

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEN TEDAVİSİNE YÖNELİK, DNA-KİTOZAN
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE *İN-VİTRO*
DEĞERLENDİRİLMESİ**

124014

Ecz. Ogun Mehmet SAKA

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

124014

DANIŞMAN

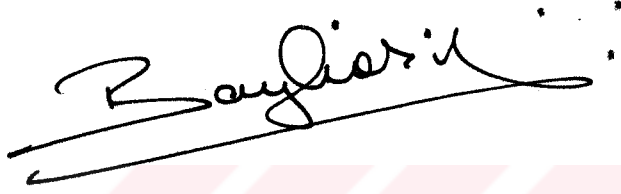
Doç. Dr. Asuman BOZKIR

Bu tez, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
20010803024 proje numarası ile desteklenmiştir.

2003 ANKARA

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Biyoteknoloji Alanı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 09 Ocak 2003

**Prof. Dr. Tamer BAYKARA**

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**Prof. Dr. Kandemir CANEFE**

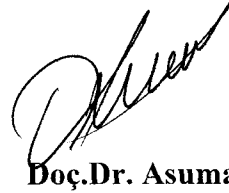
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Prof. Dr. Filiz ÖNER**

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR**

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

**Doç. Dr. Asuman BOZKIR**

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

ÖNSÖZ

Bu tez Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu araştırmayı yöneten, çalışmalarım sırasında her türlü anlayış ve kolaylığı gösteren, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan değerli hocam, tez yöneticim Doç. Dr. Sayın Asuman BOZKIR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Başta Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı ve Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı Prof. Dr. Sayın Tamer BAYKARA olmak üzere, tez çalışmalarım sırasında bana her türlü kolaylığı göstererek laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve her konuda yardımcı olan tüm hocalarıma, teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında fikirlerinden çok yararlandığım değerli büyüklerim Dr. Ecz. Canan OGAN HASÇİÇEK ve Dr. Ecz. Müge KILIÇARSLAN'a, laboratuvarlarda benden yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Ecz. Tuba ŞENGEL, Ecz. Burcu DEVRİM, Ecz. Ulya NUMANOĞLU, Ecz. Ebru KURUL, Uzm. Ecz. Özge İNAL, Uzm. Ecz. Gökhan HAYTA, Ecz. Feray SAATÇİ, Uzm. Ecz. Eda BENLİER, Uzm. Ecz. Esin ÖZMENER ve Uzm. Ecz. Bahar HOROZ'a teşekkür ederim.

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Ecz. Dilşad BARUT ve Uzm. Ecz. Devrim DEMİR'e; Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Ecz. Ekrem KILIÇ'a; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Yard. Doç. Dr. Ahmet PINAR'a; Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Ecz. Hatice DEMİR'e çalışmalarım sırasında gösterdikleri ilgi ve destekten dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Formüllerimin partikül büyüklüğü ve dağılımı analizleri konusunda benden ilgi ve desteklerini esirgemeyen Naci SARAÇOĞLU nezdinde ATOMİKA firması ve çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi yüksek lisans tez çalışmam süresince de bana destek ve anlayış gösteren aileme şükranlarımı sunarım.

Her zaman yanımda olan, yüksek lisans tez çalışmam süresince de bana destek ve anlayış gösteren, sevgisi ile zorlukları aşmamda yardımcı olan biricik eşim Ecz. Alime AŞKIN SAKA'ya sevgilerimi ve şükranlarımı sunarım.

Ecz. Ongun Mehmet SAKA
Ocak-2003

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. DNA Yapısı	2
1.3. Gen Klonlama	4
1.3.1. Klonlama Vektörleri	4
1.3.1.1. Plazmidler	5
1.3.1.1.1. Plazmid DNA Yapısı	5
1.3.1.2. Bakteriyofajlar (Fajlar)	6
1.3.1.3. Kozmidler	6
1.3.1.4. Yapay Maya Kromozomları (YAC)	7
1.3.2. Konakçılar	7
1.3.2.1. Escherichia coli	8
1.3.3. Klonlamada Kullanılan Enzimler	9
1.3.3.1. DNA Yapısını Birleştiren Enzimler	9
1.3.3.2. DNA Kısıtlayıcı Enzimler	10
1.4. Gen Tedavisi	11
1.4.1. <i>Ex-vivo</i> Gen Tedavisi	13
1.4.2. <i>In-vivo</i> Gen Tedavisi	14
1.4.2.1. DNA Taşıyıcı Sistemler	14
1.4.2.1.1. Viral Vektörler	15
1.4.2.1.1.1. Retrovirüs Vektörler	16
1.4.2.1.1.2. Adenoviral Vektörler	16
1.4.2.1.1.3. Adeno-bağlantılı Viral Vektörler	17

1.4.2.1.1.4.	Herpes Simplex Virüs	17
1.4.2.1.2.	Viral Olmayan Vektörler	17
1.4.2.1.2.1.	Fiziksel Teknikler	18
1.4.2.1.2.1.1.	Mikroenjeksiyon	18
1.4.2.1.2.1.2.	Partikül Bombardmanı	18
1.4.2.1.2.2.	Taşıyıcı Vektörler	19
1.4.2.1.2.2.1.	Emülsiyonlar	19
1.4.2.1.2.2.2.	Katyonik Lipidler	20
1.4.2.1.2.2.3.	Lipozomal veya Lipid Yapıdaki Sistemler	20
1.4.2.1.2.2.4.	Katı Kolloidal Taşıyıcılar	21
1.5.	Nanopartiküller	24
1.5.1.	Nanopartiküllerin Taşınması Gereken Özellikler	24
1.5.2.	Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	25
1.5.2.1.	Amfifilik Makromoleküllerin Çapraz Bağlanması	26
1.5.2.2.	Monomerlerin Polimerizasyonu	26
1.5.2.3.	Polimerin Çöktürülmesi	27
1.6.	Kitozan Hakkında Genel Bilgiler	28
1.6.1.	Kitozanın Yapısı ve Elde Edilmesi	29
1.6.2.	Kitozanın Fiziko-Kimyasal Özellikleri	30
1.6.3.	Kitozanın Farmakolojik Özellikleri	31
1.6.4.	Kitozanın Uygulama Alanları	32
1.6.4.1.	Kitozanın Farmasötik Teknolojide Kullanımı	33
1.6.4.2.	Kitozanın Farmasötik Biyoteknolojide Kullanımı	34
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1.	Materyal Listeleri	36
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.1.2.	Kullanılan Biyolojik Maddeler	37
2.1.3.	Kullanılan Malzemeler	37
2.1.4.	Kullanılan Cihazlar ve Aletler	38
2.2.	Yöntem ve Deneyler	39

2.2.1.	Plazmid DNA'nın ve E.coli Hücrelerinin Seçimi	39
2.2.1.1.	Plazmid DNA İzolasyonu	41
2.2.1.1.1.	Plazmid DNA Taşıyan Kültür Ortamlarının Oluşturulması	41
2.2.1.1.2.	Alkali ile Liziz Metoduyla Plazmid DNA Eldesi	43
2.2.1.1.3.	Saflaştırma Kiti ile Plazmid DNA Eldesi	44
2.2.1.2.	Plazmid DNA Safılık ve Miktar Tayini	45
2.2.2.	Kitozanın Deasetilasyon Derecesinin Tayini	46
2.2.2.1.	Deasetilasyon Derecesinin Kapiller Viskozimetre ile Tayini	47
2.2.2.2.	Deasetilasyon Derecesinin Titrasyon Yöntemi ile Tayini	48
2.2.3.	DNA Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	49
2.2.3.1.	Emülsiyonlarda Çapraz Bağ Oluşturulması Yöntemi	49
2.2.3.2.	Kompleks Koaservasyon (Complex Coaservation) Yöntemi	50
2.2.3.3.	Modifiye Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	53
2.2.4.	pDNA-Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	55
2.2.4.1.	Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması	55
2.2.4.2.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Ölçülmesi	56
2.2.4.3.	Zeta Potansiyel Değerinin Ölçülmesi	56
2.2.4.4.	<i>İn-vitro</i> pDNA Salımının İncelenmesi	57
2.2.5.	pDNA-Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Dayanıklılıklarının Araştırılması	58
2.2.5.1.	F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının, pDNA'yı Koruma Etkisinin İncelenmesi	58
2.2.5.1.1.	Jel Elektroforez Yöntemi	58
2.2.5.2.	F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının, Zaman İçerisindeki Değişiminin Gözlenmesi	61
2.2.5.3.	F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının, Liyofilizasyon Etkisi ile Değişiminin Gözlenmesi	61
2.2.6.	Taramalı Elektron Mikroskopisi Analizleri	61
2.2.7.	F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının Gen Aktarım Etkinliğinin Araştırılması	62

3.	BULGULAR	65
3.1.	Genetik Materyalin Elde Edilmesi	65
3.1.1.	pDNA Saflık ve Miktar Tayinlerine İlişkin Bulgular	66
3.2.	Kitozanın Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini	67
3.3.	Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	69
3.3.1.	Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular	69
3.3.2.	Partikül Büyüklüğü Analizlerine İlişkin Bulgular	70
3.3.3.	Zeta Potansiyel Değerlerinin Tayinine İlişkin Bulgular	78
3.3.4.	Nanopartiküllerden <i>In-vitro</i> pDNA Salımına İlişkin Bulgular	79
3.3.5.	Jel Elektrophorez Görüntülerine İlişkin Bulgular	81
3.3.6.	F1 ve F4 Formüllerinin DNaz I Enzimine Karşı Dayanıklılığı	83
3.3.7.	Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülerine İlişkin Bulgular	84
3.3.8.	Nanopartiküllerden Gen Aktarım Etkinliğine İlişkin Bulgular	86
4.	TARTIŞMA	88
4.1.	Genetik Materyalin Elde Edilmesinin Değerlendirilmesi	88
4.2.	Kitozan Üzerinde Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi	89
4.3.	DNA Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesinde Etkili Parametrelerin Değerlendirilmesi	89
4.3.1.	Emülsiyonlarda Çapraz Bağ Oluşturulması Yöntemi	89
4.3.2.	Kompleks Koaservasyon Yöntemi	90
4.3.3.	Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	91
4.4.	Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	92
4.4.1.	Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	92
4.4.2.	Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Analizlerinin Değerlendirilmesi	92
4.4.3.	Zeta Potansiyel Analizlerinin Değerlendirilmesi	93
4.4.4.	<i>In-vitro</i> pDNA Salımının Değerlendirilmesi	93
4.4.5.	Nanopartikül Formülasyonlarının Jel Elektrophorez Görüntülerinin Değerlendirilmesi	94

4.4.6.	Nanopartikül Formülasyonlarının Dayanıklılıklarının Değerlendirilmesi	95
4.4.7.	Nanopartikül Formülasyonlarının Zaman İçerisindeki Değişiminin Değerlendirilmesi	96
4.4.8.	Nanopartikül Formülasyonlarının Liyofilizasyon Etkisi ile Değişiminin Değerlendirilmesi	96
4.4.9.	Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi	97
4.4.10.	Nanopartikül Formülasyonlarının Gen Aktarım Etkinliğinin Değerlendirilmesi	97
5.	SONUÇ	98
	ÖZET	99
	SUMMARY	100
	KAYNAKLAR	101
	ÖZGEÇMİŞ	113

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AAT	α 1-antitripsininin
AAV	Adeno bağlantılı virüs
ADA	Adenozin deaminaz
Bp	Baz çifti
BSA	Sığır serum albümin
C	Sitozin
DDAB	Dimetildioktadesilamonyum
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dnaz	Deoksiribonükleaz
E. coli	Escherichia coli
EMB	Eozin metilen blue agar
G	Guanin
HMW	Yüksek molekül ağırlıklı
Kb	Kilo baz
LB	Luria-Bertani
LMW	Düşük molekül ağırlıklı
MMW	Orta dereceli molekül ağırlıklı
mPa	Mili paskal
OD	Optik dansite
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit
P	Poise
PBS	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
pDNA	Plazmid DNA
PLGA	polilaktik-ko-glikolik asit
PLL	Poli-L-lizin
SA	Spesifik aktivite
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
UV	Ultraviyole
YAC	Yapay maya kromozomları

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
Şekil 1.1.	DNA sarmalının şematik gösterimi	3
Şekil 1.2.	Etkin madde yüklenmiş çeşitli nanopartiküller	24
Şekil 1.3.	Kitin ve kitozan'ın kimyasal yapıları	30
Şekil 2.1.	pSV- β -Galactosidase vektörünün haritası	40
Şekil 2.2.	E.coli suşlarının (ATCC 25922 ve ATCC 35218) ampisilin içeren diskler varlığında üremeleri	40
Şekil 2.3.	Ubbelohde kapiller viskozimetresinin şematik görüntüsü	46
Şekil 2.4.	pDNA-kitozan nanopartiküllerini kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanış şeması	52
Şekil 2.5.	pDNA-kitozan nanopartiküllerinin modifiye çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanış şeması	54
Şekil 3.1.	E.coli kültürlerinin, Mc Conkey agarda pembe koloni oluşturmaları	65
Şekil 3.2.	İmmersiyon objektifi altında, gram boyama sonucu elde edilen pembe kok halindeki görüntüleri	65
Şekil 3.3.	F1 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	71
Şekil 3.4.	F2 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	71
Şekil 3.5.	F3 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	71
Şekil 3.6.	F4 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	72
Şekil 3.7.	3 ay sonunda F4 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	72
Şekil 3.8.	Liyofilize toz halinde 3 hafta bekledikten sonunda F4 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	72
Şekil 3.9.	F5 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	73
Şekil 3.10.	F6 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	73
Şekil 3.11.	F7 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	73
Şekil 3.12.	F8 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	74
Şekil 3.13.	F9 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	74
Şekil 3.14.	F10 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	74
Şekil 3.15.	F11 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	75

Şekil 3.16.	F12 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	75
Şekil 3.17.	F13 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	75
Şekil 3.18.	F14 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	76
Şekil 3.19.	F15 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	76
Şekil 3.20.	F16 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	76
Şekil 3.21.	F17 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	77
Şekil 3.22.	F18 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı	77
Şekil 3.23.	Kompleks koaservasyon yöntemi ile 1:2 (pDNA:kitozan) oranında hazırlanan formülasyonların PBS tamponu içerisindeki <i>in-vitro</i> salım grafiği	79
Şekil 3.24.	Kompleks koaservasyon yöntemi ile 1:1 (pDNA:kitozan) oranında hazırlanan formülasyonların PBS tamponu içerisindeki <i>in-vitro</i> salım grafiği	80
Şekil 3.25.	Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonların PBS tamponu içerisindeki <i>in-vitro</i> salım grafiği	80
Şekil 3.26.	F1-F4 kodlu formülasyonların, jel elektroforez görüntüleri	81
Şekil 3.27.	F5-F18 kodlu formülasyonların, jel elektroforez görüntüleri	82
Şekil 3.28.	DNaz I enzimi ile muamele edilmiş formülasyonların jel elektroforez görüntüsü	83
Şekil 3.29.	F1 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı	84
Şekil 3.30.	F1 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı	84
Şekil 3.31.	F4 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı	85
Şekil 3.32.	F4 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı	85
Şekil 3.33.	(a) Ampisilin içeren katı LB besiyerinde gen aktarımı gerçekleştiren F4 formülasyonu. (b) İmmersiyon objektifi altında, oluşan kültürlerin E.coli'ye ait olduğunu gösteren pembe kok görüntüsü	87
Şekil 3.34.	(a) Ampisilin içeren katı Mc Conkey agarda gen aktarımı gerçekleştiren F1 formülasyonu. (b) İmmersiyon objektifi altında, oluşan kültürlerin E.coli'ye ait olduğunu gösteren pembe kok görüntüsü	87

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
Tablo 1.1.	Bazı klonlama vektörleri ve özellikleri	4
Tablo 1.2.	Bazı kısıtlayıcı endonükleazların, elde edildiği organizma ve kesme-tanıma işleminin gerçekleştiği bölgeler	10
Tablo 1.3.	Kitozanın genel kullanım alanları	32
Tablo 2.1.	Alkali ile lizis işlemi için gerekli çözeltiler	43
Tablo 2.2.	Kitozanın bazı çözücü ortamlardaki, K ve a sabiteleri	48
Tablo 2.3.	Emülsiyonlarda çapraz bağ oluşturulması yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar	49
Tablo 2.4.	Kompleks koservasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar	51
Tablo 2.5.	Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar	53
Tablo 3.1.	Farklı izolasyon yöntemleriyle elde edilen pDNA'ların saflığı ve konsantrasyonları	66
Tablo 3.2.	Formülasyonda kullanılan farklı molekül ağırlığı ve konsantrasyondaki kitozanların kılcal viskozimetreden akış süreleri	68
Tablo 3.3.	Formülasyonlarda kullanılan kitozan çeşitleri ve özellikleri	68
Tablo 3.4.	Formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri	69
Tablo 3.5.	Formülasyonların partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları	70
Tablo 3.6.	Formülasyonların zeta potansiyel değerleri	78
Tablo 3.7.	Formülasyonların gen aktarım etkinliğinin spesifik aktivite cinsinden değerlendirilmesi	86

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş ve Amaç

Gen tedavisi, fonksiyonel bir yada birkaç genetik bölgenin hatalarının düzeltilmesi veya yeni bir işlev kazandırılması amacıyla oluşturulmuş yeni genetik materyalin, bireyin hücrelerine aktarılması işlemidir. Gen tedavisinde, *ex-vivo* ve *in-vivo* olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. *Ex-vivo* gen tedavisinde hasta genleri içeren dokular alınır, dışarıda tedavi edilip düzeltildikten sonra hastaya geri nakledilir. Daha umut verici bir yaklaşım olan *in-vivo* gen tedavisi ise, hasta genlerin hücre dışına çıkartılmasına gerek kalmadan terapötik genler organa doğrudan iletilebilmektedir. Uygulaması çok daha kolay olan *in-vivo* gen tedavisinde çözülmesi gereken problemlerden birisi, terapötik gen için uygun taşıyıcı formülasyonların geliştirilmesidir. Bugüne kadar bu amaçla başarı ile uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler; polimerik kolloidal ilaç taşıyıcılar, katyonik lipidler, emülsiyonlar ve lipozomlardır.

Bu tez çalışmasında amacımız; biyolojik materyali etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak hücreye taşıyabilecek bir farmasötik formülasyon geliştirmektir. Bu amaca yönelik taşıyıcı sistem olarak en stabil olan ve son yıllarda yaygın olarak araştırılan polimerik kolloidal taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi tercih edilmiştir. Biyolojik materyalin, hedeflenen hücreye taşınması için partikül boyutunun önemi bilinmektedir. Bu nedenle araştırmalarımız, gen aktarımında model olarak seçtiğimiz plazmid DNA'nın nanopartiküler yapı içerisine hapsedilmesini sağlayacak şekilde yoğunlaşmıştır.

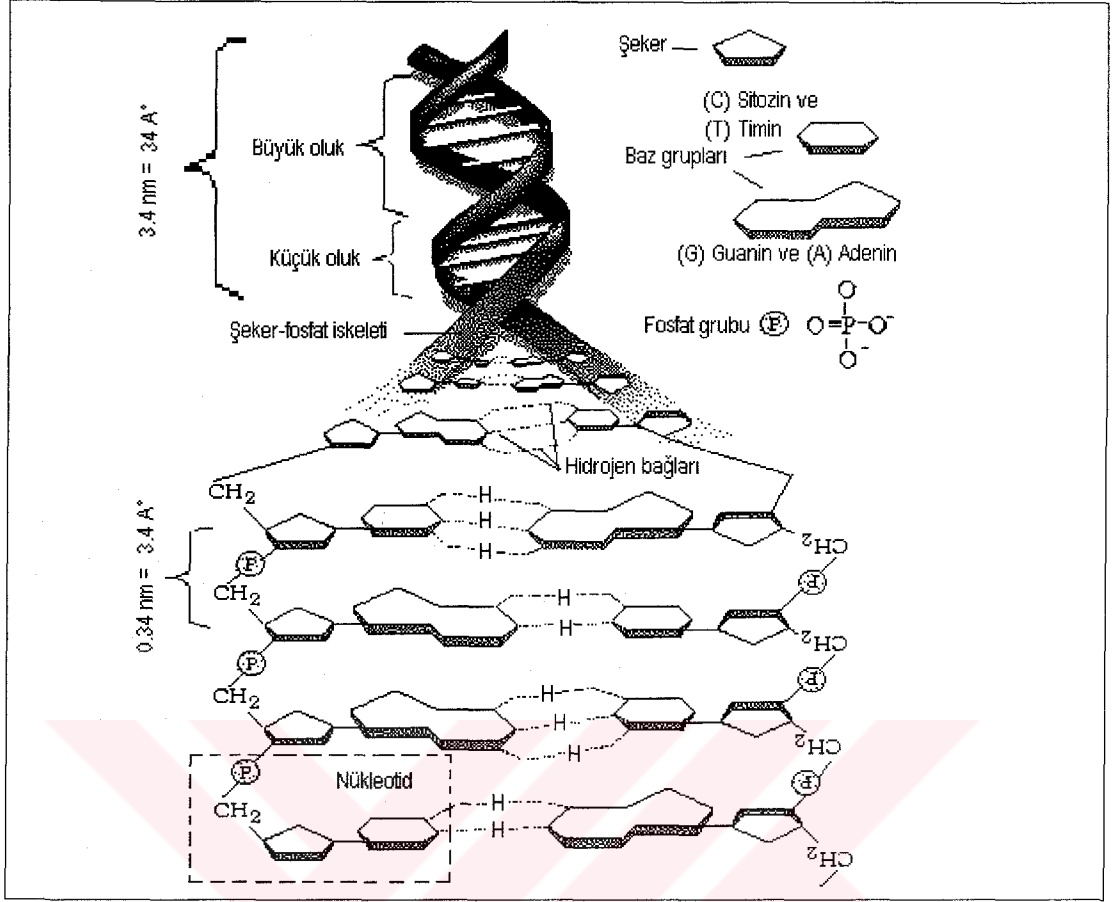
Formülasyon geliştirmede amacımıza uygun polimer olarak seçilen kitozan; vücut ile geçimli, toksisitesi bulunmayan, biyolojik olarak parçalanan ve en önemlisi düşük bağışık yanıt oluşturan doğal kaynaklı bir polimerdir. Kitozanın, mukozal yüzeylere yapışabilme özelliği ile gen tedavisinde amaçlanan hedeflendirmeye yardımcı olacağı, fizikokimyasal özelliğinin ise genetik materyalin biyolojik ortamda oldukça düşük olan stabilitesini iyileştirmesinde önemli bir avantaj sağlayacağı da düşünülmüştür.

1.2. DNA Yapısı

Canlının yapı (doku, organ ve canlılığı sürdürmeye ilişkin tüm sistemler) ve fonksiyonlarının (canlılık yapısını oluşturan sistemlerin çalışması için gerekli tüm basamaklar) oluşturulması ile ilgili bilgiyi kodlamak ve bunların gerektiği yerde, ihtiyaç miktarınca aktarımını sağlamakla görevli olan deoksiribonükleik asit (DNA), ilk defa primer genetik materyali olarak 1944 yılında Avery ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. 1860'lı yıllarda Mendel kuralları ile organizmada döller boyunca süren bilgi aktarımının temelleri açıklanmaya çalışılmış, dolayısıyla genetik materyalin varlığı varsayım da olsa ortaya çıkarılmıştır (Sifford, 1998; Celikel, 2002; Granner, 1993a).

1953 yılında Watson ve Crick, DNA molekülünün kendine has özelliklere sahip bir çift sarmal yapı halinde bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Aynı dönemlerde çalışma yapan Wilkins ve Franklinin DNA'nın yapısına ait X ışınları fotoğraflarına ve Chargaff tarafından saptanan baz oranlarına dayanarak 1962 yılında DNA makro molekülünün sekonder yapısına ait bir modeli geliştirmişlerdir (Yüksel ve Yelkenci, 2000; Watson, 1995).

Fosforik asit ve beş karbonlu şeker (deoksiriboz), DNA molekülünün iki zincir omurgasını oluşturur ve sağa dolanan bu omurgayı birbirlerinin karşıtı olan doğrusal moleküllerin pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları bir arada tutar (Şekil 1.1). Azot içeren bazlar, çift halka yapısına sahip pürin [adenin (A) ve guanin (G)] ile tek halka içeren pirimidin [sitozin (C) ve timin (T)], arasındaki eşleşmeler son derece spesifik olup A'nın T ile G'nin C ile hidrojen bağları ile bağlanmaktadır (Yüksel ve Yelkenci, 2000; Sifford, 1998; Celikel, 2002; Granner, 1993a; Arda, 1990a; Smith, 1985).



Şekil 1.1. DNA sarmalının şematik gösterimi.

Azot içeren organik baz, deoksiriboz ve fosfat grubu (fosforik asit) kombinasyonu, nükleik asitlerin temel birimleri olan nükleotidleri meydana getirir (Şekil 1.1). Nükleotidler, şekerin 5' karbonuna tutunan fosfat ile diğer şekerin 3' karbonuna tutunan hidroksil gruplarına "fosfodiester bağları" ile kovalan bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmak üzere bir araya gelirler. Polinükleotid zincirinin son kısmında 5'-fosfat ucu bulunurken karşı zincirin son kısmında ise 3'-hidroksil ucu bulunmaktadır. İki polinükleotid zincirinden oluşan DNA'nın zincirleri birbirlerine antiparalel ve sağa dönüşlü olarak sarmal bir yapı gösterir (Hoekstra ve Smeekens, 1997; Yüksel ve Yelkenci, 2000; Smith 1985). Bu ikili sarmalın çapı 2.0 nm'dir. Herbir 3.4 nm'de tam bir dönüş yapar ve her bir dönüş 10 nükleotid çifti isabet eder. İki baz arasındaki uzaklık 0.34 nm olup, bazlar orta eksene dikeydir ve eksene göre iki bitişik baz arasında 36°'lik bir açı vardır (Arda, 1990a; Woodbury, 1992).

1.3. Gen Klonlama

Gen, belirli proteinin kodunu içeren DNA'daki spesifik dizin bölgesidir. Gen klonlama ise spesifik bölgenin bir organizmadan diğerine aktarılması ve özelliklerinin yeni organizmada gösterilmesi işlemidir (Woodbury, 1992). Hedef geni taşıyan DNA'nın saf ve bol olarak elde edilmesi, genin yerinden çıkarılması ve taşıyıcı DNA ile birleştirilmesi, oluşan rekombinant vektörün konakçı hücreye aktarılması, konakçı hücre tarafından aktarılan genin kabul edilmesi ve gen ürününün kontrol altında tutulması, gen klonlamadaki önemli basamaklardır (Arda, 1990b).

1.3.1. Klonlama Vektörleri

Klonlama vektörü, yabancı DNA parçasının hücre içerisine aktarımını sağlayarak, kendisini eşleyip yabancı DNA'nın çoğalabilmesini sağlayan özel DNA molekülüdür. İyi bir klonlama vektörü; küçük olmalı, konakçıya girebilmeli ve kopya sayısı yüksek olmalı, konakçı içerisinde dayanıklı kalabilmeli ve taşıdığı genin ekspresyonunu yüksek düzeyde yapabilmelidir (Woodbury, 1992; Arda, 1990d; Demir, 1999; Barut, 2001). Ayrıca entegre olmadıkları yapılardan ayırt edilebilmeleri için, üzerlerinde birden fazla seçici gen taşımaları gerekmektedir. Klonlama vektörü olarak genellikle plazmidler, bakteriyofajlar (fajlar) (Tablo 1.1.), kozmidler ve yapay maya kromozomları (YAC) kullanılır (Trambella ve Zito, 1992).

Tablo 1.1. Bazı klonlama vektörleri ve özellikleri (Woodbury, 1992)

Klonlama Vektörleri	Tip	Konakçı Hücre	Seçici özellik
PBR322	Plazmid	E. coli	Tetrasiklin ve ampisilin direnç geni içerir.
PUC8	Plazmid	E. coli	Ampisilin direnç geni ve β -Gal. geni içerir.
pEMBL8	Plazmid	E. coli	Ampisilin direnç geni ve β -Gal. geni içerir.
pBluescript	Plazmid	E. coli	Ampisilin direnç geni ve β -Gal. geni içerir.
λ gt10	Bakteriyofaj	E. coli	cDNA klonlamasında kullanılır.
λ gt11	Bakteriyofaj	E. coli	cDNA klonlaması ve gen ekspresyonunda.
λ ZAP	Bakteriyofaj	E. coli	Ampisilin direnç geni ve β -Gal. geni içerir.
λ EMBL3A	Bakteriyofaj	E. coli	Gen kütüphanesi oluşturmada kullanılır.
Yep24	Plazmid	E. coli, Maya	Ampisilin direnç geni içerir. Tekrar edilebilir maya vektörü

1.3.1.1. Plazmidler

1.3.1.1.1. Plazmid DNA Yapısı

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak kopyalanabilen, boyutları 1-200 kb arasında değişebilen, dairesel, çift iplikli DNA molekülleridir. Bazı bakteri cinslerinde doğal olarak bulunan plazmidler, bakteri kromozomundan ayrı bir çoğalma gösterirler. Buna rağmen çoğalmak için konakçı hücrenin enzim ve proteinlerine ihtiyaç duyarlar. Fakat kendini kopyalama işleminin başlaması üzerindeki kopyalama (replikon) gruplarının kontrolü altında gerçekleşir. Çoğunlukla kodladığı enzimler ile konakçı hücreye doğada belirli koşullar altında avantajlar sağlar. Plazmidler tarafından kodlanan görünen (fenotipik) özelliklerden bazıları şunlardır;

- Antibiyotiklere, ağır metal iyonlarına karşı direnç gösterme,
- Kompleks organik bileşiklere karşı parçalanmayı engelleme,
- Kısıtlayıcı (restriksiyon) ve modifikasyon enzimleri oluşturma,
- Diğer organizmaların üremesine engel olan maddeler (enterotoksin ve kolisin) oluşturmaktır (Sambrook ve ark., 1989).

Plazmidler bir bakteri yaşamı için gerekli yapılar değildirler. Bakterilere yukarıda geçen fenotipik karakterler kazandırdıkları zaman varlıkları anlaşılabilir. Her hücre bölünmesi sırasında, genom kopyalarını oluştururken, bunlar da eş zamanlı olarak kopyalanırlar ve oğul hücreye de aktarılırlar. Ancak, kopyalanmaları her zaman bakteri kromozomuna bağlı değildir. Bazı durumlarda, hücre içindeki kopyaları çok sayıda olabilir (Arda, 1990c; Blaisonneau ve ark., 1997).

Kolisinojenik (Col) plazmidleri, direnç (R) plazmidleri, stafilokok plazmidleri, virulans plazmidleri ve F faktörü taşıyan plazmidler olmak üzere 5 çeşit doğal pDNA bulunmaktadır (Arda, 1990c). Doğal olarak bulunan bu plazmidlerden gen aktarımında pek fazla yararlanılmamakta bunların yerine rekombinant plazmidler tercih edilmektedir (Arda, 1990d; Smith, 1985; Trambella ve Zito, 1992).

Plazmidlerin sıklıkla vektör olarak kullanılmalarının başlıca nedenleri şunlardır:

- Çok sayıda, kolay ve ucuz elde edilmeleri,
- Çift iplikcikli, sarmal ve dairesel bir yapıya sahip olmaları,
- Yapılarında, ayırım işleminde önemli fonksiyonu olan bazı özel seçici genleri içermeleri,
- Belli uzunlukta yabancı genleri kabul etmeleri,
- Enfeksiyona neden olmamaları,
- Bazılarında kısıtlayıcı endonükleaz için bir tek kesim yerinin bulunması,
- Kopyalanma özelliğine sahip olmaları ve buna bağlı olarak da hücre içinde bağımsız olarak kopyalanma özelliği taşımaları (Arda, 1990d; Smith, 1985).

1.3.1.2. Bakteriyofajlar (Fajlar)

Bakteriyofajlar, genel anlamda, bakterilerde üreyen ve liziz oluşturan bakteriyel virüslerdir. Bir çok bakterinin kendilerine özgü fajları vardır ve bunlar, bakterilerin tanınmasında da kullanılır.

Fajların bazıları, kendi konakçılarında liziz meydana getirmelerine karşın bir kısmı da bakteri içinde bulunduğu halde, her hangi bir zararlı etkide bulunmazlar. Bu tür fajlar bakterinin genomu ile kopyalanır ve hücre bölünmesi sırasında oğul hücreye aktarılır. Gen aktarımı amacıyla lambda (λ) fajı (çift iplikcikli, düzlemsel, uzunluğu ~ 50 kb) başarılı olarak kullanılmaktadır (Arda, 1990d; Trambella ve Zito, 1992).

Sadece litik döngü sırasında yüksek kopya sayısında çoğalmaları ve faj ile onun konakçı hücrelerinin sınırlı olmaları nedeniyle plazmidlere göre dezavantajları bulunduğu, Demir (1999) tarafından derlenmiştir.

1.3.1.3. Kozmidler

Plazmid DNA'nın kopyalanma bölgesi ve bir veya birden fazla seçici bölgesi ile bakteriyofajların cos dizisini (paketleme için gerekli DNA dizisi) içeren küçük dairesel molekülüdür. Plazmid vektör ve faj vektörünün avantajlarını birleştirmek

için geliştirilmiş olan kozmidler 35-50 kb uzunluğunda DNA dizisini taşıyabilirler (Arda, 1990d).

1.3.1.4. Yapay Maya Kromozomları (YAC)

1.000 kb uzunluğunda DNA dizisi taşıyabildiklerinden, daha çok gen kütüphanesi oluşturulmasında kullanılırlar. Oldukça uzun DNA dizilerinin analizinde kullanılabildikleri için, insan genom projesinde kullanımları daha fazladır. Büyük bir yapı gösterdiklerinden klonlama vektörü olarak kullanımları oldukça sınırlıdır (Burke ve ark., 1987; Meuelller ve Young 1995).

1.3.2. Konakçılar

Konakçılar, vektör ve vektörün taşıdığı genin çoğaltılmasında kullanılan hücrelerdir.

Konakçıların seçiminde, vektör çeşidine, elde edilecek ürün özelliğine, üretim ekonomisine ve tasarlanan ürün kalitesine bağlı olarak uygun seçim yapılmalıdır.

Konakçılar;

- Uygun büyüme hızına sahip olmalı (hızlı veya yavaş),
- Üretimin maliyeti göz önüne alınmalı (kültür ortamı ve üretim koşulları),
- Ürün ekspresyonu sağlanmalı,
- İstenilen ürün kolayca ortama salınmalı ve/veya elde edilmeli,
- Vektör ile seçilen konakçı uyum göstermeli,
- İstenilen ürün, tam özellik gösterebilmeli (örneğin, elde edilen protein, istenilen aktiviteyi göstermeli),
- Kültür ortamında dayanıklı kalabilmelidir (Woodbury, 1992).

Klonlama için sıklıkla kullanılan konakçılar: prokaryotik hücrelerden; *Escherichia coli* (E. coli), *Salmonella* ve *Bacillus* türevleri, ökaryotik hücrelerden; maya hücreleri, ve memeli hücrelerden; Çin hamster yumurta hücreleri, bebek hamster böbrek hücreleri, bazı tümör türev hücrelerdir (Fry ve Wood, 1999; Woodbury, 1992).

Ucuz kültür ortamında hızlıca üremeleri ve kolayca endüstriyel üretime adapte edilebilmeleri nedeniyle, bakteriyel konakçılar sıklıkla tercih edilir. Prokaryotik ürün elde edilmek istendiğinde, glikolizasyon gibi ileri protein modifikasyonlarını gerçekleştirememeleri, çok sayıda protein üretimi sağlayarak hücre içerisinde çözünmeyen kümelenmelere neden olmaları ve ortamda etkin bir saflaştırmayı engelleyen yabancı proteinler bulundurmaları dezavantajlarıdır.

Maya hücreleri ise üretime katılmayan intron hücrelerini RNA yapısına aktarmamaları ve glikolizasyon gibi basamakları gerçekleştirebildiklerinden dolayı, bakteri konakçılara üstünlük sağlar. Ucuz kültür ortamında, kısmen hızlı bir üretim sağlaması da diğer bir avantajıdır. Yalnız glikolizasyon basamağını gerçek ökaryotik kaynağı gibi yapamaması, ortamın özelliğine bağlı olarak çeşitlilik göstermesi ve çok sayıda üretime bağlı kümelenmiş protein oluşumundaki kontrol zayıflığı dezavantajları olarak sayılabilir.

Bakteri ve maya konakçılarına göre oldukça yavaş büyüyen ve ortamın pH'sına, sıcaklığına, oksijen ve metabolit düzeyine çok duyarlı olan memeli konakçıları, istenilen proteinin istenilen kalitede elde edilebilmesi açısından tercih edilir. Üretim aşamasında ortam şartları değiştirilerek, ürün kalitesi üzerinde kontrol sağlanabilmesi de önemli bir avantajdır (Woodbury, 1992).

1.3.2.1. Escherichia coli

E. coli, insan dahil pek çok hayvanın sindirim sisteminde yaşayan 1.1-1.5 µm eninde ve 2.0-2.6 µm boyunda düz, uçları yuvarlak çomakcık şeklinde, gram-negatif bakterilerdir. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar ve teker teker ya da ikiye bölünmüş gruplar halinde bulunabilirler. Peritrik kirpikleri ile hareket etmelerine rağmen hareket kabiliyetleri yavaştır. Hatta hareketsiz görünebilirler (Brenner, 1981; Bilgehan, 2002a).

Buyyon ve jeloz besiyerlerinde kolayca üreyebilirler. Optimal üreme ısısı 37°C, pH ise 7.2'dir. Katı besiyerinde hafif kabarık, düzgün 1-2 mm çapında parlak S tipi (yuvarlak) koloniler oluştururlar (Brenner, 1984). E. coli basili ortamdaki şekeri, asit ve gaz oluşturarak parçalar. E. coli, laktoz ve eozin metilen mavisi içeren, eozin metilen blue agar (EMB) besiyerinde laktozu parçalayıp asit oluşturur. Bu mekanizma sonucu, koyu renkli, genellikle üzerleri metalik yeşil kılıf ile kaplı koloniler oluşur. Mc Conkey agarda (MC agar) ise oluşan E.coli kolonileri kırmızı renklidir. Sıvı besiyerinde ise ortamı bulandırarak üreme gerçekleştirirler (Finegold ve Martin, 1982; Bilgehan, 2002a). E. coli üzerinde yapılan; indol ve metil kırmızısı testlerinde olumlu, voges proskauer ve sitrat testlerinde olumsuz sonuçlar elde edilir. Katalaz reaksiyonlarında olumlu, oksidaz reaksiyonlarında olumsuz yanıtlar alınır. Üreyi parçalayamazlar. Taşıdıkları H (kirpik), O (vücut hücresi) ve K (kapsül) antijenlerine bağlı patojenite gösterirler. Sonradan kazanılan direnç plazmidlerine bağlı olarak antibiyotiklere karşı direnç gösterirler (Bilgehan, 2000). Moleküler biyolojisi ve genetiği iyi araştırılmış bir bakteri olduğundan, klonlama vektörü olarak çok sık kullanılmaktadır (Arda 1990b).

1.3.3. Klonlamada Kullanılan Enzimler

1967 yılında DNA parçalarını birbirine bağlayan DNA ligaz ve 1970 yılında herhangi bir DNA kaynağını, spesifik bir veya birkaç bölgeden kesen DNA kısıtlayıcı enzimlerin (restriction enzyme) keşfi, klonlama vektörü içerisine istenilen gen bölgesinin aktarımına olanak sağlamıştır (Mueller ve Young, 1995).

1.3.3.1. DNA Yapısını Birleştiren Enzimler

Ligazlar, iki DNA fragmentini birleştirmek için DNA'nın 5'fosfat ve 3'-hidroksil uçları arasında fosfodiester bağlarının oluşumunu katalize ederler (Arda, 1990b).

1.3.3.2. DNA Kısıtlayıcı Enzimler

Prokaryotlar, türlerin genetik yönden stabilitesini korumak ve mutasyonlara engel olmak için, yabancı DNA'nın parçalanmasını sağlayan bir veya birkaç kısıtlayıcı endonükleaz enzimi sentezler (Arda, 1990b; Granner, 1993b). Üçyüzün üzerinde farklı kısıtlayıcı enzim, çeşitli bakteriyel organizmalardan izole edilmiştir. Kimi tanıdığı baz sıralarının 5-10 nükleotid sonrasını keserken, tercih edilen enzimler ise genelde 4-6 baz çifti uzunluğunda olan spesifik bir DNA dizisini tanır ve keser (Mueller ve Young, 1995).

Kısıtlayıcı enzimler, herhangi bir organizmanın DNA'sını gelişigüzel parçalayan enzimatik, kimyasal veya fiziksel yöntemlerin aksine aynı DNA'yı diziye spesifik bir tarzda ufak parçalara ayırır. Bu kesim işleminden, enzim tarafından uygulanan mekanizmaya bağlı olarak, çift zincirin aynı yerden kesilmesiyle küt uçlar veya aynı DNA dizilimine bağlı kesilmesi ile yapışkan uçlar elde edilir (Mueller ve Young, 1995; Granner, 1993b). Kısıtlayıcı enzimler izole edildikleri bakteriye göre isimlendirilirler (Tablo 1.2.).

Tablo 1.2. Bazı kısıtlayıcı endonükleazların, elde edildiği organizma ve kesme-tanıma işleminin gerçekleştiği bölgeler (Mueller ve Young, 1995).

Kısıtlayıcı enzim	Elde edildiği organizma	Tanıma-kesim bölgesi
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens H	G ↓ G A T C C
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G ↓ A A T T C
Hae III	Haemophilus aegyptius	G G ↓ C C
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	A ↓ A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainfluenzae	G T T ↓ A A C
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A ↓ G
Sma I	Serratia marcescens	C C C ↓ G G G
Sal I	Streptomyces albus G	G ↓ T C G A C

1.4. Gen Tedavisi

Gen tedavisinin temel amacı, hücrelerin hastalığa yol açan eksik yada kusurlu gen veya genlerin yerine, sağlam kopyaların hücreye yerleştirilmesiyle genetik hatanın düzeltilmesi yada hücreye yeni bir işlev kazandırılmasıdır (Fry ve Wood, 1999; Sagioglu, 2002). Genetik bozukluktan kaynaklanan semptomların kontrol edilmesi veya tedavisi için sorunun kaynağına inilip hastanın bozuk genetik yapısı düzeltilmeye çalışılmaktadır (Sagioglu, 2002).

Kalıtsal olarak meydana gelen,

- Hemopoetik sistemde, adenoazin deaminaz (ADA) enzimindeki bozukluk,
- Üst solunum yolu epitel dokularında, kistik fibroz (CF),
- Kas zayıflığı sendromu (Duchenne muscular dystrophy),
- Karaciğerde, ailesel hiperkolesterolemi (FH),
- Hemofili,
- Ciddi bileşik immün yetmezliği (SCID),
- Periferik vasküler bozukluklar ile sonradan meydana gelebilen ve birçok faktöre bağlı kanser tipleri,
- Artrit,
- Enfeksiyon hastalıkları (örnek: AIDS) gen tedavisinin hedefleri arasında yer almaktadır (Bout, 1997; Mahato ve ark., 1997a; Galipeau ve ark., 1999; Rolland, 1998; Spack ve Sorgi, 2001).

Yukarıda da belirtildiği üzere, kalıtsal olarak meydana gelen (konjenital hastalıklar) ve sonradan meydana çıkan birçok genetik hastalığa çare bulmaya çalışılmaktadır. Bununla birlikte pek çok hastalık birkaç genetik faktörü (poligenik) içermektedir. Klinik açıdan etkili bir tedavi sağlamak için, farklı genlerin hastalık mekanizmasındaki gelişmelerinin ve kodladıkları protein yapılarının kesin olarak açıklanabilmesi gerekmektedir. Bu yüzden, adenoazin deaminaz yetersizliği, ailesel hiperkolesterolemi ve kistik fibröz gibi tek-gen bozukluklarının ilk uygulamalarında, etkin gen aktarım vektörlerinin kullanılamamış olmasına rağmen, ümit verici

sonuçlarla gen tedavi protokolleri tamamlanmış ve bazı başarılar elde edilmiştir (Fry ve Wood, 1999).

İbn-i Sina'nın, Tıp Kanunu adlı eserinde; "Vücutta varolan üç tür yetenek arasında yer alan doğal yeteneklerden birisi, bireyin korunması, diğeri ise ırkın korunması ile ilgilidir. Irkın korunmasına hizmet eden yetenek, erkek ve kadın tohumunun biçimlendirilmesi ve çeşitli organların farklı yapı ve özelliklerine göre gelişmesini sağlayan üreme yeteneğidir. Kuşaktan kuşağa aktarılan bu yetenek, yaşamın devamından ve ırkın bekaasından sorumludur" ifadesi geçmektedir (Ozturk, 2001). Bin yıl öncesinde bile gen yapısı bilinmesine rağmen, gen tedavisi ilk kez 1958 yılında Haskova ve Hrubesova (1958) tarafından DNA doku transferinde uygulanmıştır. Aynı yıllarda Medawar (1958) adlı araştırmacı da farelerde deri nakli sırasında baskın geni taşıyan DNA dizisi üzerinde çalışmalar yapmıştır. Gen tedavisinde ise ilk çalışma 1990 yılında Anderson tarafından gerçekleştirildi. Normal ADA geninin ürettiği enzim, savunma sisteminin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. ADA eksikliği ile doğan çocuklarda, savunma sisteminde ciddi boyutlarda sorun olmaktadır. En ufak bir virüs enfeksiyonu bile hayati tehlike yaratmaktadır. Tedavi edilmez ise hastalık birkaç yıl içinde hastanın ölümüyle sonuçlanır. ADA tedavisinin başarılı olma sebepleri incelendiğinde, tek bir gen bozukluğu nedeniyle ortaya çıkması ve enzimin çok az miktarlarda üretiminin klinik açıdan olumlu sonuçlar vermesi ve yüksek miktarda üretiminin ise vücut üzerinde zarar oluşturmamasıdır (Rolland, 1998).

Başarılı bir gen tedavisi sağlamak için uygulanması gereken basamaklar bulunmaktadır. Öncelikle hastalığa neden olan gen veya genlerin belirlenmesi, sağlam kopyaların üretilip-çoğaltılması gerekmektedir. Genin tanımlanmasından sonraki aşamada, genin istenilen hücreye nakledilmesi ve orada aktif olarak çalışabilmesini sağlamak gerekir (Bout, 1997). Sonuç olarak, etkin bir gen tedavisinin gerçekleşmesi için konvansiyonel ilaçların karşılaştıkları sorunların yanı sıra;

- Gen, etkin bir taşıyıcı sistem ile hedeflenen yere gelmeli,
- Vektör/DNA yapısı, hedef hücreye özgül bir bağlanma gerçekleştirmeli,

- Hücre içi endozomal yapılar içerisine alınmalı,
- Genomik yapı, sitoplazma içerisine başarılı salım göstermeli,
- Hücre içi taşıma gerçekleştirilerek, çekirdek yapısına girmeli,
- Taşıyıcıdan (vektör) kurtulmalı ve çekirdek DNA yapısına katılmalıdır

(Borchard, 2001; Higgins ve Portnoy, 1998).

Gen tedavisi, eşey hücresi (germ-line) ve vücut hücresi (somatik) gen tedavisi olarak iki ana kategoride incelenebilir. Eşey hücresi gen tedavisinde, genetik bir bozukluğu önlemek için eşey hücrelerinde (sperm yada ovum) veya embriyonel hücrede (4-8 hücre aşamasında) genler değiştirilir. Günümüzde, etik ve bazı teknik problemlerden dolayı, eşey hücresi gen tedavisi toplumca kabul görmemektedir (Fry ve Wood, 1999; Sagioglu, 1999, Winston ve Handyside, 1993).

Günümüzde gen tedavisi, *ex-vivo* ve *in-vivo* olmak üzere iki teknik ile yapılmaktadır.

1.4.1. *Ex-vivo* Gen Tedavisi

Başarılı bir şekilde genleri yapısında taşıyan hücre ve dokuların, hastaya geri verilme işlemidir. Hastadan alınan hücrelere laboratuvar ortamında sağlam gen nakledilir (Mahato ve ark., 1997a). Gen tedavisine yönelik ilk klinik çalışma, ciddi immün yetmezliği olan iki çocuğun ADA geninin sürekli salımını sağlamak amacıyla retroviral vektörler kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Hastanın, T-lenfositleri alınarak, laboratuvar şartlarında, doku kültürü yoluyla çoğaltılmıştır. Daha sonra sağlam insan ADA geni, retrovirüs vektörü yardımıyla bu hücrelere nakledilmiş. Genetik olarak başarı ile değiştirilen hücreler seçilerek, 10 gün boyunca çoğaltılmış ve i.v. olarak hasta vücuduna geri verilmiştir. İlk on ay boyunca; 6-8 haftada bir, daha sonra ise 6-12 ayda bir tedavi tekrarlanarak, istenilen etki sağlanmıştır (Rolland, 1998).

Daha sonraki uygulamalar, LDL-reseptörü (düşük dansiteli lipoprotein-reseptörü) eksikliğine bağlı olarak gelişen ailesel hiperkolesterolemi hastalığı

üzerinedir. Hastalardan alınan hepatositlere, retrovirüs vektörleri kullanarak, *ex-vivo* yöntemlerle reseptör geni nakledilmiş ve karaciğer portal venine enjekte edilerek, vücuda geri verilmiştir. Fakat, etkin bir klinik yarar sağlanamamıştır (Rolland, 1998). Kemik iliği hücrelerine yapılan diğer *ex-vivo* çalışmalar ise, Gaucher hastalığı, AIDS ve kemik iliği üzerinde etkili, kemoterapötik toksisiteden korumak amacıyla yapılmıştır (Rolland, 1998; Fry ve Wood, 1999).

Ex-vivo gen tedavisi; zor, pahalı, hasta uyuncunu azaltan ve klinik uygulamalarda karşılaşılan sorunlar nedeniyle pek tercih edilmeyen bir yöntemdir (Rolland, 1998).

1.4.2. In-Vivo Gen Tedavisi

Terapötik genlerin, hastaya taşıyıcı sistemler içerisinde verilmesiyle sağlanan tedavi şeklidir (Mahato ve ark., 1997a). Akciğer, beyin, kalp gibi organlara hedef hücrelerin kültürlerinin yapılması veya bu organların çıkarılıp-tekrar nakil edilebilmesi mümkün olmadığından, *ex-vivo* gen tedavisi uygulanamaz (Bout, 1997).

Ex-vivo gen tedavisinde kullanılabilen fiziksel yöntemler (mikroenjeksiyon, elektroporasyon, partikül bombardımanı v.b.), *in-vivo* gen tedavisinde uygulama zorlukları nedeniyle kullanılamazlar. Viral ve viral olmayan taşıyıcılar yardımı ile tedavi gerçekleştirilir (Mahato ve ark., 1997a).

1.4.2.1. DNA Taşıyıcı Sistemler

Başarılı bir gen tedavisi için, terapötik gen veya genleri hedef hücreye verimli olarak taşıyabilecek gen aktarım vektörleri gereklidir. Gen aktarım vektörleri;

- İstenilen terapötik geni taşıyabilme kapasitesine sahip olmalı,
- Üretimi tekrarlanabilir olmalı,
- Saklama koşullarında stabil kalabilmeli,
- Hedef hücreye gen aktarımını istenilen düzeyde sağlamalıdır (Felgner ve Rhodes, 1991; Felgner ve ark., 1987).

1.4.2.1.1. Viral Vektörler

Viral vektörler, viral hastalık oluşturmada terapötik genleri hedef hücrelere aktarmak üzere, üzerinde modifikasyonlar yapılan taşıyıcılardır (Russell ve Hirata, 1998; Rolland, 1998). Viral vektörler aracılığı ile yapılan gen tedavisi, genetik mühendisliğince yaratılmış, hasarlı veya zayıflatılmış virüslerin kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (Rolland, 1998; Watson ve ark., 1983).

Viral vektörler, hedef hücrenin yüzeyi ile etkileşir, reseptör aracılığı ile hücre içerisine alınır ve etkin bir şekilde endozom ile çekirdek arasında geçiş sağlar. Ayrıca, çekirdek içerisinde taşıdığı genomik yapı ile konakçı hücrenin kromozomal DNA'sına entegre olma kapasitesine sahiptir. Doğal olarak hücreyi enfekte etme yeteneğine sahip, retrovirüsler, adenovirüsler herpesvirüsler ve adeno-bağlantılı virüsler *in-vivo* gen taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır (Rolland, 1998; Russell ve Hirata, 1998).

Yabancı bir genin, modifikasyona uğramış virüs ile taşınması ilk defa 1968 yılında bildirilmiştir. Tütün mozaik virüsünde yapılan ilk denemelerin sonucu, virüslerin özgül genetik materyali hücre içerisine taşıdığını göstermektedir. Memeli hücrelerini enfekte eden modifiye papilloma virüsleri (SV40) üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Vanderbilt, 2000).

Viral gen dizilimi terapötik gen ile yer değiştirmiş, kopyalanma yeteneği bulunmayan rekombinant virüsler, doğal yeteneklerine bağlı olarak gen aktarımında yüksek etkiye sahiptirler (Lee ve Huang, 1996; Felgner ve Rhodes, 1991). Viral vektörlerin, immünojeniteleri, toksisiteleri, büyük miktar üretimindeki zorlukları, taşıyabileceği DNA büyüklüğünün sınırlı olması (7-13 kb), dokuya özgü olmayışları ve tümörejenik mutasyonu başlatmasındaki olasılık ve/veya rekombinasyon ile aktif viral partikülleri meydana getirebilme olasılıkları nedeniyle kullanımlarında sakıncalar bulunmaktadır (Lee ve Huang, 1996).

1.4.2.1.1.1. Retrovirüs Vektörler

Vücut hücrelerinin kromozomal DNA'larına etkin ve kararlı olarak entegre olmasını sağlayan bir RNA virüsüdür. Sadece kopyalanan hücreleri enfekte eder. Bu yüzden retrovirüsler ilk olarak *ex-vivo* tedavide hücre bölünmesini teşvik eden büyüme ortamındaki hücrelere gen aktarımında kullanılmışlardır (Rolland, 1998).

Retrovirüs vektörlerin olumlu özellikleri; yüksek gen aktarımına sahip olmaları, 8 kb büyüklüğe kadar yabancı gen taşıyabilmeleri, çok fazla araştırılmış olmaları ve vektör proteinlerini konakçıda oluşturmamalarıdır (Fritz, 1996a; Felgner ve Rhodes, 1991; Mulligan, 1993). Olumsuz özellikleri ise; sadece bölünmekte olan hücreleri enfekte etmeleri, düşük titre göstermeleri (10^6 - 10^7), hücre ile birleşimlerinin rastgele olması, *in-vivo* taşımada zayıf özellik göstermeleri (enfekte edebilmeleri için yardımcı hücre kültür ve ortamına ihtiyaç duymalarına bağlı olarak) (Fritz, 1996a; Mulligan, 1993), vücut hücrelerinin kromozomal DNA'sının yapısına daimi olarak katılmaları sonucunda, onkogen aktivasyonunu (veya tümör baskılayıcı genlerin inaktif hale gelmelerini) sağlamalarıdır (Barut, 2001).

1.4.2.1.1.2. Adenoviral Vektörler

Adenovirüsler, üst solunum yolu epitel hücreleri, endotelial hücreler, hepatositler ve kanser hücreleri gibi bölünmekte olan ve olmayan hücreleri enfekte etme potansiyeline sahiptirler. Adenoviral vektörler taşıdıkları geni konakçı genomunun yapısına katmazlar (Rolland, 1998; Mulligan, 1993; Curiel, 1994). Adenoviral vektörler kullanılarak, hedef hücreye giren genler sınırlı bir süre boyunca çekirdekte epizom olarak yer alırlar. Adenovirüsler zayıflatılmış virüslerdir. Bu nedenle hücrel ve bağışık yanıtlara neden olabilecek bazı viral proteinlerin yapımını yönlendirirler. Adenoviral vektörlerin *in-vivo* uygulanmasında, humoral bağışık yanıt oluşturmalarının yanında, etki gösterdiği hücrelere karşı hücrel bağışık yanıt da oluşturmaktadır. Bu olay, terapötik genler için adenoviral vektörlerin tekrar uygulanmasında önemli sınırlamalar getirmektedir (Rolland, 1998).

Kistik fibröz hastalarında, kistik fibrözün dış membranında taşınan, düzenleyici proteini kodlayan genin, adenoviral vektör ile uygulanmasında başarı sağlanamadığı belirtilmektedir (Rolland, 1998).

1.4.2.1.1.3. Adeno-bağlantılı Viral Vektörler

Adeno-bağlantılı virüsler (AAV), genomlarını konakçı hücrenin kromozomlarına kalıcı olarak birleştirebilen DNA virüsleridir. DNA virüsü olarak AAV vektörler, retrovirüslere göre rekombinasyona daha az yatkındırlar. AAV vektörlerinin, kopyalama döngüsünde S fazındaki hücreleri enfekte ettiği gösterilmiştir. AAV vektörleri, konakçı hücrenin kromozom yapısına katılmalarını sağlayan özellik dışındaki yapıların, genetik mühendislerince değiştirilmesine olanak sağlar. AAV vektörlerin kullanımındaki en büyük sınırlama, yardımcı virüs olmadan klinik kullanım için yeterli titrede virüs üretmek için paketleyici hücre hatlarının geliştirilmesindeki zorluktur.

Kistik fibröz ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilir (Rolland, 1998, Russell ve Hirata, 1998).

1.4.2.1.1.4. Herpes Simplex Virüs

Herpes simplex virüsü, bölünmeyen hücreler için geliştirilmiş, sinir sistemi ve diğer dokulara gen taşınmasında kullanılan yeni bir vektör sistemidir (Tighe ve Fritz, 1996).

1.4.2.1.2. Viral Olmayan Vektörler

Viral vektörlerin, rekombinasyon ile aktif viral partikülleri meydana getirebilme olasılıkları, toksik ve bağışık yanıt oluşturan etkileri nedeniyle (Bölüm 1.4.2.1.1.) viral olmayan yapay vektörler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Ancak viral olmayan vektör sistemlerin gen aktarım verimleri, viral vektörlerin verimlerinden düşüktür (Lee ve Huang, 1996; Lee ve Huang, 1997).

Viral vektörlere göre üstünlükleri;

- Düşük toksisite göstermeleri,
- Daha az bağışık yanıt oluşturmaları,
- Genetik materyali lizozomal yıkımdan korumaları,
- İstenilen hücelere hedeflendirilebilmeleri,
- Ticari olarak büyük miktarlarda üretililebilmeleri,
- DNA taşıma kapasitelerinin yüksek olmasıdır (Lee ve Huang, 1997;

Spack ve Sorgi, 2001).

1.4.2.1.2.1. Fiziksel Teknikler

Genetik materyalin hücelere aktarımında yararlanılan basit yöntemlerdir. DNA yapısının hücre zarından geçmesini sağlamak ve kolaylaştırmak amacıyla uygulanan yöntemlerdir (Fritz, 1996b; Sifford, 1998)

1.4.2.1.2.1.1. Mikroenjeksiyon

Mikroenjeksiyon metodu, diğer taşıyıcı yöntemlerle karşılaştırıldığında; oldukça basit, ucuz ve toksik olmayan bir yöntemdir. Bu yöntem uygulandığında, düşük oranda sadece enjeksiyonun yapıldığı bölge ve çevresinde gen aktarımı gerçekleşebilmektedir. Genç hayvanlarda, yeni oluşmakta olan kas hücrelerinde yüksek bir etki elde edildiyse de gerek iğne ucunda gerekse vücut hücrelerine girmeden parçalandıkları gözlenmiştir. 2 ila 5 mg gibi yüksek miktarlarda DNA karaciğere enjekte edildiğinde gözlenebilir bir aktarım gerçekleşmiştir. Kültür hücrelerinde, taşıyıcı içermeyen pDNA ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuç elde edilmemiştir. Fakat iskelet ve kalp kaslarında yapılan çalışmalarda birkaç başarılı sonuç elde edilmiştir (Mahato ve ark., 1997a).

1.4.2.1.2.1.2. Partikül Bombardmanı

Bu yöntemle DNA, mikrometre boyutundaki tungsten veya altın parçacıklarıyla kaplanıp, yüksek hızda hücelere gönderilmektedir. Daha çok bitki dokularına gen aktarımında kullanılmaktadır (Fritz, 1996b).

1.4.2.1.2.2. Taşıyıcı Vektörler

Gen tedavisinin amaçlandığı her bölgeye fiziksel tekniklerle ulaşılması imkansızdır. Bu nedenle genetik materyali etkin ve dayanıklı bir biçimde taşıyabilecek sistemler kullanılmalıdır.

1.4.2.1.2.2.1. Emülsiyonlar

Emülsiyonlar karışmayan iki sıvının üçüncü bir bileşen yardımı ile birbirleri içerisinde damlacıklar halinde dağıldığı çok fazlı sistemlerdir. Farmasötik emülsiyonlar çoğunlukla bir su fazı ile bir yağ fazından oluşmaktadırlar. Sürekli fazın su veya yağ olmasına göre iki tip emülsiyon oluşabilir. İlaç taşınmasında kullanılacak emülsiyonun tipi, etkin maddenin uygulanma yoluna, etkin maddeye ve istenen etkiye göre belirlenir (Barut, 2000; Hayta, 2002). Katyonik yüzey etkin madde içeren emülsiyona, gen etkin bir biçimde hapsedilerek, nükleaz ve biyolojik serum ortamlarında yıkımdan korunduğu gösterilmiştir (Barut, 2000; Yiu ve ark.,1997; Dubernet ve ark., 1997).

Liu ve arkadaşları (1996) tarafından, dioleil fosfatidil ethanolamin, N-karbomil dimetil aminoetan ve kolesterol ile 4 farklı tip yüzey etkin madde kullanılarak DNA/emülsiyon kompleksleri hazırlanmış ve serum varlığında aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan tween serisinin, DNA'ya bağlı çökme mekanizmasını engellediği, pluronik F127 ve pluronik F68 varlığında ise %20'lik serum ortamında dahi aktivitede kayıp olmadığı bulunmuştur. İyonik olmayan yüzey etkin maddelerin, emülsiyon oluşumuna dayanan DNA stabilizasyonlarının, taşıdıkları hidrofilik gruplarına bağımlı olarak gerçekleştiği, gen aktarım aktivitesinde ise bu hidrofilik grupların etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Negatif yüklü polinükleotidler taşıması ve negatif yüklü biyolojik yüzeyler ile ilişki kurabilmesi için taşıyıcı sistemin katyonik olması gerektiğini bildiren Yiu ve arkadaşları (1997), gen taşıyıcı olarak katyonik lipid emülsiyonları hazırlamışlardır. Katyonik lipid kompleksiyle karşılaştırılan lipid emülsiyonun, serum varlığında

oldukça stabil olduğu, *in-vitro* ve *in-vivo* uygulamalar için büyük bir potansiyel taşıdığı bildirilmiştir.

1.4.2.1.2.2.2. Katyonik Lipidler

Katyonik lipidler, DNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşerek yükü nötralize eden ve DNA'nın daha sıkı bir yapı haline gelmesini sağlayan amfifilik moleküllerdir (Felgner ve ark., 1987; Felgner ve ark., 1994; Hofland ve ark., 1997).

Katyonik lipidlerle pDNA kompleksleri hazırlanmış, zwitteriyonik yüzey etkin maddelerin ve aminoasitlerin gen aktarımı üzerine artırıcı etkileri olduğu, ve komplekslerin nükleazlar tarafından parçalanmasına engel olduğu gözlenmiştir (Demir, 1999; Barron ve ark., 1998; Mahato ve ark., 1998). Hazırlanan katyonik lipid-pDNA komplekslerinin kısa sürede, etkin gen aktarımı yapabildiği tespit edilmiştir (Demir, 1999; Mahato ve ark., 1997b).

1.4.2.1.2.2.3. Lipozomal veya Lipid Yapıdaki Sistemler

Lipozomlar, pDNA'yı sulu iç fazlarına hapsederek, nükleazlar tarafından parçalanmasına engel olurlar. Biyolojik ortamdaki stabilite problemleri ve retiküloendotelial sistem tarafından ortamdan elimine edilmeleri, çözümlenmesi gereken problemlerdir. Fosfolipidlerin çifte tabakalarından oluşan lipozomlar, biyolojik membran yapılarına benzemelerinden dolayı hücre içine kolayca girerler (Mahato ve ark., 1997a; Lee ve ark., 1992; Litzinger ve Huang, 1992; Mui ve ark., 1994).

Lipozom içerisine hapsedilmiş plazmid formülasyonunun intravenöz enjeksiyon sonrasında; küçük lipozomal yapı içerisindeki insan α 1-antitripsininin (AAT), fare plazmasında değerlendirilebilir miktarda bulunduğu, çok tabakalı lipozomal yapı içerisindeki faktör IX geni verildiğinde ise fare plazma ve karaciğerinde insan kan pıhtılaşma proteinlerinin varlığı tesbit edilmiştir (Rolland, 1998).

Lipozomlar üzerine antikor ve/veya ligandlar bağlanarak aktif hedeflendirilme gerçekleştirilmiştir (Senior ve ark., 1986; Chesa ve ark., 1993; Lee ve ark., 1996; Campbell ve ark., 1991; Lee ve Low, 1994; Wu ve Wu, 1987). Lizozomal yıkımdan kurtulmak için, nötral pH'larda stabil olan fakat zayıf asit pH'larında füzyon etkisi ortaya çıkan ve içeriğini sitoplazmaya aktarabilen, pH duyarlı lipozomlar üzerinde oldukça fazla çalışma bulunmaktadır (Wang ve Huang, 1987; Litzinger ve Huang, 1992; Legendre ve Szoka, 1992). pDNA katyonik lipozomlar içerisinde anyonik lipozomlara göre daha verimli ve stabil şekilde taşınabilmektedir. Nötral ve anyonik lipozomların DNA ile etkileşimleri kondanse olmamış DNA'nın negatif yükü ve büyüklüğü nedeniyle yeterli değildir. Bu lipozomlar DNA'yı düşük etkinlikte içlerine hapsederler. Lipozom içerisine hapsedilme oranını artırmak için kullanılan, dondurma-çözme siklusları, polikarbonat membranından geçirme veya sonikasyon gibi yöntemlerin ciddi DNA hasarlarına yol açmakta olduğu bildirilmektedir (Felgner ve ark., 1987; Mahato ve ark., 1997a; Gao ve Huang, 1996; Farhood ve ark., 1994; Gable ve ark., 1998). Bu nedenle yüksek katyonik yük yoğunluğundan yararlanarak, poli-l-lizin gibi polikasyonlar yardımı ile DNA kondanse edilip, lipozomal yapı içerisine hapsedilir. Bu özellikten yararlanarak, katyonik lipozoma hapsedilmiş-polikasyonla birleştirilmiş DNA ile katyonik vektör (LPD I) (Gao ve Huang, 1996) ve anyonik lipozoma hapsedilmiş-polikasyonla birleştirilmiş DNA ile hedeflendirilebilir vektör (LPD II) gibi yeni kuşak lipozomal yapılar üzerinde de umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Lee ve Huang, 1996).

1.4.2.1.2.2.4. Katı Kolloidal Taşıyıcılar

Lipozomal formülasyonlar; dayanıklı olmamaları, agregasyona yatkınlıkları, serum bileşenleri ile inaktivite olmaları ve kısa bir yarı ömre sahip olmaları gibi sakıncalar içermektedirler (Bozkir ve Kocyigit, 1995; Bozkir ve Duman, 1996). Bu nedenlerle katı kolloidal taşıyıcı sistemler üzerinde oldukça yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

DNA aşılarının ve peptid-proteinlerin taşınmasında 5 μm 'nin altındaki boyutlara sahip mikroküre formülasyonları üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Borchard, 2001; Witschi ve ark., 1999; Lubben ve ark., 2001; Cui ve Mumper, 2001). Polimer olarak, biyolojik olarak parçalanan polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) (Hao ve ark., 2000; Crotts ve Park., 1997; Bittner ve ark., 1999; Wang ve ark., 1999; Cohen ve ark., 1991; Bozkir ve Saka, 2002) ve polilaktik asit (Saka ve ark., 2000) oldukça sık kullanılmaktadır. Hao ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada; PLGA içerisine hapsedilmiş DNA mikrokürelerinin *in-vitro* salımları karakterize edilmiş, biyolojik aktiviteleri hücre kültürlerinde ve bakteri ortamında incelenmiş ve gen aktarım oranı belirlenmiştir. *In-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda elde edilen biyolojik aktivitelerde belirgin bir fark elde edilmemiş, fakat formülasyonun stabilitesini sağlamak için liyofilizasyon yapılması gerektiği, böylece formülün 4°C'de saklanabildiği, aksi takdirde -20°C'de saklanması gerektiği bildirilmektedir. Sonuçta gen aktarımını sağlayan bir formülasyon elde edilmiş, fakat *in-vitro* metodların aktivite tayinlerinde kullanışlı olmadığı belirtilmiştir.

Jung ve arkadaşlarının (2000) yapmış olduğu araştırmada farelere oral yoldan verilen polistiren ve sığır serum albümin (BSA) yüklü PLGA nanopartiküllerinin değişik organ ve dokularda dağılımı incelenmiştir. Sadece 500 nm boyutlarındaki polistiren nanopartiküllerin, fare ince-barsağındaki M hücreleri tarafından tutulabildiği, 100 nm'nin üzerindeki partiküllerin kemik iliğine ulaşamadığı, 300 nm boyutundakilerin ise kanda görülmediği bildirilmiştir. Karboksillenmiş polistiren nanopartiküllerinin ise polistiren nanopartiküllerine göre daha az emilime uğradığı belirtilmiştir. BSA yüklü PLGA nanopartiküllerinde, küçük partiküllerin emilim oranının, büyük partiküllerden 15-250 kat daha fazla olduğu, eksi yüklü formülasyonların ise M hücrelerine ve enterositlere emiliminin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak; protein, oligonükleotid gibi makro moleküllerin oral yoldan etkin olarak koloidal taşıyıcılarla verilebilmesi için partikül büyüklüğü, yüzey yükü ve hidrofobik özelliklerin ayarlanması gerektiği, özellikle lenf nodlarına geçiş için partikül büyüklüğünün önemli bir formülasyon kriteri olduğu saptanmıştır.

Düşük molekül ağırlığındaki kitozanın katyonik özelliğinden yararlanarak, negatif yüklü DNA ile nanometrik boyutlarda oluşturulan kompleks ile poli-L-lizin:DNA kompleksinin, nükleaz enziminin yıkımından korunması incelenmiştir. Sonuçta kitozan ile DNA'nın 1:1 oranındaki kompleksinin, toksik etkileri bilinen poli-L-lizin ile oluşturulan DNA kompleksinden daha etkin bir oranda nükleaz enziminden korunduğu bildirilmektedir. Fareler üzerinde komplekslerin dağılımı incelenmiş ve karaciğerde birikime uğramamış düşük molekül ağırlıklı kitozan-DNA kompleksinin non-viral gen taşıyıcı vektör olarak kullanabileceği sonucuna varılmıştır (Richardson ve ark., 1999).

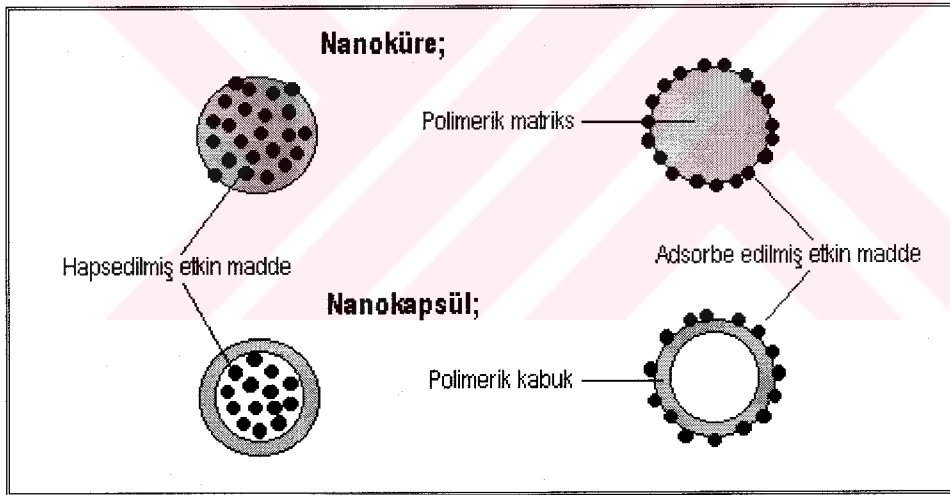
200-750 nm boyutunda kitozan ve jelatin nanopartikülleriyle, lipozom formülasyonunun, epitel hücre kültüründe gen aktarımı incelendiğinde, nanopartiküllerin; lipozom formülasyonundan ve kontrol grubu olan serbest DNA'dan yüksek, diğer kontrol grubu olan adeno-bağlantılı virüs vektöründen düşük aktivite gösterdiği bulunmuştur. Jelatin nanopartiküllerin hücre içerisine giriş mekanizmasının farklı olabileceği düşünülerek, kitozan formülasyonlarından daha iyi aktarım sağladığı bildirilmektedir (Leong ve ark., 1998). Ayrıca kistik fibröz (Walsh ve ark., 1997) ve DNA aşılı (Truong-Lee ve ark., 1997) için jelatin nanopartiküller üzerinde yapılan çalışmaların lipozom formülasyonlarına üstünlük sağladığı belirlenmiştir.

Gen taşımada kitozan-DNA nanopartikülleri hakkında da çalışmalar devam etmekte ve ümit verici sonuçlar elde edilmektedir (Roy ve ark., 1998; Mao ve ark., 1997; Roy ve ark., 1997; Mao ve ark., 1996).

1.5. Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10 nm ila 1000 nm (1 μ m) arasında dağılım gösteren, katı kolloidal partiküllerdir. Etkin madde içerisinde çözündürülmüş, hapsedilmiş, enkapsüle edilmiş ve/veya etkin madde yüzeye tutturulmuş veya adsorbe edilmiş olabilir (Kreuter, 1983; Allemann ve ark., 1993; Kreuter, 1992).

Nanopartiküller; nanoküreler ve nanokapsüllere verilen genel addır. Şekil 1.2. de gösterildiği üzere; etkin madde matris yapının yüzeyine adsorbe edilmiş veya matris yapı içerisine hapsedilmiş ise nanoküre adı verilir. Nanokapsüller ise polimerik kabuk ve sıvı bir çekirdekten oluşur. Etkin madde yüzeye adsorbe edildiği gibi çekirdekte çözünmüş halde de bulunabilir (Allemann ve ark., 1993; Kreuter, 1992).



Şekil 1.2. Etkin madde yüklenmiş çeşitli nanopartiküller.

1.5.1. Nanopartiküllerin Taşınması Gereken Özellikler

Lipozomların, hazırlanmalarından kullanımlarına kadar geçen sürede kimyasal ve fiziksel stabilitelerindeki problemleri ve *in-vivo* ortamda göstermiş olduğu bağlanmalar nedeniyle istenen etkiyi oluşturamazlar (Bozkir ve Kocyigit, 1995; Bozkir ve Duman, 1996; Senior ve ark., 1991). Emülsiyon sistemlerinde ise, birçok etkin maddenin yağ damlacıkları ve kan arasındaki dağılımının yüksek olması nedeni

ile, salım çok hızlı gerçekleşmektedir. Buna karşın, polimerik katı partiküllerin birçok avantajı bulunmaktadır:

- Kan düzeyinde ani yükselmeleri önleyerek, verilişten sonra etkin maddenin yan etkilerinin azalmasına, etkinliğinin artmasına neden olur,
- Özellikle mikron boyutunun altındaki polimerik etkin madde taşıyıcıları, salım profilinde modifikasyonlar yapmada olanak sağlar,
- Saklama ve uygulama sırasında nispeten yavaş bozunma gözlenir (Couveur ve ark., 1996; Allemann ve ark., 1993; Demirel ve Yazan, 2000).

Polimerik nanopartiküllerin etkin maddeyi, hücre içerisine yüksek verimde taşıyabilmeleri için bazı özellikleri taşıması gerekmektedir.

- Yeterli etkin madde yükleme kapasitesine sahip olmalı,
- Taşıyıcı makromolekül toksik olmamalı ve oluştuğu monomerik yapı da toksik etki göstermemeli,
- Biyolojik olarak vücutta parçalanabilmeli,
- Etkin maddeyi hedef bölgeye taşıyabilmeli ve etkin maddenin salım hızı kontrol edilebilmeli,
- Saklama sırasında değişmeden kalabilmeli: hızlandırılmış ve zorlama koşullar (stress koşullar) uygulanmadığında, raf ömrü 30°C'nin altında en az bir sene olmalıdır. Ürün dispersiyon halinde saklanıyorsa, agregasyon ihtimali olmamalıdır. Liyofilize toz halinde saklanıyor ise, tekrar dispersiyon haline getirme zamanı ve çözücü miktarı kontrol altına alınmalı, toz halinde iken yaşlanma etkisi gözlenmemelidir. Genelde parenteral uygulandıklarından, sterilitesi sağlanmış olmalı ve iğne ucundan rahat geçerek vücut içerisinde emboli riski yapmamalıdır (Oppenheim, 1986; Allemann ve ark., 1993).

1.5.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Etkin madde yüklü nanopartikülleri hazırlamak için, polimerin ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine uygun yöntemi seçmek gerekir. Formülasyon şartları, polimerik kolloidal sistemin iç yapısını belirlemektedir. Şekil 1.2.'de görüldüğü

üzere oluşan farklı karakterdeki nanoküre veya nanokapsül formlarının *in-vitro* salım davranışları da farklılık gösterir (Alonso, 1996; Kreuter, 1983).

1.5.2.1. Amfifilik Makromoleküllerin Çapraz Bağlanması

Yağ içerisinde su emülsiyonlarında çapraz bağ oluşturulması;

Kramer (1974) tarafından, etkin maddelerin nanoenkapsulasyonunu sağlayan bir teknik olarak geliştirilmiştir. Öncelikle, proteinin (model etkin madde) sulu çözeltisi hazırlanır. Yüksek hızda homojenizatör kullanılarak yağ fazı ile karıştırılarak, emülsiyonu hazırlanır. Yağ içerisindeki su emülsiyonları, yüksek ısıdaki yağ içerisine dökülür ve belirli bir süre sonunda submikron boyutundaki partiküller oluşunca, organik çözücü ile yıkanır ve santrifüj uygulanarak toplanır. Bu teknik ile hazırlama sırasında iki önemli kriter bulunmaktadır, stabilizasyon sıcaklığı ve emülsiyon enerjisi. Stabilizasyon sıcaklığı, yüksek ısıda gerçekleştiği için proteinlerin yapısında bozulmalara neden olabilmektedir. Bundan kurtulmak için glutraldehit gibi kimyasal maddeler ile çapraz bağlar oluşturulur. Aynı zamanda bu tekniğin bir diğer dezavantajı, partiküllerin geniş bir dağılım göstermesidir. Daha dar bir dağılım göstermesi için formülasyonlarda çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır (Alonso, 1996; Akbuga ve Durmaz, 1994; Tian ve Groves, 1999).

Sulu ortamda faz dağılımı esasına bağlı olarak çapraz bağ oluşumu;

pH değerlerinde ve sıcaklık üzerinde yapılan değişikliklerde veya zıt iyon ilavesi ile sulu ortamda faz ayırımı sağlanır. Çapraz bağ oluşturmak için bir kimyasal madde ilave edilir ve nanopartikül saflaştırılır (Alonso, 1996).

1.5.2.2. Monomerlerin Polimerizasyonu

Etkin madde, yüzey etkin madde çözeltisi içerisinde dağıtılır, monomer ilavesi ile ortamda polimerizasyon işlemi sağlanır ve nanoküreler elde edilir. Misel oluşumu sağlandıktan sonra da polimerizasyon işlemi gerçekleştirilir (Alonso, 1996).

Polielektrolit kompleksler oluşturarak da nanoküreler elde edilir. Katyonik polimer olan kitozan, tripolifosfat, trifloroethanol gibi oldukça yüksek negatif yüklü bileşiklerle etkileştirerek, nanoküreler meydana gelir. Nanokürelerin büyüklüğü kitozan ve tripolifosfat konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Oluşan pozitif yüklü partikül, negatif yüklü moleküller için iyi bir taşıyıcı özellik göstermektedir (Calvo ve ark., 1997; Leong ve ark., 1998; Hirose ve ark., 2001; Saka ve Bozkir, 2002b).

1.5.2.3. Polimerin Çöktürülmesi

Bu terimin kullanılma nedeni; çözünmüş olan polimerin, dış fazı oluşturan çözünemediği faz ile dispersiyon oluşturmaya bağlı olarak nanokürelerin ortamda çökmesine neden olmasıdır. Genelde iç faz hidrofobik polimer içeren organik çözücülerden, dış faz ise stabilizan içeren su fazından oluşur (Alonso, 1996; Allemann ve ark., 1993).

Çözücü-Buharlaştırma Tekniği;

Bu yöntem ilk olarak 1981 yılında poli(D,L-laktik asit) nanoküreleri hazırlamada kullanılmış (Gref ve ark., 1994), birçok uygulamaları yapılmıştır. Daha sonra bu yöntem poli(D,L- laktik-ko-glikolid) için modifiye edilmiştir (Kreuter, 1983). Organik faz içerisinde çözündürülen polimere, BSA ilavesi yapılarak, karıştırılarak, yüzey etkin madde içeren su fazı ile emülsiyon oluşturulmuştur. Organik çözücü buharlaştırma ile ortamdan uzaklaştırılmıştır (Spiers ve ark., 1999). PLGA'nın farklı oranları kullanılarak faktoriyel deney tasarımı yapılmış, farklı yüzey etkin madde ve organik faz miktarı incelenmiştir. Parenteral uygulama için uygun olmayan poli-vinil alkol yerine pluronikler kullanılmıştır. Partiküllerin büyüklüğünün; yüzey etkin madde tipine ve polimer-yüzey etkin madde oranına bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur (Bozkir ve Saka, 2001).

Çözücü-buharlaştırma tekniği daha çok polimer çözeltisinde çözünen, lipofilik etkin maddenin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Modifikasyonlarla protein gibi amfilik özellik gösteren maddeler de kullanılmaktadır (Alonso, 1996; Calvo ve ark., 1997).

Nanoçöktürme (nanoprecipitation) metodu;

Bu yöntemde organik faz, iç su fazında tamamen çözünür. Bu nedenle buharlaştırma veya çözücü ekstraksiyonu gibi yöntemlere gerek kalmadan nanoküreler ortamda çöker. Polar olmayan çözücü içerisindeki polimer ve yarı-polar özellikteki çözücüdeki etkin maddenin karıştırılması ile yarı-polar çözücü organik fazın iç su fazında dağılımını kolaylaştırarak etkin maddenin organik fazda çözünmesini sağlar ve polimer-etkin madde yapısının hemen çökmesine sebep olur (Alonso, 1996; Gref ve ark., 1996).

Nanoçöktürme yöntemi ile, hidrofobik özellikteki polimer içerisine hem hidrofobik hemde hidrofilik etkin maddeleri enkapsüle etmek mümkün olmaktadır. Çünkü, etkin maddeleri çözecek çözücü hem polar hemde polar olmayan gruplardan seçilebilmektedir. Polimerizasyon veya çapraz-bağ oluşturma yöntemlerinde, etkin madde ile monomer yapı arasında olabilecek reaksiyonlar, çapraz bağlar ve ortamda kalan monomer ve istenmeyen çapraz bağların potansiyel toksik etkileri nedeniyle nanoçöktürme yöntemi bir üstünlük sağlamaktadır (Alonso, 1996).

1.6. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler

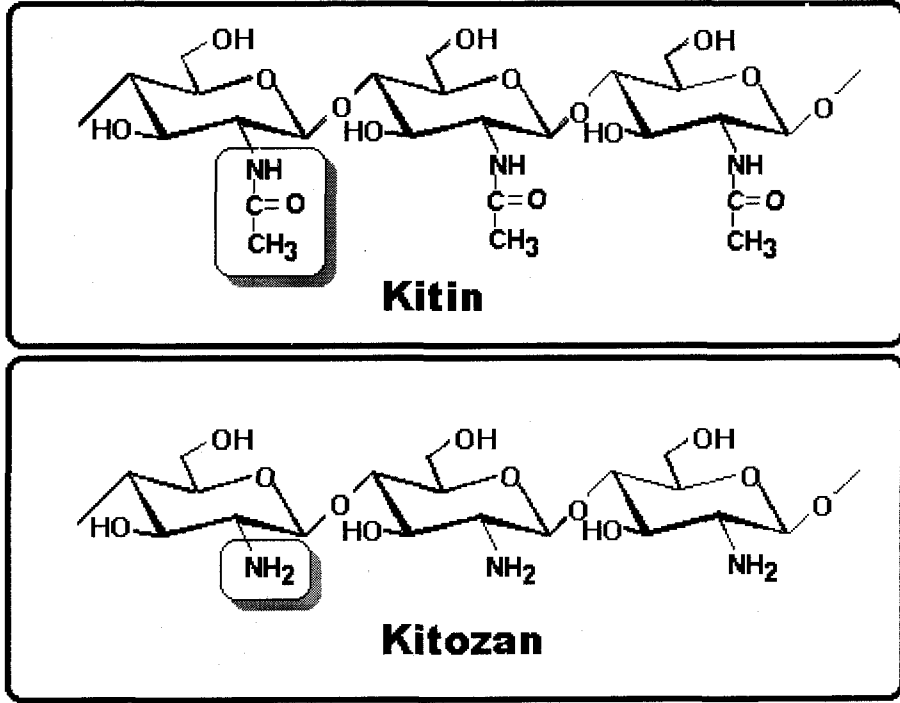
Kitozan, ilk kez 19. yüzyılın ortalarında organik asitlerde eriyebilen kitinin derişik potasyum hidroksit çözeltisinde kaynatılması ile elde edilmiştir. 1894'te Hoppe-Seyler modifiye kitin üzerinde araştırmalar yapmış ve oluşan yeni polimere kitozan ismini vermiştir (Vanson, 2000b) . Kitozan, son zamanlarda, farmasötik teknolojide selülozdan sonra en çok kullanılan doğal polisakkarit olmuştur (Kas, 97; Singla ve Chawla, 2001; Erden ve Çelebi, 1990).

Yengeç, karides ve istakoz gibi eklembacaklıların kabuklarının ve kısmen bazı mikroorganizma ve mantar türlerinin dekalsifikasyonu ile elde edilen, selüloz benzeri bir polisakkarit olan kitinin [(1-4)-2-asetamido-2-deoksi β -D, glukoz] alkali ile N-asetilasyonu sonucu elde edilmektedir. Biyopolimerik yapı gösteren ve doğada yaygın olarak bulunan kitin, suda ve birçok organik çözücülerde çözünmeyen, hidrofobik bir madde olduğundan, kitozan şeklinde kullanılır (Kas, 97; Singla ve Chawla, 2001)

1.6.1. Kitozanın Yapısı ve Elde Edilmesi

Hidrofilik biyopolimer olan kitozan, β (1-4) 2-amino-2deoksi-D-glukoz yapısında, kitinin alkali ortamda aminoasetil grubunun hidrolize edilmesiyle elde edilen şeklidir (Şekil 1.3).

İyice yıkanmış olan eklembacaklıların kabukları, kitozan verimini artırmak üzere kimyasal işlemlerden önce öğütülür. Kabuklardaki kitin ekstraksiyonundaki en önemli aşama, protein ve kalsiyum karbonat / kalsiyum fosfat gibi inorganik minarellerin sırasıyla önce alkali (NaOH), sonra asitle (HCl) muamele edilerek uzaklaştırılmasıdır. Yıkayıp kurutularak elde edilen kitin bir ara madde olarak saklanabilir. Kitinin yüksek sıcaklıkta, 1-2 saat boyunca konsantre sodyum hidroksitle muamelesi, yani deasetilasyonu sonucu kitozan elde edilir. Son basamağın tekrarlanması durumunda ise, yüksek deasetilasyon derecesinde kitozan elde edilir (Singla ve Chawla, 2001). Kitozanın suda çözünebilir şekli, uygun bir organik asitle muamelesinden elde edilir. Elde edilen kitozan tuzları, suda çözünür ve çözünürlük deasetilasyon derecesine bağlı olarak artar (Illum, 1998; No ve ark., 2000).



Şekil 1.3. Kitin ve kitozan'ın kimyasal yapıları.

1.6.2. Kitozanın Fiziko-Kimyasal Özellikleri

Kitozan görünüş olarak beyazdan-krem rengine, pul şeklinden ince toz haline kadar farklı partikül büyüklüğüne sahip, berrak açık sarı renkli çözelti oluşturan bir maddedir (Sigma, 2000).

Kitozan, kitinin deasetilasyonundan hazırlandığı için, molekül ağırlığı kitine göre düşüktür ve üretim koşullarına bağlı olarak farklılık gösterir (50–2000 kDa). %1'lik asetik asit çözeltisi içindeki %1 kitozan çözeltisi molekül ağırlığına da bağlı olarak geniş bir vizkosite aralığı gösterir (<2000 mPa.s). Poly-D-glukozamin formülündeki kitozanın, glukozamin grubunun mol fraksiyonu olarak tanımlanan deasetilasyon derecesi ise % 40-98 arasında değişmektedir (Illum, 1998).

Kitozan, alkali ve nötral pH'larda çözünmez. Asetik asit, propiyonik asit ve laktik asit gibi organik asitli ortamlarda hatta konsantre formik asitte oldukça yüksek oranda çözündüğü, kitozan-asit konsantrasyonuna bağlı olarak, hidroklorik asit, perklorik asit ve nitrik asit gibi mineral asitlerde kısmen çözündüğü, ancak sülfürik

asit ve fosforik asitlerde çözünmediği bildirilmektedir (No ve ark., 2000; Singla ve Chawla, 2001).

Kitozanın polimerik yapısındaki amin grupların organik asitler ile muamele edilmesiyle, proton kazanmasına bağlı, pozitif yüklü çözeltiler meydana gelir. Yani; kitozanın zayıf bir baz olduğu düşünülürse, glukozamin birimlerini pozitif yüklü suda çözünebilen şekle dönüştürebilmek için uygun miktarda organik asit ilavesi gerekir. En çok kitozan glutamat ve kitozan klorür tuz formları oluşur. Kitozan tuzlarının çözünürlüğü yüksektir, fakat ortama tuz ilavesiyle çözünürlük düşmektedir.

Deasetilasyon derecesi de çözünürlük üzerine etki göstermektedir. %40 deasetilasyon derecesine sahip kitozanın, çözünürlüğünün pH 9'lara vardığı, diğer taraftan %85 deasetilasyona sahip kitozanın pH 6.5'a kadar çözünürlük gösterdiği belirtilmiştir (Illum, 1998; Singla ve Chawla, 2001).

1.6.3. Kitozanın Farmakolojik Özellikleri

Kitozan, biyolojik olarak geçimlidir ve biyolojik olarak parçalanabilir. Lizozomlarda parçalanabilen ve parçalanma ürünleri çok düşük toksik özellik gösteren doğal bir polisakkarittir. Sıçanlarda oral LD₅₀ değeri 16g/kg, farelerde intraperitoneal LD₅₀ değeri 350 mg/kg'dan daha fazladır (Erden ve Celebi, 1990; Zieba ve Knapczyk, 1988; Illum, 1998). Bu değer tuz ve şekerin letal dozlarıyla aynıdır.

Kitozanın, yara iyileştirici ürün olarak, TegaserbTM adı altında 3M tarafından üretilen piyasa preparatı bulunmaktadır. Kitozan, barsak ortamında gerçekleşen lipid geçiş mekanizmasında, pozitif yüküne bağlı olarak kolesterol ve safra tuzlarına bağlanarak karışık misel oluşumunu önler ve bunun sonucunda ise yağ emilimi engellenir (Illum, 1998). Bu özelliğine dayanarak özellikle Uzakdoğu pazarında birçok diyet ürünün formülasyonunda yer alır. Ayrıca kitozanın düşük düzeyde antienflamatuvar, antikanserojenik ve heparinik aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Antiasit ve antiülser etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Erden ve Celebi, 1990;

Zieba ve Knapczyk, 1988; Felt ve ark., 1998). Kitozan gibi katyonik polimerlerin, hafif alkali ve nötral ortamlarda mukoadhesif özelliği sebebiyle insanlarda mantar oluşumunu engellediği, dolayısıyla antifungal ve antimikotik formülasyonların etkisini artırdığı görülmüştür. (Pavanetto ve ark., 1996). Düşük molekül ağırlıklı kitozanın silia hareketlerini aktive ettiği de kaydedilmiştir (Lubben ve ark., 2001; He ve ark., 1998).

1.6.4. Kitozanın Uygulama Alanları

Doğal bir polimer olan kitozan, farklı dallardaki araştırmacıların dikkatini çekmiş ve çeşitli alanlarda kullanımı gerçekleştirilmiştir. Kitozanın genel uygulamadaki farklı endüstri dalları ve amaçları Tablo 1.3.'te özetlenmiştir (Erden ve Celebi, 1990; Vanson, 2000a, Shahidi ve ark., 1999; Pavenetto ve ark., 1996; Felt ve ark., 1998).

Tablo 1.3. Kitozanın genel kullanım alanları

Kozmetik sanayii	- Pudra - Nemlendirici - Saç ve cilt bakım ürünleri - Banyo losyonu
Tarım	- Ürün verimini artırmak - Tohum kaplanması - Pestisid ve herbisit formülasyonlarında
Hayvancılık	- Hayvan yem katkısı
Çevre mühendisliği	- Atık su arıtımı - Zehirli madde ve artıkların arıtımı - Radyoaktif madde arıtımı
Gıda Mühendisliği	- Besin koruyucu - Renk stabilite artırıcı - Şarap ve meyvesuyu saflaştırılmasında - Kolesterol düşürücü
Medikal	- Bandaj / sünger - Yapay kan damarı - Kan kolesterol kontrolü - Yapay deri
Kağıt ve tekstil sanayii	- Yüzey düzeltici - Fotoğraf kağıdı - Karbonsuz kopya kağıdı
Analitik yöntemler	- Protein saflaştırması - Canlı hücre ve enzimlerin immobilizasyonu - Protein, aminoasit, boya ayrıştırılması
Diş hekimliği	- Protez ve dolgu materyali

1.6.4.1. Kitozanın Farmasötik Teknolojide Kullanımı

Tablet teknolojisinde direkt basım ajanı olarak, %50 oranında kitozan ilavesi tabletlerin dağılıma hızını artırmıştır. Kitozanın deasetilasyon derecesinin, tabletlerin nem absorpsiyonunda etkili olduğu bildirilmiştir. Tablet dağıtıcısı olarak etkinliği; partikül büyüklüğü, kristalizasyon derecesi ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak, (%5'in üzerinde ilave edildiğinde) mısır nişastası ve mikrokristalize selüloza karşı üstünlük göstermiştir. Ayrıca sodyum karboksimetil selüloz ve metilselüloza göre daha iyi bir bağlayıcı olduğu belirtilmiştir (Illum, 1998). Fakat basılabilirlik ve akışkanlık özellikleri zayıftır (Singla ve Chawla, 2001).

Kitozan, tek değerlikli polimerik katyonik karakter ve jel veya film yapma özelliklerine bağlı olarak kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinde yüksek bir potansiyele sahiptir. Etkin maddenin ilaç uygulama miktarı ile terapötik etkiyi gösteren zamanı uzatması üzerindeki kontrolü ve belkide hedeflemede seçicilik sağlaması diğer maddelere üstünlük sağlamaktadır (Illum, 1998). Birçok araştırmada kitozan; mikrogranülasyon sistemleri, sürekli salım matrisleri, aşınabilen matris yapıları ve kontrollü salım sağlayan jel sistemleri, mikroküre ve mikrosünger yapılarında ilaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanmıştır (Felt ve ark., 1998; Erden ve Celebi, 1990; Jameela ve ark., 1996; Calvo ve ark., 1997; Lim ve ark., 2000).

Kontrollü salım yapmak amacıyla kitozandan, çözücü buharlaştırma tekniği, çoklu emülsiyon yöntemi, çöktürme yöntemi, kompleks oluşturma ile hazırlama, ekstrüzyon/sferinizasyon, püskürterek kurutma yöntemi veya iyonotropik jelasyon yöntemlerinden biri kullanılarak mikropartiküler yapılar elde edilir (Kas, 1997).

Kitozan mikrokürelerinin hazırlama teknikleri ve salım kinetikleri oldukça fazla incelenmiştir. Ağrı kesici grubundan; diklofenak sodyum (Acikgöz ve ark., 1996), diüretiklerden; furosemid (Akbuga ve Durmaz, 1994) ve kanser tedavisinde; sisplatin (Nishioka ve ark., 1990) gibi oldukça geniş bir etkin madde grubu ile araştırmalar yapılmıştır.

1.6.4.2. Kitozanın Farmasötik Biyoteknolojide Kullanımı

Kitozan ile DNA arasında iyonik bağlanmalar oluşarak (elektrostatiksel olarak) nanoboyutlarda polimer-DNA kompleksleri hazırlanabilmesi nedeniyle, bölüm 1.4.2.1.2'de adı geçen non-viral taşıyıcılar için uygun bir seçenek olarak görünmektedir. Gen taşıyıcı olarak kullanımında bazı avantajlar oluşturmaktadır;

- Hedeflemeyi gerçekleştirecek ligandların nanoküre formülasyonlarına bağlanmalarını sağlaması,
- Reseptör aracılığı ile endositoz mekanizmasını uyarması,
- Endozomal ve lizozomal kompartmanlarda, lizozomolitik maddeler ile birleşerek, DNA'nın degradasyonunu azaltması,
- Diğer biyoaktif maddelerle birden çok plasmidi hapsedebilmesi,
- Polimer matris içerisindeki DNA'yı, serum nükleaz yıkımından koruması,
- Aktivitede kayıp olmadan, nanokürelerin saklanması için liyofilizasyon işleminin yapılmasına olanak sağlaması (Leong ve ark., 1998).

Gen taşıyıcı olarak kitozan, lipozom (Gregoriadis ve ark., 1996), mikroküre (Jameela ve ark., 1996; Ishii ve ark., 2001) ve nanoküre (Richardson ve ark., 1999; Leong ve ark., 1998; Lee ve ark., 2001; Cui ve Mumper, 2001; Lubben ve ark., 2001; Mao ve ark., 2001) formülasyonları olarak hazırlanmış ve etkileri incelenmiştir. DNA-kitozan nanoküreleri 100 ila 750 nm boyutları arasında elde edilmiş, bu yapıların etkin bir şekilde çeşitli epitel hücre kültürlerine gen aktarımı incelenmiştir. %10 oranında serum içeren ortamlarda dahi etkin bir gen aktarımı gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Mao ve ark., 2001; Thanou ve ark., 2002; Ishii ve ark., 2001). Genetik bağışıklama çalışmalarında kitozan, geleneksel aşılama göre; pDNA'nın stabilitesini yüksek oranda koruması, düşük maliyeti, viral aşılara göre enfeksiyon riski taşıyamaması, bir plazmid üzerine birkaç antijen hedefleme kapasitesine sahip olması ve hem humoral hemde hücresel yanıt oluşturabilmeleri açısından üstünlükleri bulunmaktadır. Kitozanın katyonik özelliğine bağlı olarak Peyer plağından geçiş sağlaması nedeniyle mukozal aşılama çalışmalarında ümit verici sonuçlar elde edilmiştir (Cui ve Mumper, 2001; Lubben ve ark., 2001). Ayrıca çeşitli amino asit, antithrombotik maddeler, fibroblast, interlökin 2, monoklonal antikor ve

insülin içeren kitozan formülasyonları üzerinede çalışmalar yapılmıştır (Kas, 1997; Singla ve Chawla, 2001; Illum, 1998; Calvo ve ark., 1997; Tokura ve ark., 1987).



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Materyal Listeleri

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-merkaptetanol	Sigma
Agar	Bacto
Agaroz	Fluka
Ampisilin	Mustafa Nevzat İlaç Sanayi
Bromfenol mavisi	Sigma
Dimetildioktadesilamonyum (DDAB)	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat (susuz)	Merck
Disodyum hidrojen fosfat.7H ₂ O	Merck
Etanol	Merck
Etidyum bromür	Sigma
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Merck (Titriplex III®)
Fenol fitalein	Riedel
Fosforik asit	Merck
Glasiyel asetik asit	Merck
Gliserol	BDH Chemicals
Glukoz	Merck
Iyodoasetik asit	Sigma
Kitozan (HMW)	Fluka
Kitozan (LMW)	Fluka
Kitozan (MMW)	Fluka
Kloroform	Merk
Magnezyum sülfat	Merck
Maya Ekstresi	Oxoid
Mc Conkey agar	Oxoid
o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozit (ONPG)	Sigma

Poli-L-lizin	Sigma
Potasyum asetat	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Potasyum klorür	Merck
Sodyum dodesil sülfat	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Merck
Sodyum sülfat	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat.H ₂ O	Merck
Tripton	Baltimore Biological Laboratory (Trypticase®)
Tris(hidroksimetil)amino metan	Sigma (Trizma® Baz)
Tris.HCl	Sigma

2.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler

DNA Molekül Ağırlık Standartları	Sigma
DNaz I	Sigma
E.coli ATCC 25922 Bakteri Suşu	Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü
E.coli ATCC 35218 Bakteri Suşu	Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü
Kitozanaz Enzimi	Sigma
pSV-β-Galaktosidaz Kontrol Vektör	Promega

2.1.3. Kullanılan Malzemeler

Dio-Transquick® Transformasyon Sistemi	Diomed
DNaz ve RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpler	USA Scientific
Pipet uçları	Dateks
Wizard® Plus Maxipreps DNA Saflandırma Sistemi	Promega

2.1.4. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

- 45°C Dondurucu	Heto
- 70°C Dondurucu	Snijders Scientific
Açılımlı Rotara Sahip Santrifüj	Sigma 4K15
Cam malzemeler	İldam
Elektroforez Güç Kaynağı	E-C-Apparatus Corporation
Etüv	Heraeus
Kesintisiz Güç Kaynağı	Gemla
Laminar Flow Cihazı	Birleşik Alman İlaç Firması
Liyofilizatör	Labconco Freeze Dry System
Manyetik Karıştırıcı	Stuart Scientific
Mikro pipet 10-100 µL	Pipet-lite
Mikro pipet 1-10 µL	Pipet-lite
Mikro pipet 200-1000 µL	Kartell
Mikrosantrifüj	Hermle 2-160M
Optik mikroskop	Olympus B201
Otoklav	Hiclave HV-85
Örnek Kaplama Cihazı (SEM analizi için)	Polaron E5100
Partikül Büyüklüğü Ölçeri	Malvern Mastersizer 2000
pH-metre	Meter Lab
Taramalı Elektron Mikroskobu	Jeol JSM 840-A
Teraziler	Sartorius, Mettler H10
Ubbelohde Kılcal Viskozimetre	Jena ^{er} Glas
Vakum Pompası	Emerson
Vortex Karıştırıcılar	Lab-line Instruments, Nüve NM-110
Yüksek Devirli Santrifüj	Sorvall Superspeed Centrifuge SS-3(A)
Zeta Potansiyeli Ölçeri	Malvern Zetasizer 3000 HS-a

2.2. Yöntem ve Deneyler

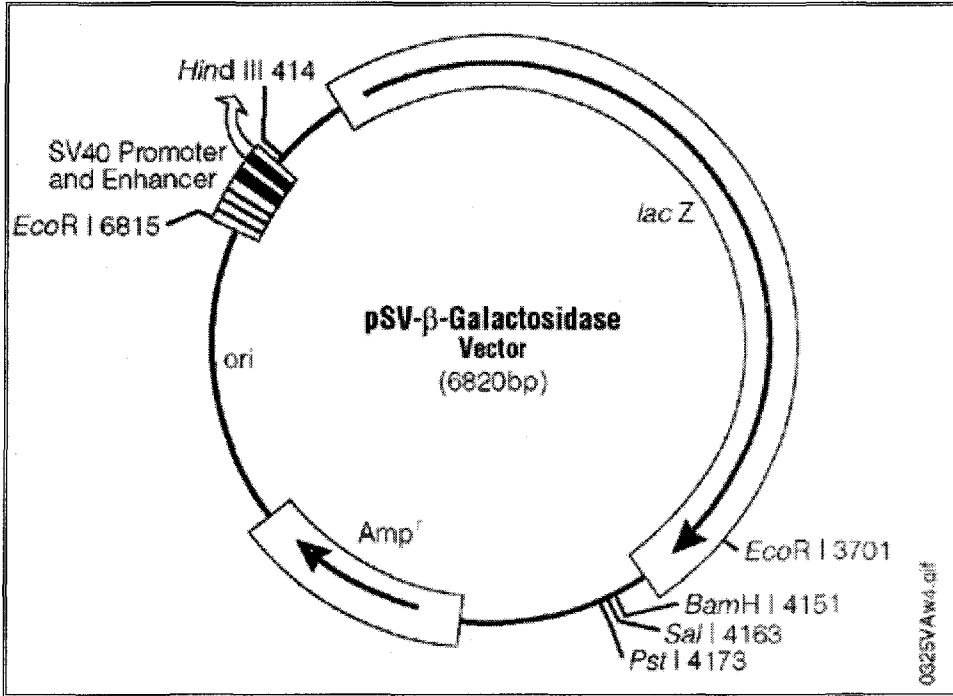
2.2.1. Plazmid DNA'nın ve E.coli Hücrelerinin Seçimi

Gen aktarımı için üzerinde β -galaktosidaz ve ampisilin direnç genleri taşıyan, yüksek kopya sayısına sahip, plazmid “pSV- β -Galactosidase” vektörü seçilmiştir.

pSV- β -Galactosidase vektörü, memeli hücrelerine aktarımını izlemeyi sağlayan pozitif kontrol vektörüdür. β -galaktosidaz enzimini kodlayan lacZ gen bölgesinin yüksek derecede üretimini sağlayan SV40 promotor ve artırıcı (enhancer) diziler içermektedir (Şekil 2.1). β -galaktosidaz mükemmel bir belirleyici enzimdir. Hücre ortamından alınan örnekler hızlı ve direkt olarak spektrofotometrik, floresans ve kemiluminesans yöntemleriyle tayin edilebilmektedir. Bu belirleyici enzim *in situ* histokimyasal analizlerde de sıklıkla kullanılmaktadır (Promega, 1999).

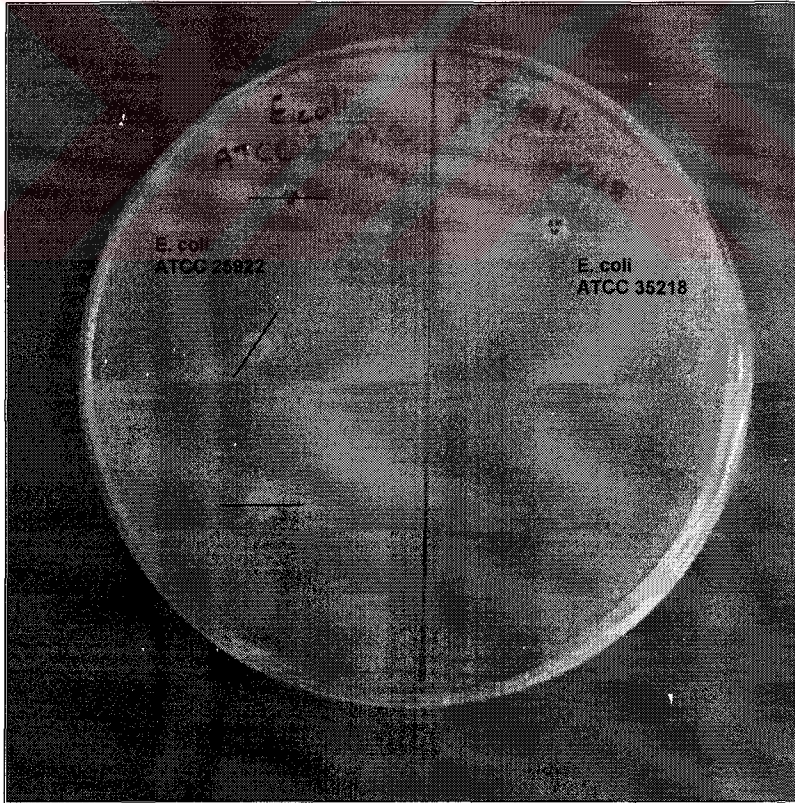
Bu plazmid vektörü, SV40 bölgesi içeren pRSV- β -Gal ile pUC18 plazmidlerinin rekombinasyonu ile hazırlanmıştır. Bu plazmid vektörünün E.coli hücrelerinde ürettirmiş olduğu β -galaktosidaz enzimini, aktarmayı düşündüğümüz COS (böbrek epitel hücreleri) hücrelerinde diğer hücre kültürlerine göre 10 kat daha yüksek aktivitede ürettiği bildirilmektedir (Promega, 1999).

Konakçı hücrenin seçiminde, pDNA'nın taşımış olduğu ampisiline karşı direnç sağlayan (Amp^r) geni taşıyan bakterinin ampisilinli ortamdaki üreyebilme yeteneği esas alınarak tercih yapılmıştır. Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edilen iki ayrı ATCC 25922 (RSKK 97022) ve ATCC 35218 (RSKK 95069) E.coli suşlarının ampisilin içeren diskler varlığında ekimi yapılmış ve ampisilin içeren ortamda üreme gözlenmeyen ATCC 25922 suşunun (Şekil 2.2), pDNA aktarımını analitik yöntemlere gerek kalmadan gözlemleyebileceğimizden tercih edilmiştir.



Şekil 2.1: pSV-β-Galactosidase vektörünün haritası.

(www.promega.com/figures/frame.asp?fn=0325va adresinden alınmıştır.)



Şekil 2.2. E.coli suşlarının (ATCC 25922 ve ATCC 35218) ampisilin içeren diskler varlığında üremeleri.

Çalışma için gerekli olan plazmid aşağıdaki protokoller uygulanarak elde edilmiştir.

2.2.1.1. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid üretimindeki tüm aşamalarda kullanılan madde ve malzemenin steril olmaları sağlanmıştır. Cam malzemeleri alkol çözeltisinden geçirilerek yüksek ısı altında (200°C 'de 2 saat süre ile ısı fırınlarında) veya su buharı ile basınç altında (120°C 'de 20 dakika) sterilizasyonları sağlanmıştır. Yüksek ısıya dayanamayacak madde ve malzemeler ise steril olarak temin edilmiştir.

2.2.1.1.1. Plazmid DNA Taşıyan Kültür Ortamlarının Oluşturulması

Ampisiline karşı duyarlı olan ATCC 25299 E.coli hücrelerine, pSV- β -Galactosidase aktarımını hızlı ve kolay bir prosedürle gerçekleştirmek için Diomed firmasının "DNA Transformation Kit (Dio-Transquick®)" kullanılmıştır.

pDNA üretimine başlanmadan önce buz banyosu ve 42°C 'lik su banyosu hazırlanmıştır. Ayrıca Luria-Bertani (LB) besiyeri bir gün önceden hazırlanıp, gece boyunca inkübasyona bırakılarak, kontaminasyon olmadan hazırlandığı kontrol edilmiştir.

LB sıvı besiyeri;

Tripton	10 g
Maya Ekstresi	5 g
Sodyum klorür	10 g
Distile suy.m.....	1000 mL (Becker ve ark., 1990)

Katı besiyeri hazırlamak için reçeteye % 1.5-3 oranında agar ilavesi gerekmektedir (Bilgehan, 2002). Ampisilin direnç geni taşımayan bakterilerin üremesini engellemek için ortama $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ampisilin ilavesi gerekmektedir.

- 1- Belli miktarda (10-15 mL) LB sıvı besiyeri içeren 50 mL'lik steril tüpe, taze üretilmiş E.coli kültür plağından bir koloni ekilmiş ve 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 2- Gece boyunca inkübasyona bırakılmış 300 µL bakteri kültürü, 15 mL taze sıvı LB'de yaklaşık 2 saat boyunca 37°C'de bulanıklık (0.5*1 Mc Farland) oluşuncaya kadar inkübe edilmiştir.
- 3- 1.5 mL taze kültür, mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve oda ısısında, 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 4- Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet üzerine kit içerisinde bulunan, 1 mL "Çözelti A" ilave edilmiş, vorteks karıştırıcı ile tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.
- 5- Tekrar oda ısısında, 1 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 200 µL "Çözelti A" ilave edilip, vorteks karıştırıcı ile süspansiyon edilmiştir.
- 6- 20 µL hacim ve 10 µg miktar pDNA ortama ilave edilmiştir.
- 7- İyi karıştırılan tüp ilk önce 15 dakika (10-30 dakika arasında) buz üzerinde, sonra 42°C'lik banyoda 1.5 dakika ve tekrar 3 dakika boyunca buz üzerinde tatbik edilmiştir. Bu şok uygulamasıyla DNA'nın hücre çeperinden geçişi kolaylaşmıştır.
- 8- Oda ısısında, 1 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve kit içerisinde hazır bulunan, 500 µL "Çözelti B" ilave edilip, vorteks karıştırıcı ile süspansiyon haline getirilmiştir.
- 9- Tekrar oda ısısında, 1 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 200-500 µL ampisilin içeren (100µg/mL) sıvı LB besiyerinde gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 10- Plazmid taşıyan kolonileri, işlem görmemiş kolonilerden ayırt etmek için elde edilen 50 µL kültür, ampisilin içeren katı LB besiyerine tek koloni elde edecek şekilde yayılmış ve 37°C'lik etüvde bir gece boyunca üremeye bırakılmıştır.

2.2.1.1.2. Alkali ile Lizis Metoduyla Plazmid DNA Eldesi

Steril santrifüj tüpüne 5 mL ampisilin içeren sıvı LB besiyerine, Bölüm 2.2.1.1.1.'de elde edilen kültürden tek koloni olarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen taze kültürden 1.5 mL alınarak mikrosantrifüj tüpünde 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış ve işlem kuru pelletler üzerinden yapılmıştır. Sambrook ve arkadaşlarının (1989) belirtmiş olduğu alkali ile lizis metoduna dayanarak çift sarmal DNA elde edilmiştir.

Tablo 2.1 Alkali ile lizis işlemi için gerekli çözeltiler.

İçerik	Miktar /10 mL	Koşulları
Çözelti I		
Glukoz 50 mM	90 mg	En fazla 100 mL hazırlanarak, +4°C’de saklanmalıdır.
Tris.Cl (pH 8.0) 25 mM	39 mg	
EDTA (pH 8.0) 10 mM	37 mg	
Çözelti II		
Sodyum hidroksit 0.2 N	80 mg	Kullanımdan önce taze hazırlanmalı.
Sodyum dodesil sülfat % 1	100 mg	
Çözelti III		
Potasyum asetat (5 M) 60.0 mL	6.00 mL	+4°C’de saklanmalıdır.
Glasiyel asetik asit 11.5 mL	1.15 mL	
Distile su 28.5 mL	2.85 mL	

1. Elde edilen pellet halindeki bakteri çökeleği üzerine buz üzerinde soğutulmuş 100 µL Çözelti I eklenerek, vorteks karıştırıcı kullanarak karıştırılmıştır.
2. Üzerine 200 µL Çözelti II eklenmiş ve tüpler beş kez ters-düz edilerek karışması sağlanmıştır. Karışım, buz üzerinde şeffaf ve viskoz bir hal alana değin bekletilmiştir.
3. Elde edilen viskoz bakteri lizatı ile 150 µL'lik soğuk Çözelti III eklenerek, tamamen karışması sağlanmıştır.

4. Son karışım, buz üzerinde 5 dakika bekledikten sonra, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır.
5. Süpernatant, temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve eşit hacimde fenol:kloroform (1:1 h/h) karışımı eklenerek ve vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır.
6. 2 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
7. Mikrosantrifüj tüp üzerine, 2 kat hacimde etanol ilave edilmiş ve 2 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanmıştır.
8. Süpernatant uzaklaştırılmış, elde edilen çift sarmal DNA çökeltisi oda ısısında kurutulmuştur.
9. Kuru halde elde edilen DNA, 1 mL %70'lik etanol ile muamele edilerek, +4°C'de 10 dakika bekletildikten sonra, 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
10. Çökelti üzerine, 20 µg/mL ribonükleaz içeren 50 µL Tris-EDTA (10:1 h/h) tamponu ilave edilmiş ve vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır.
11. İzole edilen DNA kullanılabilecek kadar -45°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.1.1.3. Saflaştırma Kiti ile Plazmid DNA Eldesi

Steril santrifüj tüpüne 5 mL ampicilin içeren sıvı LB besiyerine, Bölüm 2.2.1.1.1.'de elde edilen kültürden tek koloni olarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Protokole bağlı olarak izolasyon gerçekleştirilmiştir.

- 1- 5 mL'lik sıvı kültürden 1 ml alınıp, 500 mL'lik ampicilin içeren sıvı LB besiyerine aktarılmış ve 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 2- Kültüre santrifüj uygulanmış ve elde edilen pellet hücreler üzerine 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA ve 100 µg/mL ribonükleaz A içeren çözeltide yavaşça karıştırarak, süspand edilmiştir.
- 3- Lizis tamponu ilave edilmiş ve hücre yıkımı tamamlandıktan sonra (çözelti berrak ve viskoz oluncaya kadar) nötralizasyon çözeltisi ilave edilmiştir. 14.000

- rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek kromozomal DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. 0,2 µm'lik membran filtreden süzülerek çöken kromozomal DNA uzaklaştırılmıştır.
- 4- Süpernatant üzerine yarısı kadar izopropanol ilave edilmiştir.
 - 5- Oda ısısında 14.000 rpm'de santrifüj ederek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
 - 6- Tris-EDTA tamponu ilave edilmiş ve vorteks karıştırıcı ile süspansiyon hâle getirilmiştir.
 - 7- DNA saflaştırma reçinesi ilave edilmiş ve vakum uygulanarak kit içerisinde bulunan, kolon içine aktarılmıştır.
 - 8- Kolon, kolon yıkama çözeltisinden ve %80'lik etanolden sırası ile geçirilmiş ve vakum uygulanarak kurutulmuştur.
 - 9- Kolon 2.500 rpm'de santrifüj edilmiştir. 65-70°C'ye ısıtılmış Tris-EDTA tamponu ilave edilmiş ve tekrar santrifüj uygulanmıştır.
 - 10- İzole edilen pDNA kullanılmaya kadar -45°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.1.2. Plazmid DNA Saflık ve Miktar Tayini

Elde edilen pDNA çözeltilerinin saflık ve konsantrasyon belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

DNA molekülü 260 nm dalga boyunda maksimum absorbanı göstermekte iken DNA'nın proteinler varlığındaki maksimum absorbanı 280 nm dalga boyuna kayma göstermektedir. Bu verilerden yararlanarak 260 nm / 280 nm'deki optik dansite (OD) oranı hesaplanarak, DNA çözeltisinin saflığı saptanmaktadır. İyi bir saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş pDNA çözeltisinde bu oran 1.8 – 2.0'dir.

20 µl DNA çözeltisi, 1980 µl deiyonize su ile seyreltilerek 260 ve 280 nm'deki OD oranı belirlenmiştir. 1 OD'nin 50 µg/mL çift sarmal DNA'ya eşdeğer olduğu bilinmektedir (Sambrook ve ark., 1989; Lee ve ark., 2001). 260 nm'deki ölçüm nükleik asit konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır. Konsantrasyon hesabı eşitlik 2.1 de verilmektedir.

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$$

(Eşitlik 2.1)

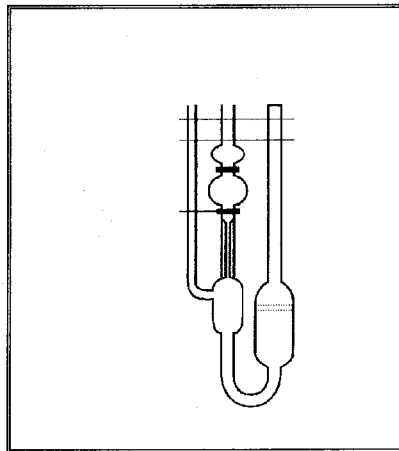
2.2.2. Kitozanın Deasetilasyon Derecesinin Tayini

Kitozanın sahip olduğu molekül ağırlığının, etkin maddeyi hapsetme oranı ve in vitro ortamda salım profillerine etki gösterdiği bildirilmektedir (Genta ve ark., 1998; Lee ve ark., 2001; Richardson ve ark., 1999). Kitozanın özelliklerinden biri olan deasetilasyon derecesinin de, çözünürlük (Illum, 1998; No ve ark.,2000; Singla ve Chawla, 2001) ve gen aktarım etkinliği üzerinde oldukça etkili bir parametre olduğu ayrıca partiküler yapı oluşturduğunda stabilitede etkin rol oynadığı belirtilmektedir (Kiang ve ark., 2002).

Kitozanın temin edildiği firma tarafından eksik verilen deasetilasyon derecesini tayin etmek için,

- Kapiller-viskozimetre
- H-NMR
- IR-spektroskopik metod
- Titrasyon
- Birinci derece türev UV spektrofotometre
- Enzimatik metodlar (Saka ve Bozkir, 2002a; Sabnis ve Block, 1997; Win ve Stevens, 2001; Kiang ve ark., 2002) uygulanmaktadır.

Araştırmamızda kullandığımız kitozanların deasetilasyon derecelerini tayin etmek için uygulaması kolay ve ucuz olan, kapiller viskozimetre ve titrasyon ile tayin yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 2.3. Ubbelohde kapiller viskozimetresinin şematik görüntüsü

2.2.2.1. Deasetilasyon Derecesinin Kapiller Viskozimetre ile Tayini

0.1 M asetik asit ve 0.2 M sodyum klorür çözeltisi içerisinde, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan kitozan (%1, %0.5, %0.25, %0.1) çözeltilerinin Ubbelohde kapiller viskozimetresi kullanılarak (Şekil 2.3.) akış süreleri ölçülmüş, sekiz paralel akış süresinin ortalamaları hesaplanmıştır.

Poise cinsinden elde edilen değerler, mPa (mili paskal) değerine çevrilmiştir (Eşitlik 2.2.). Her bir konsantrasyon için okunan viskozite değeri (η), kitozan içermeyen çözücü ortamının viskozite değerine (η_0) bölünmüş (η_r =relatif viskozite) ve 1'den çıkartılmıştır (spesifik viskozite) (Eşitlik 2.3.). Spesifik viskozitenin konsantrasyona bölünmesiyle elde edilen değerler grafiğe geçirilerek intrinsik viskoziteleri bulunmuştur.

$$1 \text{ poise (P)} = 0.1 \text{ Pa.s} = 100 \text{ mPa.s}$$

Eşitlik 2.2.

$$(\eta / \eta_0) - 1 / C = \eta_{sp} / C$$

Eşitlik 2.3.

η : mPa.s cinsinden çözeltinin belirli konsantrasyondaki viskozitesi

η_0 : mPa.s cinsinden çözücü ortamın viskozitesi

C: Konsantrasyon

Elde edilen intrinsik viskozite $[\eta]$ ile Mark-Houwink eşitliğinin yardımıyla molekül ağırlığı hesaplanmaktadır (Eşitlik 2.4.).

$$[\eta] = K M^a$$

Eşitlik 2.4.

K ve a: Çözücü ve polimerin deasetilasyon derecesine bağlı sabitelerdir.

M: Molekül ağırlığı.

Çözücü ortamına bağlı olarak kitozanın, K ve a sabiteleri Tablo 2.2.'de verilmiştir (Rinaudo ve Domard, 1989).

Tablo 2.2. Kitozanın bazı çözücü ortamlardaki, K ve a sabiteleri.

Eşitlik	Çözücü ortamı
$[\eta] = 1.81 \times 10^{-3} \cdot M^{0.93}$	0.1 M Asetikasit – 0.2 M sodyum klorür
$[\eta] = 3.04 \times 10^{-5} \cdot M^{1.26}$	0.1 M Asetikasit – 0.02 M sodyum klorür
$[\eta] = 3.41 \times 10^{-3} \cdot M^{1.02}$	0.33 M Asetikasit – 0.3 M sodyum klorür
$[\eta] = 8.93 \times 10^{-2} \cdot M^{0.71}$	0.2 M Asetikasit – 0.1 M sodyum klorür-4 M üre

2.2.2.2. Deasetilasyon Derecesinin Titrasyon Yöntemi ile Tayini

Kitozanın deasetilasyon derecesi eşit hacimdeki fosforik asit varlığında, 0.1 N sodyum hidroksitle olan titrasyonuna dayanarak hesaplanmıştır. İndikatör olarak fenolfitalein kullanılmıştır. Kitozan içermeyen fosforik asit ile yapılan titrasyon referans olarak kullanılmıştır. Kitozanın deasetilasyon derecesi Eşitlik 2.5.'te verildiği üzere hesaplanmıştır (Knapczyk ve ark., 1989).

$$DD (\%) = 100 - (2.03 \times V / m)$$

Eşitlik 2.5.

DD : Deasetilasyon derecesi.

V : Kitozan içeren ile içermeyen çözelti için harcanan sodyum hidroksit miktarının farkı

m : Kitozan miktarı.

2.2.3. DNA Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

2.2.3.1. Emülsiyonlarda Çapraz Bağ Oluşturulması Yöntemi

pDNA-kitozan nanopartiküllerinin hazırlanmasında ilk formülasyonlar, gluteraldehit varlığında kitozanın çapraz bağ oluşturmaya bağlı gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.3.). Gluteraldehitin toksik etkileri ve partikül büyüklüğüne olumsuz etkisi nedeniyle bu denemeler başarısız bulunmuştur.

Tablo 2.3. Emülsiyonlarda çapraz bağ oluşturulması yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar.

Formülasyon no	Formülasyon içeriği	Yararlanılan kaynaklar	Partikül büyüklüğü (µm)
G1	- 3 mL kitozan çözeltisi - 60 mL pamuk tohumu yağı (%5 Span 85 ve %0.5 Tween 20) - 2 mL %25'lik gluteraldehit	Wang ve ark., 1996	100-120
G2	- 1.25 g kitozan - 5 mL Tween 80 + asetik asit - 3 g sodyum sülfat - 5 ml %25'lik gluteraldehit - 12 g sodyum metabisülfat	Tian ve Groves, 1999	15-50
G3	- % 4 kitozan çözeltisi - 10 mL toluen - 1 mL %25'lik gluteraldehit	Jameela ve ark., 1998	250-350
G4	- 3 mg kitozan - 150 mL soya yağı (%1 Sorbitan seskioleat, Arlacel C)	Onishi ve ark., 1996	30-100
G5	- Kitozan çözeltisi - Ayçiçek yağı (%2 Span 85) - 0.6 mL %25'lik gluteraldehit	Filipovic ve ark., 1996	50-75

2.2.3.2. Kompleks Koaservasyon (Complex Coaservation) Yöntemi

Gluteraldehit ile kitozanın dönüşümsüz olarak kimyasal çapraz bağlar oluşturmaya dayanan yöntem ile başarılı sonuçlar elde edilemeyince, daha basit ve etkin bir yöntem olan iyonik etkileşimden yararlanılarak formülasyon geliştirme çalışmaları sürdürülmüştür.

Kitozan ve DNA'nın zıt yüklerinden yararlanarak yapılan formülasyonlarda, faz ayrımı ve buna bağlı kolloidal kompleks çökmeleri gözlenmiştir. Formüllerde oluşan kolloidal yapının agregasyonunu önlemek için, nanopartikül formülasyonları 25 mM sodyum sülfat çözeltisi içinde hazırlanmıştır (Saka ve Bozkır, 2002a). 2,5-25 mM konsantrasyon arasındaki sodyum sülfat çözeltisinin DNA-kitozan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğüne etkisi olmadığı bildirilmektedir (Borchard, 2001).

Glasiyel asetik asit ve suda çözünmeyen kitozanın, seyreltik asetik asit ile muamele ederek çözeltilerinin hazırlandığı bildirilmektedir (Illum, 1998). Pozitif yüklü kitozan çözeltilerini hazırlamak için su içerisindeki %1'lik asetik asit çözeltisinden yararlanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan 100 mL'lik çözeltiler, manyetik karıştırıcı ile ancak 4-5 saat içerisinde elde edilmiştir. Kitozanın yapısı incelenmiş ve çözünme işlemini hızlandırmak için kitozanın glukozamin ünitelerinde yüksek miktarda bulunan amino gruplarına proton kazandırmak gerektiği düşünülmüştür. Borchard (2001) bu amino gruplarının düşük ve fizyolojik pH değerlerinde tüm amino gruplarının proton kazanmadığını, ancak pH 6 ve altındaki yakın değerlerde tüm amino gruplarının proton kazandığını bildirmektedir. Bu bilgidен yararlanarak;

- Kitozanın tam ve daha hızlı çözünmesi için pH 5.5 seviyesine getirilmiştir.
- Kitozan çözeltisi saflıksızlıklarından kurtarılma amacıyla 0,22 µm lik filtrelerden geçirilmiştir. Böylece aseptik filtrasyon ile bakteriyolojik kontaminasyonlar engellenmiştir.

Bu bilgiler ışığında, kitozanın katyonik özelliğinden yararlanarak negatif yüklü DNA ile kompleks koaservasyon yöntemi ile nanopartiküller elde edilmiştir. Hazırlanan formüller Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar

Formülasyonlar ^a	Kitozan çeşidi ^b	pDNA miktarı ^c	Kitozan miktarı ^c
F1 (1:2) ^d	HMW	50 µg/ 1 mL	100 µg / 1 mL
F2 (1:2)	MMW	50 µg/ 1 mL	100 µg / 1 mL
F3 (1:2)	LMW	50 µg/ 1 mL	100 µg / 1 mL
F4 (1:1)	HMW	100 µg / 1 mL	100 µg / 1 mL
F5 (1:1)	MMW	100 µg / 1 mL	100 µg / 1 mL
F6 (1:1)	LMW	100 µg / 1 mL	100 µg / 1 mL
F7 (2:1)	HMW	200 µg/ 1 mL	100 µg / 1 mL
F8 (2:1)	MMW	200 µg/ 1 mL	100 µg / 1 mL
F9 (3:1)	HMW	150 µg/ 1 mL	50 µg / 1 mL
F10 (1:3)	HMW	50 µg/ 1 mL	150 µg / 1 mL
F11 (5:1)	HMW	250 µg/ 1 mL	50 µg / 1 mL
F12 (1:5)	HMW	50 µg/ 1 mL	250 µg / 1 mL

a: Her formülasyon, 25 mM sodyum sülfat içermektedir.

b: HMW; yüksek molekül ağırlığına sahip kitozan,

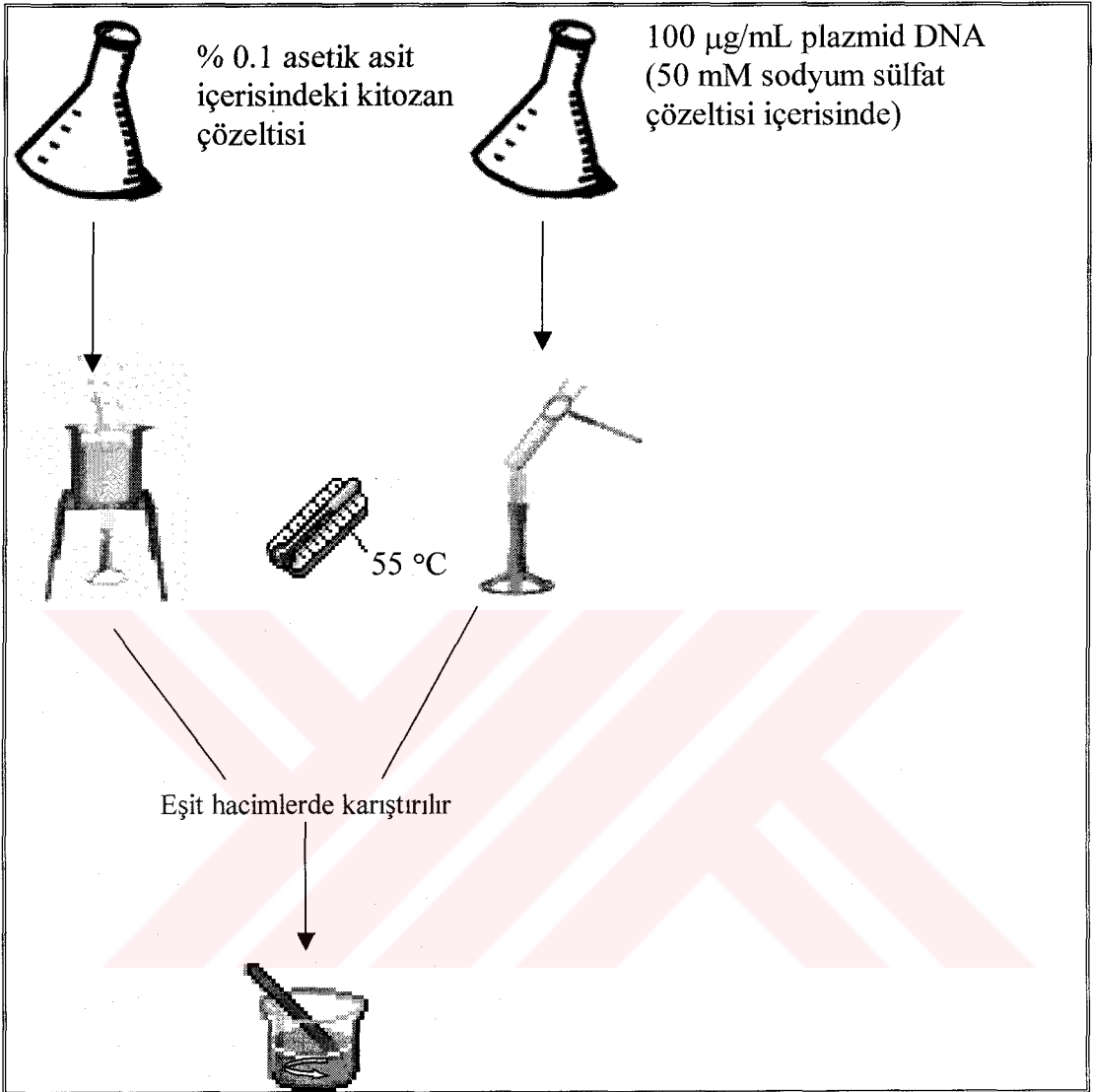
MMW; orta büyüklükte molekül ağırlığına sahip kitozan,

LMW; düşük molekül ağırlığına sahip kitozan.

c: Hesaplar formülasyon hacmi üzerinden yapılmıştır.

d: Formülasyonlardaki pDNA:kitozan oranları.

Şekil 2.4'te şematik olarak anlatılan kompleks koaservasyon yönteminde, %1'lik asetik asit içerisinde hazırlanan kitozan çözeltileri (pH 5.5) ile 50 mM sodyum sülfat çözeltisi içerisindeki 100 µg/mL pDNA, 55°C'ye kadar ısıtılmıştır. Her iki çözeltiden eşit hacimlerde alınmış ve vorteks karıştırıcı ile karıştırılarak, kolloidal yapının oluşması sağlanmıştır.



Şekil 2.4. pDNA-kitozan nanopartiküllerinin kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanış şeması.

2.2.3.3. Modifiye Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

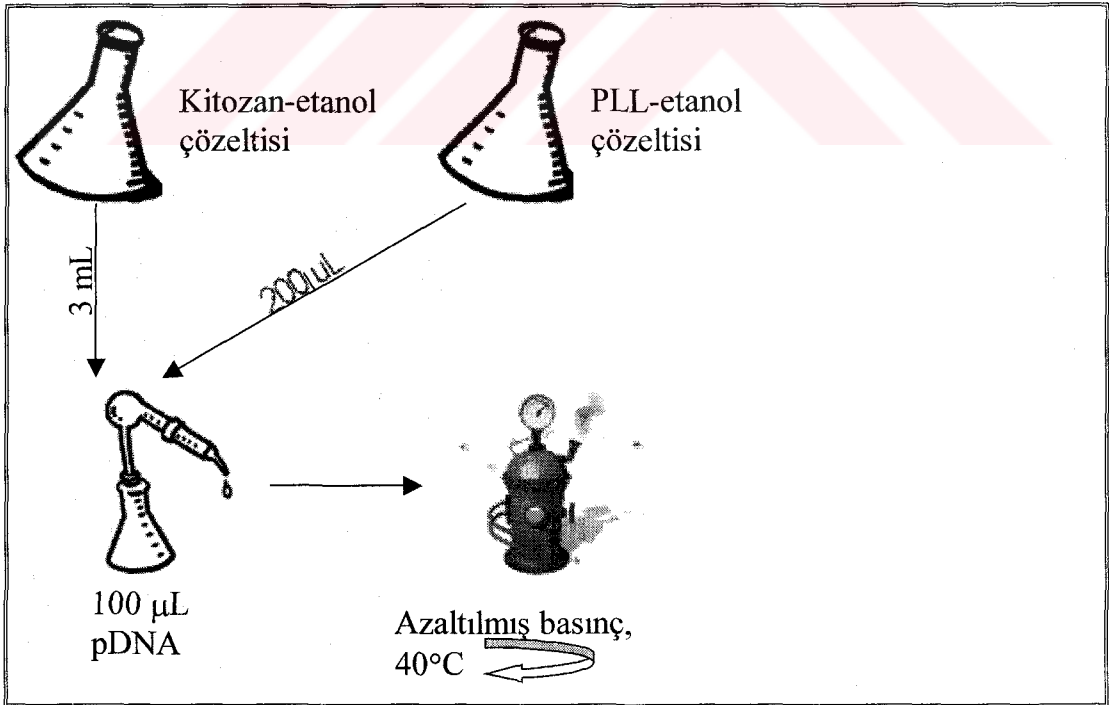
Kitozan-DNA nanopartiküllerini hazırlamak için kullandığımız bir diğer yöntem ise Hirosue ve arkadaşlarının (2001) uygulamış olduğu modifiye çözücü buharlaştırma yöntemidir. Modifiye çözücü buharlaştırma yönteminde; pDNA'yı yoğunlaştırmak amacıyla dimetildioktadesilamonyum (DDAB) kullanıldığında, mikron boyutlarında partiküller elde edilmiştir (Saka ve Bozkır, 2002b). Daha küçük boyutlarda partikül elde etmek için, DDAB yerine pDNA ile daha yoğun etkileşen poli-L-lizin (PLL) kullanılmıştır (Tablo 2.5.).

Tablo 2.5. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar.

Formülasyonlar	Formülasyon içeriği
F13	HMW kitozan, 7.5 mg / 10 mL pDNA, 100 µg / 10 mL DDAB, 2 mg / 10 mL
F14	MMW kitozan, 7.5 mg / 10 mL pDNA, 100 µg / 10 mL DDAB, 2 mg / 10 mL
F15	LMW kitozan, 7.5 mg / 10 mL pDNA, 100 µg / 10 mL DDAB, 2 mg / 10 mL
F16	HMW kitozan, 7.5 mg / 10 mL pDNA, 100 µg / 10 mL PLL, 2 mg / 10 mL
F17	MMW kitozan, 7.5 mg / 10 mL pDNA, 100 µg / 10 mL PLL, 2 mg / 10 mL
F18	LMW kitozan, 7.5 mg / 10 mL pDNA, 100 µg / 10 mL PLL, 2 mg / 10 mL

200 μ L PLL-etanol veya DDAB çözeltisi (10 mg/mL), 3 mL kitozan (%1 asetik asit)-etanol çözeltisi (2.5 mg/mL) ile birkaç kez ters-düz ederek karıştırılmıştır. 1 mg/mL Tris-EDTA tamponu içerisindeki 100 μ L DNA çözeltisi, etanollü çözelti üzerine mikropipet ile azar azar ilave edilmiştir. 5 mL etanol ilavesinden sonra karışım birkaç kez ters-düz edilmiş ve 10 mL distile su ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda, basınç azaltılarak 40°C civarında, etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 2.5.).

Formülasyondan etanolü uzaklaştırmak için rotavapor cihazı kullanılmıştır. Rotavapor cihazı uzun süre kullanıldığında dahi nanopartikül dispersiyonundan etanolü tamamen uzaklaştırmak mümkün olmamıştır. Uzaklaştırılamayan etanol artığının toksik etkilere neden olabileceği düşünülerek daha etkin bir buharlaştırma sağlamak için, içerisinde manyetik alan yaratılan desikatöre vakum pompası bağlanmış ve kademeli olarak artırılan ısı ve azaltılan basınç altında karışmakta olan dispersiyondan etanol tamamen uzaklaştırılmıştır.



Şekil 2.5. pDNA-kitozan nanopartiküllerinin modifiye çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanış şeması.

2.2.4. pDNA-Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

Farklı yöntemlerle hazırlanan nanopartiküllerin; enkapsülasyon etkinlikleri hesaplanmış, partikül büyüklükleri ve dağılımlarına ilişkin ölçümleri yapılmıştır. Bu analizlere göre; enkapsülasyon etkinlik değerleri yüksek olan ve partikül büyüklükleri mikrometre boyutunun altında bulunan nanopartikül formülasyonları belirlenmiştir. Bu formülasyonlarda zeta potansiyel değerleri ölçülmüş ve pDNA'nın *in-vitro* salım özellikleri incelenmiştir.

2.2.4.1. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Elde edilen nanopartikül formülasyonlarına yüksek devirde santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant 260 nm'de okunarak serbest pDNA miktarı, Bölüm 2.2.1.2.'de verilen Eşitlik 2.1. kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler nanopartikül yapısına katılmayan pDNA miktarıdır. Bu değer, formüle konulan pDNA değerinden çıkarılarak nanopartiküllerde tutulan pDNA miktarı (a) µg cinsinden bulunmuştur. Santrifüj sonrası elde edilen pelletler tartılmış ve formülasyondaki nanopartiküllerin ağırlığı (b) saptanmıştır. Nanopartiküllerin etkin madde yükleme yüzdesi bu oranlar kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 2.6.).

$$\% \text{ Etkin madde yükleme } (a / a) = 100 \times a / b$$

Eşitlik 2.6.

Enkapsülasyon etkinliğinin yüzde ifadesinde Eşitlik 2.7.'ye göre hesaplanmıştır.

$$EE (\%) = 100 \times [(c \times a / b - a) / d]$$

Eşitlik 2.7.

a: hesaplanan pDNA miktarı,

b: elde edilen nanopartikül ağırlığı,

c: formülasyona konulan polimer miktarı,

d: formülasyona konulan pDNA miktarı,

2.2.4.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Ölçülmesi

Bizim için önemli bir formülasyon kriteri olan, nanopartiküllerin boyutları ve dağılımları hakkında bilgi elde etmek için Mastersizer 2002 kullanılmıştır. Cihaz, Fraunhofer ve Mie teorilerinden yararlanarak partiküllerin bulunduğu alandan lazer ışınının dağılmasına göre partikül boyutunu hesaplamaktadır (Rowle, 1994). Işık dağılımı prensibi ile ölçülen örnekler, bidistile su içinde disperse edilmiş, 5 ayrı okuma yapıp ortalamaları alınmıştır.

Kitozanın 8 farklı kristal yapı gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle yapılan araştırmalar sonucu partikül büyüklüklerinin geniş bir dağılım gösterdiği bulunmuştur (Nishioka ve ark., 1990; Mao ve ark., 1997). Tekdüze bir dağılım sağlamak için kitozan çözeltisi hazırlanırken dikkat edilmesi gereken noktalar bulunmaktadır (Bölüm 2.2.3.2.).

2.2.4.3. Zeta Potansiyel Değerinin Ölçülmesi

Zeta potansiyel değerinin sıfırdan farklı olması istenir. Nötr değerdeki partiküllerin stabilitesi oldukça zayıftır. +30 mV ile -30 mV üzerindeki değerlerin oldukça stabil olduğu kabul edilir (Rawle, 1994). Partikülün yüzey yükü, partikülün hücre içine alınmasında önemli bir etkidir. Etkin bir geçiş sağlanması için partikülün yüksek zeta potansiyeline ($\cong 25.8$ mV) sahip olması gerekmektedir (Chassagne ve Bedeaux, 2003). Hücre çeperi ile ters yüzey yük özelliği taşıyan düşük zeta potansiyeline sahip partiküllerin de oldukça etkin geçiş sağladığı bildirilmiştir (Strand ve ark., 2003; Hosseinkhani ve Tabata, 2003). Pozitif yüklü kitozan nanopartiküllerinden, mide-barsak ortamında (El-Shabouri, 2002; Pan ve ark., 2002) ve bakteri süspansiyonlarında (Strand ve ark., 2003) yüksek oranda etkin madde geçişinin sağlandığı bildirilmiştir.

Partikülün yüzey yükünün ifadesi olan zeta potansiyel değerinin ölçülmesi için Zeta Sizer 3000 HSA kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanmış 10 mL numune, kapiller kolona tatbik edilmiş ve kutuplardaki sürekli akım değiştirilerek partiküllerin

zeta potansiyel değerleri tesbit edilmiştir. Alet kendi içerisinde 10 farklı okuma yaparak, bunun ortalamalarını bize vermektedir. Kapiller kolonlara hava tatbik edilerek numuneler geri kazanılmıştır.

2.2.4.4. *In-vitro* pDNA Salımının İncelenmesi

Formülasyonların *in-vitro* salım profillerini elde etmek için, nanopartiküller 37°C'ye ayarlanmış steril PBS içeren salım ortamlarına DNaz ve RNaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüpleri içerisinde konulmuşlardır. Belirlenen zaman aralıklarında tüpler ortamdan alınarak, 12.000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edilmiş ve süpernatandaki DNA miktarı 260 nm'de spektrofotometrik olarak okunmuştur. Çökelti üzerine alınan süpernatant miktarı kadar PBS tamponu ilave edilerek salım çalışmaları sürdürülmüştür. Eşitlik 2.1'den yararlanarak hesaplanan DNA miktarı, Eşitlik 2.8'e göre kümülatif olarak yüzdeye geçilmiş ve zamana karşı grafiğe geçirilerek değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ Çıkan etkin madde} = 100 \times a / (b.c/100)$$

Eşitlik 2.8.

a: Bulunan DNA miktarı

b: Ortama konan nanopartikül miktarı

c: Nanopartikülde bulunan DNA miktarının yüzde ifadesi (Etkin madde yükleme yüzdesi).

Fosfat tamponu (PBS)

Sodyum klorür 7.650 g

Disodyum hidrojen fosfat (susuz) .. 0.724 g

Potasyum dihidrojen fosfat 0.210 g

Distile suy.m..... 1.000 L (pH 7.4)

FDA'nın (<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/r59.html>) sayfasından alınmıştır.

Salım ortamı olarak kullanılan PBS'in pH'sı 1 N sodyum hidroksit ile ayarlanmıştır. Hazırlanan PBS, 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiştir.

2.2.5 pDNA-Kitozan Formülasyonlarının Dayanıklılıklarının Araştırılması

Deasetilasyon derecesi yüksek olan HMW kitozan ile hazırlanmasından dolayı yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren, mikrometre boyutlarının altında elde ettiğimiz F1 ve F4 kodlu formülasyonları seçilmiş ve yapılan araştırmalar F1 ve F4 kodlu formülasyonlar üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

2.2.5.1. F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının, pDNA'yı Koruma Etkisinin İncelenmesi

Değişik oranlarda hazırlanan pDNA:kitozan nanopartikülleri Deoksiribonükleaz I (DNaz I) enzimi ile muamele edilerek, pDNA'nın nükleaz varlığında nanopartikül içerisindeki stabilitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar, serum varlığında yapılan *in vitro* çalışmalarda veya *in vivo* çalışmalarda nanopartiküllerin pDNA üzerindeki koruma etkisini tam olarak yansıtamamasına rağmen ileriye dönük bir fikir elde etmek açısından önemlidir.

Tüpler içine aktarılan, 25 mM sodyum sülfat içerisindeki 1µg serbest pDNA ile 1 µg pDNA taşıyan hacimdeki nanopartikül süspansiyonları, 4 ve 40 µg/ml DNaz I ile 15 dakika 37°C'de muamele edilmiştir. 15 dakika sonunda, reaksiyonu durdurmak için ortama 5mM olacak şekilde iyodoasetik asit ilave edilmiştir. Nanopartikül süspansiyonlarına, distile su ile içerisindeki 1 Ünite kitozanaz enzimi ilave edilmiş, böylece pDNA zarar görmeden nanopartikül yapısından ayrılmıştır. pDNA'ların akibeti jel elektroforez analizleriyle aydınlatılmıştır.

2.2.5.1.1. Jel Elektroforez Yöntemi

Agoroz veya poliakrilamid jel elektroforez yöntemleri, DNA'nın ayırımı, tayin edilmesi ve saflaştırılmasında kullanılan standart yöntemlerdir. Bu yöntemler; basit, tekrarlanabilir ve diğer prosedürlerle ayırımını yapamadığımız hassaslıkta DNA fragmanlarının ayırımını gerçekleştirebilecek kapasitededir. Ultraviyole ışık altında jel, etidyum bromür ile boyandığı zaman 1-10 ng DNA gibi düşük konsantrasyonlar

bile belirlenmektedir. Ayrıca, bantlar jelden geri kazanılarak klonlama amacıyla kullanılabilir.

Agaroz ve poliakrilamid jeller amaca göre farklı şekil, büyüklük ve porozitede hazırlanabilir ve farklı şartlar altında yürütülebilir. Bu parametreleri belirleyen en önemli faktör ayırımı sağlanacak genomik maddenin büyüklüğüdür. Boyutları 5-500 bp olan DNA bantlarının ayırımı için, yüksek ayırım gücü gösteren 1 bp'ni bile diğerinden ayırabilen poliakrilamid jel kullanılması gerekmektedir. DNA sürüklenmesi hızlı olan poliakrilamid jellerinin agaroz jellere göre hazırlanması daha zordur. Agaroz jellerin ayırım gücü, poliakrilamid jellere göre daha azdır. Fakat 200 bp'den 50 kb'a kadar geniş bir aralıkta ayırım sağlanır. Agaroz jeller ile genellikle yatay ve sabit bir akım altında sürüklenme gerçekleştirilir. Büyük DNA parçalarının (>10.000 kb) ayırımı için belirli aralıklarda akım gücü ve yönü değiştirilerek ayırım sağlanır (Sambrook ve ark., 1989).

Elektroforez işlemi için %0.8 konsantrasyonunda agaroz jel kullanılmıştır. Düşük erime sıcaklığına sahip agarozdan 0.8 g tartılarak ve ısıtıcı yardımıyla 100 mL Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu içerisinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti tarak ve yan destekleri takılmış jel tepsisi üzerine dökülmüş, jel polimerleşmesi gerçekleştikten sonra tarak ve yan destekleri çıkarılmıştır. Elektroforez tank sistemi içerisine yerleştirilen jelin üzeri TBE tamponu ile örtecek şekilde ilave edilmiştir. Uygulanacak örnekler, örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra tarak ile oluşturulan kuyucuklara ilave edilmiş ve 60 V, 150 mA'lık elektrik akımı altında bromfenol mavisi jelin sonlarına gelinceye kadar sürüklenmesi sağlanmıştır. Jele zarar vermeden, etidyum bromür içeren boyama çözeltisinde yaklaşık 45 dakika bekletilmiştir. Akabinde yıkama amacıyla, yarım saat distile suda bekletilen jel, ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenmiştir.

Elektroforez İşleminde Kullanılan Çözeltiler;

TBE tamponu (5x) :

Trizma baz	54.0 g
Borik asit	27.5 g
EDTA (0.25 M, pH 8.0)	10.0 mL
Distile su	100.0 mL

Agaroz jel elektroforezi çalışmaları sırasında çalışma çözeltisi olarak TBE tamponu kullanılmıştır. Bu tampon 5 kez konsantre stok olarak hazırlanmıştır. Kullanım sırasında 1/5 oranında seyreltilerek kullanılır.

Örnek yükleme tamponu :

Bromfenol mavisi	% 0.25
Gliserol (su içerisinde)	% 30

Örnek yükleme tamponu hazırlandıktan sonra buz dolabında 4°C'de saklanmıştır. Jel üzerinde örneklerin sürüklenmesini izleyebilmek amacıyla kullanılır. Örnekler, önce örnek yükleme tamponu ile muamele edildikten sonra kuyucuklara tatbik edilmiştir.

Boyama çözeltisi :

Jele uygulanıp yürütülen DNA moleküllerin görüntülenmesi için etidyum bromür çözeltisi kullanılmıştır. DNA bantları etidyum bromür ile birleşerek UV altında floresan vermektedir. Etidyum bromür stok çözeltisi su içerisinde 10 mg/mL olacak konsantrasyonda hazırlanmıştır. Boyama sırasında 0.5 µg/mL etidyum bromür içeren çözeltisi kullanılmıştır. Etidyum bromür güçlü bir mutajenik etki gösteren toksik bir maddedir. Bu nedenle boyama çözeltisi dikkatli kullanılmış ve eldiven ile korunulmuştur.

2.2.5.2. F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının, Zaman İçerisindeki Değişiminin Gözlenmesi

Seçilen F1 ve F4 kodlu nanopartikül formülasyonlarının PBS tamponu (pH 7.4) ve hazırlandıkları ortam (pH 5.5) içerisindeki dispersiyonları, +4°C’de 3 ay süre ile saklanmış, partikül büyüklüğü dağılımları ve zeta potansiyelleri arasında bir fark olup-olmadığı değerlendirilmiştir.

2.2.5.3. F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının, Liyofilizasyon Etkisi ile Değişiminin Gözlenmesi

Polimerik nanopartiküllerin, etkin maddeyi hücre içerisine yüksek verimde taşıyabilmeleri için bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bu özelliklerden biri de saklama sırasında partiküllerin değişmeden kalabilmesidir (Bölüm 1.5.1.). Hao ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada formülasyonun stabilitesini sağlamak için liyofilizasyon yapılması gerektiği, böylece formülün +4°C’de saklanabildiği, aksi takdirde -20°C’de saklanması gerektiği bildirilmektedir.

Formülasyonların uzun süre bozunmadan saklanabilmesi için liyofilize toz haline getirilmesi gerektiği düşünülmüştür. Formüller %10 mannitol varlığında dondurulmuş ve liyofilizatör kullanarak toz haline getirilmiştir. Liyofilize toz formülasyonların, kullanılmadan önce +4°C’de saklanması ve kullanım anında PBS (pH 7.4) içerisinde disperse edilmesi amaçlanmıştır. F1 ve F4 kodlu liyofilize toz numunelerin SEM fotoğrafları çekilmiş, disperse edildikten sonra partikül büyüklüğü analizleri yapılmıştır.

2.2.6. Taramalı Elektron Mikroskopisi Analizleri

F1 ve F4 kodlu formülasyonlar üzerinde, partiküllerin boyutu ve yüzey görünüşü hakkında bilgi sahibi olmak için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Liyofilize edilmiş, F1 ve F4 kodlu formülasyonlar karbon üzerine 2 saat 30°C’lik etüvde bekletilerek fikse edilmiştir. Yalıtkan materyal,

elektron mikroskobunda incelenebilmesi için altın bombardımanına tutularak iletken hale getirilmiştir. Net görüntü elde etmek için altın ile kaplama işlemi birkaç kez tekrarlanmıştır. Jeol marka elektron mikroskopu altında partiküllerin morfolojik yapıları incelenmiştir.

2.2.7. F1 ve F4 Kodlu Nanopartikül Formülasyonlarının Gen Aktarım Etkinliğinin Araştırılması

Hücre hatları ve primer hücre kültürleri üzerinde gen aktarım etkinliği incelenmeden önce, bakteriler üzerinde gen aktarımının sağlanabildiği ve tayin yöntemlerinin etkin olarak kullanıldığını incelemek için hazırlamış olduğumuz nanopartiküllerin E.coli hücrelerine gen aktarımı üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Ampisilin direnç geni ve β -galaktosidaz enzimini kodlayan geni içeren pDNA'yı taşıyan nanopartikül formülasyonları, ampisiline duyarlı olan ATCC 25922 suşu ile muamele edilerek ampisilinli plaklarda kültür oluşturma özellikleri incelenmiştir. Gen aktarım işlemi ve tayini şu şekilde gerçekleştirilmiştir;

- 1- 15 mL LB besiyeri içeren 50 mL'lik steril tüpe, taze üretilmiş E.coli kültür plağından tek koloni ekilmiş ve 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 2- Gece boyunca inkübasyona bırakılmış 300 μ L bakteri kültürü, 15 mL taze sıvı LB'de yaklaşık 2 saat boyunca 37°C'de bulanıklık (1 Mc Farland) oluşuncaya kadar inkübe edilmiştir.
- 3- 1.5 mL taze kültür, mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve oda ısısında, 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 4- Elde edilen pellet üzerine 1.5 mL 50 mM kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltisi ilave edilmiştir. Vorteks karıştırıcı ile süspansiyon hale getirilmiş, 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- 5- Tekrar oda ısısında, 1 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 1.5 mL 50 mM kalsiyum klorür çözeltisi ilave edilip, vorteks karıştırıcı ile süspansiyon edilmiş ve buz banyosunda bekletilmiştir.
- 6- DNaz ve RNaz içermeyen ependorf tüplerine 300 μ L buz banyosunda bekleyen kültürden alınmıştır. Bu tüplerin üzerine 5 μ g pDNA içeren formülasyon ilave

edilmiştir. Kontrol grubu olarak nanopartikül formülasyonu yerine 25 mM sodyum sülfat içerisindeki 5µg serbest pDNA ilave edilmiştir.

- 7- Vorteks uygulanarak karıştırılan tüpler sırasıyla, 30 dakika buz banyosunda, 1.5 dakika 42°C'lik su banyosunda ve tekrar 10 dakika buz banyosunda bekletilmiştir.
- 8- Tüplerin üzerlerine 1 mL LB besiyeri ilave edilmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 9- Plazmid taşıyan kolonileri, işlem görmemiş kolonilerden ayırt etmek için elde edilen 150 µL kültür, ampisilin içeren katı LB besiyerine tek koloni elde edecek şekilde yayılmış ve 37°C'lik etüvde bir gece boyunca üremeye bırakılmıştır.
- 10- Oluşan koloniler "gram boyama" ile kontrol edilmiştir.
- 11- Ayrıca, 15 mL ampisilin içeren sıvı LB besiyerine tek koloni ekimi yapılmış, 37°C'lik etüvde bir gece boyunca üremeye bırakılmıştır.
- 12- Elde edilen taze kültür, mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve oda ısısında, 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 13- Süpernatant, mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve Becker ve arkadaşlarının (1990) prosedürüne göre β-galaktosidaz tayini yapılmıştır.

Z tampon içeriği (pH 7.0)

Disodyumhidrojen fosfat.7H ₂ O	16.100 g
Sodyumdihidrojen fosfat.H ₂ O.....	5.500 g
Potasyum klorür	0.750 g
Magnezyum sülfat	0.246 g
2-merkaptetanol	2.700 mL

- 14- 1 mL Z tamponuna, 100 µL süpernatant ilave edilmiştir.
- 15- Daha önceden ayarlanmış 28°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir.
- 16- β-galaktosidazın yıkıma uğratacağı substrat olarak, 0.2 mL o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozit (ONPG) (4 mg/mL) ilave edilmiştir.
- 17- Uçuk sarı renk oluşuncaya kadar (10 –30 dakikada) 28°C'de inkübasyona devam edilmiştir.

18- Reaksiyonu durdurmak için ortama 0.1 mL 1M sodyumkarbonat ilave edilmiş ve reaksiyon zamanı kaydedilmiştir.

19- Z tamponuna karşı oluşan renk 420 nm’de okunmuştur.

20- Spesifik aktivite (SA) Eşitlik 2.9.’a göre hesaplanmıştır.

SA (Ünite/mg) =	$\frac{OD_{420} \times 380}{\text{İnkübasyon zamanı (dakika)} \times \text{Seyreltme faktörü}}$
-----------------	---

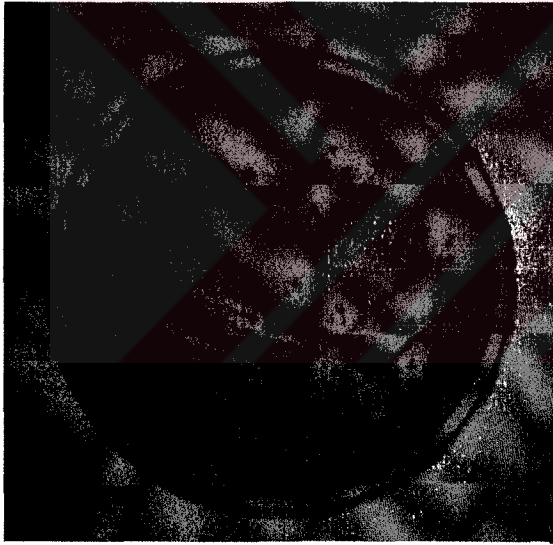
Eşitlik 2.9.

Saf β -galaktosidazın SA’sı 300.000 Ünite/mg olarak verilmektedir (Becker ve ark., 1990b).

3. BULGULAR

3.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesi

pDNA çoğaltılması için E.coli bakterisinin ATCC 25922 suşu kullanılmış ve izolasyon işlemi, bölüm 2.2.1.1.2. ve 2.2.1.1.3.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. pDNA aktarımı sağlanan E.coli hücrelerinin ayırımını sağlamak üzere ampisilin içeren sıvı LB besiyerinde üreme gerçekleştirilmiştir. E.coli hücrelerinin McConkey agarda pembe renk oluşturma (Şekil 3.1.) ve gram negatif E.coli hücrelerinin gram boyama sonucu pembe koklar halinde görülmesi (Şekil 3.2.) ile ortamda oluşan kültürlerin E.coli hücresi olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 3.1. E.coli kültürlerinin, Mc Conkey agarda pembe koloni oluşturmaları.



Şekil 3.2. İmmersiyon objektifi altında, gram boyama sonucu elde edilen pembe kok halindeki görüntüleri.

3.1.1. pDNA Saflık ve Miktar Tayinlerine İlişkin Bulgular

Farklı zamanlarda elde edilen pDNA'nın saflık ve miktar tayini spektrofotometrik olarak bölüm 2.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. pDNA'ların saflık ve konsantrasyonları ile ilgili veriler Tablo 3.1'de görülmektedir.

Tablo 3.1. Farklı izolasyon yöntemleriyle elde edilen pDNA'ların saflığı ve konsantrasyonları.

İşlem No	Yöntem	OD _{260 nm}	OD _{280 nm}	Saflık (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	DNA Konsantrasyonu (µg/mL)
1	2.1.1.2	0.027	0.015	1.80	675.0
2	2.1.1.2	0.468	0.255	1.84	1638.0
3	2.1.1.2	0.342	0.237	1.44	1710.0
4	2.1.1.3	0.448	0.247	1.81	2240.0
5	2.1.1.3	0.517	0.294	1.76	1809.5
6	2.1.1.3	0.157	0.085	1.85	471.0
7	2.1.1.3	0.695	0.446	1.56	1737.5
8	2.1.1.3	0.316	0.172	1.84	948.0
9	2.1.1.3	0.366	0.219	1.67	1281.0
10	2.1.1.3	0.229	0.128	1.79	1145.0
11	2.1.1.3	0.458	0.257	1.78	2061.0
12	2.1.1.3	0.326	0.181	1.80	652.0
13	2.1.1.3	0.521	0,296	1.76	2605.0
14 (3)	Eks.	0.486	0.267	1.82	1701.0
15 (7)	Eks.	0.348	0.187	1.86	1740.0
16 (9)	Eks.	0.256	0.139	1.84	1280.0

Protein varlığında DNA'nın absorbanısı 280 nm'ye kayar. Bu nedenle; DNA'nın saflık değerini gösteren OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının 1.8-2.0 arasında olması istenir. Saflığın 1.8'in altına düştüğü durumlarda, ileri saflaştırma protokolü uygulanabilir.

İleri saflaştırma protokolü, bölüm 2.2.1.1.3.'te kullanılan Wizard® Plus Maxipreps DNA Saflaştırma Sistemine ait kılavuzda, sorunlar kısmında önerildiği şekilde, saflık oranı 1.8'in altında olduğunda, fenol/kloroform ekstrasyonu uygulanmıştır.

Elde edilen düşük saflıktaki pDNA çözeltileri üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) karışımı eklenmiş ve tüp alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Oda ısısında, 19.000 rpm'de 1 dakika santrifüj uygulandıktan sonra, süpernatant başka bir tüpe aktarılmıştır. Bu ekstraksiyon işleminin 3 kez yapılması tavsiye edilmektedir. Aynı işlem kloroform ile birkaç kez tekrarlandıktan sonra, 10 da 1 oranında 3M'lık sodyum asetat (pH 5.2) çözeltisi ilave edilmiştir. %95'lik etanol ilavesi ile DNA'nın çökmesi sağlanmış, ve oda ısısında pellet elde edilinceye kadar bırakılmıştır. DNA pelleti, Tris-EDTA tamponu ile süspand edilmiştir.

3.2. Kitozanın Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

Fluka'dan temin edilen 3 farklı kitozanın 25-26°C'de 0.1 M asetik asit ve 0.2 M sodyum klorür içerisindeki %1, %0.5, %0.25 ve %0.1'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin kılcal viskozimetredeki akış süreleri Tablo 3.2.'de verilmiştir. 3 farklı kitozanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon dereceleri Bölüm 2.2.2.'ye göre hesaplanmıştır. Tablo 3.3.'te görüldüğü üzere, kullanılan farklı molekül ağırlıklarına sahip kitozan çeşitlerinin deasetilasyon dereceleri birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur.

Tablo 3.2. Formülasyonda kullanılan, farklı molekül ağırlığı ve konsantrasyondaki kitozanların kapiller viskozimetreden akış süreleri^a.

Kitozan çeşitleri	Kitozan konsantrasyonları			
	% 1	% 0.5	% 0.25	% 0.1
HMW	599.8±1.2 sn	107.5±1.4 sn	32.6±1.6 sn	19.0±1.3 sn
MMW	488.4±1.6 sn	87.3±1.7 sn	25.9±2.1 sn	10.9±2.1 sn
LMW	189.3±2.1 sn	51.4±2.4 sn	22.1±2.7 sn	10.1±1.3 sn

a: T= 25-26°C, k=1.003.

n = 8 ; ortalama süre ± standart sapma

Tablo 3.3. Formülasyonlarda kullanılan kitozan çeşitleri ve özellikleri

Kitozan çeşitleri	Lot / dolum no	Deasetilasyon derecesi (%)		Viskozitesi ^a (mPa.s)	Molekül Ağırlığı
HMW	371936/1 23398	89.02 ^b	88.90 ^c	557.82	620 000
MMW	398416/1 35100	83.94	83.75	293.07	415 000
LMW	364954/1 53498	82.06	82.95	159.01	137 000

a: 25 °C'de %1 asetik asit ortamında.

b: Kapiller viskozimetre yöntemi ile bulunan sonuçlar.

c: Titrasyon yöntemi ile bulunan sonuçlar.

3.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

3.3.1. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Hazırlanan pDNA-kitozan nanopartiküllerine, pDNA'yı hangi oranda yükleme yapabildiğimizi anlamak için bölüm 2.2.4.1.'de anlatılan hesaplar üzerinden sonuçlara varılmıştır (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. Formülasyonların enkapsülasyon etkinlikleri.

Formül No	pDNA:kitozan miktarı (%)	Yüklenen pDNA miktarı (%)	Enkapsülasyon etkinliği (%)
F1	20 : 40	17.8	92.7 ± 3.7
F2	20 : 40	17.4	87.5 ± 4.1
F3	20 : 40	18.2	94.4 ± 2.3
F4	20 : 20	18.4	98.0 ± 2.0
F5	20 : 20	17.8	85.1 ± 7.1
F6	20 : 20	18.8	96.2 ± 1.2
F7	20 : 10	16.5	57.4 ± 8.7
F8	20 : 10	16.1	54.3 ± 10.2
F9	30 : 10	12.6	42.3 ± 2.7
F10	10 : 30	9.2	96.4 ± 6.8
F11	50 : 10	a	-----
F12	10 : 50	a	-----
F13	10 : 25	9.8	95.4 ± 1.2
F14	10 : 25	9.2	89.1 ± 2.4
F15	10 : 25	9.6	91.9 ± 1.7
F16	10 : 25	9.7	90.4 ± 3.5
F17	10 : 25	9.3	85.2 ± 4.1
F18	10 : 25	9.7	94.2 ± 2.7

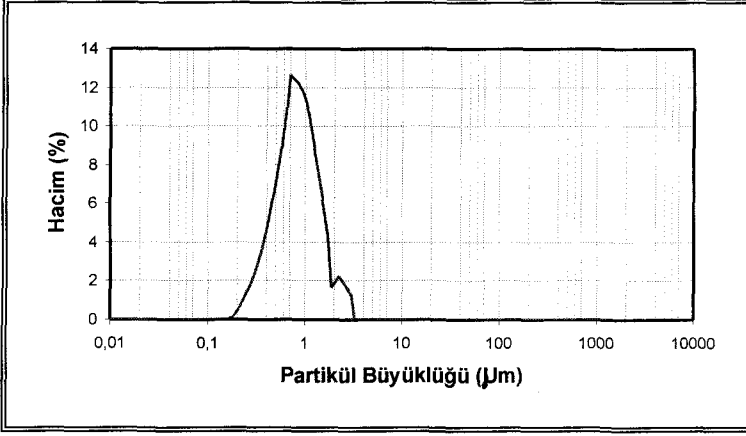
a: Partiküler oluşum gözlenmedi. (n=5)

3.3.2. Partikül Büyüklüğü Analizlerine İlişkin Bulgular

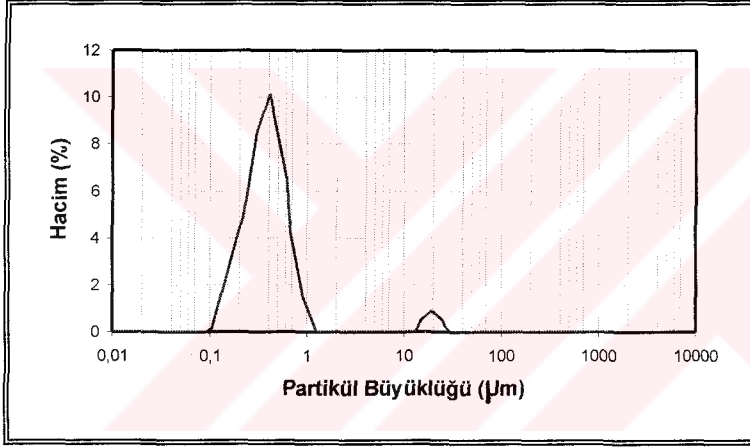
Formülasyonların partikül büyüklükleri bölüm 2.2.4.2.'deki yöntemle göre ölçülerek, sonuçlar Tablo 3.5. ve Şekil 3.3-3.22. de verilmiştir. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlardan (F1-F12), en uygun formülasyonların pDNA:kitozan oranının 1:1 ve 1:2 olduğu gözlenmiştir. 3 veya daha fazla oranlarda hazırlanan formülasyonlarda (F9-F12) nanopartikül oluşmadığı partikül büyüklüğü dağılımı ve jel elektroforez görüntülerinde görülmektedir (Şekil 3.26. ve Şekil 3.27.). Ayrıca, deasetilasyon derecesi yüksek olan HMW kitozan ile hazırlanmış, enkapsülasyon etkinliği en yüksek bulunan F4 formülünün 3 ay boyunca PBS tamponu (pH 7.4) ve hazırlandığı çözelti (pH 5.5) içerisinde bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ölçüm sonucu Tablo 3.5. ve Şekil 3.7'de verilmiştir. Liyofilize toz haline getirilen F1 ve F4 formülünün 3 hafta bekletildikten sonra partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5. Formülasyonların partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları (n=5)

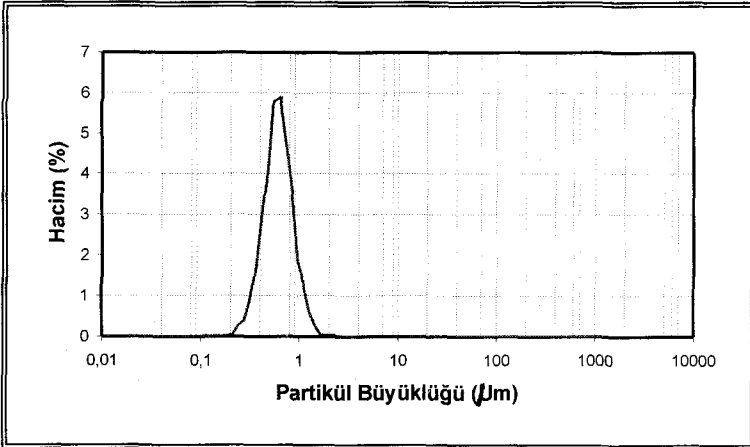
Formül numarası	Partikül büyüklüğü (nm $\pm$ Standart Sapma)
F1	820 $\pm$ 72
F2	604 $\pm$ 24
F3	580 $\pm$ 34
F4	752 $\pm$ 17
F5	553 $\pm$ 12
F6	512 $\pm$ 24
F7	2696 $\pm$ 320
F8	5879 $\pm$ 258
F9	27857 $\pm$ 450
F10	36548 $\pm$ 357
F11	175698 $\pm$ 501
F12	168542 $\pm$ 428
F13	1585 $\pm$ 45
F14	1464 $\pm$ 80
F15	1450 $\pm$ 41
F16	620 $\pm$ 27
F17	490 $\pm$ 55
F18	457 $\pm$ 11
3 ay bekletilmiş F4 (pH 5.5)	810 $\pm$ 35
3 ay bekletilmiş F4 (pH 7.4)	345854 $\pm$ 1578
Liyofilize toz halde 3 hafta bekletilen F1	852 $\pm$ 21
Liyofilize toz halde 3 hafta bekletilen F4	749 $\pm$ 19



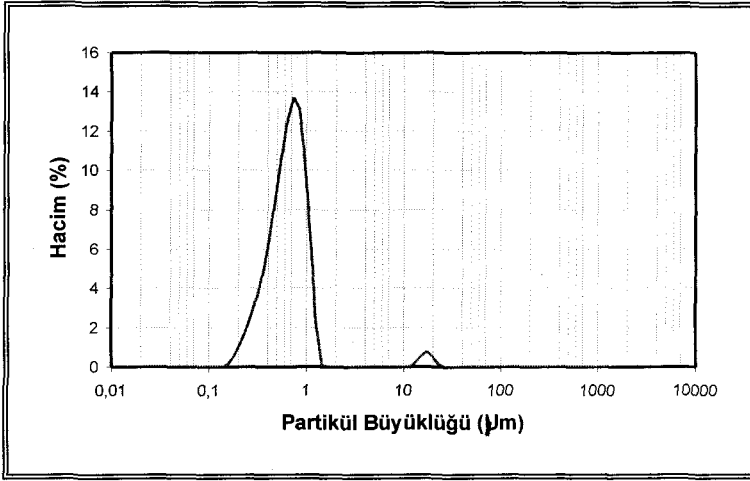
Şekil 3.3. F1 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



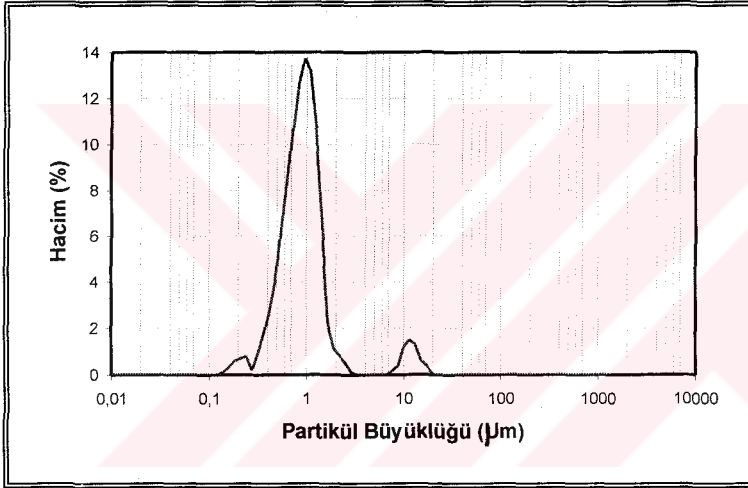
Şekil 3.4. F2 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



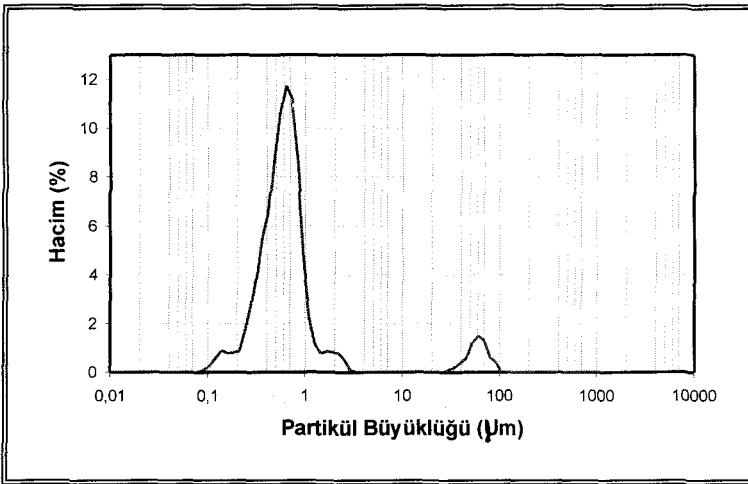
Şekil 3.5. F3 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



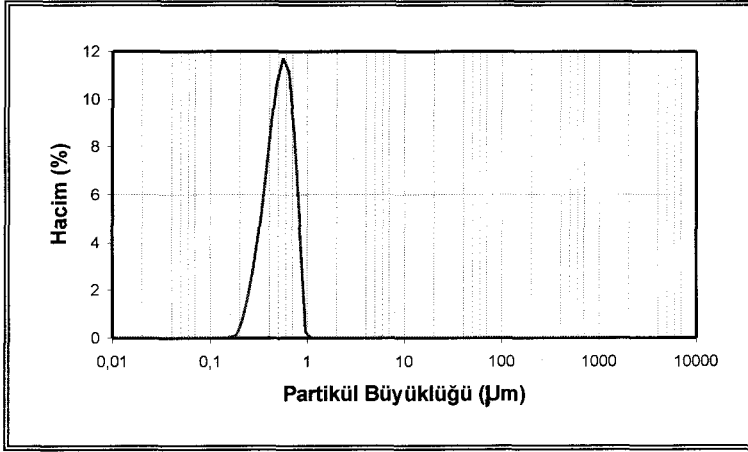
Şekil 3.6. F4 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



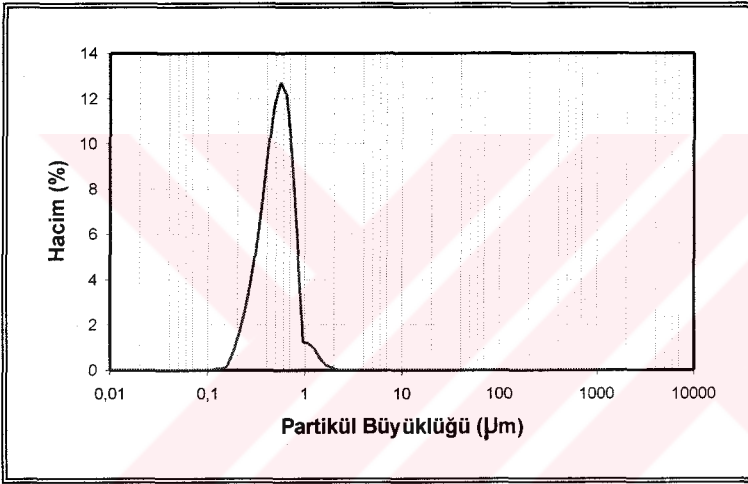
Şekil 3.7. 3 ay sonunda F4 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



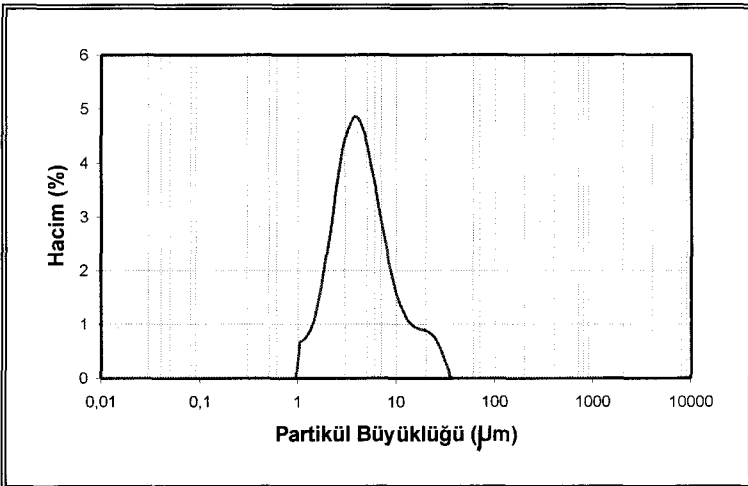
Şekil 3.8. Liyofilize toz halinde 3 hafta bekledikten sonra F4 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



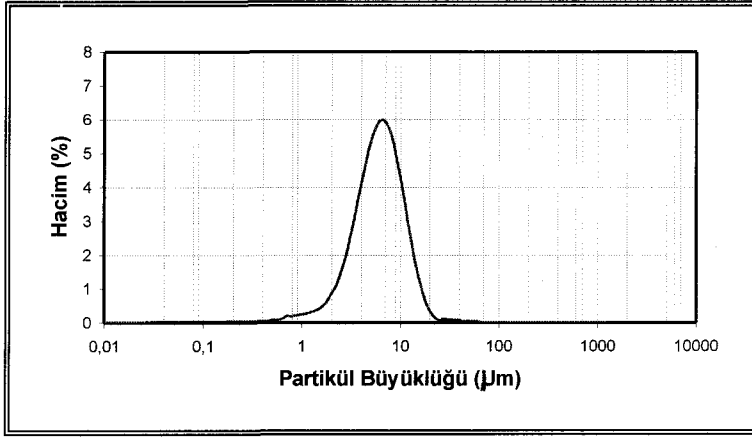
Şekil 3.9. F5 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



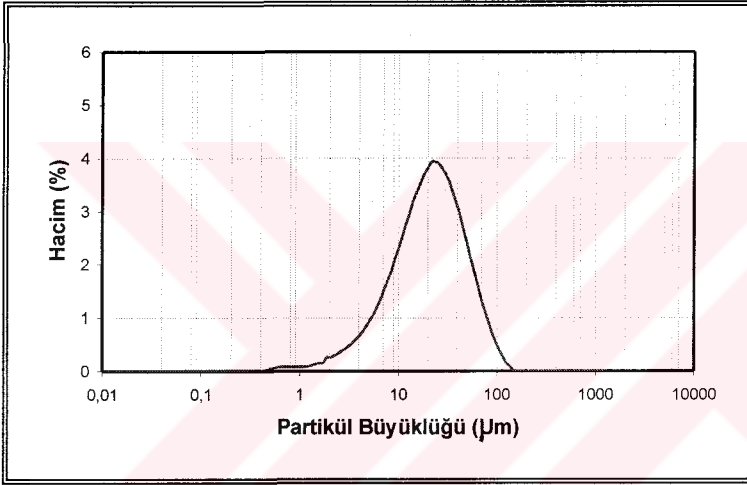
Şekil 3.10. F6 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



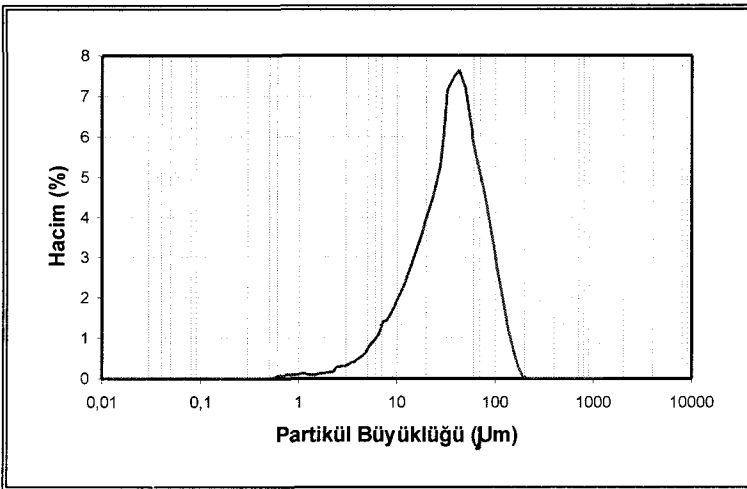
Şekil 3.11. F7 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



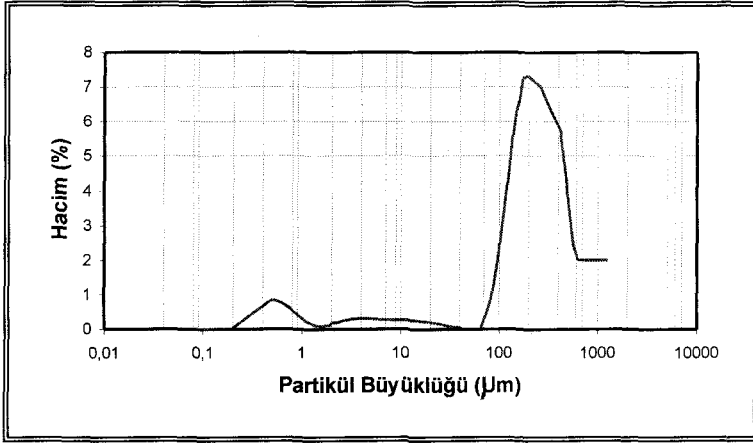
Şekil 3.12. F8 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



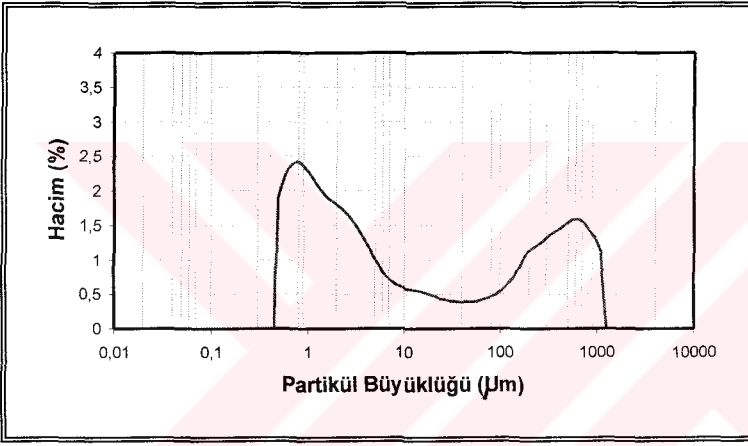
Şekil 3.13. F9 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



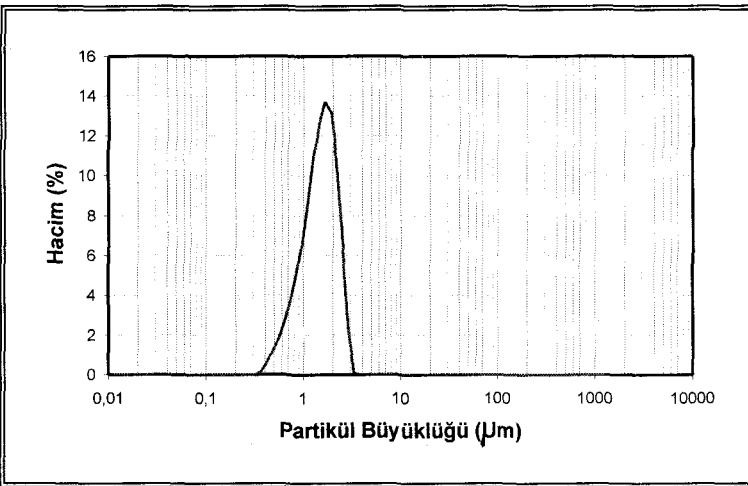
Şekil 3.14. F10 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



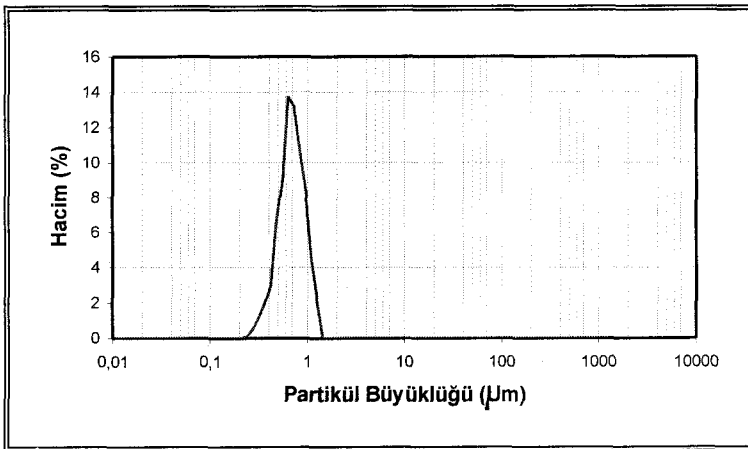
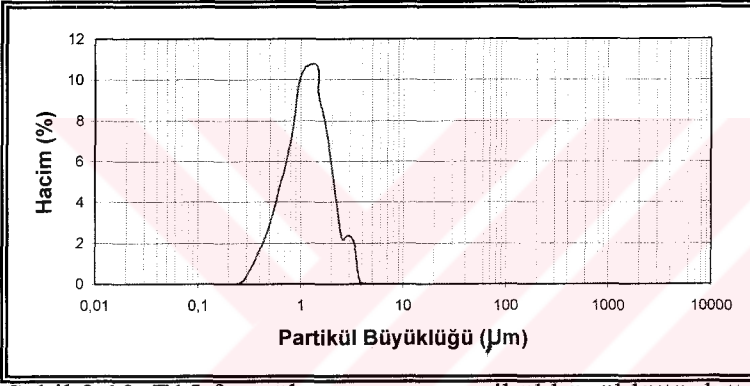
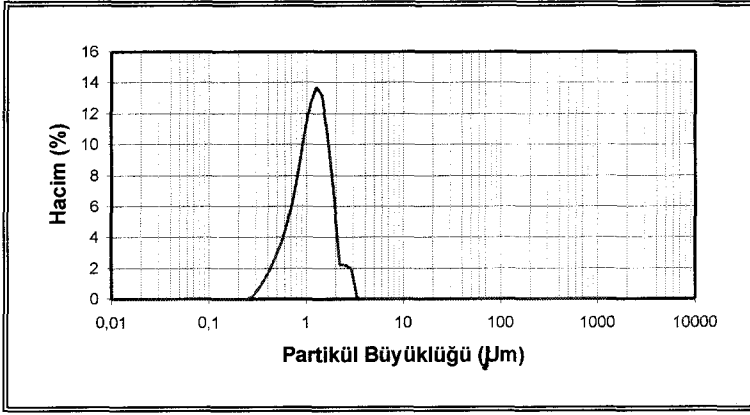
Şekil 3.15. F11 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.

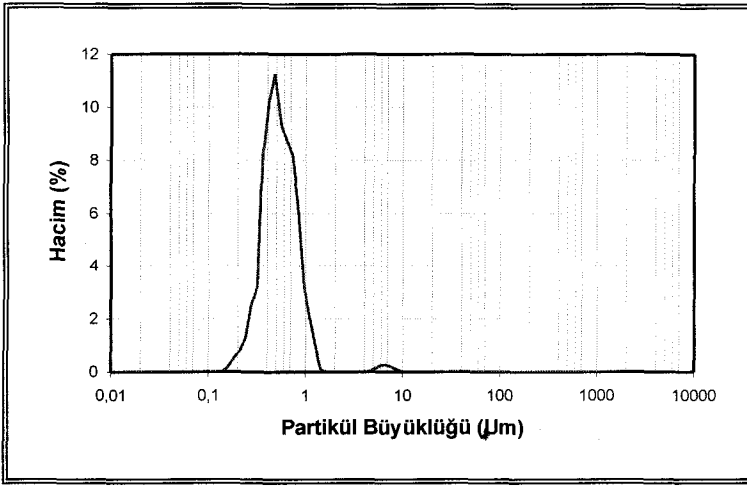


Şekil 3.16. F12 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.

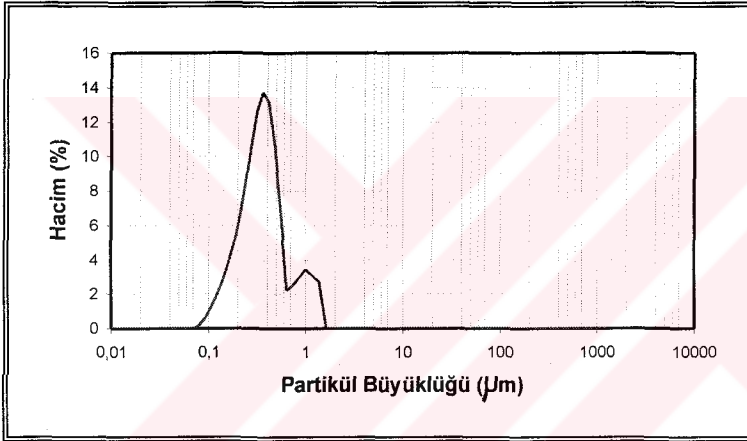


Şekil 3.17. F13 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.





Şekil 3.21. F17 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.



Şekil 3.22. F18 formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı.

3.3.3. Zeta Potansiyel Değerlerinin Tayinine İlişkin Bulgular

Taze hazırlanmış nanopartiküllerin, bölüm 2.2.4.3.'de açıklandığı şekilde zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür (Tablo 3.6.). Zeta Sizer 3000 HSA ile boyutları 10-3000 nm arasındaki nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümleri mümkündür. Bu nedenle bu boyutları aşan numunelerde ölçüm yapılamamıştır. 3 ay boyunca PBS tamponu içerisinde bekletilen F4 formülasyonundan veri elde edilememesinin nedeni partikül büyüklüğünün artarak cihazın ölçüm sınırları dışına çıkmasıdır. F17'den sonuç alamamamızın nedeni ise numunenin konsantrasyonunun az gelmesinden dolayı cihazın set değerlerine ulaşamamasından kaynaklanmıştır.

Tablo 3.6. Formülasyonların zeta potansiyel değerleri.

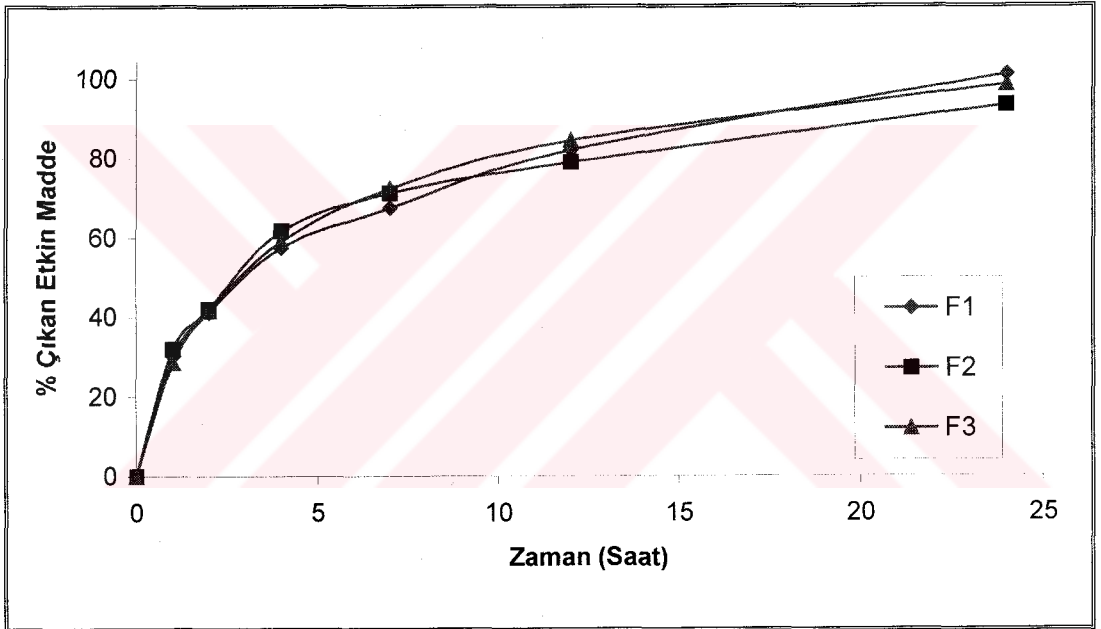
Formülasyon No	Formülasyon Durumu	Zeta Potansiyeli
F1	Taze hazırlanmış	+ 12 mV
F2	Taze hazırlanmış	+ 10 mV
F3	Taze hazırlanmış	+ 9 mV
F4	Taze hazırlanmış	+ 18 mV
F5	Taze hazırlanmış	+ 13 mV
F6	Taze hazırlanmış	+ 13 mV
F16	Taze hazırlanmış	+ 34 mV
F17	Taze hazırlanmış	Okunamadı ^a
F18	Taze hazırlanmış	+ 31 mV
F1	3 ay boyunca +4°C'de disperse halde bekletilmiş (pH 5.5)	+10 mV
F4	3 ay boyunca +4°C'de disperse halde bekletilmiş (pH 5.5)	+ 12 mV
F4	3 ay boyunca +4°C'de disperse halde bekletilmiş (pH 7.4)	Okunamadı ^b

a: Cihaza uygulanan örnek konsantrasyonu ölçüm için yeterli olmamıştır.

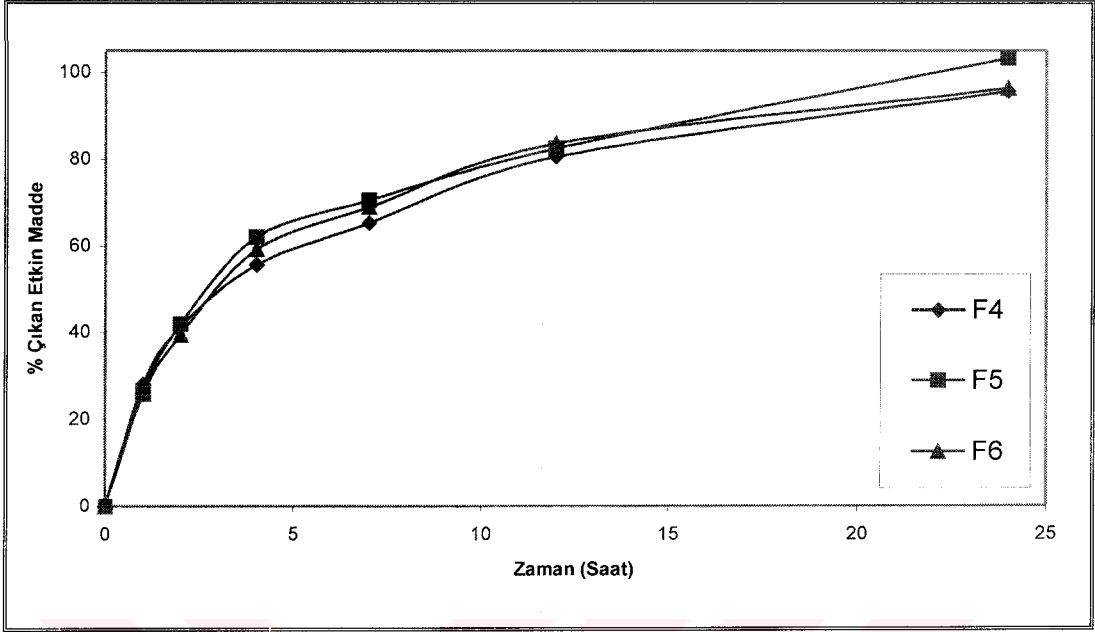
b: Partiküler yapı artarak cihazın ölçüm sınırlarının dışına çıkmıştır.

3.3.4. Nanopartiküllerden *In-vitro* pDNA Salımına İlişkin Bulgular

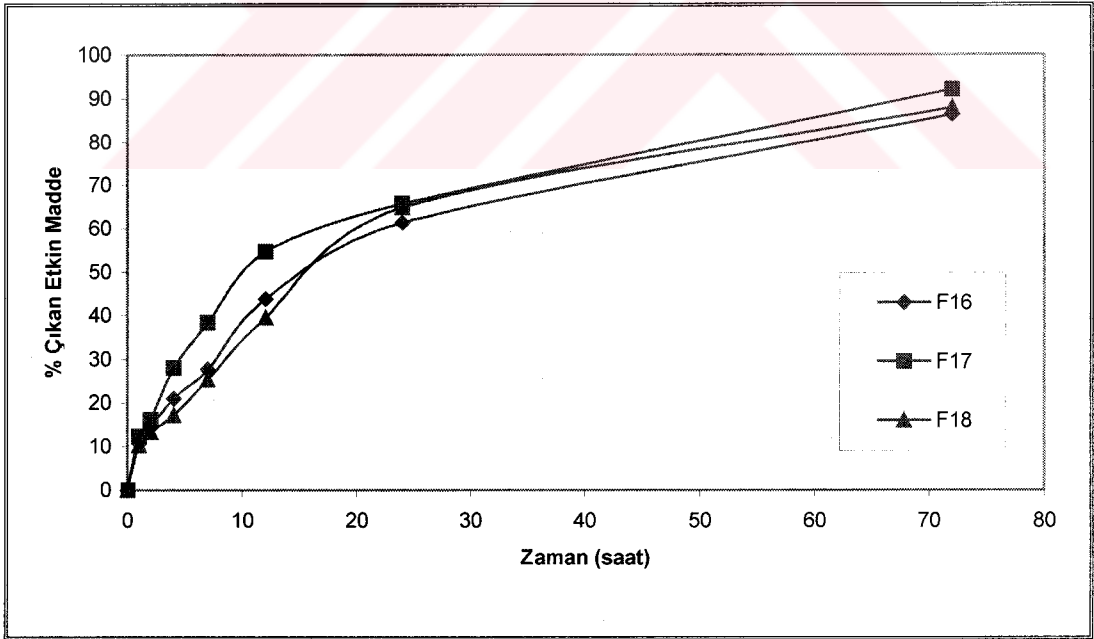
Nanopartiküllerden boyutları 450-820 nm arasındaki formülasyonlardan (F1-F6, F16-F18), PBS tamponu (pH 7.4) içeren ortama salınan pDNA miktarları 24-96 saat boyunca izlenmiş, salınan miktarlar bölüm 2.2.4.4.'e göre hesaplanmıştır. Salınan pDNA miktarlarının kümülatif yüzde değerleri hesaplanarak, zamana karşı grafiklendirilmiştir (Şekil 23-Şekil 25).



Şekil 3.23. Kompleks koaservasyon yöntemi ile 1:2 (pDNA:kitozan) oranında hazırlanan formülasyonların PBS tamponu içerisindeki *in-vitro* salım grafiği.



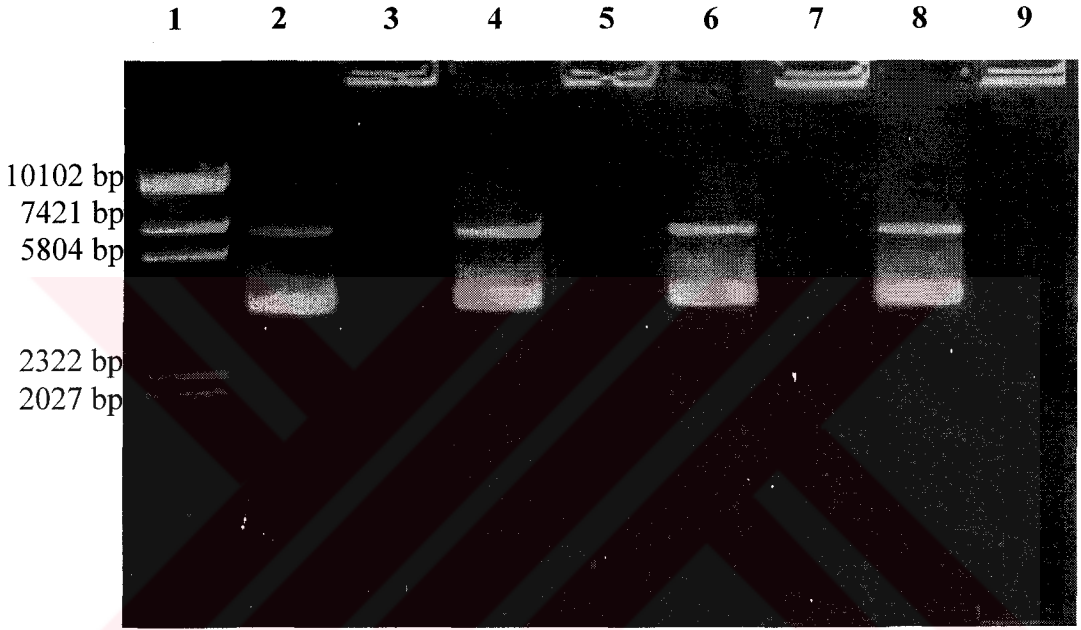
Şekil 3.24. Kompleks koaservasyon yöntemi ile 1:1 (pDNA:kitozan) oranında hazırlanan formülasyonların PBS tamponu içerisindeki *in-vitro* salım grafiği.



Şekil 3.25. Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonların PBS tamponu içerisindeki *in-vitro* salım grafiği.

3.3.5. Jel Elektroforez Görüntülerine İlişkin Bulgular

pDNA ile kitozan arasında kompleks oluşumunun gerçekleştiğinin belirlenmesinde agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır. Kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan formüller (F1-F12) ile çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formüllerin (F13-F18) kompleks oluşumunun belirlendiği jel elektroforez deneyine ait fotoğraflar Şekil 3.26 ve Şekil 3.27’de yer almaktadır.



Şekil 3.26. F1-F4 kodlu formülasyonların, jel elektroforez görüntüleri.

1: DNA marker

2: F1 + Kitozanaz enzimi (1 Ünite)

3: F1 (1:1, pDNA:kitozan)

4: F2 + Kitozanaz enzimi (1 Ünite)

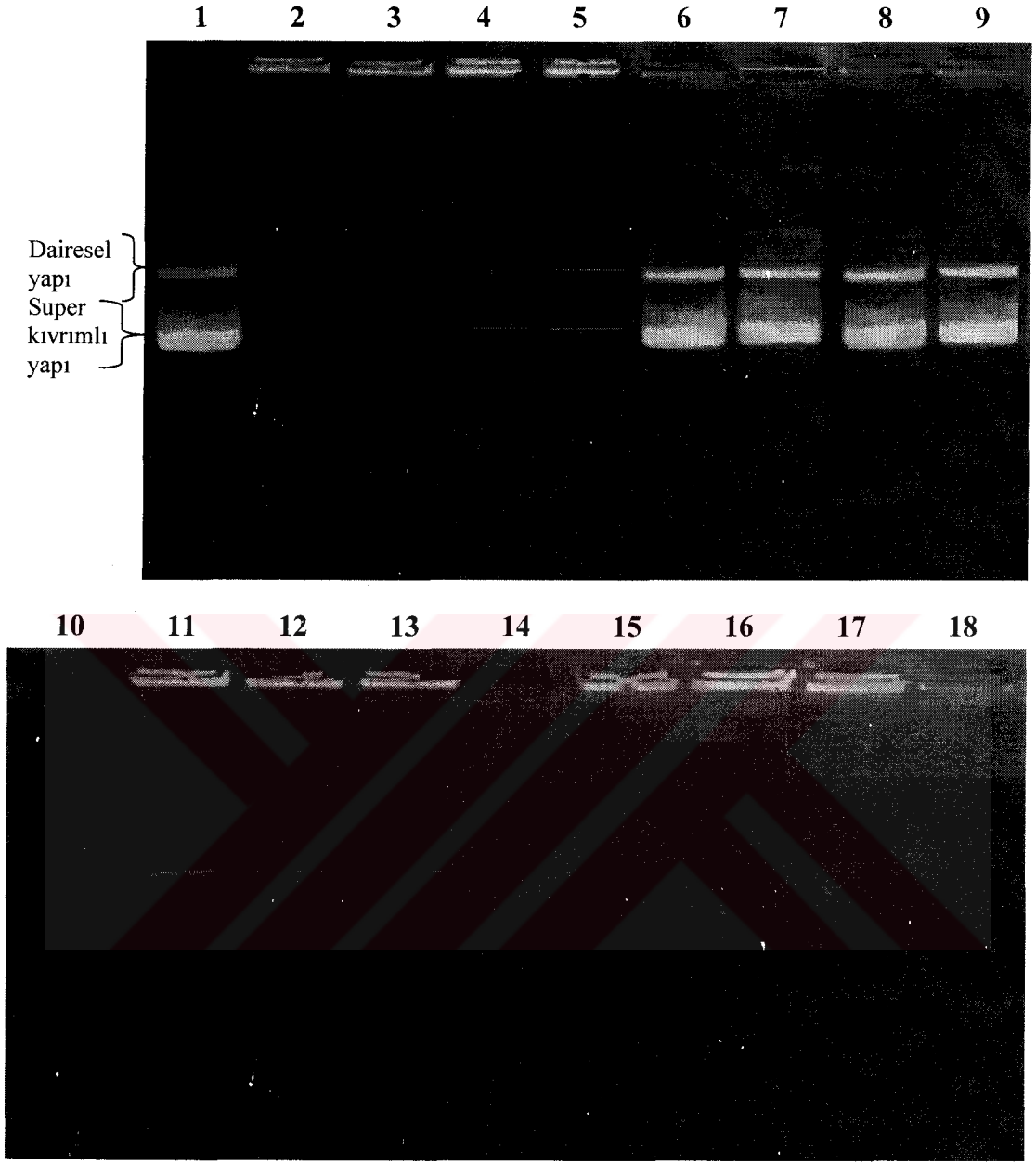
5: F2 (1:1)

6: F3 + Kitozanaz enzimi (1 Ünite)

7: F3 (1:1)

8: F4 + Kitozanaz enzimi (1 Ünite)

9: F4 (1:2)

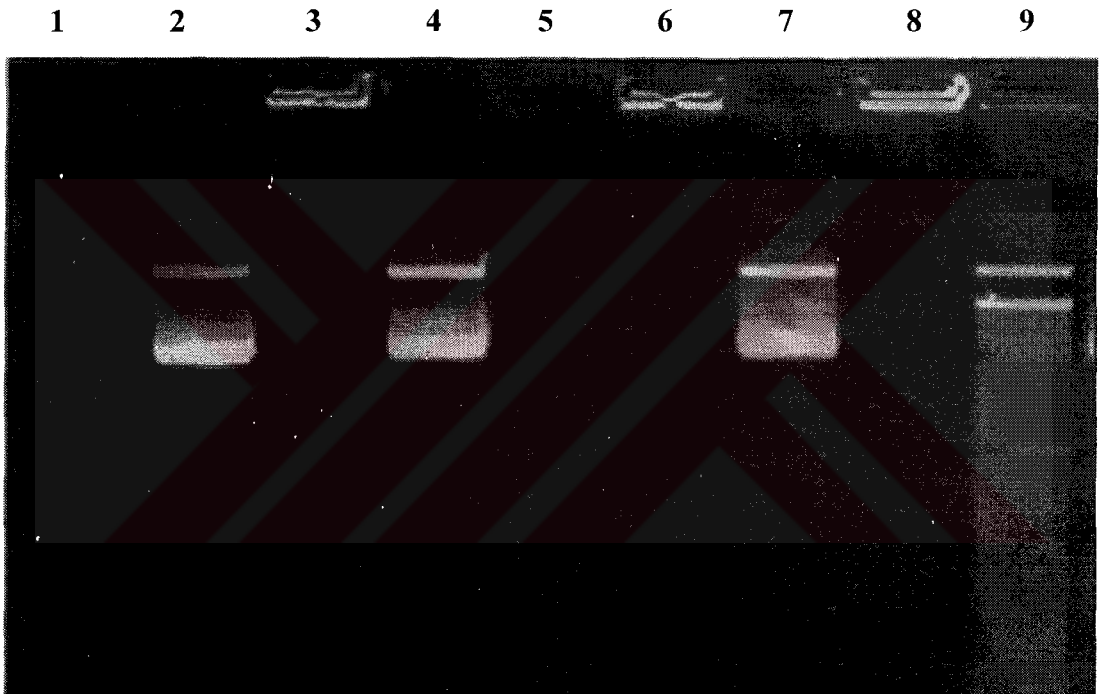


Şekil 3.27. F5-F18 kodlu formülasyonların, jel elektroforez görüntüleri.

- | | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 1: serbest pDNA | 10: boş |
| 2: F5 (1:2, pDNA:kitozan) | 11: F13 (çözücü buh. yönt./ DDAB) |
| 3: F6 (1:2) | 12: F14 (çözücü buh. yönt./ DDAB) |
| 4: F7 (2:1) | 13: F15 (çözücü buh. yönt./ DDAB) |
| 5: F8 (2:1) | 14: boş |
| 6: F9 (3:1) | 15: F16 (çözücü buh. yönt./ PLL) |
| 7: F10 (1:3) | 16: F17 (çözücü buh. yönt./ PLL) |
| 8: F11 (5:1) | 17: F18 (çözücü buh. yönt./ PLL) |
| 9: F12 (1:5) | 18: boş |

3.3.6. F1 ve F4 Formüllerinin DNaz I Enzimine Karşı Dayanıklılığı

Gen aktarım çalışmalarına ışık tutulabilmesi amacıyla yüksek oranda enkapsülasyona ulaşılmış olan F1 ve F4 formülasyonları (Tablo 2.4.) seçilmiş ve uygulama bölüm 2.2.5.1.'e göre gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.28.'de gözlenen jel elektroforezinde formüllerin pDNA'yı enkapsüle ettikleri (bant 3) ve DNaz I enziminin koruduğu izlenmektedir (bant 7 ve bant 9). Kitozanaz enziminin pDNA'ya zarar vermeden nanopartikül yapısından ayırdığı (bant 4) ve serbest pDNA'nın DNaz I enzimi ile parçalandığı (bant 5) kontrol olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.28. DNaz I enzimi ile muamele edilmiş formülasyonların jel elektroforez görüntüsü.

2: pDNA

3: F4

4: F4 + kitozanaz enzimi (1 Unite)

5: pDNA + DNaz I enzimi (4 µg/mL)

6: F4 + DNaz I enzimi (4 µg/mL)

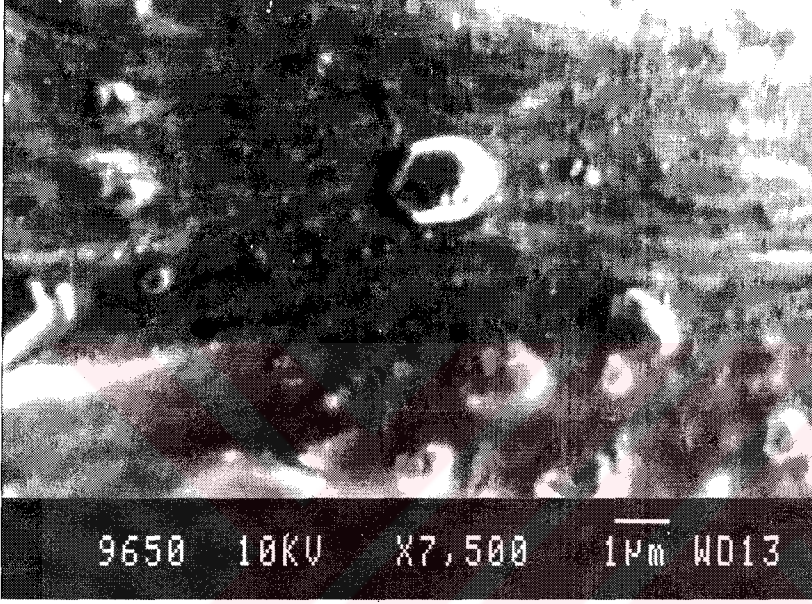
7: [F4 + DNaz I enzimi (4 µg/mL)] + kitozanaz enzimi (1 Unite)

8: F1 + DNaz I enzimi (4 µg/mL)

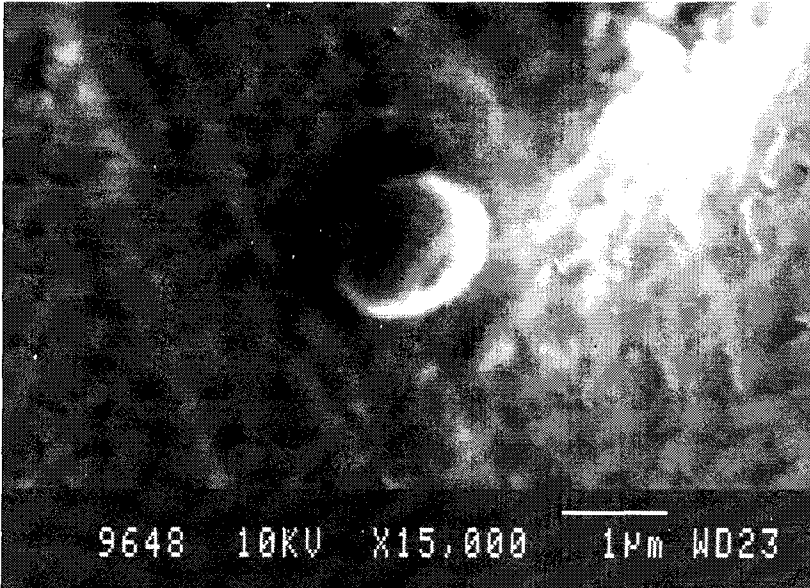
9: [F4 + DNaz I enzimi (40 µg/mL)] + kitozanaz enzimi (1 Unite)

3.3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülerine İlişkin Bulgular

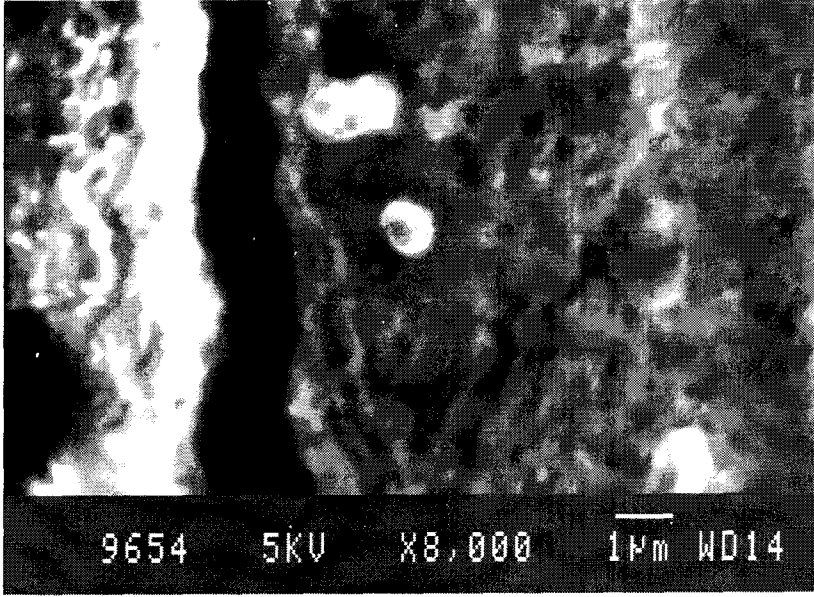
Kompleks oluşumunun sağlandığı oranlarda, yüksek enkapsülasyon verimi gösteren, ortalama partikül büyüklükleri sırasıyla 852 nm ve 749 nm olan, F1 ve F4 kodlu formülasyonların taramalı elektron mikroskobundaki görünimleri bölüm 2.2.6.'da anlatıldığı şekilde fotoğraflanmıştır.



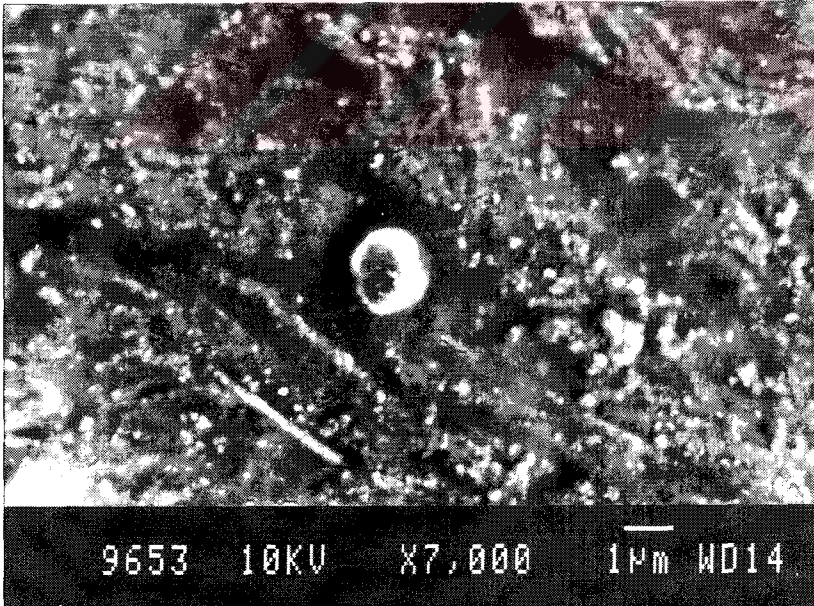
Şekil 3.29. F1 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı.



Şekil 3.30. F1 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı



Şekil 3.31. F4 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı



Şekil 3.32. F4 kodlu formülasyonun SEM fotoğrafı

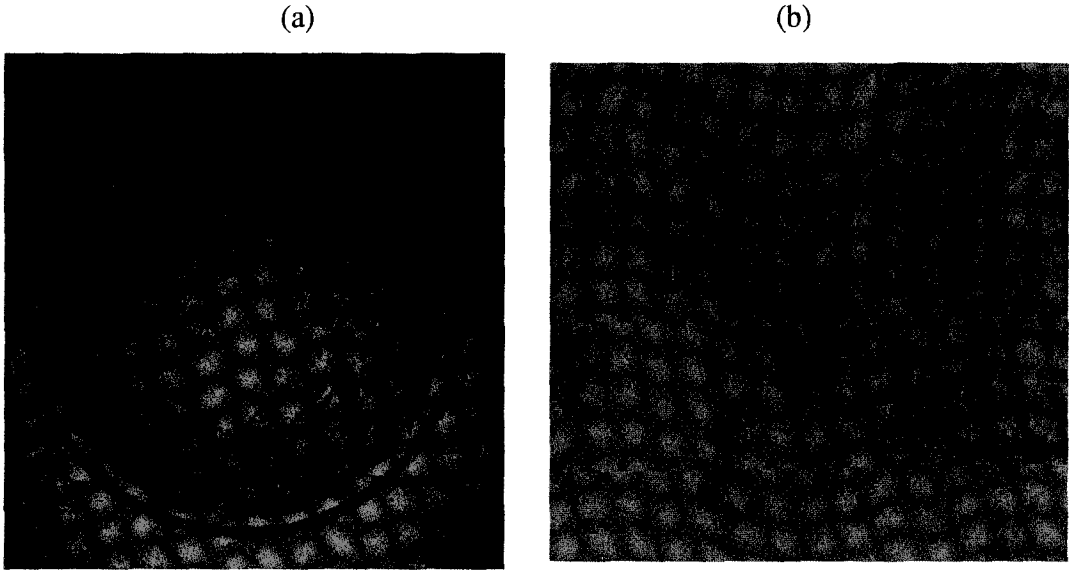
3.3.8. Nanopartiküllerden Gen Aktarım Etkinliğine İlişkin Bulgular

Kiang ve arkadaşlarının (2002) yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitozanın gen aktarımına olumlu etkisi olduğuna ilişkin bulgusu nedeniyle, yüksek deasetilasyon derecesine sahip HMW kitozan ile hazırlanmış F1 ve F4 formülasyonlarında gen aktarım etkinliğinin incelenmesine karar verilmiştir. F1 ve F4 formülasyonları yüksek oranda enkapsülasyon etkinliği göstermiş ve nükleazlara karşı iyi bir koruma sağlamışlardır (Tablo 3.4. ve Şekil 3.28.). Hücre kültürlerine aktarımı tasarlanan bu formülasyonların ilerisi için ön bilgi vermesi ve çalışmaların geçerliliğini göstermek açısından bölüm 2.2.7.'de açıklanan yöntemle göre gen aktarım etkinliği saptanmıştır. Taze hazırlanmış F1, F4 ve liyofilize hale getirilip 3 hafta bekletilen F4 formülasyonu ile kontrol grubu olarak serbest pDNA ve pDNA-PLL kompleksinin (1:2) gen aktarım etkinliği incelenmiştir (Tablo 3.7.). Ayrıca besi yerlerinden birisine ekim yapılmadan prosedür ilerletilmiş ve 24 saat inkübasyon sonunda hiç üreme gözlenmemiştir. Bu da ortamda kontaminasyon olmadığının bir göstergesidir. F4 formülasyonunun gen aktarım çalışmasında ampisilin içeren besi yerinde üreme gözlenmiş ve bu bakterilerin E.coli olduğu gram boyama sonucu gösterilmiştir (Şekil 3.33. ve Şekil 3.34.).

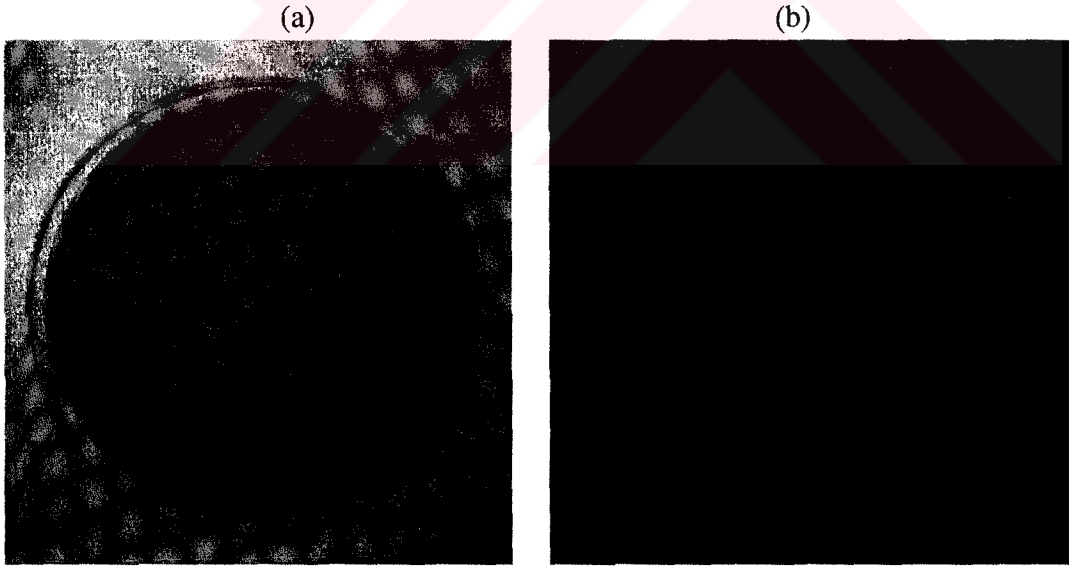
Tablo 3.7. Formülasyonların gen aktarım etkinliğinin spesifik aktivite cinsinden değerlendirilmesi.

Formülasyon No	Formülasyon Durumu	Spesifik Aktivite (Unite/mg) $\pm$ SS
F1	Taze hazırlanmış	75050 $\pm$ 387.8
F4	Taze hazırlanmış	84972 $\pm$ 974.4
F4	3 hafta boyunca +4°C'de liyofilize toz halinde bekletilmiş	92226 $\pm$ 234.0
pDNA	- 45°C'de bekletilmiş	308 $\pm$ 2.2
PDNA:PLL (1:2)	Taze hazırlanmış	1202 $\pm$ 9.4

(n = 3)



Şekil 3.33. (a) Ampisilin içeren katı LB besiyerinde gen aktarımı gerçekleştiren F4 formülasyonu. (b) İmmersiyon objektifi altında, oluşan kültürlerin *E.coli*'ye ait olduğunu gösteren pembe kok görüntüsü.



Şekil 3.34. (a) Ampisilin içeren katı Mc Conkey agarda gen aktarımı gerçekleştiren F1 formülasyonu. (b) İmmersiyon objektifi altında, oluşan kültürlerin *E.coli*'ye ait olduğunu gösteren pembe kok görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Gen tedavisi çalışmalarının önemi giderek artmakta olup, gen tedavisi uygulamaları için viral ve viral olmayan DNA taşıyıcı sistemler ve yöntemler geliştirilmektedir.

Viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin ilki olan lipozomal formülasyonlar; dayanıklı olmamaları, agregasyona yatkınlıkları, serum bileşenleri ile inaktivite olmaları ve kısa bir yarı ömre sahip olmaları gibi sakıncalar içermektedirler (Bozkir ve Kocyigit, 1995; Bozkir ve Duman, 1996). Bu nedenle polimerik taşıyıcı sistemler üzerinde oldukça yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

4.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesinin Değerlendirilmesi

Genetik materyal ile yapılan çalışmalardan önce ortam etanol ile temizlenmiş ve UV lambası altında ortamın sterilizasyonu korunmuştur. Laminar flow altında yapamadığımız çalışmalar ise bir bek alevinin yanında gerçekleştirilmiştir. Üretim ve saflaştırma sırasında kültürde sadece E.coli üremesi ve ekim yapılmayan kültür disklerinde üreme gözlenmemesi kontaminasyon olmadan çalışmaların gerçekleşebildiğini göstermektedir.

Çoğaltmış olduğumuz pDNA'yı saflaştırmak için Sambrook ve arkadaşlarının (1989) belirlemiş olduğu alkali ile lizis yönteminden ve Promega'dan temin edilen saflaştırma kitinden yararlanılmıştır. Tablo 3.1'deki sonuçlara göre her iki yöntemden de oldukça yüksek verim elde edilmiştir. Alkali ile lizis yöntemiyle daha az hacimde ürün elde edilmiştir. Ayrıca, saflaştırma kitine göre daha uzun ve daha dikkatli çalışma yapılması gerekmektedir. Saflaştırma kitinin pahalı olması ve uygun ekipman olmadığında çalışma yapılamaması nedeniyle alkali ile lizis yöntemi tercih edilmelidir.

4.2. Kitozan Üzerinde Yapılan Çalışmaların Değerlendirilmesi

Fluka tarafından üç farklı molekül ağırlığında temin edilen kitozan polimerine ait, etkin maddeyi hapsetme, salım sağlaması ve formülasyon stabilitesi üzerinde oldukça etkili olan molekül ağırlığı ve deasetilasyon dereceleri gibi bilgiler firma tarafından açıklanmamıştır.

Kitozan ile DNA yapısının yüksek verim ile bağlanmasında, deasetilasyon derecesinin doğru orantılı olarak etkilediği ve gen aktarım mekanizmasında da etkin bir parametre olduğu bildirilmektedir (Kiang ve ark.,2002). Kitozanların deasetilasyon derecesinin ve molekül ağırlığının; çözeltisinin hazırlanmasında (Illum, 1998; No ve ark., 2000; Singla ve Chawla, 2001), partiküler yapı oluşumunda ve stabilitede etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Borchard, 2001). Bu nedenle çalışmada kullandığımız üç farklı kitozanın deasetilasyon derecesi Bölüm 2.2.2. başlığı altında tayin edilmiş ve MMW kitozan ile LMW kitozanın deasetilasyon dereceleri yaklaşık aynı bulunmuştur (Sırasıyla %83.94 ve %82.06). %89.02 ile HMW kitozanın deasetilasyon derecesi nispeten daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle gen aktarım çalışmaları ile stabilite hakkında fikir elde etmek için HMW kitozan ile hazırlanmış nanopartiküller kullanılmıştır. HMW kitozanın diğer kitozan çeşitlerine göre daha hızlı çözündüğü bulunmuştur. Bu da deasetilasyon derecesinin çözünürlük üzerine olumlu katkısı olduğunu doğrulamaktadır.

4.3. DNA Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesinde Etkili Parametrelerin Değerlendirilmesi

4.3.1. Emülsiyonlarda Çapraz Bağ Oluşturulması Yöntemi

İlk tasarlanan formüllerde, iki ayrı faz yüzey etkin madde yardımıyla emülsiyonların hazırlanması, genelde sodyum sülfat ile çökme işlemi gerçekleştirilerek katı partiküllerin oluşumu, tasarlanmıştır. Oluşan partikülün stabil olmasını sağlamak amacıyla gluteraldehit ile kitozanın dönüşümsüz olarak kimyasal çapraz bağlar oluşturması sağlanmıştır. Mide sıvısında dahi stabilitesini koruyan (Felt ve ark.,

1998) bu partiküllerin istenilen büyüklükte elde edilememeleri nedeniyle farklı yöntemler ile çalışmalara devam edilmiştir. Tian ve Groves'in (1999) belirttiği yöntem üzerinde yapılan modifikasyon ile 700-1000 nm arasında partikül elde edildiği düşünülmüştür. Fakat gluteraldehitin toksik etkileri göz önüne alınarak kullanılan yöntemlerden gluteraldehitin tamamen uzaklaştırılması olanaksız olduğundan, gluteraldehit içeren formülasyon geliştirme fikri terk edilmiştir.

4.3.2. Kompleks Koaservasyon Yöntemi

Daha basit ve etkin bir yöntem olan iyonik etkileşimden yararlanarak formülasyonlar geliştirilmiştir. pDNA'nın fosfat gruplarından kaynaklanan "-" yük ile kitozanın amin gruplarının organik asitler ile muamele edilmesiyle, proton kazanmasına bağlı, "+" yüklü çözeltileri arasında iyonik bağlar oluşturarak formülasyonlar tasarlanmıştır.

Pozitif yüklü kitozan çözeltilerini hazırlamak için %1'lik asetik asit çözeltisinden yararlanılmıştır. Glasiyel asetik asit ve suda çözünmeyen kitozanın, seyreltik asetik asit çözeltileri ile muamele edilerek çözündüğü bildirilmektedir (Illum, 1998). Bu şekilde hazırlanan 100 mL'lik çözeltiler, manyetik karıştırıcı yardımı ile ancak 4-5 saatte elde edilmiştir. Bu problemin üstesinden gelmek için kitozan yapısı incelenmiş ve çözünmeyi hızlandırmak için kitozanın glukozamin ünitelerinde yüksek miktarda bulunan amino gruplarının proton kazanması gerektiği düşünülmüştür. Borchard (2001), bu amino gruplarının düşük ve fizyolojik pH'larda tüm amino gruplarının proton kazanmadığını, ancak pH 6 ve altındaki yakın değerlerde tüm amino gruplarının proton kazandığını bildirmektedir. Bu bilgiden yararlanılarak kitozanların pH 5.5'ta optimal çözünme sağladığı gözlenmiştir.

Lee ve arkadaşları (1998), hidrofobik modifiye kitozan ile deoksikolik asiti karıştırdıklarında kendi kendine çöken 160 nm boyutlarında küreler elde etmişlerdir. Kompleks koaservasyon metodu ile pDNA ile kitozan karıştırıldığında benzer sonuçlar elde edileceği düşünülmüştür. Bu şekilde hazırlanan formülasyonlarda kısa zaman içerisinde oluşabilecek faz ayırımları ve kolloidal kompleks çökmelerini

engellemek için sodyum sülfat çözeltisinin kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır (Mao ve ark., 1996; Roy ve ark., 1997).

Nanopartikül elde etmek için; 50 mM sodyum sülfat çözeltisi içerisindeki 100 µg/mL pDNA ile eşit hacimde, pH 5.5'e getirilmiş kitozan çözeltisi 55°C'ye ısıtılıp, bu sıcaklıkta karıştırılmıştır. En uygun pDNA-kitozan oranı 1:1 ve 1:2 olarak bulunmuştur. Daha farklı oranlarda ise daha büyük partiküller elde edilmiştir (Tablo 3.5.). Oran 3 katın üzerine çıktığında partikül elde edilememiştir (Şekil 3.13. ve Şekil 3.14.). Bu değerlendirmeler bölüm 3.3.5.'te verilen jel elektroforez görüntüleri ile doğrulanmıştır (Şekil 3.26. ve Şekil 3.27.).

4.3.3. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak da formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu yöntemde en önemli kriter organik çözücünün ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Uzaklaştırılamayan etanol artığının toksik etkilere neden olabileceği bilinmektedir. Rotavapor cihazı uzun zaman kullanıldığında dahi formülden etanol tamamen uzaklaştırılamamaktadır. Manyetik alan içerisindeki desikatör, vakum pompasına bağlanmış ve kademeli olarak artırılan ısı ve azaltılan basınç uygulaması ile etkin bir buharlaştırma gerçekleştirilmiştir. Formülasyonda pDNA ile etkileşen DDAB kullanıldığında, mikron boyutlarında partiküller elde edilmiştir (1450-1585 nm). PLL kullanımında ise 450-650 nm boyutlarına ulaşılmıştır. Ancak PLL'nin toksik etkileri göz önüne alınacak olursa yerine daha az toksik bir katyonik madde kullanılması uygun olacaktır. Bu nedenle PLL ile hazırlanan formülasyonların hücre kültürleri ile yapılacak çalışmalarda olumsuz sonuç doğurabileceği düşünülmektedir.

4.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

4.4.1. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Genelde tüm formülasyonların yüksek oranda enkapsülasyon gerçekleştirdikleri görülmüştür. Leong ve arkadaşlarının (1998) yapmış olduğu çalışma sonucunda pDNA enkapsülasyonun %98 oranında gerçekleştiğini saptamışlardır. Elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışma ile uyum göstermektedir. Molekül ağırlıkları karşılaştırıldığında LMW kitozanın, MMW kitozana göre daha çok etkin maddeyi enkapsüle ettiği gözlenmiştir. Yüksek molekül ağırlığına sahip kitozanın düşük molekül ağırlığına sahip kitozan gibi yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olması ise daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

4.4.2. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Analizlerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen submikron partiküllerin dağılımları incelendiğinde dar bir aralıkta gerçekleştikleri görülmektedir (Şekil 3.3.-3.20). Bu tekdüze dağılımı sağlamak için kitozanın tamamen çözünmesi ve oluşan çözeltinin mutlaka 0,2 µm'lik filtreden geçirilmesi gerekmektedir. Ayrıca aseptik filtrasyon ile bakteriyolojik kontaminasyonların da önüne geçilmiştir. Mao ve arkadaşları (2001), kompleks koaservasyon ile hazırlanan formüllerde, elde edilen ürünün toplam hacminin 500 µL'nin üzerine çıkılmadığında tekdüze bir dağılım gerçekleştiğini bildirmektedir. Bizim hazırladığımız F1-F6 formülasyonlarında ise 3 mL hazırlandığında dahi tekdüze dağılım gözlenmiştir. Endüstriyel bir üretim söz konusu olduğunda bazı parametrelerin gözden geçirilmesinde fayda bulunmaktadır.

Kompleks koaservasyon metodu ile hazırlanan formüllerde en uygun pDNA:kitozan oranı 1:1 ve 1:2 olarak bulunmuştur (Şekil 3.26. ve Şekil 3.27.). pDNA:kitozan'ın 1:1 oranında daha küçük partiküller elde edilmiştir. En küçük partiküller ise F16-F18 formüllerinde elde edilmiştir (Tablo 3.5.).

4.4.3. Zeta Potansiyel Analizlerinin Değerlendirilmesi

Partikülün yüzey yükünün ifadesi olan zeta potansiyelin, sıfırdan farklı olması istenir. Nötr değerdeki partikülün stabilitesi oldukça zayıftır. +30 mV ile -30 mV üzerindeki zeta potansiyel değerlerine sahip partiküller oldukça stabil kabul edilir. Bu veriler doğrultusunda, çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanan F16-F18 formüllerinin zeta potansiyeli +30 mV'un üzerinde olduğu için oldukça stabil formülasyonlar olarak düşünülmektedir. Bu formüllerin *in-vitro* salım grafikleri incelendiğinde diğer formüller 24 saat sonunda %100 salım gerçekleştirirken, F16-F18 formüllerinin 3 kat daha uzun zaman dilimi içerisinde yapılarını koruyabildikleri gözlenmiştir. Zeta potansiyelin “+” değer göstermesi; kitozan miktarının nanopartikül yüzeyinde daha fazla bulunduğunu, pDNA'nın ise daha çok partikül yapısının içerisinde enkapsüle edilmiş olduğunu düşündürmüştür. Negatif yük özelliği gösteren hücre çeperi ile pozitif yüzey yüküne sahip nanopartiküller ile daha etkin bir taşınma sağlandığı bilinmektedir (Yiu ve ark., 1997).

Zeta potansiyel değerinin, kitozanın molekül ağırlığına bağlı olarak farklılık göstermediği belirlenmiştir. Ancak yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan HMW kitozan ile hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel değerleri de yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar Richardson ve arkadaşlarının (1999) elde ettiği zeta potansiyel sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu amaçla formülasyonların dayanıklılıklarının araştırılmasında, HMW kitozan ile hazırlanmış F1 ve F4 formülasyonlarının değerlendirilmesi tercih edilmiştir.

4.4.4. *In-vitro* pDNA Salımının Değerlendirilmesi

In-vitro ortamda etkin olan viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin *in-vivo* koşullarda aynı etkinliği gösterememesine rağmen, nanopartikül boyutlarında elde edilen formülasyonlar hakkında bir fikir elde etmek için 24-96 saat boyunca PBS tamponu (pH 7.4) içeren ortama salınan pDNA miktarı izlenmiştir.

In-vitro salım çalışmalarının 24 saat içinde tamamlanmasında, formülasyonun pH 7.4'te stabil olmadığı bir göstergesidir. Bizim sonucumuza tamamen zıt bir sonuç olarak, Ozbas ve arkadaşlarının (1999) yapmış oldukları çalışmada kitozan-pDNA mikropartiküllerinin pH 7.4'te 50 gün boyunca *in vitro* salım gerçekleştirdiği bildirilmektedirler. Fakat pH 5.5'te daha stabil bir yapının olduğu (Hirosue ve ark., 2001; Mao ve ark., 2001) ve pH 7.4'te ise bir günden az bir zamanda yapının bozulduğu (Borchard, 2001) sonucu, bizim bulgularımızı tamamen desteklemektedir. Pan ve arkadaşlarının (2002) hazırlamış oldukları insülin-kitozan nanopartiküllerinde, pH 7.4'te *in vitro* salımın 5 saat sonunda tamamlandığı bildirilmektedir. Ayrıca, partikül boyutunun küçük olduğu durumlarda pDNA'nın daha fazla orandaki yüzey ile etkileşmesi nedeniyle, küçük partiküllerin büyük partiküllere oranla daha hızlı salım gösterdiği bildirilmektedir (Capan ve ark., 1999).

Çalışmamızda amacımız, biyolojik materyalin etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak taşınmasını sağlayacak formülasyonun geliştirilmesidir. Kontrollü salım sağlanması için bir kaygımız bulunmamaktadır. Bu nedenle kısa sürede salımın gerçekleşmesi çalışmamızda arzu edilmeyen bir durum teşkil etmemektedir. Aksine kısa sürede salımın gerçekleşmesinin, hedeflenen hücre içerisine alınan nanopartiküllerin, pDNA'yı endozomal yapılar içerisinden sitoplazmaya aktarmasında önemli bir kriter olduğu belirtilmiştir (Higgins ve Portnoy, 1998; Curiel, 1994).

4.4.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Jel Elektroforez Görüntülerinin Değerlendirilmesi

pDNA'nın taşıyıcı formülasyonlara yüklenmesi genellikle iyonik etkileşimlerden yararlanarak yapılmaktadır (Borchard, 2001; Farhood ve ark., 1994; Gao ve Huang, 1996). Bu çalışmada da kitozan ve pDNA'nın zıt yüklerinden yararlanarak formülasyon tasarlanmıştır. pDNA:kitozan arasında kompleks oluşumu ile ilgili olarak yapılan jel elektroforez çalışmaların sonucu; en uygun oranın 1:1 ve 1:2 olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.26. ve Şekil 3.27.). Şekil 3.27.'deki 6,7,8 ve 9 nolu

bantlarda gözlenen serbest pDNA, pDNA:kitozan oranının artmasının kompleks oluşumunun gerçekleşmesinde etkili olmadığını göstermiştir.

Jel elektroforez çalışmalarında serbest pDNA veya kompleks oluşmayan formülasyonların bantlarındaki pDNA görüntüleri iki hat olarak gözlenmiştir. Bu durum pDNA'nın farklı formlarda bulunduğunu göstermektedir. Açık dairesel ve süper kıvrımlı (supercoiled) formlarının formülasyonlara beraberce katıldığı düşünülmüştür. Bergan ve arkadaşları (2000) bu durumun *in-vivo* çalışmalarda olumsuz bir etki yaratmayacağını öne sürmüştür. pDNA'nın farklı formları ile kompleks oluşturmuş ve bunların gen aktarım etkinliğini değerlendirmiş, açık dairesel plazmid formu ile süper kıvrımlı plazmid formunun aynı gen aktarım etkinliğine sahip olduğunu göstermiştir.

4.4.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Dayanıklılıklarının Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonlar içerisindeki pDNA'nın biyolojik dayanıklılığını değerlendirmek amacıyla bölüm 2.2.5.1.'e göre örnekler DNaz I enzimiyle muamele edilmiştir. Serbest DNA'nın serum nükleazları tarafından parçalandığı bilinmektedir (Granner, 1993a) ve DNA'nın fizyolojik ortamda nükleazların etkisinden korunması taşıyıcı sistemler için yerine getirilmesi gereken bir koşuldur.

Serbest DNA, 4 µg/mL (25 U/mL) DNaz I enzimi varlığında 15 dakika içinde tamamen parçalanmaktadır. F4 formülasyonunun aynı süre zarfında pDNA'yı tamamen koruduğu gözlenmiştir. 1 Ünite kitozanaz enziminin pDNA'ya zarar vermeden nanopartikül yapısından ayırdığı da gözlenmiştir. DNaz I enziminin konsantrasyonu 10 katına çıkarıldığında F4 formülasyonunda az miktarda pDNA'nın yıkıma uğradığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre test edilen konsantrasyondan daha düşük nükleaz konsantrasyonuna sahip fizyolojik koşullarda nanopartikül formülasyonunun pDNA üzerinde belirgin bir koruma sağlayacağı tahmin edilmektedir (Mao ve ark., 2001). Sadece DNaz I enzimi varlığında veya serum varlığında partiküllerin etkileşmelerini incelemek, kesin bir sonuca ulaşmamızı sağlamaz. Hücre kültürü ortamında DNaz I enzimi ve/veya serum ilave ederek gen

aktarım etkinliğinin incelenmesi daha doğru sonuçlara ulaşmamıza neden olacaktır (Legendre ve Sozaka, 1992). Bu nedenle çalışmamızın ileriki aşamasında hem hücre hatlarına hem de primer hücrelere gen aktarım etkinliğinin incelenmesi gerçekleştirilecektir. Hücre hatlarının gerçek vücut fonksiyonlarını tam olarak yansıtamamasından ötürü primer epitel hücre kültürleri hazırlanarak çalışmalar gerçekleştirilecektir (Thanou ve ark., 2002).

4.4.7. Nanopartikül Formülasyonlarının Zaman İçerisindeki Değişiminin Değerlendirilmesi

F4 formülasyonu, pH 5.5’de nanopartikül dispersiyonu halinde +4°C’de 3 ay boyunca saklandığında partiküllerin boyutunda çok küçük bir artış ve zeta potansiyelinde ise küçük bir düşüş gözlenmiştir. Partiküller pH 7.4 tamponu içerisinde saklandığında ise tamamen parçalanmıştır. *İn-vitro* salım çalışmalarının 24 saat içinde tamamlanmasında, formülasyonun pH 7.4’te stabil olmadığına bir göstergesidir. pH 5.5’te daha stabil bir yapının oluştuğu (Hirose ve ark., 2001; Mao ve ark., 2001) ve pH 7.4’te ise bir günden az bir zamanda yapının bozulduğu (Borchard, 2001) sonucu, bizim bulgularımızı tamamen desteklemektedir.

4.4.8. Nanopartikül Formülasyonlarının Liyofilizasyon Etkisi ile Değişiminin Değerlendirilmesi

Formülasyonların uzun zaman saklanması için partiküllerin liyofilize toz halinde saklanması düşünülmüştür. Formülasyonlar %10 mannitol varlığında liyofilize edilmiş, liyofilizasyon sonucunda tekrar disperse edilen formülasyonların gerek partikül büyüklüğü dağılımında gerekse transformasyon veriminde bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, hazırlanan formülasyonların liyofilize toz halinde saklanarak, kullanılacağı zaman PBS tamponunda sulandırarak verilmesi sonucuna varılmıştır.

4.4.9. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan çekimlerde nanometre boyutlarını belirlemek amacıyla uygulanan yakınlaştırma işlemi sırasında, kırılmalar gerçekleşmektedir. Net ve düzgün fotoğraf elde etmek için, örnekleme sırasında formülasyonlar birkaç kez altın ile kaplanmıştır. Bu nedenle elde edilen fotoğraflardaki partiküller normalden daha büyük gözlenmiştir. F1 ve F4 formülasyonlarında taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntülerde, partiküllerin birkaç kat kaplanmasına rağmen mikrometre boyutunun altında olduğu gözlenmiştir.

Partiküllerin çevresindeki ışımlar, birkaç kez kaplamaya bağlı olarak elektron birikmesi ve bunların çekim anında deşarj olmasından kaynaklanmaktadır. Birkaç kez kaplama yapılmasına rağmen, hazırlanan örneklerde düzgün fotoğraflar alınamamıştır. Taramalı elektron mikroskobunun yüksek basınç altında fotoğraflandırılabilmesi nedeniyle, yumuşak olduğu belirlenen polimerimizde sürekli bir hareketlilik ve kırılmalar oluşmaktadır. Düzgün fotoğraflar elde etmek için TEM (transmission electron microscop) veya düşük basınç altında çalışan elektron mikroskoplarından yararlanılması gerekmektedir.

4.4.10. Nanopartikül Formülasyonlarının Gen Aktarım Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonun gen aktarım veriminin doğru olarak elde edilmesi için hücre kültürlerinde çalışma yapılması gerekmektedir. Fakat, bir fikir elde etmek ve yöntemlerin işlevliğini tayin etmek için E.coli hücrelerine gen aktarımı gerçekleştirilmiştir. F1 ve F4 kodlu formülasyonların üzerinde yapılan gen aktarım etkinliği değerlendirmelerine göre F4 kodlu formülün daha yüksek spesifik aktivite değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, taze hazırlanmış ve liyofilize toz haline getirilip 3 ay bekletilmiş F4 formülasyonu ile serbest DNA uygulandığında elde edilen aktiviteden 300 kat, pDNA-PLL kompleksinden ise 60 kat daha fazla bir aktivite elde edilmiştir.

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, model genetik materyal olarak seçtiğimiz pDNA'nın, gen aktarımını gerçekleştirmek amacıyla, nanopartiküler formülasyonlarının tasarımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile, *in-vivo* çalışmalar için yol gösterici nitelikteki temel bilgiler oluşturulmuştur.

Formülasyonları hazırlamak için kullanılan farklı üç yöntemden, özellikle kompleks koaservasyonu ile hazırlanan, pDNA:kitozan komplekslerinin 1:1 ve 1:2 oranlarındaki formülasyonlarında partiküller nanometre boyutlarında elde edilmiştir. Böylece kompleks koaservasyon yöntemi ile pDNA'nın etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak formüle edilebileceği gösterilmiştir.

Çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlarda ise PLL dışında daha güvenilir bir katyonik madde kullanımı ile nanometre boyutlarındaki partiküllerin elde edilebileceği gösterilmiştir.

Formülasyonda kullanılan kitozanın deasetilasyon derecesine de bağlı olarak, F1 ve F4 kodlu formülasyonların pDNA'yı etkin ve dayanıklı olarak enkapsüle ettiği, bu formülasyonların 3 ay boyunca +4°C'de ve pH 5.5'de nanopartikül dispersiyonu halinde dahi dayanıklı kalabildiği belirlenmiştir.

Formülasyonların pH 5.5 değerinde hazırlanmasından dolayı, uygulama sırasında oluşabilecek olumsuz etkiyi önlemek için formülasyonların liyofilize toz haline getirilip, kullanımı sırasında pH 7.4 tamponunda çözeltisinin hazırlanarak uygulanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan liyofilizasyon işleminin partiküler yapıda önemli bir değişiklik meydana getirmediği gösterilmiştir.

ÖZET

Gen Tedavisine Yönelik, DNA-Kitozan Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *In-vitro* Değerlendirilmesi.

Bu tez çalışmasında, model genetik madde olarak seçtiğimiz pDNA'yı etkin, güvenilir ve dayanıklı olarak hücreye taşıyabilecek nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için başlıca; emülsiyonlarda çapraz bağ oluşturulması, kompleks koaservasyon ve modifiye çözücü buharlaştırma yöntemi olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmıştır.

Ampisiline karşı direnç sağlayan ve β -galaktosidaz genleri taşıyan "pSV- β -Galaktosidaz" vektörü ile biyolojik olarak parçalanabilen kitozan polimeri kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları; enkapsülasyon etkinlikleri, partikül büyüklükleri ve dağılımları, zeta potansiyel değerleri ve *in-vitro* salım özellikleri açısından değerlendirilmişlerdir.

Bu değerlendirmelere göre kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırlanan (pDNA:kitozan 1:1 oranında) F1 ve (pDNA:kitozan 1:2 oranında) F4 kodlu formülasyonların istenilen nanopartikül özelliklerine uyduğu saptanmıştır. F1 ve F4 kodlu formülasyonların üzerinde yapılan gen aktarım etkinliği değerlendirmelerine göre F4 kodlu formülün en başarılı spesifik aktivite değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Seçilen F4 kodlu nanopartikül dispersiyonunun 3 ay boyunca +4°C'deki, 3 hafta boyunca ise liyofilize haldeki değişimleri incelenmiştir.

Formülasyon özelliklerinin ve gen aktarım özelliklerinin yüksek olduğu anlaşılan F4 kodlu nanopartikül formülasyonunun, ileride hücre kültürlerinde yapılacak çalışmalarda genetik materyal taşıyıcısı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitozan, pDNA, Nanopartikül, Gen tedavisi

SUMMARY

Development of DNA-Chitosan Nanoparticle Formulations for Gene Delivery and *In-vitro* Evaluation

In this study, investigations have been carried out to prepare nanoparticle formulations which can transfer pDNA as a model genetic material for an active, safe and resistant delivery systems to the cells.

Three different methods were used in order to prepare nanoparticle formulations. These are; crosslink formation in emulsions method, complex coaservation method and modified solvent evaporation method.

Nanoparticle formulations have been prepared with biodegradable chitosan polymer with the pSV- β -Galactosidase control vector that provides resistance to ampicilline. Nanoparticle formulations have been evaluated for their encapsulation efficiency, particle size and distribution, zeta potential values and *in-vitro* release properties.

According to these evaluations we observed that the formulations are coded as F1 (pDNA:Chitosan, 1:1) and F4 (pDNA:Chitosan, 1:2) fit the desired nanoparticle properties. It has been found that F4 formulation has the most succesful specific activity in respect of the gene transfection efficiency which are investigated on the formulations F1 and F4. The changes on the F4 nanoparticle dispersion were investigated at +4°C for 3 months and on the lyophilized form for 3 weeks.

As a result, we can conclude that nanoparticle formulation coded as F4 has good formulation properties with high gene transformation properties and F4 formulation can be used as a transfection vector in the animal cell culture studies

Key Words: Chitosan, pDNA, Nanoparticles, Gene therapy

KAYNAKLAR

- ACIKGOZ, M., KAS, H.S., ORMAN, M., HINCAL, A.A. (1996). Chitosan microspheres of diclofenac sodium: I. application of factorial design and evaluation of release kinetics. *J. Microencap.* **13(2)**: 141-160.
- AKBUGA, J., DURMAZ, G. (1994). Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. *Int. J. Pharm.* **111**: 217-222.
- ALLEMANN, E., GURNY, R., DOELKER, E. (1993). Drug-loaded nanoparticles- preparation methods and drug targeting issues. *J. Pharm. Biopharm.* **39(5)**: 173-191.
- ALONSO, M.J. (1996). Nanoparticulate drug carrier technology. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. Marcel Dekker Inc., New York s:203-242.
- ARDA, M. (1990a). Genetik materyallerin yapısı. Biyoteknoloji: bazı temel ilkeler. KÜKEM derneği bilimsel yayınları, Ankara s: 1-12.
- ARDA, M. (1990b). Gen klonlaması (moleküler klonlama). Biyoteknoloji: bazı temel ilkeler. KÜKEM derneği bilimsel yayınları, Ankara s: 31-49.
- ARDA, M. (1990c). Plasmid ve transpozonlar. Biyoteknoloji: bazı temel ilkeler. KÜKEM derneği bilimsel yayınları, Ankara s: 28-30.
- ARDA, M. (1990d). Klonlamada kullanılan başlıca vektörler. Biyoteknoloji: bazı temel ilkeler. KÜKEM derneği bilimsel yayınları, Ankara s: 63-79.
- BARRON, L.G., MEYER, K.B., SZOKA, F. (1998). Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic-lipid DNA complexes. *Hum. Gene Ther.* **9**: 315-323.
- BARUT, K.D. (2001). Gen tedavisine yönelik, katyonik sürfaktan içeren emülsiyon şeklinde in vivo gen terapötik taşıyıcı sistem üzerinde çalışmalar. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Biyoteknoloji Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.
- BECKER, J.M., CALDWELL, G.A., ZACHGO, E.A. (1990). Aseptic Technique: transferring a culture. *Biotechnology a Laboratory Course*. Academic Press, Inc., San Diego s: 23-26.
- BECKER, J.M., CALDWELL, G.A., ZACHGO, E.A. (1990b). β -galaktosidase assay. *Biotechnology a Laboratory Course*. Academic Press, Inc., San Diego s: 121-124.
- BERGAN, D., GALBRAITH, T., SLOANE, D.L. (2000). Gene transfer in viro and in vivo by cationic lipids is not significantly affected by levels of supercoiling of a reporter plasmid. *Pharm. Res.* **17**: 967-973.

- BILGEHAN, H. (2002a). Enterobacteriaceae. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler kitapevi barış yayınları, İzmir s: 425-464.
- BILGEHAN, H. (2002b). Besiyerleri. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler kitapevi barış yayınları, İzmir s: 97-109.
- BITTNER, B., WITT, C., MADER, K., KISSEL, T. (1999). Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release. *J. Control. Rel.* **60**: 297-309.
- BLAISONNEAU, J., SOR, F., CHERET, G., YARROW, D., FUKUHARA, H. (1997). A circular plasmid from the yeast *torulaspora delbrueckii*. *Plasmid* **38**: 202-209.
- BORCHARD, G. (2001). Chitosan for gene delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **52**: 145-150.
- BOUT, A. (1997). Gene therapy. Pharmaceutical Biotechnology. Harwood, Academic publishers s: 167-182.
- BOZKIR, A., DUMAN, E. (1996). Lipozomların kan ve plazmadaki stabiliteleri. *Ank. Üni. Ecz. Fak. Mec.* **25**: 1-13.
- BOZKIR, A., KOCYIGIT, S. (1995). Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitelerinin incelenmesi. *Ank. Üni. Ecz. Fak. Mec.* **24**: 42-52.
- BOZKIR, A., SAKA, O.M. (2001). The experimental design and characterisation of PLGA nanoparticles. I-factorial design. *Int. Congress FIP* **61**: 82.
- BOZKIR, A., SAKA, O.M. (2002). Poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles containing 5-fluorouracil. II- formulation design. Proceed. World Meet. ADRITELF/APGI/APV **4**: 809-810.
- BURKE, D.T., CARLE, G.F., OLSON, M.V. (1987). Cloning into a yeast artificial chromosome (YAC). Erişim: [<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/YAC.html>]. Erişim tarihi: 05.11.2001
- CALVO, P., LOPEZ, C.R., JATO, J.L.V., ALONSO, M.J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.* **14**: 1431-1436.
- CAPAN, Y., WOO, B.H., GEBREKIDAN, S., AHMED, S., DELUCA, P. (1999). Preparation and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *Pharm. Res.* **16**: 509-513.
- CELIKEL, T. (2002). Sifreli spiral. Erişim: [<http://www.locusnovus.com/hayaletgemi/liman35d.htm>]. Erişim tarihi: 25.10.2002

- CHAMPBELL, I.G., JONES, T.A., FOULKES, W.D., TROWSDALE, J. (1991). Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res.* **51**: 5329-5338.
- CHASSAGNE, C., BEDEAUX, D. (2003). Dielectric response of charged spheres: interpolation formulae linking the low and high zeta potential expression. *Physica A* **317**: 345-353.
- CHESA, P.G., CHAMPBELL, I., SAIGO, P.E., LEWIS, J.L., OLD, L.J., RETTIG, W.J. (1993). Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. *Am. J. Pathol.* **142**: 557-567.
- COHEN, S., YOSHIOKA, T., LUCARELLI, M., HWANG, L.H., LANGER, R. (1991). Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm. Res.* **8(6)**: 713-720.
- COUVREUR, R., COUARRAZE, G., DEVISSAGUET, J.P., PUISIEUX, F. (1996). Nanoparticles: preparation and characterization. Microencapsulation methods and industrial applications. Marcel Dekker Inc., New York s:183-211.
- CROTTS, G., PARK, T.G. (1997). Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Control. Rel.* **44**: 123-134.
- CUI, Z., MUMPER, R.J. (2001). Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *J. Control. Rel.* **75**: 409-419.
- CURIEL, D.T. (1994). High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus-polylysine-DNA complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **716**: 36-56.
- DEMİR, D. (1999). DNA taşıyıcı sistemler ile gen tedavisi üzerine çalışmalar. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Biyoteknoloji Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.
- DEMİREL, M., YAZAN, Y. (2000). Katı lipid nanopartiküller. *FABAD J. Pharm. Sci.* **25**: 167-179.
- DUBERNET, C., TEIXERIA, H., BENITA, S., COUVREUR, P. (1997). Cationic emulsions as a novel antisense oligonucleotides delivery system. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **24**: 661-662.
- EL-SHABOURI, M.H. (2002). Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* **249**: 101-108.
- ERDEN, N., CELEBİ, N. (1990). Kitin ve kitozanın farmasötik teknolojide uygulanışı. *FABAD Farm. Bil. Der.* **15**: 277-287.

- FARHOOD, H., GAO, X., SON, K., YANG, Y.Y., LAZO, J.S., HUANG, L. (1994). Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **176**: 23-34.
- FELGNER, P.L., GADEK, T.R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H.W., WENZ, M., NORTHROP, J.P., RINGOLD, G.M., DANIELSEN, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7413-7417.
- FELGNER, P.L., RHODES, G. (1991). Gene therapeutics. *Nature* **24**: 351-352.
- FELGNER, J.H., KUMAR, R., SRIDHAR, C.N., WHEELER, C.J., TSAI, Y.J., BORDER, R., RAMSEY, P., MARTIN, M., FELGNER, P.L. (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* **269**: 2550-2561.
- FELT, O., BURI, P., GURNY, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24(11)**: 979-993.
- FILIPOVIC, G., BECIREVIC, L.M., SKALKO, N., JALSENJAK, I. (1996). Chitosan microspheres of nifedipine and nifedipine-cyclodextrin inclusion complexes. *Int. J. Pharm.* **135**: 183-190.
- FRITZ, J. (1996a). Retroviral vectors. Erişim adresi : [<http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/retro.htm>] Erişim tarihi 11.07.2000.
- FRITZ, J. (1996b). Non-viral vectors for gene therapy. Erişim adresi : [<http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/nonviral.htm>] Erişim tarihi 11.07.2000.
- FRY, J.W., WOOD, K.J. (1999). Gene therapy: potential applications in clinical transplantation. Erişim adresi : [<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>] Erişim tarihi: 08.05.1999.
- GABLE, C.G., FLOCH, V., MERCIER, B., AUDREZET, M.P., GOBIN, E., BOLCH, G., YAOUANC, J.J., CLEMENT, J.C., ABBAYES, H., LEROY, J.P., MORIN, V., FEREC, C. (1998). Cationic phosphonolipids as nonviral gene transfer agents in the lungs of mice. *Hum. Gene Ther.* **9**: 2309-2319.
- GALYPEAU, J., LI, H., PAQUIN, A., SICILIA, F., KARPATI, G., NALBANTOGLU, J. (1999). Vesicular stomatitis virus G psedotyped retrovector mediates effective invivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Elektronik journal. Cancer Res.* **59**: 2384-2394. Erişim tarihi: 12.03.2001.
- GAO, X., HUANG, L. (1996). Potential of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry* **35(3)**: 1027-1036.

- GENTA, I., PERUGINI, P., PAVANETTO, F. (1998). Different molecular weight chitosan microspheres: influence on drug loading and drug release. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24(8)**: 779-784.
- GRANNER, D.K. (1993a). Nükleik asit yapı ve fonksiyonu. Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi, İstanbul s: 440-452.
- GRANNER, D.K. (1993b). Rekombinant DNA teknolojisi. Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi, İstanbul s: 526-545.
- GREF, R., MINAMITAKE, Y., PERACCHIA, M.T., LANGER, R. (1996). Poly(ethylene glycol)-coated biodegradable nanospheres for intravenous drug administration. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. Marcel Dekker Inc., New York s:279-306.
- GREF, R., MINAMITAKE, Y., PERACCHIA, TRUBETSKOY, V., TORCHILIN, V., LANGER, R. (1994). Biodegradable long-circulation polymeric nanospheres. *Science* **263**:1600-1607.
- GREGORIADIS, G., SAFFIE, R., HART, S.L. (1996). High yield incorporation of plasmid DNA within liposomes: effect on DNA integrity and transfection efficiency. *J. Drug Target.* **3**: 469-475.
- HAO, T., MCKEEVER, U., HEDLEY, M.L. (2000). Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA. Elektronik journal. *J. Control. Rel.* **69(2)**: 249-259. Erişim tarihi: 20.02.2001.
- HASKOVA, V., HRUBESOVA, M. (1958). Part played by deoxyribonucleic acid in transplantation immunity. *Nature* **182**: 61-62.
- HAYTA, G. (2002). Influenza virüs antijeni içeren çoklu (s/y/s) emülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi, in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.
- HE, P., DAVIS, S.S., ILLUM, L. (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* **166**: 75-88.
- HIGGINS, D.E., PORTNOY, D.A. (1998). Bacterial delivery of DNA evolves. *Nat. Biotech.* **16**: 138-139.
- HIROSUE, S., MULLER, B.G., MULLIGAN, R.C., LANGER, R. (2001). Plasmid DNA encapsulation and release from solvent diffusion nanospheres. *J. Control. Rel.* **70**: 231-242.
- HOEKSTRA, W.P.M., SMEEKENS, S.C.M. (1997). Molecular Biotechnology. Pharmaceutical Biotechnology. Harwood, Academic publishers s: 1-22.

- HOFLAND, H.E.J, NAGY, D., LIU, J.J., SPRATT, K., LEE, Y.L., DANOS, O., SULLIVAN, S.M. (1997). In vivo gene transfer by intravenous administration of stable cationic lipid/DNA complex. *Pharm. Res.* **14**: 742-749.
- HOSSEINKHANI, H., TABATA, Y. (2003). In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. *J. Control. Rel.* **86**: 169-182.
- ILLUM, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Research.* **15**(9): 1326-1331.
- ISHII, T., OKAHATA, Y., SATO, T. (2001) Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**: 51-64.
- JAMEELA, S.R., LATHA, P.G., SUBRAMONIAM, A., JAYAKRISHNAN, A. (1996). Antitumor activity of Mitoxantrone-loaded chitosan microspheres against ehrlich ascites carcinoma. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**: 685-688.
- JAMEELA, S.R., KUMARY, T.V., LAL, A.V., JAYAKRISHNAN, A. (1998). Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J. Control. Rel.* **15**: 17-24.
- JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., KAISERLING, E., XIAO, J.X., KISSEL, T. (2000). Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**: 147-160.
- KAS, H.S. (1997). Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsulation* **14**(6): 689-711.
- KIANG, T., WEN, J., LIM, H., LEONG, K.W. (2002). Degree of deacetylation of chitosan effect on gene transfection efficiency in vivo. *Proceed. Control. Rel. Socit. Meet.* **29**: 192.
- KNAPCZYK, J., KROWCZYNSKI, L., KRZEK, J., BRZESKI, M., NURNBERG, E., SCHENK, D., STRUSZCZYK, H. (1989). Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical application. Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications. Elsevier Science Publishers, New York, 657-663.
- KRAMER, P.A. (1974). Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **63**: 1646-1647.
- KREUTER, J. (1983). Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems I: preparation methods. *Pharm. Acta Helv.* **58**: 196-208.
- KREUTER, J. (1992). Nanoparticles-preparation and applications. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. CRC Press Inc., USA s:125-148.

- LEE, M., NAH, J.W., KWON, Y., KOH, J.J., KO, K. S., KIM, S.W. (2001). Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm. Res.* **18**: 427-431.
- LEE, R.J., HUANG, L. (1997). Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**(2): 173-206.
- LEE, K.D., HONG, K., PAPAHAJOPOULOS, D. (1992). Recognition of liposomes by cells: in vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid headgroups and surface charge density. *Biochim. Biophys. Acta* **1103**: 185-197.
- LEE, R.J., HUANG, L. (1996). Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *J. Biol. Chem.* **271**(14): 8481-8487.
- LEE, R.J., WANG, S., LOW, P.S. (1996). Measurement of endosome pH following folate receptor-mediated endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1312**: 237-242.
- LEE, R.J., LOW, P.S. (1994). Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **269**: 3198-3204.
- LEGENDRE, J.Y., SZOKA, F.C. (1992). Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm. Res.* **9**: 1235-1242.
- LEONG, K.W., MAO, H.Q., TRUNG-LE, V.L., ROY, K., WALSH, S.M., AUGUST, J.T. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control. Rel.* **53**: 183-193.
- LIM, S.T., MARTIN, G.P., BERRY, D.J., BROWN, M.B. (2000). Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *J. Control. Rel.* **66**: 281-292.
- LITZINGER, D.C., HUANG, L. (1992). Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**: 201-227.
- LIU, F., YANG, J., HUANG, L., LIU, D. (1996). Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. *Pharm. Res.* **13**: 1642-1646.
- LUBBEN, I.M., VERHOEF, J.C., BORCHARD, G., JUNGINGER, H.E. (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Del. Rev.* **52**: 139-144.
- MACLAUGHLIN, F.C., MUMPER, R.J., WANG, J., TAGLIAFERRI, J.M., GILL, I., HINCHCLIFFE, M., ROLLAND, A.P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J. Control. Rel.* **56**: 259-272.

- MAHATO, R.I., ANWER, K., TAGLIAFERRI, F., MEANEY, C., LEONARD, P., WADHWA, M.S., LOGAN, M., FRENCH, M., ROLLAND, A. (1998). Biodistribution and gene expression of lipid/plasmid complexes after systemic administration. *Hum. Gene Ther.* **9**: 2083-2099.
- MAHATO, R.I., ROLLAND, A., TOMLINSON, E. (1997b). Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* **14**: 853-859.
- MAHATO, R.I., TAKAKURA, Y., HASHIDA, M. (1997a). Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**(2): 133-172.
- MAO, H.Q., ROY, K., TROUNG-LE, V.L., JANES, K.A., LIN, K., WANG, Y., AUGUST, J.T., LEONG, K.W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control. Rel.* **70**: 399-421.
- MAO, H.Q., ROY, K., WALSH, S.M., AUGUST, J.T., LEONG, K.W. (1996). DNA-chitosan nanospheres for gene delivery. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **23**: 401-402.
- MAO, H.Q., ROY, K., TRUONG-LEE, V., AUGUST, J.T., LEONG, K.W. (1997). DNA-chitosan nanospheres: derivatization and storage stability. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **24**: 671-672.
- MEDAWAR, P. (1958). Part played by deoxyribonucleic acid in transplantation immunity. *Nature* **182**: 62.
- MUELLER, R.F., YOUNG, I.D. (1995). Recombinant DNA technology. Emery's elements of medical genetics. Churchill livingstone press s: 45-65.
- MUI, B.L.S., CULLIS, P.R., PRITCHARD, P.H., MADDEN, T.D. (1994). Influence of plasma on the osmotic sensitivity of large unilamellar vesicle prepared by extrusion. *J. Biol. Chem.* **269**(10): 7364-7370.
- MULLIGAN, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**: 926-931.
- NISHIOKA, Y., KYOTANI, S., OKAMURA, M., MIYAZAKI, M., OKAZAKI, K., OHNISHI, S., YAMAMOTO, Y., ITO, K. (1990). Release characteristics of cisplatin chitosan microspheres and effect of containing chitin. *Chem. Pharm. Bull.* **38**(10): 2871-2873.
- NO, H.K., CHO, Y.I., KIM, H.R., MEYERS, S.P. (2000). Effective deacetylation of chitin under conditions of 15 psi/121 °C. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2625-2627.
- ONISHI, H., SHIMODA, J., MACHIDA, Y. (1996). Chitosan-drug conjugate microspheres: preparation and drug release properties of microspheres composed of the conjugate of 2'- or 3'-(4-carboxy-butyryl)-5-fluorouridine with chitosan. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **22**(5): 457-463.

- OPPENHEIM, R.C. (1986). Nanoparticulate drug delivery systems based on gelatin and albumin. *Polymeric Nanoparticles and Microspheres*. CRC Press Inc., Florida s:1-93.
- OZBAS, S. T., ARAL, C., KABASAKAL, L., UYSAL, M., AKBUGA, J. (1999). Co-encapsulation of double plasmids in chitosan microspheres as non-viral gene delivery vehicle. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **26**: 645-646.
- OZTURK, M. (2001). Moleküler biyoloji: genler ve genom projesinden ilaç sanayine yansımalar. Ankara Ecza Odası, Meslek İçi Eğitim Programı, Ankara s:81-101.
- PAN, Y., LI, Y., ZHAO, H., ZHENG, J., XU, H., WEI, G., HAO, J., CUI, F. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* **249**: 139-147.
- PAVANETTO, F., PERUGINI, P., CONTI, B., MODENA, T., GENTA, I. (1996). Evaluation of process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method. *Microencapsulation* **13**: 679-688.
- PROMEGA. (1999). pSV-beta-galactosidase control vector, product information. Erişim: [<http://www.promega.com/catalog/CatalogProducts.asp?catalog%5Fname=Promega%51Fid=E1081>]. Erişim tarihi: 25.11.1999
- RAWLE, A. (1994). The importance of particle size analysis in the pharmaceutical industry. *Malvern Instruments Ltd., UK*.
- RICHARDSON, S.C.W., KOLBE H. V.J., DUNCAN, R. (1999). Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int. J. Pharm.* **178**: 231-243.
- RINAUDO, M., DOMARD, A. (1989). Solution properties of chitosan. *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*. Elsevier Science Publishers, New York, 71-86.
- ROLLAND, A.P. (1998). From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **15(2)**: 143-198.
- ROY, K., MAO, H.Q., KEVIN, Y.L., LIN, J., HUANG, S.K., LEONG, K.W. (1998). Oral immunization with DNA-chitosan nanospheres. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **25**: 348-349.
- ROY, K., MAO, H.Q., LEONG, K.W. (1997). DNA-chitosan nanospheres: transfer efficiency and cellular uptake. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **24**: 673-674.
- RUSSELL, D.W., HIRATA, R.K. (1998). Human gene targeting by viral vectors. *Nat. Genet.* **18**: 325-330.

- SABNIS, S., BLOCK, L.H. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polymer Bull.* **39**: 67-71.
- SAGIROGLU, A.K. (2002). Gen terapisi. Erişim: [<http://www.genetikbilimi.com/genbilimi/genterapi.htm>]. Erişim tarihi: 25.10.2002
- SAGIROGLU, A.K. (1999). Gen terapisi. *Bilim ve Teknik, Tübitak* **375**: 54-58.
- SAKA, O.M., INAL, O., HAYTA, G., BOZKIR, A. (2000). Factors affecting the stability and release of model protein, encapsulated within biodegradable PLLA microparticles. *Proceed. ISOPS* **6**: 300.
- SAKA, O.M., BOZKIR, A. (2002a). Chitosan-plasmid DNA nanoparticles: I-characterization and properties of different molecular weight chitosan nanoparticles. *ACTA Pharm. Turcica* **44**: 20. (Oral Sunum)
- SAKA, O.M., BOZKIR, A. (2002b). Chitosan-plasmid DNA nanoparticles: II-effect of different molecular weight chitosan nanoparticles on drug loading and drug release. *Int. Symp. Biomed. Sci. Tech.* **9**: 64.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Chapter 1, Chapter 6.
- SENIOR, J., WATERS, J.A., GREGORIADIS, G. (1986). Antibody-coated liposomes. *FEBS Lett.* **196**: 54-58.
- SENIOR, J.H., TRIMBLE, K.R., MASKIEWICZ, R. (1991). Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**: 173-179.
- SHAHIDI, F., ARACHCHI, J. K. V., JEON, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 37-51.
- SIFFORD, M. (1998). Human gene therapy. Erişim: [<http://www.cc.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/students98/sifford.htm>]. Erişim tarihi: 04.04.2001
- SIGMA (2000). Sigma product information sheet. Erişim: [<http://www.sigma.sial.com/sigma/proddata/c3646.htm>]. Erişim tarihi: 11.07.2000
- SINGLA, A.K., CHAWLA, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**: 1047-1067.
- SMITH, J. (1985). Introduction to genome. Erişim: [<http://www.bis.med.jhmi.edu/Smith/geome/prim1.htm>]. Erişim tarihi: 02.07.2000
- SPACK, E.G., SORGI, F.L. (2001). Developing non-viral DNA delivery systems for cancer and infectious disease. *Drug Discov. Today* **6(4)**: 186-197.

- SPIERS, I.D., ALPAR, H.O., EGLES, I.E., BOZKIR, A., MILLER, J., WILLIAMSON, D. (1999). Studies on the co-encapsulation, release and integrity of two subunit antigens: rV and rF1 from *Yersinia pestis*. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 991-997.
- STRAND, S.P., VARUM, K.M., OSTGAARD, K. (2003). Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. *Colloids Surf. B* **27**: 71-81.
- THANOU, M., FLOREA, B.I., GELDOLF, M., JUNGINGER, H.E., BORCHARD, G. (2002). Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. *Biomaterials* **23**: 153-159.
- TIAN, X.X., GROVES, M.J. (1999). Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from *Mycobacterium vaccae* in chitosan nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 151-157.
- TIGHE, R., FRITZ, J. (1996). Lentiviral and herpes simplex vectors. Erişim adresi : [<http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/hsv.htm>] Erişim tarihi 11.07.2000.
- TOKURA, S., HASEGAWA, O., NASHIMURA, S., NISHI, N., TAKATORI, T. (1987). Induction of methamphetamine-specific antibody using biodegradable carboxymethyl-chitin. *Anal. Biochem.* **161**: 117-122.
- TRAMBELLA, A., ZITO, S.C. (1992). Vectors in recombinant technology. Erişim: [<http://www.unifr.ch/nf45/MEDMOL/GeneTherVecors.html>]. Erişim tarihi: 11.07.2000
- TRUONG-LEE, V.L., MAO, H.Q., WALSH, S., LEONG, K.W., AUGUST, J.T. (1997). Delivery of DNA using gelatin-DNA nanospheres. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **24**: 39-40.
- VANDERBILT, (2000). Viral vectors in gene therapy. Erişim: [<http://www.mc.vanderbilt.edu/gcrc/gene/viral.htm>]. Erişim tarihi: 11.07.2000
- VANSON (2000a). Chitin and chitosan and their medical applications. Erişim: [<http://www.vanson.com/pages/med/biomed.html>]. Erişim tarihi: 11.07.2000
- VANSON (2000b). Physical forms of chitosan and their applications. Erişim: [<http://www.vanson.com/pages/med/forms.html>]. Erişim tarihi: 11.07.2000
- WALSH, S.M., FLOTTE, T.R., TROUNGLEE, V.L., RUBENSTEIN, R., BECK, S., AUGUST, T., ZEITLIN, P., LEONG, K.W. (1997). Combination of drug and gene delivery by gelatin nanospheres for the treatment of cystic fibrosis. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **24**: 75-76.
- WANG, D., ROBINSON, D.R., KWON, G.S., SAMUEL, J. (1999). Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(lactide-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery. *J. Control. Rel.* **57**: 9-18.

- WANG, C.Y., HUANG, L. (1987). pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7851-7855.
- WANG, Y.M., SATO, H., ADACHI, I., HORIKOSHI, I. (1996). Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *J. Pharm. Sci.* **85(11)**: 1204-1210.
- WATSON, J.D. (1995). İkili sarmal: DNA yapı çözümünün öyküsü. Tübitak popüler bilim kiyapları dizisi:2. Ankara.
- WATSON, J.D., TOOZE, J., KURTZ, D.T. (1983). Methods of creating recombinant DNA molecules. Recombinant DNA, a short course. Scientific American Books, New York s:58-69.
- WIN, N.N., STEVENS, W.F. (2001). Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 334-341.
- WINSTON, R.M., HANDYSIDE, A.H. (1993). New challenges in human in vitro fertilization. *Science* **260**: 932.
- WITSCHI, C., MRSNY, R.J. (1999). In vitro evaluation of microparticles and polymer gels for use as nasal platforms for protein delivery. *Pharm. Res.* **16(3)**: 382-390.
- WOODBURY, C.P. (1992). Recombinant DNA technology. Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and essentials. Interpharm Press. s: 77-103.
- WU, G.Y., WU, C.H. (1987). Receptormediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**: 4429-4432.
- YIU, S.W., YUN, Y.H., KIM, Y.H., BAE, E.H., KWON, I.C., SEONG, S.Y., CHOI, Y.W., JEONG, S.Y. (1997). Cationic lipid emulsion; a novel, non-viral, and non-liposomal gene delivery system. *Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **24**: 653-654.
- YUKSEL, A.F., YELKENCI, B. (2000). DNA (deoksiribonükleikası) molekülü. Erişim: [<http://www.genetikbilimi.com/genbilim/dnanedir.html>]. Erişim tarihi: 25.10.2002
- ZIEBA, J., KNAPCZY, J. (1988). Drug adducts with microcrystalline chitosan and microcrystalline cellulose. *Acta Pharm. Technol.* **34(2)**: 84-97.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Ankara’da doğdum. 1986 yılında Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi’nde orta ve lise öğrenimine başladım ve 1993 yılında mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ne kaydımı yaptırdım. Lisans eğitimimi 1997 yılında tamamladım ve 2000 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Farmasötik Biyoteknoloji Program’ında yüksek lisans eğitimine başladım.



**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMENTASYON MERKEZİ**

