



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **GEN TEDAVİSİ AMAÇLI NANOTAŞIYICI PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

**Hazal PEKASIL**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**ANKARA  
2025**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN TEDAVİSİ AMAÇLI NANOTAŞIYICI  
PLATFORMLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Hazal PEKASIL

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün  
TYL-2024-3608 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2025

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Gen Tedavisi Amaçlı Nanotaşıyıcı Platformların Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Hazal PEKASIL

Tarih: 20/10/2025

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında  
Hazal PEKASIL tarafından hazırlanan  
“Gen Tedavisi Amaçlı Nanotaşıyıcı Platformların Geliştirilmesi” adlı  
tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile  
kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/10/2025

İmza  
Prof. Dr. Asuman BOZKIR  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

İmza  
Prof. Dr. İmran VURAL  
Hacettepe Üniversitesi  
Üye

İmza  
Dr. Öğr. Üyesi Ogun Mehmet SAKA  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza  
Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# ÖZET

## Gen Tedavisi Amaçlı Nanotaşıyıcı Platformların Geliştirilmesi

Bu tez çalışmasının temel amacı, son yıllarda nanoteknolojinin biyoteknoloji alanındaki yenilikçi uygulamalarından biri olarak öne çıkan gen transferine yönelik, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir özellikte nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin sentezlenmesi ve karakterize edilmesidir. Çalışma kapsamında, bu sistemlerin yapısal özellikleri detaylı olarak aydınlatılacak ve gen aktarımındaki transfeksiyon verimlilikleri deneysel olarak değerlendirilecektir.

Gen terapisi, kalıtsal ya da sonradan edinilmiş hastalıkların tedavisinde, terapötik genlerin vektör adı verilen taşıyıcı sistemler aracılığıyla hedef hücrelere aktarılmasına ve bu genlerin hücre içinde ekspresyonunun sağlanmasına dayanmaktadır. Ancak gen transfer süreci, vektörlerin hücre içi hedeflerine ulaşmasında karşılaşılan çeşitli hücresel bariyerler nedeniyle karmaşık bir hal alır. Bu süreçte kullanılan vektörlerin, minimal toksisite ile maksimum transfeksiyon etkinliği göstermesi büyük önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, gen transferinde vektör seçimi kritik bir rol oynamaktadır. Gen aktarımı için temel olarak iki yaklaşım geliştirilmiştir: yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip viral vektörler ve viral vektörlerin potansiyel immünojenik ve toksik etkileri nedeniyle tercih edilen viral olmayan taşıyıcı sistemler. Bu tez çalışması kapsamında, gen aktarımı için model olarak plazmid DNA (e-GFP) yüklenmiş, lipid-polimer esaslı hibrit non-viral nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Lipid-polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP'ler), liposomlar ile polimerik nanopartiküllerin yapısal ve fonksiyonel avantajlarını bir araya getiren, çekirdek-kabuk mimarisine sahip yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu hibrit yapılar, iç kısımda kontrollü salım sağlayan polimerik bir çekirdek ile dış yüzeyde biyomembran benzeri geçirgenlik özellikleri sunan lipid bir tabakadan oluşmaktadır. LPHNP'lerin geliştirilme amacı, liposomların sınırlı stabilite, içerik sızıntısı ve kısa dolaşım süresi gibi dezavantajları ile polimerik nanopartiküllerin hücre membranı geçişindeki yetersizliklerini ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında gen taşıma amacıyla kullanılabilecek yeni bir LPHNP formülasyonu geliştirilmiş; plazmid DNA ile kompleks oluşturularak bu sistemlerin transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. Formülasyonun hazırlanmasında, PEG-PCL (polietilen glikol-polikaprolakton) ve DOTAP içeren bileşenler kullanılmış ve modifiye su/yağ/su emülsiyon-temelli çözücü buharlaştırma yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen nanopartiküller, yeşil floresan protein ekspresyon plazmidini taşıyacak şekilde yüklenmiş ve ardından sistemlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, partikül boyutu, boyut dağılımı (polidispersite indeksi), zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği analiz edilmiştir. Devamında, optimize edilen formülasyonlarla in vitro ilaç salım profilleri belirlenmiş ve uygun fizikokimyasal özellikler gösteren sistemler kullanılarak HEK-293 hücre hattı üzerinde transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri değerlendirildiğinde, partikül boyutunun 200 nm'nin altında, polidispersite indeksinin (PDI) 0,3'ün altında ve zeta potansiyel değerlerinin  $\pm 10-30$  mV aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, hazırlanan nanopartiküllerin gen taşıma uygulamaları için uygun bir boyutsal ve yüzey yük dağılımına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, plazmid DNA'nın nanopartikül yapısı içerisinde yüksek verimle enkapsüle edildiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında PEG-PCL ve DOTAP bileşenlerinden oluşan lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin, HEK-293 hücre hattında transfeksiyon etkinliği gösteren, toksik olmayan ve viral olmayan gen taşıyıcı sistemler olarak etkili bir performans sergilediği belirlenmiştir. Yürütülen in vitro karakterizasyon analizleri ve hücre kültürü temelli biyolojik değerlendirmeler, geliştirilen sistemin hedeflenen kriterleri başarıyla karşıladığını ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, bu hibrit nanopartikül sisteminin gen tedavisine yönelik mevcut nanotaşıyıcı alternatifleri arasında potansiyel bir aday olduğunu ve gelecekteki terapötik uygulamalar için umut vadeden bir platform sunduğunu göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Gen tedavisi, lipid-polimer hibrit nanopartikül, nanopartikül, p-EGFP.

# SUMMARY

## Development of Nanocarrier Platforms for Gene Therapy

The main objective of this thesis is to synthesise and characterise biocompatible and biodegradable nanoparticulate carrier systems for gene transfer, which has been one of the innovative applications of nanotechnology in biotechnology in recent years. Within the scope of the study, the structural properties of these systems will be elucidated in detail and their transfection efficiency in gene transfer will be experimentally evaluated.

Gene therapy, in the treatment of inherited or acquired diseases, is based on the transfer of therapeutic genes to target cells via DNA carrier systems called vectors and the expression of these genes within the cell. However, the gene transfer process is complicated by various cellular barriers encountered in the delivery of vectors to their intracellular targets. It is of great importance that the vectors used in this process show maximum transfection efficiency with minimal toxicity. Accordingly, vector selection plays a critical role in gene transfer. Basically, two approaches have been developed for gene transfer: viral vectors with high transfection efficiency and non-viral carrier systems, which are preferred due to the potential immunogenic and toxic effects of viral vectors. In this thesis, lipid-polymer based hybrid non-viral nanoparticulate systems loaded with plasmid DNA (eGFP) as a model for gene transfer were developed and characterised. Lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPHNPs) are innovative drug delivery systems with core-shell architecture that combine the structural and functional advantages of liposomes and polymeric nanoparticles. These hybrid structures consist of a polymeric core providing controlled release on the inside and a lipid layer offering biomembrane-like permeability properties on the outer surface. The aim of the development of LPHNPs is to overcome the disadvantages of liposomes such as limited stability, content leakage and short circulation time and the inadequacies of polymeric nanoparticles in cell membrane permeation. These hybrid systems are considered as an attractive alternative in drug delivery systems due to their high encapsulation efficiency and well-defined release profiles. While the polymer structure contributes to controlled and prolonged drug release, the lipid structure increases bioavailability by facilitating interaction with biological membranes and supports the orientation of the carrier to the target tissue. Therefore, in this thesis, a new LPHNP formulation that can be used for gene delivery was developed and the transfection efficiency of these systems was evaluated by complexing with plasmid DNA. In the preparation of the formulation, components containing PEG-PCL (polyethylene glycol-polycaprolactone) and DOTAP were used and modified water/oil/water emulsion-based solvent evaporation method was applied. The obtained nanoparticles were loaded to carry the green fluorescent protein expression plasmid and then the systems were characterised. In this context, particle size, size distribution (polydispersity index), zeta potential and encapsulation efficiency were analysed. Subsequently, in vitro drug release profiles were determined with the optimised formulations and transfection efficiency was evaluated on HEK293 cell line using systems with appropriate physicochemical properties. When the physicochemical properties of the NPs developed in this study were evaluated, it was found that the particle size was below 200 nm, the polydispersity index (PDI) was below 0.3 and the zeta potential values were in the range of  $\pm 10$ -30 mV. These results show that the prepared nanoparticles have a suitable dimensional and surface charge distribution for gene delivery applications. In addition, it was determined that plasmid DNA was encapsulated in the nanoparticle structure with high efficiency. In conclusion, in this thesis, lipid-polymer hybrid nanoparticles consisting of PEG-PCL and DOTAP components were determined to perform effectively as non-toxic and non-viral gene carrier systems with high transfection efficiency in HEK293 cell line. In vitro characterisation analyses and cell culture-based biological evaluations revealed that the developed system successfully met the targeted criteria. The data obtained show that this hybrid nanoparticle system is a potential candidate among the existing nanocarrier alternatives for gene therapy and offers a promising platform for future therapeutic applications.

**Keywords:** Gene therapy, lipid-polymer hybrid nanoparticle, nanoparticle, p-EGFP

# İÇİNDEKİLER

|               |      |
|---------------|------|
| Etik Beyan    | ii   |
| Kabul ve Onay | iii  |
| Özet          | iv   |
| Summary       | v    |
| İçindekiler   | vi   |
| Şekiller      | xi   |
| Çizelgeler    | xiii |

|                                                                                    |          |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                    | <b>1</b> |
| 1.1. Plazmid DNA (p-DNA)                                                           | 6        |
| 1.1.1. Yeşil Floresans Protein                                                     | 6        |
| 1.1.2. Nükleik Asitlerin ve Plazmidlerin Enkapülasyon Etkinliği ve PicoGreen Kiti  | 8        |
| 1.2. Gen Terapisi                                                                  | 9        |
| 1.2.1. Eşey Hücresi Gen Tedavisi                                                   | 10       |
| 1.2.2. Somatik Hücre Gen Tedavisi                                                  | 11       |
| 1.3. Gen Terapisi Tarihçesi                                                        | 11       |
| 1.4. Gen Aktarımında Kullanılan Vektörler                                          | 13       |
| 1.4.1. Viral Vektörler (Biyolojik Vektörler)                                       | 14       |
| 1.4.1.1. Retroviral Vektörler                                                      | 14       |
| 1.4.1.2. Lentiviral Vektörler                                                      | 15       |
| 1.4.1.3. Adenoviral Vektörler                                                      | 15       |
| 1.4.1.4. Adeno Bağlantılı Viral Vektörler                                          | 16       |
| 1.4.2. Non-viral Vektörler                                                         | 17       |
| 1.4.2.1. Fiziksel Yöntemler                                                        | 17       |
| 1.4.2.2. Kimyasal Sistemler                                                        | 28       |
| 1.5. Nanoboyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemler                                           | 28       |
| 1.5.1. Polimerik Nanopartiküller                                                   | 28       |
| 1.5.1.1. Polimerik Nanopartikül Üretim Yöntemleri                                  | 31       |
| 1.5.1.1.1. Solvent Evaporasyon Yöntemi                                             | 32       |
| 1.5.1.1.2. Emülsifikasyon/Solvent Difüzyonu Yöntemi                                | 33       |
| 1.5.1.1.3. Emülsifikasyon/ Tuz Etkisiyle Çözünürlük Azalması (Salting Out) Yöntemi | 34       |
| 1.5.1.1.4. Nanopresipitasyon (Çözücü Yer Değiştirme) Yöntemi                       | 35       |
| 1.5.1.1.5. İyonik Jelleşme Yöntemi                                                 | 37       |
| 1.5.2. Lipozomlar                                                                  | 37       |
| 1.5.2.1. Lipozomların Yapısı                                                       | 38       |
| 1.5.2.2. Lipozomların Sınıflandırılması                                            | 39       |
| 1.5.2.3. Lipozomların Üretim Yöntemleri                                            | 40       |
| 1.5.2.3.1. İnce Film Hidratasyon Yöntemi                                           | 41       |
| 1.5.2.3.2. Sonikasyon Yöntemi                                                      | 41       |
| 1.5.2.3.3. Ekstrüzyon Yöntemi                                                      | 41       |
| 1.5.2.3.4. Mikroemülsifikasyon Yöntemi                                             | 42       |
| 1.5.2.3.5. Dondurma-Eritme Yöntemi                                                 | 42       |
| 1.5.2.3.6. Eter Enjeksiyon Yöntemi                                                 | 42       |
| 1.5.2.3.7. Etanol Enjeksiyon Yöntemi                                               | 43       |
| 1.5.2.3.8. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi                                          | 43       |
| 1.5.2.3.9. Deterjan Uzaklaştırma Yöntemi                                           | 43       |
| 1.5.2.3.10. Mikroakışkan yöntemi                                                   | 44       |
| 1.5.3. Lipid- Polimer Hibrit Nanopartiküller                                       | 44       |

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.5.3.1. Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Sınıflandırılmaları                                 | 48  |
| 1.5.3.2. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri                                   | 51  |
| 1.5.3.3. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Kullanım Alanları                                   | 53  |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                           | 55  |
| 2.1. Gereçler                                                                                       | 55  |
| 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler                                                                 | 55  |
| 2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler                                                       | 55  |
| 2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar                                                            | 56  |
| 2.2. Yöntemler                                                                                      | 56  |
| 2.2.1. p-EGFP Plazmidinin PicoGreen dsDNA Kiti ile Kalibrasyonu                                     | 56  |
| 2.2.2. Lipid-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması                                          | 57  |
| 2.2.3. Lipid-Polimer Hibrit Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Önformülasyon Çalışmaları        | 58  |
| 2.2.4. p-EGFP ile Hazırlanan Nanopartiküller İçin Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları                | 61  |
| 2.3. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller                                                           | 63  |
| 2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması                                                 | 63  |
| 2.3.2. Hazırlanan Formülasyonlarda p-EGFP Plazmid Miktar Tayini                                     | 63  |
| 2.3.3. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini                                                               | 63  |
| 2.3.4. Zeta Potansiyel Ölçümü                                                                       | 64  |
| 2.3.5. İn-vitro Salım Çalışmaları                                                                   | 64  |
| 2.3.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Kısa Süreli Fiziksel Stabilitate Çalışmaları                 | 64  |
| 2.3.7. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi                  | 65  |
| 2.3.8. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi                                                  | 65  |
| 2.3.9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi                                                   | 65  |
| 2.3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları                                                                   | 66  |
| 2.3.10.1. Floresan Görüntüleme Çalışmaları                                                          | 66  |
| 2.3.10.2. Transfeksiyon Etkinliğinin Tayini                                                         | 67  |
| 2.3.10.3. Hücre Canlılığı Çalışmaları                                                               | 67  |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                  | 69  |
| 3.1. Nanopartikül Formülasyonunda Yapılan Kontroller                                                | 69  |
| 3.1.1. p-EGFP Plazmidinin Miktar Tayinleri İçin Kullanılan Yöntemlerin Kalibrasyonuna Ait Bulgular  | 69  |
| 3.1.2. Lipid-Polimer Hibrit Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Ön Formülasyon Çalışma Sonuçları | 70  |
| 3.1.3. p-EGFP Yüklü Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları Sonuçları     | 74  |
| 3.1.4. İn-vitro Etken Madde Salım Çalışmasına Ait Bulgular                                          | 79  |
| 3.1.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Kısa Süreli Fiziksel Stabilitate Çalışma Sonuçları           | 80  |
| 3.1.6. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları        | 83  |
| 3.1.7. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi Sonuçları                                        | 84  |
| 3.1.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları                                         | 85  |
| 3.1.9. Hücre Kültürü Çalışmaları                                                                    | 86  |
| 3.1.9.1. Floresan Görüntüleme Çalışmaları Sonuçları                                                 | 86  |
| 3.1.9.2. Transfeksiyon Etkinliği Tayini Sonuçları                                                   | 87  |
| 3.1.9.3. Hücre Canlılığı Çalışmaları Sonuçları                                                      | 89  |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                                  | 93  |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                         | 108 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                                    | 110 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                     | 123 |

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamız kapsamında, model plazmid olarak e-GFP plazmidini içeren polimer olarak PEG-PCL ve lipid olarak DOTAP kullanılarak hibrit nanopartiküller formülasyonlarının çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak üretilmesi planlanmış olup genetik hastalıklarda etkili olacak gen yapılarının korunarak vücuda verilmesi ve transfeksiyon etkinliğinin arttırılmasına yönelik yenilikçi formülasyon tasarımlarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Lipit-polimer hibrit nanopartiküller, yalnızca formülasyonun stabilitesini artırmakla kalmayıp aynı zamanda kontrollü salım özellikleri, yüksek biyoyumluluk ve biyoyararlanım gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, partikül boyutuna bağlı olarak pasif hedefleme imkânı da sunarak terapötik etkinliğini artırmaktadır. Bu tez çalışmasında geliştirilecek olan yenilikçi gen taşıyıcı formülasyonlar, non-viral vektör taşıyıcı sistemler alanında önemli bir ilerleme kaydedilmesini sağlayacaktır. Bu kapsam da hazırlanan yenilikçi formülasyonel yaklaşımlar birçok hastalık grubunda öncülük sağlayacak bir platform olarak karşımıza çıkacaktır.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, mesleğimiz hakkında her daim yeni ufuklar açarak mesleğimizi bana bir kez daha sevdiren, her daim beni destekleyerek bana yol gösteren, eğitim hayatımda yapmış olduğu dokunuşlarla dönüm noktası oluşturan, mesleğimize olan saygı ve sevgisinin yanı sıra çalışma azmine hayran olduğum çok değerli ve saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a sonsuz minet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı zamanında tamamlamama imkân veren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın sayın öğretim üyelerine,

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, her zorlukta yanımda olan, çözüm üreten Doç Dr. Umut Can ÖZ, Doç. Dr. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Dr. Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA ve Uzm. Ecz. Selin GÖKSEVER'e,

e-GFP plazmidini üretilip saflaştırarak benimle paylaşan Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a ve hücre kültürü çalışmalarındaki destekleri için Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya

Yüksek lisans eğitimim süresince TYL-2024-3608 nolu proje ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hayatımın her döneminde beni ben olduğum için koşulsuz seven, her zaman benden bir adım önde ilerleyip bana örnek olan, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa yanı başımda oluveren biricik ablam Ayşe Nur PEKASIL'a, hayatımın her döneminde beni ben olduğum için koşulsuz seven, bugünlere gelmemde en büyük destekçilerim olan, her daim yanımda olarak beni destekleyen, bana duydukları güvenle her daim beni cesaretlendiren, çocukları olmaktan her zaman gurur ve mutluluk duyduğum çok sevgili biricik babam Halil PEKASIL ve çok sevgili biricik annem Türkan PEKASIL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.



## SİMGELER ve KISALTMALAR

|         |                                                 |
|---------|-------------------------------------------------|
| AAV     | Adeno-Bağlantılı Viral                          |
| DLS     | Dinamik Işık Saçılımı                           |
| DMEM    | Dulbecco'nun Modifiye Besiyeri                  |
| DNA     | Deoksiriboz nükleik asit                        |
| DOTAP   | 1,2-dioleoyl-3-trimetilamonyum propan           |
| DSC     | Diferansiyel taramalı kalorimetre               |
| FDA     | Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu |
| GFP     | Yeşil floresan protein                          |
| GUV     | Dev tek tabakalı lipozomlar                     |
| kDa     | Kilodalton                                      |
| LPHNP   | Lipit-Polimer Hibrit Nanopartikül               |
| LUV     | Tek tabakalı lipozomlar                         |
| MA      | Molekül ağırlığı                                |
| m-RNA   | Mesajcı Ribonükleik Asit                        |
| MTT     | 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil          |
| MLV     | Çok tabakalı lipozomlar                         |
| NP      | Nanopartikül                                    |
| NMR     | Nükleer Manyetik Rezonans                       |
| PBS     | Fosfat-Salin Tamponu                            |
| PDI     | Polidispersite indeksi                          |
| p-DNA   | Plasmid DNA                                     |
| PEG     | Polietilen Glikol                               |
| PEG-PCL | Poli (etilen glikol)-blok-poli (ε-kaprolakton   |
| PVA     | Polivinilalkol                                  |
| RNA     | Ribonükleik asit                                |
| SEM     | Taramalı Elektron Mikroskobu                    |
| SS      | Standart sapma                                  |
| SUV     | Küçük tek tabakalı lipozomlar                   |
| TEM     | Geçirimli Elektron Mikroskobu                   |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Mikroenjeksiyon yöntemi                                                                                                                                                                                     | 19 |
| Şekil 1.2. İğne enjeksiyonu yöntemi                                                                                                                                                                                    | 20 |
| Şekil 1.3. Jet tabancası yöntemi                                                                                                                                                                                       | 21 |
| Şekil 1.4. Gen tabancası yöntemi                                                                                                                                                                                       | 22 |
| Şekil 1.5. Elektroporasyon yöntemi                                                                                                                                                                                     | 23 |
| Şekil 1.6. Nükleofeksiyon yöntemi                                                                                                                                                                                      | 24 |
| Şekil 1.7. Sonoporasyon yöntemi                                                                                                                                                                                        | 25 |
| Şekil 1.8. Hidrodinamik gen transfer yöntemi                                                                                                                                                                           | 26 |
| Şekil 1.9. Magnetofeksiyon yöntemi                                                                                                                                                                                     | 27 |
| Şekil 1.10. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin temel bileşenleri                                                                                                                                                   | 46 |
| Şekil 1.11. Polimer çekirdek-lipit kabuk hibrit nanopartikül yapısı                                                                                                                                                    | 48 |
| Şekil 1.12. Monolitik hibrit nanopartikül yapısı                                                                                                                                                                       | 48 |
| Şekil 1.13. Çekirdek-kabuk tipi içi boş hibrit nanopartikül yapısı                                                                                                                                                     | 49 |
| Şekil 1.14. Polimer kafesli lipozom hibrit nanopartikül yapısı                                                                                                                                                         | 49 |
| Şekil 1.15. Hücre membran-kamuflaj hibrit nanopartikül yapısı                                                                                                                                                          | 50 |
| Şekil 2.1. Nanopartiküllerin çift emülsiyon çözücü uzaklaştırma yöntemiyle hazırlanması                                                                                                                                | 58 |
| Şekil 2.2. Nanopartikül formülasyonlarının uygulandığı 48 kuyucuklu HEK-293 hücre kültür kabı                                                                                                                          | 66 |
| Şekil 3.1. p-EGFP plazmidinin TE buffer içerisindeki kalibrasyon grafiği                                                                                                                                               | 69 |
| Şekil 3.2. p-EGFP yüklü NP 28 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik                                                                                                                                  | 75 |
| Şekil 3.3. p-EGFP yüklü NP 28 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik                                                                                                                                             | 76 |
| Şekil 3.4. p-EGFP yüklü NP 29 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik                                                                                                                                  | 76 |
| Şekil 3.5. p-EGFP yüklü NP 29 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik                                                                                                                                             | 77 |
| Şekil 3.6. p-EGFP yüklü NP 30 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik                                                                                                                                  | 77 |
| Şekil 3.7. p-EGFP yüklü NP 30 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik                                                                                                                                             | 78 |
| Şekil 3.8. p-EGFP yüklü NP 31 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik                                                                                                                                  | 78 |
| Şekil 3.9. p-EGFP yüklü NP 31 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik                                                                                                                                             | 79 |
| Şekil 3.10. Plazmid DNA ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili                                                                                                                              | 79 |
| Şekil 3.11. +4 °C saklanan numunelere ait partikül boyutu sonuçlarının grafiksel gösterimi                                                                                                                             | 81 |
| Şekil 3.12. +4 °C saklanan numunelere ait zeta potansiyel sonuçlarının grafiksel gösterimi                                                                                                                             | 82 |
| Şekil 3.13. +4 °C saklanan numunelere ait % enkapsülasyon etkinliği sonuçlarının grafiksel gösterimi                                                                                                                   | 82 |
| Şekil 3.14. Lipid-polimer hibrit nanopartikül formülasyonu ve formülasyonda bulunan maddelere ait DSC termogramları. Yukarıdan aşağıya; PEG-PCL, boş nanopartikül, yüklü nanopartikül ve DOTAP'a ait DSC termogramları | 83 |

|                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.15.</b> Hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartiküllere ait TEM görüntüleri                                                                                                                                                                  | 84 |
| <b>Şekil 3.16.</b> Hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartiküllere ait SEM görüntüleri                                                                                                                                                                  | 85 |
| <b>Şekil 3.17.</b> Yukarıdan aşağıya e-GFP-C1 plazmidini içeren NP-29, NP-28, ve NP-31 formülasyonlarının HEK-293 hücrelerine transfeksiyonun 48. saatinden sonra ters floresan mikroskopisi kullanılarak gözlemlenen GFP-pozitif hücrelerin görüntüleri | 86 |
| <b>Şekil 3.18.</b> Flow sitometri analizi sonucu formülasyonlardan ve kontrol gruplarından alınan floresan sinyal pikleri ve değerleri                                                                                                                   | 87 |
| <b>Şekil 3.19.</b> 0,5 µg konsantrasyonda uygulanan 3 formülasyonun flow sitometri analizi transfeksiyon yüzdeleri                                                                                                                                       | 87 |
| <b>Şekil 3.20.</b> 1 µg uygulanan konsantrasyonda uygulanan 3 formülasyonun flow sitometri analizi transfeksiyon yüzdeleri                                                                                                                               | 88 |
| <b>Şekil 3.21.</b> 2 µg konsantrasyonda uygulanan 3 formülasyonun flow sitometri analizi transfeksiyon yüzdeleri                                                                                                                                         | 88 |
| <b>Şekil 3.22.</b> 3 formülasyonun flow sitometri analizi sonucu transfeksiyon yüzdelerinin grafiksel karşılaştırılması                                                                                                                                  | 89 |
| <b>Şekil 3.23.</b> 3 formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki flow sitometri analizi sonucu elde edilen ölü hücre yüzdelerinin grafiksel karşılaştırılması                                                                                              | 89 |
| <b>Şekil 3.24.</b> 3 formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki flow sitometri analizi sonucu elde edilen hücre canlılığı yüzdelerinin grafiksel karşılaştırılması                                                                                        | 91 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. Viral vektörlerin karşılaştırılması.                                                                             | 16 |
| Çizelge 1.2. Non-viral gen transferi için fiziksel yöntemlerin avantajları ve dezavantajları                                  | 18 |
| Çizelge 2.1. Lipid-polimer hibrit nanopartikül geliştirmek üzere yapılan önformülasyonlar                                     | 59 |
| Çizelge 2.2. p-EGFP ile hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartiküller için yapılan önformülasyonlar                         | 62 |
| Çizelge 3.1. p-EGFP plazmidinin kalibrasyon doğrusuna ait parametreler                                                        | 69 |
| Çizelge 3.2. Birinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi                                                                 | 70 |
| Çizelge 3.3. İkinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi                                                                  | 71 |
| Çizelge 3.4. Sonikasyon gücünün partiküllere etkisi                                                                           | 71 |
| Çizelge 3.5. Polimer miktarının partiküllere etkisi                                                                           | 72 |
| Çizelge 3.6. DNaz-free su miktarının partiküllere etkisi                                                                      | 72 |
| Çizelge 3.7. Dış faz hacminin partiküllere etkisi                                                                             | 73 |
| Çizelge 3.8. Dış faz konsantrasyonunun partiküllere etkisi                                                                    | 73 |
| Çizelge 3.9. İç faz hacminin partiküllere etkisi                                                                              | 74 |
| Çizelge 3.10. DOTAP miktarının partiküllere etkisi                                                                            | 75 |
| Çizelge 3.11. Yüklenen plazmid miktarının partiküllere etkisi                                                                 | 75 |
| Çizelge 3.12. Plazmid DNA yüklü nanopartikülün in vitro salım kinetikleri                                                     | 80 |
| Çizelge 3.13. +4 °C’de yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular                                                   | 81 |
| Çizelge 3.14. 3 formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki flow sitometri analizi sonucu elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri | 90 |

# 1. GİRİŞ

Gen tedavisi, son yıllarda kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının temel bileşenlerinden biri haline gelmiş olup, özellikle eczacılık ve ilgili disiplinlerde artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. Bu terapötik yaklaşım, gen ekspresyonunu modüle ederek hastalıkların tedavi edilmesini veya önlenmesini hedeflemektedir. Gen tedavisi sayesinde hastalığa yol açan genler düzenlenebilir, modifiye edilebilir veya işlevleri değiştirilebilir hale gelmektedir (Mintzer ve Simanek, 2009). Etkili bir gen tedavisinin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle biyouyumlu ve non-toksik özelliklere sahip bir gen taşıyıcı sistemin geliştirilmesi gerekmektedir. Nükleik asitlerin hücre içine etkin şekilde taşınmasındaki en büyük sorun nükleazlara karşı düşük stabilite göstermeleridir (Mehier-Humbert vd., 2005). Bu sorunu aşmak için viral ve viral olmayan (biyolojik olmayan) taşıyıcı platformlar karşımıza çıkmaktadır. Viral vektörler transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olması nedeniyle avantaj sağlasa da güçlü immün yanıt oluşturmaları ve büyük ölçekli üretimlerinin zorluğu nedeniyle klinik uygulamalarda çeşitli kısıtlamalara sahiptir. Buna karşılık, non-viral gen taşıyıcı sistemler daha güvenli bir alternatif sunmaktadır. Düşük toksisite, bağışıklık yanıtı oluşturmamaları, kolay modifiye edilebilir olmaları, büyük ölçekli üretime uygunlukları, maliyet avantajları ve hedeflenebilirlik gibi özellikleri, non-viral sistemleri gen tedavisi alanında daha cazip hale getirmektedir (Walther vd., 2000).

Gen tedavisinde optimal bir vektörün belirli niteliklere sahip olması gerekir. Öncelikli olarak bu vektör DNA veya RNA fragmanlarını etkin bir şekilde transfer edebilecek yeterli yük kapasitesine sahip olmalıdır. Yüksek konsantrasyonlara kolayca ulaşabilmesi, hedefe yönelik tedavinin başarısını artıran kritik bir parametredir. Ayrıca istenmeyen etkilere yol açmadan ilgili tedavi edici genlerin hedef bölgelere güvenle ulaşmasını sağlamalıdır. Stabil olması, genetik materyalin bozulmadan taşınmasını garantilerken, immün yanıt oluşturmaması da güvenli bir tedavi için kritik bir gerekliliktir. Ayrıca, toksisite göstermemesi biyouyumluluğunu artırırken, yüksek etkinlik sergilemesi ise tedavinin başarısını belirleyen en kritik faktörlerden biridir. Son olarak, uzun süreli gen ekspresyonu sağlayabilme yetisi, gen tedavisinin kalıcılığını ve terapötik etkinliğini artıran temel özelliklerden biri olarak değerlendirilmektedir (Nayerossadat vd., 2012). Ne yazık ki ideal bir non-viral vektör henüz geliştirilmiş değildir. Fakat birçok araştırmacı tarafından nanoteknoloji teknikleri kullanılarak çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir.

Nanoteknoloji, küçük moleküllü ilaçlar, genler, RNA'lar, peptitler ve tanısal görüntüleme ajanları gibi çeşitli terapötik bileşiklerin taşınmasını önemli ölçüde etkileyebilen yenilikçi bir teknoloji platformudur. Bu teknoloji, sistemik koşullar altında bazı ilaçların terapötik indeksini ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirme potansiyeline sahiptir (De Jong ve Borm, 2008). Genel olarak, bu terapötik ajanlar nanotaşıyıcılar içine kapsüllenerek veya yüzeylerine kovalent bağlanarak stabilize edilir. Nanopartiküllerin terapötik yük taşıma kapasitesi, ortalama boyutları, homojenlikleri, yüzey potansiyelleri ve etken madde yükleme kapasiteleri gibi temel parametrelere dayanır. Yüzeyi kaplanmış ve immün sistemi tetiklemeyen NP'ler, retiküloendotelial sistemin etkisini azaltarak enkapsüle edilmiş etken maddelerin biyoyararlanımını artırabilir ve terapötik etkinliğini maksimize edebilir (Masareddy vd., 2011).

Nanotaşıyıcılar, ilaç taşıma sistemlerinde birçok avantaj sunmaktadır. Öncelikle, ilaç molekülünün yapısını değiştirmeden farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini optimize edebilirler. Bunun yanı sıra, doku, hücre ve moleküler düzeyde hedefleme kapasitesini artırarak ilaçların spesifik bölgelerde daha etkin çalışmasını sağlayabilirler. Nanotaşıyıcılar ayrıca, çeşitli biyolojik engelleri aşma yeteneğine sahip olup, terapötik ajanların istenilen sitozol veya nükleus gibi hücresel bölgelere yönlendirilmesine olanak tanır ve böylece ilaç etkinliğini artırırken yan etki riskini azaltır (De Jong ve Borm, 2008). Ayrıca, farklı kimyasal özelliklere sahip birden fazla ilacın eş zamanlı olarak hedef bölgeye yönlendirilmesine olanak tanıyarak, kombine tedavi stratejilerinin etkinliğini artırmada önemli bir rol oynamaktadırlar (Masareddy vd., 2011).

İlaçların modifiye edilmiş ve hedeflenmiş dağıtımı, kontrollü ilaç salımı, bölgeye özgü etki ve hasta uyumunu artırma potansiyeli nedeniyle günümüzde yoğun araştırmalara konu olmaktadır. Hedefe yönelik ve kontrollü ilaç salım sistemlerinin tasarımında polimerler, temel yapı taşları arasında yer almaktadır. Özellikle polimerik nanopartiküller, ilaç taşıma sistemleri alanında en yoğun araştırılan konulardan biri haline gelmiştir. Bu sistemlerin başlıca avantajları arasında boyut kontrolünün sağlanabilmesi, dolaşım süresinin uzatılması, terapötik etkinliğin artırılması ve advers etkilerin minimize edilmesi yer almaktadır. Polimer bazlı nanopartiküller; dendrimerler, ligand bazlı nanopartiküller, polimerik miseller ve PEG ile modifiye edilmiş nanopartiküller gibi çeşitli yapısal formlarda bulunabilir. Ayrıca, polimerik nanopartiküller ilaç, protein veya DNA gibi biyolojik materyalleri belirli bir organa yönlendirerek hedefe yönelik tedavi imkânı sunmaktadır (Ganta vd., 2008; Lim vd., 2012).

Lipid-polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP'ler), liposomlar ve polimerik nanopartiküllerden türetilen, çekirdek-kabuk yapısına sahip yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Bu yapıda, polimerik bir çekirdek, dış yüzeyinde bir lipid tabakası ile kaplanmıştır (Nakmode vd., 2022). Lipozomlar ve polimerik nanopartiküler sistemlerin avantajlarını bir araya getiren bu hibrit taşıyıcılar, her iki sistemin sahip olduğu kısıtlamaları aşmak amacıyla geliştirilmiştir. Lipozomlar ve polimerik nanopartiküller, klinik başarılarıyla dikkat çekse de yapısal bozulma, sınırlı dolaşım süresi ve içerik sızıntısı gibi dezavantajlara sahiptir. Bu sorunların üstesinden gelmek için LPHNP'ler tasarlanmış ve ilaç taşıma sistemlerinde önemli bir yenilik haline gelmiştir (Bansal vd., 2022).

Bu hibrit yapıda polimer, kontrollü ilaç salımını sağlarken, lipid tabakası ise ilacın biyomembranlardan geçişini kolaylaştırır ve yüklenme kapasitesini artırır. LPHNP'ler, yüksek enkapsülasyon verimi, iyi tanımlanmış salınım kinetiği, güçlü serum stabilitesi ve hedefe yönelik ilaç taşıma gibi avantajlar sunarak ilaç iletiminde umut vadeden bir platform oluşturmaktadır. Lipid ve polimerik çekirdek, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri aracılığıyla bir araya gelerek yüksek stabiliteye sahip bir yapı meydana getirmektedirler (Zhang ve Zhang, 2010). LPHNP ilaç taşıyıcı sistemleri, özellikle kanser tedavisi, aşı adjuvanları, nükleik asit taşınması, aktif hedefleme stratejileri, genetik hastalıkların tedavisi ve teşhis amaçlı görüntüleme gibi birçok alanda araştırılmaktadır (Oh ve Park, 2009).

Polimerik çekirdek, taşıyıcı sistemin yapısal bütünlüğünü sağlayarak mekanik stabiliteye katkıda bulunur. Aynı zamanda, etkin maddenin kontrollü salımını optimize ederken, bu maddeyi metabolik degradasyona karşı koruyarak biyoyararlanımını artırır. Ayrıca, partikül büyüklüğünün belirlenen sınırlar içinde kalmasını sağlayarak homojen bir dağılım elde edilmesine yardımcı olur. Polimerik çekirdek yapısının oluşturulmasında, biyoparçalanabilir, biyouyumlu ve toksik olmayan polimerler tercih edilmektedir. Bu kapsamda, PLGA, PCL, dekstran ve albümin gibi polimerler, taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Sistemin yüzeyinde yer alan lipid tabaka, hücre membranından geçişi kolaylaştırarak biyoyumluluğu artırmakta ve böylece taşıyıcının terapötik etkinliğine katkı sağlamaktadır. Lipid tabakanın oluşturulmasında nötral, anyonik veya katyonik fosfolipitler kullanılabilmekte olup, lesitin, dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), dipalmitoil trimetilamonyum propan (DPTAP), dioleil trimetilamonyum propan (DOTAP) ve dioleil fosfoetanolamin (DOPE) bu amaçla sıkça kullanılan lipidler arasında yer almaktadır (Bose vd., 2016). Ayrıca, lipid tabaka, etkin maddenin polimerik matristen

sızmasını engelleyerek, sistemin ilaç yükleme kapasitesini artırıcı bir rol üstlenmektedir. Taşıyıcı sistemin en dış katmanı olan hidrofilik polimerik kabuk ise, retiküloendotelial sistem tarafından tanınmasını engelleyerek fagositozdan korunmasını sağlar ve böylece nanopartiküllerin dolaşım sistemi içerisinde daha uzun süre kalma imkânına sahip olur. Bu amaçla, farklı lipit-PEG türevleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ile bunların kopolimerleri (örneğin PLGA) ve fiziksel karışımları, kontrollü salım sistemleri ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu polimerler, biyobozunabilirlikleri ve hücresel düzeyde gösterdikleri yüksek biyouyumluluklarının yanı sıra, etkin madde geçirgenliğini kolaylaştırmaları nedeniyle taşıyıcı sistemlerde dikkat çeken materyaller arasında yer almaktadır. İnsanlarda kullanım için FDA onayı almış polimerlerden biri olan PEG-b-PCL (polietilen glikol-blok-poli( $\epsilon$ -kaprolakton)), bu tez çalışmasında biyomateryal olarak tercih edilmiştir. PEG-b-PCL polimeri, biyomedikal uygulamalar ve farmasötik teknolojilerde geniş kullanım alanına sahiptir (Zhang vd., 2008).

Bununla birlikte, PCL'nin hidrofobik yapısı ve yüksek kristallik derecesi, biyobozunma hızını sınırlayarak bazı farmasötik uygulamalarda istenen terapötik etkiyi elde etmeyi güçleştirmektedir. Özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanıldığında, PCL nanopartiküllerinin protein adsorpsiyonuna eğilimli olması, hedefe yönelik ilaç taşıma ve kontrollü ilaç salınımında beklenen performansı sağlamasını engellemektedir. Bu özellikleri nedeniyle, PCL'nin bazı uygulama alanlarında kullanımı kısıtlanmakta ve modifikasyon gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak ve farmasötik teknolojilerdeki uygulanabilirliğini artırmak amacıyla, PCL'nin biyolojik uyumluluğunu iyileştirmek, antijenik ve immünojenik etkilerini ortadan kaldırmak, toksisiteyi minimize etmek ve hidrofilik özellik kazandırmak için polietilen glikol (PEG) ile kopolimerleştirilmesi tercih edilmiştir (Li vd., 2015). Bu sayede, PEG-b-PCL kopolimeri daha verimli ve fonksiyonel bir biyomalzeme olarak kullanılabilir hale gelmiştir.

Katyonik lipid 1,2-dioleoyl-3-trimetilamonyum propan (DOTAP), oligonükleotidlerin gen terapisinde liposomal transfeksiyonu için kullanılan orijinal sentetik katyonik lipidlerden biridir. DOTAP'ın ana yapısal elementi hem nükleik asitlerle hem de hedef hücre zarlarıyla etkileşimlerden sorumlu olan kuaterner amonyum baş grubudur (Zuhorn vd., 2002). DOTAP ve kuaterner amonyum baş grupları gen transfeksiyon etkinliği için oldukça önemlidir.

DOTAP gen transfeksiyonu açısından en iyi adaylardan biridir ve en yaygın kullanılan katyonik lipittir.

LPHNP sistemleri, sundukları çeşitli avantajlar sayesinde kritik öneme sahip taşıyıcı sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu avantajlar şu şekilde özetlenebilir:

- İlaç yükleme kapasitesinin yüksek olması,
- Raf ömrünü uzatarak dolaşım sisteminde daha stabil bir yapı sunması,
- Kontrollü ilaç salım mekanizması ile etkin maddeyi belirlenen hızda serbest bırakabilmesi,
- Biyouyumluluğu ve biyoyararlanımı yüksek olması,
- Yüzey modifikasyonuna uygun yapıda olması (folik asit, transferin, antikor gibi hedefleyici moleküllerle fonksiyonelleştirilebilmesi),
- Partikül boyutuna bağlı olarak pasif hedefleme imkânı sunması (Clawson vd., 2011).

Bu çalışmada model plazmid DNA olarak Green Fluorescent Protein (pEGFP-C1) plazmidinin kullanılması, taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğini değerlendirmek açısından kritik bir rol oynamaktadır. pEGFP-C1, mavi ile morötesi ışık altında parlak yeşil floresans yayarak bir raporlayıcı gen işlevi görmektedir. Bu plazmid, hücrelerde protein ekspresyonunu ve lokalizasyonunu izlemeye olanak tanıyarak hücre içi biyolojik süreçlerin görselleştirilmesini mümkün kılar (Ding vd., 2014). Güçlü floresans özellikleri sayesinde pEGFP-C1 cDNA'sı, moleküler biyoloji araştırmalarında önemli bir gösterge sistemi olarak değerlendirilmektedir. Moleküler biyoloji teknikleriyle hedef proteine pEGFP-C1 etiketi eklenerek hibrit proteinler oluşturulabilir ve böylece hedeflenen bölgedeki dağılımı takip edilebilir. Floresan özelliğe sahip bu hibrit proteinler, hücre içi gen aktivitesinin ve dağılımının izlenmesine yardımcı olur. Ayrıca, yaydığı ışımaya şiddeti; ifade edilen proteinin miktarına, difüzyon özelliklerine ve biyokimyasal etkileşimlerine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bu özellikleri sayesinde pEGFP-C1, hücresel süreçlerin detaylı olarak incelenmesine katkı sağlayan değerli bir araçtır (Baltimore vd.,1970).

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, model plazmid olarak pEGFP-C1 plazmidini içeren polimer olarak PEG-PCL ve lipid olarak DOTAP kullanılarak hibrit nanopartiküller formülasyonlarının çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak üretilmesi planlanmakta olup genetik hastalıklarda etkili olacak gen yapılarının korunarak vücuda verilmesi ve transfeksiyon etkinliğinin artırılmasına yönelik yenilikçi formülasyon

tasarımlarının gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerinin kullanımı, yalnızca formülasyonun stabilitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda kontrollü salım özellikleri, yüksek biyouyumluluk ve biyoyararlanım gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, partikül boyutuna bağlı olarak pasif hedefleme imkânı da sunarak bu sistemin terapötik etkinliğini artırmaktadır. Bu tez çalışmasında geliştirilecek yenilikçi gen taşıyıcı formülasyonlar, non-viral vektör taşıyıcı sistemler alanında önemli bir ilerleme kaydedilmesini sağlayacaktır. Bu kapsam da hazırlanan yenilikçi formülasyonel yaklaşımlar birçok hastalık grubunda (monogenetik nadir hastalıklar, kanser, enfeksiyon hastalıkları vb.) öncülük sağlayacak bir platform olarak karşımıza çıkacaktır.

### **1.1. Plazmid DNA (p-DNA)**

Gen terapisi ve gen transferi çalışmalarının ilk aşamalarında, özellikle hücresel uygulamalarda, terapötik genlerin taşınması için ağırlıklı olarak viral vektörler tercih edilmiştir. Başlangıçta, bu vektörlerin endojen virüslerle etkileşime girme, rekombinasyon yapma ve konak hücre genomuna entegre olma yetenekleri güvenli kabul edilmiştir. Ancak, zamanla yapılan araştırmalar ve klinik denemeler, viral vektörlerin beklenmedik riskler taşıdığını ve güvenlik açısından çeşitli endişeler doğurduğunu ortaya koymuştur. Plazmidler, rekombinant DNA teknolojisinin ilk insan denemelerinden biri olan Martin Cline'ın talasemi çalışması gibi araştırmalarda önemli başarılar elde etmiştir (Ding vd., 2014). Çift iplikli ve halkasal yapıda olan bu DNA molekülleri, prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunur ve boyutları 1-200 kilobaz (kb) arasında değişirken, molekül ağırlıkları  $4-60 \times 10^6$  dalton aralığında olabilir. Hücre için yaşamsal bir zorunluluk teşkil etmemekle birlikte, eşeyli üreme sürecinde alıcı hücreye transfer edilerek genetik materyalin bir bakteriden diğerine aktarımını sağlayan bu yapılar, bu yolla biyolojik işlevlerini yerine getirirler. (Baltimore vd.,1970).

#### **1.1.1. Yeşil Floresans Protein**

Yeşil Floresan Protein (GFP), ilk olarak *Aequorea victoria* adlı denizanası türünde keşfedilmiş ve bu keşif, floresan proteinlerin tanımlanmasının önünü açmıştır. Bu proteinler, keşfedildikleri günden itibaren canlı sistemlerin organizasyonu ve işlevlerini araştırmak amacıyla birçok çalışmada kullanılmış olup günümüzde de yaygın bir tercih olmaya devam etmektedir. Özellikle hücresel ve organizmal düzeyde yürütülen gen tedavisi çalışmalarında,

gen ifadesinin takibi ve protein hedeflendirme süreçlerinde etkili bir biyolojik işaretleyici olarak önemli bir rol oynamaktadır (Wade, 1970).

Yeşil Floresan Protein, 238 amino asitten oluşan ve yaklaşık 27 kDa moleküler kütleye sahip bir biyofloresan proteindir. Ultraviyole ışığa maruz kaldığında karakteristik olarak parlak yeşil floresans emisyonu göstermektedir. Bu proteinin sarmal yapısının merkezinde, oksijen molekülünün etkisiyle aktif hale gelen ve dışarıdan herhangi bir yardımcı molekül veya proteine ihtiyaç duymadan yeşil floresan ışık yayılmasını sağlayan kromofor grup adı verilen özel bir moleküler yapı bulunmaktadır. GFP'nin yapısal özelliklerine yönelik araştırmalar, yalnızca yeşil floresan proteinin karakterizasyonu ile sınırlı kalmamış; aynı zamanda farklı dalga boylarında emisyon yapan sarı floresan protein (YFP) ve mavi floresan protein (BFP) gibi türevlerinin sentezlenmesine de zemin hazırlamıştır (Smith, 2004).

Yeşil Floresan Protein (YFP) ve diğer floresan proteinler, yüksek stabilite göstermeleri ve kromofor gruplarını herhangi bir yardımcı kofaktör veya substrata ihtiyaç duymadan oluşturabilme yetenekleri sayesinde floresan işaretleyiciler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ceylan vd.,2020). Hücrel ve moleküler biyoloji alanında, YFP geni gen ekspresyonunun takibinde sıklıkla bir raportör sistem olarak kullanılmaktadır. Genetik araştırmalarda da sıklıkla tercih edilen bu proteinin genetik kodu, hedef hücreye transfeksiyon yöntemiyle aktararak, hücrenin ultraviyole ışık altında yeşil floresans yaymasını sağlamaktadır.

Günümüzde pek çok protein ve plazmid, rekombinant DNA teknolojisinin olanaklarıyla genetik olarak modifiye edilmiş *Escherichia coli* suşları kullanılarak yüksek verimlilikle elde edilmektedir. *Escherichia coli*, floresan proteinlerin ve bunları kodlayan plazmidlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir konakçı organizma olarak tercih edilmektedir. Bu bakterinin iyi karakterize edilmiş genetik yapısı, yüksek seviyede protein ekspresyonu sağlaması ve üretim sürecinde zaman ve maliyet açısından verimlilik sunması, onu oldukça avantajlı bir sistem haline getirmektedir (Rosano ve Ceccarelli, 2014).

### 1.1.2. Nükleik Asitlerin ve Plazmidlerin Enkapsülasyon Etkinliği ve PicoGreen Kiti

Nükleik asitlerin terapötik uygulamalardaki artışı, bu yapılarının vücuda etkili bir şekilde iletilmesi için çeşitli formülasyonların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu formülasyonların enkapsülasyon etkinliğini değerlendirmek, taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir. Bu nedenle deney prosedürlerimiz sırasında nanopartikül formülasyonu içerisinde yer almayan serbest plazmid DNA miktarını bulmak ve buradan hareketle enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için PicoGreen dsDNA Assay Kit kullanılmaktadır.

PicoGreen, çift sarmallı nükleik asitleri tespit etmek üzere özel olarak tasarlanmış, 480 nm'de uyarılma zirvesi ve 520 nm'de emisyon zirvesine sahip son derece hassas bir floresan boyadır (Ban vd., 2024). PicoGreen, floresan mikroskopi yöntemlerinde DNA'nın boyanması ve görselleştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşın PicoGreen yalnızca büyük boyutlu nükleik asitlerin değil, aynı zamanda mi-RNA veya si-RNA gibi küçük nükleik asitlerin enkapsülasyonunu değerlendirmede de kritik öneme sahiptir. PicoGreen'in kullanım kolaylığı, özgülüğü ve hassasiyeti sayesinde nükleik asit analizinde kullanımlarına dair birçok çalışma yer almaktadır. Ban ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda PicoGreen dsDNA Assay Kitin yaygın analiz yöntemleri veya floresan boyalara göre sağladığı avantajlar vurgulanmıştır.

Geleneksel bir yöntem olarak da bilinen jel elektroforezi, DNA veya RNA gibi nükleik asitlerin formülasyonlara enkapsüle edilme miktarını ve verimliliğini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Jel elektroforezi zaman alıcı prosedürlere sahip olması, işlem sırasında RNA bozunması gibi zorluklarla karşı karşıya kalınması ve mi-RNA veya si-RNA gibi düşük moleküler ağırlıklı nükleik asitler için daha büyük örnek miktarları gerektirmesi gibi dezavantajları nedeniyle kullanım alanını kısıtlamaktadır. Yapılan çalışmalar da PicoGreen testi geleneksel jel elektroforezi ile karşılaştırıldığında yüksek hassasiyet, hız ve kullanım kolaylığı gibi avantajlar sunmaktadır (Ban vd., 2024).

Deney prosedürlerinde PicoGreen yardımıyla nükleik asitlerin formülasyonlardaki enkapsülasyonunu değerlendirmek, nükleik asit içeren formülasyonların santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatantın PicoGreen'nin basit bir şekilde belirli oranlarda karıştırılmasını içermektedir. PicoGreen'nin nükleik asitlere bağlanmasıyla oluşan floresan

yoğunluğu, bir fluorometre yardımıyla hızlı ve kolayca ölçülmektedir. Ölçülen floresan yoğunluğu, formülasyonun süpernatant kısmında yer alan serbest nükleik asit konsantrasyonunu göstermektedir. Elde edilen bu değerden hareketle başlangıçtaki toplam nükleik asit miktarı arasındaki fark kullanılarak enkapsülasyon verimliliği hesaplanmaktadır.

## 1.2. Gen Terapisi

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (2025), gen terapisini; nükleik asitler, viral vektörler veya genetik mühendisliği ile modifiye edilmiş mikroorganizmalar aracılığıyla genetik materyalin hedef hücrelere aktarılması ve bu materyalin transkripsiyon ya da translasyon süreçleri yoluyla konak genomuna entegre olarak biyolojik etkilerini göstermesi şeklinde tanımlamaktadır.

Kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve genetik rahatsızlıklar gibi kalıtsal faktörlerin yanı sıra fiziksel, kimyasal ve sosyal çevresel etmenlerin de etkisiyle gelişen hastalıklar, insan hayatını tehdit etmekte ve yaşam kalitesini ciddi şekilde düşürmektedir. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlar ve cerrahi yöntemler her zaman yeterli etkinliği sağlayamazken, bazen hastaların yaşam kalitesini daha da olumsuz etkileyebilmektedir (Mintzer ve Simanek, 2009).

Günümüzde, genetik anormallikler de dahil olmak üzere birçok ölümcül hastalığın önlenmesi, teşhisi ve tedavisi amacıyla biyomedikal teknoloji alanında yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Ancak geliştirilen farmakolojik ajanlar ve peptit tabanlı terapötikler, tüm hastalıklar için yeterli etkinlik göstermemekte ve kullanım alanları sınırlı kalmaktadır (Gevher vd., 2012). Pek çok hastalık, doğuştan gelen ya da yaşamın ilerleyen evrelerinde belirli genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmakta ve geleneksel farmakolojik yaklaşımlar bu hastalıkları tedavi etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu durum, bilim insanlarını yalnızca hastalık semptomlarını hafifletmekle kalmayıp, aynı zamanda altta yatan nedenleri ortadan kaldıracak yenilikçi terapötik yaklaşımlar ve alternatif tedavi stratejileri geliştirmeye yönlendirmiştir (Mintzer ve Simanek, 2009).

Gen terapisi, genetik ve kardiyovasküler hastalıklar da dahil olmak üzere birçok sağlık sorunuyla mücadelede öne çıkan yenilikçi bir yaklaşımdır. Bu yöntem, belirli bir hücreye genetik materyal aktararak mevcut anormallikleri düzeltmeyi veya hücreye yeni bir işlev kazandırmayı amaçlar. Seçilen bir genin fonksiyonunu onarmak ya da belirli bir genin

susturulmasını sağlamak için farklı gen terapisi teknikleri geliştirilmiştir. Gen terapisinin temel hedefi, uygun genetik materyali doğrudan hatalı veya eksik genin yerine yerleştirerek kalıcı bir tedavi sağlayabilmektir (Nayerossadat vd., 2012).

Kişiselleştirilmiş tedavi ve nanoteknoloji alanlarının rekombinant DNA teknolojisi ile birlikte göstermiş oldukları hızlı gelişmeler neticesinde genetik ve diğer hastalıkların tedavisinde günümüzde büyük gelişmeler meydana gelmektedir. İlerleyen yıllarda bu gelişmelerin daha da umut verici platformlar olarak karşımıza çıkacağı öngörülmektedir.

FDA tarafından yapılan tanıma göre, bir tedavi yönteminin gen terapisi olarak kabul edilebilmesi için iki temel özelliği taşıması gerekmektedir. İlk olarak, uygulanan tedavi, gen dizilerinin düzenlenmesi, onarılması, modifikasyonu, silinmesi ya da yeni bir genetik işlev kazandırılması süreçlerinde rol alan nükleik asitleri aktif bileşen olarak içermelidir. İkinci olarak ise, tedavi edici etkinin doğrudan transfer edilen genetik diziden veya bu dizinin kodladığı proteinden kaynaklanması beklenmektedir. Gen terapisi yaklaşımları, hedeflenen hücre tipine bağlı olarak iki ana kategoriye ayrılmaktadır: eşey hücrelerine yönelik uygulamalar 'germline gen tedavisi' olarak, somatik hücrelere yönelik uygulamalar ise 'somatik gen tedavisi' olarak sınıflandırılmaktadır.

### **1.2.1. Eşey Hücresi Gen Tedavisi**

Eşey hücresi gen tedavisi, işlevsel genin gamet hücrelerine (yumurta ve sperm) doğrudan aktarılması yoluyla gerçekleştirilen bir genetik müdahale yöntemidir. Bu yaklaşımda gerçekleştirilen genetik aktarım, kalıtsal nitelik taşıdığından, meydana gelen genetik değişiklikler sonraki nesillere de aktarılabilir. Böylece yalnızca mevcut bireyde hastalık etkeni ortadan kaldırılmakla kalmayıp, aynı zamanda genetik olarak modifiye edilmiş gametlerin oluşumu yoluyla gelecek nesillerin sağlıklı bir genotipe sahip olması amaçlanmaktadır. Eşey hücrelerinde meydana gelen genetik değişikliklerin kalıtsal olması ve gelecek nesilleri doğrudan etkileme potansiyeli, önemli etik tartışmalara yol açmaktadır. Her ne kadar başarılı sonuçlar elde edilebilecek bir yöntem olsa da etik ve teknik kısıtlamalar nedeniyle birçok ülkede uygulanması yasaklanmıştır (Smith vd., 2004). Bazı durumlarda, yalnızca laboratuvar ortamında incelenmesi gereken genetik hastalıklar üzerine çalışmalar, hücre kültürü veya hayvan modelleri kullanılarak yapılmaktadır. Teorik olarak, bu yöntem hatalı genlerin düzeltilmesi ve sağlıklı genetik materyalin sonraki nesillere aktarılması açısından oldukça etkili olsa da genom düzeyindeki değişikliklerin geri

dönüşümsüz doğası, büyük riskler taşımakta ve bu durum gelecekteki nesilleri olumsuz yönde etkileyebilme potansiyeline sahiptir (Haritha vd., 2012).

### **1.2.2. Somatik Hücre Gen Tedavisi**

Bu gen tedavisi yaklaşımında, terapötik genlerin doğrudan hastanın somatik hücrelerine transferi söz konusudur. Uygulama, yalnızca hedef bireyin tedavisini amaçlamakta olup, genetik değişikliklerin kalıtsal olarak aktarılması söz konusu değildir. Vücut hücrelerine aktarım ex vivo veya in vivo olarak gerçekleştirilebilir. Tercih edilecek gen aktarım yöntemi; hedeflenen hücre tipi, kullanılacak terapötik genin özellikleri ve seçilen taşıyıcı sistemin yapısal ve fonksiyonel niteliklerine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Haritha vd., 2012). Somatik hücre gen tedavisinde genetik aktarım sonucu meydana gelen genetik değişiklik vücut hücrelerinde meydana geldiği için gelecek nesillere aktarılmamaktadır. Etik açıdan daha kabul edilebilir ve tercih edilebilir bir yaklaşım olduğu için, günümüzde yapılan gen tedavisi denemeleri somatik hücreler üzerinde uygulanmaktadır (Ginn vd., 2018).

Klinik gen tedavisi uygulamalarında insanlara aktarılan genlerin büyük bir kısmını onkogenler oluşturmaktadır. Bugüne kadar gen tedavisiyle müdahale edilen hastalıklar arasında en geniş hasta grubunu kanser vakaları temsil etmektedir. Küresel ölçekte yürütülen klinik gen tedavisi denemelerinin %60'tan fazlası onkolojik hastalıklara odaklanırken, bunu monogenik ve kardiyovasküler hastalıklar izlemektedir. Bununla birlikte, şimdiye kadar yürütülen gen tedavisi çalışmalarında en yüksek klinik başarı oranı, monogenik hastalıkları hedefleyen girişimlerde elde edilmiştir. Özellikle kalıtsal ve nadir görülen tek gen bozukluklarına yönelik çok sayıda çalışma günümüzde de yoğun bir şekilde sürdürülmektedir. Gen tedavisi ile terapötik müdahale hedeflenen hastalıklarda, kullanılacak vektör sisteminin seçimi son derece önemli bir aşamadır. Hastalık türlerine ve hedeflenen dokulara bağlı olarak, transgen aktarımını gerçekleştirecek vektörlerin tasarımı yapılmaktadır.

### **1.3. Gen Terapisi Tarihçesi**

Genetik biliminin öncüsü olarak bilinen Avusturyalı rahip Gregor Johann Mendel, bezelyelerin tohum rengi üzerine yaptığı çalışmalarla kalıtım yasalarının temelini atmıştır. İlk kez “baskın” ve “çekinik” gen kavramlarını ortaya koyan Mendel, bezelyelerin genetik

mirasını inceleyerek kalıtımın nasıl aktarıldığını açıklayan bir model geliştirmiştir (Auffray vd.,2022).

1950 yılında Amerikalı biyokimyacı James Watson ve İngiliz biyofizikçi Francis Crick, çift sarmallı deoksiribonükleik asit (dsDNA) modelini temel alarak DNA'nın üç boyutlu yapısını çözümlemiştir. Watson ve Crick'in geliştirdiği modele göre DNA, beş halkalı bir şeker (deoksiriboz), üç fosfat grubu ve birbirine hidrojen bağlarıyla bağlanan dört farklı nükleik asidi (adenin, guanin, sitozin ve timin) içeren, çift sarmallı, antiparalel ve sağa doğru dönen bir heliks yapısına sahiptir (Danylova vd., 2020).

1960'ların ortalarında araştırmacılar, kalıtsal hastalıkların tedavisinde DNA dizilerinin hastaların hücrelerine aktarılabilirliğini öngörmüşlerdir. Bu öngörü, 1970 yılında DNA zincirinin belirli bölgelerinde gen parçalanmasını sağlayan nükleaz enzimlerinin keşfiyle daha da güçlenmiştir (Sayed vd., 2022). Bu önemli bilimsel gelişmeler, genetik alanında yeni olasılıkların doğmasına katkıda bulunmuş ve gen terapisi araştırmalarının başlamasının önünü açmıştır.

İlk insan gen transferi, 1989 yılında, kanser hücrelerini tanıyıp yok eden tümör infiltrate eden lenfositler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen terapisi ise ilk kez 1990 yılında, T ve B lenfosit fonksiyonlarındaki bozukluklardan kaynaklanan bir primer immün yetmezlik hastalığı olan Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (SCID) tedavisinde uygulanmıştır. Ashanti DeSilva adlı hastaya, adenozin deaminaz (ADA) geninin transfer edilmesiyle gerçekleştirilen bu tedavi başarılı sonuçlar vermiştir. 21. yüzyılda, rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler ve tıp alanındaki gelişmeler sayesinde fetüslerin genetik yapısı görüntülenebilir hale gelmiştir. Bu gelişme, genetik mutasyonlara bağlı hastalıkların tespit edilmesi, düzeltilmesi ve tedavi edilmesine yönelik gen terapisi temelli klinik çalışmaların önünü açmıştır (Nilay ve Damke, 2021).

Ticari olarak kullanılan ilk gen terapisi ürünü, 2003 yılında Shenzhen SiBiono GeneTech Co. Ltd tarafından piyasaya sürülen ve Çin Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanan Gendicine'dir. Rekombinant insan p53 adenovirüsü içeren bu ilaç, baş ve boyun kanserinin tedavisi için geliştirilmiştir (Sayed vd., 2022).

Gen terapisi, zaman içinde elde edilen başarılı sonuçlar ve kronolojik gelişmeler ışığında, günümüzde hemofili, sistik fibroz, talesemi, hiperkolesterolemi gibi kalıtsal

hastalıkların neden olduğu genetik mutasyonları düzeltmek ve kanser, Parkinson, Alzheimer, AIDS gibi sonradan gelişen hastalıklarla mücadele etmek için etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, eşeyli üreme hücrelerinde yaşanan etik sorunlar ve özel izin gereksinimleri nedeniyle, gen terapisi çalışmaları genellikle somatik hücreler üzerinde gerçekleştirilmektedir (Nilay ve Damke, 2021). Bugüne kadar gerçekleştirilen gen tedavisi klinik çalışmalarının büyük bir bölümü (%81,4) kanser (%68,3) ve kalıtsal monogenik hastalıkların (%13,1) tedavisine odaklanmıştır. Özellikle monogenik hastalıklarla ilgili çalışmalar, karaciğer, beyin ve göz gibi çeşitli organ sistemlerinde önemli başarılar elde etmiş ve bu alanda umut verici sonuçlar doğurmuştur. Enfeksiyon hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklar kanser ve monogenik hastalıkların ardından en yaygın hedeflenen endikasyonlar arasında yer almakta olup, tüm klinik çalışmaların sırasıyla %5,0 ve %4,9'unu oluşturmaktadır (Nathwani vd., 2011).

#### **1.4. Gen Aktarımında Kullanılan Vektörler**

Gen terapisi, bir hücredeki mevcut genetik anormalliği düzeltmek veya hücreye yeni bir fonksiyon kazandırmak amacıyla belirli bir hücreye genetik materyalin iletilmesini temel alan bir yaklaşımdır. Seçilen bir genin fonksiyonunun onarılması veya özel bir genin susturulması için farklı gen terapisi stratejileri uygulanmaktadır. Bu yöntemlerin nihai amacı, uygun genetik materyalin tek bir adımda bozulmuş veya kaybolmuş gen ile değiştirilmesini sağlamaktır (Nayerossadat vd., 2012). Tedavinin etkin bir şekilde uygulanabilmesi için, sağlıklı genin hastanın hedeflenen hücrelerine başarılı bir şekilde iletilmesi gerekmektedir. Bu iletim süreci, taşıyıcı olarak bilinen vektörler aracılığıyla gerçekleştirilir. Hedef hücreye genetik materyalin güvenli bir şekilde iletilmesi ve taşınması amacıyla çeşitli vektör grupları ve transfer tekniklerinden faydalanılmaktadır.

İdeal bir gen transfer vektörünün, minimal yan etki profiline sahip olması, hedef hücrelere yüksek özgüllük göstermesi, immün sistemi aktive etmemesi, toksisite oluşturmaması, metabolik yıkıma karşı dirençli olması ve terapötik genin istenen süre boyunca uygun düzeyde ekspresyonunu sürdürebilmesi beklenmektedir (Mehier-Humbert vd., 2005). Mevcut çalışmalar ışığında, günümüzde tüm istenen özellikleri aynı anda bünyesinde barındıran ideal bir gen aktarım vektörü henüz geliştirilmemiştir.

Hedef dokunun biyolojik özellikleri ve hedef dokuya gönderilecek genin boyutu gibi parametreler doğrultusunda, her hastalık için özgün bir vektör tasarımına ihtiyaç

duyulmaktadır. Zira her gen transfer vektörü, sınırlı genetik taşıma kapasitesine sahip olup, yalnızca belirli hücre tiplerine etkin giriş yapabilme yeteneğine sahiptir. Aynı zaman da genlerin büyüklüğü de vektör seçimi kritik öneme sahiptir. Gen transfer vektörleri;

- Biyolojik vektörler
- Fiziksel veya kimyasal vektörler olmak üzere iki guba ayrılmaktadır (Chuah vd., 2003).

#### **1.4.1. Viral Vektörler (Biyolojik Vektörler)**

Biyolojik taşıyıcı sistemler olarak da isimlendirilen viral taşıyıcı sistemler virüslerden meydana gelmektedir. Genetik materyalin hücelere aktarılmasında taşıyıcı sistem olarak kullanılan viral vektörler, sahip oldukları özgün genetik yapılar doğrultusunda konak hüceleri enfekte etme ve kendi genomlarını hücre içerisine entegre etme kapasitesine sahiptir. Bu virüsler arasında hem DNA virüsleri hem de RNA virüsleri, gen taşıyıcısı olarak kullanılabilir. Gen tedavisinde kullanılmak üzere tercih edilen viral vektörler, laboratuvar koşullarında patojenik özelliklerinden arındırılarak güvenli hale getirilmekte; buna karşın, yüksek verimlilikte gen transferi gerçekleştirme yetilerini büyük ölçüde korumaktadırlar. Bununla birlikte, bu biyolojik taşıyıcı sistemlerin üretiminin zorluğu, toksik etkiler yaratma potansiyelleri, immün yanıtları tetikleyebilmeleri ve taşıyabilecekleri genetik materyal miktarının sınırlı olması gibi etmenler, kullanım alanlarını kısıtlamaktadır (Walther vd., 2000). Viral vektörlerde, hedef hücreye yönlendirilen aktif gen virüs içerisine yerleştirilir ardından hücreye yollar ve transdüksiyon işlemi gerçekleşir. Genetik materyalin etkin bir şekilde replikasyonu için, yüksek miktarda virüs partikülünün kullanılması zorunludur (Dando vd., 2001).

Viral vektör seçimi, vektörün genetik materyal taşıma kapasitesi, konak hücreye özgüllüğü, gen ekspresyon profili ve immün yanıtı tetikleme potansiyeli gibi faktörler göz önünde bulundurularak yapılmaktadır (Das vd., 2015). Her bir virüs, kendine ait özgün özelliklere sahiptir. En çok kullanılan viral vektörler ise kısaca şu şekilde tanımlanabilir:

##### **1.4.1.1. Retroviral Vektörler**

Retrovirüsler küçük yapıda RNA virüsleridir ve retrovirüslerin gen aktarma amacıyla başarılı olarak kullanımları ilk olarak 1981 yılında tanımlanmıştır. Üretilen ilk gen terapi

virüsleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Kawabata vd., 1995). Retrovirüs taşıyıcı sistemler sahip oldukları genler ile hedefe yönelik kullanılacak olan terapötik genlerin yer değiştirilmesiyle geliştirilmektedir. Bu yapılar konak hücrelere girerek sahip oldukları hedefe yönelik terapötik genleri transfekte edip konak hücrede gene ait proteinlerin sentezlenmesine aracılık ederler (Miller vd., 1994). Retroviral vektörler, gen transferi için 7-8 kb'den daha küçük yükleme kapasitesine sahip olmaları, viral genomun kolay manipülasyonu ve DNA ile entegrasyonunun kolay olması gibi avantajlar sunsa da sınırlı hedefleme yeteneği, genomda karışık entegrasyon, taşıyıcıların kararsızlığı ve yalnızca bölünmekte olan hücreleri enfekte etme gibi çeşitli dezavantajlara da sahiptir (Walther vd., 2000).

#### **1.4.1.2. Lentiviral Vektörler**

Lentiviral vektörler, retrovirüslerin taşıdığı dezavantajlar nedeniyle geliştirilmiştir. Hem çoğalan hem de çoğalamayan hücreleri enfekte edebilme özelliği taşıyan lentivirüsler, çok çeşitli konak hücreleri enfekte edebilme kapasitesine sahip olduklarından, kullanım alanları retrovirüslerden daha geniştir. Günümüzde, non-viral vektör taşıyıcı sistemler üzerine yapılan araştırmalarda, insan bağışıklık yetmezliği virüsü tip 1 (HIV-1) kaynaklı lentiviral vektörlere yönelik çalışmalar hızla ilerlemektedir. Bu vektörler aracılığıyla, genlerin konak hücrelerin genomlarına verimli bir şekilde entegrasyonu sağlanarak uzun süreli ekspresyon hedeflenmektedir (Meneghini vd., 2016).

#### **1.4.1.3. Adenoviral Vektörler**

Adenovirüs ailesi, yaklaşık 36 kb uzunluğunda çift sarmallı, katlanmamış DNA (dsDNA) virüsleri olup hem bölünebilen hem de bölünemeyen hücreleri enfekte etme yeteneğine sahiptir. Gen terapisi uygulamalarında genetik materyalin aktarımında en yaygın olarak kullanılan viral sistemler arasında yer alır. Adenovirüs ailesine ait 1000'den fazla tür bulunmaktadır. Adenovirüsler, konak hücrelere reseptör aracılı endositoz yoluyla giriş yaparak, genomlarını hücre çekirdeğine transfer ederler; ancak bu virüsler, konak hücrenin genomuna entegrasyon gerçekleştirmezler (Wang vd., 2019). Adenovirüslerin enfekte edebileceği konak hücre türlerinin yelpazesi oldukça geniştir ve daha önce de belirtildiği gibi, birçok farklı hücreyi enfekte etme yeteneğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde, adenovirüsler birçok insan hastalığının etiyolojisinde yer almaktadır. Ancak, immünojenik

özellikleri ve sebep oldukları yan etkiler nedeniyle, gen terapisi uygulamalarında genetik materyal aktarımı amacıyla kullanım alanları sınırlıdır (Kamimura vd., 2011).

#### 1.4.1.4. Adeno Bağlantılı Viral Vektörler

Parvovirüs ailesine ait olan AAV'ler, yaklaşık 4.5 kb uzunluğunda ve 22-26 nm çapında, tek zincirli DNA (ssDNA) virüsleridir ve konakçı hücrelerin kromozomlarına kalıcı olarak entegre olabilme yeteneğine sahiptir. Genetik olarak, tek zincirli genomlarında bulunan viral proteinler olan Rep ve Cap'in çıkarılması ve yapısal olarak küçük boyutları, AAV'lerin gen terapisi uygulamalarında kullanılmasını mümkün kılar. AAV'ler, adenovirüslerle benzer şekilde, hücre döngüsünde aktif olan hücrelerin yanı sıra, bölünme kapasitesini yitirmiş postmitotik hücreleri de enfekte edebilme potansiyeline sahiptir. Adenovirüslerin aksine, AAV'lerin DNA'ları konak hücrenin genomuna entegre olmaktadır. AAV'ler, doğal formlarında patolojik etkiler göstermemekle birlikte, vektör olarak kullanıldıklarında minimal düzeyde toksisite gösterebilirler. Mutojenik etkilerinin düşük olması nedeniyle AAV'ler, güvenli vektörler arasında yer almaktadır, ancak gen taşıma kapasitesi sınırlıdır. Bu sistemin başlıca dezavantajı, üretim sürecinde yardımcı bir virüse ihtiyaç duyulmasıdır; bu gereklilik, rekombinant AAV'lerin kontaminasyon riskiyle üretilmesine zemin hazırlayarak güvenlik ve saflık açısından ek zorluklar doğurmaktadır (Naso vd., 2017). Aşağıdaki şekilde dört grup arasındaki karşılaştırmalara yer verilmektedir.

**Çizelge 1.1.** Viral vektörlerin karşılaştırılması.

|                         | RETROVİRÜS    | LENTİVİRÜS                   | ADENOVİRÜS                   | AAV                          |
|-------------------------|---------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Boyut                   | 80-100 nm     | 80-100 nm                    | 70-100 nm                    | 25 nm                        |
| Genom Türü              | ssRNA         | ssRNA                        | dsDNA                        | ssDNA                        |
| Paketleme Kapasitesi    | 10 kb         | 8 kb                         | 8-36 kb                      | 4,7 kb                       |
| Transdüksiyon           | Çoğalan Hücre | Çoğalan ve Çoğalamayan Hücre | Çoğalan ve Çoğalamayan Hücre | Çoğalan ve Çoğalamayan Hücre |
| Transdüksiyon Etkinliği | Orta          | Orta                         | Yüksek                       | Orta                         |
| Ekspresyon              | Kalıcı        | Kalıcı                       | Geçici                       | Geçici veya Kalıcı           |
| İmmunojenite            | Orta-yüksek   | Orta-yüksek                  | Yüksek                       | Düşük                        |
| Gen Terapi Stratejisi   | Ex-vivo       | Ex-vivo                      | In-vivo                      | In-vivo                      |

### 1.4.2. Non-viral Vektörler

Genetik materyaller DNA ve RNA gibi farklı nükleik asit türleri serbest halde bulunduklarında biyolojik sıvılardaki çeşitli enzimler ve moleküller tarafından hızla parçalanabilir, istenmeyen bağışıklık tepkilerini tetikleyerek etkisiz hale gelebilir veya vücuttan hızla uzaklaştırılabilirler. Bu durum, genetik tedavilerin etkinliğini önemli ölçüde azaltarak terapötik başarısızlığa yol açabilir. Bu nedenle, genleri biyolojik ortamın degrades edici etkilerinden koruyabilecek, biyolojik membranları geçebilen ve hücre içi hedeflemeyi iyileştiren uygun vektörlere duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır. Bugün itibarıyla birçok gen terapisi ürünü farmasötik pazarda yer almakta olsa da gen taşıyıcı vektörler konusunda daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alandaki ileri düzey çalışmalar, gen terapisinin etkinliğini önemli ölçüde artırarak, yeni bir terapötik aşamaya taşınmasına olanak sağlayabilir (Hill vd., 2016). Viral vektörler sürdürülebilir gen ekspresyonu sağlasa da geliştirme süreçlerinin son derece zahmetli olması ve biyolojik sistemlerde immünojenik cevap oluşturmaları nedeniyle kullanımlarını kısıtlanmaktadır. Araştırmacılar, istenmeyen inflamatuvar ve immün reaksiyonları tetiklemeden sürdürülebilir gen ekspresyonu sağlayabilen ve toksisite açısından güvenli olan nonviral vektörler üzerine araştırmalarını yoğunlaştırmaktadır. Bu nedenle de nonviral vektörler, düşük maliyetli, çok yönlü, immünojenik olmayan ve kararlı yapılarıyla dikkat çekerken, yüksek miktarda genetik materyal yükleme kapasitesine sahip olmaları nedeniyle gen aktarımı araştırmalarında büyük önem kazanmıştır (Liu vd., 2018).

#### 1.4.2.1. Fiziksel Yöntemler

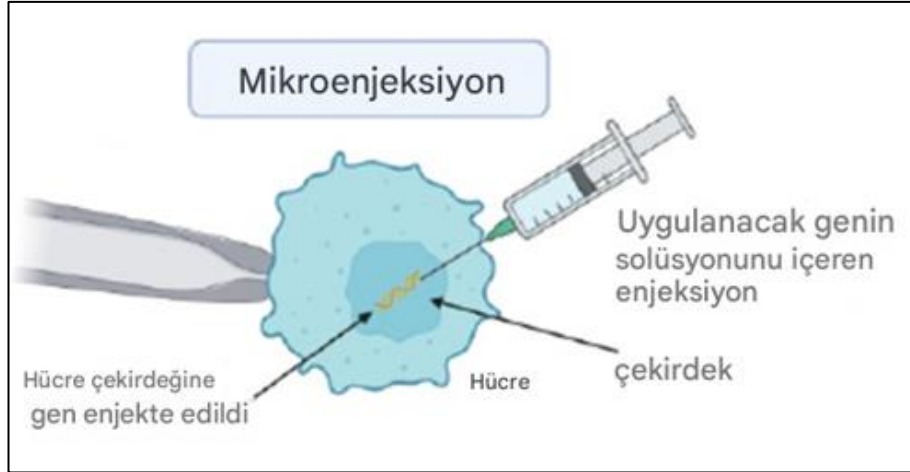
Viral vektörlerle gerçekleştirilen gen aktarım çalışmaları sırasında karşılaşılan sorunlar araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bu alanda, viral vektörler ve kimyasal yöntemlerden daha etkili yeni ve yenilikçi fiziksel gen aktarım yöntemlerini keşfetmek amacıyla çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Hücre dışı ve hücre içi engelleri aşabilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle fiziksel yöntemler büyük önem taşımaktadır. Diğer yöntemlerde bu engeller nedeniyle sınırlanan gen transfeksiyon verimliliği geliştirilen fiziksel yöntemlerle önemli ölçüde artırılabilir.

Bu bölümde mikroenjeksiyon, iğne enjeksiyonu, gen tabancası, jet tabancası, elektroporasyon, sonoporasyon, nükleofeksiyon, hidrodinamik gen aktarımı, mekanik masaj ve magnetoporasyon gibi en yeni ve yenilikçi fiziksel gen aktarım yöntemleri sırasıyla

anlatılacaktır. Bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları, Tablo 2'de kapsamlı bir şekilde sunulmuştur (Jinturkar,2011).

**Çizelge 1.2.** Non-viral gen transferi için fiziksel yöntemlerin avantajları ve dezavantajları

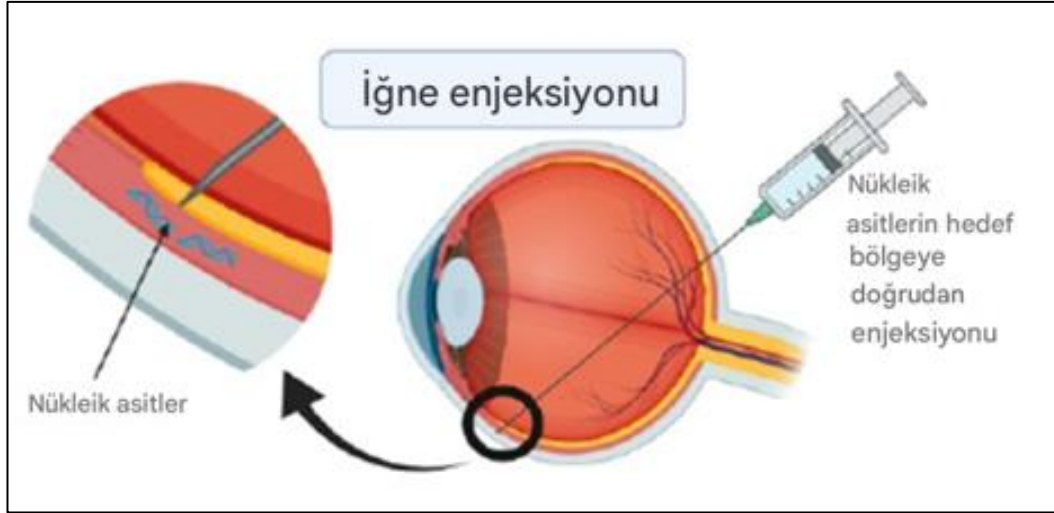
| TEKNİKLER                         | AVANTAJLARI                                                                                                                                                               | DEZAVANTAJLARI                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mikroenjeksiyon</b>            | Büyük miktarda genetik materyalin iletilmesine olanak tanır, kullanışlı, basit, uygun maliyetli daha az toksik ve tekrarlanabilir olması başlıca avantajlarıdır.          | Çok sayıda hücre transfeksiyonu için kullanılmıyor olması ve özel el tekniği gerektiriyor olması başlıca dezavantajlarıdır.                                                                                                 |
| <b>İğne-Enjeksiyonu</b>           | Az miktarda DNA ile çalışılmasına imkân sağlaması başlıca avantajlarıdır.                                                                                                 | Terapötik etkinliğinin düşük olması ve uygulanmasının zor olması başlıca dezavantajlarıdır.                                                                                                                                 |
| <b>Jet Tabancası</b>              | İnvaziv olmaması, güvenli ve kontrol edilebilirliğinin yüksek olması başlıca avantajlarıdır.                                                                              | Bölgesel doku hasarına neden olması ve etkinliğinin düşük olması başlıca dezavantajlarıdır.                                                                                                                                 |
| <b>Gen Tabancası</b>              | Genin transfekte edilmesi zor olan hücrelere etkin bir şekilde iletilmesine olanak sağlaması ve toksik olmaması başlıca avantajlarıdır.                                   | İşlemin yüzeysel hücreler ile sınırlı olması ve derin penetrasyonun gerekli olduğu hücrelerde kullanılmıyor olması başlıca dezavantajlarıdır.                                                                               |
| <b>Elektroporasyon</b>            | Hızlı, tekrarlanabilir ve fazla miktarda DNA'nın iletimine olanak sağlaması başlıca avantajları arasındadır.                                                              | Bölgesel etkili olması ve yüksek voltaja maruz kalma nedeniyle DNA hasarı riskinin olması başlıca dezavantajları arasındadır.                                                                                               |
| <b>Nükleofeksiyon</b>             | Hücre zarı geçişinin zor olduğu durumlarda etkili ve hızlı olması başlıca avantajları arasındadır.                                                                        | Canlı organizmalarda sınırlı uygulamalarının olması ve toksik özellik göstermeleri başlıca dezavantajları arasındadır.                                                                                                      |
| <b>Sonoporasyon</b>               | Derin penetrasyonun gerekli olduğu hücreler ve spesifik lokal hedefler için kullanılabiliyor olması ve invaziv olmayan bir teknik olması başlıca avantajları arasındadır. | Verimliliğin nispeten düşük olması ve hedef hücrelerin zarar görme riski başlıca dezavantajları arasındadır.                                                                                                                |
| <b>Hidrokinamik Gen Transferi</b> | Genin karaciğer hücrelerine iletilmesinde basit ve etkili bir yöntem olması başlıca avantajları arasındadır.                                                              | Gerekli enjeksiyon hacminin çok büyük olması ve klinik olarak uygulanabilir olmaması başlıca dezavantajları arasındadır.                                                                                                    |
| <b>Manyetoporasyon</b>            | Derin penetrasyonun gerekli olduğu hücrelerde kullanılabiliyor olması ve invaziv olmayan bir teknik olması başlıca avantajları arasındadır.                               | Özel ekipmanın gerekli olması, manyetik vektörlerin hazırlanma aşamalarının karışık olması ve manyetik reaktiflerin manyetik alan kaldırılmasından sonra toksisite riskini sahip olması başlıca dezavantajları arasındadır. |



**Şekil 1.1.** Mikroenjeksiyon yöntemi (Hill vd., 2016)

Mikroenjeksiyon, genetik materyalin doğrudan hedef hücreye enjekte edilerek taşındığı fiziksel bir transfer yöntemidir. İlk kez, bu tekniği tanımlayan ve uygulayan araştırmacı Barber olmuştur. Bu teknikte, çapı 0.5–5  $\mu\text{m}$  arasında değişen çok küçük bir iğne, genetik materyal içeren bir çözelti ile doldurulmaktadır. Daha sonra bu çözelti, mikroskop altında izlem yapılarak doğrudan tek bir hücreye enjekte edilmektedir. Mikroenjeksiyon tekniği oldukça basit ve ekonomiktir. Aynı zamanda büyük boyutlu genetik materyallerin aktarılabilmesi olanak sağlaması nedeniyle önemli bir avantaja sahiptir. Ayrıca, toksik olmayan, biyouyumlu ve tekrarlanabilir bir fiziksel gen aktarım yöntemidir. Ancak, bu tekniğin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar arasında hassas bir uygulama gerektirmesi, tek tek hücrelerin manipüle edilme zorunluluğu, düşük miktarda gen ekspresyonu ve genin hücre içinde kalma süresinin kısa olması yer almaktadır. Bunun yanı sıra, hücresel membranın ve hücre içi ortamın bozulmasını önlemek amacıyla yalnızca küçük hacimde genetik materyal enjekte edilebilmesi dezavantajları arasında yer almaktadır (Hill vd., 2016).

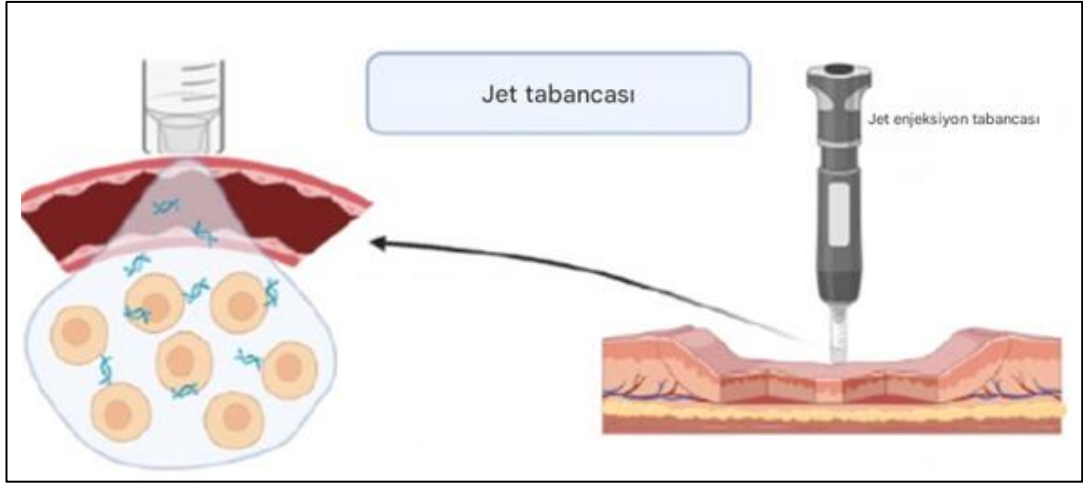
Özetle, DNA'nın mikroenjeksiyonu yüksek düzeyde etkili bir yöntem olmasına rağmen, oldukça zahmetli bir süreçtir. Her enjeksiyon yalnızca tek bir hücreye uygulanabildiğinden, birkaç yüz hücreye genetik materyal aktarmak için çok sayıda işlem yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda, gen transferi sürecini daha etkin ve pratik bir şekilde gerçekleştirebilmek için alternatif fiziksel yöntemler geliştirilmiştir.



Şekil 1.2. İğne enjeksiyonu yöntemi (Hill vd., 2016)

İğne enjeksiyonu tekniği genetik materyalin doğrudan hedef bölgeye enjekte edildiği fiziksel bir yöntemdir. İlk olarak 1990 yılında Wolf ve ekibi tarafından rapor edilmiş olup, çıplak DNA'nın fare kasındaki miyofiberlere DNA iletimi için uygulanmıştır (Wolff vd., 1990).

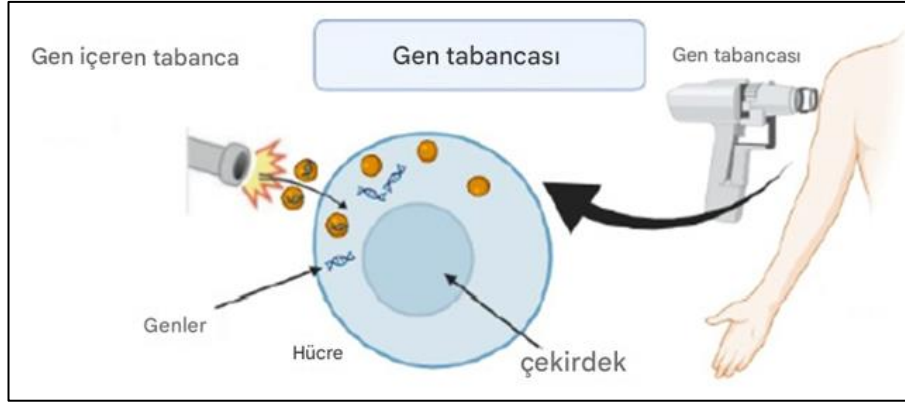
Bu yöntemin hedef bölgeye direkt olarak uygulamada göstermiş olduğu uygulama basitliği, gen tedavisi çalışmalarında bu yöntemi ilgi çekici kılmıştır. Göz hücreleri, beyin hücreleri veya kan gibi belirli dokulara gen aktarımı için etkili bir yöntemdir. Bu teknik yalnızca DNA'nın değil, siRNA gibi farklı RNA türlerinin de aktarımına olanak tanımaktadır. Biyolojik ortam için oldukça uyumlu ve düşük toksisiteye sahip olmasına rağmen, iğne enjeksiyonunun bazı dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle, intravenöz olarak enjekte edilen genetik materyalin gen ekspresyonu oldukça düşük seviyelerde kalmaktadır. Bu sorun yeni geliştirilen fiziksel gen aktarım yöntemiyle çözülmeye çalışılmıştır (Hill vd., 2016).



**Şekil 1.3.** Jet tabancası yöntemi (Hill vd., 2016)

Jet enjeksiyon yöntemi, tıpta 1947 yılından beri ilaç uygulamalarında kullanılan iğnesiz bir tekniktir. Bu yöntem, terapötik maddeleri veya genetik materyali doğrudan hedef hücrelere iletme yeteneğine sahiptir. Cihaz, genetik materyali ince bir jet akışı halinde yüksek basınçla hedef bölgeye aktarır. Uygulanan basınç, genetik materyalin hücre içinde ne kadar eşit dağıldığını belirleyen önemli bir faktördür. Jet enjeksiyonu bazı doku hasarlarına yol açabilse de istenilen gen aktarımı ve ekspresyonu sağlandığında bu hasar genellikle tolere edilebilir (Jinturkar, 2011).

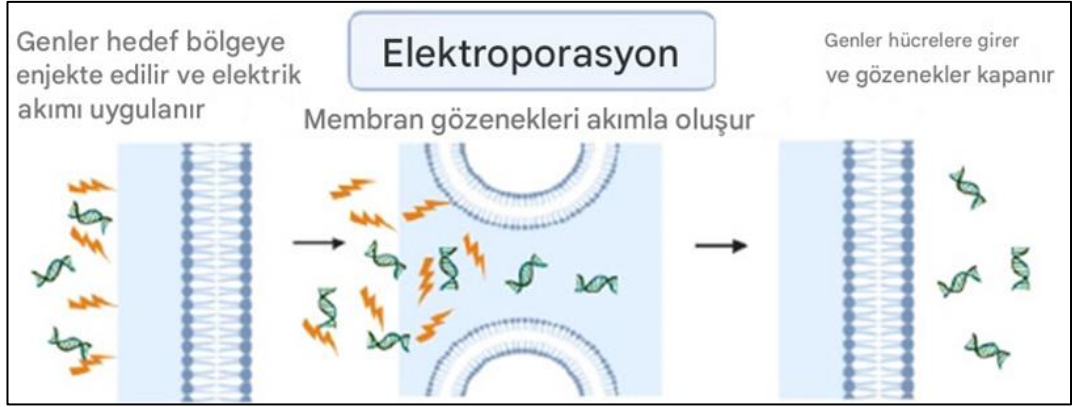
Jet tabancası olarak bilinen bu yöntem, gen terapisi uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Genetik aşılarda uygulanması ve DNA kodlayan intihar genlerinin hedeflenerek antitümör tedavilerinde kullanılması gibi çeşitli amaçlarla geliştirilmiştir. Ayrıca, jet enjeksiyon yöntemi sayesinde bazı cilt hastalıklarının genetik tedavisi mümkün hale gelmiştir. Bu teknik, deri, meme dokuları, kas ve yağ dokuları gibi farklı doku türlerine genetik materyal iletiminde başarılı sonuçlar vermektedir. Şu ana kadar yöntemle ilgili ciddi bir yan etki rapor edilmemiştir. Ancak enjeksiyon bölgesinde hafif kanama, lokal inflamasyon, geçici sıcaklık artışı (hipertermi) ve ödem gibi küçük yan etkiler gözlemlenebilmektedir (Lysakowski vd.,2003).



**Şekil 1.4.** Gen tabancası yöntemi (Hill vd., 2016)

Gen tabancası, balistik gen aktarımı ya da balistik DNA enjeksiyonu olarak bilinen bu yöntem, gen terapisi kapsamında genetik materyal kaplı partiküllerin doğrudan hedef hücrelere veya dokulara iletilmesini sağlar. Bu teknik, genetik materyalin mukozaya, deriye, tümör hücrelerine ya da cerrahi olarak açığa çıkarılmış vücut dokularına aktarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Gen tabancası tekniğinde taşıyıcı partikül olarak tungsten ve altın gibi yoğun metalleri kullanmaktadır. Öncelikle bu partiküller genetik materyal ile kaplanır, ardından yüksek basınç uygulanarak hücre zarını etkili bir şekilde geçmeleri sağlanır. Böylece genler veya nükleik asitler hücre sitoplazmasına ya da çekirdeğine ulaştırılır. Gen aktarımının etkinliğini belirleyen çeşitli fiziksel faktörler arasında partikül boyutu, yüzey yapısı, şekli, dozajı ve salınım hızı yer almaktadır (Jinturkar, 2011). Bu fiziksel yöntem en yaygın olarak deri hedefli genetik bağışıklama uygulamalarında kullanılmaktadır. Gen tabancası yöntemiyle DNA kaplı partiküller doğrudan epidermise yönlendirilerek en etkili DNA immünizasyonunun bu bölgede gerçekleşmesi sağlanır. Bu yaklaşım, genetik aşılarda geliştirilmesi, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve kanser tedavisinde intihar gen terapisi gibi çeşitli tıbbi alanlarda kullanılmaktadır (Hill vd., 2016).

Bu yöntem, güvenli ve uygulanabilir bir gen aktarım stratejisi sunmasına rağmen, belirli sınırlamaları da beraberinde getirmektedir. En önemli sınırlaması ise gen aktarımının yalnızca birkaç milimetre derinliğe ulaşabilmesi nedeniyle daha çok lokal uygulamalara uygun olmasıdır. Ayrıca, bu yöntemle sağlanan gen ekspresyonu genellikle geçici olup, daha çok aktif olarak bölünen ve hızlı çoğalan hücrelerle sınırlıdır. Bu sınırlamaları aşmak ve yöntemin etkinliğini artırmak amacıyla araştırmacılar çeşitli iyileştirme çalışmaları yapmıştır. Bu çalışmalar arasında, daha verimli taşıyıcı partikül üretim tekniklerinin geliştirilmesi, doku hasarının en aza indirilmesi ve işlemin süresinin kısaltılması yer almaktadır (Dutta vd., 2021).

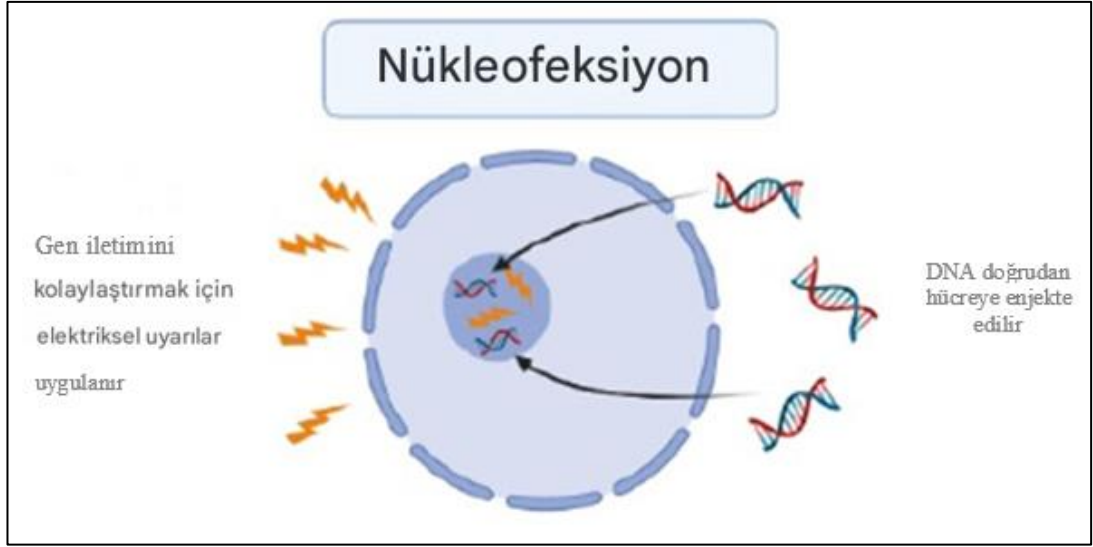


Şekil 1.5. Elektroporasyon yöntemi (Hill vd., 2016)

Elektroporasyon, elektrofeksiyon veya elektropermeabilizasyon olarak da bilinen ve hem in vivo hem de in vitro koşullarda gen aktarımı amacıyla yaygın şekilde kullanılan bir biyoteknolojik yöntemdir. İlk kez 1982 ve 1991 yıllarında uygulanan bu yöntem, hücre zarını geçemeyen genetik materyallerin hedef hücrelere etkin bir şekilde iletilmesini sağlamak amacıyla geliştirilmiştir (Dutta vd., 2021).

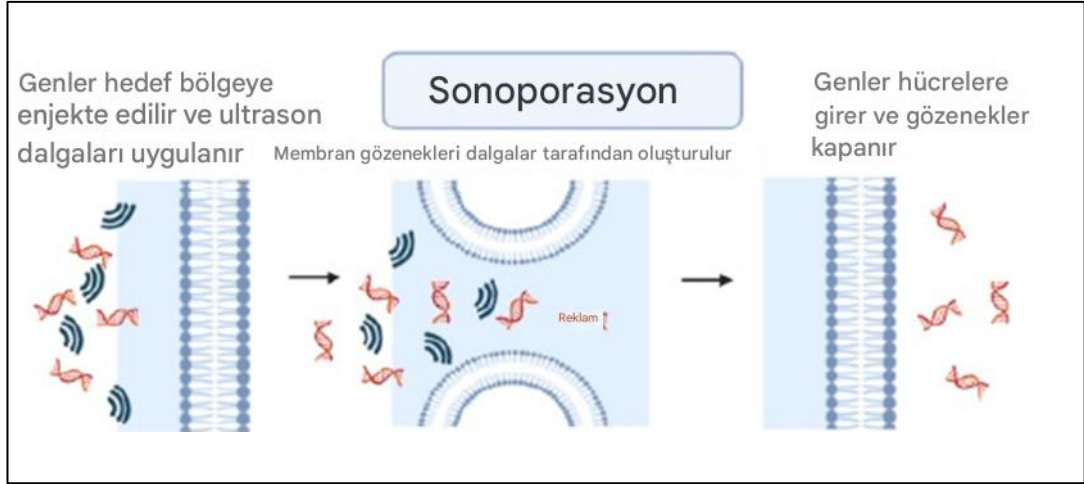
Elektroporasyon yöntemi, hedef hücrelere uygulanan elektrik akımı sayesinde nanometrik boyutta geçici gözeneklerin oluşmasını sağlar. Normal koşullarda hücre zarını geçemeyen negatif yüklü DNA veya diğer genetik materyaller, bu geçici gözeneklerden hücre sitoplazmasına veya çekirdeğine iletilerek etkili bir gen aktarımı gerçekleştirir. Elektrik darbelerinin süresi ve şiddeti, hedeflenen hücre tipine göre değişiklik gösterir. Örneğin, iskelet kaslarına yönelik gen aktarımında öncelikle yüksek voltajlı bir elektrik akımı kullanılarak hücre zarında gözenekler açılır. Ardından, düşük yoğunluklu elektrik darbeleri uygulanarak genetik materyalin bu gözeneklerden hücre içine geçişi desteklenir. Bu süreç, elektroporetik etki sayesinde genetik materyalin hücre içine etkin bir şekilde yönlendirilmesini sağlar. İşlem sırasında hücre türlerine göre kullanılan farklı elektrot türleri bulunmaktadır (Heller vd., 2006).

Elektrik darbeleriyle oluşturulan membran permeabilitesi son derece kısa süreli olup, bu nedenle genetik materyalin bu zaman aralığında hücre içerisine etkin bir şekilde giriş yapabilmesi için uygun koşulların sağlanması gerekmektedir. Elektroporasyon tekniği, genellikle in vitro nükleik asit aktarımında yaygın olarak kullanılır. Bunun yanı sıra, cilt ve karaciğer tümörlerinin tedavisi gibi bazı in vivo uygulamalarda da tercih edilmektedir. Ancak, bu yöntem çoğunlukla lokal hedefleme ile sınırlıdır ve hücreye zarar verme ya da hücrel toksisite riskini beraberinde getirebilir (Hill vd., 2016).



**Şekil 1.6.** Nükleofeksiyon yöntemi (Hill vd., 2016)

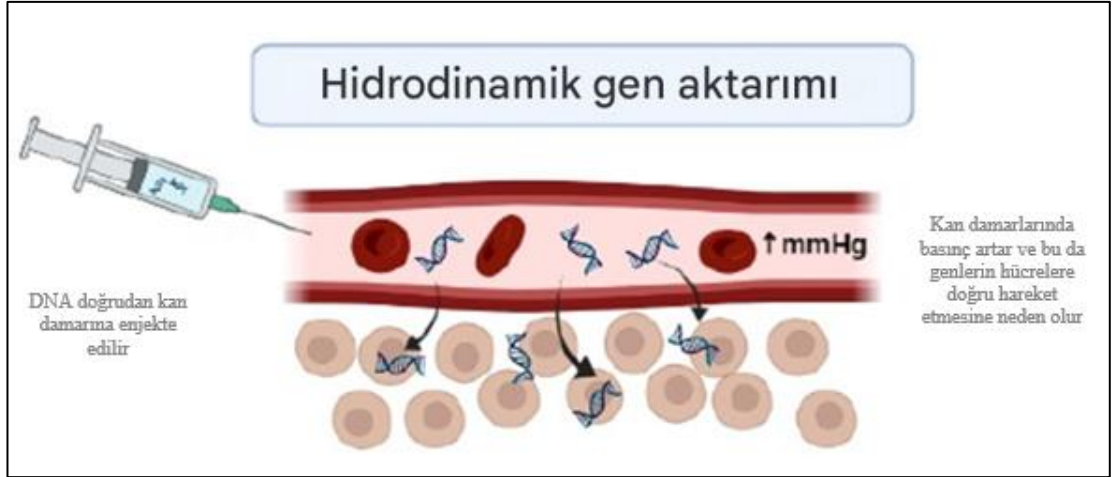
Nükleofeksiyon, elektroporasyon yöntemine benzer ancak elektrofüzyon yöntemine göre daha gelişmiş ve verimli bir tekniktir. Bu yöntemde, hedef hücrelere elektriksel darbeler uygulanarak hücre zarlarında geçici gözenekler açılır ve genetik materyal bu gözenekler aracılığıyla hücre sitoplazmasına iletilir, böylece gen aktarımı sağlanır. Nükleofeksiyonun önemli farkı, dışarıdan gelen materyalin doğrudan hücre içine enjekte edilmesidir; bu da sürecin verimliliğini artırır ve zor transfüze olan hücrelerde bile gen transferini mümkün kılar. Nükleofeksiyonun en önemli avantajları, işlemin zaman açısından verimli olması ve genetik materyalin aktarılması için çok az sayıda hücreye ihtiyaç duymasındır. Ancak bazı araştırmalar, bu gen terapisi türünü kullanan klinik denemelerde katılımcıların yüksek ölüm oranlarına maruz kaldığını bildirmiştir. Bu nedenle, elektroporasyon tekniğinin daha kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi ve potansiyel toksik etkilerinin en aza indirilmesi amacıyla ileri düzey araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Aslan vd., 2006).



Şekil 1.7. Sonoporasyon yöntemi (Hill vd., 2016)

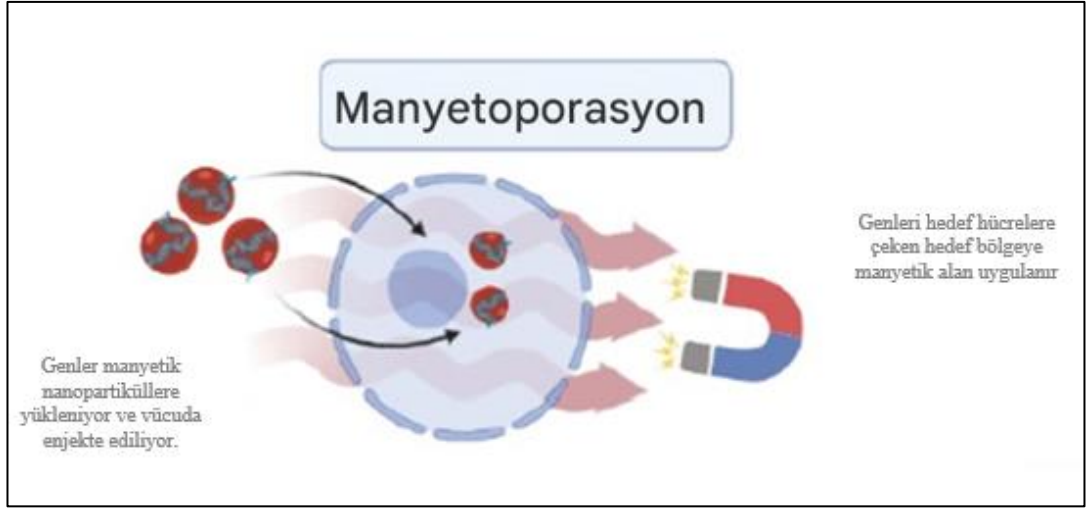
Sonoporasyon, ya da sonofeksiyon, elektroporasyon ile benzer bir prensibe dayanır ve hücre zarında genetik materyalin geçişini sağlamak amacıyla ultrason dalgalarını kullanır. Bu süreçte genellikle yüksek yoğunluklu ultrason dalgaları kullanılır, ancak işlemin etkinliği ve gözeneklerin geçebileceği genetik materyalin boyutu, uygulanan ultrason dalgalarının yoğunluğuna bağlı olarak değişir. Ultrason dalgalarının etkisi, kavitasyon adı verilen bir süreçle gerçekleşir. Bu süreçte, düşük basınçlı kabarcıklar veya boşluklar, uygulanan akustik alan tarafından oluşturulup ani çökme ile büyük miktarda enerji açığa çıkarır. Bu olay sonoporasyon mekanizmasının etkinleşmesine katkıda bulunarak çevresel sıcaklık ve basınçta belirgin bir artışa neden olmaktadır. Bu sayede oluşan gözenekler, genetik materyalin hücre zarlarından geçerek hücrenin sitoplazmasına ulaşmasını sağlar.

Bu yöntem, invaziv olmaması nedeniyle önemli bir avantaj sunar, bu da gen terapilerinin lokalize edilmediği veya daha derin alanlara yönlendirildiği durumlarda kullanılabilmesini mümkün kılar. Ayrıca, sonopore tekniği lokal gen terapisi için de uygundur. Bu durumda, kontrast ajanı ve genetik materyal önce kan dolaşımına verilir ve ardından ultrason dalgaları uygulanır. Kontrast ajanı, hedeflenen dokuya özel bağlayıcı ajanlar veya ligandlar ile birleşerek, genetik materyalin bu belirli dokuya etkili bir şekilde iletilmesini sağlar (Delalende vd., 2012).



**Şekil 1.8.** Hidrodinamik gen transfer yöntemi (Hill vd., 2016)

Hidrodinamik gen transferi tekniğinde, genetik materyallerin hücre zarlarından geçmesini sağlamak amacıyla yüksek hızda hidrostatik basınç kullanılır. DNA çözeltisi çok hızlı bir şekilde enjekte edildiğinde, enjeksiyon bölgesinde basınç birikir ve bu da hücre zarlarında geçici gözeneklerin oluşmasına yol açar. Bu gözenekler, DNA'nın hücre içine geçmesini ve gen ekspresyonunu başlatmasını mümkün kılar. Farelerin kuyruk damarına, vücut ağırlığının %8'inden fazla DNA çözeltisi enjekte edilmesi sonucunda, karaciğer, akciğerler, kalp ve böbrekler gibi organlarda yeterli transgen ekspresyonu gözlemlenmiştir. En yüksek gen ekspresyonu ise karaciğerde gerçekleşmiştir (Suda vd, 2007). Bu süreç, kemirgenlerde gen transferi için faydalı olduğu kanıtlanmış olsa da, insanlarda geniş çapta kullanılmamaktadır. Yüksek basınç birikiminin hepatositlerde karaciğer enzimlerinin artışına neden olabileceği ve büyük miktarlarda genetik çözeltisi enjekte edilmesi durumunda kalp fonksiyon bozuklukları ve karaciğer tıkanması gibi dolaylı sorunlara yol açabileceği gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, bu tekniğin olumsuz etkilerini aşmak amacıyla daha büyük hayvanlarda, örneğin domuzlarda, gen transferi için kateter kullanımını önermiştir. Bununla birlikte, elde edilen iyileştirilmiş sonuçlara rağmen, bu yöntemin insanlarda gen aktarımı açısından klinik olarak uygulanabilir hale gelebilmesi için kapsamlı ek araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Dutta vd., 2021).



Şekil 1.9. Magnetofeksiyon yöntemi (Hill vd., 2016)

Manyetik transfeksiyon ya da magnetofeksiyon, genetik materyalin hücre zarını aşarak sitoplazmaya geçmesini sağlamak için manyetik alan kullanır. Bu süreçte, manyetik nanopartiküllerle yüklenmiş nükleik asit temelli vektörler, manyetik alan tarafından yönlendirilir. Manyetik vektörler, lipid veya polimer bazlı genetik vektörlerin manyetik nanopartiküllerle birleştirilmesiyle oluşturulur. Genellikle demir oksit kullanılarak nanopartiküllere manyetik özellik kazandırılır. Uygulanan dış manyetik alan, gen taşıyan manyetik vektörleri hedef hücrelere yönlendirir ve bu hücrelerde gen ekspresyonunun gerçekleşmesini sağlar (Zhang vd., 2010). Araştırmalar, manyetik alanın genetik materyalin hücre zarını geçme yeteneğini artırdığını ortaya koymuştur. Ayrıca, bu alan, genlerin hücrenin iç yapılarıyla daha fazla etkileşimde bulunmasını sağlayarak, transfeksiyon ve gen ekspresyonunun artırılmasına yardımcı olur. Magnetofeksiyon, elektroporasyona kıyasla birçok üstünlüğe sahiptir. Magnetofeksiyonun en dikkat çekici avantajlarından biri, elektrotların hedef hücrelerle doğrudan temasını gerektirmemesi olup, bu özelliği yöntemi daha pratik ve minimal invaziv bir hale getirmektedir. Ayrıca, bu teknik daha düşük maliyetli ve zaman açısından daha verimli bir alternatif sunarken, elektroporasyon ile ulaşılamayan derin dokulara ve anatomik bölgelere etkin bir şekilde nüfuz edebilme kapasitesine sahiptir. Yapılan araştırmalar, magnetofeksiyonun gen transferi açısından kardiyak dokular, tümör hücreleri, melanomlar ve pulmoner metastazlar üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Li vd., 2009).

#### **1.4.2.2. Kimyasal Sistemler**

Son yıllarda, kimyasal sistemler genetik materyal taşınmasında viral vektörlere kıyasla daha düşük etkinlik göstermesine rağmen, düşük toksisite profili, daha yüksek gen yükleme kapasitesi, immün yanıt tetikleme riskinin minimal düzeyde olması ve üretim süreçlerinin daha kolay yönetilebilir olması gibi önemli avantajlar sunmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle, kimyasal taşıyıcı sistemler gen terapisi ve genetik mühendislik uygulamalarında giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu sistemlerin çoğu katyonik özellik gösterir ve katyonik polimerler, katyonik lipidler, karbon nanotüpleri, kuantum noktaları, metal nanopartiküller ve silika tabanlı sistemler gibi farklı inorganik materyaller içerir.

Katyonik moleküller, elektrostatik kuvvetler aracılığıyla genetik materyalleri taşıyan negatif yüklü nükleik asitlerle güçlü kompleksler oluşturabilir. Bu kompleksler, hedefleme ligandlarıyla birleştiğinde, hücre içi alım, endozomal kaçış ve genin sitoplazma veya çekirdeğe iletilmesi gibi gen aktarımı engellerini aşma kapasitesine sahiptir. Ayrıca, bu sistemler genetik materyali çevresel bozulmalardan koruyarak sürdürülebilir bir gen ekspresyonu sağlama potansiyeline sahiptir.

### **1.5. Nanoboyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemler**

#### **1.5.1. Polimerik Nanopartiküller**

Günümüzde nanoteknoloji, biyotıp alanında özellikle hastalıkların erken teşhisi ve hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarında sağladığı özgün avantajlar sayesinde hızla gelişmekte ve klinik uygulamalarda artan bir ilgi görmektedir (Parveen vd, 2012). Nanopartiküller, doğal veya sentetik polimerlerden sentezlenen, boyutları 10-100 nm arasında değişen katı kolloidal parçacıklardır. Nanopartiküller ultra küçük boyutta olmaları, yüzey/hacim oranlarının yüksek olması ve modifiye edilebilir yapısal özellikler sergilemeleri nedeniyle birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Bu avantajlar arasında hedefe yönelik taşıma, kontrollü ve sürekli ilaç salım sağlama, minimum yan etki görülürken yüksek düzeyde etkinlik sağlanması ve hasta uyum düzeyini artırması sayılabilmektedir (Devrim ve Bozkır, 2017).

Son yıllarda, nanopartikül tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı ve bunların biyomedikal uygulamadaki potansiyellerine yönelik araştırmalar belirgin biçimde artış

göstermektedir. Nano boyuttaki bu taşıyıcı yapılar, spesifik hedefleme kabiliyetleri, kontrollü salım özellikleri ve terapötik ajanların biyoyararlanımını artırırken sistemik toksisiteyi azaltma potansiyelleri sayesinde, konvansiyonel ilaç taşıma stratejilerine kıyasla önemli avantajlar sunmaktadır. Ayrıca, yüzey fonksiyonelleştirmeye elverişli olmaları, bu sistemlerin biyolojik engelleri aşma ve hücre içi hedeflere ulaşma konusundaki etkinliğini daha da artırmaktadır. (De Jong ve Borm, 2008). Buna ek olarak, nanopartiküler taşıyıcı sistemler, içerdiği etkin bileşikler biyolojik ortamlarda karşılaşılan enzimatik degradasyona karşı koruyarak, bu ajanların biyolojik bariyerleri etkin bir şekilde aşmalarını ve hedef dokuya ulaşmalarını kolaylaştırmaktadır (Masareddy vd., 2011). Nanotaşıyıcılar, antikanser ilaçlarının yanı sıra genetik materyaller, peptitler, proteinler ve hormonlar gibi çeşitli etkin maddelerin vücuda iletilmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Ganta vd., 2008; Lim vd., 2012).

Nanotaşıyıcılar, yapılarına göre polimerik, lipid, metal ve inorganik olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır. Polimerik nanotaşıyıcı sistemler, yapısal özelliklerine göre polimerik nanopartiküller, polimerik miseller ve dendrimerler olmak üzere çeşitli alt sınıflara ayrılmaktadır. Benzer şekilde, lipid bazlı nanotaşıyıcılar arasında ise başlıca lipozomlar ve katı lipid nanopartiküller (solid lipid nanoparticles, SLN) yer almakta olup, bu sistemler hem hidrofilik hem de lipofilik ajanların taşınmasında geniş uygulama alanı bulmaktadır. Metal ve inorganik nanotaşıyıcılara ise altın nanopartiküller ve kuantum noktacıkları örnek olarak verilebilir (Conniot vd., 2014). Klinik çalışmalar, onaylanmış ilaçlar ve mevcut literatürler incelendiğinde, nanotaşıyıcı sistemler arasında en yaygın kullanılanların lipozomlar ve polimerik nanopartiküller olduğu görülmektedir (Anselmo ve Mitragotr, 2016).

Polimerik nanopartiküller, genellikle 10 ila 1000 nm aralığında boyutlanan ve taşıdıkları bileşenlerin dağılımına ile üretim tekniklerine bağlı olarak nanokapsül veya nanoküre şeklinde sınıflandırılan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemleridir. Bu yapıların morfolojik özellikleri, ilacın enkapsülasyon verimi, salım profili ve biyoyararlanımı üzerinde belirleyici rol oynamaktadır (Guterres vd., 2007). Nanokapsül formunda, ilaç polimerik bir zar ile çevrelenmişken, nanoküre yapılarında etkin madde, partikülün içerisinde homojen bir şekilde dağılan bir matriks içinde yer almaktadır.

Polimerik nanopartiküller, vücut içinde yüksek stabilite göstermeleri, dolaşımda uzun süre kalabilmeleri, hedef dokulara etkin şekilde nüfuz edebilmeleri, yüzeylerinin modifikasyona uygun olması ve kontrollü salım profilleri sunmaları gibi avantajları

sayesinde birçok hastalığın tedavisinde potansiyel taşıyıcı sistemler olarak araştırılmaktadır (Wang vd., 2008).

Suda yüksek çözünürlüğe sahip ilaçların polimerik nanopartiküllere yüklenmesi sırasında, etkin maddenin dış faza kaçması düşük enkapsülasyon verimine yol açmakta ve bu durum formülasyon geliştirme sürecinde önemli bir sorun teşkil etmektedir (Cheow ve Hadinoto, 2011). Polimerik nanopartiküllerin üretimi, temel olarak iki ana sınıfa ayrılmakta olup, uygun yöntemin seçimi polimerin ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Hazırlık aşamasında, biyouyumlu ve toksik olmayan biyoparçalanabilir polimerler tercih edilmekte olup, bu amaçla hem doğal hem de sentetik polimerlerden yararlanılmaktadır (Nagavarma vd., 2012). Polimerik nanopartiküller sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan kopolimerden biri de Poli (etilen glikol)-blok-poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PEG-*b*-PCL)'dir. Poli (etilen glikol)-blok-poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PEG-*b*-PCL), biyomedikal uygulamalar için kullanılan FDA onaylı nontoksik ve biyouyumlu polimerdir (Deng vd., 2019). (PEG-*b*-PCL) kopolimeri, biyobozunurluğu, biyouyumluluğu ve yükleme verimliliği sayesinde ilaç verme uygulamalarında kullanılan iyi bilinen bir amfifilik kopolimer sınıfıdır. Ayrıca, bazı kimyasalların kullanımı ve karmaşık adımlar atlandığından, suda dağılabilen nanopartiküller oluşturmak için bu kopolimerin kullanılması konusunda kesinlikle büyük bir avantaj sunar (Risangud vd., 2022).

PEG monomer birimi, hem polar oksijen atomundan hem de polar olmayan (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> biriminden oluşur. Bu nedenle, PEG hem polar hem de polar olmayan çözücülerin geniş bir yelpazesinde çözünür ve suda çözünürlüğünü veya parçalanma özelliklerini geliştirmek için hidrofobik ilaçlar için bir taşıyıcı sistem olarak yaygın kullanıma sahiptir. Poli (PEG-PCL) kopolimerleri biyolojik olarak parçalanabilir, amfifiliktir, sentezlenmesi kolaydır ve ilaç taşıyıcı sistemlerinde potansiyel uygulamalara sahiptir. PEG-PCL'nin iki bloklu kopolimerinde, PEG'in hidrofilik doğası ve PCL'nin hidrofobik doğası nedeniyle PEG dış kabuğu ve PCL bir iç çekirdeği oluşturur. PCL (poli  $\epsilon$ -kaprolakton), yarı kristal özelliği nedeniyle düzenli bir yapıya sahiptir ve vücutta implante edilebilir bir biyomateryal olarak kullanılmasına yardımcı olan ester bağlarının hidrolizi ile insan vücudunda bozunmaya uğrar. Uzun süreli implante edilebilir yapılar, PCL'nin yavaş bozunma profili özelliğine sahip olarak hazırlanabilir. PCL'nin yüksek erime noktası ve düşük cam geçiş sıcaklığı, amorf bölgenin kauçuksu durumda olması nedeniyle insan sisteminde yüksek dayanıklılık ile sonuçlanan yarı kristal yapı ile sonuçlanır. Ayrıca PCL'nin biyouyumluluk ve biyobozunurluk gibi özellikleri, kontrollü ilaç verme uygulamaları için çok uygundur. PCL

geniş bir ilaç yelpazesıyla afiniteye sahip olduğundan, ilaçlar formülasyon matrisinde eşit olarak dağılır, böylece ilaç salımının birkaç gün/aya varan uzun vadeli bozunmasını kolaylaştırır. PCL'nin bozunması, bir asidik yan ürün ile sonuçlanmaz bu da onu diğer polimerlerden daha üstün kılar. Yavaş bozunma ve yumuşak dokularla daha az biyouyumluluk, PCL'yi klinik uygulamalarda çok yetkin kılar. PCL'nin iyileştirilmesi, istenmeyen uzun vadeli bozunmasını artıran PEG gibi hidrofilik polimerlerle kopolimerizasyon şeklinde yapılmıştır. PEG-PCL diblok kopolimerleri hem PEG hem de PCL'nin avantajlarına sahiptir; biyoyararlanımda artış, yüksek ilaç yükleme ve kapsülleme etkinliği, hedef bölgeye ulaşırken moleküler boyutta düşüş ve patlama deşarjı, kanda maksimum kullanım için mevcut ilacı dışarı çekme ve görünmezlik yeteneği. PEG-PCL koblok polimerik nanopartiküller, genetik materyaller ve proteinler için taşıyıcı olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (Behl vd., 2020).

#### **1.5.1.1. Polimerik Nanopartikül Üretim Yöntemleri**

Polimerik nanopartiküller genellikle önceden sentezlenmiş polimerlerin kullanımı veya monomerlerin doğrudan polimerize edilmesi yoluyla üretilir (Castro vd., 2022). Yüklmesi planlanan etken maddenin türü ve uygulanacağı yönteme bağlı olarak, farklı üretim teknikleri tercih edilebilir. Temelde, polimerlerin hazır halde dispersiyonuna dayanan yöntemler ile monomerlerin polimerizasyonuna dayalı yaklaşımlar olmak üzere iki ana üretim stratejisi bulunmaktadır (Zielinska vd., 2020).

Önceden sentezlenmiş polimerler kullanılarak gerçekleştirilen yöntemler arasında emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma, tuzlama, diyaliz, iyonik jelleştirme ve çözücü emülsifikasyon-difüzyon gibi teknikler yer alır. Önceden sentezlenmiş polimerlerin kullanılması, monomerlerin polimerizasyonuna dayalı polimerik nanopartikül üretimine kıyasla daha kolay kontrol edilebilir bir süreç sunarken, aynı zamanda, daha yüksek verim elde edilmesine olanak tanır (Castro vd., 2022). Önceden sentezlenmiş polimerlerin kullanıldığı yöntemlerin büyük bir kısmında karşılaşılan ve birtakım dezavantajları da beraberinde getiren durum ise, polimerin çözünmesini sağlamak için organik çözücüler tercih edilmesidir. Ne yazık ki, bu çözücüler çevresel riskler ve toksisite açısından birtakım sorunlara yol açabilmektedir. Bunun yanı sıra, son formülasyonda istenmeyen organik çözücü kalıntılarının giderilmesi de gereklidir (Zielinska vd., 2020).

Öte yandan, polimerik nanopartiküller monomerlerin doğrudan polimerizasyonu ile sentezlenebilir ve bu işlem için mikro/nano emülsiyon, sürfaktan içermeyen emülsiyon ve arayüzey polimerizasyonu gibi yöntemler kullanılabilir. Monomerlerin polimerizasyonu ile sentezlenen nanopartikül formülasyonları, tek adımda yükleme imkânı sağlayarak etken maddelerin daha verimli bir şekilde enkapsülasyonuna olanak tanımaktadır (Zielinska vd., 2020).

Polimerik nanopartiküllerin sentezinde kullanılacak yöntemin belirlenmesi, polimerin yapısı, uygulanma şekli ve istenen partikül boyutu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak yapılmalıdır. Genel olarak, sentez yöntemi seçilirken en önemli kriterlerden biri, aktif maddenin çözünürlük özellikleridir (Castro vd., 2022).

#### **1.5.1.1.1. Solvent Evaporasyon Yöntemi**

Solvent buharlaştırma yöntemi, önceden sentezlenmiş polimerlerin kullanıldığı ve polimerik nanopartikül üretimi için geliştirilen ilk tekniklerden biridir. Bu yöntemin temel prensibi, polimerin uygun bir organik çözücü içerisinde çözülmesini takiben, bu organik fazın sulu bir ortamda emülsifiye edilmesi ve ardından organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla koloidal boyutta nanopartiküllerin oluşturulmasına dayanmaktadır. Sürecin ilk aşamasında, polimer uygun bir organik çözücü içerisinde çözülerek homojen bir çözelti elde edilir. Bu aşamada, yüklenmesi planlanan etken madde de çözeltiye eklenerek polimer matrisi içinde enkapsülasyonu sağlanır. Ardından, elde edilen organik faz, sulu faz içerisinde uygun bir sürfaktan yardımıyla emülsifiye edilir. Bu emülsifikasyon işlemi, genellikle yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir. Böylece, su içinde yağ veya çift emülsiyon sistemleri oluşturulabilir. Nanopartiküllerin başarılı bir şekilde oluşumu için emülsiyon damlacıklarının stabilize edilmesi ve çözücünün etkin bir şekilde uzaklaştırılması gerekmektedir (Castro vd., 2022).

Çözücünün uzaklaştırılması, genellikle iki temel yöntemle gerçekleştirilir. Birincisinde, emülsiyon oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak çözücünün buharlaşması sağlanır. Alternatif olarak, çözücü, düşük basınç altında yavaş bir şekilde uzaklaştırılarak nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Çözücü tamamen buharlaştıktan sonra, nanopartiküller katı faza geçerek süspansiyon içerisinde stabilize edilir. Son aşamada, elde edilen polimerik nanopartiküller, fazla serbest polimer veya etken maddeden arındırılması için birkaç kez yıkama işlemine tabi tutulur. Genellikle de santrifüjleme işlemi kullanılarak

partiküller çöktürülerek saflaştırılır. Daha sonra, uzun süreli depolama ve stabilite sağlamak amacıyla nanopartiküller dondurularak kurutulabilir. Solvent buharlaştırma yöntemi, kontrollü partikül boyutu ve yüksek enkapsülasyon verimliliği göstermesi nedeniyle polimerik nanopartikül üretimi, günümüzde yaygın olarak kullanılan ve son derece etkili bir teknik haline gelmiştir (Zielinska vd., 2020).

#### **1.5.1.1.2. Emülsifikasyon/Solvent Difüzyonu Yöntemi**

Emülsifikasyon/solvent difüzyonu yöntemi, polimerik nanopartiküllerin üretiminde yaygın olarak kullanılan ve hem polimerin hem de etken maddenin uygun bir çözücü ortamında çözünmesini gerektiren etkili bir tekniktir. Bu yöntemin temel prensibi, kısmen suyla karışabilen bir organik çözücüde çözünmüş olan polimer ve etken maddenin, sürfaktan içeren sulu bir çözeltiyle emülsifiye edilerek stabil bir emülsiyon oluşturulmasına dayanmaktadır.

Sürecin başlangıcında, organik faz içerisinde çözölmüş polimer ve etken madde karışımı hazırlanır. Bu organik faz, su ile önceden karıştırılmış bir organik çözücü içerdüğinden, çözücü difüzyonu kontrollü bir şekilde gerçekleşebilir. Hazırlanan organik faz, sulu faz içerisine kontrollü bir şekilde eklenerek karıştırılır ve sürfaktan yardımıyla stabil bir yağ içinde su (y/s) emülsiyonu elde edilir. Bu aşamada, yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon gibi yöntemler kullanılarak emülsiyon damlacıklarının boyutu küçöltölür ve daha homojen bir dağılım sağlanır. Oluşturulan emülsiyon, sistemde bulunan organik çözücünün sulu faza difüzyonunu artırmak amacıyla fazla miktarda su ile seyreltilir. Bu seyreltilme işlemi, organik çözücünün dış faza daha hızlı yayılmasına neden olur ve böylece polimer çökelerek nanopartikül oluşumunu başlatır. Sonuç olarak, difüzyon sürecinin tamamlanmasıyla birlikte stabil kolloidal partiküller elde edilir.

Bu yöntemin son aşamasında, sistemde kalan organik çözücünün uzaklaştırılması için genellikle buharlaştırma veya süzme işlemi uygulanır. Buharlaştırma işlemi, çözücünün düşük basınç altında uzaklaştırılmasını sağlarken, süzme işlemi ise partiküllerin saflaştırılması ve fazla sıvı fazın giderilmesi için kullanılabilir. Ancak, emülsifikasyon/solvent difüzyonu yönteminin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. En önemli sınırlamalardan biri, kolloidal süspansiyondan büyük miktarda sulu fazın uzaklaştırılmasının gerekliliğidir, bu da işlem süresini ve maliyetini artırabilir. Ayrıca, hidrofilik etken maddelerin sulu faza difüze olma eğilimi nedeniyle, etken madde yükleme

kapasitesinde azalma ve kayıplar yaşanabilir. Bu durum, özellikle yüksek oranda hidrofilik etken maddeler için yöntem verimliliğini düşürebilir (Zielinska vd., 2020).

#### **1.5.1.1.3. Emülsifikasyon/ Tuz Etkisiyle Çözünürlük Azalması (Salting Out)**

##### **Yöntemi**

Emülsifikasyon/tuz etkisiyle çözünürlük azalması (salting out) yöntemi, polimerik nanopartiküllerin üretiminde kullanılan ve emülsifikasyon/çözücü difüzyon yönteminin bir türevi olarak kabul edilen bir tekniktir. Bu yöntemin temel prensibi, su ile karışabilen organik bir çözücünün, belirli tuzlama maddelerinin etkisiyle sulu fazdan ayrılması ve bunun sonucunda nanopartikül oluşumunun sağlanmasıdır. Emülsifikasyon/tuz etkisiyle çözünürlük azalması yöntemi, özellikle su ile tamamen karışabilen organik çözücülerin kullanıldığı sistemlerde etkili bir üretim tekniğidir.

Bu yöntemin en belirgin özelliği, su ile karışabilen çözücülerin (örneğin aseton veya etanol) kullanıldığı yağ içinde su (y/s) emülsiyonlarının oluşturulmasıdır. Sistemin dış fazı, nanopartiküllerin stabilizasyonunu sağlamak için jel yapıdaki bir çözelti içinde koloidal stabilizatörler ve tuzlama maddeleri içermektedir. Bu yöntemde yaygın olarak kullanılan tuzlama maddeleri arasında magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ), kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ) ve magnezyum asetat [ $Mg(CH_3COO)_2$ ] gibi elektrolitler bulunur. Bunun yanı sıra, elektrolit içermeyen tuzlama ajanları da kullanılabilir; örneğin, sukroz gibi bileşikler çözücü ayrılmasını teşvik eden katkı maddeleri arasında yer alır.

Prosesin başlangıcında, polimer ve etken madde, aseton veya etanol gibi suyla karışabilen bir organik çözücüde çözülerek homojen bir karışım elde edilir. Ardından, bu organik faz sulu bir ortama ilave edilir ve sürfaktan yardımıyla stabil bir yağ/su (y/s) emülsiyonu oluşturulur. Emülsifikasyon işlemi sırasında yüksek hızlı karıştırma uygulanarak daha küçük ve homojen emülsiyon damlacıkları elde edilir. Bu aşamada, organik çözücünün sulu faz içinde çözünürlüğünü azaltmak için tuzlama maddeleri kullanılır. Tuzlama maddelerinin varlığı, organik çözücünün sulu çözeltiden ayrılmasını teşvik ederek polimerin çökmesini ve nanopartikül oluşumunu sağlar.

Nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezlenmesi için emülsiyonun uygun bir hacimde deiyonize su veya başka bir sulu çözelti ile seyreltilmesi gerekmektedir. Bu seyreltme işlemi, çözücünün dış faza daha fazla yayılmasını sağlarken, polimerin

çökmesini hızlandırarak partikül oluşumunu destekler. Sürecin son aşamasında, sistemde kalan organik çözücüler ve tuzlama maddeleri, çapraz akışlı filtrasyon gibi tekniklerle ortamdan uzaklaştırılır. Bu saflaştırma işlemi, elde edilen nanopartiküllerin yüksek saflıkta olmasını sağlarken, istenmeyen yan ürünlerin veya kalıntı çözücülerin uzaklaştırılmasına yardımcı olur.

Bu yöntem, yüksek sıcaklık gerektirmediğinden dolayı, ısıya duyarlı etken maddelerin korunması açısından avantajlıdır. Özellikle biyolojik olarak aktif proteinler, enzimler veya sıcaklığa duyarlı farmasötik bileşiklerin enkapsülasyonu için uygun bir tekniktir. Ancak yöntemin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi, nanopartiküllerin ve sistemdeki safsızlıkların çözünürlüklerinin birbirine yakın olabilmesidir. Bu durum, partiküllerin saflaştırılmasını zorlaştırarak verimliliğin düşmesine neden olabilir. Bunun yanı sıra, işlem sırasında kullanılan tuzlama maddelerinin uygun şekilde uzaklaştırılmaması, elde edilen nanopartiküllerin saflığını olumsuz etkileyebilir (Castro vd., 2022; Zielinska vd., 2020).

#### **1.5.1.1.4. Nanopresipitasyon (Çözücü Yer Değiştirme) Yöntemi**

Nanopresipitasyon, diğer adıyla çözücü yer değiştirme yöntemi, polimerik nanopartiküllerin sentezi için yaygın olarak tercih edilen, basit, verimli ve ölçeklenebilir bir tekniktir. Düşük enerji gereksinimi ve uygulama kolaylığı gibi avantajları sayesinde, bu yöntem; kontrollü ilaç salımı, hedefe yönelik tedavi ve diğer biyomedikal uygulamalar başta olmak üzere çok sayıda alanda yaygın şekilde tercih edilen bir üretim stratejisi haline gelmiştir. Bu yöntem, birbiriyle karışabilen iki çözücü sistemine dayanmakta olup, polimerin uygun bir organik çözücü içerisinde çözündürülmesini ve ardından kontrollü bir şekilde sulu faza eklenmesini esas alır. Genellikle, su ile karışabilen bir organik çözücü içerisinde çözünen polimer, bu çözücünün sulu ortama difüzyonu sırasında çözünürlüğünü kaybederek spontan olarak nanopartikül oluşumuna neden olur. Bu süreç, çözücünün yer değiştirmesi, polimer çökme kinetiği ve ortamın termodinamik dengesine bağlı olarak gerçekleşir, böylece homojen ve kontrollü bir partikül sentezi sağlanır.

Süreçte iç faz olarak adlandırılan organik çözücü genellikle aseton, asetonitril veya benzeri çözücülerdir. Bu çözücüler su ile karışabilir özellikte olup, ortamdan buharlaştırma yoluyla kolayca uzaklaştırılabilirler. Organik çözücü içinde çözünen polimer, lipofilik bir çözeltiliden sulu faza geçtiğinde, arayüzeyde çökerek nanopartikül oluşumuna neden olur.

Prosesin önemli bir aşaması, polimer çözeltisinin sulu ortama eklenme şeklidir. Polimer çözeltisi genellikle sulu faza damla damla veya kontrollü bir hızda kademeli olarak eklenir. Bu aşamada sistemin karıştırılması kritik bir faktördür, çünkü karıştırma hızı ve difüzyon süreci, partikül boyutunun ve dağılımının kontrol edilmesine doğrudan etki eder. Organik çözücü, su ile karışma sürecinde hızla sulu faza difüze olur ve polimer, su moleküllerinden kaçınarak anında çökerek nanopartikül oluşumunu tetikler. Bu çökme mekanizması sonucunda polimer, nanokapsül veya nanoküre yapıları oluşturacak şekilde organize olur. Çözücünün nanopartikül yapısından uzaklaşması ile partiküller stabil hale gelir ve belirli bir büyüklük aralığında sabitlenir. Çoğu durumda, organik fazın sulu faza eklenmesiyle nanopartikül üretimi gerçekleştirilse de, bu yöntem belirli modifikasyonlarla ters yönde de uygulanabilir. Yani, uygun şartlar sağlandığında, sulu fazın organik çözücü içine eklenmesi de nanopartikül oluşumunu engellemeden gerçekleştirilebilir.

Nanopartiküllerin stabilizasyonu için genellikle yüzey aktif maddeler (sürfaktanlar) kullanılabilir. Yüzey aktif maddeler, partiküllerin çökmesini veya aglomerasyonunu engelleyerek uzun süre stabil kalmalarını sağlar. Bununla birlikte, nanopresipitasyon yöntemi, yüzey aktif madde eklenmeden de başarılı şekilde uygulanabilir. Bu nedenle, sürfaktan kullanımı, sistemin ihtiyacına ve hedeflenen partikül özelliklerine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Bu yöntemin en belirgin avantajlarından biri, yüksek sıcaklık gerektirmemesi ve çok aşamalı, karmaşık reaksiyon süreçlerine ihtiyaç duymadan uygulanabilmesidir. Düşük enerji gereksinimi ve basit işlem adımları sayesinde, ısıya duyarlı bileşiklerin korunmasına olanak tanırken, ölçeklenebilirliği ve tekrarlanabilirliği ile de dikkat çekmektedir. Böylece, ısıya duyarlı biyomoleküllerin veya farmasötik bileşiklerin enkapsülasyonu için uygun bir teknik olarak kabul edilir. Ayrıca, yöntem hızlı ve kolay bir şekilde uygulanabilir olup, ölçeklenebilir bir süreç olması sayesinde endüstriyel üretim için de uygunluk göstermektedir. Bu yöntemin avantajlarının yanı sıra birtakım kısıtlamaları da bulunmaktadır. Örneğin, kullanılan çözücünün tamamen uzaklaştırılması gerekliliği, özellikle büyük ölçekli üretimlerde ekstra saflaştırma adımları gerektirebilir. Ayrıca, polimerin çökme mekanizmasının kontrolü, partikül boyut dağılımını belirleyen kritik bir faktördür. Bu nedenle, üretim sürecinde proses parametrelerinin titizlikle optimize edilmesi, istenen partikül özelliklerinin elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Çökme dinamikleri, çözücü-antisolvan etkileşimleri ve difüzyon hızları gibi faktörlerin dikkatlice

ayarlanması, homojen ve stabil nanopartikül sentezini sağlamada belirleyici rol oynamaktadır (Zielinska vd., 2020).

#### **1.5.1.1.5. İyonik Jelleşme Yöntemi**

İyonik jelleşme yöntemi, hidrofilik ve iyonik özellik gösteren polimerler kullanılarak nanopartiküllerin sentezlenmesini sağlayan basit ve etkili bir tekniktir. Genellikle aljinat, kitosan veya karboksimetilselüloz gibi polielektrolitlerin kullanıldığı bu yöntem, ters yüklü polielektrolitler arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanır. Bu süreç, proteinler, peptitler ve oligonükleotidler gibi biyomoleküllerin korunarak kapsülasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerlerin, ters yüklü iyonlar veya başka polimerlerle reaksiyona girerek çökmesi sonucu çapraz bağlı bir yapı oluşur ve böylece stabil nanopartiküller elde edilir. Öte yandan, çözücü emülsifikasyon-difüzyon yöntemi, çözücü buharlaştırma yönteminin bir varyasyonu olarak geliştirilmiştir. Bu teknikte, polimer kısmen suda çözünebilen bir organik çözücü içinde çözündürülür ve ardından sulu faz ile karıştırılarak termodinamik denge sağlanır. Nanopartikül oluşumu, organik çözücünün suya difüzyonu ile polimerin çökmesi sonucu gerçekleşir. Organik çözücü, sulu faz içinde belirli bir oranda çözünür olduğunda, çözücü fazın fazla suya yayılmasıyla birlikte polimer çökerek nanopartikülleri oluşturur.

Bu yöntemin avantajları arasında: Basit ve uygulanabilir bir süreç olması, elde edilen nanopartiküllerin dar boyut dağılımına sahip olması, yüksek üretim verimi sunması, ekstra homojenizasyon gerektirmemesi yer almaktadır. Ancak, bu yönteminde avantajları yanında birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Süspansiyondan büyük miktarda suyun uzaklaştırılması gerekliliği bu yöntemin en önemli dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu, üretim sürecinde ek saflaştırma adımlarını (örneğin santrifüjleme, filtrasyon veya dondurarak kurutma) gerektirebilir (Castro vd., 2022).

#### **1.5.2. Lipozomlar**

Lipozomlar, hidrofilik çekirdeği çevreleyen bir ya da daha fazla sayıda fosfolipit çift tabakadan oluşan, amfifilik özellik taşıyan veziküler sistemlerdir. Bu çift tabakalı fosfolipit yapısı hem hidrofilik hem de hidrofobik moleküllerin lipozomal sisteme entegre edilmesine imkân tanıyarak, taşıyıcı sistemler olarak geniş bir biyomedikal ve farmasötik uygulama alanına katkı sağlamaktadır. Enkapsüle edilen ilacın çözünürlüğünü artırma, biyolojik ve kimyasal bozulmaya karşı koruma sağlama gibi avantajlar sunarak hedef bölgede

biyodağılımı iyileştirebilirler. Ayrıca, yüzey modifikasyonları ile spesifik hedeflere yönlendirilmeleri mümkündür. Hücre membranına benzer yapıları sayesinde ilaç moleküllerinin hücre alımını kolaylaştırır. Biyouyumlu, biyobozunur, toksik olmayan ve immünojenik etki göstermeyen özellikleri nedeniyle en yaygın araştırılan ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olarak öne çıkmaktadırlar (Khizar vd., 2022).

Sharma ve Agraval (2021) tarafından belirtildiği üzere, diğer ilaç taşıyıcı sistemlerle kıyaslandığında lipozomların başlıca avantajları şunlardır:

- Biyouyumlu, biyobozunur ve immünojenik olmayan biyomateryallerden oluşurlar.
- Basit yapıları sayesinde farklı amaçlarla kullanılmak üzere kolayca modifiye edilebilirler.
- İçerdikleri aktif bileşenleri çevresel faktörlerden koruyarak bir depo görevi görürler.
- Yüksek biyouyumluluk gösterirler.
- İlaçların biyoyararlanımını ve tedavi edici etkinliğini artırır.
- Aktif bileşenlerin daha düşük dozlarda etkili olmasını sağlayarak yan etki riskini azaltabilirler.
- Tanı ve tedavi amaçlı olarak oküler, oral, pulmoner, transdermal ve parenteral yollarla uygulanabilme esnekliğine sahiptirler.

Lipozomal ilaçlar arasında ticari olarak geliştirilen ilk ürün, 1995 yılında FDA tarafından onaylanan Doxil'dir. Günümüzde birçok lipozomal formülasyon klinik kullanıma sunulmuş olup, birçoğu da halen klinik araştırma aşamasındadır. Lipozomların sunduğu çok yönlü avantajlara rağmen, üretim süreçlerinde karşılaşılan bazı zorluklar uygulamalarını kısıtlamaktadır. Özellikle partikül boyutunun tutarsızlığı, yüksek üretim maliyetleri ve stabilite sorunları, bu kısıtlamaların başlıca nedenleri arasında yer almaktadır (Edwards vd., 2006).

#### **1.5.2.1. Lipozomların Yapısı**

Lipozomların yapısındaki temel bileşenler, lipitler veya lipit karışımlarıdır; bunlar arasında fosfolipitler ve kolesterol en yaygın kullanılan bileşenlerdir. Lipit bileşimi, lipozomların partikül boyutu, rijiditesi, membran akışkanlığı, stabilitesi ve elektriksel yük gibi birçok önemli özelliğini etkileyen kritik bir faktördür. Fosfolipitler, elde edildikleri kaynağa bağlı olarak temel olarak doğal kökenli (bitkisel veya hayvansal kaynaklı) ve

sentetik olarak üretilmiş formlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma, fosfolipitlerin fizikokimyasal özelliklerini, biyouyumluluklarını ve farmasötik uygulamalardaki işlevselliklerini doğrudan etkilemektedir. Doğal fosfolipitler ise, bitkisel (örneğin soya fasulyesi, pamuk tohumu gibi) ve hayvansal (örneğin yumurta sarısı) kaynaklardan elde edilebilmektedir.

Doğal lipitler, soya fasulyesi ve yumurta sarısı gibi farklı doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipitlerden oluşur. Fosfolipitler, polar baş gruplarına göre farklı türlere ayrılır; bunlar arasında fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilgliserol (PG) ve fosfatidik asit (PA) yer alır. Doğal fosfolipitlerin doymamış hidrokarbon zincirleri nedeniyle, sentetik fosfolipitlere kıyasla stabiliteleri genellikle daha düşüktür (Nsairat ve ark., 2022). Sentetik lipitler, doğal fosfolipitlerin polar ve nonpolar bölgelerinin kimyasal olarak modifiye edilmesiyle üretilir. Genellikle, doymuş sentetik fosfolipit türevleri stearik ve/veya palmitik yağ asitlerine dayanmaktadır. Palmitik asit bazlı sentetik fosfolipitlere örnek olarak, 1,2-Dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosforiletanolamin, 1,2-Dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfatidik asit sodyum tuzu, 1,2-Dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosforilgliserol sodyum tuzu ve 1,2-Dipalmitoil-sn-gliserol-3-fosfokolin (DPPC) verilebilir. Stearik asit bazlı sentetik fosfolipit örnekleri ise 1,2-Distearoil-sn-gliserol-3-fosforiletanolamin, 1,2-Distearoil-sn-gliserol-3-fosfatidik asit Na tuzu, 1,2-Distearoil-sn-gliserol-3-fosforilgliserol sodyum tuzu ve 1,2-Distearoil-sn-gliserol-3-fosfokolin şeklinde sıralanabilir (Hu vd., 2021).

Steroidler, siklopentanoperhidrofenantren halkasına sahip olan hidrofobik lipitlerdir. Bu lipitlerden kolesterol, lipozomal çift tabakanın yapısına entegre olarak lipozomların sertliğini ve stabilitesini artırır. Genellikle, toplam lipit miktarının %30'undan daha düşük bir oranla kullanılırlar. Yüzey etkin maddeler, karışmayan fazlar arasındaki yüzey gerilimini düşürerek lipozomların enkapsülasyon etkinliğini ve etkin madde salım özelliklerini modifiye etmek amacıyla lipozom formülasyonlarında kullanılır. Sodyum kolat, Span 60, Span 80, Tween 60 ve Tween 80, bu amaçla sıklıkla tercih edilen yüzey etkin maddelere örnek olarak verilebilir (Nsairat vd., 2022).

#### **1.5.2.2. Lipozomların Sınıflandırılması**

Lipozomlar literatürde çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmuştur. Bu sınıflandırmalar, lipozomların yapısal özellikleri, üretim yöntemleri, kullanım alanları ve kimyasal bileşimleri

gibi faktörler dikkate alınarak oluşturulmuştur. Lipozomların boyutu, biyolojik sistem içerisinde kalış süresini belirlerken hem boyutları hem de tabaka sayıları, yapı içerisinde enkapsüle edilecek etken madde miktarını etkilemektedir. Tabaka sayılarına göre lipozomlar tek tabakalı, çok tabakalı ve multi-veziküler vezikül olmak üzere üç ana gruba ayrılır.

- Tek tabakalı lipozomlar, tek bir fosfolipit tabakası ile çevrili olup, küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV), büyük tek tabakalı lipozomlar (LUV) ve dev tek tabakalı veziküller (GUV) olarak üçe ayrılır. SUV'lerin boyutu 20-100 nm, LUV'lerin boyutu 100 nm'den büyük, GUV'lerin boyutu ise 1000 nm'den büyük olarak tanımlanır.
- Çok tabakalı lipozomlar (MLV) ise 500 nm'den büyük olup, 5 ila 25 fosfolipit tabakasından oluşur. Bu tabakalar arasında sulu faz bulunur ve iç içe geçmiş çoklu yapılar oluşturur.

Bu farklı yapı özellikleri, lipozomların ilaç taşıma kapasiteleri ve biyolojik sistemlerdeki davranışları açısından önemli rol oynar (Pattni vd., 2015).

### 1.5.2.3. Lipozomların Üretim Yöntemleri

İdeal lipozomal formülasyonların geliştirilmesindeki temel hedef, etkin maddenin başarıyla veziküler yapıya entegre edilmesi, dar bir partikül boyutu dağılımına sahip olması ve uzun süre stabilitesini koruyabilen taşıyıcıların üretilmesidir. Etkin madde yüklü lipozomların hazırlanmasında pasif ve aktif yükleme yöntemleri kullanılmaktadır. Pasif yükleme yönteminde, etkin madde lipozom oluşumu sırasında yapıya dahil edilirken, aktif yükleme yönteminde ise bu süreç lipozom oluşumundan sonra gerçekleşmektedir. Pasif yükleme teknikleri, mekanik dispersiyon yöntemleri, çözücü dispersiyon yöntemleri ve deterjan uzaklaştırma yöntemi (enkapsüle edilemeyen maddelerin sistemden ayrılması) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır (Akbarzadeh vd., 2013).

Lipozom hazırlama yöntemleri 3 ana başlık altında sınıflandırılabilir:

1. Mekanik dispersiyon yöntemi, kendi içerisinde sonikasyon yöntemi, french pres yöntemi, dondurup çözme yöntemi, film hidrasyon yöntemi, mikroemülsiyon yöntemi ve membran ekstrüzyon yöntemi olmak üzere altı gruba ayrılmaktadır.
2. Çözücü dispersiyonu yöntemi, kendi içerisinde eter enjeksiyonu, etanol enjeksiyonu ve ters faz buharlaştırma yöntemi olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

3. Deterjan uzaklaştırma yöntemi, kendi içerisinde diyaliz, deterjan uzaklaştırma, jel permeasyon kromatografisi ve seyreltme yöntemi olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

#### **1.5.2.3.1. İnce Film Hidratasyon Yöntemi**

Lipozom hazırlamak için en yaygın kullanılan yöntem, Bangham yöntemi olarak da bilinen film hidrasyonu tekniğidir. Bu yöntemde, fosfolipitler ve kolesterol öncelikle organik bir çözücü içinde çözülür. Ardından çözücü, vakum altında buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılır. Çözücünün tamamen buharlaşmasının ardından, oluşan ince lipid filmi üzerine sulu bir tampon çözeltisi eklenir. Bu süreç, lipidlerin kendiliğinden şişerek hidrate olmasını ve lipozom yapısının oluşmasını sağlar. Film hidrasyonu yöntemiyle genellikle heterojen boyutlara sahip çok katmanlı veziküller (MLV) elde edilir. Elde edilen bu veziküllerin boyutları, sonikasyon ve ekstrüzyon gibi yöntemlerle küçültülebilir. Sonikasyon işlemi, probe veya su banyosu sonikatör kullanılarak gerçekleştirilir, ancak işlem sırasında açığa çıkan ısı hem lipidlerin hem de ilacın stabilitesine zarar verebilir. Ekstrüzyon yönteminde ise, polikarbonat membranlar kullanılarak lipozomların boyutu kontrollü bir şekilde küçültülür. Elde edilmek istenen partikül boyutuna bağlı olarak, ekstrüzyon döngü sayısı ve kullanılan polikarbonat membranların gözenek çapı belirlenir (Ahmed vd., 2019; Pattni vd., 2015).

#### **1.5.2.3.2. Sonikasyon Yöntemi**

Farklı tekniklerle hazırlanan çok katmanlı veziküller (MLV), prob sonikatör veya ultrasonik banyo kullanılarak sonikasyona tabi tutulur. Uygulanan ultrasonik dalgalar, numunede bulunan büyük ve çok katmanlı veziküllerin parçalanmasını sağlayarak daha küçük ve tek tabakalı veziküllerin oluşumunu destekler. Sonikasyon işlemi genellikle 5 ila 10 dakika sürmekte olup bu süreçte lipozomların boyutunda belirgin bir küçülme meydana gelmektedir. Prob sonikasyonunda, titanyum prob doğrudan lipozom dispersiyonuna daldırılarak yüksek enerji uygulanır. Ancak, işlem sırasında açığa çıkan ısıнын lipid yapısını bozmasını önlemek amacıyla formülasyon su veya buz banyosunda tutulur (Liu vd., 2020).

#### **1.5.2.3.3. Ekstrüzyon Yöntemi**

Lipozom ekstrüzyonu, büyük ve çok katmanlı veziküllerin membran filtrelerden geçirilmesiyle gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu süreçte, istenen vezikül boyutu uygulanan

basınca bağılı olarak kontrol edilir. Ekstrüzyon basıncının artırılması ve kullanılan membran filtrenin gözenek çapının küçültülmesi, lipozomların partikül boyutunun azalmasını sağlarken, aynı zamanda boyut dağılımının daha homojen hale gelmesine katkıda bulunur (Ahmed vd., 2019).

#### **1.5.2.3.4. Mikroemülsifikasyon Yöntemi**

Mikro-akışkanlaştırma tekniğine dayanan bu yöntem, lipit dispersiyonundan küçük ve çok katmanlı veziküller elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu süreçte, mikro-akışkanlaştırıcı cihaz, sıvıyı yüksek basınç altında 5 mikrometrelik bir açıklıktan geçirerek iletir. Sonrasında, iki sıvı akışı dik açılarda yüksek hızda çarpıştırılır ve mikro kanallar boyunca uygulanan basınç sayesinde etkin bir enerji transferi sağlanarak homojen ve kontrollü partikül oluşumu desteklenir. Elde edilen dispersiyon, istenen boyutta veziküller oluşana kadar mikro-akışkanlaştırıcıdan tekrar geçirilerek optimize edilebilir (Ahmed vd., 2019).

#### **1.5.2.3.5. Dondurma-Eritme Yöntemi**

Bu yöntemde, küçük tek tabakalı veziküller hızla dondurulduktan sonra oda sıcaklığında kontrollü bir şekilde çözündürülür. Ardından, kısa süreli sonikasyon uygulanarak agregasyonun teşvik edilmesi sağlanır ve böylece daha büyük tek tabakalı veziküller elde edilir (Liu vd., 2020).

#### **1.5.2.3.6. Eter Enjeksiyon Yöntemi**

Bu yöntemde, lipitler dietil eter veya metanol-eter karışımında çözülerek uygun bir organik faz oluşturulmakta; ardından, düşük basınç altında ya da 55-65°C sıcaklık aralığında, etkin bileşiğin sulu çözeltisine kontrollü şekilde ilave edilerek homojen bir karışım sağlanmaktadır. Eterin vakum altında uzaklaştırılmasıyla lipozomlar oluşur. Ancak, bu yöntemin başlıca dezavantajı, oluşan lipozomların heterojen bir yapıya sahip olması ve enkapsüle edilecek bileşiklerin yüksek sıcaklıkta işlenmesidir (Lombardo ve Kiselev, 2022).

#### **1.5.2.3.7. Etanol Enjeksiyon Yöntemi**

Bu yöntem, fosfolipitler ve kolesterolün çözülmesinde etanol kullanımına dayanır. Etanolde hazırlanan lipit çözeltisi, bir enjektör ve pompa aracılığıyla belirli bir hacimde karıştırılan sulu çözeltinin içine enjekte edilir. Lipit çözeltisi, sulu faz ile temas ettiği anda lipozomlar kendiliğinden oluşur. Daha sonra, lipozom dispersiyonu 15 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak dengelenmeye bırakılmaktadır. Bu yöntem, oksidatif değişimlere veya lipitlerin bozulmasına yol açmaksızın, ekstrüzyon veya sonikasyon gibi ek işlemlere gerek duyulmadan küçük ve tek katmanlı veziküllerin oluşumunu sağlamaktadır (Ahmed vd., 2019; Pattni vd., 2015).

#### **1.5.2.3.8. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemi**

Fosfolipitler, organik çözücüler içinde çözünerek ters misel oluşumu sağlar. Ardından, bu çözeltinin üzerine sulu bir faz (tampon) eklenir. Lipitlerin su-yağ ara yüzeyinde dizilmesiyle su içinde yağ (s/y) tipi emülsiyon oluşur. Organik çözücü, rotavapor aracılığıyla basınç altında uzaklaştırılır ve sonunda lipozomal viskoz jel yapısı elde edilir (Lombardo ve Kiselev, 2022).

#### **1.5.2.3.9. Deterjan Uzaklaştırma Yöntemi**

Deterjan uzaklaştırma yöntemi, tek katmanlı lipozomların elde edilmesini sağlayarak membran proteinlerinin yeniden yapılandırılmasına olanak tanımaktadır. Bu yöntemin ilk aşamasında, lipitler ve yüzey aktif maddeler bir araya gelerek karışık miseller oluşturur. Yüzey aktif maddeler, hidrasyon aşamasında ya da kurutulmuş lipit karışımının hazırlanma sürecinde formülasyona entegre edilebilmektedir. Karışık misel yapısındaki çözücünün, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi veya seyreltilme gibi tekniklerle uzaklaştırılmasıyla büyük tek katmanlı veziküller oluşur. Bununla birlikte, bu yöntemin bazı sınırlamaları ve dezavantajları da bulunmaktadır. Örneğin kullanılan yüzey aktif maddelerin lipozomlarla kontaminasyonu, biyomakromoleküllerin denatüre olma riski ve enkapsülasyon etkinliğinin azalması gibi sorunlarla karşılaşılabilir (Pattni vd., 2015).

#### **1.5.2.3.10. Mikroakışkan yöntemi**

Mikroakışkan teknolojisi, mikro kanal geometrileri içinde sıvı akışlarını kullanarak lipozomların hassas, tekrarlanabilir ve yüksek verimli bir şekilde sentezlenmesini sağlayan yenilikçi bir yöntem olarak son yıllarda öne çıkmıştır. Bu yöntemde, nanopartiküllerin oluşumu, bir taşıyıcı sıvıya itilen sıvı damlacıklarının belirli bir çip tasarımı boyunca püskürtmeden damlama rejimine kontrollü bir şekilde geçişini içerir. NP'lerin agregasyonunu ve çökmesini önlemek amacıyla, yüzey aktif maddeler stabilizatör olarak sentez aşamasında kullanılmaktadır. Mikroakışkan sistemler hem karışmayan hem de karışan sıvılar üzerinde üç boyutlu akış desenleri oluşturarak etkin bir karışım sağlayabilir (Carugo vd., 2016). Bu özellikleri sayesinde, lipozomlar ve diğer lipid bazlı nanopartiküllerin çip üzerinde üretimi mümkün hale gelmektedir. Ayrıca, bu teknik, sulu ve organik fazların karıştırılmasını hassas bir şekilde kontrol edebilme avantajına sahiptir. Sonuç olarak, optimize edilmiş özelliklere sahip lipozomlar, daha tutarlı ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilmektedir. Bu yöntem geliştirilmiş ölçeklenebilirlik, tekrarlanabilirlik ve arttırılmış enkapsülasyon etkinlikleri nedeniyle lipozomların üretilmesi için kullanılan konvansiyonel yöntemlere (lipit film hidrasyonuna/etanol enjeksiyonuna) alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Gkionis vd., 2021) .

#### **1.5.3. Lipid- Polimer Hibrit Nanopartiküller**

Polimerik ve lipid bazlı nanopartiküller, terapötik ajanların hedef bölgelere etkin bir şekilde taşınmasında yaygın olarak kullanılan taşıyıcı sistemlerdir. Polimerik nanotaşıyıcılar; polimerik miseller, polimer-ilac konjugatları ve polimerik nanopartiküller olmak üzere üç ana gruba ayrılırken, lipid bazlı nanotaşıyıcılar ise lipozomlar, katı lipid nanopartiküller ve nanoyapılı lipid taşıyıcılar olarak sınıflandırılmaktadır (Nakmode vd., 2022).

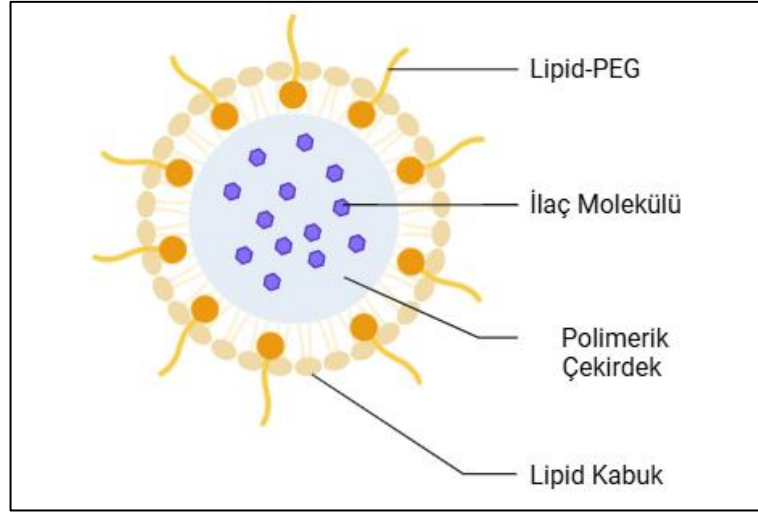
Polimerik nanopartiküller, biyouyumluluk, biyobozunurluk, kolay modifiye edilebilirlik ve kontrollü salım gibi birçok avantajlı özelliğe sahip olmaları nedeniyle günümüzde giderek daha fazla ilgi görmektedir. Ayrıca, bu nanopartiküllerin basit ve tekrarlanabilir sentez süreçleri sayesinde kolayca üretilmesi de önemli bir avantaj sağlamaktadır (Bansal vd., 2022). Bununla birlikte, polimerik nanopartiküller bazı sınırlamalara da sahiptir. Üretim sürecinde zararlı organik çözücülerin kullanımı, yüksek maliyetli sentez yöntemleri, ölçeklendirme zorlukları, bozunma ürünlerinin toksik etkileri ve genellikle düşük ilac yükleme kapasitesi bu kısıtlamalar arasında yer almaktadır. Ayrıca,

biyolojik sistemler polimerik nanopartiküllerin hidrofobik yüzeylerini yabancı bir madde olarak algılamakta ve bağışıklık sistemi tepkisi nedeniyle bu partikülleri hızla elimine etmektedir. Bu durum, polimerik nanopartiküllerin etkinliğini ve kullanım alanlarını sınırlamaktadır. Buna ek olarak, polimerik nanotaşıyıcı sistemlerin hücre zarını geçme kapasitelerinin düşük olması, ne yazık ki yetersiz transfeksiyon verimliliğine yol açmaktadır (Vaidya vd., 2015).

Lipid nanopartiküller, son yıllarda ilaç, nükleik asit ve aşı taşıma sistemleri alanında önemli klinik başarılar elde ederek araştırmacıların ilgisini çeken yenilikçi platformlardan biri haline gelmiştir. Bu nanopartiküller, düşük üretim maliyetleri, kolay hazırlanabilirlikleri, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri, biyouyumlulukları, ölçeklendirme kolaylığı ve hedefe yönelik ilaç taşıma yetenekleri gibi birçok avantaja sahiptir. Ancak, düşük stabilite, hızlı ilaç salımı ve yüksek polidispersite gibi dezavantajlar, bu sistemlerin yaygın kullanımını kısıtlayan temel zorluklar arasında yer almaktadır (Nakmode vd., 2022).

Polimerik ve lipidik nanopartiküllerin sınırlamalarını aşmak amacıyla, biyomimetik ve biyouyumlu özellikleri sayesinde lipid-polimer hibrit nanopartiküller geliştirilmiştir. Bu nanotaşıyıcı sistem hem polimerik hem de lipidik sistemlerin avantajlarını bir arada toplayarak yenilikçi ve hibrit bir yaklaşım sunmaktadır (Teixeira vd., 2017). LPHNP'ler, temel olarak polimerik bir çekirdeğin lipid bir tabaka ile çevrelediği çekirdek-kabuk yapısına sahip yenilikçi hibrit nanosistemlerdir. Geniş çapta ilgi görmelerine rağmen, bu sistemlerin klinik uygulamalarda yaygın kullanımı henüz tam olarak sağlanamamıştır.

Polimer-lipit hibrit nanopartiküller, en az iki bileşenden, yani polimer ve lipitten oluşan nanoboyutlu, katı partiküllerdir. Lipozom ve polimerik nanopartikül sistemlerinde karşılaşılan zorlukları aşmak amacıyla geliştirilen hibrit yapılar, her iki taşıyıcı sistemin avantajlarını bir arada sunarak son yıllarda ilaç taşıma alanında önemli bir ilgi uyandırmıştır. Lipit-polimer hibrid nanopartikül sistemleri, polimerik çekirdek ile lipit tabakasının elektrostatik etkileşimler, hidrofobik bağlanmalar ve Van der Waals kuvvetleri gibi zayıf non-kovalent etkileşimler aracılığıyla birleşmesi sonucu oluşmaktadır (Zhang ve Zhang, 2010).



**Şekil 1.10.** Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin temel bileşenleri

Biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve toksik olmayan yapıları nedeniyle LPHNP formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan polimerler arasında PLGA, polikaprolakton (PCL), dekstran ve albümin bulunmaktadır. Ayrıca, zwitter iyonik, katyonik, anyonik ve nötral fosfolipidler, özellikle lesitin, 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonyum-propan, DOTAP ve DOPE gibi bileşikler sıklıkla tercih edilen lipit grupları arasındadır.

Lipit-polimer hibrid nanopartikül bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, sağladıkları çok yönlü avantajlar nedeniyle, kanser tedavisinden aşı adjuvanı uygulamalarına; nükleik asit taşımaktan aktif hedeflemeye, genetik hastalıkların tedavisinden diagnostik görüntüleme tekniklerine kadar geniş bir yelpazede yenilikçi ve sürdürülebilir nanomedikal platformlar olarak yoğun araştırma konusu olmaya devam etmektedir (Bose vd., 2016).

LPHNP sistemleri, çeşitli avantajları sayesinde ilaç taşıma ve hedefleme alanında önemli bir potansiyele sahiptir (Clawson vd., 2011). Bu avantajlar şunlardır:

- İlaç yükleme kapasitesinin yüksek olması,
- Raf ömrünü uzatarak dolaşım sisteminde daha iyi stabilite sağlamaları,
- Kontrollü salım mekanizması sunmaları,
- Biyouyumluluk ve biyoyararlanım açısından yüksek performans göstermeleri,
- Folik asit, transferin ve antikor gibi moleküllerle yüzey modifikasyonuna uygun olmaları,
- Partikül boyutlarının sağladığı pasif hedefleme imkânı sunmaları.

Lipit-polimer hibrid nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemleri, temel olarak üç ana bileşenden oluşmaktadır: (1) ilaç yüklemesinde rol oynayan polimerik çekirdek, (2) bu çekirdeği saran lipit çift tabaka ve (3) nanopartikül yüzeyinde bulunan hidrofilik polimerik kabuk. Bu yapısal organizasyon, sistemin stabilitesini artırmak ve biyolojik ortamdaki dağılımını optimize etmek için kritik öneme sahiptir.

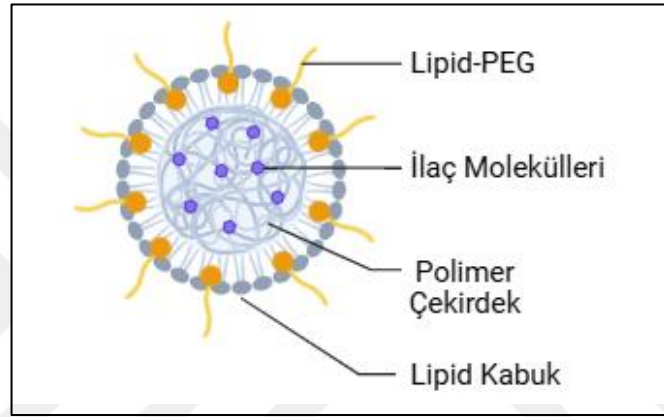
Polimerik çekirdek, taşıyıcı sistemin yapısal iskeletini oluşturmakla birlikte mekanik stabiliteyi temin eder, etkin bileşiğin kontrollü salınımını düzenler ve metabolik degradasyonu önler. Ayrıca, partikül boyutu dağılımının belirli sınır aralıklarında tutulmasına katkı sağlar. Polimerik çekirdek üretiminde, biyoparçalanabilirlik, biyoyumluluk ve toksisite profilinin uygunluğu nedeniyle PLGA (polilaktik-ko-glikolik asit), PCL (polikaprolakton), dekstran ve albümin gibi polimerler yaygın şekilde tercih edilmektedir.

Lipit tabaka, hücreye penetrasyonu artırarak biyoyumluluğu iyileştirir. Bu tabakanın oluşturulmasında nötral, anyonik ve katyonik fosfolipidler kullanılabilir. Lesitin, dipalmitoil fosfatidilkolin, dipalmitoil trimetilamonyum propan, dioleil trimetilamonyum propan ve dioleil fosfoetanolamin bu lipitler arasında yer almaktadır. Ayrıca, lipit tabaka etkin maddenin polimerden sızmasını önleyerek taşıyıcı sistemin daha fazla ilaç yüklemesine olanak tanır.

Sistemin en dış kısmında bulunan hidrofilik polimerik kabuk, LPHNP ilaç taşıyıcı sisteminin RES hücreleri tarafından tanınmasını engelleyerek fagositoza karşı korunmasını sağlar ve böylece ilacın dolaşım sisteminde daha uzun süre kalmasına yardımcı olur. Bu amaçla farklı lipit-PEG türevleri kullanılmaktadır (Zhang vd., 2008). Hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında lipit bileşiminin türü ve konsantrasyonu önemli bir faktördür. Lipit miktarının fazla olması, partikül yüzeyinde çok katmanlı bir lipit kaplamasına yol açarken, aynı zamanda serbest lipozomal partiküllerin oluşmasına da neden olabilir (Mandal vd., 2013). Literatürde, farklı tiplerde ve yapısal özelliklerde birçok LPHNP sistemi geliştirilmiştir. Farklı tiplerde LPHNP sistemler yer almaktadır ve bu sistemler yapısal özellikleri de farklılık göstermektedir. LPHNP'ler, lipit ve polimerin farklı şekillerde düzenlemelerine göre beş ana grupta kategorize edilebilirler

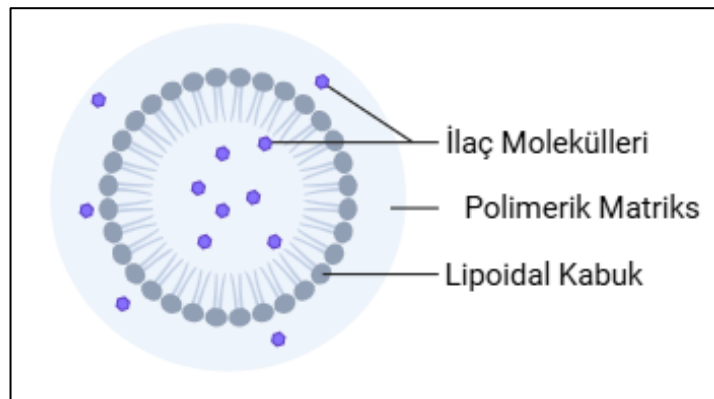
### 1.5.3.1. Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Sınıflandırılmaları

Polimer çekirdek-lipit kabuk grubunda yer alan hibrit nanopartiküller, bir veya iki tabaka lipit tarafından çevrelenen polimerik çekirdeklerden oluşmaktadır. Aynı zamanda bu grup hibrit sistemler arasında en temel ve basit formu temsil etmektedir. Genellikle emülsiyon yöntemiyle üretilerek elde edilmektedirler. Bu sınıfa ait hibrit nanopartiküllerin etken madde yükleme ve enkapsülasyon etkinliğini etkileyen başlıca faktörler arasında nanopartikül yapısının hazırlanma yöntemi, lipit ve polimer uyumu ve polimer/lipit oranı gibi faktörler yer almaktadır (Zhang vd., 2008).



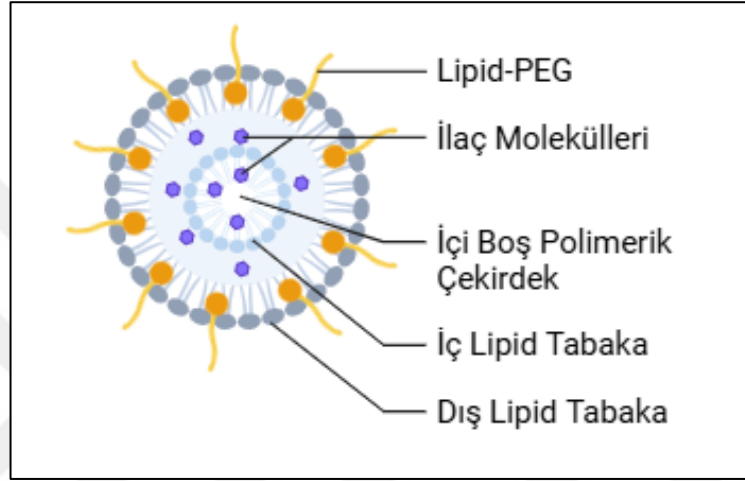
Şekil 1.11. Polimer çekirdek-lipit kabuk hibrit nanopartikül yapısı

Monolitik grubunda yer alan hibrit nanopartiküller, karışık lipit-polimer hibrit nanopartiküller olarak da bilinmektedir. Bu nanopartiküllerde, etken madde, lipit ve lipit-PEG polimerik çekirdek matriksinde dağılmış bir şekilde yer almaktadır. (Dave vd., 2019).



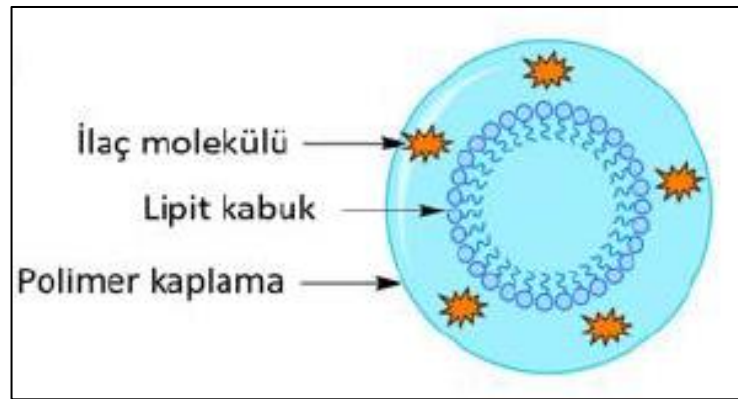
Şekil 1.12. Monolitik hibrit nanopartikül yapısı

Çekirdek-kabuk tipi içi boş hibrit nanopartiküller, pozitif yüklü lipid, iç tabakaları çevreleyen polimer tabakası ve en dışta PEG-lipid tabakasından oluşmaktadır. İçteki katyonik bölge, anyonik ilaçların enkapsülasyon verimliliğini artırmaktadır. Lipit konsantrasyonu, lipozom ve misel oluşumunu etkileyerek, düşük konsantrasyonlarda lipid kullanımı bu yapıları engellemektedir. İçteki katyonik lipid seçimi, dıştaki PEG zincir yoğunluğu ve polimerin molekül ağırlığı, bu tür hibrit yapıların oluşumunda en önemli faktörler arasında yer almaktadır.



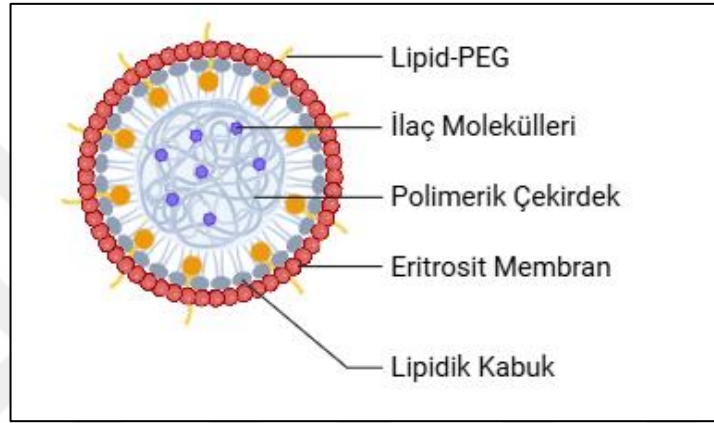
**Şekil 1.13.** Çekirdek-kabuk tipi içi boş hibrit nanopartikül yapısı

Polimer kafesli lipozom hibrit nanopartikül grubu, lipozomları çevreleyen polimerik bir kafes yapısına sahip hibrit nanopartikülleri içerir. Tüm hibrit tipler arasında en yüksek stabiliteye sahip olanlar, bu sınıfa aittir (Dave vd., 2019).



**Şekil 1.14.** Polimer kafesli lipozom hibrit nanopartikül yapısı

Hücre membran-kamuflaj hibrit nanopartiküller, hücre membranlarının, lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin yüzeyini kaplamasıyla oluşurlar. Yüzey kimyaları, doğal hücre membranlarını taklit ettikleri için biyomimetik nanopartiküller olarak adlandırılırlar. Bu kaplama genellikle ekstruzyon yöntemiyle yapılır. Kırmızı kan hücreleriyle kaplanmış nanopartiküller, makrofajlardan kaçınmayı kolaylaştırır ve biyolojik bariyerleri aşmalarını sağlar. Ayrıca, bu hibrit nanopartiküller, PEG ile kaplanan sistemlere kıyasla in vivo stabiliteleri daha yüksek olduğundan, dolaşımda daha uzun süre kalabilirler (Mohanty ve ark.,2020).



**Şekil 1.15.** Hücre membran-kamuflaj hibrit nanopartikül yapısı

Polimerik çekirdeklerin, tek veya çok katmanlı lipid kabuk ile kaplandığı sistemler, mevcut hibrit nanopartiküller arasında dikkat çekici bir yer tutmaktadır. Bu çekirdek-kabuk yapısına sahip hibrit nanopartiküller, geleneksel nanopartiküllere kıyasla bir dizi ek avantaj sunmaktadır (Mandal vd., 2013):

- Katı polimerik çekirdek, yapıyı destekleyerek mekanik stabilite, biyobozunurluk, dar partikül boyutları ve daha yüksek spesifik yüzey alanı sağlar.
- Lipit tabaka biyouyumlu olup, hücre membranlarıyla benzer özellikler göstererek hücrel etkileşimleri kolaylaştırır. Ayrıca, membran içinde veya yüzeyinde bulunan farklı moleküllerle etkileşime girme yeteneğine sahiptir.
- Lipitlerin amfifilik doğası, hidrofilik moleküllerin çift katmanlı yüzeye bağlanmasını ve hidrofobik moleküllerin lipid tabakasının hidrofobik kısmına yerleşmesini kolaylaştırır.

Tez çalışmamız kapsamında yukarıdaki bahsi geçen avantajlardan faydalanmak amacıyla hibrit nanopartikül tasarımıımız çekirdek-kabuk yapısına sahip hibrit nanopartikül

elde edecek şekilde planlanmış olup çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle üretimler gerçekleştirilmiştir.

### **1.5.3.2. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri**

LPHNP taşıyıcı sistemlerin hazırlamasında temel olarak iki basamaklı yöntem ve tek basamaklı yöntem olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmaktadır (Mandal vd, 2013).

LPHNP taşıyıcı sistemleri ilk kez geliştirildiğinde, iki aşamalı hazırlama yöntemi yaygın olarak kullanılmaktaydı. Ancak günümüzde, bu yöntem, hazırlama sürecinin uzun sürmesi ve suda çözünen ilaçlar için düşük yükleme kapasitesi gibi sorunlar nedeniyle daha az tercih edilmektedir. Bu yöntemde, polimerik nanopartiküller ve lipit bileşenler öncelikle ayrı ayrı hazırlanmakta, ardından hidrasyon, sonikasyon veya ekstrüzyon gibi fiziksel işlemler aracılığıyla birleştirilmektedir. Alternatif olarak, emülsiyon-solvent buharlaştırma, nanoçöktürme ya da yüksek basınçlı homojenizasyon teknikleriyle elde edilen polimerik nanopartikül süspansiyonları; kloroform gibi uygun bir organik çözücüde çözündürülmüş ve ardından solventi uzaklaştırılmış kuru lipit film üzerine ya da önceden hidrate edilmiş lipit tabakasına ilave edilerek de LPHNP sistemleri oluşturulabilir. Her iki yaklaşımda da lipit ve polimer bileşenleri, lipitin faz geçiş sıcaklığının üzerinde inkübasyon koşullarına maruz bırakılır; ultrasonikasyon veya mekanik karıştırma ile bütünleşme sağlanır. Elde edilen sistemde partikül boyutunun homojenleştirilmesi amacıyla ise genellikle homojenizasyon veya ekstrüzyon işlemleri uygulanmaktadır (Hadinoto vd., 2013).

İki basamaklı yöntemin zaman ve enerji açısından verimsiz olması, daha pratik bir alternatif olarak tek basamaklı yöntemin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yöntemde, polimer ve lipit bileşenleri aynı fazda çözündürülerek birlikte işlenir; böylece ayrı ayrı nanopartikül ve lipozom üretimine gerek kalmaksızın, LPHNP'ler yüksek tekrarlanabilirlik ve verimle elde edilir. Genellikle modifiye emülsiyon-çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme teknikleri bu süreçte tercih edilmektedir (Ferraira ve ark.,2020). Modifiye emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği, uygulama amacına ve formülasyonun doğasına bağlı olarak iki temel yaklaşıma ayrılmaktadır: tek emülsiyon ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri. Her iki teknik de ilaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimliliği üzerinde doğrudan etkili olan formülasyon parametrelerine göre optimize edilmektedir (Hadinoto vd., 2013).

Tek emülsiyon çözücü uçurma yöntemi, etkin maddenin organik fazda çözünebildiği durumlarda uygulanmakta olup, özellikle hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için uygundur. Süreçte, polimer ve etkin maddeyi içeren organik faz, lipit içeren sulu faza kontrollü biçimde eklenerek su içinde yağ tipi emülsiyon oluşturulur. Genellikle suyla karışmayan çözücüler, örneğin kloroform veya diklorometan tercih edilir. Organik çözücünün buharlaştırılması sonucunda, etkin maddeyi içeren polimerik çekirdek lipit tabakası ile kaplanarak LPHNP'lerin spontan oluşumu sağlanır. Alternatif olarak, lipit bileşenleri de polimer ve etkin madde ile aynı organik faz içerisinde çözülebilmektedir (Hadinoto vd., 2013).

Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi, özellikle hidrofilik ilaçların enkapsülasyonu amacıyla tercih edilmektedir. Hidrofilik etkin madde öncelikle sulu fazda çözündürülür ve bu faz, polimer ve lipit içeren organik faza eklenerek karıştırılır; böylece birinci emülsiyon elde edilir. Elde edilen bu emülsiyon, lipit-PEG içeren ikincil sulu faza aktarılıp yeniden emülsifiye edilerek W/O/W tipi çift emülsiyon oluşturulur. Sürecin sonunda organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla, LPHNP yapıları elde edilir (Hadinoto vd., 2013). Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle elde edilen LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerinin yapısı, diğer yöntemlerden biraz farklıdır. Bu yöntemle elde edilen LPHNP sistemleri, sulu çekirdeğin etrafında lipid tabakasının bulunduğu, ortasında polimer tabakanın yer aldığı ve en dışta lipit-PEG tabakasının bulunduğu bir yapıya sahiptir (Mandal vd., 2013).

Nanoçöktürme yönteminde, karşılıklı çözünebilen iki farklı çözücü sistemi kullanılmaktadır; bunlardan biri polimeri iyi çözerken, diğeri çözmez. Hidrofobik polimer ve etkin madde, suyla karışabilen bir organik çözücüde çözülürken; lipit ve lipit-PEG karışımı, 65–70 °C'ye kadar ısıtılmış sulu fazda çözünerek homojen bir dağılım oluşturur. Organik faz, manyetik karıştırma altında damla damla sulu faza eklenir. Bu süreçte, polimeri çözen çözücünün polimeri çözmeyen faza difüze olması ile birlikte polimerin çökmesi sağlanır. Ardından, lipitlerin hidrofobik kuyruklarının polimerik çekirdek ile etkileşimi ve hidrofilik baş gruplarının sulu faza yönelmesiyle lipit tabakası polimerik yapı etrafında organize olur ve LPHNP'ler spontan biçimde oluşur. Partikül morfolojisi ve tekdüzeliği, özellikle polimer konsantrasyonu ve fazlar arasındaki hacim oranına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu yöntem, ölçeklenebilirliği sayesinde endüstriyel üretim açısından avantaj sağlarken, suda yüksek çözünürlüğe sahip ilaçlar için düşük enkapsülasyon verimliliği sınırlayıcı bir faktör oluşturabilir (Hadinoto vd, 2013).

### 1.5.3.3. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

DNA ve RNA gibi genetik materyallerin taşıyıcı sistemler aracılığıyla hedef bölgelere taşınması, genetik bozukluklar, kronik hastalıklar ve birçok kanser türünün tedavisi açısından büyük fırsatlar sunmaktadır (Lee ve Kim, 2005). Bu materyallerin hedef bölgelere iletilmesi ve etkili olabilmesi amacıyla, biyobozunur ve biyouyumlu nanopartiküller gibi non-viral vektörler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Polimer ve lipit tabanlı viral olmayan nanotaşıyıcılar, düşük immünojenisite ve toksisite, viral rekombinasyon risklerinin bulunmaması, düşük üretim maliyetleri ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi pek çok avantaj sunmaktadır (Oh ve Park, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, lipid ve polimer tabanlı nanotaşıyıcıların avantajlarını birleştiren lipid-polimer hibrit nanopartiküller stabil olmaları, uzun ömürlü olmaları, biyouyumlulukları ve biyobozunurlukları sayesinde genetik hastalıkların tedavisinde etkili bir alternatif taşıyıcı platformu olarak öne çıkmaktadır. Bu nanopartiküller, özellikle gen taşıyıcı sistemler olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Feng ve ark., 2007).

LPHN'ler, terapötik ajanlar ve genetik materyallerin taşınmasının yanı sıra, tıbbi tanı amaçları için biyo-görüntüleme ajanlarının taşınmasında da kullanılabilir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve bilgisayarlı tomografi (CT) gibi görüntüleme tekniklerinde, demir oksit, kuantum noktalar (QDs), floresan boyalar ve inorganik nanokristaller gibi ajanlar, polimer çekirdekleri içine enkapsüle edilerek lipid-polimer hibrit nanotaşıyıcı sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Troutier vd., 2005). Valencia ve ekibi, mikroakışkan bir sistemde hızlı karıştırma yöntemi kullanarak, hidrofobik polimer yerine kuantum noktaları (QDs) içeren lipid-QD hibrit nanopartiküller geliştirmiştir (Salvador-Morales ve ark., 2009). Bu yöntemde enkapsüle edilen QD'ler, floresan özelliklerini koruyarak sulu çözeltilerde yüksek stabilite göstermiştir.

LPHNP'ler hem tek başına hem de kombinasyon halinde terapötik maddelerin etkin bir şekilde taşınması ve iletilmesi için tasarlanmış sistemlerdir. Suda çözünebilen etken maddeler, polimer çekirdeklerinde enkapsüle edilirken, suda çözünmeyen etken maddeler lipit ya da lipit-PEG katmanlarında enkapsüle edilmektedir. LPHNP'lerin etken madde taşıyıcı sistem olarak kullanımları tekli ilaç taşıma, kombine ilaç taşıma ve hedefe yönelik ilaç taşıma olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Hedefe yönelik taşıma, LPHN'lerin, hedefleyici ligandlar ile fonksiyonel hale getirilmesiyle gerçekleştirilir. Bu teknolojinin yapılan çalışmalarla, polimer çekirdek, lipid bileşenler veya lipid PEG katmanı yüzeyine entegre edilen bir kemoterapötik ajan ile hedefe yönelik iletim sağlayarak özellikle kanser tedavisinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. LPHN'lerin hedefli etken madde iletim kapasitesi, folat, transferrin, aptamerler ve peptitler gibi çeşitli aktif hedefleme unsurları ile gerçekleştirilmektedir (Valencia vd., 2010). Bu hedefleme stratejisi sayesinde doz miktarı azalırken elde edilen biyoyararlanım artmaktadır. Bunun yanı sıra yan etki potansiyellerinde de azalma söz konusudur.

LPHN'ler, kombine ilaç taşıma alanında da büyük bir potansiyele sahiptir. Farklı ilaçları birleştirerek daha etkili tedavi yöntemleri geliştirmek amacıyla çeşitli ilaç birleşim stratejileri uygulanmaktadır. Bunlardan biri, lipid ve polimer öncüllerinin kovalent bağlarla birleştirilerek tek adımda hazırlanan LPHN'lerdir. Diğer bir strateji ise iki adımlı yöntemle LPHN üretimi olup, burada bir ilaç polimer çekirdeği içine hapsedilirken, diğer ilaç lipid veziküllerine yerleştirilir (Kularatne ve Low, 2010). Bir çalışmada, LPHN sistemi hem kemoterapi hem de radyoterapi ajanlarını aynı anda taşıyacak şekilde hedeflenmiştir. Bu çift ilaç yüklemesi, her iki ilacın farklı salınım profillerini sergileyerek, tümör hücrelerini öldürme konusunda daha etkili sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. İki antikanser ilacının ardışık salınımı, sinerjik bir etki oluşturmuştur (Kong vd., 2013).

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, model plazmid olarak pEGFP-C1 plazmidini içeren polimer olarak PEG-PCL ve lipid olarak DOTAP kullanılarak hibrit nanopartiküller formülasyonlarının çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılarak üretilmesi planlanmakta olup genetik hastalıklarda etkili olacak gen yapılarının korunarak vücuda verilmesi ve transfeksiyon etkinliğinin artırılmasına yönelik yenilikçi formülasyon tasarımlarının gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerinin kullanımı, yalnızca formülasyonun stabilitesini artırmakla kalmaz, aynı zamanda kontrollü salım özellikleri, yüksek biyoyumumluluk ve biyoyararlanım gibi önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, partikül boyutuna bağlı olarak pasif hedefleme imkânı da sunarak bu sistemin terapötik etkinliğini artırmaktadır. Bu tez çalışmasında geliştirilecek yenilikçi gen taşıyıcı formülasyonlar, non-viral vektör taşıyıcı sistemler alanında önemli bir ilerleme kaydedilmesini sağlayacaktır. Bu kapsam da hazırlanan yenilikçi formülasyonel yaklaşımlar birçok hastalık grubunda (monogenetik nadir hastalıklar, kanser, enfeksiyon hastalıkları vb.) öncülük sağlayacak bir platform olarak karşımıza çıkacaktır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

|                                      |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
| Kloroform                            | Sigma Aldrich      |
| Polivinil alkol (PVA) MW:13000-23000 | Sigma, Almanya     |
| Centrisart santrifüj tüpü            | Sartorius, Fransa  |
| Etanol 96°                           | Carlo Elba, İtalya |
| DOTAP                                | Sigma Aldrich      |

#### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

|                               |                                |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Cam malzeme                   | İldam, Türkiye                 |
| Çalkalayıcı su banyosu        | Jeio Tech, Kore                |
| Derin dondurucu               | Heto, Almanya                  |
| DSC cihazı                    | TA DSC Q2000, Çin              |
| Elektrikli terazi             | Mettler Toledo, Almanya        |
| Filtre                        | İsolab, Türkiye                |
| Manyetik karıştırıcı          | IKA, Almanya                   |
| Mikropipet                    | Eppendorf, Almanya             |
| Mikroplak okuyucu             | Molecular Devices, Spectra Max |
| Mikroplak (96 kuyucuklu)      | Greiner Bio-One, Almanya       |
| Mikroskop                     | Leica DM 4000B                 |
| Parafilm                      | Bemis Packaging, ABD           |
| Plastik enjektör              | Set inject                     |
| Santrifüj                     | Sigma 2-16 P, Almanya          |
| Sonikatör                     | Bandelin Sonoplus              |
| Taramalı Elektron Mikroskobu  | FEI Tecnai G2                  |
| Vorteks cihazı                | Heidolph Reax                  |
| Zeta potansiyeli ölçüm cihazı | MalvernZetasizer,              |

### 2.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar

Etken maddelerin in-vitro salım çalışmalarında üretilen nano boyuttaki formülasyonlarda açığa çıkışının incelenmesinde pH 7,4 fosfat- salin tamponu (PBS) kullanılmıştır. Tampon Avrupa Farmakopesi 9'a (EP 9) göre hazırlanmıştır (EP9, 2016).

➤ pH 7,4 Fosfat-Salin Tamponu (PBS)

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Disodyum hidrojen fosfat        | 2,38 g  |
| Potasyum dihidrojen fosfat..... | 0,19 g  |
| Sodyum klorür                   | 8 g     |
| Distile su.....y.m              | 1000 ml |

## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. p-EGFP Plazmidinin PicoGreen dsDNA Kiti ile Kalibrasyonu

PicoGreen dsDNA Reajan, çift sarmallı nükleik asitleri tespit etmek üzere özel olarak tasarlanmış, 480 nm'de uyarılma zirvesi ve 520 nm'de emisyon zirvesine sahip son derece hassas bir floresan boyadır (Ban ve ark.,2024). PicoGreen, floresan mikroskopi yöntemlerinde DNA'nın boyanması ve görselleştirilmesi için yaygın olarak kullanılan ve yüksek hassasiyet gösteren bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde 250 pg/ml kadar az miktardaki dsDNA'nın floresans mikropilaka okuyucular kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edilip miktar tayinleri gerçekleştirilebilmektedir. Az miktarlarda bile yüksek hassasiyet gösteriyor olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir.

PicoGreen dsDNA kiti ile çalışırken reajanın ışıktan korunmasına ve deneylerden önce günlük kullanım miktarı kadar hazırlanmasına özen gösterilmiştir. Kit içerisinde yer alan analiz tamponu (TE buffer) PicoGreen dsDNA reajan çalışma çözeltisini hazırlamak ve dsDNA numunelerini hazırlamak için kullanılmıştır. TE buffer DNaz-free su ile 20 kat (1:20) seyreltilerek hazırlanmıştır. Kit içerisinde yer alan reajan ise kullanımdan önce hazırlanan ve 20 kat seyreltilmiş olan TE buffer ile 200 kat (1:200) seyreltilerek hazırlanmıştır. Çalışmalar sırasında reajanın ışıktan korunmasına dikkat edilmiş olup materyaller alüminyum folya ile sarılmıştır.

TE buffer ile hazırlanmış ve p-EGFP plazmid miktarı bilinen çözeltilerinin miktar tayini PicoGreen dsDNA kiti kullanılarak yapılmıştır. Stok p-EGFP plazmid çözeltisinden (31,25 ng/μl) dilüsyonlar yapılarak 31,25-3,96 ng/μl konsantrasyonlar arasında yedi farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden, mikropalakada bulunan kuyucuklara üç paralel şekilde 100'er μl koyulmuştur. Ardından analiz protokolü gereğince hazırlanan reajan her bir kuyucuğa 100'er μl eklenmiştir.

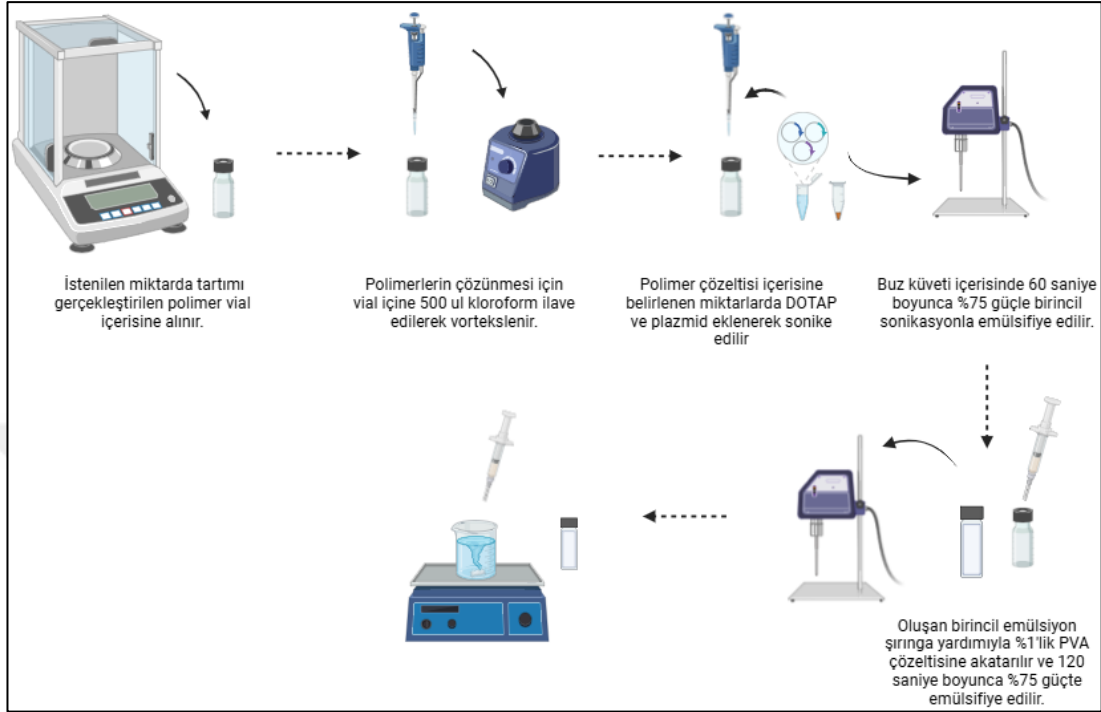
Mikropalaka ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyoya sarılı bir şekilde oda sıcaklığında 2-5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu durum PicoGreen reaktifinin dsDNA'ya bağlanarak floresans oluşturmalarını sağlamaktadır. Süre sonunda floresans mikropalaka okuyucu uyarım 480 nm ve yayılım 520 nm dalga boylarına ayarlanmıştır. Hazırlanan numunelerin floresans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen her bir örneğin floresans değerinden reaktif körünün floresans değeri çıkarılmıştır. İçerdikleri plazmid miktarı bilinen numunelerden elde edilen floresans değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğri aracılığıyla kalibrasyon denklemi hesaplanmıştır. Bu denklemlerden hareketle konsantrasyonu bilinmeyen numunelerdeki plazmid DNA miktarları hesaplanmıştır. Ardından % EE hesaplanmıştır.

### **2.2.2. Lipid-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması**

Nanopartiküllerin hazırlanmasında çift emülsiyon solvent evaporasyon yöntemi kullanılmıştır (Spiers vd., 2010).

Tez çalışması kapsamında nanopartikül hazırlamak amacıyla kullanılacak olan lipid ve polimer miktarlarına literatürdeki formülasyonlardan hareketle karar verilmiştir (Dou vd., 2014). Tez çalışmamız kapsamında lipid polimer hibrit nanopartiküllerin hazırlanması Şekil 2.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak çalışmada kullanılan 20 mg PEG-PCL polimeri 500 μl kloroform içerisinde çözölmüş olup üzerine DOTAP ve etkin madde çözeltisi eklenmiş ve %75 güçte buz küveti üzerinde 1 dakika boyunca sonike edilmiştir. Daha sonra bu karışım enjektörle %1 PVA içeren flakona aktarılmıştır. %75 güçte buz üzerinde 2 dakika boyunca sonike edilmiştir. Elde edilen su/yağ emülsiyonu manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm'de karışan %0,3 PVA içeren behere enjektörle tek bir noktadan seri bir şekilde aktarılmıştır. Hazırlanan nihai formülasyon 3 saat boyunca 600 rpm'de karıştırılmıştır. Sonrasında, su/yağ/su emülsiyonu, 35,000 rpm hızda ve 5 °C'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen süpernatant, enkapsülasyon

etkinliği ve miktar tayini için +4 °C'de saklanmıştır. Elde edilen çökelti ise, nanopartikül karakterizasyon analizlerinde kullanılmıştır.



şekil 2.1. Nanopartikülerin çift emülsiyon çözücü uzaklaştırma yöntemiyle hazırlanması

### 2.2.3. Lipid-Polimer Hibrit Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Öñformülasyon Çalışmaları

Öñ formülasyon çalışmalarında iç ve dış fazda kullanılacak olan PVA miktarı ve % konsantrasyonu, sonikasyon süresi ve sonikasyon gücü gibi parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Formülasyon parametreleri Çizelge 2.1'de verilmektedir. Bu formüllerden hareketle partikül boyutu sonuçlarına göre en uygun formül seşilerek p-EGFP plazmidini kullanarak formülasyonlar üretilerek enkapsülasyon etkinlikleri tayin edilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Lipid-polimer hibrit nanopartikül geliştirmek üzere yapılan önformülasyonlar

| PEG-PCL<br>(mg) | DOTAP<br>(mg) | DNAz-free<br>Su(µl) | İç Faz<br>PVA(%) | İç Faz PVA<br>(ml) | Dış Faz PVA<br>(%) | Dış Faz PVA<br>(ml) | 1. Sonikasyon<br>(sn) | 2. Sonikasyon<br>(sn) | Sonikasyon Gücü<br>(%) | Karıştırma süresi<br>(saat) |
|-----------------|---------------|---------------------|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| 20,39           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 50                     | 3                           |
| 20,56           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,03           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 100                    | 3                           |
| 15,09           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 50                     | 3                           |
| 15,07           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 15,32           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 100                    | 3                           |
| 25,18           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 50                     | 3                           |
| 25,39           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 25,4            | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 100                    | 3                           |
| 20,33           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 50                     | 3                           |
| 20,13           | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,1            | -----         | -----               | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 100                    | 3                           |
| 20,39           | 1             | 25                  | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,56           | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,03           | 1             | 200                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,09           | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,07           | 1             | 200                 | 1                | 1,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,32           | 1             | 100                 | 1                | 1                  | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,18           | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 90                    | 75                     | 3                           |
| 20,39           | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,4            | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,33           | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 90                    | 75                     | 3                           |
| 20,13           | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |

**Çizelge 2.1. Devam.** Lipid-polimer hibrit nanopartikül geliştirmek üzere yapılan önformülasyonlar

| PEG-PCL<br>(mg) | DOTAP<br>(mg) | DNAz-free<br>Su(µl) | İç Faz<br>PVA(%) | İç Faz PVA<br>(ml) | Dış Faz PVA<br>(%) | Dış Faz PVA<br>(ml) | 1. Sonikasyon<br>(sn) | 2. Sonikasyon<br>(sn) | Sonikasyon Gücü<br>(%) | Karıştırma süresi<br>(saat) |
|-----------------|---------------|---------------------|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| 20,1            | 1             | 100                 | 1                | 1,5                | 0,5                | 18                  | 90                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,31           | 1             | 100                 | 1                | 1                  | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,33           | 1             | 100                 | 1                | 2                  | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,59           | 1             | 100                 | 1                | 2,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,14           | 1             | 100                 | 1                | 1                  | 0,5                | 10                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,9            | 1             | 100                 | 1                | 2                  | 0,5                | 10                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,89           | 1             | 100                 | 1                | 2,5                | 0,5                | 10                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,39           | 1             | 100                 | 1                | 2,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,56           | 1             | 100                 | 1                | 3                  | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,03           | 1             | 100                 | 1                | 3,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,09           | 1             | 100                 | 1                | 2,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,07           | 1             | 100                 | 1                | 3                  | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,32           | 1             | 100                 | 1                | 3,5                | 0,3                | 18                  | 30                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,18           | 1             | 100                 | 1                | 3,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 90                    | 75                     | 3                           |
| 19,1            | 1             | 100                 | 1                | 3,5                | 0,5                | 18                  | 30                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,4            | 1             | 50                  | 1                | 3,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 60                    | 75                     | 3                           |
| 20,33           | 1             | 200                 | 1                | 3,5                | 0,5                | 18                  | 60                    | 90                    | 75                     | 3                           |
| 20,13           | 1             | 100                 | 1                | 4,5                | 0,5                | 16,5                | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,56           | 1             | 40                  | 1                | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,03           | 0,5           | 40                  | 1                | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,09           | 0,75          | 40                  | 1                | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| 20,15           | 0,25          | 40                  | 1                | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |

#### **2.2.4. p-EGFP ile Hazırlanan Nanopartiküller İçin Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları**

Ön formülasyon çalışmalarında kullanılacak olan DOTAP miktarı, formülasyona yüklenecek plazmid miktarı ve formülasyon için kullanılacak DNAz-free su miktarı gibi parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Formülasyon parametreleri Çizelge 2.2’de verilmektedir. Bu formüllerden hareketle plazmid yüklü nanopartikül formülasyonları üretilmiş olup enkapsülasyon etkinliklerine, zeta potansiyellerine ve partikül boyutlarına bakılarak HEK-293 hücre hattında transfeksiyon etkinliği ve sitotoksosite çalışmalarına geçilmiştir.



**Çizelge 2.2.** p-EGFP ile hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartiküller için yapılan önformülasyonlar

| Formül No | PEG-PCL<br>(mg) | DOTAP<br>(mg) | e-GFP Plasmid<br>(ng) | İç Faz PVA<br>(%) | İç Faz PVA<br>(ml) | Dış Faz PVA<br>(%) | Dış Faz PVA<br>(ml) | 1. Sonikasyon<br>(sn) | 2. Sonikasyon<br>(sn) | Sonikasyon Gücü<br>(%) | Karıştırma süresi<br>(saat) |
|-----------|-----------------|---------------|-----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| NP 28     | 20,39           | 1             | 50000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 29     | 20,03           | 0,5           | 50000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 30     | 20,09           | 0,75          | 50000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 31     | 20,15           | 0,25          | 50000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 32     | 20,56           | 1             | 20000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 34     | 20,03           | 0,5           | 20000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 35     | 20,09           | 0,75          | 20000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |
| NP 36     | 20,15           | 0,25          | 20000                 | 1                 | 3,5                | 0,3                | 18                  | 60                    | 120                   | 75                     | 3                           |

## 2.3. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

### 2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Saptanması

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımını saptamak için dinamik ışık saçılımı yöntemi (Malvern Zetasizer NanoZS) kullanılmıştır. Nanopartikül formülasyonları distile su kullanılarak 50 µg/mL konsatrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Pipetaj ile disperse edildikten sonra, ölçüm küvetine alınmış ve 3 seri şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.

### 2.3.2. Hazırlanan Formülasyonlarda p-EGFP Plazmid Miktar Tayini

Nanopartikül formülasyonlarındaki p-EGFP plazmid miktar tayini indirekt yöntemle hesaplanmıştır. Bu amaçla formülasyon 35000 rpm 5 derecede 1 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatanda yer alan p-EGFP plazmid miktarı PicoGreen dsDNA Assay Kitinin uygun prosedürlerde kullanılmasıyla 3 seri şeklinde mikrolaka içerisinde florometre okuyucuda ölçülmüştür.

### 2.3.3. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Nanopartikül formülasyonlarındaki p-EGFP plazmid miktar tayini PicoGreen™ dsDNA Assay Kiti kullanılarak indirekt yöntemle hesaplanmıştır ve aşağıda yer verilen eşitlik kullanılarak hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (EE) hesaplanmıştır.

$$\% EE = (A/B) \times 100$$

A: Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (µg) – Süpernatanda bulunan etken madde miktarı (µg)

B: Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (µg)

#### 2.3.4. Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan yüklerin değişimi belirlemek için zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. Hazırlanan farklı nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyelinin ölçümü için Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılmıştır. Elde edilen nanopartikül distile su kullanılarak 50 µg/mL konsantrasyon elde edilecek şekilde seyreltilmiştir. Pipetaj ile disperse edildikten sonra, ölçüm küvetine alınmış ve 3 seri şeklinde ölçümler gerçekleştirilmiştir.

#### 2.3.5. İn-vitro Salım Çalışmaları

Etkin maddenin nanopartiküler sistemden *in vitro* salımı ideal salım profili sağlamak için önemlidir. Etkin maddenin *in vitro* salım profilinin modifikasyonu, kan konsantrasyonunu ve biyoyararlanımını optimize etmektedir. Hasta uyuncunun sağlanmasının yanı sıra uygun farmakokinetik davranış elde edilebilmektedir. Diyaliz membran yöntemi ve franz difüzyon hücresi en sık kullanılan *in vitro* salım yöntemleridir (Chan ve ark., 2009; Ghanshyam ve ark., 2011). Diyaliz tüp yönteminde diyaliz membran 24 saat boyunca pH 7,4 fosfat tamponunda ıslatılmıştır. Bu yöntemde Sigma, 100 kDa membran içerisine 2 mL hibrit nanopartikül dispersiyonu konulmuş ve membranın her iki ucu bağlanmıştır. Elde edilen diyaliz torbası 30 mL pH 7,4 fosfat tamponu ortamına bırakılmış belirli zamanlarda (0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 12; 24. saat) 1 mL'lik örnekler alınarak PicoGreen assay kiti kullanılarak açığa çıkan plazmid DNA miktarı analiz edilmiştir. Örnekler alındıktan sonra sink koşulunu sağlamak amacıyla çekilen örnek hacmi kadar ortama pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilmiştir. Deney 37±1°C sıcaklıkta 5 rpm sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Alınan örneklerdeki serbest plazmid DNA miktarı PicoGreen dsDNA kiti kullanılarak hesaplanmış ve bu verilerden hareketle *in vitro* etkin madde salım hızı grafiği hazırlanmıştır. Deneyler üç paralel tekrar edilmiştir (n=3).

#### 2.3.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Kısa Süreli Fiziksel Stabilité Çalışmaları

Geliştirilen lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin saklama koşulunu belirlemek ve saklama sırasındaki kararlılığını gözlemlemek amacıyla kısa süreli fiziksel ön stabilite çalışması yapılmıştır. Nanopartiküllerin ön stabilite verileri hakkında bilgi edinmek amacıyla seçilen nihai fomülasyon hazırlanmış ve +4 °C bir hafta boyunca takip edilmiştir. Bunun için

su/yağ/su çift emülsiyonu santrifüj edildikten sonra elde edilen çökelti Dnaz-free su ile disperse edilmiş ve bu fomülasyonun stabilitesi +4 °C bir hafta boyunca takip edilmiştir. Bir hafta boyunca her gün her bir numunenin partikül boyutu, polidisperseite indeksi, zeta potansiyeli ve % enkapsülasyon etkinliği ölçülmüştür.

### **2.3.7. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)**

#### **Analizi**

p-EGFP, DOTAP, boş lipid-polimer hibrit nanopartikül, p-EGFP yüklü lipid-polimer hibrit nanopartikül ve PEG-PCL kopolimerlerinin termal özellikleri TA Q2000 DSC cihazı ile incelenmiştir. Yaklaşık 2 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek preslenmiştir. Azot gazı 50 ml/dakika akış hızında kullanılarak, örnekler 20-300 °C sıcaklık aralığında 5°C/dak doğrusal ısıtma hızında analiz edilmiştir. Analizde kör olarak boş pan kullanılmıştır.

### **2.3.8. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi**

Nanopartiküllerin boyut, morfoloji ve yapısal özelliklerinin incelenmesi amacıyla Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarı (MERLAB) bünyesinde bulunan FEI Tecnai G2 marka TEM (120 Kw) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler 200 kV hızlandırma voltajı altında gerçekleştirilmiştir. Numuneler, analize uygun şekilde hazırlanmak üzere önce distile su ile seyreltilmiş, ardından bir damla örnek çözeltisi 200 mesh karbon kaplı bakır grid (carbon-coated copper grid) üzerine damlatılmıştır. Gridler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra cihazda görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen TEM görüntüleri, nanopartiküllerin boyut dağılımı, şekil özellikleri ve agregasyon durumunun değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

### **2.3.9. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi**

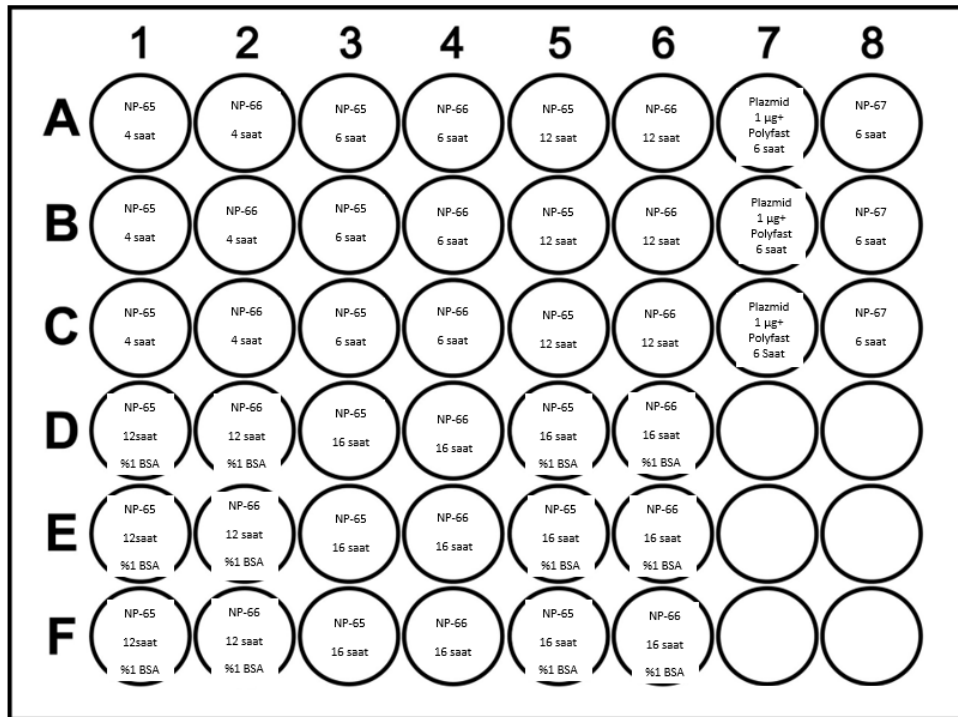
Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarı (MERLAB) bünyesinde bulunan Zeiss Evo 40 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Örnekler analiz öncesinde iletkenlik sağlamak amacıyla K550X püskürtmeli altın kaplayıcı ile 0,33 nm/saniye hızla yaklaşık 5 nm

kalınlığında altın ile kaplandı. Ardından 15 kV ile yüksek vakum modlu çevresel taramalı elektron mikroskobu ile incelendi. Elde edilen SEM görüntüleri, partikül yüzey morfolojisi, boyut dağılımı ve küresellik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

### 2.3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 2.3.10.1. Floresan Görüntüleme Çalışmaları

Yeşil Floresans Protein geni taşıyan e-GFP plazmid DNA 'sı ile hazırlanan plazmid-lipit polimer hibrit nanoartikül komplekslerinin transfeksiyon etkinlikleri HEK-293 hücreleri ile değerlendirilmiştir. 48 kuyucuklu hücre kültür kabında yoğunluğu  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler çoğaltılmıştır. Elde edilen bu kompleks 48 kuyucuklu hücre kültür kabına 0,5 µg plazmid/kuyucuk, 1 µg plazmid/kuyucuk ve 2 µg plazmid/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. 48 saat boyunca CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C 'de inkübe edilen hücre kültürleri bu süre sonunda fikse edilerek floresans mikroskop incelenmiştir ve fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 2.2. Nanopartikül formülasyonlarının uygulandığı 48 kuyucuklu HEK-293 hücre kültür kabı

### 2.3.10.2. Tranfeksiyon Etkinliğinin Tayini

e-GFP plazmid DNA'sının hücre içine taşınma etkinliğini ve ekspresyon düzeyini değerlendirmek amacıyla, eGFP plazmid yüklü lipid-polimer hibrit nanopartiküller kullanılarak HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293) hücre hattında transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücreler, %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilmiştir. Transfeksiyon öncesinde, hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekilerek yaklaşık %70–80 konfluens seviyesine ulaşmaları sağlanmıştır. Ardından, steril koşullarda hazırlanan eGFP plazmid yüklü nanopartikül süspansiyonu, belirlenen optimal DNA miktarı ve nanopartikül konsantrasyonu esas alınarak hücrelere uygulanmıştır. Hücreler 4–6 saat inkübasyonun ardından taze DMEM ile yıkanmış ve yenilenmiş besiyeri ile 24–48 saat süreyle inkübatörde tutulmuştur. Transfeksiyonun ardından, eGFP ekspresyonu öncelikle invert floresans mikroskop altında gözlemlenmiş, hücrelerdeki yeşil floresan sinyalin varlığı ve dağılımı nitel olarak değerlendirilmiştir. Ek olarak, transfekte hücre oranının kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla hücreler tripsinize edilerek PBS ile yıkanmış ve flow sitometri (akım sitometrisi) analizi yapılmıştır. Ölçümler, 488 nm uyarma ve 530 ± 15 nm emisyon filtreleri kullanılarak gerçekleştirilmiş, her örnek için en az 10.000 hücre analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, kontrol grubu (transfekte edilmemiş hücreler) ile karşılaştırılarak transfeksiyon verimliliği (% GFP pozitif hücre oranı) hesaplanmıştır. Böylece nanopartikül formülasyonlarının gen taşıma kapasitesi ve hücre içi ekspresyon etkinliği hem nitel hem de nicel olarak değerlendirilmiştir.

### 2.3.10.3. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Tez çalışmamızın bu kısmında e-GFP plazmid DNA yüklü lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin hücresel biyouyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla HEK-293 hücre hattı üzerinde flow sitometri yöntemi temelli hücre canlılığı analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler, %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatör koşullarında kültüre edilmiştir. Transfeksiyon amacıyla hazırlanan e-GFP plazmid yüklü nanopartikül süspansiyonları (0,5 µg, 1µg ve 2µg) hücrelere uygulanmış ve 24–48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda canlılık analizleri yapılmıştır.

Analiz öncesinde hücreler tripsin ile süspanse edilip, fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez yıkanmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesinde, membran bütünlüğü esasına dayanan propidium iodide (PI) boyama yöntemi kullanılmıştır. PI, yalnızca membran geçirgenliği bozulmuş, ölü veya apoptotik hücelere penetre olabildiğinden, canlı ve ölü hücre popülasyonlarının ayırımına olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda, e-GFP plazmidinin hücre içi ekspresyonundan kaynaklanan intrinsik yeşil floresan sinyal, canlı hücrelerin belirlenmesinde doğal bir belirteç olarak değerlendirilmiştir. Ölçümler, 488 nm dalga boyunda lazer uyarımı altında çalışan bir flow sitometri sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. e-GFP sinyali FITC kanalı ( $530 \pm 15$  nm), PI floresansı ise  $> 600$  nm emisyon filtresi üzerinden tespit edilmiştir.

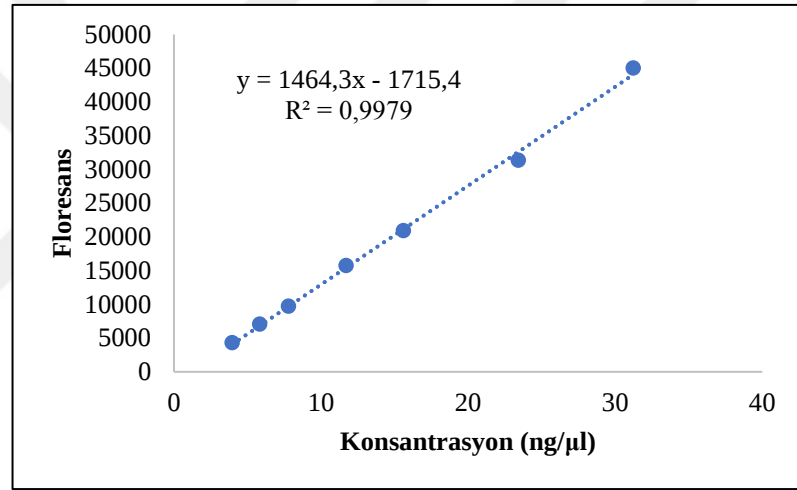
Her bir örnek için en az 10.000 hücre sayımı yapılmış, elde edilen veriler fluoressan yoğunluğu ve hücre popülasyon dağılımı temelinde analiz edilmiştir. e-GFP pozitif (canlı) hücre oranı ile PI pozitif (ölü) hücre oranları karşılaştırılarak transfeksiyon sonrası hücre canlılığı yüzdesi hesaplanmıştır. Sonuçlar, kontrol ve boş nanopartikül grupları ile karşılaştırılmış; böylece e-GFP plazmid yüklü nanopartiküllerin HEK-293 hücrelerinde sitotoksik etkileri, biyouyumluluk düzeyi ve hücre canlılığı üzerindeki genel etkileri kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ile hücre canlılığı konsantrasyon grafikleri çizilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Nanopartikül Formülasyonunda Yapılan Kontroller

##### 3.1.1. p-EGFP Plazmidinin Miktar Tayinleri İçin Kullanılan Yöntemlerin Kalibrasyonuna Ait Bulgular

p-EGFP plazmidinin TE buffer içerisindeki ölçümü bölüm 2.2.1.'de açıklanan şekilde yapılmış ve kalibrasyona ait grafik ve denklem bulunmuştur. Grafik Şekil 3.1.'de verilmiştir. Doğrulara ait parametreler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. p-EGFP plazmidinin TE buffer içerisindeki kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.1. p-EGFP plazmidinin kalibrasyon doğrusuna ait parametreler

|                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| Ortam                             | TE Buffer              |
| Eğim                              | 1464,3                 |
| Kesişim                           | 1715,4                 |
| Doğru Denklemi                    | $y = 1464,3x - 1715,4$ |
| Determinasyon Katsayısı ( $r^2$ ) | 0,9979                 |

### 3.1.2. Lipid-Polimer Hibrit Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Ön Formülasyon Çalışma Sonuçları

Ön Formülasyon çalışmalarında sırasıyla sonikasyon süresi, sonikasyon gücü, iç/dış faz oranları ve polimer miktarları değiştirilerek “2.2.2. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları” kısmında anlatıldığı şekilde farklı formülasyonlar hazırlanmıştır.

Değişen parametrelerle üretilen nanopartiküllere ilişkin Zetasizer NanoZS cihazı ile elde edilen partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli sonuçları; ayrıca yüzde yükleme etkinliği bulguları değerlendirilerek final formülasyona karar verilmiştir. Analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ SS olarak verilmiştir.

Sonikasyon süresi, partikül boyutunu ve dağılımını etkileyen en önemli formülasyon parametrelerinden biridir. Sonikasyon emülsiyon damlacıklarını parçaladığı için genel olarak sonikasyon süresinin artmasıyla parçacık boyutu ve dağılımının azalması beklenir (Topal vd., 2023). Sonikasyon süresinin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla primer emülsiyonu oluşturmak için yapılan 1.sonikasyon süresi 30, 60 ve 90 saniye olarak üç farklı sürede ayarlanarak formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir. 60 sn sonikasyon partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-2 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara 1. sonikasyon 60 sn olarak devam edilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Birinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi (n=3)

| Formül No | Sonikasyon 1 (sn) | Zeta Potansiyeli (mV $\pm$ SS) | Partikül Boyutu (nm $\pm$ SS) | PDI (Ort $\pm$ SS) |
|-----------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| NP-1      | 30                | 33,63 $\pm$ 0,003              | 193,3 $\pm$ 5,335             | 0,2515 $\pm$ 0,008 |
| NP-2      | 60                | 36,25 $\pm$ 0,001              | 211,3 $\pm$ 0,008             | 0,3871 $\pm$ 0,007 |
| NP-3      | 90                | 38,92 $\pm$ 0,008              | 208,5 $\pm$ 0,005             | 0,2587 $\pm$ 0,003 |

Sonikasyon süresinin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla sekonder emülsiyonu oluşturmak için yapılan 2.sonikasyon süresi 60, 90 ve 120 saniye olarak üç farklı sürede formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.3’de verilmiştir. 120 sn sonikasyon partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu

vermiştir. NP-6 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara 2. sonikasyon 120 sn olarak devam edilmiştir

**Çizelge 3.3.** İkinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi (n=3)

| <b>Formül No</b> | <b>Sonikasyon 2 (sn)</b> | <b>Zeta Potansiyeli (mV±SS)</b> | <b>Partikül Boyutu (nm±SS)</b> | <b>PDI (Ort±SS)</b> |
|------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| NP-4             | 60                       | 32,35±0,003                     | 199,4±5,335                    | 0,2356±0,008        |
| NP-5             | 90                       | 39,44±0,009                     | 202,1±2,926                    | 0,2797±0,012        |
| NP-6             | 120                      | 33,63±0,003                     | 193,3±5,335                    | 0,2515±0,008        |

Sonikasyon gücünün partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla primer ve sekonder emülsiyonu oluşturmak için uygulanan sonikasyon gücü yüzde 50, 75 ve 100 olarak üç farklı güçte sonikasyon yapılarak formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmiştir. %75 sonikasyon gücü partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyel açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-8 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara sonikasyon gücü %75'e ayarlanarak devam edilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Sonikasyon gücünün partiküllere etkisi (n=3)

| <b>Formül No</b> | <b>Sonikasyon gücü (%)</b> | <b>Zeta Potansiyeli (mV±SS)</b> | <b>Partikül Boyutu (nm±SS)</b> | <b>PDI (Ort±SS)</b> |
|------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| NP-7             | 50                         | 22,18±0,001                     | 198,8±9,425                    | 0,3228±0,010        |
| NP-8             | 75                         | 25,75±0,004                     | 195,1±9,265                    | 0,2709±0,008        |
| NP-9             | 100                        | 24,01±0,005                     | 239,2±11,38                    | 0,4688±0,013        |

Polimer miktarının partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla 15, 20 ve 25 mg olarak üç farklı miktarda polimer (PEG-PCL) ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.5'de verilmiştir. 20 mg PEG-PCL partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyel açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-11 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara 20 mg PEG-PCL ile devam edilmiştir.

**Çizelge 3.5.** Polimer miktarının partiküllere etkisi (n=3)

| <b>Formül No</b> | <b>Polimer miktarı (mg)</b> | <b>Zeta Potansiyeli (mV±SS)</b> | <b>Partikül Boyutu (nm±SS)</b> | <b>PDI (Ort±SS)</b> |
|------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| NP-10            | 15                          | 23,81±0,004                     | 234,9±5,518                    | 0,3050±0,019        |
| NP-11            | 20                          | 24,96±0,007                     | 186,4±5,254                    | 0,2381±0,007        |
| NP-12            | 25                          | 22,18±0,001                     | 198,8±3,143                    | 0,3228±0,003        |

Formülasyonda yer alan DNAz-free su miktarının partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla 25, 50, 100 ve 200 µl olarak dört farklı miktarda DNAz-free su ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.6’de verilmiştir. 50 µl DNAz-free su ile hazırlanan NP-14 formülü partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-14 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara 50 µl DNAz-free su miktarı ile devam edilmiştir.

**Çizelge 3.6.** DNAz-free su miktarının partiküllere etkisi (n=3)

| <b>Formül No</b> | <b>DNAz-free su miktarı (µl)</b> | <b>Zeta Potansiyeli (mV±SS)</b> | <b>Partikül Boyutu (nm±SS)</b> | <b>PDI (Ort±SS)</b> |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| NP-13            | 25                               | 30,49±0,003                     | 208,8±7,101                    | 0,2696±0,046        |
| NP-14            | 50                               | 35,57±0,005                     | 165,4±4,215                    | 0,2692±0,011        |
| NP-15            | 100                              | 35,05±0,004                     | 202,4±5,050                    | 0,2582±0,014        |
| NP-16            | 200                              | 36,06±0,004                     | 199,5±1,015                    | 0,2662±0,010        |

Dış faz hacminin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla nihai emülsiyon 5, 10, 16 ve 18 ml olarak üç farklı hacimde dış faz (% 0,3 PVA) ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.7’de verilmiştir. 18 ml dış faz hacmi partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyel açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-20 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara 18 ml dış faz hacmi ile devam edilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Dış faz hacminin partiküllere etkisi (n=3)

| <b>Formül No</b> | <b>Dış faz hacmi (ml)</b> | <b>Zeta Potansiyeli (mV±SS)</b> | <b>Partikül Boyutu (nm±SS)</b> | <b>PDI (Ort±SS)</b> |
|------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| NP-17            | 5                         | 38,5±0,007                      | 281,6±4,073                    | 0,197±0,005         |
| NP-18            | 10                        | 34,96±0,005                     | 186,4±1,002                    | 0,2381±0,009        |
| NP-19            | 16                        | 36,13±0,001                     | 175,2±1,686                    | 0,2547±0,010        |
| NP-20            | 18                        | 37,36±0,002                     | 166,1±2,650                    | 0,2483±0,007        |

Dış faz konsantrasyonunun partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla nihai 18 ml dış faz hacminde % 0,3 ve % 0,5'lik PVA ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.8'de verilmiştir. 18 ml dış faz hacimli % 0,3 PVA konsantrasyonu ile hazırlanan NP-21 formülünü partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyel açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-21 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara %0,3 PVA konsantrasyonu ile devam edilmiştir.

**Çizelge 3.8.** Dış faz konsantrasyonunun partiküllere etkisi (n=3)

| <b>Formül No</b> | <b>Dış faz konsantrasyonu (%)</b> | <b>Zeta Potansiyeli (mV±SS)</b> | <b>Partikül Boyutu (nm±SS)</b> | <b>PDI (Ort±SS)</b> |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| NP-21            | 0,3                               | 32,52±0,007                     | 162,8±4,073                    | 0,2447±0,005        |
| NP-22            | 0,5                               | 38,77±0,002                     | 168,6±2,650                    | 0,2428±0,007        |

İç faz hacminin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla nihai emülsiyon 1, 2, 2,5, 3,5 ve 4,5 ml olarak beş farklı hacimde iç faz (% 1 PVA) ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.9'da verilmiştir. 3,5 ml iç faz hacmi partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyel açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. NP-26 kodlu formülün yapılan tekrarlı formülasyon üretimi ve elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği sonucunda çalışmalara 3,5 ml dış faz hacmi ile devam edilmiştir.

**Çizelge 3.9.** İç faz hacminin partiküllere etkisi (n=3)

| Formül No | İç faz hacmi (ml) | Zeta Potansiyeli (mV±SS) | Partikül Boyutu (nm±SS) | PDI (Ort±SS) |
|-----------|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------|
| NP-23     | 1                 | 35,91±0,007              | 223,4±4,073             | 0,2424±0,005 |
| NP-24     | 2                 | 35,25±0,005              | 194,4±1,002             | 0,2217±0,009 |
| NP-25     | 2,5               | 31,23±0,001              | 173,1±1,686             | 0,2547±0,010 |
| NP-26     | 3,5               | 37,36±0,002              | 168,1±2,650             | 0,2428±0,007 |
| NP-27     | 4,5               | 36,13±0,152              | 175,2±1,116             | 0,2547±0,257 |

### 3.1.3. p-EGFP Yüklü Nanopartikül Geliştirmek Üzere Yapılan Ön Formülasyon Çalışmaları Sonuçları

İdeal p-EGFP yüklü nanopartikül yapısının elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen ön formülasyon sonuçları Çizelge 3.4'te listelenmiştir. İdeal p-EGFP yüklü nanopartikül formülasyonu seçilirken enkapsülasyon etkinlikleri dikkate alınmıştır. Aynı zamanda partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelleri dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. İç faz PVA oranının %1, miktarının 3,5 ml ve dış faz sodyum PVA oranının %0,3 ve miktarının 18 ml olduğu formülasyonun partikül boyutu büyüklüğü ve polidispersite indeksi daha uygun bulunmuştur. Hedef hücrelere gen aktarımının daha etkili bir şekilde olması için partikül büyüklüğü 200 nm'nin altında olan daha küçük partikül boyutuna sahip formülasyon seçilmiştir. Bu sonuca da sonikasyon gücü %75 ve birinci sonikasyon süresi 60 saniye, ikinci sonikasyon süresi 120 saniye olan formülle ulaşılmıştır. Bu parametreler değerlendirilerek elde edilen üç formülasyon NP-28, NP-29, NP-30 ve NP-31 formülasyonu nanopartikül geliştirmek üzere yapılan ön formülasyon çalışmalarında ideal formülasyonlar olarak seçilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin % enkapsülasyon, transfeksiyon etkinliklerinin ve sitotoksitelerinin karşılaştırılması sonucunda nihai formülasyona karar verilmiştir.

Formülasyon üretimi sırasında lipid olarak kullanılan DOTAP miktarının partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla nihai emülsiyon 1, 0,75, 0,5 ve 0,25 mg olarak dört farklı miktarda hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.10'da verilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri, partikül boyutları ve enkapsülasyon etkinlikleri değerlendirilerek nihai formülasyona karar vermek için HEK-293 hücre hatlarında transfeksiyon etkinlikleri ve sitotoksiteleri incelenmiştir.

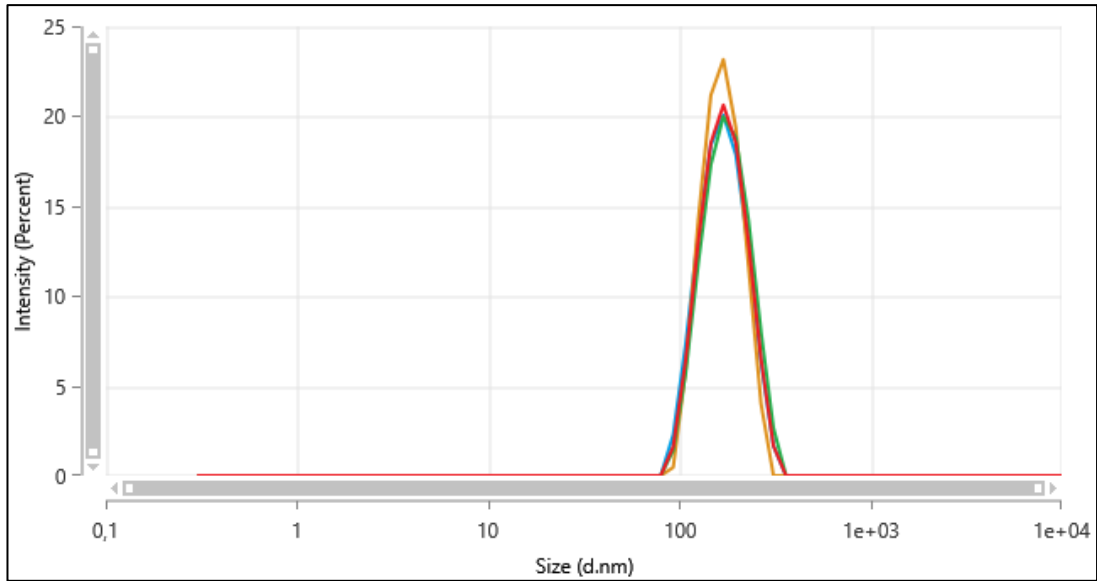
**Çizelge 3.10.** DOTAP miktarının partiküllere etkisi (n=3)

| Formül No | DOTAP Miktarı (mg) | Zeta Potansiyeli (mV±SS) | Partikül Boyutu (nm±SS) | PDI (Ort±SS)  | EE (%)        |
|-----------|--------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| NP-28     | 1                  | 25,6±0,126               | 168,4±0,2635            | 0,2622±0,063  | 98,8861±3,33  |
| NP-29     | 0,5                | 23,22±1,498              | 176,3±0,866             | 0,2243±0,014  | 97,7527±4,03  |
| NP-30     | 0,75               | 24,95±1,596              | 170,9±1,5698            | 0,2325±0,458  | 98,7034±8,47  |
| NP-31     | 0,25               | 16,98±0,264              | 181,8±0,6987            | 0,2382±0,1569 | 96,8696±12,43 |

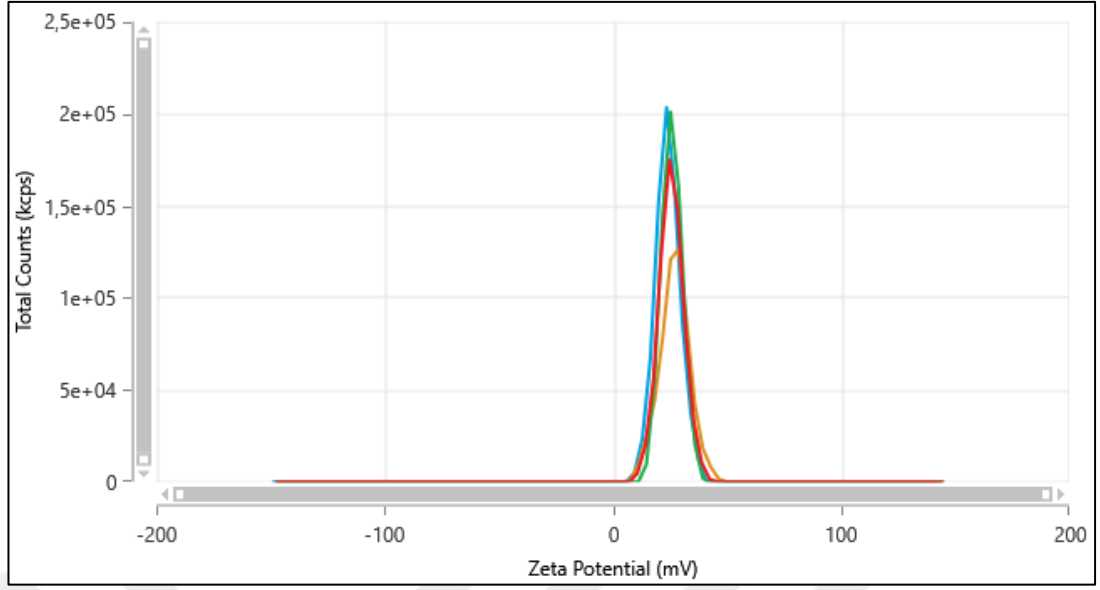
Formülasyon üretimi sırasında nanopartiküllere yüklenen plazmid miktarının etkisini gözlemlemek amacıyla formülasyonlara 20000 ng ve 50000 ng olacak şekilde iki farklı miktarda plazmid yüklenmiş olup hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.11’de verilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri, partikül boyutları ve enkapsülasyon etkinlikleri değerlendirilerek nihai formülasyona karar vermek için HEK-293 hücre hatlarında transfeksiyon etkinlikleri ve sitotoksiteleri incelenmiştir.

**Çizelge 3.11.** Yüklenen plazmid miktarının partiküllere etkisi (n=3)

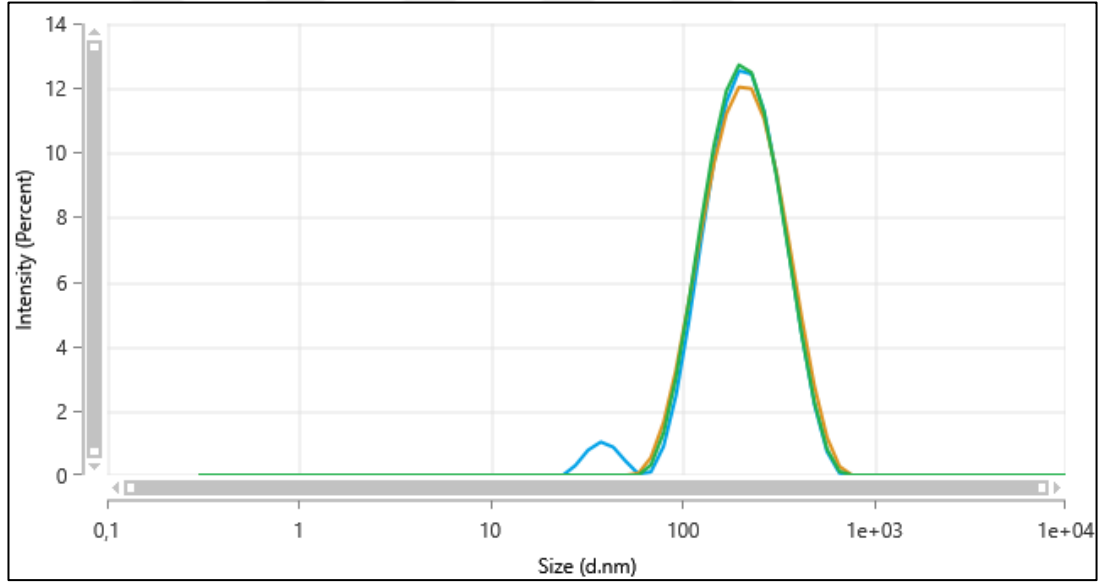
| Formül No | Plazmid Miktarı (ng) | Zeta Potansiyeli (mV±SS) | Partikül Boyutu (nm±SS) | PDI(Ort±SS)   | EE (%±SS)    |
|-----------|----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|--------------|
| NP-32     | 20000                | 23,22±1,498              | 176,3±0,866             | 0,2243±0,014  | 97,7527±4,03 |
| NP-33     | 50000                | 16,98±0,264              | 190,8±0,6987            | 0,2463±0,1569 | 98,6613±1,03 |



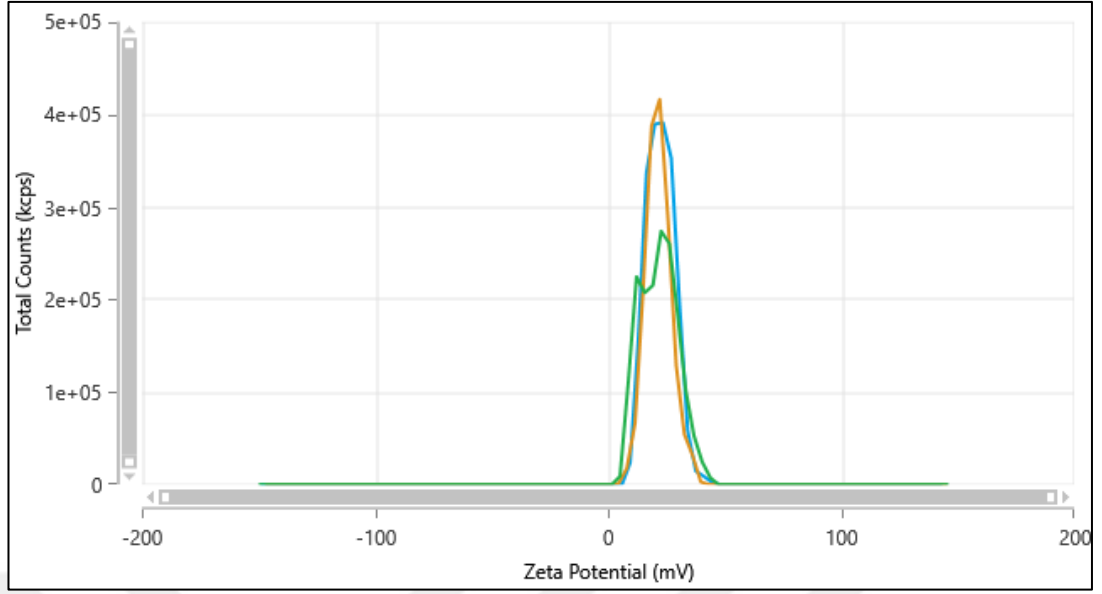
**Şekil 3.2.** p-EGFP yüklü NP 28 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik



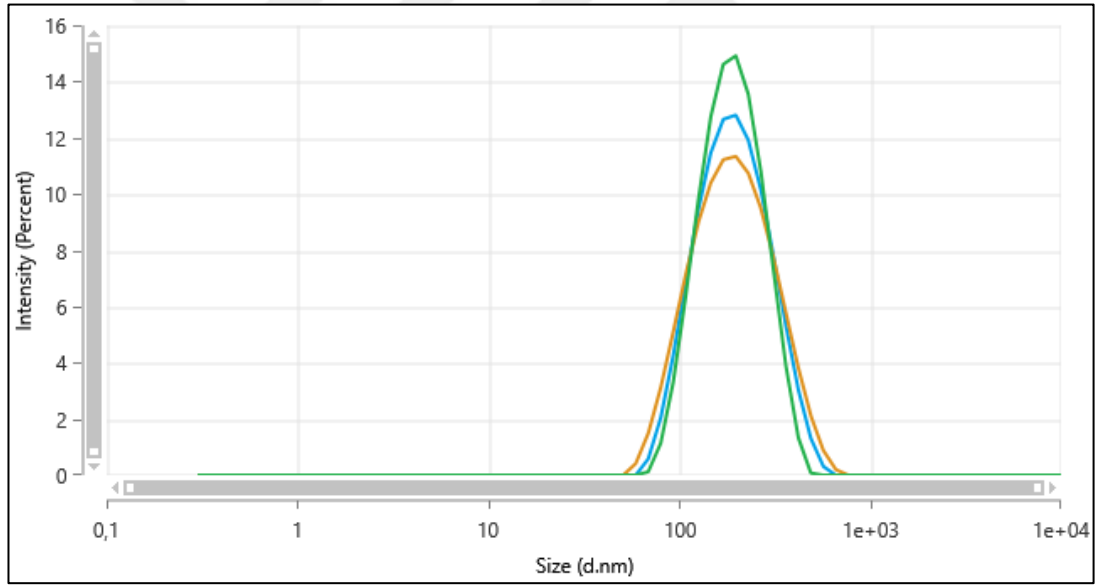
Şekil 3.3. p-EGFP yüklü NP 28 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik



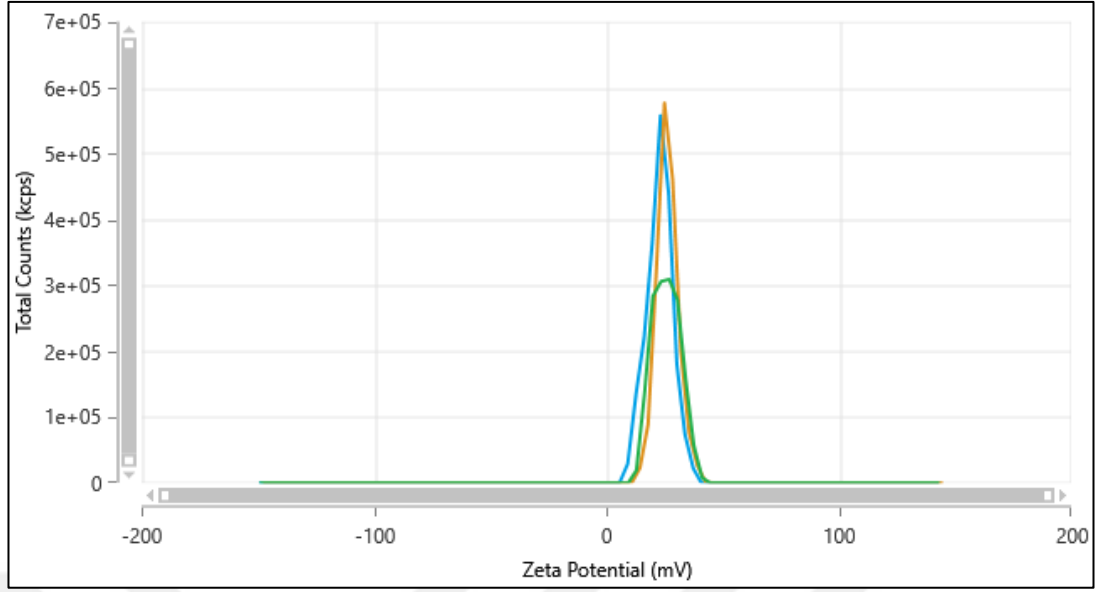
Şekil 3.4. p-EGFP yüklü NP 29 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik



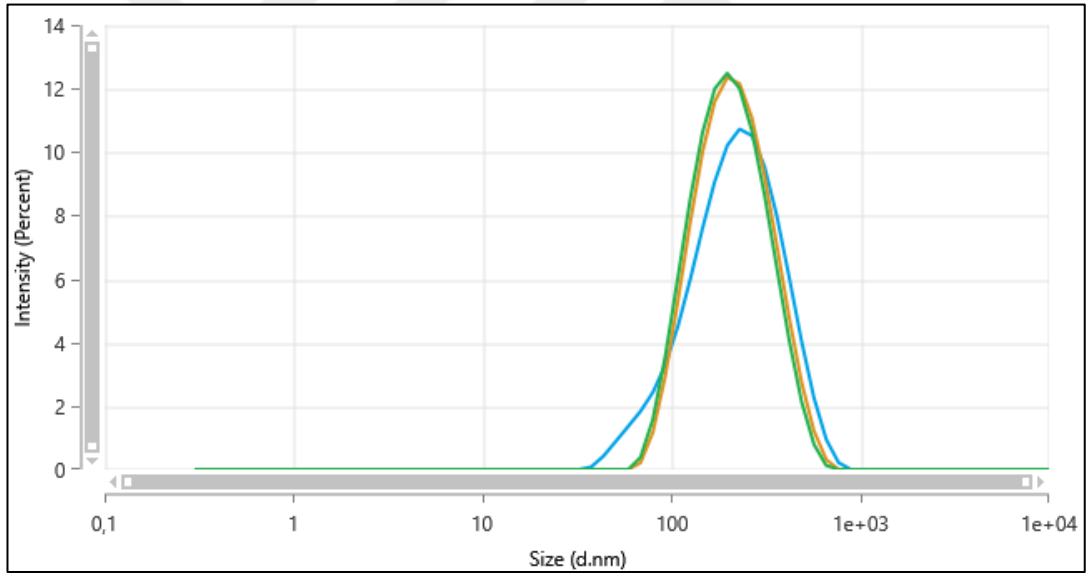
Şekil 3.5. p-EGFP yüklü NP 29 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik



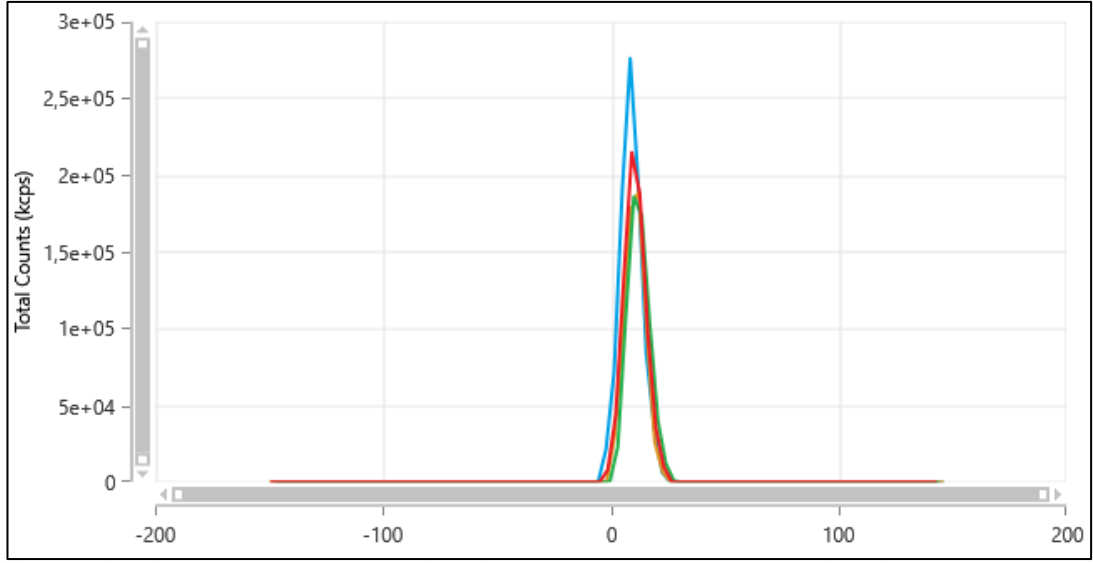
Şekil 3.6. p-EGFP yüklü NP 30 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik



Şekil 3.7. p-EGFP yüklü NP 30 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik



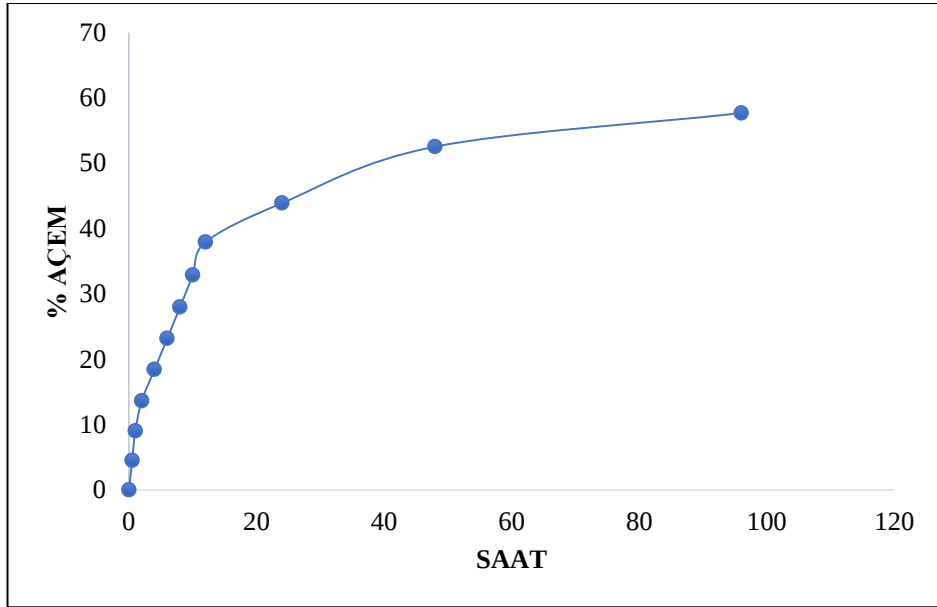
Şekil 3.8. p-EGFP yüklü NP 31 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik



Şekil 3.9. p-EGFP yüklü NP 31 kodlu formülün zeta potansiyeline ait grafik

#### 3.1.4. İn-vitro Etken Madde Salım Çalışmasına Ait Bulgular

Bölüm 2.3.5.'te anlatıldığı şekilde diyaliz membran yöntemiyle yapılan in vitro salım çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Plazmid DNA ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili

İn vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda salımın 48. saate kadar hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve platoya ulaştığı görülmüştür. Daha sonrasında ise salımın 96 saate kadar devam ettiği bulunmuştur. Salım çalışmaları üç paralel olarak yürütülmüştür.

**Çizelge 3.12.** Plazmid DNA yüklü nanopartikülün in vitro salım kinetikleri

|                                                   | 0. derece | 1.derece | Higuchi | Korsmeyer-Peppas | Weibull |
|---------------------------------------------------|-----------|----------|---------|------------------|---------|
| <b>Determinasyon Katsayısı (<math>r^2</math>)</b> | 0,6585    | 0,7586   | 0,9153  | 0,9389           | 0,990   |
| <b>Kesişim</b>                                    | 0,091     | 0,011    | 2,710   | 0,482            | 0,371   |

Plazmid DNA yüklü nanopartiküllerden yapılan in vitro salım çalışmaları sonucunda elde edilen verilerden hareketle yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda salımın Korsmeyer-Peppas, Higuchi ve Weibull kinetiklerine uyum sağladığı görülmüştür. Yukarıda bahsedilen üç kinetiğe de uyum görülmesine karşın en yüksek uyum Weibull kinetiğinde görülmüştür. İn vitro salım grafiklerinden elde edilen sonuçların kinetik sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

### 3.1.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Kısa Süreli Fiziksel Stabilitate Çalışma Sonuçları

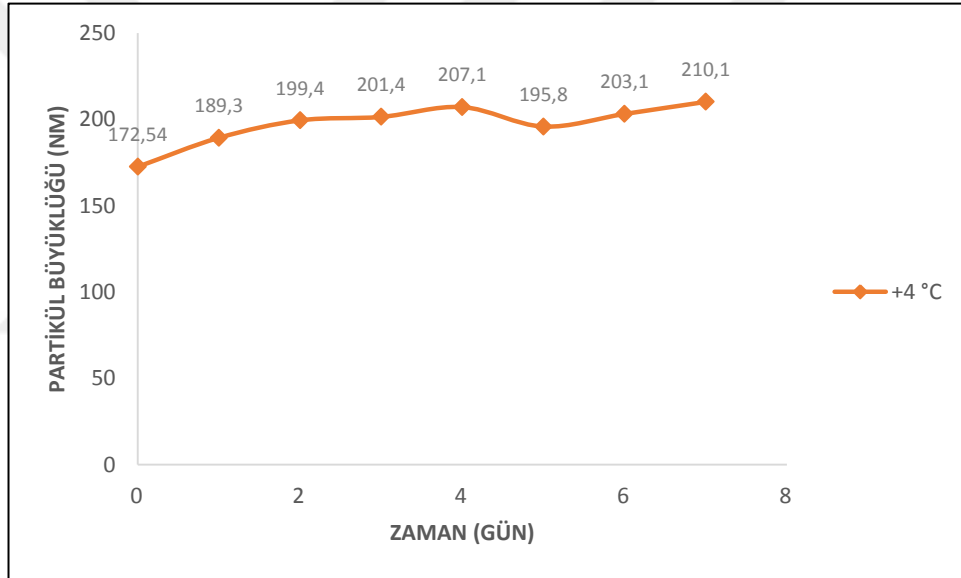
Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları Bölüm 2.3.6’da anlatıldığı şekilde seçmiş olduğumuz nihai formülasyonumuzda gerçekleştirilmiş olup Çizelge 3.13’de verilen sonuçlar elde edilmiştir. Ön stabilite değerlendirmesi partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve % enkapsülasyon sonuçlarına göre yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre tüm ortam koşulları altında nanopartikül formülasyonlarının 7 gün boyunca yapılan stabilite çalışmalarında partikül büyüklüğü 150-250 nm aralığında bulunmuştur.

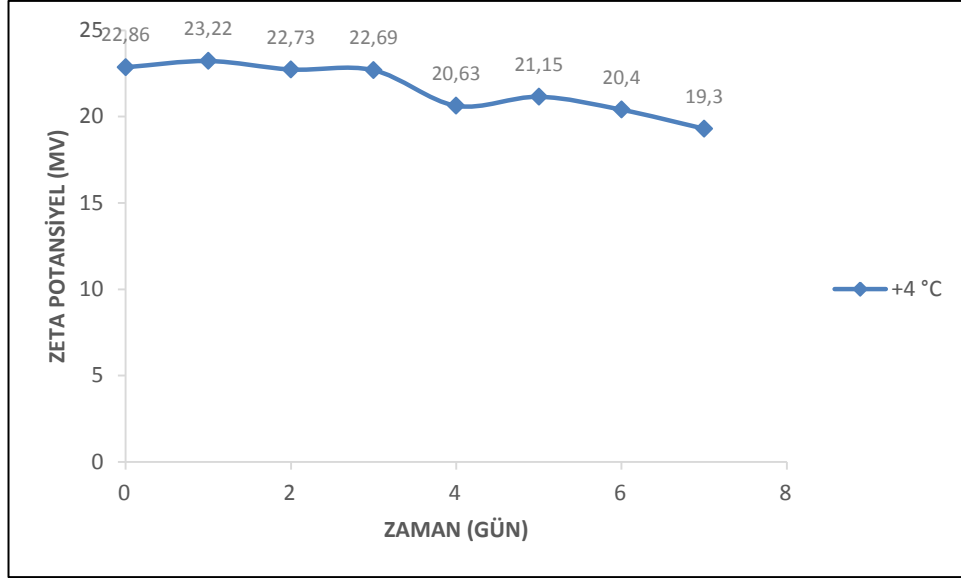
Elde edilen sonuçlara göre nanopartikül formülasyonlarının 7 gün boyunca yapılan stabilite çalışmalarında zeta potansiyel değerleri (+19) - (+24) mV aralığında bulunmuştur.

**Çizelge 3.13.** +4 °C’de yapılan stabilite çalışması sonuçlarına ait bulgular

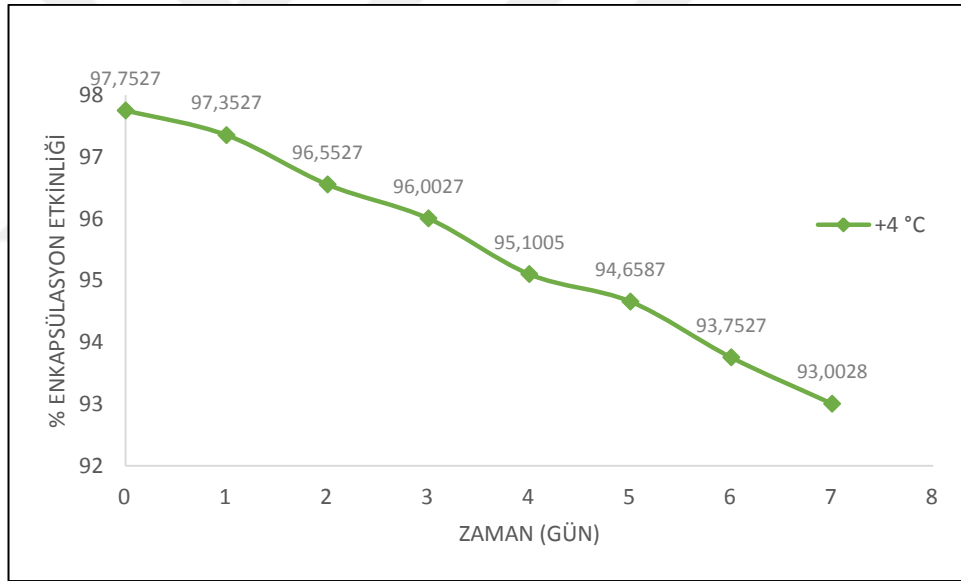
| Günler | Partikül büyüklüğü (nm)±SS | Zeta potansiyel (mV)±SS | PDI±SS         | %EE±SS        |
|--------|----------------------------|-------------------------|----------------|---------------|
| 0      | 17254±1,65                 | 22,86±3,950             | 0,2449±0,108   | 97,7527±4,03  |
| 1      | 189,3±4,417                | 23,22±0,8318            | 0,2438±0,01249 | 97,3527±1,69  |
| 2      | 199,4±3,21                 | 22,73±0,3041            | 0,2538±0,013   | 96,5527±4,03  |
| 3      | 201,4±5,545                | 22,69±0,2059            | 0,2542±0,0071  | 96,0027±2,203 |
| 4      | 207,1±2,371                | 20,63±0,100             | 0,2514±0,018   | 95,1005±3,103 |
| 5      | 195,8±0,5774               | 21,15±5,50              | 0,268±0,009    | 94,6587±6,12  |
| 6      | 203,1±1,286                | 20,4±0,702              | 0,2333±0,031   | 93,7527±5,86  |
| 7      | 210,1±1,53                 | 19,3±0,2                | 0,2296±0,004   | 93,0028±0,962 |



**Şekil 3.11.** +4 °C saklanan numunelere ait partikül boyutu sonuçlarının grafiksel gösterimi (n=3)



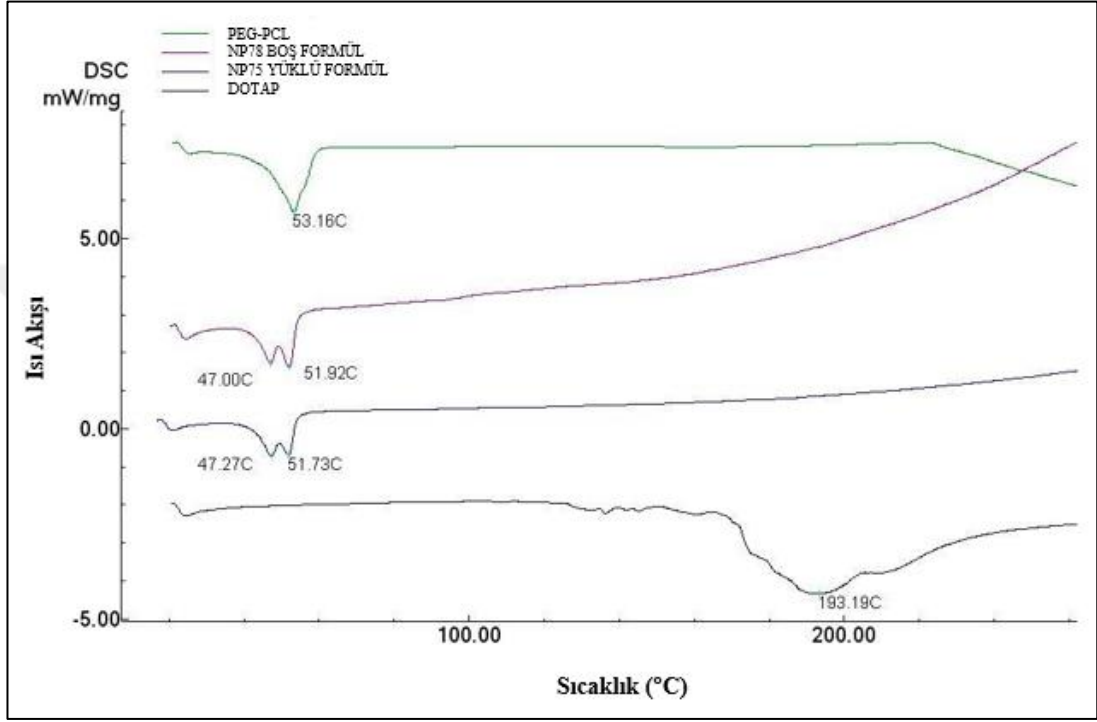
Şekil 3.12. +4 °C saklanan numunelere ait zeta potansiyel sonuçlarının grafiksel gösterimi (n=3)



Şekil 3.13. +4 °C saklanan numunelere ait % enkapsülasyon etkinliği sonuçlarının grafiksel gösterimi (n=3)

### 3.1.6. Hazırlanan Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi Sonuçları

Bölüm 2.3.7’ de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi sonuçları Şekil 3.14’te gösterilmiştir.

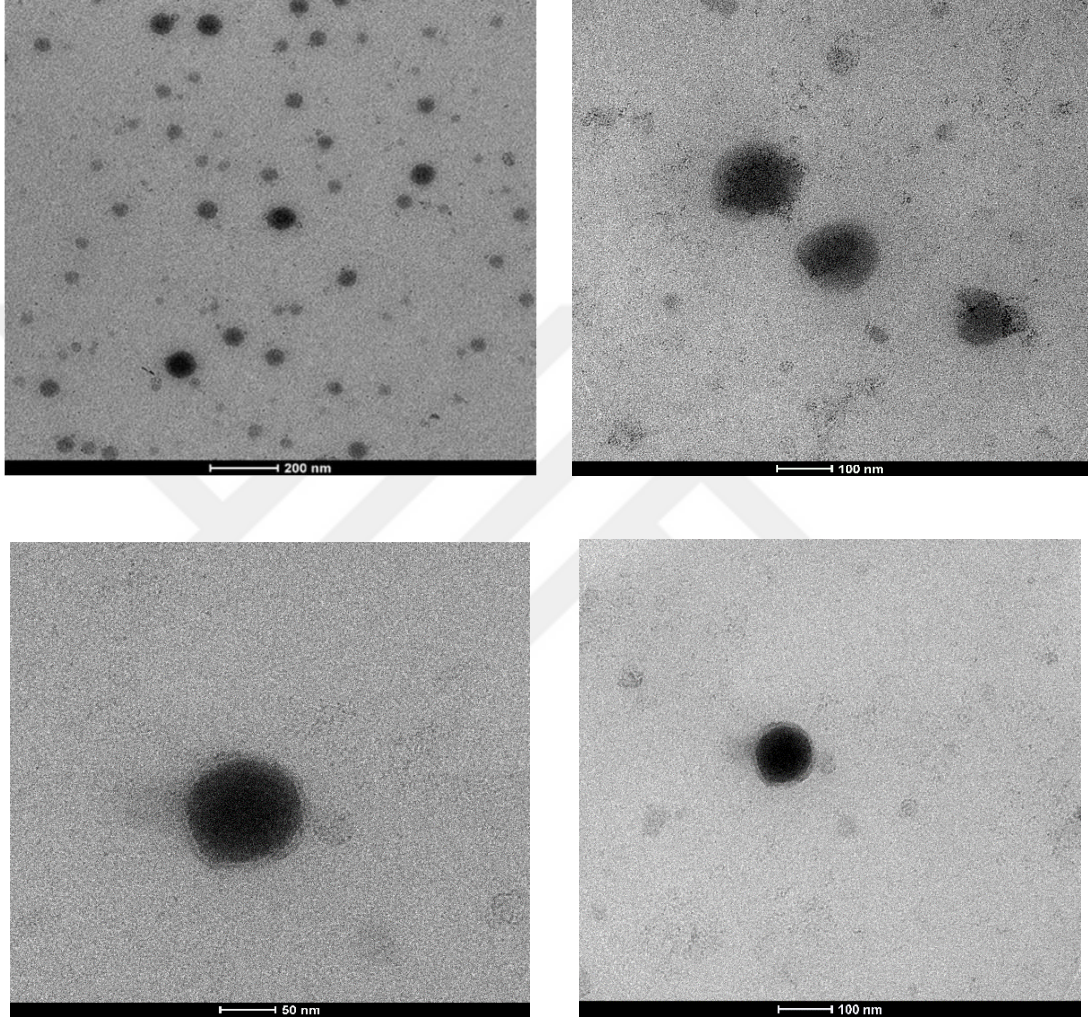


**Şekil 3.14.** Lipid-polimer hibrit nanopartikül formülasyonu ve formülasyonda bulunan maddelere ait DSC termogramları. Yukarıdan aşağıya; PEG-PCL, boş nanopartikül, yüklü nanopartikül ve DOTAP’a ait DSC termogramları.

Şekil 3.14’te verilen sonuçlara göre üretilen nanopartikül formülasyonunda sadece nanopartiküle ait sıcaklık değerlerine sahip pikler görülmüştür. Formülasyonda yer alan plazmid, polimer, lipid ve dış faza ait pikler görülmemiştir. Bu sonuç formülasyondaki maddelerin bir araya gelerek nanopartikül yapısını oluşturduğu ve yapıya enkapsüle olduklarını göstermektedir.

### 3.1.7. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi Sonuçları

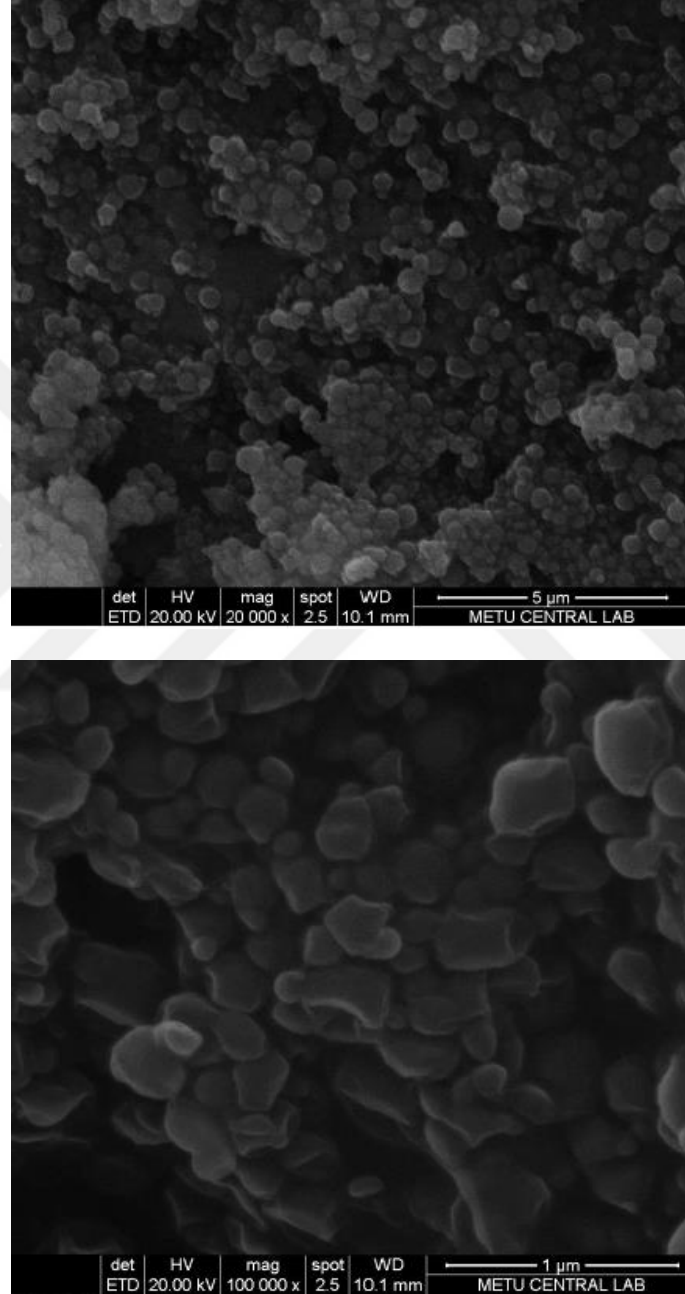
Bölüm 2.3.8’te anlatıldığı şekilde Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara ait görüntüler aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.15. Hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartiküllere ait TEM görüntüleri

### 3.1.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

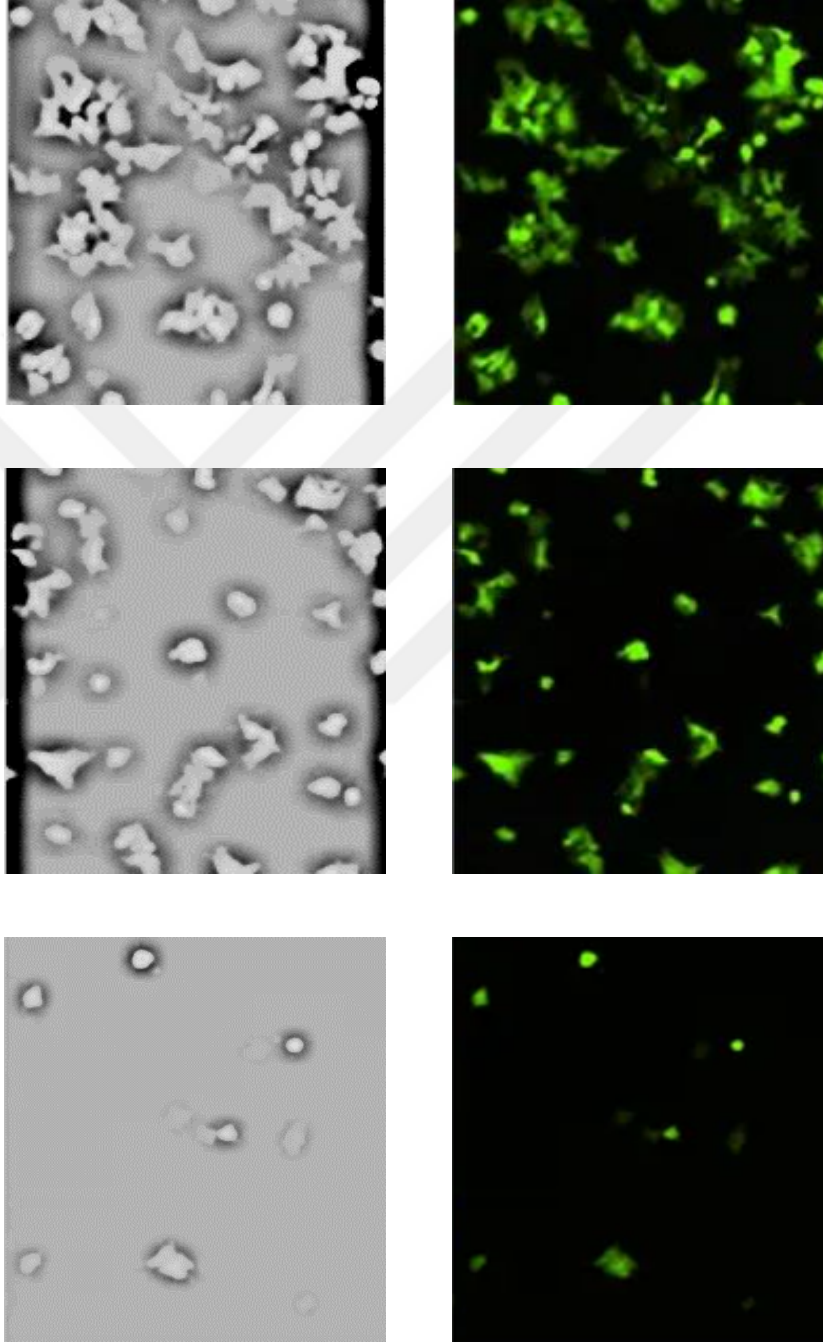
Bölüm 2.3.9’da anlatıldığı şekilde Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara ait görüntüler aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.16. Hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartiküllere ait SEM görüntüleri

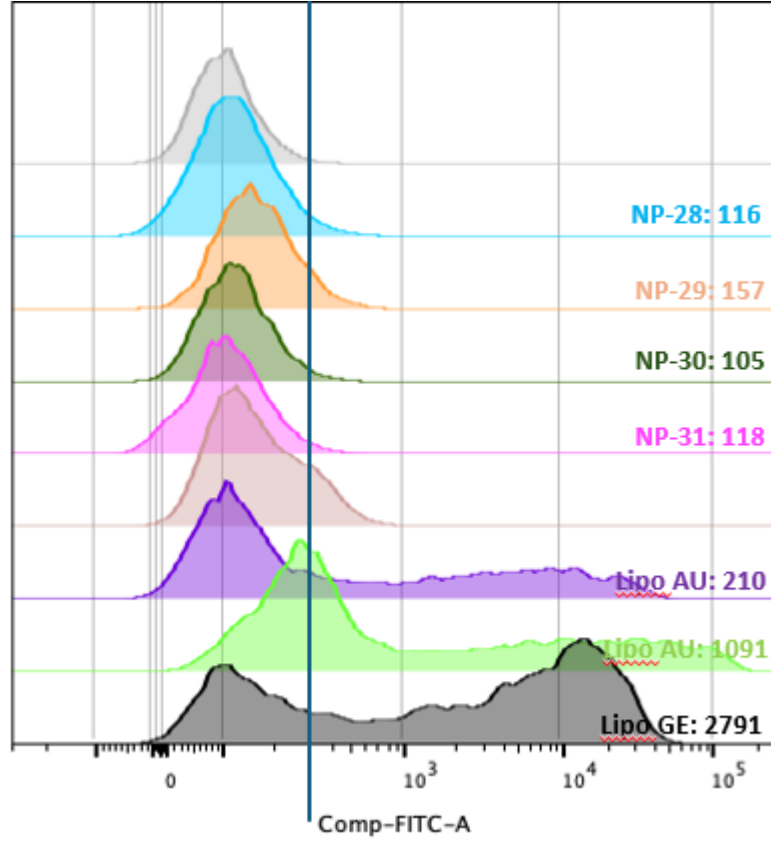
### 3.1.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 3.1.9.1. Floresan Görüntüleme Çalışmaları Sonuçları

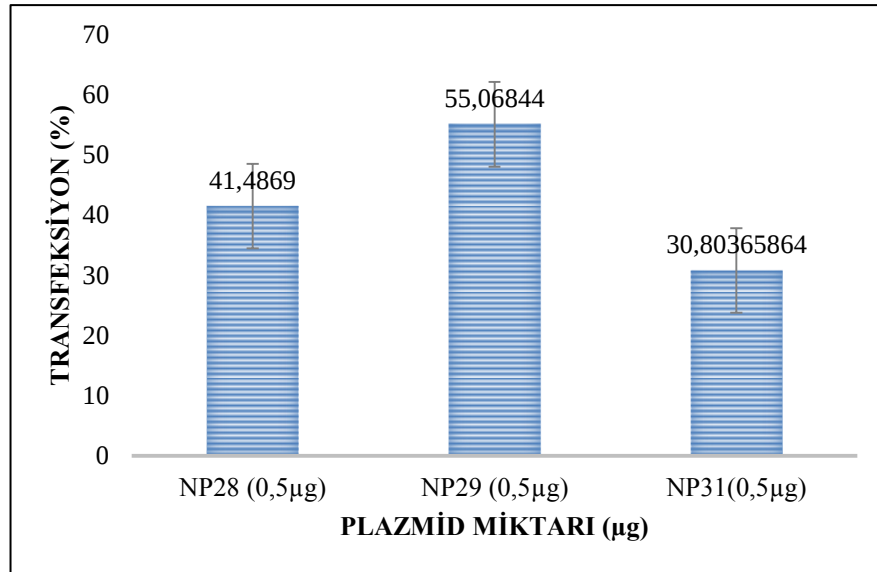


**Şekil 3.17.** Yukarıdan aşağıya e-GFP-C1 plazmidini içeren NP-29, NP-28, ve NP-31 formülasyonlarının HEK-293 hücrelerine transfeksiyonun 48. saatinden sonra ters floresan mikroskopisi kullanılarak gözlemlenen GFP-pozitif hücrelerin görüntüleri

### 3.1.9.2. Transfeksiyon Etkinliği Tayini Sonuçları

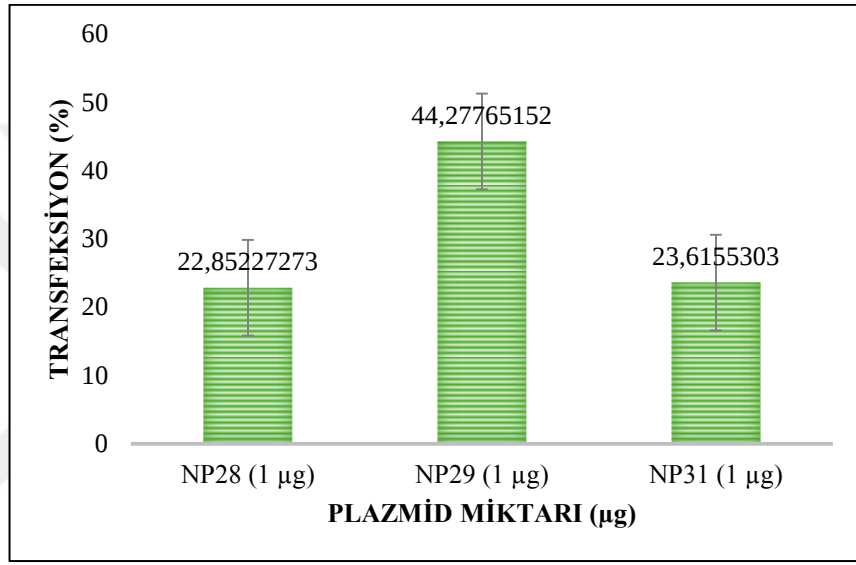


**Şekil 3.18.** Flow sitometri analizi sonucu formülasyonlardan ve kontrol gruplarından alınan floresan sinyal pikleri ve değerleri

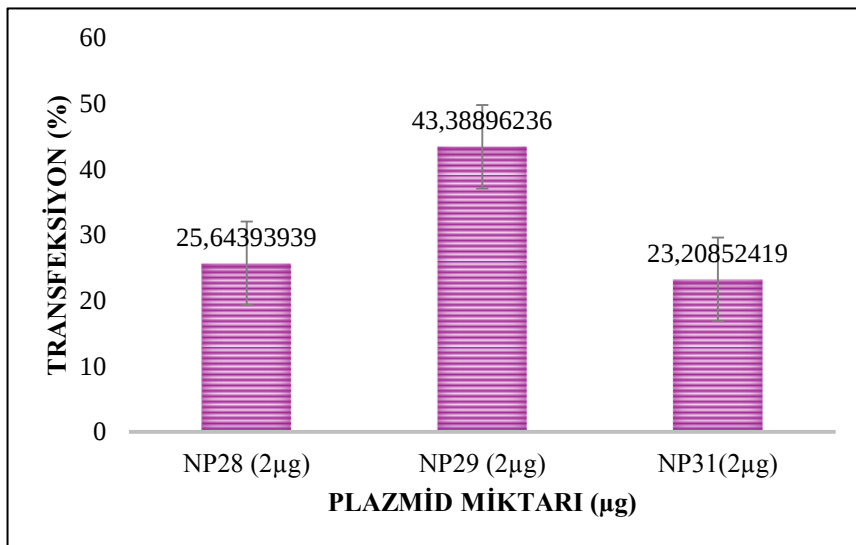


**Şekil 3.19.** 0,5 µg konsantrasyonda uygulanan 3 formülasyonun flow sitometri analizi transfeksiyon yüzdeleri

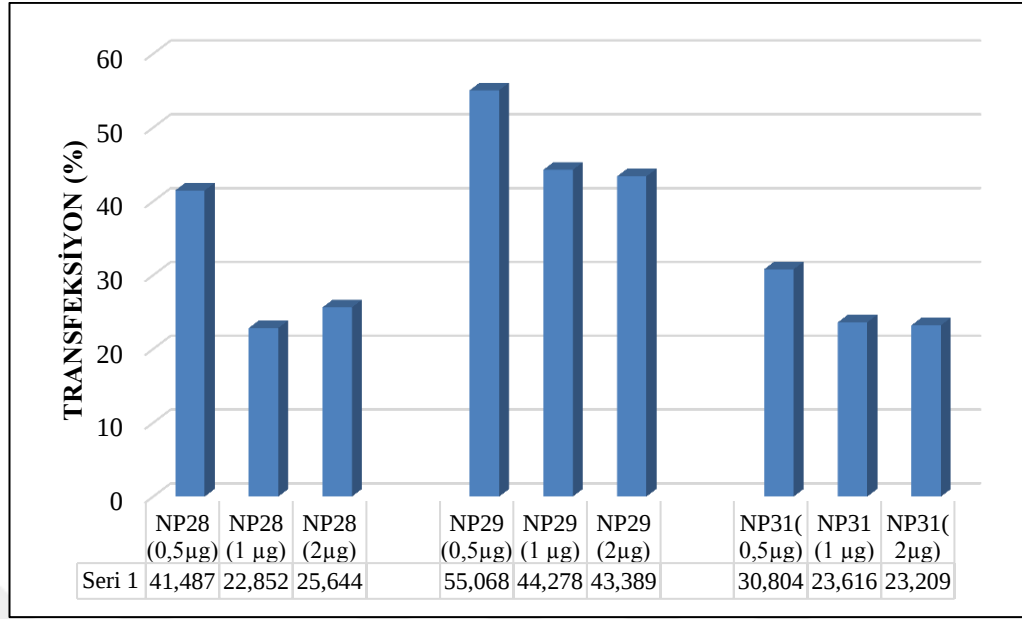
Flow sitometri analizi sonucunda elde edilen veriler, farklı nanopartikül formülasyonlarının transfeksiyon verimliliğinde belirgin farklılıklar olduğunu göstermektedir. En yüksek tranfeksiyon yüzdesi HEK-293 hücrelerine 0,5 µg plazmid uygulaması sonucu elde edilmiştir. NP 28 (0,5 µg) uygulamasında %41,49 oranında transfeksiyon elde edilirken, NP 29 (0,5 µg) ile bu oran %55,06'ya yükselmiştir. Buna karşılık NP 31 (0,5 µg) transfeksiyon oranı %30,80 ile en düşük düzeyde kalmıştır. Elde edilen sonuçlar, NP 29'un diğer gruplara kıyasla daha yüksek transfeksiyon etkinliği sağladığını, NP 31'in ise daha sınırlı bir başarıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



**Şekil 3.20.** 1 µg uygulanan konsantrasyonda uygulanan 3 formülasyonun flow sitometri analizi transfeksiyon yüzdeleri

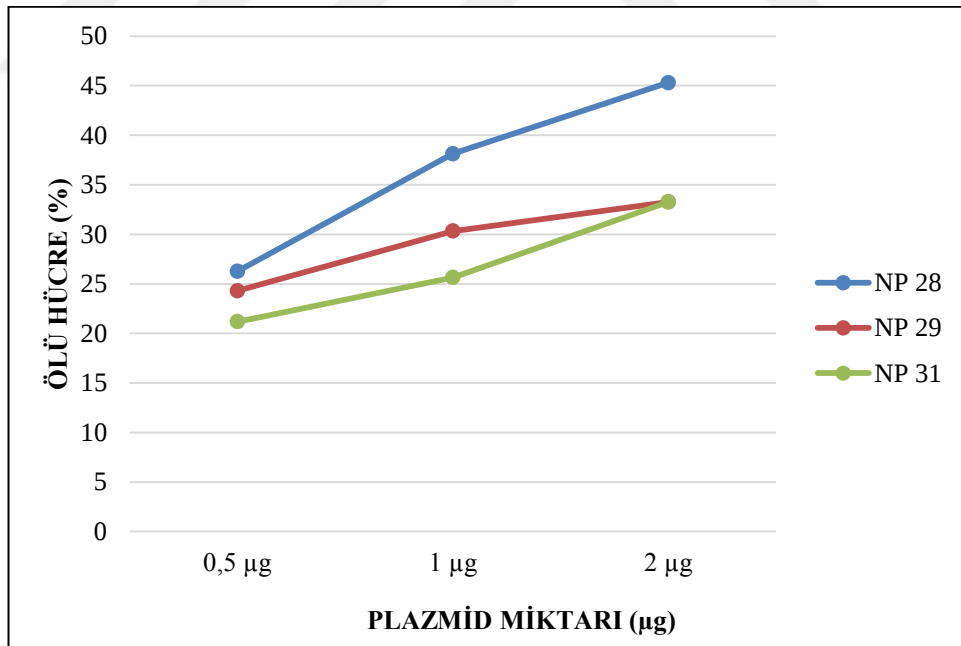


**Şekil 3.21.** 2 µg konsantrasyonda uygulanan 3 formülasyonun flow sitometri analizi transfeksiyon yüzdeleri



Şekil 3.22. 3 formülasyonun flow sitometri analizi sonucu transfeksiyon yüzdelerinin grafiksel karşılaştırılması

### 3.1.9.3. Hücre Canlılığı Çalışmaları Sonuçları



Şekil 3.23. 3 formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki flow sitometri analizi sonucu elde edilen ölü hücre yüzdelerinin grafiksel karşılaştırılması

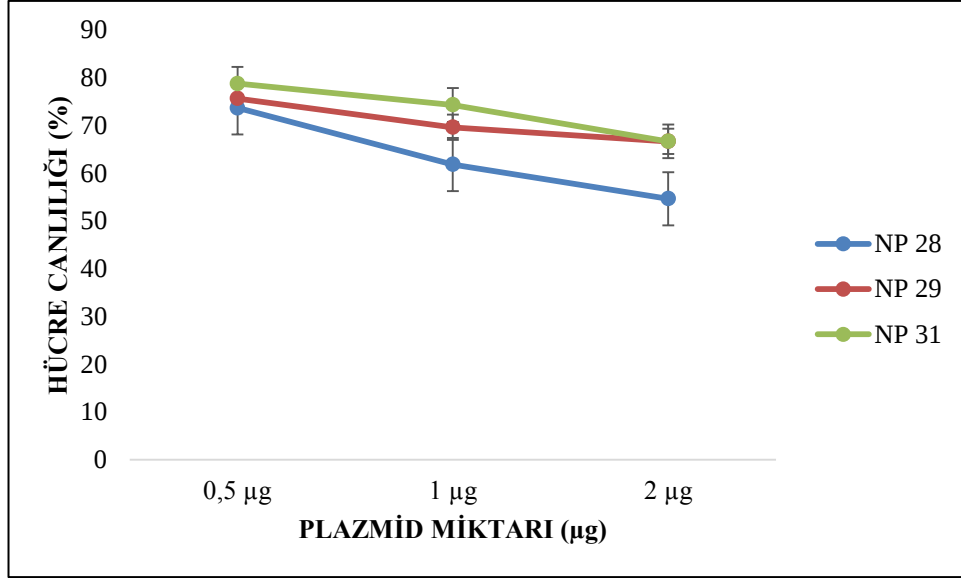
Flow sitometri analizi sonucunda nanopartikül gruplarının farklı dozlarda (0,5–2 µg) uygulandığında hücre canlılığı üzerinde farklı etkiler oluşturduğu saptanmıştır. NP28 grubu,

doza bağılı olarak artan bir ölü hücre oranı göstermiştir; 0,5 µg'de %26,26 olan oran, 1 µg'de %38,13'e, 2 µg'de ise %45,30'a yükselmiştir. Bu sonuç, NP28'in özellikle yüksek dozlarda sitotoksosite potansiyelini artırdığını göstermektedir. NP29 grubunda ise ölü hücre oranı daha düşük düzeylerde seyretmiştir. 0,5 µg'de %24,30 olan ölü hücre oranı, 1 µg'de %30,32'ye ve 2 µg'de %33,27'ye çıkmıştır. Bu artış NP28'e kıyasla daha sınırlı kalmıştır. NP31 grubunda ise en düşük sitotoksosite değerleri gözlenmiştir. 0,5 µg uygulamasında %21,18 ile en düşük ölü hücre oranı elde edilmiş, 1 µg'de %25,64 ve 2 µg'de %33,27'ye yükselmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, tüm nanopartikül gruplarında doz artışıyla birlikte ölü hücre oranında yükseliş olduğu görülmektedir. Ancak gruplar arasında kıyaslama yapıldığında, NP31'in en düşük sitotoksositeye, NP28'in ise en yüksek sitotoksositeye yol açtığı tespit edilmiştir. Bu bulgu, nanopartikül yapılarının hücre uyumluluğu açısından farklılıklar barındırdığını ve özellikle yüksek dozlarda toksisite riskinin göz önünde bulundurulması gerektiğini ortaya koymaktadır. Literatürde de nanopartikül temelli sistemlerin hücre toksisitesinin doz bağımlı bir biçimde arttığı, ancak yapısal özelliklerin bu etkiyi belirgin şekilde farklılaştırdığı bildirilmektedir (Nel vd., 2006; Zhao ve ark., 2021).

**Çizelge 3.14.** 3 formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki flow sitometri analizi sonucu elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri

| Formüller | Doz (µg) | Hücre Canlılığı (%) |
|-----------|----------|---------------------|
| NP28      | 0.5      | 73.73               |
| NP28      | 1.0      | 61.87               |
| NP28      | 2.0      | 54.7                |
| NP29      | 0.5      | 75.69               |
| NP29      | 1.0      | 69.67               |
| NP29      | 2.0      | 66.73               |
| NP31      | 0.5      | 78.82               |
| NP31      | 1.0      | 74.35               |
| NP31      | 2.0      | 66.73               |



**Şekil 3.24.** 3 formülasyonun farklı konsantrasyonlardaki flow sitometri analizi sonucu elde edilen hücre canlılığı yüzdelerinin grafiksel karşılaştırılması

Flow sitometri verileri hücre canlılığı üzerinden değerlendirildiğinde, nanopartikül grupları arasında belirgin farklılıklar saptanmıştır. NP28 grubunda hücre canlılığı doz artışına paralel olarak belirgin şekilde azalmış; 0,5 µg’de %73,73 olan canlılık oranı, 1 µg’de %61,87’ye, 2 µg’de ise %54,70’e düşmüştür. Bu durum NP28’in özellikle yüksek dozlarda sitotoksosite potansiyelinin arttığını göstermektedir.

NP29 grubunda ise hücre canlılığı daha yüksek düzeylerde seyretmiş ve doz artışıyla birlikte azalma daha sınırlı kalmıştır. 0,5 µg’de %75,69, 1 µg’de %69,67 ve 2 µg’de %66,73 oranında canlılık elde edilmiştir.

NP31 grubu en yüksek hücre canlılığı değerlerini göstermiştir. 0,5 µg’de %78,82 ile en yüksek canlılık oranına ulaşılmış, 1 µg’de %74,35, 2 µg’de ise %66,73 değerleri elde edilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, tüm nanopartikül gruplarında doz artışıyla hücre canlılığında azalma eğilimi gözlenmiştir. Ancak gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, NP31’in en yüksek hücre canlılığı ile en biyouyumlu grup olduğu, NP28’in ise hücre canlılığını en fazla azaltan nanopartikül olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, nanopartikül yapılarının hücre biyouyumluluğu açısından farklı özellikler taşıdığını ve optimizasyon gereksinimlerini ortaya koymaktadır. NP28 grubu özellikle yüksek dozlarda en düşük hücre canlılığı değerlerini göstermiştir (%61,87 ve %54,70). NP29 grubu orta düzeyde canlılık

korurken, NP31 grubu tüm dozlarda en yüksek hücre canlılığına ulaşmıştır (%78,82 → %66,73). Bu bulgu, NP31'in biyouyumluluk açısından en uygun nanopartikül olduğunu, NP28'in ise yüksek dozlarda toksisite riskini artırdığını ortaya koymaktadır.



## 4. TARTIŞMA

Tez kapsamında, genetik materyal taşıyıcı sistem olarak poli(etilen glikol) (PEG)-poli(ε-kaprolakton) (PCL) ve DOTAP kullanılarak lipid-polimer hibrit nanopartikül formülasyonları tasarlanmıştır. Çalışmada, formülasyon parametrelerinin (hazırlama yöntemi, kullanılan materyaller ve uygulanan basamaklar) geliştirilen nanopartikül taşıyıcı sistemler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, gen taşıyıcı sistemlerin tasarım ve uygulama süreçlerinde karşılaşılan güçlüklerin anlaşılmasına ve bu alandaki sorunların çözümüne eczacılık teknolojisi perspektifinden katkı sunulması amaçlanmıştır.

Lipid-polimer hibrit nanopartikül nanopartiküllerin hazırlanmasında, lipid olarak DOTAP ve polimer olarak biyoyumlu, biyoparçalanır ve FDA onaylı bir polimer olan PEG ve PCL'un kopolimer olarak modifiye edilmiş formu kullanılmış; S/Y/S çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretim yapılmıştır.

DOTAP (1,2-diöleoyl-3-trimethylammonium-propane), gen transferinde en yaygın kullanılan katyonik lipitlerden biridir. Yapısındaki kuaterner amonyum grupları sayesinde negatif yüklü DNA veya RNA ile güçlü elektrostatik kompleksler oluşturur. Bu özellik, genetik materyalin hem enzimatik degradasyondan korunmasını sağlar hem de membran ile yakın etkileşim kurarak hücre içine girişini kolaylaştırır. Ayrıca DOTAP, endozomal membran destabilizasyonunu tetikleyerek genetik materyalin sitoplazmaya kaçışına katkıda bulunur (Zuhorn vd., 2002). Ancak DOTAP'ın avantajları, bazı sınırlılıklar ile dengelenmektedir. Yüksek katyonik yük, plazma proteinleri ile nonspesifik etkileşimlere neden olarak hızlı eliminasyona yol açabilmektedir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda kullanımı membran bütünlüğünü bozarak sitotoksositeye neden olabilmektedir (Simberg vd., 2004). Bu nedenle DOTAP tek başına kullanıldığında transfeksiyon etkinliği ile biyogüvenlik arasında bir denge sorunu ortaya çıkmaktadır.

PEG-PCL (poli(etilen glikol)-poli(ε-kaprolakton)) blok kopolimeri, biyoyumlu ve biyobozunur yapısı sayesinde gen taşıyıcı sistemlerde stabiliteyi artıran önemli bir materyaldir. PCL segmenti, hidrofobik özelliği ile çekirdek oluşturarak genetik materyalin veya eklenen hidrofobik ajanların enkapsülasyonunu kolaylaştırırken, PEG segmenti nanopartikül yüzeyinde hidrofilik bir koruma tabakası sağlar. Bu PEG tabakası, dolaşım süresini uzatır, immün sistem tarafından tanınmayı azaltır ve nanopartiküllerin hedef bölgeye

ulaşma olasılığını artırır (Li vd., 2015). PEG-PCL ayrıca kontrollü biyobozunurluk sunarak, terapötik ajanların salım kinetiğini düzenleyebilir. Bu özellik, özellikle uzun süreli gen ekspresyonu gerektiren terapötik uygulamalarda büyük avantaj sağlar. Literatürde PEG polimeri yüksüz kısım, PCL ise negatif yüklü hidrofobik kısım olarak geçmektedir.

Çalışmamızda kullanılan kopolimer, PEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>10000</sub> formunda olup PEG: PCL oranı 1:2 olacak şekilde tasarlanmıştır. PEG zincirinin 5000 g/mol ve PCL zincirinin 10000 g/mol molekül ağırlığına sahip olması, sistemde hidrofilik-hidrofobik dengeyi kontrollü biçimde sağlamaktadır. PCL segmentinin PEG'e kıyasla daha uzun zincir yapısına sahip olması, nanopartikül çekirdeğinin daha hidrofobik bir karakter kazanmasına neden olurken, PEG zincirleri yüzeyde hidrofilik bir kılıf oluşturarak partikülün sulu ortamda stabil kalmasını sağlamaktadır (Zhou vd., 2020; Hu vd., 2019). PEG-PCL oranı, nanopartiküllerin boyutunu, yüzey yükünü ve salım profilini doğrudan etkileyen bir parametredir. Literatürde PEG oranının artırılmasının partikül boyutunu küçülttüğü, yüzey yükünü nötrleştirdiğı ve biyoyumluluğu artırdığı bildirilmektedir (Wang vd., 2015). Buna karşılık, PCL oranının artması, partikül çekirdeğinde daha yüksek DNA veya ilaç yükleme kapasitesi sağlamaktadır çünkü PCL'nin hidrofobik doğası, çekirdek kısmında stabil bir kapsülasyon ortamı oluşturur (Gajbhiye vd., 2023). Çalışmada kullanılan 1:2 oranı, hem yeterli DNA yükleme kapasitesi hem de sulu ortamda uzun süreli stabilite sağlamak açısından optimal bir denge sunmaktadır.

Ayrıca PEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>10000</sub> oranı, nanopartiküllerin kontrollü salım profiline de katkı sağlamaktadır. PCL segmentinin yavaş bozunma hızı, plazmid DNA'nın uzun süreli ve kararlı biçimde salınmasına olanak tanırken, PEG zincirleri sistemin biyoyumluluğunu ve dolaşım süresini uzatmaktadır. Benzer şekilde literatürde, PEG zincir uzunluğunun 2000–5000 g/mol aralığında, PCL zincir uzunluğunun ise 10000–20000 g/mol aralığında tutulmasının, gen taşıyıcı sistemlerde hem yüksek transfeksiyon verimi hem de düşük sitotoksosite sağladığı rapor edilmiştir (Chan vd., 2021; Hu vd., 2019).

Sonuç olarak, PEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>10000</sub> oranı (1:2) bu çalışmada hidrofilik-hidrofobik dengeyi, stabiliteyi ve transfeksiyon etkinliğini optimize etmek amacıyla tercih edilmiştir. Bu oran, nanopartiküllerin yüzeyinde yeterli PEG tabakası oluştururken, PCL'nin oluşturduğu hidrofobik çekirdek sayesinde plazmid DNA'nın etkili bir şekilde yüklenmesini ve salımının kontrollü olarak gerçekleşmesini desteklemektedir.

PEG<sub>5000</sub>-PCL<sub>10000</sub> oranı, nanopartikülün hidrofilik-hidrofobik dengesini düzenleyerek DNA yükleme ve salım davranışlarını da etkilemiştir. Çalışmada yapılan in vitro DNA salım analizinde, 24 saatlik sürede toplam DNA'nın %43,89'unun serbest bırakıldığı belirlenmiştir. Salım profiline göre, ilk 0,5–2 saat içinde hızlı bir salım fazı gözlenmiş bu aşamadan sonra ise salım hızı yavaşlayarak 24. saatte %43,89'a ulaşmıştır. Bu durum, sistemde PEG zincirlerinin yüzeyde oluşturduğu hidrofilik tabakanın difüzyon kontrollü bir salım mekanizması oluşturduğunu, PCL çekirdeğinin ise DNA'nın kademeli olarak serbest kalmasını sağladığını göstermektedir. Bu veriler çalışmamız sırasında elde etmiş olduğumuz plazmid DNA salım verilerimizi destekler niteliktedir. Benzer şekilde Zhou ve ark. (2020) ile Gajbhiye ve ark. (2023), PEG-PCL oranının PCL yönünde artırıldığı sistemlerde daha yavaş ve sürdürülebilir bir DNA salım profili elde edildiğini bildirmişlerdir.

DOTAP ve PEG-PCL'nin kombinasyonu, her iki bileşenin avantajlarını bir araya getirerek hibrit nanopartiküller oluşturur. DOTAP, genetik materyalin yoğun bir şekilde paketlenmesini ve hücre membranı ile güçlü etkileşimini sağlarken; PEG-PCL, sistemin biyostabilitesini artırır ve toksisite riskini azaltır. Bu sinerji sayesinde, genetik materyalin hem dolaşımda daha uzun süre korunması hem de hücre içine etkin şekilde taşınması mümkün hale gelir. Literatürde yapılan çalışmalar, DOTAP/PEG-PCL hibrit sistemlerin özellikle siRNA ve plazmid DNA taşınmasında yüksek transfeksiyon verimi sunduğunu göstermektedir. Örneğin Liu ve ark. (2015), bu hibrit yapıların serum varlığında dahi yüksek stabilite gösterdiğini ve siRNA ile hücresel susturma etkinliğini artırdığını bildirmiştir (Liu vd., 2015). Benzer şekilde Zhang ve ark. (2018), PEG-PCL katkılı DOTAP nanopartiküllerinin tümör hücrelerinde daha uzun süreli gen ekspresyonu sağladığını göstermiştir (Zhang vd., 2018).

Nanopartikül üretiminde solvent evaporasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, globüllerin emülsifikasyonu ve stabilizasyonu iki önemli faktördür (Sharma vd., 2016). Genel olarak, araştırmacılar nanopartiküllerin stabilizasyonunda bir yüzey aktif madde kullanmaktadırlar. Nanopartikül üretiminde poli(vinil alkol) (PVA) genellikle stabilizatör, emülgatör ve yüzey kaplayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. PVA, amfifilik yapısı sayesinde hem sulu fazda çözünürlüğü artırmakta hem de nanopartiküllerin yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturarak agregasyonu engellemektedir (Zhang vd., 2020). Bu özellik, özellikle çift emülsiyon (W/O/W) veya nanopresipitasyon yöntemlerinde partikül boyutunun kontrol edilmesini ve homojen bir dağılım elde edilmesini kolaylaştırır (Bilati, Allémann ve Doelker, 2005). Ayrıca, PVA'nın hidrofilik hidroksil grupları sayesinde nanopartikül yüzeyinde

yüksek kolloidal stabilite sağlanmakta ve bu da plazmid DNA gibi hidrofobik ve/veya yüklü biyomoleküllerin etkin enkapsülasyonuna katkıda bulunmaktadır (Sahoo vd., 2002). Bununla birlikte, PVA'nın yüzeye adsorbe olması, nanopartikül yüzeyinde hidrofilik bir bariyer oluşturarak sistemin biyoyumluluğunu artırır ve opsonizasyonu azaltarak dolaşım süresini uzatır (Andhariya vd., 2017). Ancak bazı çalışmalarda, PVA'nın yüzeyde kalıntı halinde bulunmasının, nanopartikül yüzey özelliklerini ve yükünü değiştirebileceği, dolayısıyla biyolojik etkileşimleri etkileyebileceği de rapor edilmiştir (Jain vd., 2010). Bu nedenle, PVA'nın konsantrasyonu partikül sentezinde kritik parametreler arasında yer almaktadır. Nanopartikül önformülasyon çalışmalarımız sırasında PVA konsantrasyonu ve miktarının belirlenmesi kritik rol oynamış olup değerlendirmeler partikül boyutu ve zeta potansiyelleri üzerinden yapılmıştır.

Genetik materyallerin hedef hücreler tarafından alımı boyut, şekil, yüzey yükü, hidrofobiklik ve hidrofiliklik gibi taşıyıcı sistemin özelliklerine de bağlıdır (Bachmann ve Jennings, 2010). Nanopartikül boyutu genetik materyalin hedef hücre tarafından etkili bir şekilde alınabilmeleri için önemli bir faktördür. Plazmid DNA yüklü nanopartiküllerin transfeksiyon etkinliği büyük ölçüde partikül boyutu ve zeta potansiyeline bağlıdır. Literatürde, 100–200 nm aralığındaki nanopartiküllerin hücre membranına daha etkin şekilde internalize olduğu ve endositoz yoluyla hücre içine alımının arttığı bildirilmektedir (Zhang vd., 2021). Özellikle 150 nm'nin altındaki partiküller, endositoz ve klatrin aracılı giriş mekanizmaları açısından daha avantajlı kabul edilmekte, bu da gen taşınım verimliliğini artırmaktadır (Lv vd., 2006). Daha büyük partiküller (>300 nm) ise hücre zarından geçişte zorlanmakta, fagositoz oranı artmakta ve dolayısıyla transfeksiyon etkinliği azalmaktadır (Jiang vd., 2020).

Zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde, pozitif yüzey yüküne sahip nanopartiküller (genellikle +20 ila +40 mV aralığında) hücre yüzeyindeki negatif yüklü fosfolipit tabakalar ile elektrostatik etkileşime girerek hücre alımını kolaylaştırmaktadır (Suk vd., 2016). Katyonik lipid veya polimer bileşenlerinin (örneğin DOTAP, PEI veya kitosan) zeta potansiyeli artırdığı ve plazmid DNA'nın negatif yükünü nötralize ederek yoğun, stabil kompleksler oluşturduğu rapor edilmiştir (Gao vd., 2022). Ancak aşırı pozitif zeta potansiyeli (>+50 mV), hücre membranında sitotoksositeye yol açabileceğinden, optimum yük dengesinin sağlanması gereklidir (Xu vd., 2018).

Bu çalışmada sentezlenen DOTAP/PEG-PCL temelli plazmid DNA yüklü lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin (LPHNPs) fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde, elde edilen partikül boyutu ve zeta potansiyel değerlerinin transfeksiyon etkinliği açısından literatürle uyumlu aralıkta olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküllerin ortalama partikül boyutunun 150–200 nm aralığında olması, hücre zarından endositoz yoluyla etkin bir şekilde internalize edilmesini kolaylaştırmaktadır (Zhang vd., 2021).

Zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde, çalışmada elde edilen yaklaşık +20 ila +30 mV aralığındaki pozitif yüzey yükü, nanopartiküllerin negatif yüklü plazmid DNA ve hücre membran fosfolipitleriyle elektrostatik etkileşime girmesi açısından optimal kabul edilmektedir (Suk vd., 2016). Katyonik lipid olan DOTAP, sistemdeki pozitif yükün temel kaynağını oluşturarak DNA'nın negatif yükünü nötralize etmiş ve yoğun, stabil komplekslerin oluşumuna katkıda bulunmuştur (Gao vd., 2022). Ayrıca, PEG-PCL kopolimerinin sistemde bulunması, partiküllerin kolloidal stabilitesini artırmış, agregasyonu önlemiş ve biyouyumluluğu iyileştirmiştir (Xu vd., 2018).

Bununla birlikte, zeta potansiyel değerinin aşırı yüksek olmaması (+40 mV üzeri) sayesinde, sistemin sitotoksikite riskinin düşük olduğu düşünülmektedir. Bu durum, DOTAP ile PEG-PCL arasında sağlanan yük dengesi sayesinde elde edilmiştir. Bu sonuçlar, hibrit nanopartikül sisteminin yüksek stabilite, hücre içi alım kolaylığı ve uygun biyouyumluluk özellikleriyle, plazmid DNA'nın etkin taşınımı ve transfeksiyon için uygun bir taşıyıcı platform sunduğunu göstermektedir.

Elde edilen nihai formülasyonun ortalama partikül boyutu 176,3 nm, zeta potansiyeli ise +23,22 mV olarak belirlenmiştir. Literatüre göre gen taşıyıcı nanopartiküllerde 100–200 nm aralığında partikül boyutu, hücre zarından endositoz yoluyla etkin alımı desteklemekte; 20–30 mV aralığında pozitif zeta potansiyel ise DNA'nın negatif yüküyle elektrostatik etkileşimi artırarak hücre membranı ile bağlanmayı kolaylaştırmaktadır (Hu vd., 2019; Chan vd., 2021). Bu bulgular ışığında, çalışmada elde edilen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel değerleri değerlendirildiğinde, sistemin hücrelerle etkileşimi ve transfeksiyon verimliliği bakımından optimal aralıkta olduğu söylenebilir. Başarıyla gerçekleştirilen HEK-293 hücre hattı transfeksiyon sonuçlarını da bunu kanıtlar niteliktedir. Dolayısıyla nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin uygun şekilde optimize edilmesi, gen taşınımı ve ekspresyon etkinliği açısından belirleyici bir faktör olarak değerlendirilmektedir.

Plazmid DNA yüklü nanopartiküllerin transfeksiyon etkinliği, yalnızca partikül boyutu ve yüzey yükü gibi fizikokimyasal parametrelere değil, aynı zamanda nanopartiküllere yüklenen plazmid miktarına da doğrudan bağlıdır. Literatürde, gen taşıyıcı sistemlerde yüksek DNA yükleme oranlarının (örneğin 5–20 µg) hücrelere taşınan gen miktarını artırarak transfeksiyon verimliliğini yükselttiği, ancak aşırı DNA yüklemesinin partikül stabilitesini azaltabileceği bildirilmiştir (Gao vd., 2022; Liu et vd., 2019). Ayrıca, fazla DNA yükleme nanopartikül yüzeyinde agregasyona neden olabilmekte ve partikülün kolloidal stabilitesini düşürebilmektedir (Jiang vd., 2020). Bu durum, DNA yükleme ile nanopartikül yüzey özellikleri arasında dikkatli bir denge optimizasyonu gerektirdiğini göstermektedir.

e-GFP plazmid ile yapılan çalışmalarda da benzer eğilimler gözlemlenmiştir. Zhang ve arkadaşları (2021), 2–10 µg aralığında yüklenen e-GFP plazmidinin, HEK-293 hücrelerinde transfeksiyon etkinliğini doz bağımlı biçimde artırdığını, ancak 10 µg üzerindeki konsantrasyonlarda floresan yoğunluğunda azalma ve hücre canlılığında düşüş meydana geldiğini bildirmiştir. Bu durum, yüksek DNA miktarının nanopartikül sistemlerinde yük dengesizliği ve toksisite oluşturabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, tez çalışmamızda kullanılan e-GFP plazmid miktarının optimize edilmesi hem nanopartikül stabilitesi hem de transfeksiyon etkinliği açısından kritik önem taşımaktadır.

Tezimiz kapsamında ilk olarak hücre kültürü çalışmalarında e-GFP plazmid DNA yüklü DOTAP/PEG-PCL temelli lipid-polimer hibrit nanopartiküller kullanılarak 50 µg plazmid DNA yükleme oranının transfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bu miktarda DNA yükleme ile hazırlanan nanopartiküllerde transfeksiyon etkinliği gözlemlenmemiş olup floresan mikroskobu incelemelerinde yeşil floresan ışıma görülmemiştir. Bu sonuç, 50 µg DNA yükleme oranının, etkin gen ekspresyonu için uygun olmadığını göstermiş olup hücrelerde yük dengesizliği ve toksisite oluşturmuştur. Bu durum literatürde Gao ve ark., (2022) tarafından da belirtilen aşırı DNA yükleme oranının partikül stabilitesini azaltarak hücre toksisitesini artırdığı yönünde sunulan verileri doğrulamaktadır.

Zhang ve arkadaşlarının (2021) çalışmasında, 10–20 µg aralığında e-GFP plazmid yükleme yapılan nanopartiküllerde, transfeksiyon etkinliğinin yüksek floresan sinyaliyle doğrulandığı, ancak bu değerin üzerinde yapılan yüklemelerde DNA fazlalığına bağlı yüzey dengesizlikleri ve azalan hücre canlılığı gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu bağlamda, 20 µg

plazmid yüklemesinin üst sınırdan ancak optimum etkinlikte olduğu, sistemin yüksek gen ekspresyonu ve kabul edilebilir hücre canlılığı arasında denge sağladığı değerlendirilebilmektedir. Bir sonraki hücre kültürü çalışmalarımızda bahsi geçen literatür yorumlanarak e-GFP plazmid DNA yüklü DOTAP/PEG-PCL temelli lipid-polimer hibrit nanopartiküller kullanılarak 20 µg plazmid DNA yüklemesinin transfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bu miktarda DNA yüklemesiyle hazırlanan nanopartiküller transfeksiyon etkinliği göstermiş ve floresan mikroskobu incelemelerinde belirgin yeşil floresan ışımaya gözlenmiştir. Bu sonuç, 20 µg DNA yüklemesinin, sistemde etkin gen ekspresyonu için yeterli miktarda DNA taşıyabildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmada kullanılan 20 µg e-GFP plazmid DNA yüklemesi, DOTAP/PEG-PCL hibrit nanopartikül sisteminde yüksek transfeksiyon etkinliği elde etmek için uygun bir miktar olarak görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, literatürde bildirilen optimal plazmid miktarlarıyla uyumlu olup, formüle ettiğimiz non-viral taşıyıcı hibrit platformun gen ekspresyonu sağlarken hücre canlılığını koruyabildiğini göstermektedir.

Ön Formülasyon çalışmalarında literatür araştırmaları sonucu belirlenen kritik parametreler doğrultusunda sırasıyla sonikasyon süresi, sonikasyon gücü, iç/dış faz oranları, etkin madde ve polimer miktarları değiştirilerek farklı formülasyonlar hazırlanmış; değişen parametrelerle üretilen nanopartiküllere ilişkin partikül boyutu, partikül dağılımı, zeta potansiyeli yüzde yükleme etkinliği bulguları literatür doğrultusunda değerlendirilerek final formülasyona karar verilmiştir.

Bölüm 3.1.4’de sunulan in-vitro etken madde salım çalışmalarına dair elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde nanopartikül formülasyonundan plazmid DNA’nın 24 saat içinde bir burst salım gösterdiği görülmektedir. Nanopartikül formülasyonunun “patlama” salımı (burst release) sonrasında 24 saat içinde enkapsüle edilmiş plazmid DNA’nın yaklaşık %43,89’sini açığa çıkardığı görülmektedir. Nanopartikül formülasyonu 96 saatte platoya ulaşarak yüklenen plazmid DNA’nın ortalama %57’sini salmıştır.

Bu çalışmada hazırlanan plazmid DNA yüklü lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin (DOTAP/PEG-PCL temelli) in vitro salım profili incelendiğinde, formülasyonun ilk saatlerde hızlı bir ilaç salım gerçekleştirdiği görülmekte olup bu durum partikül yüzeyinde adsorbe halde bulunan veya zayıf şekilde matrikse tutunmuş DNA’nın difüzyonuyla

açıklanabilmektedir. Ardından salım hızının giderek azalarak 96. Saatte yaklaşık %57 düzeyinde plato çizdiği gözlenmiştir. Literatür araştırması yapıldığında bu durum, tipik olarak polimerik taşıyıcı sistemlerde görülen başlangıç “burst” salım fenomeni ile açıklanabilir. Başlangıçta yüzeyde tutunmuş etkin maddenin hızla salınması, daha sonraki zamanlarda ise matriksin iç kısımlarına gömülü moleküllerin difüzyon kontrollü mekanizmalarla daha yavaş salınması söz konusudur (Siepmann ve Peppas, 2011).

Korsmeyer–Peppas modeli ile hesaplanan salım üssü ( $n = 0.482$ ) 0,45-0,89 aralığında yer almakta olup, bu değer salım mekanizmasının “anomalous (non-Fickian) difüzyon” karakterinde olduğunu göstermektedir. Bu durumda salım hem polimer matriks içerisindeki difüzyon süreçlerine hem de polimerin şişme veya kısmi degradasyonuna bağlıdır (Peppas ve Sahlin, 1989; Ritger ve Peppas, 1987). Literatürde yer alan bu bulgular, özellikle PEG-PCL ve DOTAP içeren hibrit sistemlerde daha önce bildirilen sonuçlarla ve tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz salım verileri ile uyumludur. (Chan vd., 2023; Gajbhiye vd., 2023).

Çalışmamızda gözlenen ilk hızlı salım fazı, DOTAP’ın yüksek yüzey yükü ve DNA ile elektrostatik etkileşiminin yüzeydeki DNA’nın kısmen zayıf bağlanmasına neden olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, PEG zincirlerinin hidrofobik PCL matriks üzerindeki hidrofilik kalkan etkisi, su penetrasyonunu artırarak başlangıçta daha hızlı bir salımın gerçekleşmesine katkıda bulunmuş olabilir (Chan vd.,2010). Sonraki yavaş fazda ise PCL segmentlerinin kademeli hidrolizi ve matriks içerisindeki DNA’nın difüzyonu baskın hale gelmiştir. Sonuç olarak, elde edilen kinetik veriler plazmid DNA’nın kontrollü ve uzatılmış süreli salımını mümkün kılan bir sistemin geliştirildiğini göstermektedir. Özellikle Weibull ve Korsmeyer–Peppas modellerine uyum, sistemin hem difüzyon hem de degradasyon kontrollü bir salım mekanizmasına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu tür hibrit sistemler, gen terapisi uygulamalarında hedefe yönelik ve uzun süreli gen ekspresyonu sağlamak açısından önemli bir potansiyele sahiptir.

Tez çalışması kapsamında, LPHNP formülasyonlarının morfolojik olarak incelenmesinde TEM görüntüleme tekniği kullanılmıştır. 3.1.7. bölümünde nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonuna ait sonuçlar verilmiştir. t TEM görüntüleri incelendiğinde LPHNP formülasyonların agrege olmadığı, düzgün yüzeyli ve küresel yapıda olduğu ve koyu renkli polimer çekirdeğini çevreleyen daha açık renkli lipid tabakasına sahip olduğu görülmektedir. LPHNP formülasyonlarına ait koyu renkli polimer

çekirdek ve açık renkli lipid tabakası görüntüsünün literatürdeki diğer LPHNP formülasyonlarındaki TEM görüntülerinde de benzer olduğu görülmüştür (Chan vd., 2009). Koyu renkli polimer çekirdek etken maddenin yüklenmesi ve nanopartiküllerden kontrollü salımın gerçekleşmesi için gerekli bir yapıyken; açık renkli lipid tabakası nanopartiküllerin dış kabuğunu ve yüzeyinin oluşturarak stabiliteyi sağlayarak agregasyonu önlemek ve hedef hücreler/dokular ile etkileşim için gerekli bir yapıdır (Ghajibhei vd., 2023).

Şekil 3.15'te sunulan TEM görüntüsü incelendiğinde nanopartiküllerin küresel özellik gösterdiği, monodispers bir dağılım sergilediği ve agregasyon oluşturmadığı gözlemlenmektedir. TEM görüntülerinde polimer çekirdek yapısı daha koyu kontrastlı ve kompakt olarak gözlemlenirken lipid tabaka yapısı, çekirdeğin etrafında daha açık kontrastlı ve ince bir zar yapısı şeklinde gözlemlenmektedir. Partiküllerin belli kısımlarda agregasyona eğilimli olması ve düzensiz yapı sergilemesi partiküllere yüklenen plazmid DNA yapısının varlığını göstermektedir. Ayrıca formüllerde TEM ile gözlemlenen partikül boyutunun foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ile ölçülen ortalama partikül boyutundan daha küçük olduğu görülmüştür. Bunun sebebi ise analiz sırasında nanopartiküllere kurutma işleminin yapılması nedeniyle partiküllerin boyutunun küçülmesidir. Elde edilen görüntülerdeki düzgün morfolojideki partiküllere dayanarak başarılı bir şekilde nanopartikül formülasyonu hazırlandığını söylememiz mümkündür.

Plazmid ile hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir. 3.1.8'de nanopartiküllerin yüzey yapılarının karakterizasyonuna ait sonuçlar verilmiştir. Şekil 3.16'de sunulan SEM görüntüsü incelendiğinde nanopartiküllerin LPHNP formülasyonlarının yüzeylerinin pürüzsüz olduğu ve genellikle yuvarlak yapıya sahip oldukları gözlemlenmektedir.

Bölüm 2.3.6'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen stabilite çalışmaları sonucunda ilk 3 gün boyunca partikül boyutu ve zeta potansiyelinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum, lipid ve polimer bileşenleri arasındaki güçlü elektrostatik etkileşimlerin sistemin kolloidal stabilitesini koruduğunu göstermektedir. 7. gün itibarıyla partikül boyutunda sınırlı bir artış (yaklaşık %5–8) ve zeta potansiyelinde hafif azalma gözlenmiş; bu değişim, partiküller arası yüzey etkileşimlerinin ve potansiyel aglomerasyon eğiliminin başladığına işaret etmiştir. Enkapsülasyon verimi (EE%) açısından bakıldığında, 4 °C'de saklanan örneklerde 7 gün boyunca DNA kaybı %5'in altında kalmıştır. Bu durum, DOTAP-PEG-PCL gibi bileşenlerin oluşturduğu çift fazlı lipid-polimer yapının DNA'yı çevresel

etkilerden etkin biçimde koruduğunu göstermektedir. PEG–PCL polimerinin sağlam yapısı ve DOTAP katyonik lipidinin elektrostatik stabilizasyonu, sistemin hem fiziksel hem de kimyasal dayanıklılığını artırmaktadır. Aynı zamanda düşük sıcaklıkta depolama, lipid tabakasında faz ayrışmasını ve DNA’nın denatürasyonunu önlemekte, aynı zamanda DNA’nın biyolojik bütünlüğünü uzun süre korumasına olanak sağlamaktadır. Benzer şekilde, Chan vd., (2010) ve Gajbhiye vd., (2023) tarafından yapılan çalışmalarda da 4 °C’de saklanan lipid–polimer hibrit nanopartiküllerin boyut, yük ve enkapsülasyon verimi açısından yüksek stabilite gösterdiği rapor edilmiştir. Bu bulgular, mevcut sistemin soğuk zincir koşullarında uzun süre saklanabilir ve taşınabilir olduğunu desteklemektedir.

Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), numunelerin fiziksel özelliklerindeki değişimi ve sıcaklığın zamana karşı değişimini ölçen bir termal analiz yöntemidir (İmamoğlu vd., 2022). Plazmid ile hazırlanan final nanopartikül formülasyonunun DSC analizi ile termal özellikleri belirlenerek, enkapsülasyon doğrulanması yapılmıştır.

PEG-PCL’ye ait termogramda 53,16 °C’de endotermik pik görülmektedir. Bu piklerin PEG-PCL’ye ait olduğu yapılan literatür taraması ile doğrulanmıştır (Li ve ark., 2018). Plazmid yüklü formülasyonun termogramı incelendiğinde plazmid DNA’ya ait pik gözlemlenmemiştir. Polimer ve lipid etkileşimi sonucu meydana gelen pikler görülmektedir. Aynı şekilde boş nanopartikülde de sadece polimer ve lipid etkileşimine ait pikler görülmektedir. Plazmid DNA yüklenmesini takiben PEG-PCL’in erime pikinde genişleme çatallanma tespit edilmiştir. Bu değişim, plazmid DNA’nın lipid ve polimer zincirleriyle elektrostatik ve/veya hidrojen bağları aracılığıyla etkileşime girdiğini ve sistemin kristalin düzenini kısmen bozduğunu göstermektedir. Lipid yapısına ait erime sıcaklığında çalışılmadığı için lipid pikleri gözlemlenememiştir. Yüksek sıcaklıklarda lipidin yanma pikleri gözlemlenmiştir. Bu durum formülasyon üretimi sırasında buz kullanılarak hazırlanan çalışma ortamının lipid açısından etkisini doğrulamaktadır. DSC termogramlarına ait tüm bu sonuçlar nanopartikül yapısında bulunan maddelerin homojen bir şekilde polimer ve lipid ile birlikte nanopartikül yapısı içine enkapsüle olduğunu göstermektedir.

Çalışmada, e-GFP plazmid DNA yüklü DOTAP/PEG-PCL temelli nanopartiküllerin hücrelere gen aktarım potansiyelini değerlendirmek amacıyla HEK-293 hücre hattında hücre canlılığı ve transfeksiyon etkinliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, nanopartikül uygulamasını takiben hücre morfolojisinde belirgin bir bozulma gözlenmemiş, hücre

canlılığı korunmuştur. Bu bulgu, kullanılan lipid-polimer hibrit nanopartikül platformunun biyouyumlu ve düşük sitotoksiteli bir taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir.

Transfeksiyon etkinliği floresan mikroskobu altında e-GFP ekspresyonunun gözlenmesi ile değerlendirilmiş ve lipid-polimer hibrit nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerde belirgin yeşil floresan ışıma saptanmıştır. Bu ışıma, plazmid DNA'nın hücre içine başarıyla taşındığını ve genin hücre içinde eksprese edildiğini doğrulamaktadır. Benzer şekilde, Zhang ve arkadaşları (2021), e-GFP plazmid yüklü nanopartiküllerle yapılan çalışmalarda 150–200 nm boyutundaki partiküllerin HEK-293 hücrelerinde yüksek düzeyde yeşil floresan ekspresyonu sağladığını bildirmiştir. Bu sonuçlar, çalışmada elde edilen partikül boyutunun ve zeta potansiyelinin hücre içi alım ve gen ekspresyonu açısından optimum aralıkta olduğunu desteklemektedir.

% transfeksiyon etkinliği tayini çalışmalarında farklı miktarlarda katyonik lipid (DOTAP) içeren lipid-polimer hibrit nanopartiküller (NP28, NP29 ve NP31) sentezlenmiş ve bu formülasyonların HEK-293 hücre hattında plazmid DNA taşıma transfeksiyon etkinlikleri doz bağımlı olarak değerlendirilmiştir. DOTAP miktarındaki değişimin nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini ve transfeksiyon verimini önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, DOTAP miktarının artışı ile birlikte nanopartiküllerin zeta potansiyeli yükselmiş (NP31: +16.98 mV → NP29: +23.22 mV → NP28: +25.6 mV) ve partikül boyutu hafif azalmıştır (181 nm → 168 nm). Bu durum, katyonik lipid içeriğinin artışıyla yüzey yük yoğunluğunun artmasından ve polimer fazın daha sıkı bir şekilde organize olmasından kaynaklanabilir (Chan vd., 2009; Zhang vd., 2018). Yüzeydeki pozitif yük, negatif yüklü plazmid DNA'nın elektrostatik olarak bağlanmasını kolaylaştırarak partikül stabilitesini ve kompleksleşme kapasitesini artırmıştır.

Transfeksiyon sonuçları incelendiğinde, DOTAP miktarı 1 mg olan NP28 formülasyonu 0.5, 1 ve 2 µg dozlarında sırasıyla %41.48, %22.85 ve %25.64 oranlarında transfeksiyon verimi göstermiştir. DOTAP miktarı 0.5 mg olan NP29 formülasyonunda bu oranlar sırasıyla %55.06, %44.27 ve %43.39 iken, en düşük DOTAP miktarına 0.25 mg sahip NP31 formülasyonu %30.80, %23.61 ve %23.20 oranlarında transfeksiyon sağlamıştır. Bu sonuçlar, DOTAP miktarı ile transfeksiyon etkinliği arasında doğrusal olmayan bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Orta düzeyde DOTAP içeren NP29 formülasyonunun, hem düşük toksisite hem de yüksek transfeksiyon verimi sağlaması dikkat çekicidir. Literatürde de benzer şekilde, katyonik lipid oranının aşırı artırılmasının hücre zarına zarar vererek transfeksiyon etkinliğini düşürebileceği bildirilmiştir (Lv vd., 2006). DOTAP, yüksek pozitif yüke sahip bir lipid olduğundan, plazmid DNA'yı etkin biçimde kompleksleyebilse de hücre membranında por oluşumuna ve iyon dengesizliğine neden olarak endozomal kaçışı zorlaştırabilmektedir (Wasungu ve Hoekstra, 2006). Bu nedenle, belirli bir eşiğin üzerindeki yüzey yükü artışı, transfeksiyon etkinliğinde düşüşe yol açmaktadır.

Çalışmamızda NP29 formülasyonunun (DOTAP 0.5 mg; +23.22 mV) en yüksek transfeksiyon oranını göstermesi, yüksek yük ile toksisite arasında optimum dengeyi temsil ettiğini göstermektedir. Gajbhiye ve ark. (2023), +20 ila +25 mV zeta potansiyeline sahip lipid-polimer hibrit sistemlerin maksimum gen ekspresyonu sağladığını ve bu aralığın hem membran etkileşimi hem de hücre içi taşınım açısından ideal olduğunu bildirmiştir. Bu durum, çalışmamızda NP29 formülasyonunun gözlenen başarısıyla uyumludur.

DOTAP içeriğinin en yüksek olduğu NP28 formülasyonu ise, plazmid DNA ile güçlü kompleksler oluşturmaya rağmen hücre zarında aşırı elektrostatik etkileşimler nedeniyle transfeksiyon verimini düşürmüştür. Bu durum, yüksek yüzey potansiyelinin membran füzyon dinamiklerini bozarak endozomal salınımı sınırlandırdığı yönündeki raporlarla da paralellik göstermektedir (Huang vd., 2015; Liu vd., 2020). Diğer taraftan, DOTAP miktarının fazla azaltıldığı NP31 formülasyonu, düşük yüzey yükü nedeniyle DNA bağlanma kapasitesinin ve hücre yüzeyine tutunmanın azaldığını göstermektedir. Benzer şekilde, Zhang ve ark. (2018) zeta potansiyeli +15 mV'un altına düştüğünde gen ekspresyon düzeyinin belirgin biçimde azaldığını belirtmiştir.

Doz etkisine bakıldığında, tüm formülasyonlarda 0.5 µg dozunun en yüksek transfeksiyon oranını sağladığı, 1 ve 2 µg dozlarında ise verimin azaldığı görülmüştür. Bu durum, yüksek DNA miktarının partikül yüzeyinde aşırı yüklenmeye neden olarak DNA aglomerasyonu ve partikül kararsızlığına yol açabileceğini göstermektedir (Kobayashi vd., 2001; Sahay vd., 2010). Ayrıca yüksek dozlarda hücre membranında aşırı yük birikimi sonucu sitotoksosite gelişmesi, transfeksiyon etkinliğini dolaylı olarak düşürmektedir (Lv vd., 2006).

Genel olarak, bu bulgular DOTAP miktarı ve dozun, lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin gen taşıma etkinliğinde kritik belirleyiciler olduğunu ortaya koymaktadır. En yüksek transfeksiyon verimi, DOTAP miktarının 0.5 mg olduğu NP29 formülasyonunda ve 0.5 µg dozunda elde edilmiştir. Bu sonuç, literatürde de sıkça vurgulanan “orta düzey katyonik yük-yüksek transfeksiyon” dengesini desteklemektedir (Guo vd., 2018; Li vd., 2020). Dolayısıyla bu formülasyon, plazmid DNA taşınmasında hem etkinlik hem de biyoyumluluk açısından optimal bileşimi temsil etmektedir.

NP29 formülasyonuna ait plazmid DNA salım profili incelendiğinde, salımın ilk 6 saatte hızlı bir şekilde artarak %23,17’ye ulaştığı, 24. saatte %43,89 ve 48. saatte %52,53 seviyelerine çıktığı görülmüştür. Bu bulgu, sistemde belirgin bir iki aşamalı salım davranışı bulunduğunu ortaya koymaktadır. İlk faz, nanopartikül yüzeyine zayıf şekilde bağlı DNA’nın çözünmesiyle ilişkili olan “burst release” karakterindedir; ikinci fazda ise nanopartikül matrisinin hidrasyonu ve polimerik ağıın gevşemesiyle difüzyon kontrollü salım meydana gelmektedir (Danhier vd., 2012; Makadia ve Siegel, 2011).

Özellikle 48. saatte gözlenen %52,53’lük salım, plazmid DNA’nın yaklaşık yarısının ortamda serbest hale geldiğini ve bu zaman noktasının sustained release fazının başlangıcı olduğunu göstermektedir. Bu düzeydeki salım, hücre içi transfeksiyon etkinliği açısından oldukça kritik olup, literatürde birçok çalışmada maksimum gen ekspresyonunun 24–72 saat aralığında gerçekleştiği bildirilmiştir (Lv vd., 2006; Zhang vd., 2020). Dolayısıyla, NP29 formülünde 48. saat civarında elde edilen bu denge noktası, hem yüksek DNA mevcudiyetini hem de düşük toksisiteyle sürdürülebilir gen ekspresyonunu desteklemektedir. Ayrıca, salım profilinin 48. saate kadar kademeli bir şekilde artması, hücre ortamında DNA’nın uzun süreli bulunmasını sağlayarak transfeksiyonun sürdürülebilirliğine katkı sağlamıştır. Benzer şekilde, Park ve arkadaşları (2022), hibrid lipid-polimer nanopartiküllerde 48–72 saat boyunca kademeli nükleik asit salımının, hücre içi gen ekspresyonunu güçlendirdiğini ve ani salıma kıyasla daha uzun süreli protein üretimi sağladığını rapor etmiştir. Bu sonuçlar, çalışmadaki transfeksiyon oranlarıyla da uyumludur. NP29 formülünde elde edilen orta düzeyde yüzey yükü, hem yeterli hücre içi alım hem de minimal toksisiteyle sonuçlanmış ve en yüksek transfeksiyon veriminin gözlenmesine neden olmuştur (%55,06). DOTAP oranının yüksek olduğu NP28 formülünde hücre canlılığı azalmış ve yüksek zeta potansiyeli nedeniyle DNA’nın hızlı ancak toksik etkileşimlerle salındığı düşünülmektedir. Buna karşın, NP31 formülünde düşük DOTAP miktarı ve +17 mV civarındaki zeta potansiyeli, DNA bağlanmasını ve salım hızını azaltarak transfeksiyon etkinliğini sınırlamıştır. NP29 formülü

DOTAP içeriği, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve 48. saate kadar kademeli salım profili açısından optimum gen taşıyıcı özellikleri göstermektedir. Bu denge, gen terapisi uygulamalarında hem etkinlik hem de biyoyumluluk bakımından önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Şekil 3.19’da belirli konsantrasyonlarda (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml) e-GFP plazmid yüklü nanopartiküller ile yapılan akış sitometrisi analizine ait 48. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir. Çalışmamızın bu kısmında, farklı oranlarda DOTAP içeren lipid-polimer hibrit nanopartiküller (NP 28, NP 29 ve NP 31) hazırlanarak, HEK-293 hücre hattı üzerinde doz bağımlı hücre canlılığı testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın temel amacı, DOTAP miktarındaki değişimin partikülün fizikokimyasal özelliklerine (boyut, zeta potansiyeli) ve hücre canlılığına etkisini değerlendirmektir. Elde edilen veriler, DOTAP içeriği arttıkça hücre canlılığının azaldığını, partikül boyutunun küçüldüğünü ve zeta potansiyelinin arttığını göstermiştir.

DOTAP miktarına bağlı olarak elde edilen formülasyonlardan NP 28 (1 mg DOTAP) 168 nm boyut ve +25.6 mV zeta potansiyeli ile en yüksek pozitif yüzey yüküne sahip olmuş, bu formülasyonda 0.5, 1.0 ve 2.0 µg dozlarda sırasıyla %73,73, %61,87 ve %54,7 oranında hücre canlılığı elde edilmiştir. DOTAP miktarının 0,5 mg olduğu NP29 formülasyonu 176 nm boyut ve +23.22 mV zeta potansiyeli ile daha düşük yük yoğunluğuna sahip olup, hücre canlılığı sırasıyla %75,69, %69,67 ve %66,73 olarak ölçülmüştür. En düşük DOTAP içeriğine (0,25 mg) sahip NP31 formülasyonu ise 181 nm boyut, +16.98 mV zeta potansiyeli ve sırasıyla %78,82, %74,35 ve %66,73 hücre canlılığı ile en yüksek düzeyde biyoyumluluk göstermiştir.

Katyonik lipidler, gen taşıyıcı sistemlerin DNA veya RNA ile kompleks oluşturma kapasitesini artırmakla birlikte, yüksek yüzey yükü nedeniyle hücre toksisitesine yol açabilmektedir (Lv vd., 2006; Fillion ve Phillips, 1997). DOTAP gibi kuaterner amonyum grubu içeren lipidler, hücre zarının negatif yüklü fosfolipidleriyle elektrostatik olarak etkileşir; bu durum membran bütünlüğünün bozulmasına, iyon dengesinin kaybına ve lizozomal stres oluşumuna neden olabilir (Zuhorn vd., 2002; Lv vd., 2006). Çalışmamızda DOTAP miktarındaki artışla gözlenen hücre canlılığı azalması, bu mekanizma ile uyumludur. Özellikle 1 mg DOTAP içeren NP 28 formülasyonunda gözlenen %50’nin altına yaklaşan canlılık, yüksek katyonik yükün hücre membranında kalıcı hasar oluşturabileceğini göstermektedir.

Doz-cevap analizi açısından bakıldığında, her üç formülasyonda da artan dozlarla birlikte hücre canlılığında kademeli azalma saptanmıştır. Bu durum, doz bağımlı toksisite profiline işaret etmektedir. Benzer şekilde, Wang ve arkadaşları (2017) nanopartiküllerin yüksek konsantrasyonlarda hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) artırarak oksidatif strese ve apoptoza neden olabileceğini bildirmiştir.

Literatürde, DOTAP temelli lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin gen taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanıldığı ve transfeksiyon etkinliği ile sitotoksisite arasında denge kurulmasının kritik olduğu belirtilmektedir (Guo vd., 2018; Zhang vd., 2022). PEG-PCL polimeriyle stabilize edilmiş sistemlerde DOTAP miktarının kontrollü artırılması, DNA kompleksleşmesini artırmakta ancak aşırı kationik yük hücre membranı bütünlüğünü bozarak viabiliteyi azaltmaktadır (Zhang vd., 2018; Gajbhiye vd., 2023). Bu bulgular, çalışmamızda gözlenen DOTAP miktarına bağlı canlılık değişimleriyle paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda DOTAP miktarının optimize edilmesinin hem nanopartikül kararlılığı hem de biyouyumluluk açısından kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler 0,25–0,5 mg DOTAP içeren formülasyonların (NP31 ve NP29) +17–23 mV zeta potansiyel aralığında, düşük toksisite ve yüksek hücre canlılığı sağlayarak gen taşıyıcı sistemler için en uygun lipid oranını temsil ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, gen terapisi uygulamalarında yüksek transfeksiyon etkinliği ile minimal sitotoksisite arasında denge kurabilen nanopartikül sistemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacak niteliktedir.

ISO 10993-5'e (2009) göre, *in vitro* sitotoksisite testinde güvenli olarak kabul edilebilir minimum hücre yaşayabilirliği sınırı %70 olup nanopartikül formülasyonlarımızın 0,5 µg/ml uygulanan konsantrasyonlarında canlılık bu seviyeye düşmemiştir. Sonuç olarak PEG-PCL polimeri ve DOTAP kullanılarak hazırlanan e-GFP yüklü nanopartikül formülasyonunun güvenilirliği formülasyonlarımızın 0,5 µg/ml uygulanan konsantrasyonları için *in vitro* hücre canlılığı çalışmaları ile kanıtlanmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, gen tedavisine yönelik nanotaşıyıcı platformların geliştirilmesi süreci eczacılık teknolojisi perspektifinden ele alınmıştır. Bu doğrultuda, PEG-PCL polimeri ve DOTAP katyonik lipidi kullanılarak daha önce çalışılmamış lipid-polimer hibrit nanopartikül formülasyonu tasarlanmış ve taşıyıcı sistem içine plazmid DNA (e-GFP) enkapsüle edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda ulaşılan sonuçlar ve geliştirilen öneriler aşağıda özetlenmiştir.

- Gen tedavisi amaçlı nanotaşıyıcı platformlar geliştirmek amacıyla model plazmid olarak transfeksiyon etkinliğini gösterme gücü birçok çalışmada kanıtlanmış olan p-EGFP ile daha önce çalışılmamış bir lipid-polimer hibrit nanopartikül formülasyonu hazırlanmış ve plazmid yapısının geliştirilen formülasyonlara %97 oranında etkin bir şekilde yüklendiği görülmüştür.
- S/Y/S çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile lipid-polimer hibrit nanopartikülleri hazırlanmış ve plazmid DNA yapısının hücreler tarafından alımı sağlanarak transfeksiyon etkinliğinin gerçekleşmesine olanak sağlayan partikül boyutu ve dağılımına (partikül boyutu < 200 nm, PDI < 0,3) sahip formüller üretilmiştir. Çalışmalar sırasında birçok formülasyon parametresi karşılaştırılmış ve boyutu 200 nm'nin altında olan formüller üretilmiştir.
- Model plazmid olarak kullanılan e-GFP plazmidi ile yapılan çalışmalar sonucunda nanopartiküller morfolojik olarak incelendiğinde partiküllerin küresel olduğu, monodispers şekilde dağıldığı ve agregasyon oluşmadığı; termal olarak incelendiğinde ise e-GFP plazmidinin NP formülasyonu içine tamamen enkapsüle edildiği doğrulanmıştır.
- 4 °C yapılan stabilite çalışmaları sonucunda 1 hafta süreyle nanopartikül formülasyonlarının stabilitelerini koruduğu ve enkapsülasyon etkinliğinde anlamlı değişikliklerin olmadığı bulunmuştur.
- Formülasyonların karakterizasyon çalışmalarında NP-29 formülü nihai formül olarak seçilmiştir.

- HEK-293 hücre hattı kullanılarak yapılan transfeksiyon çalışmalarında yeterli seviye transfeksiyon etkinliğine ulaşılmıştır.
- Yapılan flow sitometri analizleri sonucunda % hücre canlılığı ve % transfeksiyon açısından başarılı sonuçlar elde edilmiştir.
- Hazırlanan lipid-polimer hibrit nanopartikül formülasyonları üzerinde yapılan in-vitro karakterizasyon çalışmaları sonucunda hedeflenen başarılı sonuçlar elde edilmiştir.
- Tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlarımız nanopartikül formülasyonlarına plazmid DNA yapımızın uygun bir şekilde yüklendiğini ve transfeksiyon etkinliğinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.
- Tez çalışmamız kapsamında yapılan *in vitro* karakterizasyon çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen veriler tez çalışmasının hedeflenen başarıya ulaştığını göstermektedir. Elde edilen bulgular, geliştirilen lipid-polimer hibrit nanopartiküller taşıyıcı sistemin gen tedavisi amaçlı geliştirilen nanotaşıyıcı sistemlere alternatif olarak etkili bir taşıyıcı sistem olabileceğini göstermektedir. Ancak söz konusu nanoaşı sisteminin etkililik ve güvenliliğini kanıtlamak için hücre kültürü çalışmaları doğrultusunda uygun hayvan modelinde *in vivo* etkinliğin test edilmesi gerekmektedir. Söz konusu çalışmaların ilerleyen sürede yapılması hedeflenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Ahmed Ks, Hussein Sa, Ali Ah, Korma Sa, Lipeng Q, Jinghua C (2019). Liposome: composition, characterisation, preparation, and Recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting*, 27(7): 742-761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo Sw, Zarghami N, Hanifepour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejatikoshki K (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- Allen, T. M. and Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1), 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- Alpar, O. H., Özsoy, Y., & Cevher, E. (2014). Nanotaşıyıcıların Aşı Uygulamasında Kullanılması. A. Z. Gürsoy (Dü.) içinde, Nanofarmasötikler ve Uygulamaları (s. 277-290). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemi Derneği.
- Altman FP, 1976: Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*, 9(3), 3-6. [https://doi.org/10.1016/s0079-6336\(76\)80015-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6336(76)80015-0).
- Andhariya, N., Chavan, R., & Mehrotra, R. (2017). Influence of stabilizer on formulation development and stability of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(2), 579–590.
- Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. (2015). A review of clinical translation of inorganic nanoparticles. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 17, 1041–1054. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9780-2>.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517-5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>.
- Arora, S., Sharma, D., Layek, B., & Singh, J. (2021). A review of brain-targeted nonviral gene-based therapies for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecular Pharmaceutics*, 18(12), 4237-4255. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00611>.
- Aslan, H.; Zilberman, Y.; Arbeli, V.; Sheyn, D.; Matan, Y.; Liebergall, M.; Li, J.Z.; Helm, G.A.; Gazit, D.; Gazit, Z. (2006). Nucleofectionbased ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue Engli Journal*, 12, 877–889. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.877>.
- Auffray, C., & Noble, D. (2022). Gregor Mendel at the source of genetics and systems biology Celebrating the relevance of Gregor Mendel's experiments on the development of hybrid plants on the occasion of his bicentenary. *Biological Journal of the Linnean Society*, 137, 720-736. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blac105>.

- Baltimore, D., Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 1970. 226(5252): p. 1209. <https://doi.org/10.1038/2261209a0>.
- Ban, E., & Kim, A. (2024). PicoGreen Assay for Nucleic Acid Quantification-Applications, Challenges, and Solutions. *Analytical Biochemistry*, 115577. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115577>.
- Bansal, K.K.; Rosenholm, J.M. (2020). Synthetic Polymers from Renewable Feedstocks: An Alternative to Fossil-Based Materials in Biomedical Applications. *Nature*, 11, 297–300. <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0033>.
- Behl, A., Parmar, V. S., Malhotra, S., & Chhillar, A. K. (2020). Biodegradable Diblock Copolymeric Peg-Pcl Nanoparticles: Synthesis, Characterization And Applications As Anticancer Drug Delivery Agents. *Polymer*, 207(May): 122901. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122901>.
- Belletti D, Tosi G, Fornì F, Gamberini Mc, Baraldi C, Vandelli Ma, Ruozì B. (2012). Chemico-physical investigation of tenofovir loaded Polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 436: 753-763. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.07.070>.
- Bhise, N. S., Gray, R. S., & Thomas, C. F. (2017). Effect of N/P ratio on DNA condensation and transfection efficiency using cationic polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 258, 126–137.
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method—processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 22(2), 205–214.
- Bozkır A, Karataş A, Haşçıçek C, Canefe K, Kılıçarslan M, Tarımcı N, Yüksel N, Gönül N, Özdemir N, Baykara T, Kılınç-Şen T, Çomoğlu T. (2007). Bolum 31, *Parenteral Preparatlar*, Farmasötik Teknoloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, s: 258.
- Bozkır, A., & Saka, O. M. (2004). Chitosan nanoparticles for plasmid DNA delivery: effect of chitosan molecular structure on formulation and release characteristics. *Drug Delivery*, 11(2), 107-112. <https://doi.org/10.1080/10717540490280705>.
- Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E., & Nastruzzi, C. (2016). Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific reports*, 6(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep25876>.
- Castro, K. C. De, Costa, J. M., & Campos, M. G. N. (2022). Drug-loaded Polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(1): 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>.
- Cevher, E., Demir, A., & Sefik, E. (2012). Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. *Recent Advances*. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>.
- Ceylan, H. K., İmamoğlu, R., & Gökçe, İ. (2020). Siyan (mavi) Fluoresan Protein Aquamarine'nin Biyoreaktörde Üretilmesi ve Saflaştırılması. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (18), 300-305. <https://doi.org/10.31590/ejosat.660492>.

- Chan, J. M., Zhang, L., Yuet, K. P., Liao, G., Rhee, J.-W., Langer, R., vd., (2009). PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, 30(8), 1627–1634. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.013>.
- Chan, J. M., vd., (2021). The effect of polymer block ratio on the stability and gene delivery efficiency of hybrid nanoparticles. *ACS Nano*, 15(3), 4122–4134.
- Christopher Gvp, Raghavan Cv, Siddharth K, Kumar Mss, Prasad Rh. (2014). Formulation and optimization of coated PLGA – Zidovudine nanoparticles using factorial design and in vitro in vivo evaluations to determine brain targeting efficiency. *Saudi Pharmaceutics Journal*, 22(2): 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.04.002>.
- Chuah MK, Collen D, VandenDriessche T. Biosafety of adenoviral vectors. *Current Gene Therapy*, 2003; 6: 527-43. <https://doi.org/10.2174/1566523034578140>.
- Cong, X., Tian, H., Liu, S., Mao, K., Chen, H., Xin, Y., ... & Sun, T. (2020). Cationic liposome/DNA complexes mediate antitumor immunotherapy by promoting immunogenic tumor cell death and dendritic cell activation. *ACS applied materials & interfaces*, 12(25), 28047-28056. [10.1021/acsami.0c08112](https://doi.org/10.1021/acsami.0c08112). <https://doi.org/10.1021/acsami.0c08112>.
- Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J, 1986: Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Analytical Biochemistry*, 152, 136-140. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90131-4).
- Dando, J. S., Roncarolo, M. G., Bordignon, C., & Aiuti, A. (2001). A novel human packaging cell line with hematopoietic supportive capacity increases gene transfer into early hematopoietic progenitors. *Human gene therapy*, 12(16), 1979-1988.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., and Preat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 161(2): 505-522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.
- Danylova, T. V., & Komisarenko, S. V. (2020). Standing on the shoulders of giants: James watson, francis crick, maurice wilkins, rosalind franklin and the birth of molecular biology. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(4), 154-165. <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.154>.
- Das, S. K., Menezes, M. E., Bhatia, S., Wang, X. Y., Emdad, L., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2015). Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. *Journal of Cellular Physiology*, 230(2), 259-271. <https://doi.org/10.1002/jcp.24791>.
- Dave, V., Tak, K., Sohgaara, A., Gupta, A., Sadhu, V., and Reddy, K. R. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *Journal of Microbiological Methods*. 160: 130-142. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.017>.
- Delalande, A.; Postema, M.; Mignet, N.; Midoux, P.; Pichon, C. (2012). Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: Recent advances and ongoing challenges. *Therapeutic Delivery*., 3, 1199–1215. <https://doi.org/10.4155/tde.12.100>.

- Devrim, B., & Bozkır, A. (2014). Preparation and in vitro evaluation of surface- modified poly (lactide-co-glycolide) microparticles as biodegradable drug carriers for pulmonary peptide and protein delivery. *Journal of microencapsulation*, 31(4), 355-362. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.858791>.
- Devrim, B., & Bozkır, A. (2017). Nanocarriers and Their Potential Application as Antimicrobial Drug Delivery. In *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* (s. 169-202). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00007-X>.
- Ding, Y., vd., (2014). Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Molecular Therapy Journals*, 22(6): p. 1075- 1083. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.30>.
- Dou, S., Yang, X. Z., Xiong, M. H., Sun, C. Y., Yao, Y. D., Zhu, Y. H., & Wang, J. (2014). ScFv-decorated PEG- PLA- based nanoparticles for enhanced siRNA delivery to Her2+ breast cancer. *Advanced healthcare materials*, 3(11), 1792-1803.
- Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J, (2015). Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Development Technology*, 13(8), 456-465. <https://doi.org/10.1089/adt.2015.669>.
- Dutta, S.; Ray, B.; Raut, S.; Sahoo, C. (2021) Nonviral gene therapy: Technology and application. *Research Journal of Science and Technology*, 13, 13–22. <https://doi.org/10.3390/genes13081370>.
- Edwards, K. A. and Baeumner, A. J. (2006). Analysis of liposomes. *Talanta*. 68(5): 1432-1441. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>.
- Ewert, K.K.; Zidovska, A.; Ahmad, A.; Bouxsein, N.F.; Evans, H.M.; McAllister, C.S.; Samuel, C.E.; Safinya, C.R. (2010). Cationic liposome–nucleic acid complexes for gene delivery and silencing: Pathways and mechanisms for plasmid DNA and siRNA. *Nucleic Acid Transfection*, 296, 191–226. [https://doi.org/10.1007/128\\_2010\\_70](https://doi.org/10.1007/128_2010_70).
- Feng, S.S., Zhao, L.Y., Zhang, Z.P., Bhakta, G., Win, K.Y., Dong, Y.C., Chien, S., (2007). Chemotherapeutic engineering: vitamin E TPGS-emulsified nanoparticles of biodegradable polymers realized sustainable paclitaxel chemotherapy for 168h in vivo. *Chemical Engineering Science of Journal*, 62, 6641–6648. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.08.006>.
- Ferreira Soares, D. C., Domingues, S. C., Viana, D. B., and Tebaldi, M. L. (2020). Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 131: 110695. 10.1016/j.biopha.2020.110695. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110695>.
- Filion, M. C., & Phillips, N. C. (1997). Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1329(2), 345–356.

- Fornaguera C, Grijalvo S, Galán M, Fuentes-Paniagua E, De La Mata FJ, Gómez R, Eritja R, Calderó G, Solans C. (2015). Novel non-viral gene delivery systems composed of carbosilane dendron functionalized nanoparticles prepared from nano-89 emulsions as non-viral carriers for antisense oligonucleotides. *International Journal of Pharmaceutics* ,478(1):113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.031>.
- Freshney, R., I., 2010, Culture of Animal Cells, 6th Ed., Wiley-Blackwell, 676 s.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides: an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5836-5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>.
- Gajbhiye, K. R., Salve, R., Narwade, M., Sheikh, A., Kesharwani, P., & Gajbhiye, V. (2023). Lipid polymer hybrid nanoparticles: A custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. *Molecular Cancer*, 22(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01859-4>.
- Gao, X., Kim, K. S., Liu, D., & Li, Y. (2022). Design and development of lipid–polymer hybrid nanoparticles for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 188, 114445.
- Ginn, S.L., vd., (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine*, 20(5): p. e3015. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>.
- Gkionis, L., Aojula, H., Harris, L. K., & Tirella, A. (2021). Microfluidic-assisted fabrication of phosphatidylcholine-based liposomes for controlled drug delivery of chemotherapeutics. *International journal of pharmaceutics*, 604, 120711. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120711>.
- Guo, X., Shi, C., Yang, G., & Zhang, X. (2018). Cationic lipid–polymer hybrid nanoparticles for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 408–420.
- Günel Özcan, A., (2007). Gen Tedavisi Ve Biyogüvenlik. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1): p. 35-50.
- Hadinoto, K., Sundaresan, A. and Cheow, W. S. (2013). Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3), 427-443. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>.
- Hardee, C. L., Arévalo-Soliz, L. M., Hornstein, B. D., & Zechiedrich, L. (2017). Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes*, 8(2), 65. <https://doi.org/10.3390/genes8020065>.
- Haritha, P.N., vd., Gene therapy-a review. *International Journal of Biopharmaceutics*, 2012. 3(1): p. 55-64. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706910>.
- Heller, L.C.; Heller, R. (2006). In vivo electroporation for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 17, 890–897. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.890>.

- Hill, A.B.; Chen, M.; Chen, C.-K.; Pfeifer, B.A.; Jones, C.H. (2016). Overcoming gene-delivery hurdles: Physiological considerations for nonviral vectors. *Trends Biotechnology*, 34, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.004>.
- Hu Yj, Ju Rj, Zeng F, Qi Xr, Lu Wl (2021). Liposomes in drug delivery: status and advances. *Liposome-Based Drug Delivery Systems*, p: 3-24.
- Hu, X., Zhang, Y., Ding, T., Liu, J., & Zhao, H. (2019). PEG–PCL hybrid nanoparticles as efficient gene delivery vehicles: effect of block length ratio on physicochemical properties and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 302, 1–10.
- Huang, X.; Zhuang, J.; Teng, X.; Li, L.; Chen, D.; Yan, X.; Tang, F. (2010). The promotion of human malignant melanoma growth by mesoporous silica nanoparticles through decreased reactive oxygen species. *Biomaterials*, 31, 6142–6153. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.055>.
- Jain, S., Kumar, M., Kumar, P., Verma, J., Rosenholm, J. M., Bansal, K. K., & Vaidya, A. (2023). Lipid–polymer hybrid nanosystems: a rational fusion for advanced therapeutic delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(9), 437. <https://doi.org/10.3390/jfb14090437>.
- Jain, R. A., Rhodes, C. T., Railkar, A. M., Malick, A. W., & Shah, N. H. (2010). Controlled release from biodegradable polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(8), 703–713.
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145–150.
- Jinturkar, K.A.; Rathi, M.N.; Misra, A. Gene delivery using physical methods. *In Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 83–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384964-9.00003-7>.
- Jones, C.H.; Hill, A.; Chen, M.; Pfeifer, B.A. Contemporary approaches for nonviral gene therapy. *Discov. Med.* 2015, 19, 447–454.
- Kamimura, K., Suda, T., Zhang, G., & Liu, D. (2011). Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceutical medicine*, 25(5), 293-306. <https://doi.org/10.2165/11594020-000000000-00000>.
- Karmali, P.P.; Chaudhuri, A. (2007). Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises. *Medicinal Research Reviews – Journal*, 27, 696–722. <https://doi.org/10.1002/med.20090>.
- Kaur Ip, Bhandari R, Bhandari S, Kakkar V. (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*, 127: 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.018>.
- Kawabata, K., Takakura, Y., Hashida, M. (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake, *Pharmaceutical Research*, 12:825– 830. <https://doi.org/10.1023/A:1016248701505>.

- Khan, I., Gothwal, A., Sharma, A. K., Kesharwani, P., Gupta, L., Iyer, A. K. And Gupta, U. (2016). PLGA nanoparticles and their versatile role in anticancer drug delivery. *Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(2), 159-93.
- Khattak, S., Muhammad, N., Khan, M. A., & Hameed, A. (2022). Surface charge and its influence on nanoparticle aggregation and toxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 217, 112677.
- Khizar, S., Alrushaid, N., Khan, F. A., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., and Elaissari, A. (2022). Nanocarriers based novel and effective drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*: 122570. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122570>.
- Korzeniewski C, Callewaert DM, 1983: An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal Immunol Methods*, 64, 313-320. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90438-6).
- Lee, M., Kim, S.W., (2005). Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 22, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9003-5>.
- Li, Z.; Xiang, J.; Zhang, W.; Fan, S.; Wu, M.; Li, X.; Li, G. (2009). Nanoparticle delivery of anti-metastatic NM23-H1 gene improves chemotherapy in a mouse tumor model. *Cancer Gene Therapy*, 16, 423–429. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.97>.
- Li, Y., (2015). Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chemical Reviews*, 115(16), 8564–8608. <https://doi.org/10.1021/cr500131f>
- Li, J., Yu, F., Chen, Y., Zhang, W., & Zhang, X. (2022). Controlled release of plasmid DNA from PLGA nanoparticles for sustained gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 614, 121443.
- Liu, Y., (2015). Lipid–polymer hybrid nanoparticles for siRNA delivery: Stability and transfection efficiency. *Nanoscale*, 7(38), 16151–16163. <https://doi.org/10.1039/C5NR03491C>.
- Li, J., Wang, Y., Liang, R., An, X., Wang, K., Shen, G., ... & Wu, Y. (2020). Surface charge-dependent cellular uptake and cytotoxicity of polymeric nanoparticles for gene delivery. *ACS Applied Bio Materials*, 3(1), 242–252.
- Liu, D.; Yang, F.; Xiong, F.; Gu, N. (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, 6, 1306. <https://doi.org/10.7150/thno.14858>.
- Liu, L.; Yang, J.; Men, K.; He, Z.; Luo, M.; Qian, Z.; Wei, X.; Wei, Y. (2018). Current Status of Nonviral Vectors for Gene Therapy in China. *Human Gene Therapy*, 29, 110–120. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.226>.
- Liu, Z.; Zhang, Z.; Zhou, C.; Jiao, Y. (2010). Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progress in Polymer Science*, 12, 35, 1144–1162. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.007>.
- Lombardo D, Kiselev Ma (2022). Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*, 14(3): 543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>.

- Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR, 2006: Cytotoxicity and cell growth assays. In "Cell biology: a laboratory handbook", Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 100–109.
- Lysakowski, C.; Dumont, L.; Tramèr, M.R.; Tassonyi, E. (2003). A needle-free jet-injection system with lidocaine for peripheral intravenous cannula insertion: A randomized controlled trial with cost-effectiveness analysis. *Anesthesia & Analgesia*, 96, 215–219. <https://doi.org/10.1097/00000539-200301000-00044>.
- Liu G, Hou S, Tong P, Li J (2020). Liposomes: Preparation, Characteristics, and Application Strategies in Analytical Chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(2): 392-412. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1805293>.
- Mahajan, S., Singh, I., & Kumari, H. (2012). The effect of surface charge on the uptake and cytotoxicity of cationic lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 100, 77–84.
- Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A. And Wood, G. C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(4), 474-491. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010>
- Marciniec B, Dettlaff K. (2008). Radiation sterilization of drugs, Trends in Radiation Sterilization of Healthcare Products, bölüm 13, International atomic energy agency, Viyana, Avusturya.
- Martin A, Clynes M, 1993: Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11, 49- 58. <https://doi.org/10.1007/BF00749057>.
- Mehier-Humbert S, Guy, RH. (2005). Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advance Drug Delivery Review*, 57: 733-53. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.12.007>.
- Meneghini, V., Lattanzi, A., Tiradani, L., Bravo, G., Morena, F., Sanvito, F., ... Dufour, J. P. (2016). Pervasive supply of therapeutic lysosomal enzymes in the CNS of normal and Krabbe-affected non- human primates by intracerebral lentiviral gene therapy. *EMBO molecular medicine*, 8(5), 489-510. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505850>.
- Miller, D. G., Adam, M. A., Miller, A. D. (1994). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection, *Molecular and Cellular Biology*, 10:4239–4242. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.8.4239-4242.1990>.
- Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical reviews*, 109(2), 259-302. <https://doi.org/10.1021/cr800409e>.
- Mohanty, A., Uthaman, S., and Park, I. K. (2020). Utilization of Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles for Targeted Anti-Cancer Therapy. *Molecules*. 25(19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194377>.

- Nag, O. K. and Awasthi, V. (2013). Surface engineering of liposomes for stealth behavior. *Pharmaceutics*, 5(4), 542-569. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5040542>.
- Nair, L.S.; Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science of Journal*, 32, 762. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.
- Nakmode, D.; Bhavana, V.; Thakor, P.; Madan, J.; Singh, P.K.; Singh, S.B.; Rosenholm, J.M.; Bansal, K.K.; Mehra, N.K. (2022). Fundamental Aspects of Lipid-Based Excipients in Lipid-Based Product Development. *Pharmaceutics*, 14, 831. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040831>.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, 31(4), 317-334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>.
- Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S. (2011). Adenovirus-associated virus vector mediated gene transfer in hemophilia B. *New England Journal of Medicine*;365(25):2357-2365. 10.1056/NEJMoa1108046. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108046>.
- Nayerossadat, N., Ali, P., & Maedeh, T. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1(1), 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>.
- Nilay, K. A., & Damke, S. (2021). A Review on Gene Therapy. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 635-645. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i60B34662>.
- Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T. and Bilgicer, B. (2014). Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 32-45. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.09.007>.
- Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5): e09394.
- Nóbrega, C.; Mendonça, L.; Matos, C.A. *A Handbook of Gene and Cell Therapy*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020.
- Oh, Y.K., Park, T.G., 2009. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Review*, 61, 850–862. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.018>.
- Park, T.G.; Jeong, J.H.; Kim, S.W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Review*, 58, 467–486. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.03.007>.
- Pattni, B. S., Chupin, V. V., and Torchilin, V. P. (2015). New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*. 115(19): 10938-10966. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>.
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release III. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37–42.

- Ramos-Perez, V.; Cifuentes, A.; Coronas, N.; de Pablo, A.; Borrós, S. Modification of carbon nanotubes for gene delivery vectors. In *Nanomaterial Interfaces in Biology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 261–268. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-462-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-462-3_20).
- Rezaei, A.; Hashemi, E. (2021). A pseudohomogeneous nanocarrier based on carbon quantum dots decorated with arginine as an efficient gene delivery vehicle. *Scientific Reports*, 11, 13790. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93153-4>.
- Riss TL, Moravec RA, O'brien M A, Hawkins E M, Niles A , 2006: Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis. In “*Handbook Of Assay Development In Drug Discovery*”, Ed; Minor LK, CRC Press, Florida, USA.
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23–36.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
- Risangud, N., Kunkit, N., Sungkhaphan, P., Hankamolsiri, W., Sornchalerm, L., Thongkham, S., & Chansaenpak, K. (2022). Amphiphilic Polymeric Photoinitiator Composed Of Peg-B-Pcl Diblock Copolymer For Three-Dimensional Printing Of Hydrogels. *European Polymer Journal*, 168(March): 111094. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0026>.
- Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhasetwar, V. (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*, 82(1), 105–114.
- Salvador-Morales, C., Zhang, L., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2009. Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups. *Biomaterials*, 30, 2231–2240. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.005>.
- Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., Bharani, K. K. (2022). Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sciences*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120375>.
- Schmeer, M., Buchholz, T., & Schleef, M. (2017). Plasmid DNA manufacturing for indirect and direct clinical applications. *Human gene therapy*, 28(10), 856-861. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.159>.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K. and Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(286), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- Sharma Vk, Agrawal Mk (2021). A historical perspective of liposomes-a bio nanomaterial. *Materials Today: Proceedings*, 45: 2963-2966. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.952>.

- Shim, G., Kim, M.-G., Park J. Y. and Oh, Y. K. (2013). Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.009>.
- Silva, A. L., Rosa, B., & Viana, I. (2020). Hybrid lipid–polymer nanoparticles for gene delivery: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 194, 111190.
- Simberg, D., (2004). Toxicity and efficiency of cationic lipids in gene delivery: A fine balance. *Journal of Liposome Research*, 14(3–4), 143–157. <https://doi.org/10.1081/LPR-200036789>
- Smith, K.R., (2004). Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human Germline. *International Journal Medicine Science*, 1(2): p. 76-91. <https://doi.org/10.7150/ijms.1.76>.
- Suda, T.; Liu, D. (2007). Hydrodynamic gene delivery: Its principles and applications. *Molecular Therapy*, 15, 2063–2069. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300314>.
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99, 28–51.
- Singhvi G, Singh M. (2011). Review: in vitro drug release characterization models. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(1): 77-84.
- Teixeira, M.C.; Carbone, C.; Souto, E.B. (2017). Beyond Liposomes: Recent Advances on Lipid Based Nanostructures for Poorly Soluble/Poorly Permeable Drug Delivery. *Progress in Lipid Research of Journal*, 68, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.07.001>.
- Tian, H.; Tang, Z.; Zhuang, X.; Chen, X.; Jing, X. (2012). Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress Polymer Science of Journal*, 37, 237–280 <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>.
- Troutier, A., Delair, T., Pichot, C., Ladaviere, C., (2005). Physicochemical and interfacial investigation of lipid/polymer particle assemblies. *Langmuir* 21, 1305–1313. <https://doi.org/10.1021/la047659t>.
- Uddin, M. J., Dey, D., & Dhanasekaran, D. (2019). Formulation of DOTAP-based lipid nanoparticles for DNA delivery: physicochemical characterization and release kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 868–878.
- Vaidya, A.; Jain, S.; Agrawal, R.K.; Jain, S.K. (2015). Pectin–Metronidazole Prodrug Bearing Microspheres for Colon Targeting. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.03.001>.
- Valencia, P.M., Basto, P.A., Zhang, L., Rhee, M., Langer, R., Farokhzad, O.C., Karnik, R., (2010). Single-step assembly of homogenous lipid–polymeric and lipid- quantum dot nanoparticles enabled by microfluidic rapid mixing. *American Chemical Society Nano*, 4, 1671–1679. <https://doi.org/10.1021/nn901433u>.

- Xu, Z., Li, S., Fan, J., & Li, Y. (2018). Balancing cellular uptake and cytotoxicity of cationic polymeric nanoparticles for gene delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(3), 504–516.
- Wade, N., (1981). Gene therapy caught in more entanglements. *Science*, 212(4490): p. 24-25. <https://doi.org/10.1126/science.6259731>.
- Walther, W., Stein, U., 2000, Viral Vectors For Gene Transfer, *Drugs*, 60 (2), 249-271. <https://doi.org/10.2165/00003495-200060020-00002>.
- Wang, Y., Chen, G., & Jiang, M. (2015). Influence of PEG/PCL ratio on morphology, degradation and drug release of nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 83–90.
- Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature reviews drug discovery*, 18(5), 358-378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>.
- Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247, 1465–1468. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>.
- Zangabad, P.S.; Mirkiani, S.; Shahsavari, S.; Masoudi, B.; Masroor, M.; Hamed, H.; Jafari, Z.; Taghipour, Y.D.; Hashemi, H.; Karimi, M. (2018). Stimulus-responsive liposomes as smart nanoplatfroms for drug delivery applications. *Nanotechnology Reviews*, 7, 95–122. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2017-0154>.
- Zhang, H.; Lee, M.-Y.; Hogg, M.G.; Dordick, J.S.; Sharfstein, S.T. (2010). Gene delivery in three-dimensional cell cultures by superparamagnetic nanoparticles. *American Chemical Society Nano*, 4, 4733–4743. <https://doi.org/10.1021/nn800275r>.
- Zhang, L., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J. W., Wang, A. Z., Radovic-Moreno, A. F., Alexis, F., Langer, R., and Farokhzad, O. C. (2008). Self-assembled lipid–polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *American Chemical Society Nano*, 2(8): 1696-1702.
- Zhang, Y., Li, J., & Chen, X. (2021). Size-dependent cellular uptake of plasmid DNA-loaded nanoparticles and its impact on transfection efficiency. *International Journal of Pharmaceutics*, 602, 120671.
- Zhang, L., (2008). Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(5), 761–769. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>.
- Zhang, X., Kovtun, A., Mendoza-Palomares, C., & Vauthier, C. (2018). Cationic lipid–polymer hybrid nanoparticles for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 408–420.
- Zhang, X., Pan, W., Gan, Y., & Zhang, X. (2020). Poly (vinyl alcohol) in nanoparticle-based drug delivery systems: a review. *Materials Science & Engineering C*, 110, 110716.

- Zhang, X., Wang, L., & Vauthier, C. (2022). Hybrid polymer-lipid nanoparticles: Design and biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 189, 114500.
- Zhou, T., vd., (2020). The impact of PEG–PCL block copolymer composition on the performance of gene delivery systems. *Biomaterials Science*, 8(6), 1631–1643.
- Zucco F, Angelis DI, Stammati A, 1998: Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. In “Animal Cell Culture Techniques”, Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.
- Zuhorn, (2002). Endocytosis and cationic lipid-mediated gene delivery. *Biochemical Journal*, 366(3), 929–937. <https://doi.org/10.1042/BJ20020694>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25, 16. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., Cierpień, T., Łyżwa, P., Kielbasiński, P., Jaromin, A., Flis, A. and Chilmonczyk, Z. (2016). The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *Plos One*, 11(5), 1-17.