuru emülsiyonlar
- Submikron emülsiyonlar

#### **a. Çoklu Emülsiyonlar**

Çoklu emülsiyon sistemler karma ık sistemlerdir. S/Y/S veya Y/S/Y olarak hazırlanabilen emülsiyonun emülsiyonu olarak da bilinen sistemlerdir. Dispers faz içinde dı faz ile aynı yapıya sahip daha küçük damlacıkların da ıldı ı emülsiyon sistemleridir. En iç faz birbiri ile aynı olabilece i gibi, birbiri ile karı abilen iki farklı maddeden de olu abilir.

Çoklu emülsiyon hazırlanmasında en önemli nokta, sürfaktanların seçimi ve oranlarının belirlenmesidir. Bu maddelerin HLB de eri çok önemlidir. HLB de erleri birbirinden çok farklı iki sürfaktan kullanılır. Genellikle S/Y/S tipi çoklu emülsiyon sistemi için Y/S tipi primer emülsiyonun olu umunda lipofilik yüzey etkin madde, hidrofilik yüzey etkin madde ise, S/Y/S tipi çoklu emülsiyonlarda, dı su fazı ile primer emülsiyonun dı fazı olan ya fazı arayüzeyine yerle erek çoklu emülsiyonların olu umunu sa larlar. Örne in, HLB de eri 15 olan Tween 80(T 80) dı su fazı yüzeyinde etkile im için sıklıkla kullanılan bir yüzey aktif maddedir (12).





**ekil I. 7.** Tween 80'in kimyasal yapısı

### b. Mikroemülsiyonlar

Son yıllarda oldukça önem kazanan mikroemülsiyonlar, termodinamik olarak dayanıklı, düşük viskoziteli, saydam, çok küçük damlacık büyüklüğüne sahip (5-140 nm) ve kendiliğinden oluşan sistemlerdir. Genellikle yağ fazı, su fazı, sürfaktan (yüzey etkin madde) ve ko-sürfaktan olmak üzere dört bileşen içermektedirler.

Mikroemülsiyonların oluşabilmesi için üç önemli koşul gerekmektedir. Bunlar:

- Yağ ve suyun birbiri içinde kendiliğinden karışarak emülsifiye olabilmesi için yağ-su arayüzeyindeki gerilimin çok düşük olması (103 N/m'den küçük) gerekmektedir.
- Sürfaktanın konsantrasyonu optimum olmalıdır.
- Mikroemülsiyonun dayanıklılığını arttırmak için arayüzey akıcı ve esnek olmalıdır.

Mikroemülsiyonların üstünlükleri:

- kolayca hazırlanıp uygulanmaları
- vücutta kalış sürelerinin uzun olması
- ilaç yükleme kapasitelerinin yüksek olması
- sürfaktan ve ko-sürfaktanların etkisiyle hücre permeabilitesini arttırmaları ve dolayısıyla emilimi kolaylaştırılmaları sayılabilir.

**c. Florokarbon Emülsiyonlar**

Kan yede i olarak ve oksijen ta ınmasını gerektiren bazı tedavi uygulamalarında kullanılmak üzere perflorokarbonların emülsiyonu hazırlanmıştır. Bu tip emülsiyonlar *perflorokarbon emülsiyonlar* olarak adlandırılır. Perflorokarbonların oksijen ve karbondioksit gibi gazları çözme yeteneklerinin yüksek olması, kimyasal ve biyolojik olarak geçimli ve inert olmaları nedeniyle kan yede i olarak tercih edilmektedirler.

Florokarbon emülsiyonlar organ korunması ve kanser tedavisinde yardımcı madde olarak, tanıda kontrast ajanı olarak kullanılmaktadırlar.

**d. Submikro Emülsiyonlar**

Birbiriyle karı mayan en az iki sıvıdan, birinin di eri içinde disperse oldu u 50-1000nm partikül büyüklü üne sahip sistemlerdir. Negatif ve pozitif yüklü olabilirler. Dü ük biyoyararlanımgösteren ve kısa yarı ömre sahip etkin maddelerin farmakolojik özelliklerini ve biyoyararlanımlarını arttıırırlar (18).

**e. Kuru Mikroemülsiyon**

Suda çözünen veya çözülmeyen ta ıyıcılar içeren Y/S emülsiyonun kuru tutulmasıyla elde edilen sistemlerdir. Kurutma i lemi sonucunda su fazı uzakla makta ve katı ta ıyıcı ya fazını içine almaktadır. Bu sistemler toz haldedir ve in vivo ortamda veya sulu çözeltiyle temas etti inde kolayca Y/S emülsiyonuna dönü ebilmektedirler.

#### **I.1.5.2.2.6.Dendrimerler**

Merkezde çekirdek molekül ve etrafında simetrik dallanmış moleküllerden oluşurlar. Ayrıca kademe molekülleri adı da verilen yeni bir tür polimerlerle yapılmıştır. Katyonik karakterde hazırlanan dendrimerler DNA ile etkileşime girebilirler (56).

#### **I.1.5.2.2.7.Nanopartiküller**

Büyüklikleri 10-100nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya absorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal partiküllerdir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında albumin, kitosan, arjinat gibi doğal polimerler ve poli(laktik asit)-PLA, poli(siyanoakrilat)-PACA gibi sentetik polimerler kullanılır.

Nanopartiküllerin avantajları;

-Ligantlar bağlanarak hedeflenebilirler.

-Liyofilize edilerek saklanabilirler.

-Farklı biyoaktif ajanlar bir arada enkapsüle edilebilir.

-DNA'yı serum nükleazlarına karşı degradasyondan koruyabildikleri için biyoyararlanımı arttırırlar (13).

#### **I.1.6.Viral Gen Taşıyıcı Sistemlerin Önündeki Engeller**

##### **I.1.6.1.DNA'nın Hücresel Birleşmesi**

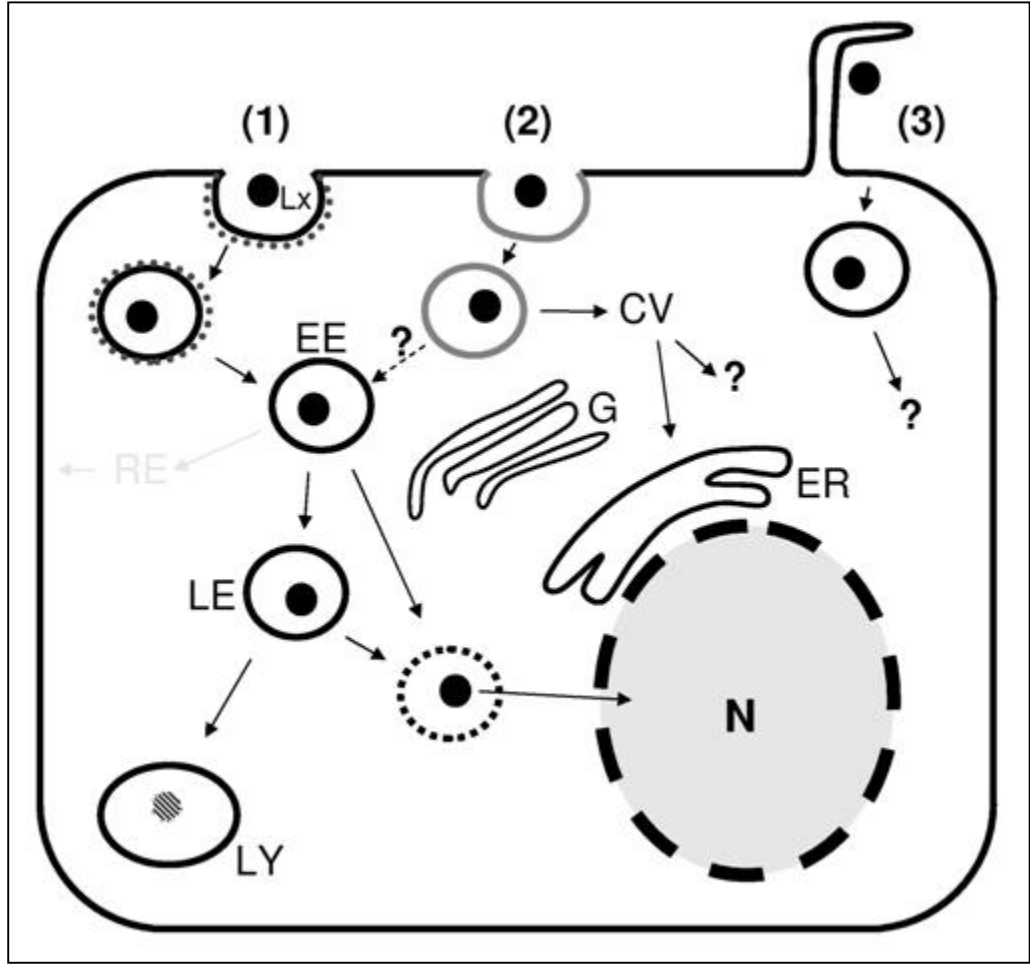
DNA'nın ve hücre yüzeyinin negatif yüklü olmaları nedeniyle karışıklıklarında etkileşim olasılıkları oldukça düşüktür. Bu sebeple DNA polikationik kompleksler halinde hücreye etkileşebilir. Polikationik ajanın kationiklik derecesi DNA'yı nötralize edebilecek düzeyde olmalıdır (46).

### **I.1.6.2.Viral Olmayan Gen Ta ıma Sistemlerinin Hücre İçine Alınması**

Viral olmayan gen ta ıyıcı sistemler hücre yüzeyinde multivalen kompleksler oluşturarak agregasyona neden olurlar. Hücre yüzeyi ile spesifik olmayan elektrostatik etkileşime girerler. Hücre yüzeyindeki agregasyon nedeni ile endositoz ve fagositoz ekinde hücre içine alınır. Bu sistemlerde DNA'nın hedef hücreye spesifik olarak taşınabilmesi için uygun kompleksler yapılması gerekmektedir.

### **I.1.6.3.Viral Olmayan Gen Ta ıma Sistemlerinin Hücreler Arası Trafiki**

Gen tedavisinde önemli sorunlardan biri de viral olmayan gen ta ıyıcı sistemin hücre içine alınması ile hücre tarafından endositik kompartman olarak görülmesidir. Hücre içine alınan non viral ta ıyıcı sistemlerin izleyebileceği birkaç yol vardır. Bir yol olarak, hücre içine giren non viral sistemler geç endozomlara taşınmak üzere erken endozomlar olarak tanımlanan yapıların içine alınır. Geç endozomdan lizozoma geçen sistemler lizise uğurlar. Geç endozomdan serbest kalan DNA sitozolden geçerek hücre çekirdeğine girebilir.



**ekil I. 8.** DNA'nın sitozolden ta ınması:1) klattrin aracılı endositoz; kaveollerden endositoz; 3) makropirositoz: Lx – lipopleksler, EE – erken endositoz, RE – geri dönü üme u rayan endozolar, LE – geç evrede endozomlar, LY – lizozomlar, CV – kaveozomlar, G – golgi aygıtı, ER – endoplazmik retikulum, N – çekirdek (66).

Endozomdan serbest olarak çıkan DNA sitoplasmada nükleazlar tarafından dejenere edilerek transfeksiyon etkisi azalabilir. DNA'nın çekirde e ula abilmesi için iki potansiyel ihtimal vardır:

- Mitosis sırasında membranın bozulmasıyla direk olarak
- Aktif transportla ya da pasif diffüzyonla nüklear porlardan geçerek (65).

### **I.1.6.5.Plazmit DNA'nın Hücresel Lokalizasyonu**

Transkripsiyon basamaına geçilmesi için DNA'nın nükleusa transfer olup yerleşmesi gereklidir.

Nükleolar porlar nükleolar çekirdek üzerinde çok sayıda ve yüzey yoğunluğu yüksek olacak şekilde gömülü durumdadır (15). Her farklı konformasyonel yapıda olduğu düşünülmektedir. Kapalı yapı 9 nm'de küçük boyuttaki moleküllerin pasif difüzyona izin verir. Açık durumda ise 26 nm'den küçük moleküllerin geçmesine izin verir (63). Açık durumdaki yapı süper sarmal DNA'nın nükleusa geçmesine izin verir, ancak kompleks yapının geçmesine izin vermez.

### **I.1.6.6.Viral Olmayan Taşıyıcı Sistemlerin Toksikitesi**

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin en önemli ve araştırılan problemlerinden biri sitotoksikitedir. Kaslardaki kreatin kinaz (48) gibi sitozolik belirteçlerin varlığı akut toksite sonucu oluşan hücresel nekrozun belirtisi sayılır. Bu veriye göre pozitif yüklü taşıyıcı vektörler DNA ile kompleks halde değilken en yüksek toksisite derecesini gösterir. Fakat bu sistemlerin toksisite mekanizmalarına ait kesin veriler bulunmamaktadır.

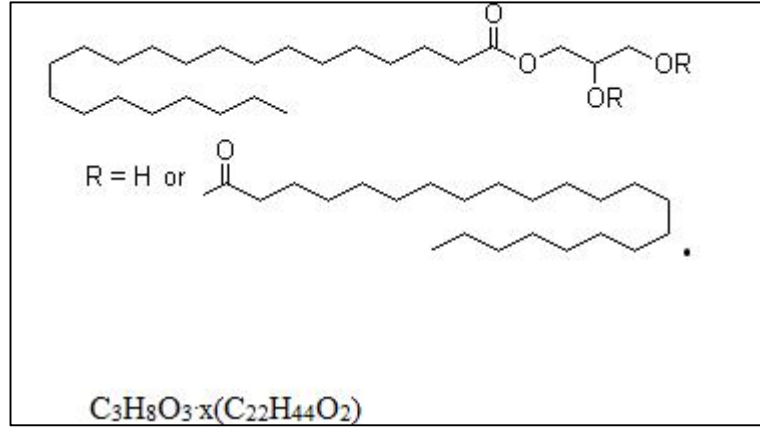
### **I.2.Katı Lipid Nanopartiküller (KLN)**

İdeal bir kolloidal sistem, içindeki etkin maddeyi hedeflenen bölgeye taşımalı ve bu bölgede istenilen etkilere ulaşarak serbest bırakabilmelidir. Bu amaçla, 1991 yılında lipozom, yağ emülsiyonları ve katı partiküllerin avantajları birleştirilerek suda zor çözünen lipofilik etkin maddelerin intravenöz verilmesi için alternatif KLN sistemleri geliştirilmiştir (17).

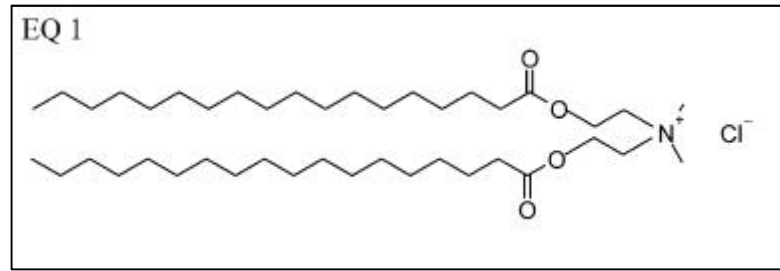
1960 yılında, parenteral beslenme amacıyla ilk güvenilir parenteral ya emülsiyonu Intralipid Wretlind® tarafından parenteral geli tirilmi tir. Bu lipofilik ilaçlar için yeni ta ıma sistemlerinin ba langıcıdır. Ba arılı market ürünleri Diazemuls ve Düziprivan bu ta ıma sistemlerinin ilk örneklerindendir (60). Ancak ilaç içeren emülsiyonların zeta potansiyele ba lı olarak, ilacı hapsedememe, emülsiyonun bozulması, kümeleme gibi kritik fiziksel stabilite sorunlarına sahiptirler (35).

KLN'ler, oda ve vücut sıcaklı ında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanan ve emülgatörler ile stabilize edilen, nanometre boyutundaki partiküllerdir. KLN'ler genel olarak katı lipidler, emülgatörler ve sudan oluşmaktadır. Lipid terimi geni anlamda kullanılmaktadır ve trigliseridleri (tristearin vb.), kısmi gliseridleri (kompritol vb.), ya asitlerini (stearik asit vb.), steroidleri (kolesterol vb.) ve mumları (setil palmitat vb.) içermektedir. Lipidler genellikle, GRAS (Generally Recognized As Safe) özelli ine sahip fizyolojik bile iklerdir.

Lipid dispersiyonu stabilize etmek için, yüklerine ve molekül a ırlıklarına ba lı olarak bütün emülgatör tipleri kullanılabilir. %1-5 emülgatör veya emülgatör/yardımcı emülgatör kompleksi ile stabilizasyon sağlanmaktadır. Emülgatörün seçimi, uygulama yoluna ba lıdır. Parenteral uygulamalar için kullanılacak emülgatörler oldukça sınırlıdır. Emülgatör amaçlı kullanılan maddelere örnek olarak lesitinler, poloksamerler, etoksillenmi monogliseridler ve polisorbattlar verilebilir.



**ekil I. 9.** Kompritol'ün kimyasal yapısı



**ekil I. 10.** Esterquat 01'in kimyasal yapısı

### I.2.1. KLN'lerin Avantajları

KLN'lerin avantajları u ekilde özetlenebilir:

- Kolloidal büyüklüktedir.
- Sulu dispersiyonları uzun süre stabil kalabilir; alternatif olarak, dondurarak veya püskürterek kurutma uygulanabilir.
- Lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler hapsedilebilir.
- Otoklav veya gama 1 nları ile sterilizasyon sa lanabilir.
- Hazırlama sırasında fizyolojik bile iklerin kullanılması nedeniyle toksikolojik olarak kabuledilebilirdir.
- Üretimde organik çözücü kullanılmaması nedeniyle, organik çözücü kalıntısı içermez.
- Endüstriyel ölçekte üretimleri mümkündür.



- Etkin maddenin kontrollü salımı sağlanabilir.
- Yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile belirli dokulara ilaç hedeflemesi yapılabilir.

- Etkin madde çevresel etkenlerden korunur ve stabilitesi artırılır.
- Ekonomik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı sistemdir.

### **I.2.2.KLN'lerin Dezavantajları**

Pek çok avantaja sahip olmalarına rağmen, KLN'lerin kullanımını sınırlayan bazı faktörler vardır:

- Nispeten düşük etkin madde yükleme kapasitesine sahiptirler.
- Saklama sırasında görülebilen polimorfik geçişler nedeniyle, etkin madde taşıyıcıdan ayrışabilmektedir.
- KLN dispersiyonlarının su içeriği nispeten (%70 – 99.9) yüksektir.
- Ortamda farklı kolloidal yapılar da bulunabilir.

### **I.2.3.KLN Hazırlama Yöntemleri**

#### **I.2.3.1.Mikroemülsiyon Yöntemi**

Gasco ve ark., mikroemülsiyonların dilüsyonuna dayanan bir KLN hazırlama yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde önce, lipid (yağ asitleri veya gliseridler) eritilir. Su, emülgatör ve ko-emülgatör karışımı, lipidle aynı sıcaklıkta olacak şekilde ısıtılır ve erimi lipide eklenerek karıştırılır. Bu maddeler, mikroemülsiyon oluşumu için gerekli oranlarda karıştırıldığında, transparan ve termodinamik olarak stabil bir sistem elde edilir. Oluşturulan sıcak veya ılık mikroemülsiyon, özel olarak geliştirilen termostatlı bir ısıtıcıya kullanılarak, belirli miktardaki soğuk su (2–3 °C) içinde mekanik bir karıştırma ile disperse edilir. Sıcak mikroemülsiyon:soğuk su hacim oranı, 1:25

ile 1:50 arasında de i ebilmektedir. Fazla su, ultrafiltrasyon veya liyofilizasyonile uzakla tırılır (10, 40).

### **I.2.3.2.Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi**

Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH), KLN üretimi için güvenilir ve etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmı tır. Yüksek basınçlı homojenizatörler, sıvıyı birkaç mikron geni li indeki darbir delikten, yüksek bir basınçla (100-2000 bar) iterler. Sıvı, çok kısa bir mesafede çok yüksek birhıza (1000 km/saat'in üzerinde) ula ır. Çok yüksek kayma stresi (gerilimi) ve kavitasyon kuvvetleri, partikülleri mikron altı büyüklü e parçalar (38). Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon ve so uk homojenizasyon olmak üzere iki ekilde gerçekte tirilebilmektedir:

#### **a. Sıcak Homojenizasyon**

Sıcak homojenizasyon, lipidin erime noktasının üstündeki sıcaklıklarda gerçekte tirilir ve bunedenle, emülsiyonun homojenizasyonu olarak de erlendirilebilir. Etkin madde, erime noktasının 5-10°C üzerinde bir sıcaklıkta eritilmi olan lipid içerisinde çözülür veya disperse edilir. Etkin madde içeren erimi lipid, aynı sıcaklıktaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızdakarı tırma ile disperse edilir. Elde edilen sıcak pre-emülsiyon homojenizatörden geçirilir ve sonuçta olu an sıcak Y/S nanoemülsiyonu oda sıcaklı ına so utulur. Bu ekilde lipid katıla ır (rekristalizeolur) ve katı lipid nanopartiküller elde edilir (4). Bununla birlikte, kısa zincirli ya a sitlerinden olu an veya dü ük (oda sıcaklı ına çok yakın) erime noktasına sahip olan gliseridler kullanıldı ında, rekristalizasyonu ba latabilmek için, nanoemülsiyonları daha dü ük sıcaklıklara so utmak gerekli olabilir. Rekristalizasyon, liyofilizasyon ile de ba latılabilir (4).

Partikül büyüklüğünün küçük olması ve emülgatörlerin varlığı nedeniyle, lipid rekristalizasyonu çok gecikebilir ve ürün, uzun aylar boyunca bir ağırlı soğutulmuş karışım (supercooled melt) olarak kalabilir. Sıcak homojenizasyon yöntemi, sıcaklığa duyarlılığı düşük etkin maddeler için uygundur. Çünkü, yüksek sıcaklığa maruz kalınan süre nispeten kısadır. Ancak, yüksek sıcaklığa karşı çokduyarlı olan bileşikler ve hidrofilik özellikteki etkin maddeler için soğuk homojenizasyon yöntemi kullanılmaktadır.

#### **b. Soğuk Homojenizasyon**

Etkin maddenin içinde çözülmesi veya disperse edildiği erimiş lipid, kuru buz veya sıvınitrojen kullanılarak hızla soğutulur. Katı lipid, yaklaşık 50- 100  $\mu\text{m}$  boyutundaki lipid mikropartiküllere soğutulur. Katı lipid mikropartiküller, soğuk emülgatör çözeltisinde disperse edilir. Elde edilen pre-süspansiyon, oda sıcaklığında veya oda sıcaklığının altında yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilir. Sonuçta KLN'ler elde edilir. Soğuk homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon yönteminde ortaya çıkan;

- Sıcaklıkla etkin madde degradasyonunun indüklenmesi,
- Homojenizasyon sırasında etkin maddenin sulu fazda dağılması,
- Nanoemülsiyonun lipid rekristalizasyonunun güçlü olduğu

gibi problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Her iki homojenizasyon tekniğinde de, %40'a kadar olan lipid konsantrasyonlarında işlem yapmak için uygundur ve genel olarak, dar partikül büyüklüğü dağılımları vermektedir.

#### **I.2.3.3.Yüksek Hızda Karıştırma ve/veya Ultrasonikasyon Yöntemi**

Her iki yöntem de, yaygın olarak kullanılan ve uygulanması kolay yöntemlerdir. Genellikle bu yöntemler bir arada kullanılmakta ve belli bir süre

boyunca yüksek sıcaklıklarda uygulanmaktadır. Yüksek hızda karı tırma yönteminin dezavantajı, mikrometre boyutuna varabilen, geni partikül büyüklü ü da ılımına sahip ürün vermesidir. Bu da, saklama sırasında partikül büyümesi gibi fiziksel stabilite problemlerine sebep olmaktadır. Bunlara ek olarak, ultrasonikasyon yöntemi kullanılıyorsa, metal kontaminasyonunun dikkate alınması gerekti i bildirilmi tir.

Hou ve ark. (2003), KLN üretimi için, modifiye yüksek hızda homojenizasyon ve ultrason yöntemi geli tirmi lerdir. Bu yöntemin, organik çözücüye ihtiyaç olmadan yüksek kalitede KLN'lerin hazırlanmasında kullanılabilir, basit, uygun ve etkin bir yöntem oldu unu bildirmi lerdir (43).

#### **I.2.3.4.Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon veya Çözücü Difüzyon Yöntemi**

Çözücü emülsifikasyon-evaporasyon yönteminde; lipid, su ile karı mayan organik birçözücüde (kloroform vb) çözülür ve bu çözeltili, bir sulu faz içinde emülsifiye edilir. Çözücünün vakum altında buharla tırılmasıyla, lipid nanopartikülleri olu arak çöker. Bu yöntemin önemli bir avantajı, hazırlama sırasında ısı uygulanmamasıdır. Bu nedenle, yüksek sıcaklıkta bozulan etkin maddelerin yüklenmesi için uygun bir yöntemdir. Yöntemin dezavantajı ise, organik çözücü kullanımının gerekmesidir. Buna ek olarak, bu yöntem ile üretimin scaling upi leminin gerçekleştirilmesinde de problemler ortaya çıkmaktadır (4). Bu yöntem ile elde edilenürünün ortalama partikül büyüklü ü, organik fazdaki lipidin konsantrasyonuna ba lıdır.

Çözücü difüzyon yönteminde; su ile kısmen karı abilen çözücüler (benzil alkol, etil formatvb) kullanılmaktadır. Lipid, su ile doyurulmu çözücüde çözülür ve yüksek sıcaklıktaki, çözücü ile doyurulmu sulu emülgatör çözeltilisi ile emülsifiye

edilir. A ırı miktarda (1:5 – 1:10 oranlarında) suyun eklenmesinden sonra, organik çözücünün emülsiyon damlacıklarından sürekli fazadifüzyonu nedeniyle KLN'ler çöker. Oldukça seyreltik olan dispersiyon, ultrafiltrasyon veyaliyofilizasyon ile konsantre hale getirilmektedir.

Trotta ve ark. (2003), çözücü difüzyon yöntemi ile ve dü ük toksisiteye sahip oldukları kabuledilen çözücülerini ve emülgatörleri kullanarak, gliserin monostearat nanopartiküllerinin hazırlanabilirliğini ara tırmlardır. Benzil alkol veya bütillaktat kullanılarak, emülsifikasyon difüzyon yöntemi ile katı lipid nanokürelerin üretiminin mümkün olduğunu göstermektedir.

#### **I.2.4.KLN'lerin Karakterizasyonu**

##### **I.2.4.1.Partikül Büyüklü ü ve Da ılım Tayini**

Partikül büyüklü ü ve da ılımı, kolloidal taşıyıcı sistemlerin en önemli fizikokimyasal özelliğidir. Hazırlama yönteminin parametreleri, partikül büyüklü ünü ve da ılımını etkileyen önemli faktörlerdendir. Basıncın ve devir sayısının artırılması ile partiküllerin büyüklü ünde azalma olduğu belirlenmiştir. Üretimde kullanılan emülgatörün tipi ve miktarı da, partikül büyüklü ünü etkilemektedir. Genellikle, emülgatör miktarını belirli bir orana kadar artırmak, ortalama partikül büyüklü ünü azaltmaktadır. Emülgatörler, KLN'lerin hazırlanması sırasında, damlacıkların yüzeylerini kaplayarak damlacık kümelemesini ve uzun dönemdeki partikül birleşmesini önleyecek mekanik veya elektriksel engel oluştururlar. Damlacıkların stabilitesi yeterince sağlanabilirse, katılaşımından sonra elde edilen partiküllerin boyutu nanometrik aralıktadır (47).

Partikül büyüklü ünün rutin ölçümleri için en güçlü yöntemler; foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı yöntemi (LD)'dir. Coulter Counter yöntemi ise, koloidal dispersiyonları destabilize edebilecek elektrolitlere ihtiyaç göstermesi ve küçük nanopartiküllerin de erlendirilmesindeki zorluklar nedeniyle, KLN'lerin partikül büyüklü ü ölçümünde nadiren kullanılmaktadır (11).

#### **I.2.4.2.Partikül ekli Tayini**

KLN'lerin ekilerinin belirlenmesinde, di er partiküler sistemlerde oldu u gibi, atomikkuvvet mikroskobisi (AFM) ve elektron mikroskobu kullanılabilir. Düz bir silikon yüzeyesabitlenen nanopartiküllerin ekileri, AFM ile vakuma ihtiyaç duyulmadan belirlenebilmektedir.

#### **I.2.4.3. Zeta Potansiyel Ölçümü**

Zeta potansiyelinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Genel olarak, yüklü partiküllerde (yüksek zeta potansiyeli), elektriksel itme nedeniyle, partikül agregasyonunun meydana gelme ihtimali daha azdır. Ancak bu kural, sterik stabilizatörler içeren sistemler için tam olarak geçerli olmamaktadır. Çünkü, sterik stabilizatörlerin adsorbsiyonu, zeta potansiyeli azaltmaktadır.

#### **I.2.5.KLN'lerin Stabilitesi**

Kolloidal bir ilaç taşıyıcı olarak KLN'nin kullanılması için çok önemli bir nokta, KLN'lerin uzun süreli fiziksel ve kimyasal stabilitesidir (36). Optimize edilen sulu KLN dispersiyonlarının partikül büyüklüklerinin, 12-36 ay boyunca stabil kalabildi i gösterilmiştir. Ancak, bu bütün KLN dispersiyonları için genel bir özellik

de ildir ve pek çok durumda, daha kısa sürede partikül büyüklü ünde artı gözlenebilmektedir (39). Bir di er problem ise, hidrolize hassas etkin maddelerin varlı ındaki kimyasal stabilite problemidir. Sıvı dispersiyonun, kuru toz formunda bir ürüne dönü türülmesi faydalı ve sıklıkla da gerekli olmaktadır. Elde edilen katı haldeki ürün, sulu lipid dispersiyonlarından daha iyi bir kimyasal ve fiziksel stabiliteye sahip olmaktadır. Ayrıca, KLN granülatları veya tozları; kapsüller içine doldurulabilmekte, tablet halinde basılabilmekte veya pelletler içine hapsedilebilmektedir (39).

KLN dispersiyonunun kuru toz formuna dönü türülmesi 2 eilde mümkün olmaktadır:

- a) Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon)
- b) Püskürterek kurutma (Spray drying)

### **I.2.6.KLN'lerin Sterilizasyonu**

KLN'lerin sterilizasyonu pulmoner ve parenteral uygulamada geçerlidir. KLN'ler otoklavla (121°C), steril filtrasyonla veya aseptik artlarda sterilize edilebilmektedir. Otoklav sterilizasyonunun fiziksel stabilitesi genellenmemelidir, çünkü formülasyon bile imine ba lıdır.

### **I.2.7.KLN'lerden Etkin Madde Salımı**

KLN'lerden hızlı salım geni yüzey alana, küçük molekül büyüklü ü nedeni ile yüksek difüzyon katsayısına, matriksin dü ük viskozitesine ve kısa difüzyon mesafesine ba lanmaktadır. KLN'lerden etkin madde salımı üretim yöntemine ve kullanılan lipidlere ba lı olarak farklılıklar göstermektedir. Sıcak homojenizasyon yöntemi ile elde edilen KLN'lerde sürekli ve kontrollü salım ile birlikte patlama

etkisi gözlenmektedir. Üretim sıcaklığı veya yüzey etkin madde konsantrasyonu de i tirilerek patlama etkisi de i tirilebilmektedir. Artan sıcaklık ve artan yüzey etkin madde konsantrasyonu ile patlama etkisi de artmaktadır. Bu artlarda sulu fazda ilacın çözünürlü ünün artması patlama etkisinin artmasına neden olmaktadır. Yüzey etkin madde konsantrasyonu azaltılarak ve partikül büyüklü ünü artırarak sürekli ve kontrollü salım ile minimum patlama etkisi elde edilebilece i gösterilmi tir. So uk homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan KLN'lerinde salım katı fazdan difüzyonla oldu undan yava ve kontrollü salım ile birlikte patlama etkisinin gözlenmedi i bir salım eklindedir. Her iki yöntemde de görülen patlama etkisidir. Yumu ak çeper / sert çekirdek modelinde ilacın salımı için kısa mesafe oldu undan patlama etkisi gözlenir. Lipid matriks / katı dispersiyon eklinde olan yapılarda ise yaklaşık 6 haftaya kadar varan sürekli salım gözlenmektedir.

### **I.2.8.KLN'lerin Uygulama Yolları**

KLN'lerin uygulama alanları a a ıda verilmi tir:

#### **a. Oral Uygulama**

KLN'lerin oral verilili i sulu dispersiyonla ya da tablet, pellet, kapsül veya sa e eklindedir. Tabletlerin üretimi için, sulu dispersiyon eklindeki KLN'ler granül üretiminde granülasyon sıvısı yerine kullanılır. Alternatif olarak KLN'ler toz haline getirililip, tabletlemede toz karı ımı içine konur. Pellet üretiminde, KLN dispersiyonu ekstrüzyon i leminde ıslatıcı ajan olarak kullanılır. KLN tozu sert jelatin kapsüllere ya da KLN direk sıvı PEG 600 ile üretilerek yumu ak jelatin kapsüllere doldurulur. KLN'ler sa elerde ise liyofilize edilerek yada sprey kurutma i lemine tabi tutularak kullanılır.

#### **b. Parenteral Uygulama**



KLN'ler küçük partikül yapıları nedeniyle hedef organa subkutan, intravenöz veya intramuskuler olarak verilebilirler. Partiküller, karaciğer ve dalakta parçalanır. KLN formülasyonu sistemik dolaşıma verilebilir çünkü emboli için minimal risk içerir. Ayrıca KLN formülasyonlar subkutan ve intramuskuler verildiklerinde etkin maddeye sürekli salım sağlanabilir.

#### **c. Topikal Uygulama**

Topikal lipid nanopartiküller kozmetik veya terapötik amaçlı kullanılırlar. KLN'ler deri yüzeyinde koruyucu aktivite gösterir. Krem, jel ya da sprey formülasyonları vardır. Düşük lipid içerikli KLN dispersiyonlarında en düşük partikül boyutu gözlenmiştir. Düşük viskozite ve düşük dispers lipid konsantrasyonu dermal kullanım için dezavantaj olmaktadır. Çoğu durumda, deri yüzey formülasyonlarının başarılı olması için, jel ya da yağlarda dispers KLN bulunması gereklidir. Dermal verilişte, lipid konsantrasyonunun artması ile partikül boyutunun arttığı gözlenmiştir.

#### **d. Pulmoner Uygulama**

Pulmoner yolla etkin madde taşınması için KLN'lerin kullanımı ile ilgili çok az çalışmaya yayınlanmıştır (4). KLN'ler, küçük boyutta olmaları ve nefes verme ile hemen dışarı atılmaları nedeniyle, toz halde pulmoner yolla uygulanmazlar. Sulu dispersiyon şeklinde nebulizör ile verilirler. Bronşlarda ve alveollerde depolanır ve kontrollü olarak etkin maddeyi salırlar. Ayrıca KLN'ler, akciğerlerdeki makrofajlara ilaç hedeflemede de kullanılabilirler.

#### **e. Oküler Uygulama**

KLN'ler, adhezyon sonucunda gözde daha uzun süre kalarak, görüntüyü bozmadan, yüksek ilaç konsantrasyonunun elde edilmesini sağlamaktadırlar. Bu alanda da sınırlı sayıda çalışma vardır. Cavalli ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada Tobramisin'in (TOB) oküler uygulanması için taşıyıcı olarak KLN'lerin kullanımını değerlendirmişlerdir. Mikroemülsiyon yöntemi ile hazırladıkları KLN dispersiyonunun preoküler alıkonmasını, oküler toleransını, potansiyel irritasyonunu ve oküler biyoyararlanımını incelemiştirlerdir. KLN dispersiyonunun stabil bir prekorneal film oluşturduğunu ve gözde uzun süre kaldığını, mükemmel bir şekilde tolere edildiğini ve oküler irritasyona neden olmadığını bildirmişlerdir. Her bir tavanın bir gözünün alt konjonktival kesesine 100 µL TOB-KLN formülasyonu veya referans göz damlası uygulayarak, oküler biyoyararlanım çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. TOB-KLN'nin uygulanmasından sonra göz salgısında, referans göz damlasına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek TOB seviyesi sağlanmıştır. Referans taşıyıcıya göre KLN dispersiyonunun, Cmax değerinde 1,5 kat ve AUC değerinde 4 kat artışı sağlandığını bildirilmiştir (17).

#### **f.A ıllarda Adjuvan Olarak Uygulama**

Adjuvanlar, a ılamada immün cevabı artırmak için kullanılmaktadır. Yıllardır sıklıkla, alüminyum hidroksit partiküllerinden oluşan adjuvanlar kullanılmaktadır; ancak, bunların yan etkileri vardır (30). Etkin madde yüklenmemi KLN'ler a ı adjuvanları olarak kullanılabilirlerdir. Ayrıca, KLN matrisinde hapsedilen veya yüzeyinde adsorblanan antijenler de, artırılmış bir immünolojik cevabı indüklemektedirler (6). Geleneksel adjuvanlara kıyasla, KLN'ler, biyodegradasyona uğramaları ve vücut tarafından iyi tolere edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptir (30).

Normalde, ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan KLN'lerin, immünolojik ve alerjik reaksiyonlar göstermesi arzu edilmeyen bir durumdur. Formülasyonda kullanılacak bazı katkı maddeleri ve lipidler sayesinde veya üretim yöntemi ile, immünolojik reaksiyon yaratacak KLN'lerin üretimi sağlanabilmektedir (6).

#### **g. Etkin Madde Hedefleme**

Gen transferi için kullanılan katyonik KLN'ler, lipozomal transfer ajanları ile aynı katyonik lipid yapıda formüle edilmiştir. Formülasyonlara katyoniklik kazandırmak için DDAB, eserquat, stearylamin gibi katyonik özellikli maddelerle çalışılmıştır. KLN'ler ve lipozomlar arasındaki yapı ve performans benzerlik ve farklılıkları araştırılmıştır. Matriks lipid yapıda olmayan KLN'ler ile lipozomların formülasyonları benzerdir. Her ikisi de katyonik lipid tabanlıdır. DOTAP ve yardımcı lipid olarak DOPE içeren bir lipozomal formülasyon karşılaştırılmıştır. Hazırlanan KLN'ler lipozomlarla karşılaştırıldığında daha küçük çapa sahiptir ve bu yapısal farklılık atomik kuvvet mikroskopuyla desteklenmektedir. DNA bağlanmasındaki farklılık ise oldukça azdır.

KLN'ler, partikül büyüklüğü, yüzey yükü ve yüzey hidrofobisitesi gibi özellikleri nedeniyle makrofajlar tarafından tanınmaktadır. Bu nedenle, Pluronic F188 gibi polioksietilen polipropilen blok kopolimerleri kullanılarak, retikuloendotelial sistem tarafından yakalanmadan, kanda uzun süre sirkülasyonda kalan KLN'ler (stealth KLN) hazırlanmaktadır. Tersine, herhangi bir işlem görmemiş KLN'nin intravenöz enjeksiyonundan sonra taşıyıcı, karaciğerin Kupffer hücrelerinde birirmektedir. Bu sayede, hepatik neoplazmlar ve hepatit gibi hastalıklarda karaciğere hedefleme sağlanabilmektedir. KLN'ler ayrıca, beyine hedefleme için de kullanılabilir. Kan-beyin bariyerinin endotelial hücrelerine

yapı maya aracılık eden apolipoproteinler gibi kan proteinlerinin, partikül yüzeyine adsorbsiyonu ile KLN'nin beyin tarafından alınması sağlanmaktadır (6).

### **I.3.Manyetizma**

#### **I.3.1.Maddenin Manyetizmi**

Manyetizma, elektrik yüklerinin hareketi sonucu meydana gelmektedir. Bütün maddelerde manyetik özellik mevcuttur. Atomlardaki elektronların spinleri ve çekirdek etrafında dönmeleri sonucu bu manyetik özellik oluşmaktadır.

Maddeler manyetik özelliklerine göre beş'e ayrılırlar:

- Diamanyetik maddeler
- Paramanyetik maddeler
- Ferromanyetik maddeler
- Antiferromanyetik maddeler
- Ferrimanyetik maddeler

##### **I.3.1.1. Diamanyetik Maddeler**

Mıknatısa yaklaştırılınca mıknatıs tarafından itilir, yani bunlar manyetik alanı zayıflatırlar. Bakır, kurun, bizmut, karbon, gümüş, cıva diamanyetik maddelerdir.

##### **I.3.1.2. Paramanyetik Maddeler**

Paramanyetik maddeler mıknatısa yaklaştırıldığında ondan çok az etkilenir, yani içine konulan manyetik alanı biraz sıkılaştırır. Platin, hava, uranyum, manganez, alüminyum, sodyum ve oksijen paramanyetik maddelere örnektir.

### **I.3.1.3.Ferromanyetik Maddeler**

Mıknatıs tarafından çekilen maddeler ferromanyetik özellik gösterir. Bu maddelere örnek olarak, demir, permaloy, yumu ak çelik, nikel, kobalt verilebilir. Bu maddeler ısıtıldıklarında belli bir sıcaklıkta (Curie sıcaklığı) mıknatıslık özelliğini kaybederler ve aniden paramanyetik olurlar (7).

### **I.3.1.4.Antiferromanyetik Maddeler**

Geçi metal bileşikleri ve bazı geçi metal oksitleridir.  $CuCl_2$ ,  $CoO$ ,  $NiO$  antiferromanyetik maddelere en tipik örneklerdir. Antiferromanyetik maddeler; paralel olmayacak şekilde dizilen manyetik dipol momentlerinin alt küme atomlarından oluşmaktadır. Bu paralel olmayan dizilimler antiferromanyetik maddelerin çok küçük bir manyetik duyarlılık göstermesine sebep olmaktadır.

### **I.3.1.5.Ferrimanyetik Maddeler**

Ferromanyetik materyaller gibi ferrimanyetik materyaller de Curie sıcaklığı ( $T_C$ ) olarak ifade edilen kritik bir sıcaklığın altında kendiliğinden olan bir mıknatıslanmaya sahiptir. Ferromanyetik ve ferrimanyetik maddeler için manyetik duyarlılık büyüklüğü benzerdir. Ancak bu iki grubun manyetik dipol momentlerin dizilmesi son derece farklıdır. Ferrimanyetik bir materyaldeki manyetik dipol momentleri alt-kümelere bölünür ve antiferromanyetik materyallerin bir alt kümesi olarak sınıflandırılır. Her bir alt küme, ferrimanyetik materyaller için net mıknatıslanmada alt küme sonuçları için manyetik dipol momentleri arasındaki farklılık ve ferromanyetik materyal olarak ele alınır. Ferrimanyetik ve antiferromanyetik materyaller arasındaki farklılık alt kümelere momentlerin sayısı ya da büyüklüğünün farklı olması şeklindedir. Manyetit benzeri geçiş metali oksitleri

(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ve kobalt ferrit benzeri karı ık ferritler (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) en tipik ferrimanyetik maddelerdir (14).

### **I.3.2. Manyetik Nanopartiküller**

Günümüzde manyetik nanopartiküller elektrik, çevre gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Nano boyuttaki manyetik partiküllerin güncel olarak, önemli kullanım alanlarından biri de kontrollü ilaç salımı ve hedeflenmesidir. Kanser tedavisi, gen tedavisi, gibi alanlarda önemli çalı malar yapılan manyetik nanopartiküllerin sentezleme yöntemleri, karakterizasyonları, biyoyumlulukları, manyetik alandaki davranı ları önemli parametrelerdir (2).

#### **I.3.2.1. Manyetik Nanopartikül Sentezleme Yöntemleri**

Manyetik nanoparçacık sentezlemek için birçok yöntem geli tirilmi tir. Bu yöntemler ihtiyaca göre seçilir (23). Nano yapının toz, sıvı, ince film, salkım, makro molekül vb. fazlarda sentezlenmesi ve bunun yanında sentezlenen malzemenin homojen boyutlarda, kararlı durumda, sentez süresine ve boyutuna ba lı olan teknikler vardır. Bu tekniklerden en çok kullanılanlar unlardır:

- Ortak çöktürme
- Mikroemülsüyon
- Hidrotermal sentez
- Termal parçalanma

##### **I.3.2.1.1. Ortak Çöktürme**

Uygun oranlarda karı tırılan Fe<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> iyonları bazik ortamda güçlü karı tırıcı altında çöktürülür. Bu yöntemle elde edilen parçacıkların boyutları, Fe<sup>+2</sup>/Fe<sup>+3</sup> oranı,

pH, karı tırma hızı, sıcaklık, baz tipi, iyonik iddet ve ortamın niceli inden etkilenir. Oda sıcaklı ında yada yüksek sıcaklıklarda gerçekte tirilebilir.

#### **I.3.2.1.2.Mikroemilsüyon**

Mikroemülsiyon, nanoparçacıkların formülasyonunda nanoreaktör olarak kullanılır. Miseller olu turarak iki sıvı fazın kararlılı ı sa lanır. Ya içinde su mikroemülsiyonunda damlacıklar sürfaktan tarafından sarılarak sıvı içine dispers olurlar. Parçacıklar miseller içinde büyütülür ve çözücü ekleyerek (aseton, etil alkol) çöktürülür. Misellerin boyutları su ve sürfaktanın molar oranına göre de i ir (61).

#### **I.3.2.1.3.Hidrotermal Sentez**

$FeCl_3$ , etilen glikol, sodyum asetat ve polietilen glikol iyice karı tırılarak basınçlı kaplara konur ve reaksiyon  $20^{\circ}C$ 'de 8-72 saat arasında gerçekte tirilir. Bu yöntemle 200-800 nm arasında monodispers nanoparçacıklar elde edilir. Bu yöntemde kullanılan etilen glikol yüksek kaynama noktalı çözücü olarak, polietilen glikol de sürfaktan olarak görev yapar.

Sodyum asetat ise nanoparçacıkların etrafını yükleyerek elektrostatik itme sa lar ve parçacıkların birle melerini engelleyici olarak görev yapar.

#### **I.3.2.1.4.Termal Parçalanma**

Organik bazlı bir yöntemdir. Kısaca demir-oleat kompleksleri yüksek kaynama noktalı organik çözücülerde oleik asit varlı ında karı tırılarak kaynatılır. Kompleks termal yolla parçalanır, bu sırada aç ı a çıkan demir ortamdaki oksijen varlı ında manyetite dönü ürken, ortamdaki sürfaktan nedeniyle çok fazla büyümeden kalır. Bu yöntemle elde edilen nanokristaller çok iyi monodisperstir ve kloroform hekzan gibi

organik çözenlerde çok iyi dispers olurlar. Parçacık boyutu sıcaklığına ve kaynama süresine bağlı olarak 5-22 nm arasında değişir (55).

**Tablo I.2.**Manyetik nanopartikül sentezleme yöntemleri, avantajları ve dezavantajları

Metodlar	Sentez	Reaksiyon sıcaklığı (°C)	Reaksiyon periyodu	Çözücü	Yüzey aktif ajan	Boyut dağılımı	Yüzey kontrolü	Ürün miktarı
Ortak çöktürme	Basit, çevre artlarında	20-90	Dakikalar	Su	Gerekli reaksiyon esnasında yada reaksiyondan sonra	Farklı	Yeni de il	Yüksek
Termal parçalanma	Komplike, inert atmosferde	100-320	Saatler, günler	Organik çözücü	Gerekli reaksiyon esnasında	Aynı	Çok iyi	Yüksek
Mikroemülsiyon	Komplike, çevre artlarında	20-50	Saatler	Organik çözücü	Gerekli reaksiyon esnasında	Farklı	Yeni	Düşük
Hidrotermal sentez	Basit, yüksek basınçta	220	Saatler, günler	Su, etanol	Gerekli reaksiyon esnasında	Aynı	Çok iyi	Orta

### I.3.2.2.Demir Oksit Yapılar

Manyetikli i en belirgin elementlerden olan demir, makroskobik uzayda bolca gözlenmektedir. Demirin nano boyuttaki partiküllerin gösterdiği farklı manyetik ve katalitik özellikleri, nanoteknolojide birçok ara tırmaı da beraberinde getirmi tir. Bu ara tırmaların temelinde demir ve bile iklerini kararlı halde tutmak yatmaktadır. Kullanım alanı en geni olan demir-oksijen bile ikleri **manyetit(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)**, **maghemite ( Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)** ve **hematite ( -Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)** olarak adlandırılır.



### **I.3.2.2.1.Maghemite**

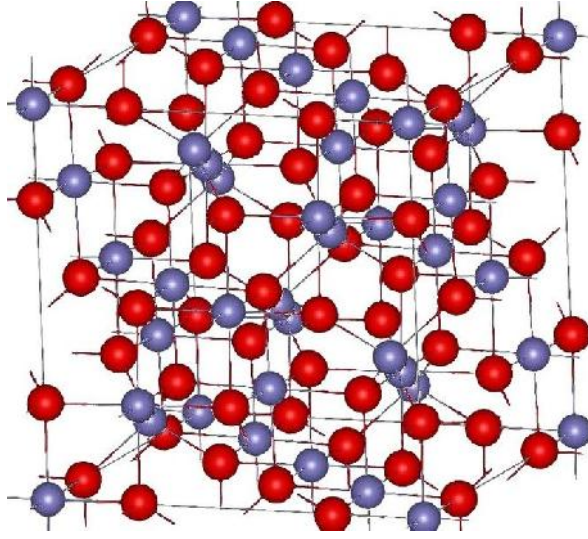
Maghemite, yapısal bakımdan manyetitle benzerlik gösterir. Artık mıknatıslık de erleri gere i en yaygın kullanılan manyetik materyallerdir. Demir tozlarının bazik ortamda aynı anda çökeltmesiyle sentezlenebilirler. Çift mikroemülsiyon prosedüründe bir ya blo u ve bir poli blo undan noniyonik yüzeyaktif madde kullanılarak da elde edilebilir. Güçlü manyetik özelli e sahiptir.

### **I.3.2.2.2.Hematite**

Hematit zayıf ferromanyetik özellik gösteren antiferromanyetik bir mineraldir. Kristal yapısı rombohedral olup demir ve oksijen atomları bu yapıda O-Fe-O-Fe-O sırasında trigonal eksene dik tabakalar halinde dizilmi lerdir. Düzlemdeki demir atomları bir manyetik alanın etkisi altında kendili inden belirli bir yönde manyetikle erek doyuma ula ırlar.

### **I.3.2.2.3.Manyetit**

Manyetit ( $Fe_3O_4$ ), çok yüksek bir manyetik özellik gösteren ters spinal kristal yapısı karı ık bir demir oksittir. Ters spinal yapı içerisinde,  $Fe^{+3}$ ,lerin yarısı tetrahedral açıdan ve  $Fe^{+3}$ ,lerin di er yarısı ve  $Fe^{+2}$ ,lerin tamamı da oktahedral açıdan koordine edilmi tir. Her bir oktahedral yer, oktahidronların kö elerinde altı yakın kom u  $O^{-2}$  iyonlarına sahip iken her bir tetrahedral yer tetrahidronların kö elerinde düzenlenmi olan dört kom u  $O^{-2}$  atomuna sahiptir.



**ekil I. 11.** Manyetitin kristal yapısı sa üstteki atom demir

## BOLÜM II-DENEYSEL KISIM

### II.1. Materyal ve Metod

#### II.1.1. Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler

**Tablo II. 1.** Deneysel kısımda kullanılan biyolojik ve kimyasal maddeler

Kompritol 888 ATO	GATTEFOSSÉ SAS, SAINT PR EST cedex/FRANCE
Esterquat 01	GERBU Biochemicals GmbH, Gaiberg, Almanya
Tween 80	MERCK Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Almanya
Span 80	MERCK Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Almanya
Span 85	SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Polaksamer 188	BASF SE, Ludwigshafen, Almanya
Etanol (%99,2)	MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya
Propanol 1	MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya
5N Amonyum Hidroksit	SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya
Sodyum Hidroksit	MERCK KGaA Darmstadt, Almanya
Demir II Klorür(.4H <sub>2</sub> O)	MERCK KGaA Darmstadt, Almanya
Demir III Klorür	MERCK Schuchardt OHG, Hohebrunn, Almanya
Agaroz	Basica LE, Prona, Madrid, spanya
Tris (Trizma Baz)	MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya
EDTA Disodyum Tuzu	SIGMA-Aldrich Co Inc., Steinheim, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	SIGMA-Aldrich Co Inc., Steinheim, Almanya
Ethidyum Bromid	SIGMA-Aldrich Co Inc., Steinheim, Almanya
Glasiyal Asetik Asit	ATABAY Kimya San. Ve Tic A. ., stanbul
Sodyum Asetat (NaOAc)	APPLICHEM GmbH, Darmstadt, Almanya
6x Yükleme Boyası	FERMENTAS International Inc., Ontario, Kanada
Moleküler A ırlık Standardı (Gene Ruler 1kb DNA Ladder)	FERMENTAS International Inc., Ontario, Kanada
pEGFP-C1	INVITROGEN, California, ABD

## II.1.2. Kullanılan Araç-Gereçler

**Tablo II. 2.** Deney kısmında kullanılan araç- gereçler

Hassas Terazı – BP121S ve BL600	Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya
Digital Su Banyosu	Vwr, Pennsylvania, ABD
Vorteks – MS1 Minishaker	Ika – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Derin Dondurucu (-20 C) – Biomedical Freezer	Sanyo, San Diego, ABD
UV Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat, Cedex, Fransa
Çalkalayıcı – KS501 D	Ika – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Santrifüj – EBA 12	Hettich, Kirchlingern, Almanya
PH metre – Level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Almanya
Zeta Sizer MALVERN- Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Worchestershire, İngiltere
Saf Su Üretim Cihazı	Millipore, Billerica, ABD
Isıtmalı Manyetik Karı tırıcı – Labortechnik RCT basic	Ika – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Almanya
Mikrodalga Fırın – MW211W	Ariston, İtalya
Elektroforez Güç Kayna ı 2 - EC – 1000 – 90	Thermo, New York, ABD
Yatay Elektroforez Sistemi 1 – EC Maxicell Primo EC340	Thermo, New York, ABD
Mikropipet	Thermo, Halbrook NY, USA
Titre imli Örnek Manyetometresi	Lakeshare, ABD

## II.2. Deneysel Çalışmalar

### II.2.1. Manyetik KLN Formülasyonlarının Hazırlanması

#### II.2.1.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında, önce iç faz S/Y mikroemülsiyon için gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra Y/S mikroemülsiyon için gerekli formülasyon hesaplamaları yapılarak, Y/S mikroemülsiyonun ya fazı yerine S/Y mikroemülsiyon

kullanılarak, S/Y/S çoklu emülsiyona geçi yapılmı tır. Formülasyon oranları belirlendikten sonra ise mikroemülsiyondan dilüsyon yöntemini modifiye ederek KLN hazırlanmı tır.

#### **II.2.1.1.1. S/Y Mikroemülsiyonun Hazırlanması**

##### **II.2.1.1.1.1. Sürfaktan Olarak Span 85 ve Polaksamer 188 Kullanılarak S/Y Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması**

S/Y mikroemülsiyon hazırlanmasında ya olarak kompritol, hidrofilik sürfaktan olarak Polaksamer 188, lipofilik sürfaktan olarak Span 85, ko-sürfaktan olarak ise Propanol 1 kullanılmı tır. Sistem HLB de eri, S/Y mikroemülsiyona uygun olarak, 5,2 olarak belirlenmi tir. HLB de eri hesaplaması kullanılarak sürfaktanlar için gerekli oranlar bulunmu tur.

$$HLB_{sistem}=f_a*HLB_a+(1-f_b)*HLB_b$$

$f_a$ =Sistemdeki A emülgatörünün a ırlıklı kesiri

$HLB_a$ =Sistemdeki A emülgatörünün HLB de eri

$F_b$ =Sistemdeki B emülgatörünün a ırlıklı kesiri

$HLB_b$ =Sistemdeki B emülgatörünün HLB de eri

$$HLB_{span\ 85}=1,8$$

$$HLB_{polaksamer\ 188}=29$$

$$HLB_{sistem}=x *1,8+(1-x)*29$$

$$5,2=x*1,8+(1-x)*29$$

Formül hesaplaması sonucu: Span 85:Polaksamer 188= 7:1olarak çıkmı tır.

Sürfaktan/ko-sürfaktan oranı ise çalı ılan faz diyagramlarında, S/Y mikroemülsiyon alanının geni li i göz önüne alınarak, 5:1 olarak seçilmi tir.

Gerekli sürfaktan, ko-sürfaktan oranları belirlendikten sonra, faz diyagramından S/Y mikroemülsiyon olu um alanında çe itli S/Y formülasyonlar

hazırlanarak transparan ve yarı transparan alanlar saptanmıştır. Toplam a ırlık 1g hesaplanarak formülasyonlar çalı ılımlıdır. Formülasyonda kullanılan maddelerin yüzde miktarları Tablo II.3.'de gösterilmiştir.

**Tablo II. 3.** Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon formülasyonlarının içerikleri

Maddeler Formülasyon	Ya (%)	Su (%)	Sürfaktan/ko-sürfaktan (%)
F1	40	10	50
F2	36	10	54
F3	30	10	60
F4	25	10	65

#### Formülasyonun Hazırlanması:

Gerekli miktarda kompritol tartılıp üzerine sürfaktan olarak 7:1 oranında Span 85 ve Polaxamer 188, sürfaktan:ko-sürfaktan oranı ise 5:1 olacak şekilde Propanol 1 eklenmiştir. Karışım 80°C'deki ısıtıcılı manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Çalı mada tüm tartımlar hassas terazide yapılmıştır. 200 rpm'de karışan ya , sürfaktan:ko-sürfaktan karışımı otomatik pipet kullanılarak, distile su ile bulanıklık gözlemleninceye kadar titre edilmiştir. Bulanıklık oluşturan su miktarları belirlenerek, faz diyagramları çizilmiştir ve oluşan S/Y mikroemülsiyon alanları saptanmıştır. Oluşan sistemlerin titre edilen su miktarlarına göre yeni yüzdeleri Tablo II.4.'te gösterilmiştir.

**Tablo II. 4. .** Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon sistemlerin distile su ile titrasyonları sonucu elde edilen formülasyon içerikleri

Maddeler Formülasyon	Ya (%)	Su (%)	Sürfaktan/ko-sürfaktan (%)
F1	43,4	2,4	54,2
F2	39,1	2,2	58,7
F3	32,3	3,2	64,5
F4	26,9	3,2	69,9

## II.2.1.1.1.2. Sürfaktan Olarak Span 80 ve Tween 80 Kullanılarak S/Y

### Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması

S/Y mikroemülsiyon hazırlanmasında yağ olarak kompritol, hidrofilik sürfaktan olarak Span 80, lipofilik sürfaktan olarak T 80, ko-sürfaktan olarak ise Propanol 1 kullanılmıdır. Sistem HLB de eri 5 olarak tasarlanmıştır. HLB de eri hesaplaması kullanılarak, Span 80:T 80 oranı 10:1 olarak saptanmıştır. Sürfaktan/ko-sürfaktan oranı ise çalılışlan faz diyagramlarında mikroemülsiyon alanının genişliği göz önüne alınarak 5:1 seçilmiştir.

Gerekli sürfaktan, ko-sürfaktan oranları belirlendikten sonra, faz diyagramından S/Y mikroemülsiyon oluşum alanında çeşitli S/Y formülasyonlar hazırlanarak transparan ve yarı transparan alanlar saptanmıştır. Toplam ağırlık 1 g hesaplanarak formülasyonlar çalılışlanmıştır. Çalılışlan formülasyonların yüzde miktarları Tablo II.5.'te gösterilmiştir.

**Tablo II. 5.** Katı yağ olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon formülasyonlarının içerikleri

Maddeler Formülasyon	Ya (%)	Su (%)	Sürfaktan/ko-sürfaktan (%)
F5	33	10	57
F6	27	15	58
F7	30	10	60
F8	40	10	50
F9	26	16	58
F10	20	20	60

### Formülasyonun Hazırlanması:

Gerekli miktarda kompritol tartılıp üzerine sürfaktan olarak 10:1 oranında Span 80 ve T 80, sürfaktan:ko-sürfaktan oranı ise 5:1 olacak şekilde Propanol 1 eklenmiştir. Karışım 80°C'deki ısıtıcılı manyetik karıştırıcıya konulmuştur.

Çalı mada tüm tartımlar hassas terazide yapılmı tır. 200 rpm'de karı an ya , sürfaktan:ko-sürfaktan karı ımı otomatik pipet kullanılarak, distile su ile bulanıklık gözlemleninceye kadar titre edilmi tir. Bulanıklık olu turan su miktarları belirlenerek, faz diyagramları çizilmi ve olu an S/Y mikroemülsiyon alanları saptanmı tır. Olu an sistemlerin titre edilen su miktarlarına göre yeni yüzdeleri Tablo II.6.'da gösterilmi tir.

**Tablo II. 6.** Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan S/Y mikroemülsiyon sistemlerin distile su ile titrasyonları sonucu elde edilen formülasyon içerikleri.

Maddeler Formülasyon	Ya (%)	Su (%)	Sürfaktan/ko- sürfaktan (%)
F5	34,7	5,3	60
F6	30	5,6	64,4
F7	31,9	4,3	63,8
F8	42,5	4,3	53,2
F9	29,5	4,5	66
F10	24,1	3,6	73

#### II.2.1.1.2. Sürfaktan Olarak Tween 80 Kullanılarak Y/S Mikroemülsiyon Formülasyonu Hazırlanması

Y/S mikroemülsiyon hazırlanmasında ya olarak kompritol, sürfaktan olarak T 80, ko-sürfaktan olarak ise toksisitesi dü ük olan etanol kullanılmı tır. Sistem HLB de eri Y/S mikroemülsiyona uygun 15 olarak belirlenmi tir. Sürfaktan/ko-sürfaktan oranı ise çalı ılan faz diyagramlarında, Y/S mikroemülsiyon alanının geni li i göz önüne alınarak, 5:4 olarak seçilmi tir.

Gerekli sürfaktan, ko-sürfaktan oranları belirlendikten sonra, faz diyagramından Y/S mikroemülsiyon olu um alanında çe itli Y/S formülasyonlar hazırlanarak transparan ve yarı transparan alanlar saptanmı tır. Formülasyonda kullanılan maddelerin yüzde miktarları Tablo II.7.'de gösterilmi tir.



**Tablo II. 7:** Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak T 80ve ko-sürfaktan olarak Etanol kullanılarak hazırlanan Y/S mikroemülsiyon formülasyonlarının içerikleri

Maddeler Formülasyon	Ya (%)	Su (%)	Sürfaktan/ko-sürfaktan (%)
F11	2	71	27
F12	3,7	76,8	19,5
F13	2,5	68,3	29,1
F14	4,1	70	25,9
F15	4,4	75	20,6
F16	3	88	9

### **Formülasyonun Hazırlanması :**

Gerekli miktarda kompritol tartılarak 80°C'ye eritilmi üzerine 10:1 oranında T 80 ve Etanol eklenmi tir. 200 rpm'de karı maya bırakılmı tir. Daha sonra farklı miktarlarda 80°C'deki distile su tüplere ilave edilerek, 80°C'de sıcak su banyosunda tutularak sistemin dengeye gelmesi beklenmi tir. Berrak sistemler saptanarak faz diyagramlarında Y/S mikroemülsiyon alanları çizilmi tir.

### **II.2.1.1.3. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Denemeleri**

#### **II.2.1.1.3.1. F<sub>3</sub> Formülasyonu ile Yapılan Deneme**

Seçilen F<sub>3</sub> formülasyonu, hidrofilik sürfaktan T 80 içeren bir dı faz hazırlanarak S/Y/S çoklu emülsiyon siteme geçi denemesi yapılmı tir. Bu deneme 2 farklı yol izlenerek yapılmı tir.

- a) F<sub>3</sub> formülasyonu 80°C'ye ısıtılarak, bu ısıyı koruyacak cam düzenek içine konulmu tur. 200 rpm'de karı tırılarak homojen olması sa lanılmı tir. Oda sıcaklı ında 40 mL %2'lik T 80 çözeltisi hazırlanarak 200 rpm'de manyetik karı tırcıda karı maya bırakılmı tir. S/Y/S çoklu emülsiyon sistemde KLN olu turmak için, F<sub>3</sub> formülasyonu sıcak enjektörle çekilerek hızla T 80 çözeltisine enjekte edilmi tir.

b) İlk yöntemden farklı olarak 80°C'de 200 rpm'de karıştırılan F<sub>3</sub> formülasyonu, sıcak enjektörle çekilerek hızla 80°C'de 200 rpm'de ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerindeki %2'lik 40 mL T 80 çözeltisine enjekte edilmiştir.

#### **II.2.1.1.3.2. F<sub>6</sub> Formülasyonu ile Yapılan Deneme**

Çok faz su yüzdesinin büyük olması daha sonra manyetik KLN oluşturmada demir bileşimlerinin çözünmesinde avantaj sağlayacağı için F<sub>6</sub> formülasyonu uygunluk araştırması için seçilmiştir. F<sub>6</sub> formülasyonu 80°C'ye ısıtılarak, bu ısıyı koruyacak cam düzenek içine konulmuştur. 200 rpm'de karıştırılarak homojen olması sağlanmıştır. Daha sonra F<sub>12</sub> formülasyonu, sıcak enjektörle çekilerek hızla 80°C'de 200 rpm'de ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerindeki %2'lik 40 mL T 80 çözeltisine enjekte edilmiştir.

#### **II.2.1.1.4. Ön Formülasyon Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen S/Y/S Çoklu Emülsiyon Formülasyonu**

S/Y/S çoklu emülsiyona geçiş uygunluk çalışmalarında en berrak ve stabil sonucu veren F<sub>6</sub> seçilerek, Y/S mikroemülsiyonun yağ fazı yerine kullanılarak 80°C'de S/Y/S çoklu emülsiyon oluşturulmuş ve oda sıcaklığına soğutulularak KLN elde edilmiştir. Y/S mikroemülsiyonda formülasyon olarak en berrak ve stabil formülasyon olan F<sub>11</sub> seçilmiştir. Oluşturulan optimum formülasyon F<sub>17</sub> olarak numaralandırılmıştır. Çok fazlı S/Y mikroemülsiyon F<sub>12</sub> 50 µl de bulandırılması için bundan sonraki deneylerde 40 µl olarak alınmıştır. 0,89 g iç yağ fazı sabit ve aynı şekilde hazırlanarak su fazı hesaplamaları buna göre yapılmıştır.

#### **F<sub>17</sub> Formülasyonunun Hazırlanması**

0,89 g iç S/Y mikroemülsiyon hazırlanıp ısıtıcılı manyetik karı tırcıya, içinden 80°C’de sıcak su geçen cam bir düzenek içersine konulup, 200 rpm’de karı maya bırakılmı tır. Dı su fazı için gerekli miktarlarda distile su tartılıp üzerine sürfaktan olarak gerekli miktarda T 80, daha sonra da ko-sürfaktan olarak Etanol eklenmi tır. Dı su fazı bu ekilde ısıtıcılı manyetik karı tırcıda 80°C’ye getirilmi daha sonra da 200 rpm’de karı tırlmaya bırakılmı tır. 0,89 g 200 rpm’deki iç faz sıcak enjektörle 80°C 200 rpm’de karı makta olan dı su fazına hızlı bir ekilde enjekte edilmi tır. Çoklu S/Y/S emülsiyon olu mu , berrak bir görüntü elde edilmi tır. Formülasyon oda sıcaklı ına kadar 200 rpm’de bekletilmi ve berrak görüntünün kaybolmadı ı gözlenmi tır. Bu formülasyon oda sıcaklı ında 24 saat bozulmadan stabil kalmı tır. Daha sonraki çalı malar için F<sub>17</sub> en berrak ve stabil formülasyon olarak seçilmi tır.

#### **II.2.1.1.4.1. Seçilen Formülasyonun Karakterizasyon Çalı maları**

##### **II.2.1.1.4.1.1. Seçilen Formülasyonun Partikül Büyüklü ü Ölçümü**

F<sub>17</sub> tekrar taze hazırlanmı tır. Partikül büyüklü ü ölçümü için cam tüpe 100 µL F<sub>17</sub>, 2900 µL ultra saf su konularak 3000 µL’ye tamamlanmı , seyreltme yapılmı tır. Ölçüm, oda sıcaklı ında (24°C) ve vücut sıcaklı ında (37°C) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, Malvern Cihazı’nda yapılmı tır.

##### **II.2.1.1.4.1.2. Seçilen Formülasyonun Zeta Potansiyeli Ölçümü**

F<sub>17</sub> tekrar taze hazırlanmı tır. Zeta potansiyeli ölçümü için cam tüpe 100 µL F<sub>17</sub>, 2900 µL ultra saf su konularak 3000 µL’ye tamamlanmı , seyreltme yapılmı tır. Ölçüm, oda sıcaklı ında (24°C) ve olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, Malvern Cihazı’nda yapılmı tır.

### **II.2.1.1.5. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sisteme Katyoniklik Kazandırılarak, Katyonik KLN Elde Edilmesi**

Geliştirilen KLN formülasyonuna katyonik özellik kazandırmak için yağ fazına Esterquat eklenmiştir. F<sub>17</sub> formülasyonundaki kompritol miktarı azaltılarak, azaltılan yağ miktarında %1 oranında Esterquat eklenmiştir. Son hazırlanan S/Y/S çoklu emülsiyon sistemi F<sub>17</sub>, katyonik olarak elde edilmiştir.

#### **Formülasyonun Hazırlanması**

0,135 g kompritol ve 0,135 g Esterquat tartılıp cam tüpe konulmuştur. 0.58 g sürfaktan, ko-sürfaktan karışımı üzerine eklenmiştir. 80°C'deki ısıtıcıly manyetik karıştırıcıda 200 rpm'de karışımın üzerine 40 µL distile su ilave edilmiştir. S/Y mikroemülsiyon oluşumu ve berraklık net olarak gözlemlenmiştir. 0,89 g iç S/Y mikroemülsiyon ısıtıcıly manyetik karıştırıcıya, içinden 80°C'de sıcak su geçen cam bir düzenek içerisinde konulup bırakılmıştır. Mikroemülsiyon 200 rpm'de karışımaya bırakılmıştır. Distile su fazı için 31,6 g distile su tartılıp üzerine sürfaktan olarak 6,67 g T 80 eklenmiştir. Daha sonra ko-sürfaktan olarak 5,34 g Etanol eklenmiştir. Distile su fazı bu şekilde ısıtıcıly manyetik karıştırıcıda 80°C'ye getirilmiştir daha sonra da 200 rpm'de karıştırılmaya başlanmıştır. 0,89 g 200 rpm'deki iç S/Ymikroemülsiyon fazı, 80°C'de 200 rpm'de karışımakta olan distile su fazına hızlı bir şekilde enjekte edilmiştir. S/Y/S çoklu emülsiyon oluşumu berrak bir sistem elde edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 200 rpm'de karıştırılarak KLN elde edilmiştir. Elde edilen KLN'lerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri ölçülerek karakterizasyonları yapılmıştır.

## **II.2.1.1.6. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sisteme Manyetik Özellik Kazandırılarak KLN Elde Edilmesi**

Geliştirilen KLN formülasyonuna manyetik özellik kazandırmak için kimyasal reaksiyonlamanyetik nanopartikül hazırlama yönteminden yararlanılmıştır. Öncelikle FeCl<sub>3</sub> ve FeCl<sub>2</sub> tuzları (2:1 molar oranı) sulu çözeltisi ile azot gazlı ortamda demir oksit nanopartikülleri sentez edilmiştir. Amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH) ilave edilmesi (44) ile de yaklaşık 5 nm büyüklüğünde iyi bir şekilde dağıtılmış manyetik nanopartiküller oluşturulmuştur.

### **II.2.1.1.6.1. Dış Su Fazına Alkali İlavesi ile Fazlar Arasındaki İyon Geçişi Sağlanarak Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalışması**

S/Y/S çoklu emülsiyon formülasyonunun iç su fazına Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup> tuzları çözündürülerek sisteme ilavesi planlanmıştır. Daha sonra alkali ortamda kimyasal reaksiyon gerçekleştirilmesi için, ayrıca dış faza alkali ilavesi ile NaOH ve NH<sub>4</sub>OH ayrıca eklenerek manyetik KLN elde edilmesi planlanmıştır.

#### **Formülasyonun Hazırlanması**

Yapılan ilk deneyde 0.135 g kompritol ve 0.135 g Esterquat hassas terazide tartılarak cam tüpe konulmuş, üzerine 0.58 g sürfaktan-ko-sürfaktan karışımı eklenmiştir. 80°C'deki ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 200 rpm'de karışımaya bırakılmıştır. Daha sonra S/Y/S çoklu emülsiyonunun dış su fazı hazırlanmıştır. 71 g su 6,67 g T 80 ve 5.34 g Etanol tartılarak, 80°C'deki ısıtıcılı manyetik karıştırıcıya konulmuştur. 200 rpm'de karışımaya bırakılmıştır. Son basamak olarak, 40 mL'de 50 mg FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O yer alacak şekilde azot gazı geçirilmiş ultra saf su ile 2 mL çözelti hazırlanmıştır. Hemen aynı şekilde 40 mL'de 81 mg FeCl<sub>3</sub> yer alacak şekilde azot gazı geçirilmiş ultra saf su ile 2 mL çözelti hazırlanmıştır. Bu kısımda oksitlenmeyi

önlemek için çok hızlı çalı ılmı tır. ki çözeltiden de 20' er mikrolitre alınarak, toplam 40 µL olarak hızlı bir ekilde 200 rpm'de karı an 80°C'deki S/Y mikroemülsiyona eklenmi tir. Olu an S/Y mikroemülsiyonda bulanıklık gözlenmemi tir. Hızlı bir ekilde hareket edilerek iç S/Y mikroemülsiyon cam tüp düzene ine yerle tirilip sıcak enjektörle çekilerek 200 rpm'de karı an 80°C'deki dı su fazına enjekte edilmi tir. Kimyasal reaksiyonla manyetik nanopartikül olu ması için ortama kuvvetli alkali eklenmesi gerekmektedir. Bu sebeple olu an sistem ikiye ayrılmı ve pH ayarlaması iki farklı alkali çözeltisiyle yapılmı tır. ki e it hacme ayrılan sitemden ilki 80 µl 1M NaOH ile pH 7.35'e ayarlanmı tır. kinci sistem ise 60 µl 5M NH<sub>4</sub>OH ile pH7.35'e ayarlanmı tır. Bu pH da her iki sitemden de vücut sıcaklı nda (37°C) ve oda sıcaklı nda (24°C) , partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümü yapılmak üzere örnekler alınmı tır. Kalan S/Y/S çoklu emülsiyon sisteminin daha yüksek pH de erlerindeki tepkisini incelemek amacıyla pH de eri 9'a kadar yükseltilmı tir. pH 9'daki sistemlerden de oda sıcaklı nda(24°C) ve vücut sıcaklı nda (37°C) örnekler alınıp malvern cihazında partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri ölçülmü tür.

#### **II.2.1.1.6.2. ç Su Fazına Alkali lavesi ile Manyetik KLN Elde Edilmesi**

##### **Çalı ması**

Yapılan ikinci deneyde 0.135 g kompritol ve 0.165 g esterquat hassas terazide tartılarak cam tüpe konulmu , DNA yüklemesine uygun olması hedeflenerek katyonikli i arttırmak için esterquat miktarı arttırılmı ve sistemin stabilitesi ve berraklı nda de i me gözlenmemi tir. Üzerine 0.58 g sürfaktan ko-sürfaktan karı ımı eklenmi tir. Karı ım 80°C'deki ısıtıcılı manyetik karı tırcıda 200 rpm'de karı maya bırakılmı tır. Daha sonra S/Y/S çoklu emülsiyonun dı su fazı

hazırlanmış tır. 71 g su 6,67 g T 80 ve 5.34 g Etanol tartılarak 80°C'deki ısıtıcı manyetik karıştırıcıda 200 rpm'de karıştırılabilir tır.

Kimyasal reaksiyon yöntemi ile molar oran 2:1 olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapılmıştır, 40 mL'de 50 mg FeCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O ve 81 mg FeCl<sub>3</sub> içerecek şekilde FeCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O ve FeCl<sub>3</sub> hassas terazide tartılarak azot gazı geçirilmiş ultra saf su ile 2 mL çözelti hazırlanmıştır. Deneyin bu basamağı, oksidasyonu önlemek için çok hızlı bir şekilde yapılmıştır. Çözeltiden 38µL otomatik pipetle çekilerek, 200 rpm'de karıştırılan 80°C'deki S/Y mikroemülsiyona eklenmiştir. Hemen arkasından da 3 µL 5N NH<sub>4</sub>OH eklenmiştir. S/Y mikroemülsiyon sistemi başarılı bir şekilde oluşturulmuş, berraklık gözlemlenmiştir. Hemen hızlı bir şekilde hareket edilerek iç S/Y mikroemülsiyon cam tüp düzeneğe yerleştirilip sıcak enjektörle çekilmiş 200 rpm'de karıştırılan 80°C'deki dış su fazına enjekte edilmiştir. Oluşturulan S/Y/S çoklu emülsiyon sisteminde berraklık gözlemlenmiştir. Oda sıcaklığında 200 rpm'de karıştırılarak oluşturulan sistem içinde oluşturulan KLN'lerin manyetik özellik kazandığını belirlemek için sistemden 3 mL alınarak titreimli örnek manyetometresi (VSM) ile ölçüm yapılmıştır.

## **II.2.2. Hazırlanan Manyetik DNA:KLN Kompleksleri ile Yapılan Çalışmalar**

### **Agaroz Jel Hazırlanması**

- Agaroz jel kasetine örnek sayısına uygun olan tarak seçilip kasete yerleştirilmiştir.

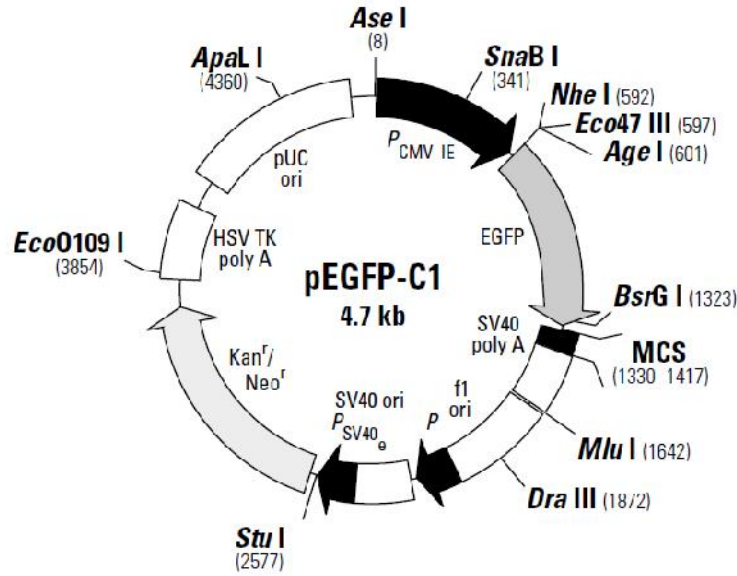
- % 1 (a/h)'lik jel hazırlamak için; 1 g agaroz tartılıp ve üzerine 100 mL 1xTE agaroz jel elektroforez tamponu eklenmiştir. Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

- Jel, kasete dökülerek 30-45 dak. süre ile katılaşması beklenmiştir.

- Jel katıla tıktan sonra taraklar çıkarılıp agaroz jeli içeren kaset, içerisinde 1xTE bulunan elektroforez tankına yerle tirilmi tir.

### DNA:KLN Kompleksinde Kullanılan pDNA

Çalı malarımızda ço altımı, karakterizasyonu ve izolasyonu önceden yapılmı , 0,1µg/ml konsantrasyonda pEGFP-C1 plazmiti kullanılmı tir. Kullanılan plazmit DNA (pDNA) 4700 bp büyüklü ündedir ve kanamisin direnç geni içermektedir. pEGFP-C1 memeli hücrelerinde yüksek ekspresyon ve parlak floresans için optimize edilmi , vah i tip GFP (1-3)'ün kırmızıya kayan varyantını kodlarma özelli i ta ır.



ekil II. 1. pEGFP-C1 gen haritası

#### II.2.2.1. Taze Hazırlanan DNA:mKLN Kompleks Olu umunun Ara tırılması

F<sub>17</sub> formülasyonu ile S/Y/S çoklu emülsiyon yöntemiyle manyetik KLN taze olarak hazırlanmı tir. 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20 (h/h) (DNA:KLN) oranlarında



epENDORF tüpüne konulmu , toplam hacim 21 µL olacak ekilde ultra saf su eklenmi tir. Oda sıcaklı ında yarım saat çalkalayıcı karı tırıcıda bekletilerek kompleksle tirilmi tir. Son olarak 4'er mikrolitre 6x boya konularak bir buçuk saat 120 voltta %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulumu tur. Elektroforez sonrası jel, 20 dk 0,5 µ/mL olacak ekilde 10 mg/ml konsantrasyondaki stok etidyum bromur çözültisi eklenen 1xTE'de bekletilmi tir. Daha sonra jel 10dk distile su ile yıkanmı tir. Jel, UV transillüminatör kullanılarak 260 nm'de görüntülenip DNA:mKLN kompleksle mesi incelenmi tir. DNA:mKLN kompleks karı ımlarını jele yüklemek için gerekli madde miktarları Tablo II.8.'de verilmi tir

**6x Yükleme Boyası çeri i:**

%0.03 bromofenol mavisi (BFM)

%0.03 Ksilen siyanol FF (XC)

%60 gliserol

%1 SDS

100 mM EDTA (pH: 7.6)

6x yükleme boyası gliserol içerd i için, DNA örneklerinin TE'den a ır olmasını ve DNA'nın kuyularda kalmasını sa lamı tur. Boya aynı zamanda içerd i brom fenol mavisi ve ksilen-siyanol nedeniyle elektroforezin ve DNA moleküllerinin jel üzerindeki hareketinin gözlenmesine yardımcı olmu tur.

**Tablo II. 8:** DNA:mKLN kompleksle tırme, agaroz jel içeri i.

			DNA	mKLN	ULTRA SAF SU	TOPLAM	6X BOYA	JELE YÜKLENEN
1	Moleküler a ırık standardı	4						4
2	P DNA		1		20	21	4	20
3	mKLN		0	10	11	21	4	20
4	DNA:mKLN	01:0,5	1	0,5	19,5	21	4	20
5	DNA:mKLN	01:01	1	1	19	21	4	20
6	DNA:mKLN	01:02	1	2	18	21	4	20
7	DNA:mKLN	01:03	1	3	17	21	4	20
8	DNA:mKLN	01:04	1	4	16	21	4	20
9	DNA:mKLN	01:05	1	5	15	21	4	20
10	DNA:mKLN	01:06	1	6	14	21	4	20
11	DNA:mKLN	01:07	1	7	13	21	4	20
12	DNA:mKLN	01:08	1	8	12	21	4	20
13	DNA:mKLN	01:09	1	9	11	21	4	20
14	DNA:mKLN	01:10	1	10	10	21	4	20
15	DNA:mKLN	01:11	1	11	9	21	4	20
16	DNA:mKLN	01:12	1	12	8	21	4	20
17	DNA:mKLN	01:13	1	13	7	21	4	20
18	DNA:mKLN	01:14	1	14	6	21	4	20
19	DNA:mKLN	01:15	1	15	5	21	4	20
20	DNA:mKLN	01:16	1	16	4	21	4	20
21	DNA:mKLN	01:17	1	17	3	21	4	20
22	DNA:mKLN	01:18	1	18	2	21	4	20
23	DNA:mKLN	01:19	1	19	1	21	4	20
24	DNA:mKLN	01:20	1	20	0	21	4	20

Jel elektroforezi sonucu, 1:15, 1:16, 1:17 (h/h) DNA:mKLN kompleksleri,partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümü için yeniden Tablo II.9.'da verilen miktarlarda eppendorf tüplerinde hazırlanmı tır.

**Tablo II. 9:** Agaroz jel elektroforezi sonucu seçilen örnek 19, 20, ve 21 no'lu kuyucuklardaki komplekslerin partikül büyüklü ü ve zeta potansiyel ölçümü hazırlanmasında kullanılan içerik miktarları

	DNA	mKLN	ULTRA SAF SU	TOPLAM HAC M
Ö:19	30 µL	450 µL	1020 µL	1500 µL
Ö:20	30 µL	480 µL	990 µL	1500 µL
Ö:21	30 µL	510 µL	960 µL	1500 µL

#### II.2.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Te vikli DNA Salım Çalı maları:

Bölüm II.2.2.1.'de belirtilen komplekle tırme çalı maları sonucu kompleks olu tu u belirlenen 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20

(h/h) (DNA:mKLN) oranlarında F<sub>17</sub> formülasyonu, eppendorf tüpüne konulmuş ve toplam hacim 21 µl olacak şekilde ultra saf su ilave edilmiştir. Karıştırmada yarım saat bırakılarak kompleksleştirilmiştir. Karıştırmadan alınan örneklerin toplam konsantrasyonda %1 olacak şekilde 4'er µl SDS, 5'er µl 6x boya konularak 23 µL hacimde %1'lik agaroz jele yüklenerek bir buçuk saat 120v/sa jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrası jel, 20 dk 0,5 µg/mL olacak şekilde 10 mg/ml konsantrasyondaki stok etidyum bromür çözeltisi eklenen 1xTE'de bekletilmiştir. Daha sonra jel 10dk distile su ile yıkanmıştır. Jel, UV transillüminatör kullanılarak 260 nm'de görüntülenip DNA:KLN salınım çalışması incelenmiştir.

**Tablo II. 10:** SDS salınım çalışması agaroz jel içeriği

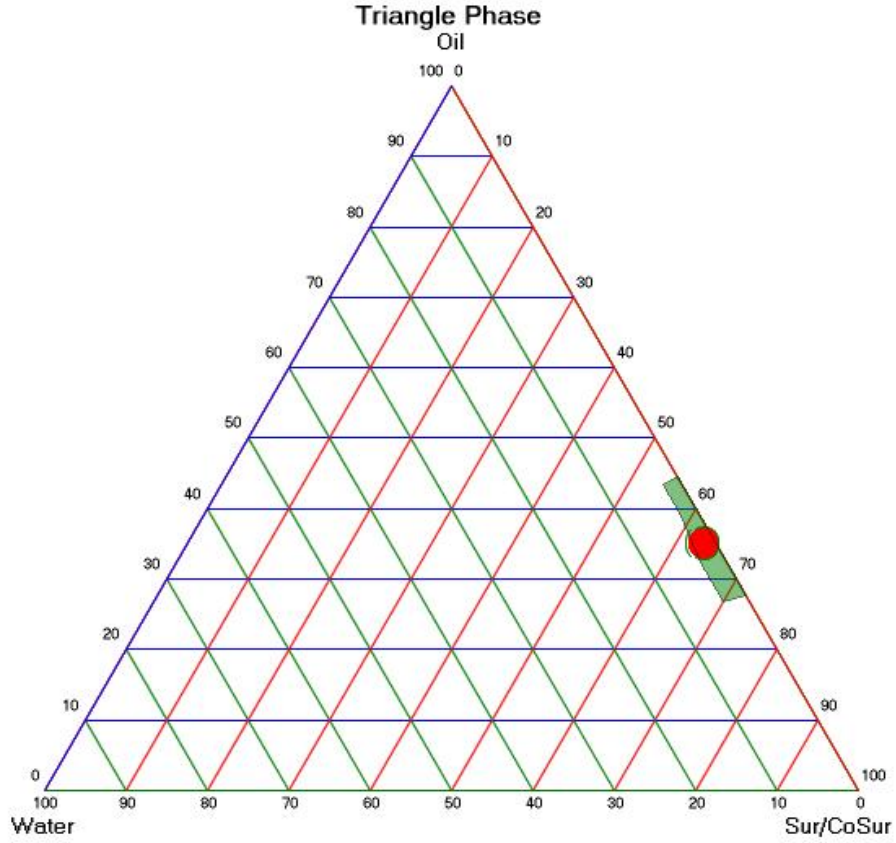
			DNA	mKLN	UP SU	ARA TOPLAM	%6,25 SDS	TOPL.	6X BOYA	JELE Yüklen
1	MWM	1			10	11	0	11	5	15
2	pDNA		1	0	24	25	0	25	5	23
3	mKLN		0	10	15	25	0	25	5	23
4	Pdna+sds		1	0	20	21	4	25	5	23
5	mKLN+SDS		0	10	11	21	4	25	5	23
6	DNA:mKLN	01:10	1	10	10	21	4	25	5	23
7	DNA:mKLN	01:11	1	11	9	21	4	25	5	23
8	DNA:mKLN	01:12	1	12	8	21	4	25	5	23
9	DNA:mKLN	01:13	1	13	7	21	4	25	5	23
10	DNA:mKLN	01:14	1	14	6	21	4	25	5	23
11	DNA:mKLN	01:15	1	15	5	21	4	25	5	23
12	DNA:mKLN	01:16	1	16	4	21	4	25	5	23
13	DNA:mKLN	01:17	1	17	3	21	4	25	5	23
14	DNA:mKLN	01:18	1	18	2	21	4	25	5	23
15	DNA:mKLN	01:19	1	19	1	21	4	25	5	23
16	DNA:mKLN	01:20	1	20	0	21	4	25	5	23

## BÖLÜM III-BULGULAR

### III.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

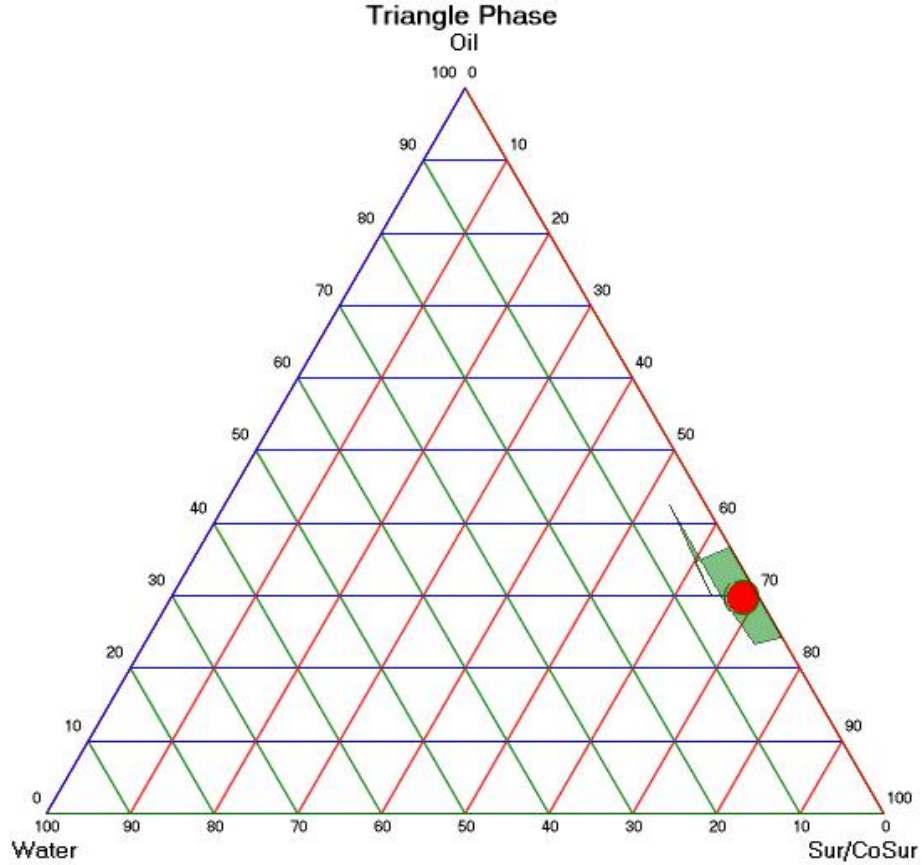
#### III.1.1. S/Y Mikroemülsiyon Hazırlanması

İlk formülasyon için bölüm II.2.1.1.1.1.'de belirtildiği gibi katı lipid olarak kompritol, surfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188, ko-surfaktan olarak Propanol 1 kullanılarak oluşturulan faz diyagramında, ekil III.1.'de gösterildiği gibi S/Y mikroemülsiyon oluşturma alanı gösterilmiştir. En stabil, en çok su içeren formülasyon olarak F<sub>3</sub> belirlenmiştir.



**ekil III. 1.** Katı lipid olarak kompritol, surfaktan olarak Span 85 ve Polaksamer 188, ko-surfaktan olarak Propanol 1 kullanılarak oluşturulan faz diyagramı, gri alanlar S/Y mikromeülsiyon alanlarını göstermektedir.

Bölüm II.2.1.1.2.'de formülasyonda sürfaktanlar de i tirilerek farklı bir formülasyon denenmi tir. Katı ya olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve T 80, ko-sürfaktan olarak ise Propanol 1 kullanılarak faz diyagramında, ekil III.2.'de gösterildi i gibi S/Y mikroemülsiyon olu um alanı gösterilmi tir. En stabil, en çok su içeren ve en berrak mikroemülsiyon içeren sistem olarak F<sub>6</sub> belirlenmi tir.

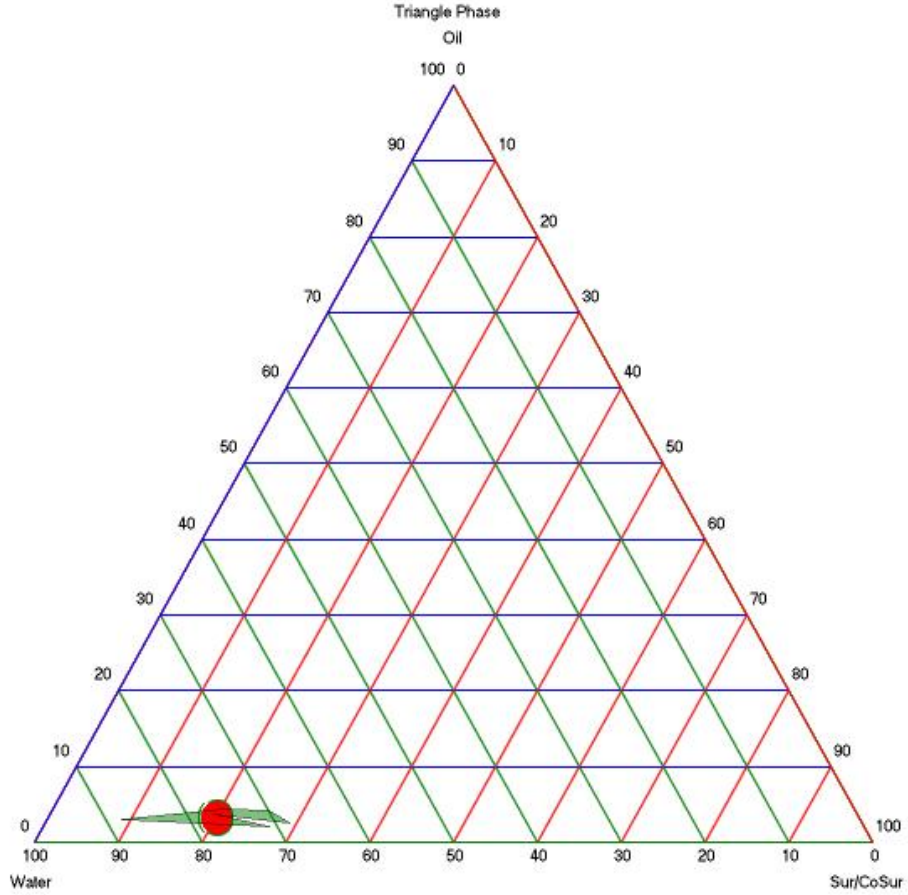


**ekil III. 2.** Katı lipid olarak kompritol, sürfaktan olarak Span 80 ve T 80, ko-sürfaktan olarak Propanol 1 kullanılarak olu turulan faz diyagramı, gri alanlar S/Y mikroemülsiyon alanlarını göstermektedir.

### III.1.2. Y/S Mikroemülsiyon Hazırlanması

Bölüm II.2.1.1.2.'de belirtildi i gibi katı lipid olarak kompritol, surfaktan olarak T 80, ko-sürfaktan olarak etanol kullanılarak olu turulan faz diyagramında,

ekil III.3.'de gösterildi i gibi Y/S mikroemülsiyon olu um alanı gösterilmi tir. En stabil, berrak dengede kalan formülasyon olarak  $F_{11}$  seçilmi tir.



**ekil III. 3.**Katı lipid olarak kompritol, sürfaktan olarak T 80, ko-sürfaktan olarak Etanol kullanılarak olu turulan faz diyagramı, gri alanlar Y/S mikroemülsiyon alanlarını göstermektedir.

### III.1.3. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Formülasyon Denenmesi

Bölüm II.2.1.1.3.'te S/Y/S çoklu emülsiyon denemelerinde  $F_3$  formülasyonu ile çalı ılmı tir.  $F_3$  oda sıcaklı ında, 40 mL %2'lik T 80 çözeltisi içinde katı parçacıklar

halinde kalmı tır. F<sub>3</sub> ile yapılan ikinci deneyde ise 40 mL %2'lik T 80 çözeltilisi içinde bulanıklık gözlenmi tir. stenen S/Y/S çoklu emülsiyona geçi te, ba arılı sonuç alınamadı ı için farklı bir formülasyon olu turma yoluna gidilmi tir.

Bölüm II.2.1.1.3.'te S/Y/S çoklu emülsiyon denemelerinde F<sub>6</sub> 80°C'de %2'lik 40 mL T 80 çözeltilisine hızla enjekte edildi inde berraklık gözlenmi tir. F<sub>6</sub> bu sebeple S/Y/S çoklu emülsiyon sisteme geçi için iç S/Y mikroemülsiyon olarak daha sonraki çalı malar için seçilmi tir.

### **III.2. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sistemde Elde Edilen KLN'lerin Karakterizasyonu**

Bölüm II.2.1.1.4'de S/Y/S çoklu emülsiyon sistem için optimum formülasyon olarak F<sub>17</sub> belirlenmi tir. F<sub>17</sub> formülasyonunun 24°C sıcaklıkta partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli de erleri Tablo III.1.'de verilmi tir.

**Tablo III. 1.** F<sub>17</sub> formülasyonunun partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri

Formülasyon	Sıcaklık	Partikül Büyüklü ü (nm)	PDI (S.D.)	Zeta Potansiyeli (mV)	Kondüktivite (µS)
F17	24°C	26,93	0,239	9,52	0,034

### **III.3. S/Y/S Çoklu Emülsiyon Sisteme Katyoniklik Kazandırılarak, Katyonik KLN Elde Edilmesi ve Seçilen Formülasyonun Karakterizasyonu**

Negatif yüklü DNA'nın KLN'lerle kompleks olu turmasını sa lamak için, formülasyona katyoniklik kazandırılması gerekmektedir. Bu amaçla Bölüm II.2.1.1.5.'de yapılan deneyler ile S/Y/S çoklu emülsiyona katyoniklik kazandırılmı tır. F<sub>17</sub> formülasyonuna eklenen Esterquat ile elde edilen katyonik

KLN'lerin 24°C'deki partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçüm de erleri Tablo III.2.'de verilmi tir.

**Tablo III. 2.** Katyonik F<sub>17</sub> formülasyonuna Esterquat ilevesiyle elde edilen KLN'lerin partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri

Formülasyon	Sıcaklık	Partikül Büyüklü ü (nm)	PDI (S.D.)	Zeta Potansiyeli (mV)	Kondüktivite (µS)
Katyonik F17	24°C	88,32	0,488	23,20	0,028

#### III.4. Katyonik KLN'lere Manyetik Özellik Kazandırılması

KLN'leri organizmada bölgesel olarak hedeflemek amacıyla manyetik özellik kazandırma çalı maları yapılmı tir. Manyetik özellik kazanan KLN'ler organizmaya verildikten sonra, dı arıdan vücudun belirli bölgesi manyetik alana maruz bırakıldı nda KLN'lerin manyetik alana yönelmeleri ve istenen gen tedavisini bu bölgede yapmaları hedeflenmi tir.

##### III.4.1. Dı Su Fazına Alkali lavesi ile Fazlar Arasındaki yon Geçi i Sa lanarak Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalı ması

Manyetik nanopartikül olu turmak amacıyla Bölüm II.2.1.1.6.1.'de yapılan deneyde dı faza sonradan alkali eklenerek elde edilen KLN'lerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli de erleri Tablo III.3.'de verilmi tir. Dı faza alkali eklenmesinin sisteme etkisini gözleyebilmek için ölçümler, NaOH ve NH<sub>4</sub>OH ile ayrı ayrı; 37°C ve 24°C'de pH 9 ve pH 7,35'de yapılmı tir.

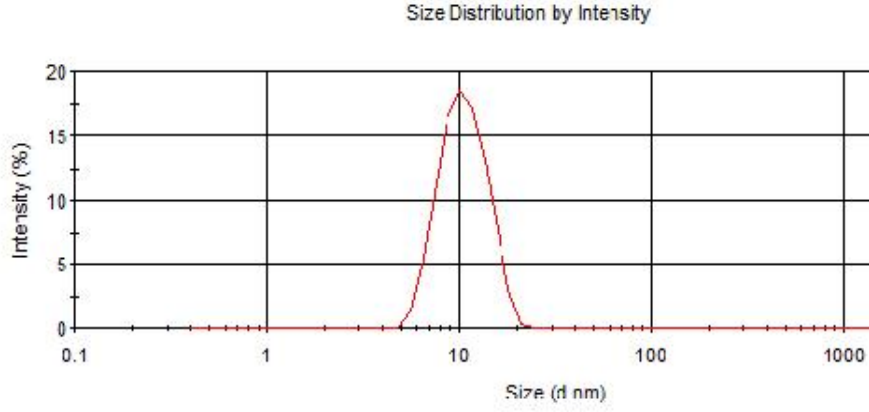


**Tablo III. 3.** D<sub>1</sub> su fazına alkali ilavesiyle hazırlanan farklı F<sub>17</sub> formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri

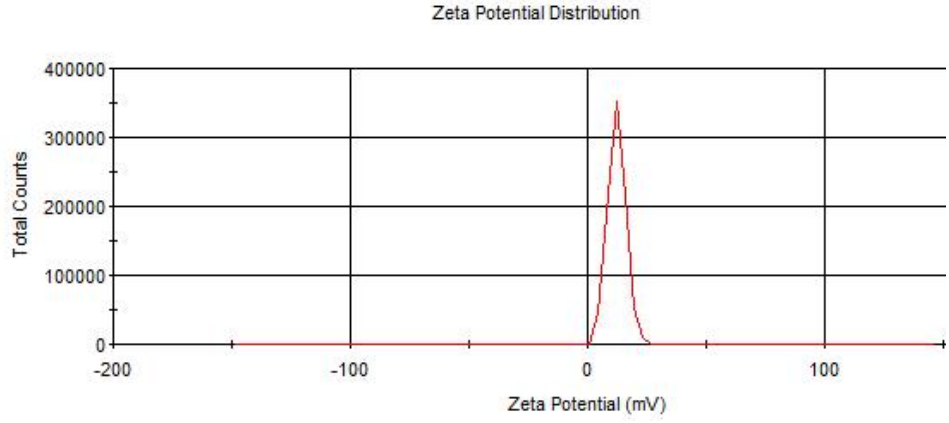
Formülasyon	pH	Sıcaklık	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI (S.D.)	Zeta Potansiyeli (mV)	Kondüktivite (µS)
Örnek1 NaOH	7,35	24°C	1057,66	1,000	1,31	0,048
Örnek 2 NH <sub>4</sub> OH	7,35	24°C	5057,33	0,549	3,98	0,051
Örnek 3 NaOH	7,35	37°C	3129,00	0,843	0,22	0,052
Örnek 4 NH <sub>4</sub> OH	7,35	37°C	2102,66	0,217	0,95	0,055
Örnek 5 NaOH	9	24°C	27,11	0,587	4,49	0,047
Örnek 8 HH <sub>4</sub> OH	9	24°C	214,00	0,934	4,94	0,043
Örnek 9 NaOH	9	37°C	25,48	0,427	-3,45	0,029
Örnek 10 HH <sub>4</sub> OH	9	37°C	154,70	0,243	-4,04	0,037

#### III.4.2. Ç Su Fazına Alkali İlavesi ile Manyetik KLN Elde Edilmesi Çalışması

Bölüm II.2.1.1.6.2.'de yapılan çalışma maddesi manyetik özelliğinin iç su fazında kimyasal reaksiyon gerçekleştirilerek kazandırılmasına çalışılmıştır. S/Y/S çoklu emülsiyon sisteminde mKLN'ler oluşturulmuştur. Manyetikli emülsiyonun belirlenmesi için VSM cihazında ölçüm yapılmıştır. Yapılan ölçüm sonuçları ekil III.6. , ekil III.7. , ekil III.8.'de verilmiştir. Tablo III.4.'te bulunan mKLN'lerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri görülmektedir. Ayrıca ekil III.4.'te mKLN formülasyonunun partikül büyüklüğü grafiği, ekil III.5.'te mKLN formülasyonunun zeta potansiyel ölçüm grafiği verilmiştir.



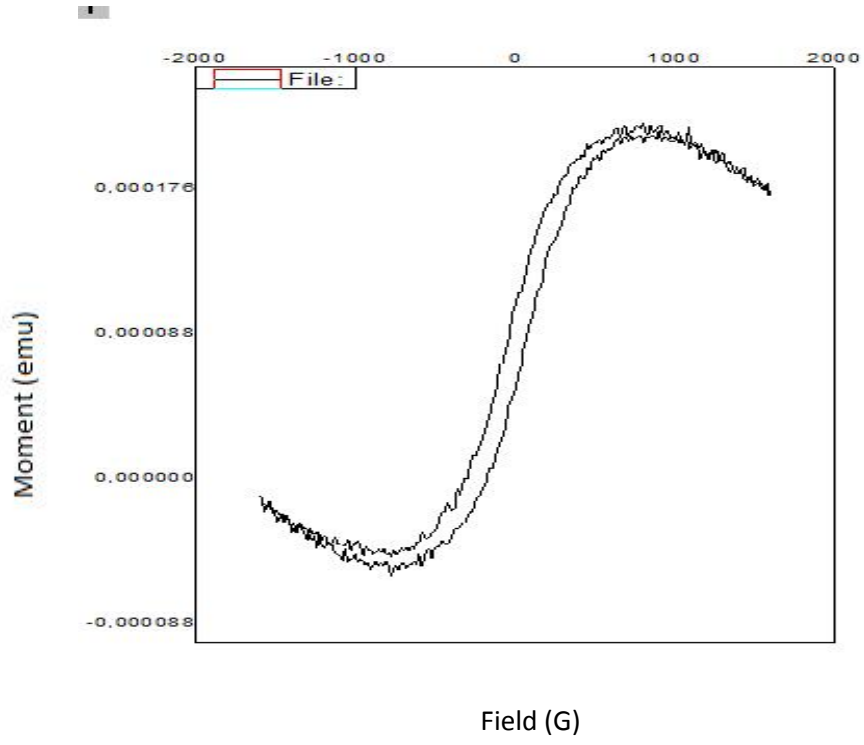
**ekil III. 4.** mKLN formülasyonunun partikül büyüklü ü grafi i



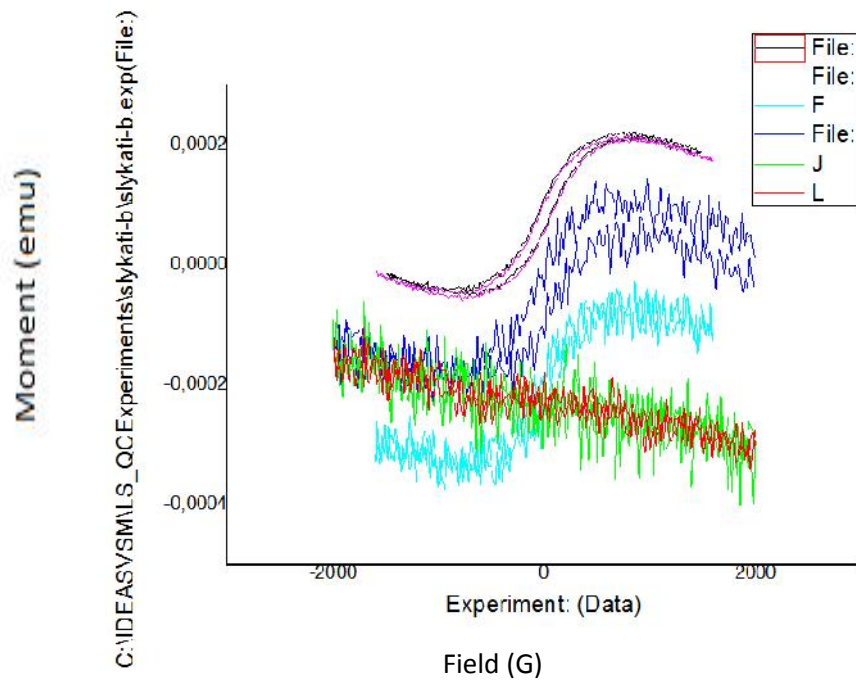
**ekil III. 5.** mKLN formülasyonunun zeta potansiyeli ölçüm grafi i

**Tablo III. 4.** Manyetik F<sub>17</sub> formülasyonunun partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri

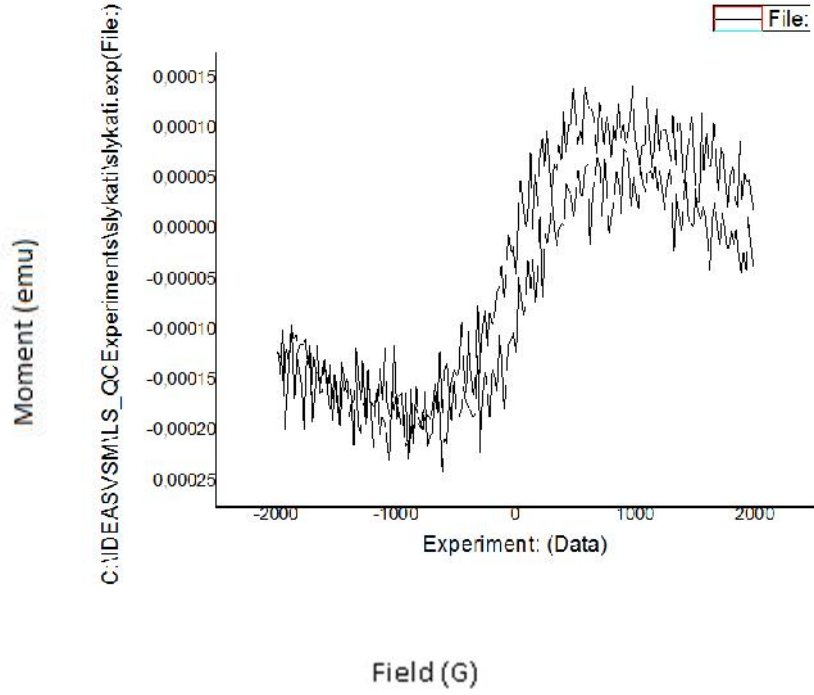
Formülasyon	Sıcaklık	Partikül Büyüklü ü (nm)	PDI (S.D.)	Zeta Potansiyeli (mV)	Kondüktivite (µS)
Manyetik F <sub>17</sub>	24°C	10,91	0,246	11,30	0,024



ekil III. 6. mKLN'lerin manyetik özelli i



ekil III. 7. mKLN'lerin manyetik özelli i



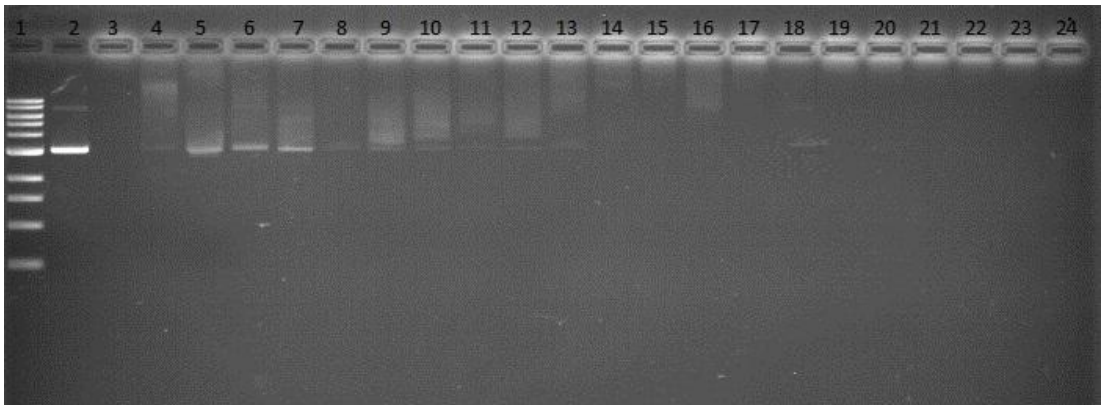
**ekil III. 8.** Manyetik alanda mKLN'lerin manyetik özelli i

### III.5. Manyetik KLN:DNA Komplekslerinin Hazırlanması

#### III.5.1. Taze Hazırlanan Manyetik KLN:DNA Komplekslerinin Agaroz

#### Jel Elektroforezi

Bölüm II.2.2.1.'de belirtildi i gibi hazırlanan DNA:mKLN komplekslerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri ekil III.9.'da verilmi tir. Tablo II.8.'de ise gerekli maddeler ve kullanım miktarları gösterilmi tir.



**ekil III. 9.** Manyetik DNA:KLN komplekslerinin agaroz jel elektroforezi foto rafı; Kuyucuklar:1.M.A.S, 2. pDNA, 3.KLN, 4'ten 24'e kadar olan jel

kuyucuklarında ise 4. Kuyucukta DNA:mKLN oranı 1:1(h/h) olmak üzere 1:20(h/h)'ye kadar DNA:mKLN kompleksleri çermektedir. Jel konsantrasyonu: %1(a/h); Uygulama gerilimi: 120V/saat

### III.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi Sonucu 1:15, 1:16, 1:17 (h/h)

#### DNA:mKLN Komplekslerinin Partikül Büyüklük ve Zeta Potansiyel Ölçümü

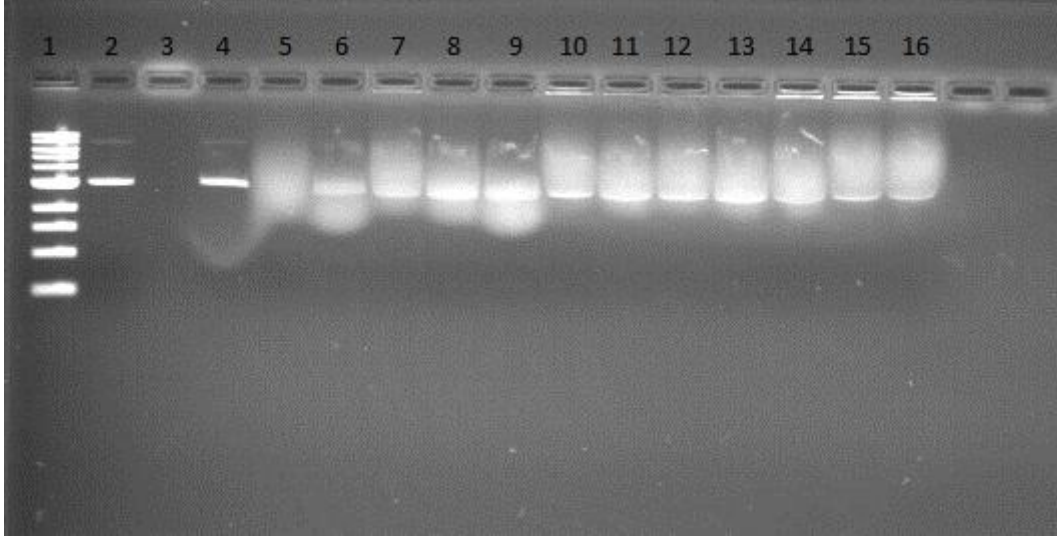
Agaroz jel elektroforezi sonucu 1:15, 1:16, 1:17 (h/h) DNA:mKLN kompleksleri ölçüm için uygun bulunmu tur. DNA:mKLN komplekslerinin ölçüme hazırlanması Tablo II.9.'da verilmi tir. Bu üç formülasyonun partikül büyüklü ü ve zeta potansiyel ölçümleri sonuçları Tablo III.5.'de verilmi tir.

**Tablo III. 5.** Örnek 19, 20 ve 21'in partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçümleri

Formülasyon	Sıcaklık	Partikül Büyüklü ü (nm)	PDI (S.D.)	Zeta Potansiyeli (mV)	Kondüktivite (µS)
Örnek 19	24°C	959,60	0,871	6,52	0,012
Örnek 20	24°C	528,70	0,937	6,56	0,013
Örnek 21	24°C	263,10	0,688	6,60	0,013

### III.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Te vikli DNA Salım Çalı maları

Bölüm II.2.2.2.'de DNA:mKLN kompleksle mesi iyi sonuç veren, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20 (h/h) (DNA:mKLN) oranları ile DNA:mKLN salım çalı maları yapılmı tur. Salım çalı masında jelle yüklenen maddeler ve miktarları tablo II.10'da verilmi tir. SDS salım çalı ması sonucu ekil III.10.'da gösterilmi tir.



**ekil III. 10.** 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20 (h/h) (DNA:mKLN) oranları ile hazırlanan manyetik DNA:mKLN komplekslerinden sabit SDS konsantrasyonunda DNA'nın salımını gösteren agaroz jel foto rafı Kuyucuklar: 1.M.A.S, 2.pDNA, 3.mKLN, 4.pDNA+SDS, 5.mKLN+SDS, 6'dan 15'ya kadar olan jel kuyucuklarında ise 6. kuyucukta DNA:mKLN oranı 1:10(h/h) olmak üzere 1:20(h/h)'ye kadar DNA:mKLN kompleksleri içermektedir. Jel konsantrasyonu: %1(a/h); Uygulama gerilimi: 120V/saat

## BÖLÜM IV-TARTI MA

Katı ya olarak kompritol kullanılarak S/Y mikroemülsiyon olu turmak için, sürfaktan olarak kullanılan Polaksamer 188 ve Span 85 ile yapılan ön denemelerde stabil ve berrak sistemler elde edilememi tir. Bu nedenle, farklı sürfaktanların denenmesi amacıyla, Span 80 ve T 80 kullanılmasına karar verilmi tir. Propanol 1 toksik olmaması sebebiyle ko-sürfaktan olarak seçilmi tir. Span 80 ve T 80 oranı 10:1 seçilerek, HLB de eri S/Y mikroemülsiyon sisteme uygun olarak 5'e ayarlanmı tır (40). Ön formülasyon denemelerinde berrak ve stabil sistemler elde edilerek, faz diyagramları çizilmi tir.

S/Y faz diyagramında çalı ılan formülasyonlardan F<sub>6</sub> berrak ve stabil olması, ayrıca di er formülasyonlardan daha fazla su içermesi nedeniyle daha sonraki çalı malar için seçilmi tir.

Span 85'in ön denemelerde elde edilen sonuçların yanı sıra, ayrıca molekül a ırlı ının da yüksek olması, elde edilecek KLN partikül boyutunu da büyütebilece i dü ünülerek, moleküler a ırlı ı daha küçük lipofilik sürfaktan Span 80 (428,16 g/mol) kullanılmasına karar verilmi tir (67).

Y/S mikroemülsiyon olu turmak için HLB de eri 15 olan T 80 sürfaktan olarak kullanılmı tır. Ko-sürfaktan olarak Etanol, toksik olmaması ve emülsiyon formülasyonlarında sıklıkla kullanılması nedeniyle seçilmi tir (27).

Tablo II.7.'de çalı ılan sistemlerden F<sub>11</sub> daha sonraki çalı malar için, en stabil Y/S mikroemülsiyon formülasyonu oldu u için seçilmi tir.

S/Y/S çoklu emülsiyon hazırlamak için, Y/S mikroemülsiyon formülasyonunun ya fazı yerine S/Y mikroemülsiyon formülasyonu F<sub>3</sub> gereken miktarda oda

sıcaklı ında eklendi i zaman büyük katı parçacıklar ekinde kaldı ndan, her iki sistemin 80°C’de karı tırlmasına karar verilmi tir. 80°C’deki S/Y/S sistemin oda sıcaklı ında manyetik karı tırcıda 200 rpm’de karı tırlmasıyla elde edilen KLN’lerin partikül büyüklü ü ve zeta potansiyelleri ölçülerek karakterizasyonu yapılmı tur. Tablo III.1’de görüldü ü gibi partikül büyüklü ü 26.93 nm ve zeta potansiyeli 9,52 mV bulunmu tur. Partikül büyüklü ünün DNA yüklenmesi için uygun oldu u görülmü tür (61). Fakat zeta potansiyeli DNA yüklendi i zaman daha da dü ece i için, katyonik madde ekleyerek zeta potansiyelinin yükseltilmesine karar verilmi tir. F<sub>17</sub> formülasyonuna zeta potansiyeli arttırmak amacıyla %1 oranında Esterquat eklenerek yeniden ölçüm yapılmı tur. Partikül büyüklü ü 88.32 nm, zeta potansiyeli ise 23,2 mV bulunmu tur. Zeta potansiyeli de erinin DNA yüklemesi için uygun oldu u dü ünülerek KLN’lere manyetik özellik kazandırma a masına geçilmi tir.

S/Y/S emülsiyon sistemin iç su fazına yüklenen demir bile ikleri ve dı su fazına ilave edilen alkali çözültisi ile hazırlanan çoklu emülsiyon sstemini, partikül büyüklü ü ve zeta potansiyeli ölçülmü tür. Tablo III.3.’de ölçüm sonuçları verilen pH 7,35’de alınan sonuçlara göre, partikül büyüklü ü DNA yüklemesine uygun olmayacak ekinde oldukça büyük çıkmı , aynı zamanda zeta potansiyeli de 0,22 ile 3,98 mV arasındaki de erlerde yani oldukça dü ük çıkmı tur. pH 9’da yapılan ölçümlerde, elde edilen partikül büyüklü ü de erleri DNA yüklemesine uygun çıkmı , fakat zeta potansiyel de erleri -4,04 ile 4,94 mV arasında amacımıza uygun bulunmamı , dü ük de erde çıkmı tur.

Bu nedenle, S/Y/S çoklu emülsiyonun dı fazına alkali ilavesi yönteminden vazgeçilerek, iç su fazına demir bile ikleri ile alkali ilavesine karar verilmi tir. Bu ekinde elde edilen mKLN F<sub>17</sub> formülasyonunun Tablo III.4.’de verilen partikül



büyükü ü ve zeta potansiyeli de erleri sırası ile 10,91 nm ve 11,30 mV bulunmu tur. Ölçülen partikül büyüü ü DNA yüklemesi için uygun olup, zeta potansiyelinin ise bir önceki yöntemle göre daha yüksek oldu u görülmü tür. ekil 3.6, 3.7, 3.8'de görüldü ü gibi F<sub>17</sub> formülasyonunun VSM ölçümlerinde manyetiklik özelli inin oldu u görülmektedir.

F<sub>17</sub> formülasyonuna pDNA yükleme çalı malarına geçilerek Tablo II.8.' de gösterilen oranlarda DNA:mKLN kompleksleri hazırlanmı tur. Kompleks olu umunun gerçekle ip gerçekle medi ini ara tırmak için, hazırlanan DNA:mKLN kompleksleri agaroz jel elektroforezine yüklenmi tir. ekil III.9.'da görüldü ü gibi 1:11 (15 nolu kuyucuktan itibaren yani 1:11 oranından 1:20 DNA:mKLN oranına kadar komplekslerin olu tu u görülmektedir. Burada olu an komplekslerden 19, 20 ve 21. kuyucuklardaki kompleksler (1:15, 1:16, 1:17, DNA:mKLN) daha sonraki çalı malar için eçilmi tir. Bunun nedeni DNA ile en fazla kompleks yapabilen, en az mKLN miktarı içeren kompleksler olmasıdır. eçilen 19, 20, 21. kuyucuklarındaki DNA:mKLN komplekslerinin partikül büyüü ü ve zeta potansiyeli de erleri Tablo III.5.'de gösterilmi tir. Tabloda görüldü ü gibi en küçük partikül boyutuna sahip olan 1:17 DNA:mKLN oranındaki örnek 21 transfeksiyon çalı maları için partikül boyutunun en küçük (42), zeta potansiyelinin 6,6 mV de erde olması nedeniyle uygun bulunmu tur.

Miga Olga ve ark. yaptı ı çalı mada DNA ve cRNA aktarılması amacıyla hazırlanmı DNA yüklü manyetik nanopartikül formülasyonlarıyla gen aktarımının ba arıldı ı bildirilmi tir. Manyetik nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri 201 nm ile 390 nm arasında olup, zeta potansiyelleri ise -10,5 ile +8,7 mV arasında de i mektedir. Bizim çalı mamızda da elde etti imiz mKLN:DNA

komplekslerinin partikül büyüklük ve zeta potansiyeli de erleri DNA aktarımı için uygundur (42).

Daha sonra DNA:mKLN komplekslerinin DNA'yı salım yete inin belirlenmesi için SDS te vikli DNA salım çalı maları yapılmı tır. ekil III.10.'da görüldü ü gibi 1:10 ile 1:20 arasında DNA:mKLN komplekslerinin hepsinin DNA'yı saldı ı görülmektedir. Agaroz jeldeki ı ımanın T 80'den kaynaklandı ı dü ünülmektedir; çünkü ekildeki sadece KLN ve SDS'nin uygulandı ı 5. kuyucukta aynı ı ıma görülmektedir. Ayrıca Hasan Akbaba'nın tezinde sadece T 80 ve SDS birlikte agaroz jele yüklendi inde hilal ekinde ı ımanın gözlendi i bildirilmi tir (1).

Sonuç olarak yapılan tüm çalı maların sonucunda elde edilen veriler do rultusunda DNA yüklenen mKLN'lerden 1:17 oranındaki DNA:mKLN kompleksinin gen artırımı için uygun oldu una karar verilmi tir.

## **BÖLÜM-V. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Yapılan formülasyon çalışmaları sonucunda DNA aktarımına uygun olarak 263,10 nm partikül boyutunda, 6,60 mV zeta potansiyeli de erinde manyetik katyonik KLN taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. DNA aktarımı için mKLN boyutunun küçük olmasının önemli olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (42). Daha sonraki çalışmalarda bu yöntemle elde edilen DNA:mKLN komplekslerinin boyutu daha küçültülerek ve zeta potansiyel değerleri artırılarak daha etkin transfeksiyon yeteneğine sahip olan mKLN'lerin hazırlanması önerilmektedir.

## ÖZET

### DNA TA İYİCİ SİSTEM GELİTİRME AMACIYLA MANYETİK NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARIN HAZIRLANMASI

**Tuba YILMAZ**

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

**Tez Yöneticileri: Doç. Dr. Gülten Kantarcı ve Yard. Doç. Dr. Devrim Demir**

**Dora**

**ubat, 2012., 95 sayfa**

Projede amacımız katyonik katı lipid nanopartikül formülasyonları geli tirerek bunlara manyetik özellik kazandırmak, daha sonra plazmid DNA yükleyerek gen aktarımı amacıyla bir ta ıyıcı sistem geli tirmektir.

Çalı mamızda ön formülasyon denemelerinde; katı lipid olarak kompritol, lipofilik sürfaktan olarak Span 80, hidrofilik sürfaktan olarak Tween 80 ve ko-sürfaktan olarak Propanol 1 kullanılarak S/Y mikroemülsiyon formülasyonu olu turulmu tur. Daha sonra Y/S mikroemülsiyon formülasyonu için yine katı lipid olarak kompritol kullanılmı , hidrofilik sürfaktan olarak Tween 80 ve ko-sürfaktan olarak etanol kullanılmı tur. Y/S mikroemülsiyonun ya fazı yerine 80°C’de S/Y mikroemülsiyon formülasyonu eklenerek S/Y/S çoklu emülsiyon sistem olu turulmu tur. Sistem oda sıcaklı ına so utularak katı lipid nanopartikül elde edilmı tir. Bu sisteme %1 oranında esterquat eklenerek 23,2 mV zeta potansiyel de erine sahip katyonik KLN elde edilmı tir.

Katyonik KLN'lere manyetik özellik kazandırmak için, iç su fazına  $Fe^{+2}$  ve  $Fe^{+3}$  bileşikleri ve alkali olarak 5M  $NH_4OH$  eklenmiştir. Netice olarak 10,91 nm partikül büyüklüğüne sahip ve zeta potansiyeli 11,30 mV olan manyetik KLN (mKLN) elde edilmiştir. mKLN'lerin manyetik özellikleri titretilmiş örnek manyetometresi (VSM) ölçümü ile doğrulanmıştır. Oluşturulan mKLN'ler ile DNA yükleme çalışmaları için çeşitli oranlarda DNA:mKLN kompleksleri hazırlanmıştır. Hazırlanan DNA:mKLN kompleksleri agaroz jele yüklenerek hangi oranlarda kompleksle menin gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Daha sonra kompleksle menin gerçekleştirildiği oranlarda SDS tevikli salınım çalışmaları yapılarak, komplekslerden DNA'nın salınımı incelenmiştir.

Sonuç olarak DNA aktarımı için; 263 nm partikül büyüklüğüne ve de 6,60 mV zeta potansiyeline sahip, DNA yüklü ve katyonik özellikli manyetik nanopartikül formülasyonu, amacına uygun olarak geliştirilmiştir.

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF MAGNETIC NANOPARTICLE FORMULATIONS TO DEVELOP A DNA CARRIER SYSTEM**

**Tuba YILMAZ**

**Post Graduate, Department of Pharmaceutical Biotechnology**

**Thesis Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Gülten Kantarcı and Assist. Prof.**

**Dr.Devrim Demir Dora**

**February, 2012., 95 page**

The aim of this project is to develop cationic solid nanoparticle formulations and give them magnetic properties therefore developing a DNA carrier system for gene transfer using plasmid DNA.

In pre-formulation studies of the research, W/O microemulsion formulation was formed using Compritol as solid lipid, Span 80 as lipophilic surfactant, Tween 80 as hydrophilic surfactant and Propanol 1 as co-surfactant. Afterwards, for O/W microemulsion formulation, Compritol was used as solid lipid, Tween 80 as hydrophilic surfactant, and ethanol as co-surfactant. Instead of oil phase of O/W microemulsion, W/O microemulsion formulation at 80°C was added and W/O/W multi emulsion system was formed. The system was cooled down to room temperature and solid lipid particles were obtained. 1% esterquat was added to this system yielding a cationic SLN with 23.20 mV zeta.

In order to give magnetic properties to cationic SLNs,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  compounds and 5 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  as alkali were used in internal water phase. As a result, magnetic SLNs (mSLNs) with 11.32 mV zeta potential and 10.91 nm particle size were obtained. Magnetic properties of mSLNs were confirmed via vibrating sample magnetometer measurements. Using the resultant mSLNs, DNA:mSLN complexes in varying ratios were produced for DNA loading system. DNA:mSLN complexes were loaded to agarose gel to determine the proportion of complexation. Then, DNA release from the complexes were examined through studies of SDS induced release in complexation ratios.

In conclusion, cationic, DNA loaded magnetic nanoparticle formulation with 263 nm particle size and 6.6 mV zeta potential was developed fitting for the purpose.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Akbaba Hasan. (2010). Gen Tedavisi Amacıyla DNA Yüklü Katı Lipid Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması, zmir, Ege Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi
2. Aruebo M, Fernandes-Pacheco R, Ibarra M.R., Santa Maria J. (2007). Magnetic Nanoparticles For Drug Delivery: Areview, 2: 22-32
3. Baltimore D. (1970). RNA-Dependent DNA Polymerase In Virions Of RNA Tumor Viruses, Nature, 226:1209-1211
4. Botstein D. (1984). Mapping The Human Genome: A New Basis For Diagnosis And Treatment, Address To Genetics And The Law: Third National Symposium, 3:2-4
5. Behr J. P. (1994). Gene Transfer With Synthetic Cationic Amphiphiles: Prospects For Gene Therapy, Bioconjugate Chemistry, 5:382–389.
6. By Alexis A. Rojas, UCSC Senior, Double Major In Biology And Philosophy. (2004). Somatic Cell Gene Therapy: A Leap In Technology And Reassessment Of Values
7. Can M.M. (2005). Manyetik Nanoparçacıkların Fiziksel Özelliklerinin Ara tırılması, Ankara, Hacettepe Üniversitesi, Fizik Müh. ABD., Yüksek Lisans Tezi



8. Canatella P.J. and Prausnitz M.R. (2001). Prediction And Optimization Of Gene Transfection And Drug Delivery By Electroporation Gene Therapy, 8:1464–1469
9. Casali M., Zambonelli C., Goldwasser J., Vu H.N., Yarmush M. L. (2008). Moloney Murine Leukemia Virus Decay Mediated By Retroviral Reverse Transcriptase Degradation Of Genomic RNA, Virology, 380:91-98
10. Cavalli R., Caputo O., Carlotti M. E., Trotta M., Scarnecchia C., Gasco M.R. (1997). Sterilization And Freeze Drying Of Drug-Free And Drug-Loaded Solid Lipid Nanoparticles, International Journal Of Pharmaceutics, 148:47-53
11. Crow J. F. (1992). Anecdotal, Historical And Critical Commentaries On Genetics, 131:761-768
12. Çelebi N., Emülsiyonlar (Bölüm 15), in Acartürk F., A abeyolu ., Çelebi N., De im T. Ve ark. (2006). Modern Farmasötik Teknoloji; TEB Eczacılık Akademisi Yayını No:1, Ankara
13. Çelebi N., laç Ta ıyıcı Partiküler Sistemler (Bölüm 4), in Acartürk F., A abeyolu ., Çelebi N., De im T. Ve ark. (2006). Modern Farmasötik Teknoloji; TEB Eczacılık Akademisi Yayını No:1, Ankara
14. Da deviren K. (2006). Radyoaktif areli Manyetik Partiküllerin Manyetik Alan le Yönlendirilmesi, zmir, DEU Nükleer Tıp ABD., Yüksek Lisans Tezi
15. Dean D.A. (1997). Import Of Plasmid DNA Into The Nucleus Is Sequence Specific, Experimental Cell Research, 230(2):293–302
16. Demir D. (1999). DNA Ta ıyıcı Sistemler le Gen Tedavisi Üzerine Çalışmalar, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD., Doktora tezi

17. Demirel M., Yazan Y. (2000). Katı Lipit Nanopartiküller (SLN), Journal Of Pharmaceutical Sciences, 25:167-179
18. Dewangan D., Suresh P. K. (2011). Nano Sized Emulsions As A Drug Carrier For Ocular Drug Delivery: A Review, JITPS 2:59-75
19. Duan D., Fisher K. J., Burda J. F., Engelhardt J. F. (1997). Structural And Functional Heterogeneity Of Integrated Recombinant AAV Genomes, Virus Research, 48:41-56
20. Engelhardt J. F., Ye X., Doranz B., Wilson J. M. (1994). Ablation Of E2A In Recombinant Adenoviruses Improves Transgene Persistence And Decreases Inflammatory Response In Mouse Liver, Proceedings Of The National Academy Of Science, 91:6196–6200
21. Gao H., Hui K. M. (2001) Synthesis Of A Novel Series Of Cationic Lipids That Can Act As Efficient Gene Delivery Vehicles Through Systematic Heterocyclic Substitution Of Cholesterol Derivatives, Gene Therapy, 8:855–863
22. Gürsoy A.Z., Lipozomlar (Bölüm 5). (2002). Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını No:1, İstanbul
23. Güven G. (2005). E Boyutlu, Katyonik, Fonksiyonel Grup Çeren, Çermeyen, Manyetik Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Nükleik Asit Uygulamaları, Doktora Tezi, Ankara
24. Horn N. ve ark. (1995). Cancer Gene Therapy Using Plasmid DNA: Purification Of DNA For Human Clinical Trials, Human Gene Therapy, 6:565–573
25. <http://www.genbilim.com//content/view/4317/32/>
26. Inder M., Verma and Nikunj S, (1997). Nature © Macmillan Publishers Ltd.

27. Joebran R.f., Jornell D.G., Paris N. (1993). Microemulsions Of Triglyceride And Non-ionic Surfactant-Efect Of Temparature And Aqueus Phase Composition, Colloits And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspect: 2-3: 153-160
28. Kameda S, Maruyama H, Niguçi N ve ark. (2004). Kidney- Targeted Naked DNA Transfer By Redrograde njection Into The Renal Vein In Nice, Bichemical And Biophysical Resarch Cominications, 390-395
29. Kars A. (2004). Gen Tedavisi, XIII. Tpong Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Kapadokya
30. Kazazian H. H., Phillips D. G., Dowling E. C., Boehm C.D. (1988). The Johns Hopkins University School Of Medicine 600 North Wove Street Baltimore, Maryland
31. Kerimi E. Gökay M.D., Ph.D. (2005). Moleküler Tıp Ve Gen Tedavisine Giri , Gökay-Biyotek Ltd. ti / Medikal Yayın Grubu
32. Kircheis R., Schuller S., Brunner S., Ogris M., Heider K. H., Zauner W., Wagner E. (1999). Polycation-Based DNA Complexes For Tumor-Targeted Gene Delivery in Vivo Journal of Gene Medicine, 1:111– 120
33. Lee H. C., Trinady F. (2003). Blood Evidence, Perseus Books Group, Cambridge USA
34. Le Roy W. (1984). Human Gene Therapy, Office Of Technology Assessment, Washington
35. Lim S-J., Kim C-K. (2002). Formulation Parameters Determining The Physicochemical Characteristics Of Solid Lipid Nanoparticles Loaded With All-Trans Retinoic Acid, International Journal Of Pharmaceutics, 243:135-146

36. Maniatis T., Hardison R.C., Lacy E., ve ark. (1978). The Isolation Of Structural Genes From Libraries Of Eucaryotic DNA Cell, 15:687-7
37. Martin M.E., Rice K. G. (2007). Peptide-Guided Gene Delivery, The AAPS J. 9:Article 3
38. Mehnert W., Mäder K. (2001). Solid Lipid Nanoparticles Production, Characterization And Applications, Advanced Drug Delivery Reviews, 47:165-196
39. Milewski E. (1984). The NIH Guidelines For Research Involving Recombinant DNA Molecules, Bethesda
40. Muller R.H., Mader K., Gohla S. (2000). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) For Controlled Drug Delivery A Review Of The State Of The Art, European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics, 50:161-177
41. Mulligan R.C. (1993). The Basic Science Of Gene Therapy, 5110:926-932
42. Mykhaylyk O, Vlaskou D, Tresilwised N. Ve ark. (2007). Magnetic Nanoparticle Formulations For DNA And Si RNA Delivery, 311: 275-281
43. Palmiter R. D., Norstedt G., Gelinis R. E ve ark. (1983). Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth Of Mice, Science, 222:809-814
44. Pan X., Guan J., Yoo J-W., Epstein A. J., Lee L. J., Lee R.J. (2008). International Journal Of Pharmaceutics, 358:263-270
45. Rojas A.A. (2004). Somatic Cell Gene Therapy: A Leap In Technology And Reassessment Of Values, UCSC Center For Biomolecular Science&Engineering, Page 1 of 4
46. Ross P. C., Hui S. W. (1999). Lipoplex Size Is A Major Determinant Of In Vitro Lipofection Efficiency, Gene Therapy 6(4):651-659

47. Sambrook J., Westphal J., Srivansan P. R., Dulbecco R. (1968). The Integrated State Of Viral DNA In SV40-Transformed Cells, Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 59:1288-93
48. Scheule R. K., St George J. A., Bagley R. G., Marshall J., Kaplan J. M., Akita G. Y., Wang K. X., Lee E.R., Harris D. J., Jiang C., Yew N. S., Smith A. E., Cheng S. H. (1997). Basis Of Pulmonary Toxicity Associated With Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer To The Mammalian Lung, Human Gene Therapy, 8(6):689–707
49. Scott F. G. (2010). Developmental Biology, Ninth Edition Chapter 2, 2.3
50. Smith G.L., Moss B. (1983). Infectious Poxvirus Vectors Have Capacity For At Least 25 000 Base Pairs Of Foreign DNA, Gene, 25:21– 28.
51. Stewart C., Taylor N. A., Green I. C., Docherty K., Bailey C. J. (1994). Insulin-Releasing Pituitary Cells As A Model For Somatic Cell Gene Therapy In Diabetes Mellitus, Journal Of Endocrinol, 142:339-43
52. Takekoshi K. J., Oh Y. H., Westerman K. W., London I. M., Leboulch P. (1995). Retroviral Transfer Of A Human 13-globin (-globinhybrid gene linked to 13 locus control region hypersensitive site 2 aimed at the gene therapy of sick lecel disease), Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 92:3014-3018
53. Talbot B. (1983). Testimony At A Hearing Before The Subcommittee On Investigations And Oversight Of The Committee On Science And Technology, Human GeneticEngineering, 170:540-545
54. Taniyama Y. ve ark. (2002). Development Of Safe And Efficient Novel Nonviral Gene Transfer Using Ultrasound: Enhancement Of Transfection

- Efficiency Of Naked Plasmid DNA In Skeletal Muscle, *Gene Therapy*, 9:372–380
55. Tartaj P., Morales M.P., Gonzalez-Carreno T., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C. J. (2005). Advances In Magnetic Nanoparticles For Biotechnology Applications, *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*, 290-291:28-34
56. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryde J., Smith P. (1985). A New Class Of Polymers Starburst-Dendritic Macromolecules, *Polymer Journal*, 17:117– 132.
57. Torsten O. Nielsen\* M. D. C. M. (1997). Human Germline Gene Therapy By MJM, Capital Health Region, Postgraduate Education Office,186–23-34, Trent St., Victoria, British Columbia, Canada, V8R 4Z3
58. Türk Nöro irürji Dergisi. (2006). Cilt: 16, Sayı: 1, 1
59. Türk Nöro irürji Dergisi. (2006). Cilt: 16, Sayı: 1, 12
60. Venkateswarlu V., Manjunath K. (2004). Preparation, Characterization And In Vitro Release Kinetics Of Clozapine Solid Lipid Nanoparticles, *Journal Of Controlled Release*, 95:627-638
61. Vidal-Vidal J., Rivas J., Lopez Quintela M.A. (2006). Synthesis Of Monodisperse Maghemite Nanoparticles By The Microemulsion Method, *Colloids And Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 288:44-51
62. Wade N. (1984). *Biotechnology And Its Public, Technology In Society*, 6:17-21.
63. Walter P. (1999). *The Transport Of Molecules Into And Out Of The Nucleus, Molecular Biology Of The Cell*, Garland Publishing, New York, 561–568

64. Walters L., Palmer J. G. (1997). The Ethics Of Human Gene Therapy, Medison Avenue, NewYork, page 66-99
65. Walsh G. (2000). Nucleic Acid And Cell-Based Therapotics (Chapter 14) in Farmaceutical Biotechnology: Concepts an Applications, John Wiiley And Sons LTD, England
66. Wasungu L., Hoekstra D. (2006). Intracellular Delivery Of Genes (Chapter 2), Netherlands
67. [www.merckmillipore.com/italy/span-80-MDA\\_chem-840123](http://www.merckmillipore.com/italy/span-80-MDA_chem-840123)

## ÖZGEÇM

1987 yılında Afyonkarahisar'ın Duhut ilçesinde doğdum. İlk öğrenimimi, 1992-1997 yıllarında Duhut Fatih İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Orta öğrenimimi, 1997-2001 yıllarında Afyon Kocatepe Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2001-2004 yılları arasında lise öğrenimimi Afyon Süleyman Demirel Fen Lisesi'nde tamamladım. 2004 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimime başladım. 2008 yılında mezun olarak 2009 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde yüksek lisans eğitimime başladım. Ayrıca sahibi ve mesul müdürü olduğum Duhut Güne Eczanesi'nde halen çalışmaktayım.