

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AŞIRI HALOFİL SUŞLARDAN ELDE EDİLEN
ARCHAEAZOMLARIN İLAÇ TAŞINMASINDA
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Sevinç UĞURLU
(Kimyager)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral BİRBİR**

İSTANBUL 2007

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AŞIRI HALOFİL SUŞLARDAN ELDE EDİLEN
ARCHAEAZOMLARIN İLAÇ TAŞINMASINDA
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Sevinç UĞURLU
(Kimyager)
(141100520040002)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral BİRBİR**

İSTANBUL 2007

ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans çalışmam süresince, aktarmış olduğu birikimler, göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayıştan dolayı, tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe OGAN' a, yaptığı teorik bilgi ve deneysel katkılar ile göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayış ile bu çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği bulunan ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Meral BİRBİR' e,

Yüksek lisans çalışmam süresince, her türlü bilgi ve yardımını esirgemeyen Marmara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ayşen YARAT' a,

Bu çalışma esnasında laboratuvarlarında bulunan döner buharlaştırıcı cihazını kullanmama imkân tanıyan Organik Kimya A.B.D.'nin çok değerli öğretim üyeleri ve asistanlarına; çalışmama yardım eden Fen Edebiyat Fakültesi Araştırma Görevlisi Cihan ÜNAL ve Serap DEMİR' e,

Kimya Bölümü' nün olanaklarını kullanımına açan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yurdun FIRAT'a,

Yüksek Lisans eğitimi boyunca maddi ve manevi desteğini gösteren MONROL Nükleer Ürünler Ticaret ve Sanayi A.Ş. Genel Müdürü Uğur BOZLUOLCAY, Kalite Kontrol Müdürü A.Yılmaz ERKOL ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tüm yaşantım boyunca bana maddi ve manevi olarak hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok sevgili aileme,

Teşekkürü bir borç bilirim.

HAZİRAN, 2007

Sevinç UĞURLU

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VI
SEMBOL LİSTESİ	VII
KISALTMA LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	X
TABLO LİSTESİ.....	XI
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
I.1. GİRİŞ.....	1
I.2. AMAÇ.....	2
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. LİPOZOMLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	3
II.1.1. Lipozom Tanımı.....	3
II.1.2. Lipozomların Yapısı.....	4
II.1.3. Lipozomların Sınıflandırılması.....	5
II.1.3.1. Büyüklük ve Tabaka Sayısına Göre Lipozomlar....	5
II.1.3.2. Özel Karakterli Lipozomlar.....	6

II.1.4. Lipozomların Hazırlanmasında Kullanılan Metotlar.....	7
II.1.4.1. Çok Tabakalı Lipozomların Hazırlanışı.....	7
II.1.4.2. Büyük Tek Tabakalı Lipozomların Hazırlanışı.....	8
II.1.4.3. Küçük Tek Tabakalı Lipozomların Hazırlanışı.....	8
II.1.5.Maddelerin Lipozomlarda Tutulması ve Tutulmaması	
Maddelerin Uzaklaştırılması.....	9
II.1.6. Lipozomların In Vivo Değerlendirilmesi.....	10
II.1.6.1. Lipozomların Vücuda Veriliş Yolları.....	10
II.1.6.2. Lipozomların Vücut Sıvılarındaki Durumu ve	
Eliminasyonu.....	12
II.1.6.3. Lipozomlanmış Maddelerin Hücrelere Giriş Yolları	12
II.1.6.4. Lipozomların Tedaviye Yönelik Kullanım Alanları.	13
II.2. ARCHAEOZOMLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	14
II.2.1. Arkebakterinin Tanımı ve Yapısı	14
II.2.2. Arkebakterinin Sınıflandırılması	15
II.2.3. Arkebakterinin Yapısında Bulunan Polar Lipitler.....	16
II.2.4. Archaeazom Tanımı	19
II.3. RİFAMPİSİN.....	19
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI.....	20
III.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	20
III.2. KULLANILAN CİHAZLAR.....	21
III.3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	22
III.3.1. Lipozom Hazırlanması	
III.3.1.1. Haloarcula 2TK2 Suşunun Brown Besi Yerinde	
Üretilmesi ve Polar Lipitlerin İzolasyonu.....	24
III.3.1.2. Evaporasyon, Hidrasyon ve Filtrasyon Aşamaları.	23
III.3.2. İlaç Yüklenmesi ve Salınımı.....	24
III.3.2.1. Rifampisin Stok ve Standart Çözeltilerinin	
Hazırlanması.....	24
III.3.2.2. Rifampisin Standart Eğrisinin Hazırlanması.....	24
III.3.2.3. Fosfolipit Tayini Çözeltilerinin Hazırlanması.....	25

III.3.2.4. Fosfolipit Tayini Standart Eğrisinin Hazırlanması.	26
III.3.2.5. Fosfolipit Tayini.....	26
III.3.2.6.Rifampisin Çözeltilisinin Yüklenmesi ve Salınımı...	26
BÖLÜM IV. SONUÇLAR.....	28
IV.1. LİPOZOM HAZIRLANMASI.....	28
IV.2. FOSFOLİPİT TAYİNİ.....	32
IV.3. RİFAMPİSİN STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI... 	33
IV.4. İLAÇ YÜKLEMESİ VE SALINIM SONUÇLARI.....	34
BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER.....	36
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	48

ÖZET

AŞIRI HALOFİL SUŞLARDAN ELDE EDİLEN ARCHAEAZOMLARIN İLAÇ TAŞINMASINDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Lipozomlar, etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılarak ilaçların istenmeyen özelliklerini azaltabilme yeteneğine sahiptir. Lipozomlar, içlerine hapsedilen etkin maddenin farmakokinetiğini değiştirirler.

Bu çalışmada sıvı Brown besi yerinde üretilen bir aşırı halofil Arkebakteri olan *Haloarcula* 2TK2 suşunun polar lipitleri kloroform/metanol çözeltisi ile ekstre edilmiştir. Çözücünün buharlaştırılmasından sonra lipitler hidrate edilmiştir. Lipozomlar (archaeazomlar) ard arda dondurma-çözme işlemini takiben 450 nm por büyüklüğündeki polikarbonat filtreden geçirilerek boyutlandırılmıştır. Hazırlanan archaeazomların taramalı elektron mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. İlaç adsorpsiyonu ve archaeazomların kontrollü salınım davranışını araştırmak için ise kısmen çözünebilir rifampisin model ilaç olarak seçilmiştir. Rifampisin salınımı (pH 7,0; 37 °C) 474 nm’de spektrofotometrik olarak izlenmiştir ve ilaç salınım yüzdesi hesaplanmıştır. Archaeazomların bu ilacın salınımı için uygun bir taşıyıcı olduğu belirlendi.

HAZİRAN, 2007

Sevinç UĞURLU

ABSTRACT

INVESTIGATION OF USAGE OF ARCHAEASOMES OBTAINED FROM EXTREMELY HALOPHILIC STRAINS IN DRUG DELIVERY

Liposomes when used as active substance carrier may decrease the unwanted properties of drugs. Liposomes change the pharmacokinetics of active substances trapped in them.

Polar lipids of extremely halophilic Archaeon *Haloarcula* 2TK2 strains grown in liquid Brown medium were extracted by chloroform/methanol solution. After the vaporization of the solvent, lipids were hydrated. Liposomes (archaeasomes) were sized by consecutive freezing and thawing steps, followed by extrusion through 450 nm polycarbonate filters by hand held extruder. The images of the archaeasomes were taken by a scanning electron microscopes (SEM). Rifampicin was chosen as a sparingly soluble drug model for the investigation of drug adsorption and controlled release behaviour of archaeasomes, The release of rifampicin from archaeasomes (pH 7,0; 37 °C) was determined spectrophotometrically at 474 nm and the percentage of drug release was calculated. It was concluded that archaeasomes were compatible for the controlled release of Rifampicin.

JUNE, 2007

Sevinç UĞURLU

SEMBOL LİSTESİ

β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Derece
μm	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
g	: Gram
nm	: Nanometre
α	: Alfa
m	: Ağırlık
L	: Litre
%	: Yüzde
M	: Molarite

KISALTMA LİSTESİ

Abs	: Absorbans
PC	: Fosfatidilkolin
PL	: Fosfolipit
DPPC	: Dipalmitoilfosfatidilkolin
DSPC	: Distearilfosfatidilkolin
PS	: Fosfatidilserin
PI	: Fosfatidilinositol
PE	: Fosfatidiletanolamin
SM	: Spingomiyelin
MLV	: Çok Tabakalı Lipozomlar
LUV	: Büyük Tek Tabakalı Lipozom
SUV	: Küçük Tek Tabakalı Lipozom
T_c	: Faz Değişirme Sıcaklığı
RES	: Retikulo Endotelyal Sistem
PEG	: Poli (Etilen Glikol)
RIF	: Rifampisin
RNA	: Ribonükleik Asit
i.v.	: İntravenöz
i.p.	: İntraperitoneal
i.m.	: İntramüsküler
s.c.	: Subkutan
CsA	: Siklosporin A
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
ATP	: Adenozin Trifosfat
N	: Azot
C	: Karbon
TCA	: Trikloro Asetik Asit

SEM : Taramalı Elektron Mikroskopu

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil II.1. Tek ve Çok Tabakalı Lipozomların Şematik ve Mikroskop Görüntüsü.....	3
Şekil II.2. Tek Tabakalı Lipozomun Üç Boyutlu Görüntüsü.....	4
Şekil II.3. Lipozomu Oluşturan Fosfolipit Yapı.....	5
Şekil II.4. Lipozomlanmış İlaçların Hücelere Veriliş Mekanizmaları.....	13
Şekil II.5. Metanojenik, Termoasidofilik Arkebakteri Membran Lipitlerinde Bulunan Caldarchaeol veya Calditoglycerocaldarchaeol Tipindeki Tetraeterlerin Tipik Temel Yapılarının Gösterilmesi	18
Şekil II.6. Sentetik Simetrik ve Asimetrik Akrilik Bipolar Lipitlerin Gösterilmesi.....	18
Şekil II.7. Rifampisinin Moleküler Yapısı	19
Şekil III.8. HEPES Moleküler Yapısı	20
Şekil III.9. Kolin Moleküler Yapısı	21
Şekil IV.10 (1a, 1b, 2a ,2b ,2c ,3a ,4a). Taramalı Elektron Mikroskopuyla Çeşitli Bölgelerden Görüntüleri Alınan Archaeazomlar ve Belirlenen Partikül Boyutlar	32
Şekil IV.11. Fosfolipit Standart Eğrisi	33
Şekil IV.12. Rifampisinin Standart Eğrisi	34
Şekil IV.13. Rifampisinin Salınım Eğrisi	35

TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo IV.1. Fosfolipit Standart Çözeltilerinin Konsantrasyonları ve 680 nm’ deki Absorbans Değerleri.....	32
Tablo IV.2. Rifampisin Standart Çözeltilerinin Konsantrasyonları ve 474 nm’ deki Absorbans Değerleri.....	33
Tablo IV.3. Rifampisin Salınım Değerleri.....	34

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

İlaç tedavisinin yararlı olabilmesi için ilaç kullanımı, tedavi amacına ve ilaç aktif maddesinin farmakolojik özelliklerine uygun olmalıdır. Hız veya zaman kontrollü oral preparatların geliştirilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Dozajdan düzgün ilaç salınımı terapötik etkiyi arttırmak açısından büyük önem taşır. Hedef bölgeye belirli bir zaman zarfında gereksinim duyulan miktarda ilacın götürülebilmesi için taşıyıcı materyaller geliştirilmektedir (Hirayama ve Uekama, 1999).

Lipozomlarla ilgili ilk çalışma Bangham ve arkadaşları (1964) tarafından yapılmıştır. Sadece hücre membranına model oluşturmak üzere başlatılan bu çalışmalar lipozomların etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılabileceğinin anlaşılması ile yoğunlaşmıştır. Bugün tedavide kullanılan az sayıda lipozomlanmış etkin madde olmasına karşın klinik araştırma aşamasında birçok çalışma vardır. Lipozomların lipit tabakası fosfolipitlerden oluşmaktadır. Kullanılan fosfolipit türüne bağlı olarak lipit tabakanın özelliği değişmektedir. Ayrıca lipit tabakanın özelliklerinde değişiklik yapmak için bazı maddeler de ilave edilmektedir. Bu şekilde kullanım amacına uygun lipozom sentezi mümkün olur. Lipozomlar, içlerine hapsedilen etkin maddelerin farmakokinetiğini değiştirebilirler. Lipozomlanmış etkin maddelerin absorpsiyonu, biyolojik dağılımı ve salınımı serbest maddeden tamamen farklıdır. Sonuçta etkin maddenin terapötik etkisi ve toksitesi değişebilir (Allen, 2000). İlaçların lipozomlarda tutularak taşınabilmesi ilacın etkinliğini arttıracaktır için

tedavinin kalitesini de yükseltecektir. Lipozomların diğer koloidal sistemlere göre üstünlükleri vardır. Yapılarında polimer olmaması onları vazgeçilmez kılmaktadır. Dolayısı ile lipozom preparatları geleceğin ilaç taşıyıcı sistemleri olarak özellikle gelişen gen teknolojisi ile gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

I.2. AMAÇ

Lipozomlar, yaklaşık 0.02 - 3.5 µm çapında kendiliğinden kapanan küresel veziküllerdir. Lipit çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Farmakoloji ve tıpta ilaç taşıyıcı sistemlerinin ve adjuvant aşılarda hazırlanmasında önemli bir yere sahiptirler. Archaeazom, arkebakterilerin polar lipitlerinden elde edilen lipozomlara verilen bir isimdir ve archaeazomların, total polar lipitlerden yapılan lipozomlara göre daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Lakshmi Krishnan ve ark., 2000)

Bu çalışmanın amacı Tuzköy Tuz Madeninden izole edilen bir aşırı halofil arkebakteri; *Haloarcula* 2TK2 suşundan ekstre edilen polar lipitleri kullanarak istenilen partikül boyutunda lipozomları (archaeazomları) hazırlamaktır. Daha sonra hazırlanan bu archaeazomlarda suda kısmen çözünen bir antibiyotik olan rifampisin tutuklanması ve fizyolojik şartlarda ilacın salınımının gerçekleştirilmesidir.

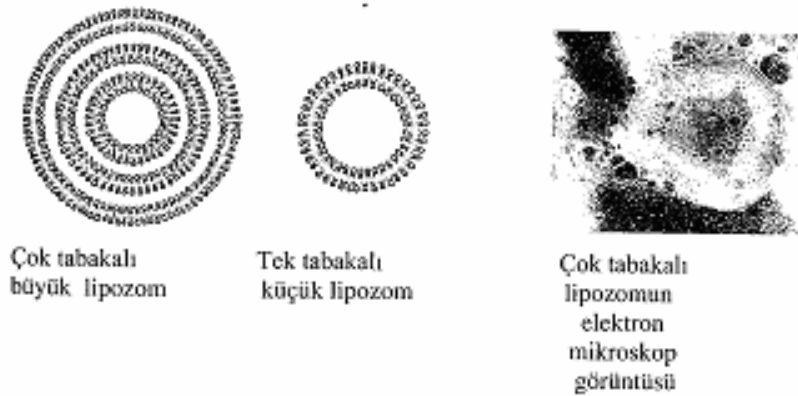
BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

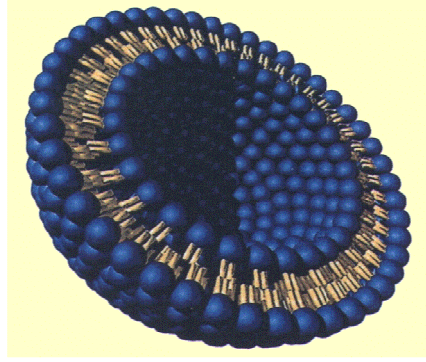
II.1. LİPOZOMLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

II.1.1. Lipozom Tanımı

Kolloidal taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, yaklaşık 0.02 - 3.5 μm çapında küresel veziküllerdir. Lipit çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Lipit çift tabaka tek veya çok sayıda olabilir. Şekil II.1' de tek ve çok tabakalı lipozomların şematik ve mikroskop görüntüsü, Şekil II.2' de tek tabakalı lipozomun üç boyutlu görüntüsü verilmiştir.



Şekil II.1. Tek ve Çok Tabakalı Lipozomların Şematik ve Mikroskop Görüntüsü



Şekil II.2. Tek Tabakalı Lipozomun Üç Boyutlu Görüntüsü

Lipozomlar, içlerine hapsedilen etkin maddelerin farmakokinetiğini değiştirirler. Lipozomlanmış etkin maddelerin absorpsiyonu, biyolojik dağılımı ve eliminasyonu serbest maddeden tamamen farklıdır. Sonuçta etkin maddenin terapötik etki ve toksitesi değişir (Allen, 2000).

II.1.2. Lipozomların Yapısı

Lipozomların lipit tabakası başlıca doğal ve sentetik fosfolipitlerden oluşur. Fosfolipitler amfoter özellikte maddelerdir. Molekölün hidrofilik baş grubu ve hidrofobik hidrokarbon zinciri vardır. Gliserin molekülünün 3 numaralı (OH) grubu önce fosforik asit ile esterleşir sonra fosforik asidin bir oksijeni değişik moleküllerle örneğin, gliserin, kolin, etanolamin, serin ve inositol ile tekrar esterleşerek hidrofilik baş grubunu oluştururlar. Şekil II.3’ de lipozomu oluşturan fosfolipit yapı gösterilmektedir.

Gliserinin 1 ve 2 numaralı (OH) grupları uzun zincirli yağ asitleri ile esterleşerek hidrokarbon zincirini oluşturur. Yağ asitlerinin zincir uzunlukları ve doymamışlık dereceleri fosfolipitlerin özelliklerini belirler.

Fosfolipitlerin içerdikleri başlıca doymamış yağ asitleri, oleik, linoleik, linolenik ve araşidonik asitler, doymuş yağ asitleri ise laurik, miristik, palmitik, stearik ve araşidik asitlerdir (Vemuri ve Rhodes, 1995). En çok kullanılan doğal ve sentetik fosfolipitler (PL); yumurta veya soya fosfatidilkolin (PC), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), distearilfosfatidilkolin (DSPC), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamin (PE) ve spingomiyelindir (SM).

$ \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{O}-\text{R} \\ \\ \text{CH}-\text{O}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{X}) \end{array} $ Ryağ asitleri	X: -OH fosfatidik asit
	$ \text{X: } -\text{OCH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^- $ fosfatidilkolin
	X: -OCH₂CH(NH₂)COOH fosfatidilserin
$ \text{X: } \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{OH} \end{array} $ fosfatidilinositol	X: -OCH₂CH₂NH₂ fosfatidiletanolamin

Şekil II.3. Lipozomu Oluşturan Fosfolipit Yapı

Lipit tabakanın özelliklerinde değişiklik yapmak için bazı maddeler ilave edilir. Sterollerin katılması ile lipit tabakanın geçirgenliği azaltılır. Steroller arasında en yaygın kullanılan kolesteroldür. Lipozomların plazmada uzun süre kalabilmesi için hidrofilik uzun zincir polimerler ve hedef bölgeye gönderilebilmeleri için bazı moleküller lipit tabakaya ilave edilir (Vemuri ve Rhodes, 1995).

II.1.3. Lipozomların Sınıflandırılması

Lipozomlar iki şekilde sınıflandırılırlar:

1. Büyüklük ve Tabaka Sayısına Göre Lipozomlar
2. Özel Karakterli Lipozomlar

II.1.3.1. Büyüklük ve Tabaka Sayısına Göre Lipozomlar

Bu kısımda lipozomlar büyüklük ve tabaka sayısı esas alınarak sınıflandırılmıştır.

➤ Çok tabakalı lipozomlar (MLV): İç içe birçok tabakadan oluşurlar. Tabakalar arasında sulu faz vardır ve büyüklükleri 400 – 3500 nm dir. Hidrofilik etkin maddeler sulu fazda, lipofilik etkin maddeler lipit tabakalarda tutulurlar. Ancak lipit tabaka sayısı fazla olduğu için lipofilik maddelerin tutulma oranı diğer lipozom tiplerine göre daha fazladır. Lipit

yapıda (+) veya (-) yük veren maddelerin bulunması, tabakalar arasındaki mesafenin genişlemesini ve daha fazla ilaç tutulmasını sağlar ve lipozomların agregat oluşturmasını engeller. Bu lipozomlar RES tarafından çok çabuk uzaklaştırılırlar.

➤ Büyük tek tabakalı lipozomlar (LUV): Tek tabakalı büyük lipozomların tek bir lipit tabakası vardır ve 100 nm’ den büyüktürler. İçlerindeki sulu faz MLV’ lere göre daha fazla olduğu için sulu fazda tutulan madde miktarı fazla olmaktadır. Daha az lipit kullanılarak hazırlandıkları için ekonomiktirler.

➤ Küçük tek tabakalı lipozomlar (SUV): Büyüklükleri 0.25 – 0.50 nm olan tek tabakalı lipozomlardır.

II.1.3.2. Özel Karakterli Lipozomlar

Bazı lipozomlar özel bir amaç için hazırlanırlar (Oku, 1991):

➤ Sıcaklığa hassas lipozomlar: Lipozomların lipit tabakasının sıcaklığa bağılı faz değıştirme özelliğinden yararlanılarak hazırlanır. Zira Tc değıerinde lipozom membranının geçirgenliğı çok artar. Özel bir bölgeye ilacın hedeflenmesi istendiğinde, bu bölgenin sıcaklığı lipozomların Tc değıerine getirilerek, bu bölgeden geçen lipozomların lipit tabakaları bozularak etkin maddeyi salması sağlanır.

➤ pH’ ya hassas lipozomlar: pH’ ya hassas lipozomlar, içlerindeki maddeleri sitoplazmaya verebilmeleri için geliştirilmişlerdir. Bu lipozomlara düşük asit özelliğı kazandırmak için bazı maddeler ilave edilebilir. Örneğın, PE lipozomlarına oleik asit ilavesi veya imidazol türevi ile lipozomun yapısını değıştirmek gibi işlemler yapılabilir. Lipozomlar hedef hücre içine girince endozom membranı ile birleşerek veya onu bozarak içeriklerini sitoplazmaya salarlar.

➤ Retikülo Endotelial Sistem (RES) korumalı veya sirkülasyonda uzun süre kalabilen veya Stealth® lipozomlar: Lipozomlar intravenöz verilmeyi takiben RES tarafından tutulurlar. Bunu engellemek ve

sirkülasyonda uzun süre kalmalarını sağlamak için lipozomun yapısına PEG polimeri gibi bazı maddeler ilave edilir (Liu ve Huang, 1993).

➤ Katyonik lipozomlar: RES korumalı lipozomların tersine hücre membranına ilgileri çok fazladır ve genellikle genetik maddeleri (RNA, oligonükleotidler gibi) hücre için taşımak için kullanılırlar. Hücre membranı ile füzyon yaparak birleşirler (Sharma ve Sharma, 1997; Sakurai ve ark., 2000).

➤ Hedef bölgeye gönderilebilen lipozomlar: Lipozomların etki etmesi istenen bölgeye gönderilebilmesidir. Hedeflendirme pasif veya aktif olmak üzere başlıca iki şekilde yapılabilir.

➤ Polimerize lipozomlar: Aşıların oral verilebilmesi için polimerize lipozomlar kullanılmıştır (Chen ve ark., 1996).

➤ Üstü kaplı lipozomlar: Bazı özel amaçlar için örneğin, mukozaya yapışma, belli bir bölgeye gönderilebilme, stabilite arttırma, vücutta dağılım ve farmakokinetiği değiştirme amacıyla lipozomların yüzeyi polimerlerle kaplanabilir. Bu iş için kullanılan polimerler; dekstran, manan, kitozan gibi polisakkaritler, lektin gibi glikoproteinler, parçalanabilen veya çözünen polimerlerdir. Bir polisakkarit olan pullan ile kaplanan lipozomların oral immunizasyonda kullanılabileceği gösterilmiştir (Venkatesan ve Vyas, 2000).

II.1.4. Lipozomların Hazırlanmasında Kullanılan

Metotlar

II.1.4.1. Çok Tabakalı Lipozomların Hazırlanışı

Çok tabakalı lipozomların hazırlanmaları için “ince lipid tabaka” veya “Bangham yöntemi” olarak isimlendirilen yöntem kullanılır. Bu yöntemde, lipozomu oluşturacak lipidler organik bir çözücünde çözündürülür sonra vakum altında organik çözücü uzaklaştırılır ve lipidlerin oluşturduğu ince film tabakası pH 7.4 tampon çözeltiyle çalkalanarak lipozom oluşturulur (Bangham ve ark., 1965).

MLV' lerin bir diğerk hazırlama yöntemi, lipitlerin çözüldürüldüğü organik çözücüye (petrol eteri veya dietileter) sulu tampon çözeltilisinin ilavesini takriben şiddetle çalkalamak ve organik çözücünün uçurulmasından sonra MLV' lerin sulu fazda kalmasını sağlamaktır. Bu yöntemle % 40'a kadar madde tutulması sağlanabilmiştir (Gürsoy, 2002).

II.1.4.2. Büyük Tek Tabakalı Lipozomların Hazırlanışı

Büyük tek tabakalı lipozomlar, ters faz buharlaştırma ve deterjan diyaliz yöntemleri ile hazırlanabildikleri gibi çok tabakalı lipozomların küçük porlu polikarbonat membranlardan, yüksek basınç altında defalarca geçirilmesi sonucu da hazırlanabilirler. Ayrıca yüksek basınçlı homojenizatörler veya "mikrosivılaştırıcılar" kullanılarak istenilen boyutta lipozom hazırlanabilir.

Ters faz buharlaştırma yönteminde önce fosfolipitlerin organik faz ve sulu faz karışımı ile s/y emülsiyonu hazırlanır ve alçak basınçta organik faz uçurulur. Organik faz uçtukça LUV' ler oluşur. Bu yöntemle hazırlanan lipozomlarda etkin madde tutulma oranı % 60-65 kadardır. Ancak yöntemin tek mahzuru, etkin maddenin organik çözücüyle temas etmesidir. Özellikle proteinlerle çalışırken sakıncalı olabilir.

Deterjan diyaliz yönteminde, önce fosfolipitlerin deterjan ile misel karışımları oluşturulur. Deterjan olarak anyonik ve non-iyonik deterjanlar kullanılır. Etkin madde bu çözeltilide çözüldürülür sonra diyaliz veya jel filtrasyon gibi tekniklerle uzaklaştırılır (Kagawa ve ark., 1971).

II.1.4.3. Küçük Tek Tabakalı Lipozomların Hazırlanışı

Küçük tek tabakalı lipozomların hazırlanmasında, MLV' lerin azot altında sonikasyonu en yaygın kullanılan yöntemdir. Banyo tipi sonikatörlerin kullanılması tercih edilir. Sıcaklığın denetlenebilmesi ve lipozomların aseptik hazırlanabilmesi yöntemin diğerk avantajlarından (Betageri ve ark., 1993).

Küçük tek tabakalı lipozomlar, çözücü enjeksiyon yöntemi kullanılarak da hazırlanabilirler. Çözücü olarak eter ve etanol kullanılabilir. Lipitler dietileterde çözüldürülür ve yavaşça ılık suya enjekte edilirler. Eter vakumla uzaklaştırılır ve

SUV'ler oluşur. Eter yerine etanol kullanıldığında etanolün sulu ortamdan uzaklaştırılması sorun yaratabilir (Vemuri ve Rhodes, 1995).

II.1.5. Maddelerin Lipozomlarda Tutulması ve Tutulmamış Maddelerin Uzaklaştırılması

Maddelerin lipozomlarda tutulabilmesi için genel olarak iki yöntem kullanılır:

1. Lipozomların hazırlanması sırasında etkin madde ilavesi
2. Boş lipozomlara etkin madde yüklemesi

Lipozomların hazırlanması sırasında etkin madde ilavesi: Genel olarak maddeler lipozomların hazırlanması sırasında formülasyona katılırlar. Bu yöntemde hidrofilik maddeler sulu fazda, lipofilik maddeler ise lipitlerin çözündürüldüğü organik fazda çözündürülürler. Bir lipozom formülünde sadece hidrofilik veya lipofilik madde bulunabileceği gibi her iki tip etkin madde birlikte yani aynı lipozomda tutulabilir. Tabii hidrofilik etken madde sulu fazda, lipofilik etken madde ise lipit fazda tutulur (Kut, 2000).

Boş lipozomlara etkin madde yüklenmesi: Bu yöntemde önce boş lipozomlar hazırlanır ve bu boş lipozomlar etkin madde çözeltisi ile karıştırılır. Sonra değişik işlemler uygulanarak etkin madde lipozomlara yüklenir. Bu işlemlerden biri dondurup-çözme işlemidir (Fresta ve ark.,1995; Bochot ve ark., 1998). Boş lipozomlara etkin madde yüklemek için uygulanan bir diğer işlem, “aktif yükleme” veya “uzaktan yükleme” veya “kademeli pH da yükleme” olarak isimlendirilir. Bu yüklemenin sadece hidrofilik etkin maddelere uygulanabileceği bildirilmiştir Boş lipozomun iki tarafındaki yani dış ortam ve lipozomun iç fazı arasındaki pH farkından yararlanılarak madde yüklenir. Bu işlem sırasında lipozomlar belli bir pH ve sıcaklıktaki etkin madde çözeltisi ile belli bir süre bekletilir. Sonra bağlanmamış etkin madde uzaklaştırılır (Sharma ve Sharma, 1997).

Lipozomlar hazırlandıktan sonra çözeltide kalan tutulmamış maddeyi ortamdan uzaklaştırmak için bazı yöntemler kullanılır. Bunlar, diyaliz yöntemi, çeşitli Sephadex ve Sepharose jeller kullanılarak jel filtrasyon, yüksek devirde ultrasantrifüj ve iyon değiştirici reçinelerin kullanılmasıdır. Tam bir temizleme için aynı işlemi

birkaç kere tekrarlamak veya iki değişik işlem uygulamak gerekebilir (Gürsoy ve ark.,1989; Vemuri ve Rhodes,1995).

II.1.6. Lipozomların In Vivo Değerlendirilmesi

II.1.6.1. Lipozomların Vücuda Veriliş Yolları

Lipozomlar vücuda başlıca paranteral, oküler, nazal, pulmoner, oral, transdermal, rektal ve vajinal yoldan verilirler.

➤ Paranteral yol: Enjeksiyon şeklinde intravenöz (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intramüsküler (i.m.), subkutan (s.c.), intraserebral ve lokal yollar en fazla kullanılan yollardır. Enjeksiyon yolu ile verilen lipozomların fiziksel özellikleri (büyüklük, lipit yapı, yük vb.) dağılımlarında önemli rol oynar. i.m. verilen lipozomlar, doku sıvısında bulunan ve hücre yıkımı sonucu oluşan protein ve lipoprotein gibi stabiliteyi bozan maddelerden etkilenirler. i.m., s.c. ve i.p. enjeksiyon yolu ile verilen lipozomlar lenf yolu ile taşınırlar ve lenfatik sistem hastalıklarında bu yol yararlı olur.

➤ Oküler uygulama: Lipozomlar kornea ve konjunktiva yüzeyi ile doğrudan temasta olabileceği için etkin maddenin absorpsiyonu serbest şekline göre artmaktadır. Ayrıca oligonükleotid lipozomlarının oküler uygulamalarından başarılı sonuçlar alınmıştır (Bochot ve ark., 1998). Siklosporin A (CsA) içeren PEG' lenmiş lipozomların gözde kalış süresinin konvansiyonel lipozomlardan daha uzun olduğu saptanmıştır (Eldem ve ark., 1997).

➤ Nazal yol: Serbest etkin madde nazal yolla verilince, etkin maddenin kısa süre kalması, enzim etkisine açık olması ve mukozadan zayıf penetrasyon göstermesi nedeniyle her zaman yeterli biyoyararlanım sağlanamamaktadır. Oysa lipozomlar bu mahzurları göstermezler. Nazal mukozanın (-) yükü ile lipozomların (+) yükünün elektrostatik etkileşimi sonucu lipozomlar bu bölgede uzun süre kalabilmektedir. Ayrıca lipozomlarla kalsitonin, insülin gibi makromoleküllerin absorpsiyonu sağlanabilmiştir. Lipozomlar endositoz, füzyon veya lipit değişimi sonucu bu moleküllerin hücrelere penetrasyonunu sağlarlar (Lee ve ark., 1994; Law ve Shih, 2001).

➤ Pulmoner yol: Lipozomlar akciğerlere ilaç göndermek için çok uygun taşıyıcılardır. Zira akciğer yüzey etkin maddelerinin % 85' i fosfolipitlerdir. Lipozomlar ilacın akciğerde kalış süresini uzatırken sistematik yan etkilerini çok azaltırlar. Ayrıca aerosollerle akciğerlere etkin madde göndererek lokal enfeksiyonların tedavisinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Lipozomların lipit yapısı, PEG' lenmesi, yükü, lipitlerin Tc değerleri, lipozomun akciğerde tutulma süresinde ve salım hızında dolayısıyla etkin maddenin terapötik etkisinde önemli faktörler olarak belirtilmiştir (Poyner ve ark., 1995; Beaulac ve ark., 1997). Diğer taraftan lipozomlanmış protein ve peptit yapılı makromoleküller pulmoner yolla verildiğinde serbest etkin maddeye göre sistematik absorpsiyonlarının arttığı ayrıca insülin ile başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Li ve Mitra, 1996).

➤ Oral yol: Lipozomların, mide-bağırsak sistemindeki pH ve enzimlerden kolayca etkilenmeleri oral yolla kullanılmalarını sınırlandıran en önemli faktördür. Son yıllarda polimerize lipozomlar kullanılarak bu engellerin aşılmasına çalışılmaktadır. Polimerize lipozomlarla aşıların oral yoldan verilebilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Chen ve ark., 1996).

➤ Transdermal yol: Etkin maddelerin lipozomlar içinde transdermal verilmesi son yıllarda tercih edilmektedir. Zira lipozomlar ilacın canlı epidermis ve dermise penetrasyonunu arttırmaktadır. Lipozomların deriden kolayca penetre olabilmelerine karşılık sistematik absorpsiyonları serbest ilaç içeren krem, jel ve merhem şekillerine göre daha az bulunmuştur (Mezei, 1992). Lipozomların yapısı, fizikokimyasal özellikleri ve derinin durumu etkin maddenin deriye penetrasyonunda önemli rol oynamaktadır (Vrhovnik ve ark. 1998). Ancak lipozomların epidermisi geçiş mekanizmaları henüz tam açıklanmamıştır (Honzak ve ark., 2000).

➤ Rektal ve vajinal yol: Lipozomların rektal ve vajinal uygulama çalışmaları son yıllarda artmıştır. İnsan geni taşıyan lipozomların rektal katater infüzyonu ile uygulaması başarılı sonuç vermiştir (Westbrook ve ark., 1994). Poliakrilat jel içindeki lipozomlar vajinal uygulandığında kontrollü salım sağlanabilmiştir (Pavelic ve ark., 2001).

II.1.6.2. Lipozomların Vücut Sıvılarındaki Durumu ve Eliminasyonu

Lipozomun stabilitesinde lipit yapısı ve plazmada bulunan bazı proteinler önemli rol oynar. Plazmada bulunan (apo) lipoproteinler i.v. verilen lipozomun lipit tabakasındaki fosfolipitlerle birleşerek lipit tabakanın bozulmasına neden olur. Özellikle yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) lipozomun lipit yapısını bozarlar ve salınımı tetiklerler. Lipoproteinlerin lipozom lipit tabakası ile birleşmesinde fosfolipit yapının önemi fazladır. Örneğin, doymamış yağ asitleri içeren fosfolipitler doymuş yağ asidi içerenlere göre daha dayanıksızdırlar ve plazma proteinlerinden de kolayca etkilenirler. Ayrıca saf olmayan fosfolipitler lipit tabakanın bozulmasına neden olurlar. Lipozomun yapısına kolesterol ve SM ilavesi ile bu bozulma engellenir. Lipozomlar plazma proteinlerinin bazıları ile kaplanınca RES tarafından fagosit ediliirler. Bu tutulma, lipozom dozuna bağlı olarak sırasıyla karaciğer, dalak, akciğer ve kemik iliğinde gerçekleşir. Düşük dozda verildiğinde sadece karaciğerde tutulabilirler ve oradan da elimine olurlar. Lipozomların akciğer ve kemik iliğinde tutulabilmeleri için yüksek dozda verilmeleri gerekir. Böbrek ve iskelet kaslarında tutulma daha düşük oranlarda ve doza bağlıdır. Ayrıca lipozomların RES tarafından tutulmalarında büyüklükleri ve yükleri önemlidir. Büyük lipozomlar küçüklerden, negatif yüklü lipozomlar yüksüz ve pozitif yüklülerden daha çabuk elimine edilirler (Fresta ve ark., 1995; Allen, 1997).

II.1.6.3. Lipozomlanmış Maddelerin Hücrelere Giriş Yolları

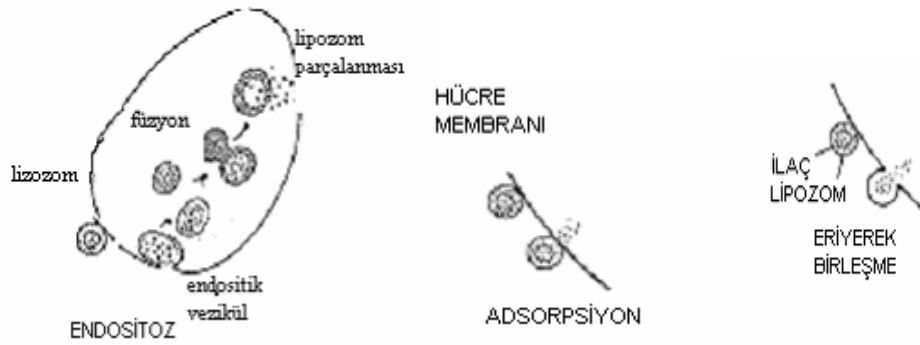
Lipozomlanmış maddelerin hücrelere verilili Şekil II.4' de gösterildiği gibi başlıca üç yolla olur (Gürsoy ve ark., 1989; Scherphof, 1991):

➤ Endositoz: Çok tabakalı veya tek tabakalı lipozomlar, fagositik hücre membranı yanına gelince membranın lipozomu hücre içine almasıdır. Hücredeki lizozomun lipozomu parçalaması sonucu madde salınır. Fizyolojik pH' da endozom membranı ile füzyon yaparak birleşirler ve içlerindeki maddeleri sitoplazmaya salarlar. Endositozun bir diğer şekli reseptör aracılığı ile olan endositozdur. Spesifik bir hücre için hedeflendirici molekül içeren lipozom, bu hücredeki reseptörler tarafından tutulunca içeriğini ekstraselüler

olarak salar ve etkin madde plazma membranından difüze olarak etkisini gösterir (Sharma ve Sharma, 1997).

➤ Füzyon: Lipozom lipid tabakası ile hücre membranının eriyerek birleşmesidir. Tek tabakalı lipozomun hücre membranı ile füzyon yapınca sulu fazda çözülmüş maddeler hücre sitoplazmasına geçer. Çok tabakalı lipozomlar hücre membranı ile füzyon yapınca birleşen tabakanın altındaki alınır ve hücre organelleri tarafından parçalandıktan sonra etkin madde serbest hale geçer. Ancak *in vivo* koşullarda bu mekanizma çok yaygın değildir.

➤ Adsorpsiyon: Önce lipozom hücre membranına adsorbe olur ve lipozomdan difüze olan maddeler hücre membranını geçerek içeri girerler.



Şekil II.4. Lipozomlanmış İlaçların Hücrelere Veriliş Mekanizmaları
(Crommelin ve Storm, 1987' den Modifiye Edilmiştir)

II.1.6.4. Lipozomların Tedaviye Yönelik Kullanım Alanları

Lipozomlar tıpta teşhis, tedavi ve koruyucu amaç için kullanılırlar. Bu amaçla hayvan ve insanlarda yapılan *in vivo* birçok çalışma başarılı sonuç vermiştir. Başlıca kullanım alanları, kanser kemoterapisi, bakteri, mantar ve viral enfeksiyonların tedavisi, paraziter hastalıklar, hormon ve enzim eksikliği, gen ile tedavi, virüs ve aşılarda verilmeleridir.

II.2. ARCHAEAZOMLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

II.2.1. Arkebakterilerin Tanımı ve Yapısı

Bilindiği gibi, ribozomal RNA'daki ribonükleotid sırasına göre canlılar, *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukarya* olmak üzere üç ana âleme ayrılırlar. Bu âlemlerin her birinin pek çok fenotipik özelliği bulunmaktadır. Filogenetik açıdan önemli olan fenotipik özellikler; hücre duvarı yapısı, lipidler, RNA polimeraz ve protein sentezindeki farklılıklardır (Balows ve ark.,1981; Madigan ve Martinko,2006).

Bacteria âleminin tüm türleri, peptidoglikandan oluşan bir hücre duvarı içerirler. Fakat bazı gruplarda hücre duvarı yapısında değişiklikler görülebilir. Bazı bakterilerde hücre duvarı proteinden oluşurken, bazılarında hücre duvarı bulunmamaktadır. Bu nedenle peptidoglikan bakteri türleri için belirleyici bir kriter olarak düşünülmektedir (Madigan ve Martinko, 2006).

Eukarya ve *Archaea* âlemlerinin hücre duvarında peptidoglikan bulunmaktadır. Arkebakteri'de pseudopeptidoglikan, polisakkarit, protein ve glikoproteinden yapılmış olan çeşitli tipte hücre duvarı yapıları bulunmaktadır. Mikroorganizmalar hücre duvarı kimyasına göre büyük çeşitlilik göstermelerine rağmen, filogenetik açıdan peptidoglikanın varlığı ya da yokluğu önemlidir. Pseudopeptidoglikanın yapısında tekrarlanan üniteler halinde N-asetilglukozamin ve N- asetiltalosamuramik asit vardır. Ayrıca, bunlar arasında glikozidik bağ β -1,3' tür (Madigan ve Martinko, 2006; Valera, 1988; Vreeland,1993).

Membran lipidlerinin kimyasal yapısı, *Bacteria*' dan *Archaea*' yı ayırt etmede kullanılmaktadır. Arkebakterilerde hücre membranında yağ asitleri ve ester bağı bulunmamaktadır. Bunun yerine gliserole eter bağı ile bağlanan uzun hidrokarbon zincirleri vardır. *Archaea*' da gliserol dieter ve gliserol tetraeterler ana lipidler olarak bulunmaktadır. *Bacteria*' daki ester bağı lipidlerde yağ asitleri genellikle düz zincirli linear moleküllerdir. Buna rağmen arkebakterilerde yağ asitleri yerine uzun zincirli dallanmış hidrokarbonlar, fitanil veya bifitanil bulunmaktadır ve bu yapılar gliserole eter bağı ile bağlanmaktadır. Özellikle hipertermofilik arkebakteri türlerinde çift tabakalı membran yapısı yerine tek tabakalı membran yapısı bulunmaktadır.

II.2.2. Arkebakterilerin Sınıflandırılması

Arkebakteriler, Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota ve Nanoarchaeota olarak dört ana alt âleme ayrılır. Euryarchaeota, Arkebakteri'nin fizyolojik olarak farklı gruplarını içerir ve bunların çoğu da farklı aşırı ortamlarda yaşarlar. Bu grubun içerisinde metajenik arkebakteriler (metan gazı üretenler) ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) gibi bakteriler bulunur. Aşırı halofillerin büyük bir kısmı zorunlu aeroplardır. Arkebakterilerin bazıları kemoorganotrof, bazıları kemolitotrof ve bazıları da ototroftur (Madigan ve Martinko, 2006; Munson, 1997; Spring ve ark.,1996; Valera, 1981; Vreeland,1993).

Halobacteriaceae familyasında *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Natrialba*, *Halobaculum*, *Halogeometricum*, *Haloterrigena*, *Natrinema*, *Natronomonas*, *Natronobacterium*, *Natronococcus* ve *Natronorubrum* cinsleri bulunmaktadır (Grant ve ark., 2001).

Aşırı halofil arkebakteriler (*Halobacteriaceae* familyası) tuz konsantrasyonunun 250 -300 g/l' yi aştığı tuzlu ortamlarda baskın olarak bulunan, kırmızı pigmentasyon oluşturan heterotrofik organizmalardır. Parlak kırmızı rengin gelişiminin tuzlu ortamlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Aşırı halofil terimi mikroorganizmanın, hem tuzlu ortamlarda geliştiğini hem de mikroorganizmanın tuza çok fazla gereksinim duyduğunu belirtmek için kullanılır. Bazen bu tuz gereksinimi tuzun doygunluk noktasına kadar olabilir. Aşırı halofillerin gelişmesi için en az 1.5 M NaCl (yaklaşık %9) ve çoğu türlerin optimal gelişmesi için 2-4 M NaCl (%12-23) gerekmektedir. Hemen hemen tüm aşırı halofiller 5.5 M NaCl' de gelişirler (NaCl doygunluğunun limiti % 32' dir). Buna rağmen bazı türler bu tuzlulukta çok yavaş gelişirler.

Aşırı halofil arkebakterilerin bazı türleri ışık vasıtasıyla ATP sentezi yapabilirler. Bu olay klorofil pigmenti ile gerçekleşmediğinden fotosentez değildir. Halofil arkebakteriler klorofil içermeyen, ışık enerjisi dönüşüm sistemine sahip tek organizmalardır (Greene ve Lanyi, 1979; Kushner, 1985; Madigan, 2006; Valera, 1988; Tu ve Huttchinson, 1984; Stoeckenius, 1985).

Halofil arkebakteri toplulukları hakkında nitel ve nicel bilgilerin elde edilmesinde mikroskopik ve pratik sayımlar ve diğer metodlar kullanılır. Halofil

arkebakterilerin karotenoid pigmentleri olan bakterioruberinlerin nicel olarak tayin edilmesi, bu organizmaların toplulukları hakkında kaba bir tahmini mümkün kılar. Bütün halofil arkebakteriler aynı karotenoid içeriğine sahip değildir. Özellikle *Haloferax* türleri zayıf pigmentasyon gösterirler. Bununla birlikte pigment içeriği hücrelerin besinsel durumuna bağlı olabilir. Ayrıca tuzluluk da burada önemli rol oynar. Bazı *Haloferax* türleri yüksek tuzluluk oranında yüksek pigmentasyona sahiptir, diğer taraftan düşük tuz konsantrasyonlarında renksiz olabilirler.

Halofil arkebakterilerdeki pigmentasyon, bakterioruberinler olarak adlandırılan kırmızı ve portakal renkli olan C₅₀ karotenoidlerinden dolayıdır. Bu pigmentler enerji metabolizmasına katılır. Oksijen konsantrasyonunun az olduğu ortamlarda *Halobacterium salinarum* ve bazı diğer aşırı halofiller, bakteriorhodopsin olarak adlandırılan mor bir protein sentezleyerek, bu proteini kendi membranı içine yerleştirirler. Bu retinal molekül ışığı absorplayarak proton itici kuvvetin oluşmasını kataliz eder ve böylece düşük oksijen konsantrasyonlu durumlarda bakteriorhodopsin sentezi başlar ve mikroorganizmanın rengi portakal ya da kırmızımsı renkten daha kırmızımsı mor renge dönüşür (Jones ve ark., 1987; Kates ve ark., 1982; Atlas, 1997; Madigan, 2006; Vreeland, 1993; Oren, 1994a; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve ark., 1984).

II.2.3. Aşırı Halofil Arkebakterilerin Yapısında Bulunan Polar Lipitler

Aşırı halofillerdeki lipidlerin tamamı, hücre kuru ağırlığının yaklaşık olarak % 2.5- 4 arasındadır. Aşırı halofillerde azotlu lipidlerin içeriği orta halofillerin ve halofil olmayan Bacteria' nınkinden daha düşüktür (Oren, 2000).

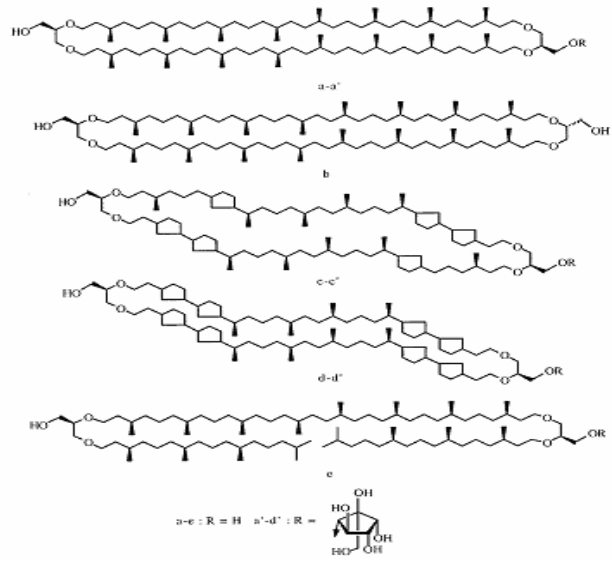
Aşırı halofillerin lipidlerinin en önemli özelliği, yağ asitlerinin veya hafif alkali hidrolizden sonra suda eriyebilen fosfat esterlerinin bulunmamasıdır. Aşırı halofil arkebakteriler, eter bağlı fosfogliseridlere sahip olmaları nedeniyle diğer halofil prokaryotlardan kolayca ayırt edilebilir (Bone ve ark.,2001; Kamekura ve Dyll Smith,1995). Tüm halobakteriler difitanil (C₂₀C₂₀) gliserol eter lipidlerine sahiptir. Fakat belli bazı suşlar bu yapıya ek olarak sesterterpanil-fitanil (C₂₅C₂₀) gliserol eter lipidlerine sahiptir. Haloalkalofillerin önemli suşları di-sesterterpanil-fitanil (C₂₅C₂₅) gliserol eter lipidlerine sahiptir. Ancak bidifitanil tetraeterler (C₄₀C₄₀) bugüne kadar

hiçbir halobakteride tespit edilmemiştir (Grant ve ark., 2001; Valera, 1988; Kamekura ve Dyll Smith, 1995).

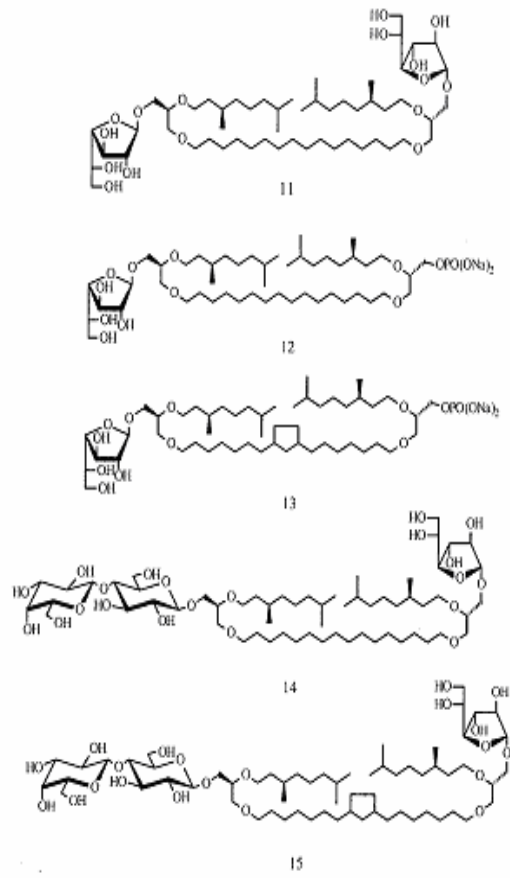
Çeşitli nötral ve polar lipidler de aşırı halofil arkebakterilerde bulunmaktadır. Fosfolipidler, sulfolipidler, glikolipidler gibi polar lipidler bu takımın farklı cinslerinde bulunmaktadır. Mevcut olan polar lipidlerin tipleri bu mikroorganizmaların taksonomik olarak sınıflandırılmasında önemli bir karakteristik olarak kullanılmaktadır. Bazı glikolipidlerin varlığı *Halobacteriaceae* familyasındaki cinslerin çoğu için önemli bir teşhis karakteristiği olarak kullanılmıştır (Torreblanca ve ark., 1986).

Arke membran ana lipitleri; SN2 reaksiyonu yoluyla eter bağlarıyla, doymuş izoprenoid zincirlerin gliserole bağlanmasından oluşmaktadır. Bu farklı bipolar lipitler (bolaamphiphiles), tetraeter 72 üyeli makrosikliklerden oluşmaktadır. Bu makrosiklikler, iki biftanil zincirinin her iki ucuna da bir gliserol ünitesinin veya simetrik veya asimetrik hidrofobik kaburbayı oluşturmak üzere bir polihidroksillenmiş kalditol grubunun eter bağıyla bağlanmasından oluşmaktadır. Bunlar genelde *caldarchaeol* ve *calditoglycerocalderchaeol* olarak isimlendirilir (Benvegnu ve ark., 2004).

Son birkaç yıldan beri, çeşitli simetrik/asimetrik ve akrilik/makrosiklik bipolar lipit analogları sentezlenmiştir. Metanojenik, termoasidofilik arkebakteri membran lipitlerinde bulunan *caldarchaeol* veya *calditoglycerocaldarchaeol* tipindeki tetraeterlerin tipik temel yapıları Şekil II.5' de ve sentetik simetrik ve asimetrik akrilik bipolar lipitlerin şekilleri Şekil II.6' da gösterilmiştir (Benvegnu ve ark., 2004).



Şekil II.5. Metanojenik, Termoasidofilik Arkebakteri Membran Lipitlerinde Bulunan Caldarchaeol Veya Calditoglycerocaldarchaeol Tipindeki Tetraeterlerin Tipik Temel Yapılarının Gösterilmesi



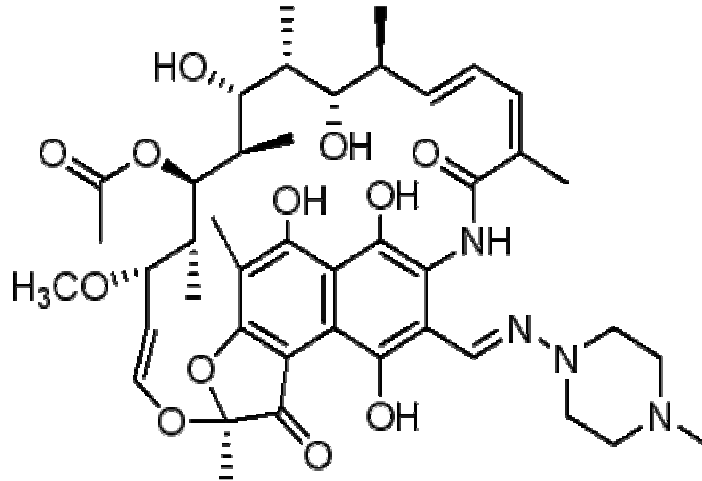
Şekil II.6. Sentetik Simetrik ve Asimetrik Akrilik Bipolar Lipitlerin Gösterilmesi

II.2.4. Archaeazom Tanımı

Archaeazom, arkebakteriden ekstrakte edilen polar eter lipidlerinden hazırlanan lipozomlara verilen bir isimdir. Archaeazom, *Archaeal Isoprenoid Glycerolipid Vesicle* anlamına gelir. Archaeazomların tek başına antijen teslim ettiği ve dendritik hücre aktivitesini değiştirdiği bulunmuştur (Benvegna ve ark., 2004). Antikor tarafından sağlanan (Th1/Th2) immün reaksiyonlarını destekledikleri ve toksik olmadıkları bildirilmiştir (Benvegna ve ark., 2004). Archaeazomların, konvansiyonel lipozomlara göre daha kararlı olduğu bildirilmiştir (Krishnan, 2000).

II.3. RİFAMPİSİN

Çalışmamızda lipozom içerisinde tutulması sağlanan “Rifampisin” veya “Rifampin” bakterisidal etkisi olan rifamisin grubundan bir antibiyotik ilaçtır. Genellikle mikobakteri enfeksiyonlarının (tüberküloz, lepra vb.) tedavisinde kullanılmaktadır. Rifampisin bakteri hücrelerindeki RNA polimerazı inhibe ederek (engellerek) mRNA’ nın transkripsiyonunu önler (<http://tr.wikipedia.org/wiki/-Rifampisin>). Rifampisin genellikle iyi tolere edilir fakat bazen ciddi toksitelere neden olabilir. En genel yan etkilerine deri ve gastrointestinal sistemler de rastlanır (<http://dermnetz.org/treatments/rifampicin.html>).



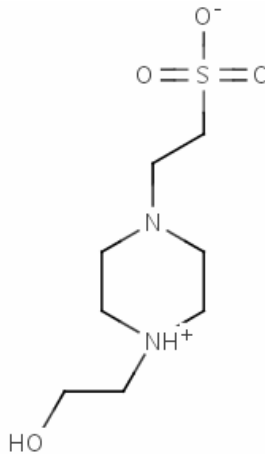
BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

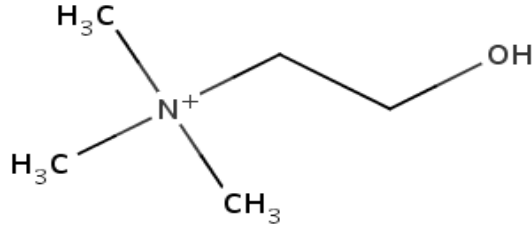
III.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler:

Deneyisel çalışmalar sırasında; potasyum klorür (KCl), trikloro asetik asit (TCA), sodyum klorür (NaCl), magnezyum sülfat hepta hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tri - sodyum sitrat dihidrat, sodyum metabisülfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), sodyum sülfite (Na_2SO_3), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), aminonaftol sülfonik asit ve potasyum hidroksit (KOH) Merck (Darmstadt–Germany); HEPES (Şekil II.8), amonyum molibdat tetra hidrat ve diyaliz torbası (selüloz membran) Sigma (Chemical Co. St. Louis); kolin (Şekil II.9) Fluka (Chemie GmbH); maya özütü Lab M; rifampisin (RIF) Koçak İlaç A.Ş., 0.45 µm polikarbonat filtre Schleicher&Schuell firmasından temin edilmiştir.



Şekil II.8. HEPES Moleküler Yapısı



Şekil II.9. Kolin Moleküler Yapısı

Kullanılan çözücüler:

Deneysel çalışmalar sırasında; klorofom, metanol çözücüler Merck (Darmstadt–Germany) firmasından temin edilmiştir.

III.2. KULLANILAN CİHAZLAR

- 1) Vakum Pompası.
- 2) UV Spektrofotometre Cihazı, Shimadzu UV-Visible Spectrophotometer UV-1601.
- 3) Spektrofotometre Küvetleri: Helma 3 mL' lik.
- 4) Taramalı Elektron mikroskobu (SEM): JOEL JSH-5910 LV.
- 5) Santrifüj: Sigma 3K 30 Laboratory Centrifuge, Soğutmalı Yüksek Devirli Santrifüj.
- 6) Santrifüj Rotorları: Sigma 12156H (10000 rpm), Sigma 12111H (~30000 rpm).
- 7) Santrifüj: Denley BS400 (3000 rpm).
- 8) Hassas Terazi: Sartorius Analitik Terazi A20S.
- 9) Terazi: Sartorius GM 312.
- 10) Distile Su Cihazı: Millipore RiOs-DIS UV.
- 11) Distile Su Cihazı: GFL 2001/4.
- 12) Su Banyoları, a. Clifton Digital Shaker Bath, 0-100 °C.
- 13) pH Metre: Hanna HI9024 Microcomputer pH Metre.

- 14) Manyetik Karıştırıcı: Wise Stir MSH 20A.
- 15) Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı: Janker&Kunkel, Labortechnik IKA.
- 16) Çalkalamalı Etüv: Edmund Bühler TH 15.
- 17) Etüv: Nüve EN 500.
- 18) Otoklav: Hirayama HMC.
- 19) Vorteks: Fision Whirli Mixer.
- 20) Otomatik Pipetler: Gilson.

III.3. DENEYSEL YÖNTEMLER

III.3.1. Lipozom Hazırlanması

III.3.1.1. *Haloarcula* 2TK2 Suşunun Brown Besiyerinde Üretilmesi ve Polar Lipitlerin İzolasyonu

Brown Besiyerinin Hazırlanması

NaCl	250 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g
KCl	2 g
Sodyum Sitrat	3 g
Maya Özütü	5 g
Distile Su	1000 mL
pH	7.5

121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir.

Bakterilerin gelişmesi için hazırlanan 2 L sıvı Brown besiyeri pH'ı 7.5'a ayarlandıktan sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. *Haloarcula* içeren 2TK2 pastel portakal izolatu steril Brown besiyerine ekilerek 37 °C'de 120 rpm'de yaklaşık 30 gün boyunca çalkalanmışlardır. 30 günlük inkübasyon süresinden sonra izolatların polar lipit analizi şu şekilde yapılmıştır:

1. Bakteriler 20 mL' lik santrifüj tüplerine konularak, 10000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
2. Üst faz dökülüp, pelet üzerine 0.75 mL distile su ve 3.75 mL kloroform/metanol (1/2) konulmuştur.
3. Pastör pipet yardımı ile peletin çözülmesi sağlanarak 2 saat bekletilmiştir.
4. Bu karışım cam bir tüpe aktarılıp 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Pastör pipetle alt faz alınıp, yeni bir cam tüpe aktarılmış ve pelet üzerine 4.75 mL kloroform/metanol/distile su (2/1/0.8) eklenmiştir.
6. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen alt faz bir önceki tüpte bulunanla birleştirilmiştir.

III.3.1.2. Evaporasyon, Hidrasyon ve Filtrasyon Aşamaları

Hidrasyon işlemi için, 50 mM HEPES, 75 mM KCl ve 25 mM kolin içeren (pH= 7.5) tampon çözelti hazırlandı.

Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

HEPES	1.1915 g
Kolin	0.3492 g
KCl	0.5589 g
Distile Su	100 mL
pH	7.5

Tampon çözeltisinin pH ayarını yapmak için KOH kullanıldı.

- 1) Örnek, altı düz 50 mL' lik balona aktarıldı.
- 2) Balon, vakumlu desikatöre konuldu. Örnekte yer alan çözücüler, su pompası yardımıyla yaklaşık 3 saatte uzaklaştırıldı.

- 3) Hazırlanan tampon çözeltisinden 1 mL, çözücüsü uzaklaştırılan örneğe ilave edildi.
- 4) Örnek, 1 saat vortekslendi ve bir gece boyunca 37 °C' lik çalkalamalı su banyosunda bırakıldı.
- 5) Örnek, 10 defa kuru buzda dondurulup çözüldü.
- 6) Örnek, 0.45 µm por büyüklüğündeki polikarbonat filtreden, cam enjektör kullanılarak 21 defa karşılıklı olarak geçirildi.
- 7) Hazırlanan archaeazomların görüntüsü taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelendi.

III.3.2. İlaç Yüklenmesi ve Salınımı

III.3.2.1. Rifampisin Stok ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

a) % 0.9 NaCl Çözeltisinin Hazırlanması

0.2186 g NaCl tartılarak 250 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Bir miktar distile su ile çözüldü ve son hacmine tamamlandı.

b) 150 ppm (mg/L)' lik Rifampisin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

15 mg rifampisin tartılıp 100 mL % 0.9 NaCl çözeltisinde bir gece boyunca karıştırılarak çözüldü.

cd) Rifampisin Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

75 ppm, 56.25 ppm, 37.50 ppm, 18.75 ppm ve 9.375 ppm konsantrasyonlarındaki rifampisin standart çalışma çözeltileri, 150 ppm rifampisin çözeltisini % 0.9 NaCl çözeltisi ile seyrelterek hazırlandı.

III.3.2.2. Rifampisin Standart Eğrisinin Hazırlanması

Hazırlanan rifampisin standart çalışma çözeltilerinin 474 nm' de absorbansları ölçüldü. Kör olarak % 0.9 NaCl çözeltisi kullanıldı. Rifampisin konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirildi.

III.3.2.3. Fosfolipit Tayini Çözeltilerinin Hazırlanması

a) % 5 TCA Çözeltisinin Hazırlanması

5 mL TCA alınarak 100 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Distile su ile hacmine tamamlandı.

b) 5 M H₂SO₄ Çözeltisinin Hazırlanması

100 mL distile su üzerine 100 mL konsantre H₂SO₄ ilave edildi, karıştırıldı ve 150 mL distile su ilave edildi.

c) Molibdat Reaktifinin Hazırlanması

6.25 g amonyum molibdat tartılarak 50 mL distile su ile çözüldü. 250 mL' lik erlene aktarıldı. 75 mL 5 M H₂SO₄ çözeltisi ilave edildi ve 250 mL' ye distile su ile tamamlandı.

d) Sodyum Metabisülfid Çözeltisinin Hazırlanması

7.5 g Na₂S₂O₅ tartılıp behere koyuldu. 50 mL distile su ile çözüldü. Çözelti berrak olduğu için filtre edilmedi.

e) Sodyum Sülfid Çözeltisinin Hazırlanması

5 g Na₂SO₃ tartılıp 25 mL' lik balon jojeye aktarıldı. Distile su ile çözülüp hacmine tamamlandı.

f) Aminonaftol Sülfonik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

0.125 g aminonaftol tartıldı. 48.75 mL Na₂S₂O₅ çözeltisi, 5 mL Na₂SO₃ çözeltisi ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Bulanık olduğu için 0.25 mL Na₂SO₃ ilave edildi ve kahverengi şişede saklandı.

g) KH₂PO₄ Stok Çözeltisinin Hazırlanması

351 mg KH₂PO₄ tartıldı. 1L'lik balon jojeye aktarıldı. 10 mL 5 M H₂SO₄ çözeltisi ilave edildi. 1 L'ye distile su ile tamamlandı.

h) (% 3.2) Seyreltik Standart Çalışma Çözeltisinin Hazırlanması

KH₂PO₄ stok çözeltisinden 2.5 mL alınıp 25 mL' lik balon jojeye aktarıldı. % 5 TCA çözeltisi ile 25 mL' ye tamamlandı. Bu çözelti % 3.2 mg fosfor içerir.

i) Standart Çalışma Çözeltilerinin Hazırlanması

% 1.6, % 0.8, % 0.4 konsantrasyonlarındaki ppm standart çalışma çözeltileri, %3,2 konsantrasyonundaki seyreltik standart çalışma çözeltilisini %5 TCA çözeltisi ile seyrelterek hazırlandı.

III.3.2.4. Fosfolipit Standart Eğrisinin Hazırlanması

Hazırlanan %3.2-0.4 standart çalışma çözeltilerinin 680 nm' de absorbansları ölçüldü. Kör olarak %5 TCA çözeltisi kullanıldı ve % fosfor konsantrasyonuna karşı absorbans değerleri grafiğe geçirildi.

III.3.2.5. Fosfolipit Tayini

- 1) 500 µL örnek alındı. Üzerine sırasıyla 0.1 mL molibdat reaktifi, 0.04 mL aminonaftol sülfonik asit çözeltisi ilave edildi.
- 2) 1 mL' ye distile su ile tamamlandı.
- 3) 5 dakika bekletildi.
- 4) 680 nm' de absorbansları ölçüldü. Kör olarak %5 TCA çözeltisi kullanıldı.

III.3.2.6. Rifampisin Çözeltisinin Yüklenmesi ve Salınımı

- 1) 16 L Brown besiyeri, III.3.1.1. de belirtildiği şekilde hazırlandı ve bakterilerin polar lipitleri izole edildi.
- 2) III.3.1.1. de belirtildiği şekilde örneğin çözücüsü uzaklaştırıldı.
- 3) Hazırlanan tampon çözeltisinden 1 mL, çözücüsü uzaklaştırılan örneğe ilave edildi.
- 4) Örnek, 1 saat vortekslendi ve bir gece boyunca 37 °C' lik çalkalamalı su banyosunda bırakıldı.
- 5) Örnekte fosfolipit tayini yapıldı.
- 6) 1 mL ilaç çözeltisi ilave edildi ve 30 dakika 37 °C' lik çalkalamalı su banyosunda bırakıldı.
- 7) Örnek, 10 defa kuru buzda dondurulup çözüldü.

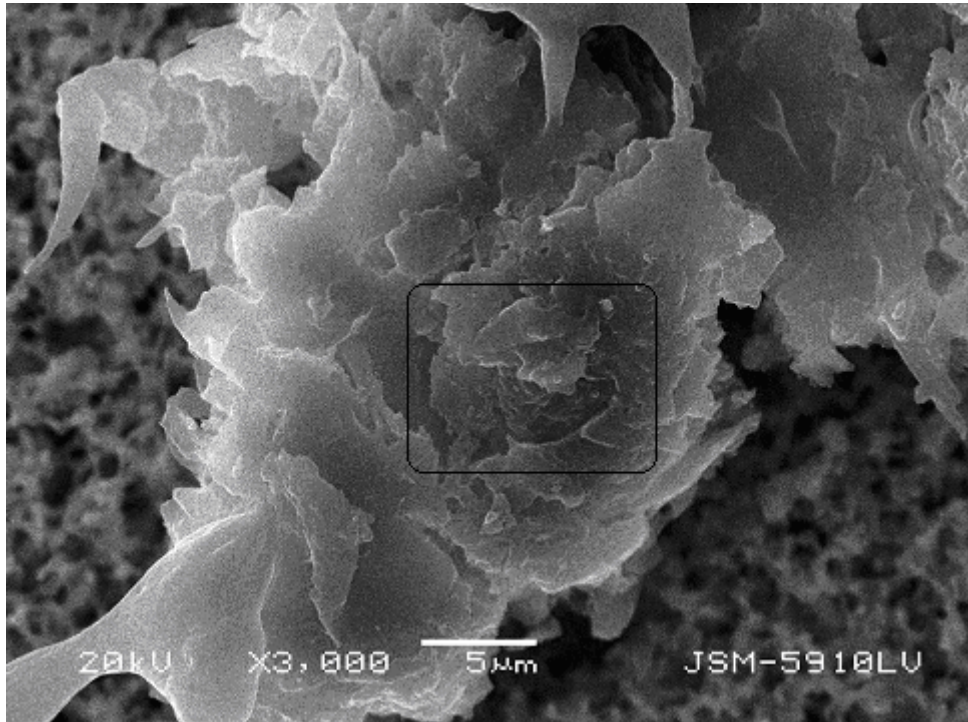
- 8) Örnek, 0.45 µm por büyüklüğündeki polikarbonat filtreden, cam enjektör kullanılarak 21 defa karşılıklı olarak geçirildi.
- 9) Süzüntü alınıp yaklaşık 30000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
- 10) Üst fazın absorbansı 474 nm de ölçüldü.
- 11) Pelet üzerine tampon çözelti ilave edildi ve tekrar santrifüj edildi. Bu işleme üst fazın absorbansı minimum indiği değer olan 0.329'a kadar devam edildi.
- 12) Pelete yaklaşık 1.5 mL % 0.9 NaCl ilave edildi ve önceden ıslatılmış diyaliz torbasına alındı.
- 13) İçinde 100 mL % 0.9 NaCl bulunan 150 mL behere yerleştirildi. Beher 37 °C' lik çalkalamalı su banyosuna konuldu.
- 14) Belirlenen zaman aralıklarında, beher içindeki % 0.9 NaCl çözeltisinden örnek alınarak 474 nm' de absorbansı ölçüldü. Ölçüm için alınan miktar kadar % 0,9 NaCl çözeltisi behere ilave edildi.

BÖLÜM IV

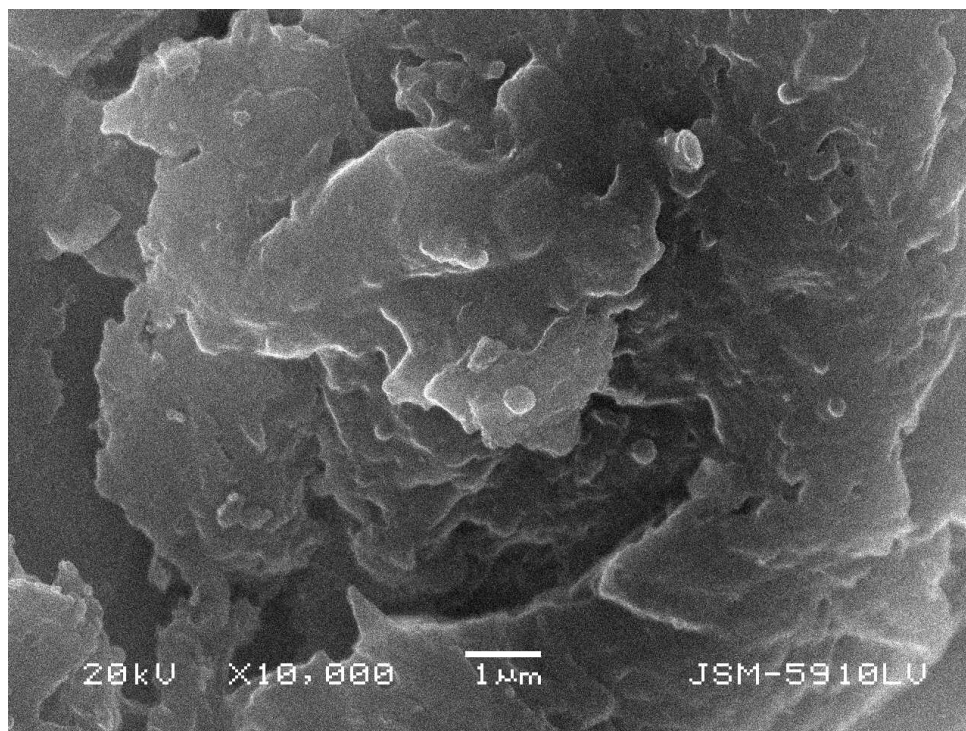
SONUÇLAR

IV.1. LİPOZOM HAZIRLANMASI

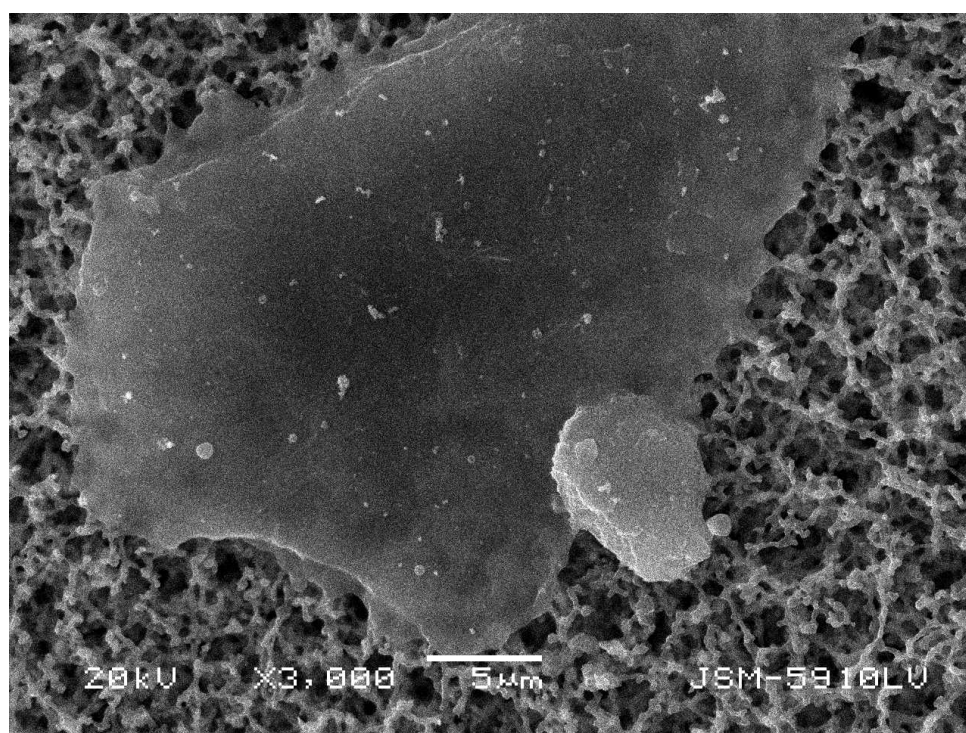
Bölüm III.3.1’ de anlatıldığı şekilde lipozomlar hazırlanmıştır. Şekil IV.10’ da archaeazomların taramalı elektron mikroskopu ile, uzaktan yakına doğru alınan görüntüleri ve belirlenen partikül boyutları verilmiştir. Bu şekilde, 0,45 μm ’ den küçük partikül boyutunda LUV’ lerin hazırlandığı kanıtlanmıştır.



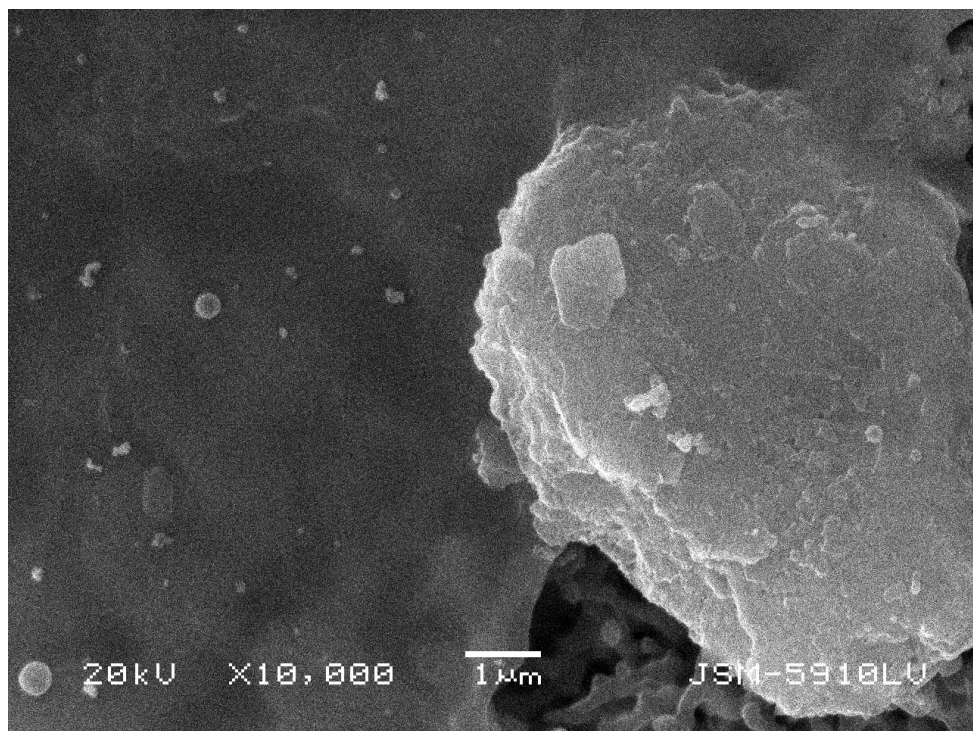
(1a)



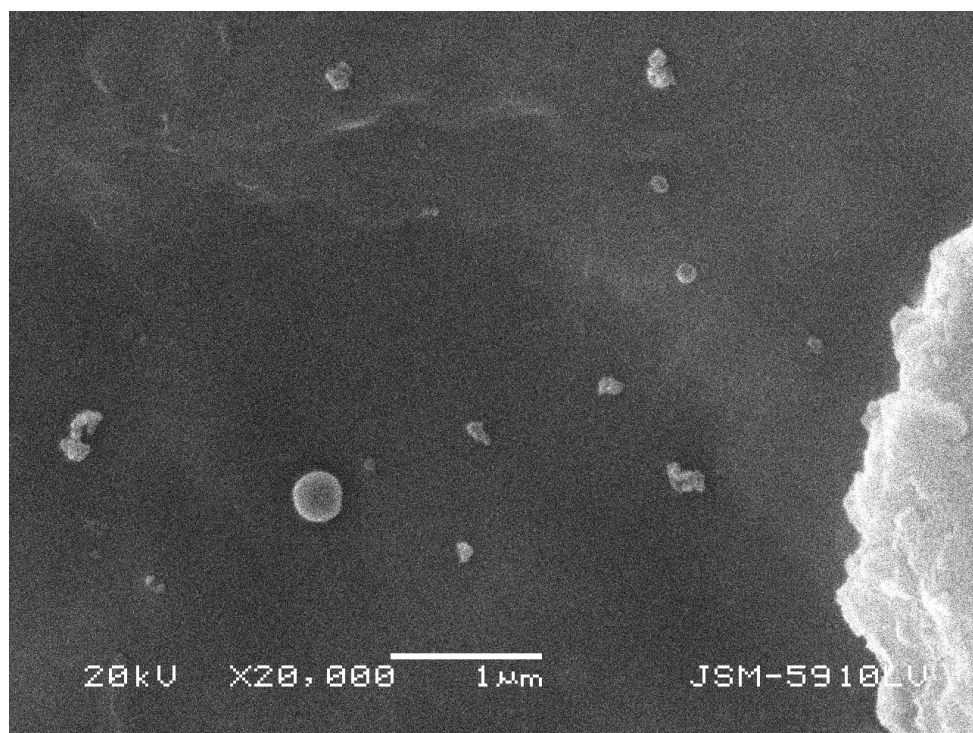
(1b)



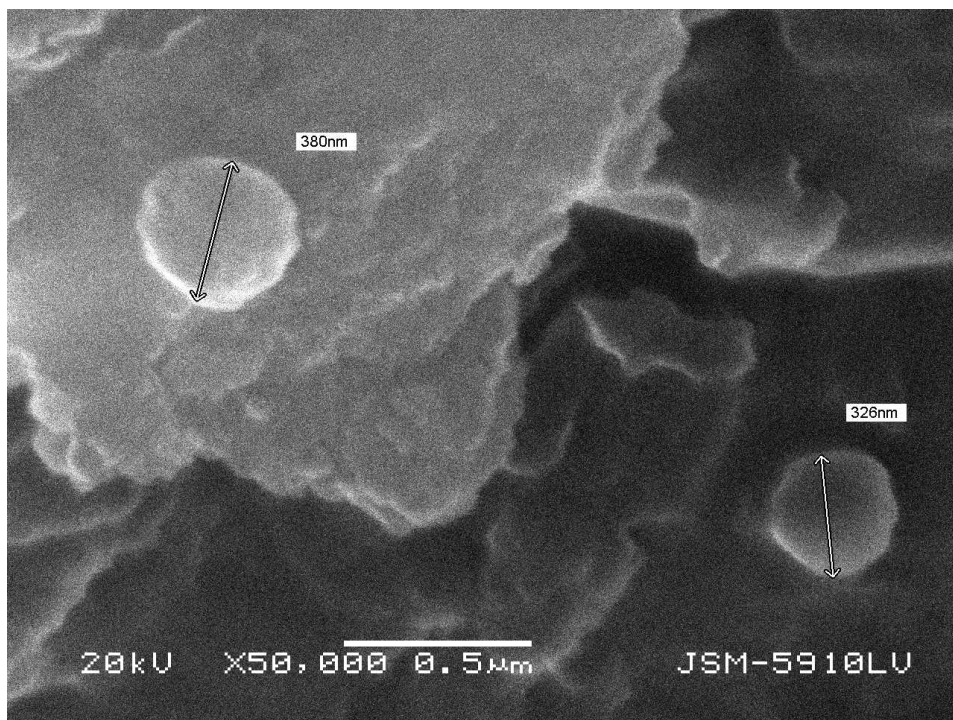
(2a)



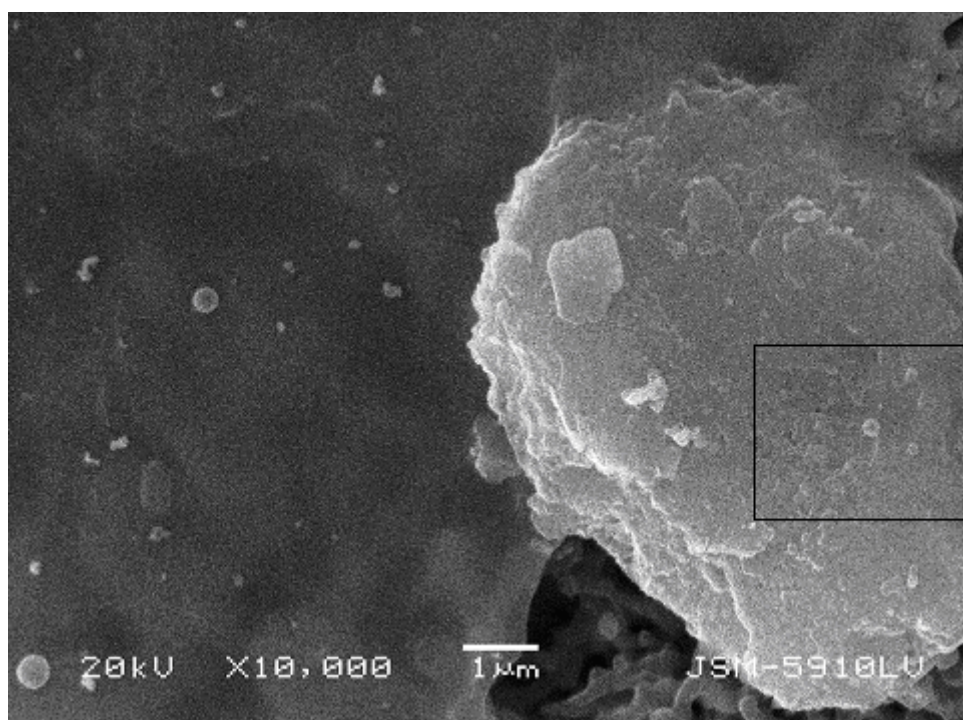
(2b)



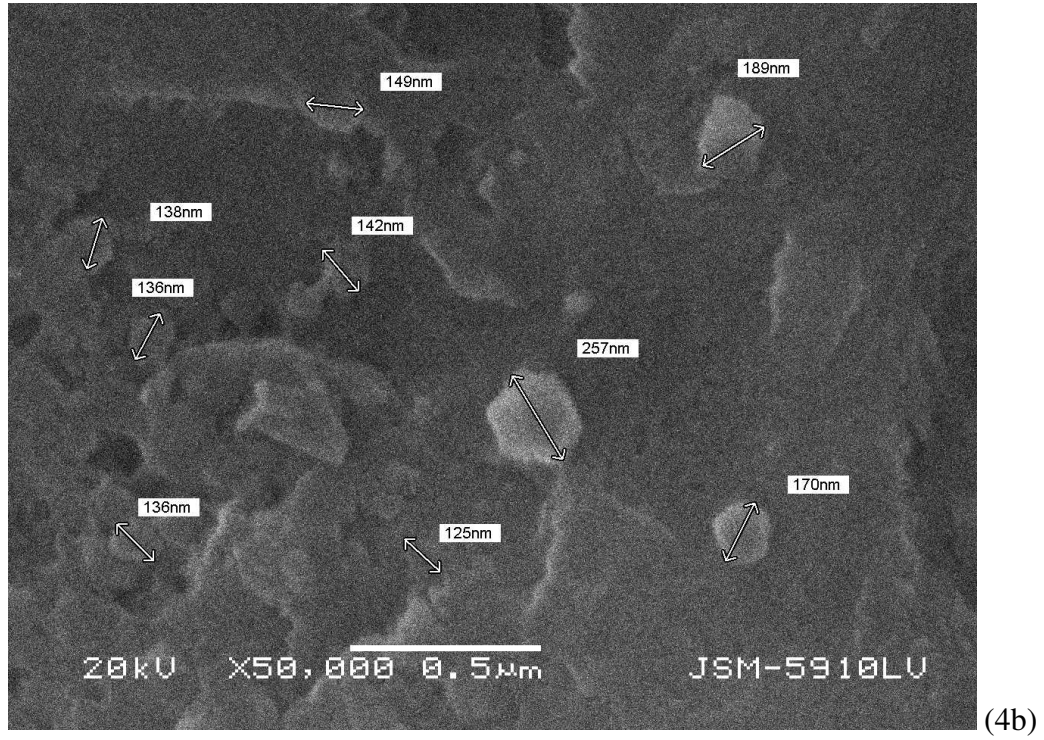
(2c)



(3a)



(4a)



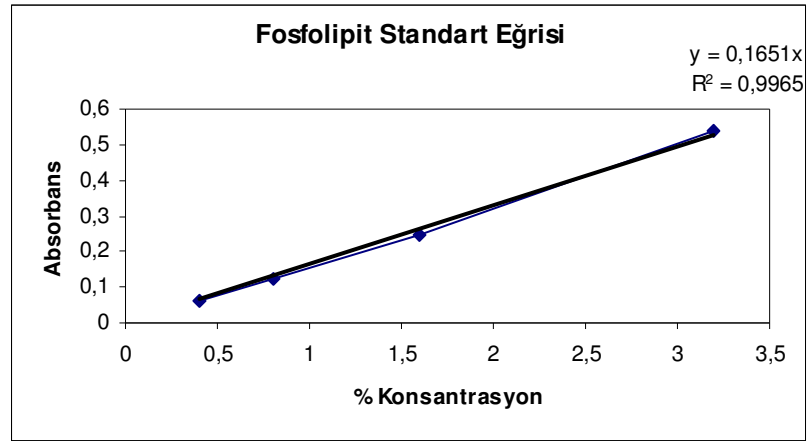
Şekil IV.10 (1a, 1b,2a ,2b ,2c ,3a ,4a)Taramalı Elektron Mikroskopuyla Çeşitli Bölgelerden Görüntüleri Alınan Archaeazomlar ve Belirlenen Partikül Boyutları

IV.2. FOSFOLİPİT TAYİNİ

İlaç yüklemesi yapılmadan önce hidrate edilmiş örnekte fosfolipit tayini yapıldı. İlk olarak, III.3.2.5.' de belirtildiği şekilde fosfolipit standart eğrisi hazırlandı. Daha sonra grafiğin eğiminden faydalanarak örnekte yer alan fosfolipit miktarı hesaplandı.

% FOSFOLİPİT KONSANTRASYONU	DALGA BOYU	ABSORBANS
0.4	680 nm	0.059
0.8		0.125
1.6		0.248
3.2		0.539

Tablo IV.1. Fosfolipit Standart Çözeltilerinin Konsantrasyonları ve 680 nm' deki Absorbans Değerleri



Şekil IV.11. Fosfolipit Standart Eğrisi

Örneğin 680 nm’ deki absorbans değeri 0.724 olarak ölçüldü. Kullanılan standart çalışma çözeltilerinin absorbans değerlerinden daha büyük olduğu için ekstrapolasyon yapılarak % fosfor konsantrasyonu hesaplandı. $y=0.1651x$ denkleminde $y=0,724$ alınarak x hesaplandı.

$$y = 0.1651x ; 0.724 = 0,1651x ; x = 4.38$$

Örnekteki fosfor konsantrasyonu % 4.38’ dir.

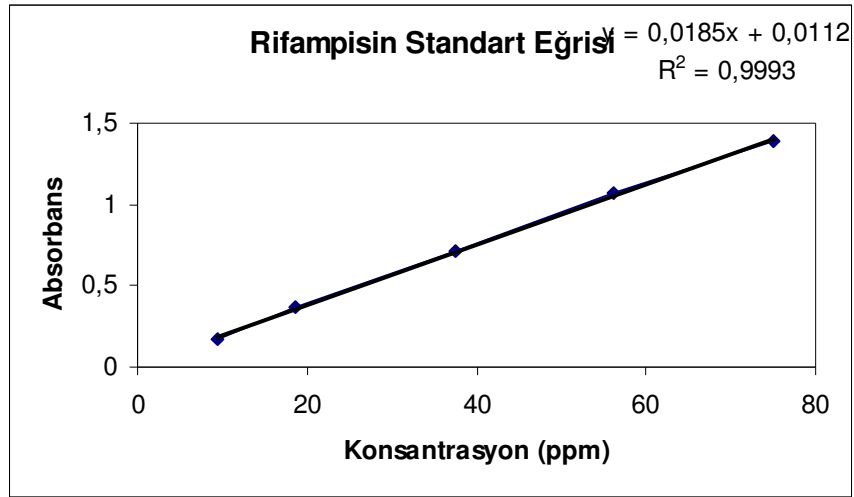
Örneğe, 150 ppm konsantrasyonundaki rifampisin çözeltisinden 1 mL yüklenmesi uygun görüldü.

IV.3.RİFAMPİSİN STANDART EĞRİSİNİN HAZIRLANMASI

III.3.2.2’ de belirtildiği şekilde rifampisin standart eğrisi hazırlandı. Daha sonra grafiğin eğiminden faydalanarak ilaç salınım yüzdeleri hesaplandı.

RİFAMPİSİN KONSANTRASYONU (ppm)	DALGA BOYU (nm)	ABSORBANS
9.375	474	0.1715
18.75		0.3655
37.5		0.712
56.25		1.07
75		1.387

Tablo IV.2. Rifampisin Standart Çözeltilerinin Konsantrasyonları ve 474 nm’ deki Absorbans Değerleri



Şekil IV.12. Rifampisin Standart Eğrisi

IV.4. İLAÇ YÜKLEMESİ VE SALINIM SONUÇLARI

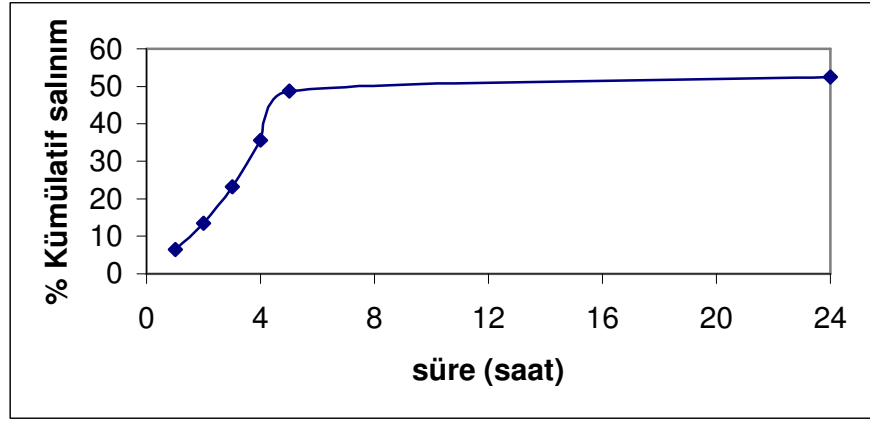
Elde edilen absorbans verisi, kalibrasyon eğrisinden elde edilen eşitlikte yerine konularak ilaç konsantrasyonu hesaplandı. Başlangıçtaki ve yükleme sonrası çözeltideki ilaç konsantrasyonu farkından, lipozom içine alınan ilaç miktarı hesaplanmıştır.

$$y = 0.0185x + 0.0112$$

En son süpernetantın okunan absorbans değeri 0.329'dur. Yukarıdaki denkleme kullanılarak hesap yapıldığında, 132.83 ppm ilacın lipozoma yüklendiği belirlendi. Tablo IV.3.' de rifampisin salınım sonuçları ve Şekil IV.13' de rifampisin salınım eğrisi verilmiştir.

Salınım süresi (saat)	Absorbans Değeri	% Kümülatif Salınım
1	0.016	6.4
2	0.021	13.44
3	0.028	23.13
4	0.032	35.65
5	0.036	48.80
24	0.045	52.44

Tablo IV.3. Rifampisin Salınım Sonuçları



Şekil IV.13. Rifampisin Salınım Eğrisi

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER

Lipozomlar, yapılarındaki hidrofilik kısımda suda çözülebilen maddeleri tutma özelliğine sahip yapay fosfolipit kesecikleridir. Lipozomlarla ilgili ilk çalışma Bangham ve arkadaşları (1964) tarafından yapılmıştır. Sadece hücre membranına model oluşturmak üzere başlatılan bu çalışmalar lipozomların etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılabileceğinin anlaşılması ile yoğunlaşmıştır. Etkin maddelerin lipozomlanmasının başlıca avantajlarını şöyle sıralayabiliriz (Gürsoy ve ark., 1989; Allen, 2000): Vücudun yapı taşı olan fosfolipitlerden oluştukları için biyolojik olarak yıkılırlar, immünojenik ve toksik etki göstermezler. İlacı hedef bölgeye götürebilirler ve küçük dozlarla terapötik etki sağlayabilirler. Etkin madde plazma düzeyini istenilen süre terapötik değerde tutabilirler. Dozlama aralığını uzatabilirler ve suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyabilirler.

Uzun yıllardır lipozomlarla ilgili çalışmalar yapılmasına rağmen piyasa preparatı sayısı sınırlıdır. Zira lipozomların kararlılık, büyük çapta imalat, seriler arası farklılıklar ve sterilizasyon gibi temel sorunları henüz tam çözülememiştir. Oysa ilaç sanayinde bir ürünün kabul edilebilirliği büyük çapta imalata dönüştürülebilmesi ve ekonomik olarak uygun olmasına bağlıdır. Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilite sorunu dolayısıyla raf ömrü kısadır. Fiziksel dayanıksızlık, lipozomdan madde sızmasına ayrıca agregat oluşmasına neden olabilir. Kimyasal dayanıksızlık, lipitlerin çifte bağının oksidasyonundan veya ester bağının hidrolizinden olabilir. Tam bir çözüm sağlayamasa da α - tokoferol, doymamış yağların peroksidasyonunu engellemek için ilave edilir. Bazı stabilite

sorunlarının lipozomları liyofilize ederek saklandığında önlenileceği de bildirilmiştir (Van Winden ve Cromellin, 1999).

Sterilite bir diğer önemli sorundur. Fosfolipitler ısıya ve diğer sterilizasyon yöntemlerine radyasyon/ kimyasal sterilizasyon maddelerine karşı hassastır. En uygun sterilizasyon yöntemi aseptik ortamda filtrasyon ile sterilizasyondur. Hazırlanan lipozomlar 0.22 µm por büyüklüğünde membranlardan geçirilerek steril edilebilir. Ancak bu yöntem büyük lipozomlara uygulanamaz ve virüslerden arındıramaz (Sharma ve Sharma, 1997).

Bütün bu sorunlara rağmen lipozomların diğer koloidal sistemlere göre üstünlükleri vardır. Yapılarında polimer olmaması onları vazgeçilmez kılmaktadır. Dolayısıyla lipozom preparatları geleceğin ilaç taşıyıcı sistemleri olarak özellikle gelişen gen teknolojisi ile gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Lipozom formülasyonun özellikleri, kompozisyona (anyonik, katyonik, nötral lipit türleri) bağlı olarak değişir. Ancak, bütün lipit kompozisyonları için, aynı hazırlama metodu kullanılmaktadır. Prosedürün ana basamakları, hidrasyon için lipitlerin hazırlanması, çalkalama ile hidrasyon ve keselerin homojen dağılımı için boyutlandırmadır. Lipozomun lipit yapısını değiştirerek etkin maddenin salım hızını ayarlamak mümkündür (Bochet ve ark., 1998).

Arkebakteri, aşırı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen bir canlı türüdür. Ökaryotik ve prokaryotik türlerden kimyasal olarak farklı olan lipit türleri içerirler. Son yıllarda laboratuvar koşullarında arkebakterinin yapısında yer alan bipolar lipitlere benzer simetrik ve asimetrik akrilik bipolar lipit analogları sentezlenmiştir (Şekil II.6), (Benvegnu ve ark., 2004). Tetraeter lipitler içeren arkebakterilerden hazırlanan lipozomların yüksek sıcaklık, bazlar, pH ve serum proteinlerine karşı en kararlı lipozomlar olduğu bildirilmiştir (C.G.Choquet ve ark., 1994).

Bu çalışmada, arkebakterilerden lipozomlar hazırlanmıştır. İlk olarak arkebakterilerin sıvı Brown besiyerinde üremeleri sağlanmış daha sonra arkebakterilerin polar lipitleri ekstre edilmiştir. Literatürde archaeazom hazırlanması ile ilgili olarak çok çeşitli yöntemler bildirilmiştir. Lipit süspansiyonunun çözücüsünü uzaklaştırmak için, azot gazı altında kuruttuktan sonra 3 saat vakum

uygulandığı (Otter ve ark.,1999) veya tabanı düz balona koyulan lipit süspansiyonunun döner buharlaştırıcıda vakum altında tutulduğu bazı makalelerde bildirilmiştir (<http://www.avatilipids.com>). Biz bu çalışmamızda lipit süspansiyonunun çözücüsünü uzaklaştırmak için, örneği tabanı düz balona koyduktan sonra düşük vakum uyguladık.

Lipozomun yapısında yer alan lipitlere göre değişebilen Tc değerinin önemi anlaşılmıştır. Çünkü, lipozomlar faz değiştirme özelliği gösterirler, jel (katı) veya sıvı kristal (sıvı) faz halinde bulunurlar. Lipozomların faz değiştirme özelliğini fosfolipitlerin yapısı belirler. Her lipidin bir faz değiştirme sıcaklığı (Tc) vardır. Fosfolipitlerdeki uzunluk, doymuş veya doymamışlık durumuna göre Tc değeri -20 °C den 90 °C' ye kadar değişir. Eğer fosfolipitlerin $T_c \geq 37$ °C ise lipozom fizyolojik şartlarda daha sağlam bir yapı gösterir yani taşıdığı moleküllerin dışarıya sızması güçtür (Gürsoy; 2002). Hidrasyon ortamının eklenmesinden sonra, lipit süspansiyonu sıcaklığı hidrasyon süresi boyunca Tc değerinin üstünde olması gerektiği belirtilmiştir. Eğer hidrasyon aşamasında su banyosunun sıcaklığı Tc değerinin altında olursa, agregat oluşma ihtimalinin arttığı bildirilmiştir Fosfolipid yapısına bağlı olarak da Tc sıcaklığı da değişebilmektedir (<http://www.avatilipids.com>). Biz de bu durumu gözönünde bulundurarak lipozomların hazırlanmasında hidrasyon sıcaklığını 37 °C olarak belirledik.

Yavaşça hidratlanan lipitler hidrasyonda kendiliğinden agregat oluşturma eğilimindedir. Agregatlar, çalkalama ile dağılan fakat yeniden oluşan büyük foliküller olarak çözeltide bulunurlar. Hidrasyon zamanı lipit türleri ve yapıları arasında az bir farklılık göstermektedir. Hidrasyon ortamı, genel olarak lipit keseciklerinin uygulamasına bağlı olarak değişmektedir. Uygun hidrasyon ortamlarının, distile su, tuz, tampon çözeltiler, ve şeker çözeltileri gibi elektrolit olmayan çözeltiler olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada hidrasyon ortamı olarak, 50 mM HEPES, 75 mM KCl ve 25 mM kolin içeren (pH= 7.5) tampon çözelti kullanılmıştır. Hidrasyon için, lipit süspansiyonu 1 saat vorteks ile hızlı çalkalanmış ve bir gece boyunca 37 °C su banyosunda bırakılmıştır.

Lipit süspansiyonun boyutlandırma aşaması için bir gece bırakılmasının, boyutlandırma prosesinin daha kolay olmasına olanak verdiği ve boyut dağılımının homojenliğini geliştirdiği belirtilmiştir (<http://www.avatilipids.com>). Daha sonra lipit

süspansiyonu ardaşık 10 defa dondurulup-çözölmüştür. Çözölme işleminden sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Dondurma ve çözme işlemlerini yapmadan lipozom elde edilen yayınlara da rastlanmıştır (Krishnn ve ark., 1999).

En son aşamada 0.45 µm boyutundaki polikarbonat filtreden 21 defa geçirilerek LUV' ler oluşturulmuştur. Şekil IV.7' de hazırlanan lipozomların taramalı elektron mikroskopuyla alınan görüntöleri incelendiğinde 0.45 µm den küçük boyutlarda oldukça uniform yapıda yuvarlak lipozomların oluştuğu görölmektedir. Bunun yanı sıra hidrasyon sırasında sıcaklığa çok dikkat edilmesine rağmen bazı agregat şeklinde yapılar oluşmuştur. Bu yapıların polar lipidlerin kompozisyonundan ötürü oluşabildiğini bazı makalelerde belirtilmiştir (Gürsoy, 2002).

Maddelerin lipozomlarda tutulabilmesi için genel olarak iki yöntem kullanılır. Birincisi; Lipozomların hazırlanması sırasında etkin madde eklenmesi, ikincisi ise boş lipozomlara etkin madde yüklemesidir. Bu çalışmamızda birinci yöntemi kullandık ve lipozomların hazırlanması sırasında ilaç ekledik. Lipozomların ilaç yüklemesi ve salınımını incelemek için model ilaç olarak suda az çözünür 150 ppm' lik rifampisin ile çalışılmıştır. Rifampisin % 0.9 NaCl çözeltisinde miktarı artırıldığında fazla çözünür olmadığı için en fazla 150 ppm çözündüğü görölmüştür. Bunun üstündeki değerlerde çökme başlamıştır. Daha önce yapılan denemelerde hazırlanan rifampisinin absorpsiyon spektrumunu incelediğimizde iki ayrı dalga boyunda (363 nm ve 474 nm) maksimum absorbands piki görölmektedir. Literatürde rifampisin ile ilgili makalelerde uygun dalga boyu olarak 474 nm' de ölçüm alındığı rapor edilmiştir, bu çalışmada da spektrofotometrik olarak aynı dalga boyunda ölçümler alınmıştır. Lipozom süspansiyonu elde edildikten sonra yüklenecek ilaç miktarını belirlemek için fosfolipit tayini yapılmıştır. Hesaplamalar sonucunda 1 ml' lik lipid süspansiyonuna 1 ml 150 ppm rifampisin ilave edilmesine karar verilmiştir.

Rifampisin hidrasyon işleminden sonra lipit süspansiyonuna eklenmiştir. Rifampisin ile lipozomun etkileşmesi için yaklaşık 30 dakika 37 °C' lik çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra lipozomlanmamış rifampisinin belirlenmesi için santrifüj işlemine geçilmiştir. Lipozomlanmamış rifampisinin ortamdan uzaklaştırılmasından sonra ilaç salınımına bakılmıştır. İlk 5 saat her saat başı ilaç salınımı izlenmiş ve salınım % si hesaplanmıştır.

Salınım sonuçları incelendiğinde, ilk 3 saat içinde ilacın salınımının yaklaşık % 20 olmasına rağmen, 4. saatten sonra yaklaşık % 35 değerine çıktığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada 5 saatlik salınım sonuçları incelendiğinde ilacın yaklaşık % 50'sinin salındığı bulunmuştur (Gürsoy ve ark., 2004). Bu farkın, lipozom hazırlanmasında kullanılan lipit farklılığından ve ilacın çözündürüldüğü ortam farklılığından olabileceği düşünülmüştür.

Bütün bu çalışmalar sonucunda, Tuzköy Tuz Madeninden izole edilen aşırı halofil arkebakteri; *Haloarcula* 2TK2 suşundan hazırlanan archaeazomların ilaç taşınmasında kullanılabileceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Allen T.M., “Solving Drug Delivery Problems with Liposomal Carriers in Controlled Drug Delivery” Designing Technologies for Future, Eds.: K. Park and R.J. Mersny, American Chemical Society, Washington DC, 100-109 (2000).
- [2] Allen T. M., “Liposomes: Opportunities in Drug Delivery” *Drugs*, 54 (suppl.4), 14-24 (1997).
- [3] Atlas, R.M., “Archaeal Diversity”, *Principles of Microbiology* 2nd Edition, Von Hoffman Press, Inc., USA, 1057-1091 (1997).
- [4] Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K. H., “The Prokaryotes” Springer-Verlag, 1(34), 768 (1981)
- [5] Bangham, A. D.; M. M. Standish and J. C. Watkins, “Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids” *Journal of Molecular Biology*, 13, 238-252 (1965).
- [6] Bangham A.D., Horne R.W., “Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface Active Agents as Observed in the Electron Microscopy” *Molecular Biology*, 8, 660-668 (1964).
- [7] Betageri G. V., Jenkins S. A., Parsons D. L. *Liposome Drug Delivery Systems*. Lancaster: Technomic Publishing Co (1993).
- [8] Beaulac C., Clement –Major S., Hawari J., “ In Vitro Kinetics of Drug Release and Pulmonary Retention of Microencapsulated Antibiotics in Liposomal Formulations in Relation to the Lipid Composition” *Journal of Microencapsulation*, 14, 335-348 (1997).
- [9] Benvegnu, T. , Brard, M. , Plusquellec, D. , “Archaeobacteria Bipolar Lipids Analogues: Structure, Synthesis and Lyotropic Properties” *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Rennes, 8, 469-479 (2004).

- [10] Bochot A., Fattal E., Gulik A., Couarraze G., Couvreur P., “Liposomes Dispersed within A Thermosensitive Gel: A New Dosage Form for Ocular Delivery of Oligonucleotides” *Pharmaceutical Research*, 15, 1364-1369 (1998).
- [11] C.G.Choquet, G. B. Patel, T. J. Beveridge, G. D. Sprott, “Stability of Pressure-Extruded Liposomes Made from Archaeobacterial Ether Lipids” *Applied Microbiol. Biotechnol.*, Springer-Verlag, New York, 42, 375-384 (1994).
- [12] Chen H., Torchilin V., Langer R., “Polimerized Liposomes as Potential Oral Vaccine Carriers: Stability and Bioavailability” *Journal of Controlled Release*, 42, 263-272 (1996).
- [13] Crommelin D. J. A., Storm G., “Liposomes as Drug Carier Systems in Theraphy: Their Potential and Limitations” *International Pharmacy Journal*, 1, 179-181 (1987).
- [14] Eldem T., Eldem B., Ojerdem V., Erdemli I., Ercan M., Merkle H. P., “Intraocular Administration of PEG- Coated Liposomal Cyclosporine A” *NATO ASI, Targetting of Drugs: Strategies for Stealth Therapeutic Systems* (1997).
- [15] Fresta M., Wehrli E., Puglisi G., “Enhanced Therapeutic Effect of Cytidine- 5'-difosfate Choline When Associated with GM1 Containing Small Liposomes as Demonstrated in Rat Ischemia Model” *Pharmaceutical Research*, 12, 1769-1774 (1995).
- [16] Grene, R. V.; Lanyi, J. K., “Proton Movements in Response to Light-Driven Electrogenic Pump for Sodium Ions in *Halobacterium halobium* Membranes” *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 10986-10994 (1979).
- [17] Grant, W. D.; Larsen, H., “Extremely Halophilic Archaeabacteria Order *Halobacteriales* ord. nov.” In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Staley J. T., Bryant, M.P., Pfenning, N.; Holt J. G. Eds.; The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2216-2233 (2001).
- [18] Grant, W. D.; Kamekura, M.; McGenity, T. J.; Ventosa, A., “Class III *Halobacteria* Class. Nov. Order I. *Halobacteriales*”, In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Bone,D. R.;

- Castelhon, R. W.; Garrity, G. M.; Staley, J. T. Eds.; Springer-Verlag, New York, 294-334 (2001).
- [19] Gürsoy A., “Lipozomlar” Kontrollü İlaç Serbestleştirme Sistemleri, Eds.: A. Gürsoy, B. Dordunç, E. Pişkin, N. N. Peppas, Teknografik, Ada Ofset, İstanbul, 173-196 (1989).
- [20] Gürsoy A., “Lipozomlar” Kontrollü Salım Sistemleri, Eds.: A. Gürsoy , Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul (2002).
- [21] Gürsoy, A., Kut, E. ve Özkırmı, E., “Co-encapsulation of Isoniazid and Rifampicin in Liposomes and Characterization of Liposomes by Derivative Spectroscopy” International Journal of Pharmaceutics, İstanbul, 271, 115-123 (2004).
- [22] Hirayama, F.; Uekama, K., “Cyclodextrin-based Controlled Drug Release System” Advanced Drug Delivery Reviews, 36 (1), (1999), 125-141.
- [23] Honzak L., Séntjere M., Swartz H. M., “In Vivo EPR of Topical Delivery of Hydrophilic Substance Encapsulated in Multilamellar Liposomes Applied to Skin of Hairless and Normal Mice” Journal of Controlled Release, 62, 221-228 (2000).
- [24] Jones , W. J.; Nagle, D. P.; Whitman, W. B., “Methanogens and Diversity of Archaeobacteria” Microbiological Reviews, 135-177 (1987).
- [25] Kagawa, Y., and Racker, E., Journal of Biological Chemistry, 246, 5477 (1971).
- [26] Kamekura, M.; Dyal-Smith, M. L., “Taxonomy of the Family *Halobacteriaceae* and Description of two New Genera *Halorubacterium* and *Natrialba*” Journal of General and Applied Microbiology, 41, 333-350 (1995).
- [27] Kates, M.; Kushwaha, S. C.; Sprott, G. D., “Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophiles and of Methanogenic Bacteria” Methods in Enzymology, 88, 98-111 (1982).
- [28] Krishnan, L. , Dicaire, C. J. , Patel, G. B. and Sprott, G. D. , “Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses: Comparison to Conventional

- Liposomes and Alum” *Infection and Immunity*, Kanada, 68(1), 54-63 (1999).
- [29] Krishnan, L. , Sad, S. , Patel, G. B. and Sprott, G. D. , “Archaeosomes Induce Long-Term CD8⁺ Cytotoxic T Cell Response to Entrapped soluble Protein by the Exogenous Cytosolic Pathway, in the Absence of CD4⁺ T Cell Help” *The Journal of Immunology*, 165: 5177-5185 (2000).
- [30] Kushner, D. J., “The Bacteria”, In the *Halobacteriaceae*, Chapter 3, Vol VII, Academic Pres, Inc., London, 171-213 (1985).
- [31] Kut E., “ İzoniasid ve Rifampisini Beraber İçeren Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması ve Özelliklerinin Türev Spektrofotometresi Yöntemi İle İncelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri, İstanbul (2000).
- [32] Law S. L., Shih C. L., “Characterization of Calcitonin- Containin Liposome Formulations for Intranasal Delivery” *Journal of Microencapsulation*, 18, 211-221 (2001).
- [33] Lee W.A, Ennis R. D., Longenecker J. P., Bengtsson P., “The Bioavailability of Intranasal Salmon Calcitonin in Healthy Volunteers with and without A Permeation Enhancer” *Pharmaceutical Research*, 11, 747-750 (1994).
- [34] Li Y., Mitra A. K., “Effects of Phospholipid Chain Length, Concentration, Charge and Vesicle Size on Pulmonary İnsülin Absorption” *Pharmaceutical Research*, 13, 76-79 (1996).
- [35] Liu D. And Huang L., “Immunoliposomes Targeting to Pulmonary Endothelium” *Liposome in Drug Delivery*, Eds.: G. Gregoriadis, A. T. Florence, H. M. Patel, Harword Academic Publishers, Great Britain, 111-124 (1993).
- [36] Madigan, M. T.; Martinko J. M., “Brock Biology of Microorganisms”, 11th Edition, Pearson Education International, New Jersey (2006).
- [37] Marlies Otter-Nilson, Rob Hendriks, Eve-Isabella Pecher-Huet, Dick Hoekstra and Tommy Nilsson, “ Cytosolic ATPases, p97 and NSF, are Sufficent to Mediate Rapid Membrane Fusion, *The EMBO Journal*, 18 (8), 2074-2083 (1999).

- [38] Mezei, M., “Biodisposition of Liposome-Encapsulated Active Ingredients Applied on the Skin”, *Liposome Dermatics*, Eds.: O. Braun-Falco, H. C. Korting, H. I. Maibach, Springer-Verlag, Berlin, 206-214 (1992).
- [39] Munson, M. A.; Nedwell, D. B.; Embley, T. M., “Phylogenetic Diversity of Archaea in Sediment Samples from Coastal Salt Marsh” *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12), 4729-4733 (1997).
- [40] Oku, N., “Liposomes” *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, Eds.: R. L. Dunn, R. M. Ottenbrite, American Chemical Society, Washington, 24-33 (1991).
- [41] Oren, A., “The Ecology of the Extremely Halophilic Archaea”, *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 415-440 (1994a).
- [42] Oren, A., “The Order *Halobacteriales*”, Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, J. H. And Stackebrandt, E. (eds), In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd ed., release 3.2, 25 July 2001. Springer-Verlag, New York (2000).
- [43] Öğmen, M. N. , “ Kaldırım ve Kayalık Tuzlalarından Ayırımı Yapılan Aşırı Halofil Arkebakterilerin Polar Lipitlerinin Karakterizasyonu” Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri, İstanbul (2005).
- [44] Pavelic, Z., Skalko-Basnet, N., Schubert, R., “Liposomal Gels for Vaginal Drug Delivery” *International Journal of Pharmaceutics*, 219, 139-149 (2001).
- [45] Poyner, E. A., Alpar, H. O., Almedia, A. J., Gamble, M. D., Brown, M. R. W., “ A Comparative Study on the Pulmonary Delivery of Tobramycin Encapsulated into Liposomes and PLA Microspheres Following Intravenous and Endotracheal Delivery” *Journal of Controlled Release*, 35, 41-48 (1995).
- [46] Sakurai, F., Inoue, R. ,Nishino, Y., Okuda, A., Matsumoto, O., Taga, T., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M., “Effects of DNA/Liposome Mixing Ratio on the Physicochemical Characteristic, Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Plasmid DNA/ Cationic Liposome

- Complexes and Subsequent Gene Expression” Journal of Controlled Release, 66, 255-269 (2000).
- [47] Scherphof, G.L., “In Vivo Behaviour of Liposomes: Interaction with Mononuclear Phagocyte System and Implication for Drug Targeting” Targeted Drug Delivery. Ed.: R. L. Juliano, Springer-Verlag, New York, 285-327 (1991).
 - [48] Sharma, A., and Sharma, U. S., “Liposomes in Drug Delivery: Progress and Limitations” International Journal of Pharmaceutics, 154, 123-140 (1997).
 - [49] Spring, S.; Ludwing, W.; Marquez, M. C.; Ventosa, A.; Schleifer, K. H., ”*Halobacillus* Gen.nov. ,with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov. and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.”, International Journal of Systemic Bacteriology, 46, 492-496 (1996).
 - [50] Stoeckenius, W., “The Rhodopsin-Like Pigments of Halobacteria: Light Energy and Signal Transducers in an Archaeobacterium” Biochemical Sciences, 10, 483-486 (1985).
 - [51] Tonosaki, A.; Tokunaga, F.; Washioka, H.; Kataoka, M.; Hisatomi, O., “Fine Structure of The Red Membrane of *Holobacterium halobium* (R1)” Biomedical Research, 5, 1-8 (1984).
 - [52] Torreblance, M.; Valera, R.; Ventosa, A.; Kamekura, M.; Kates, M., “Classification of Non-alkaliphilic *Halobacteria* on Numerical Taxonomy and Polar Lipid Composition and Description of *Haloarcula* gen. nov. and *Holoferax* gen. nov.”, Systematic and Applied Microbiology, 8, 89-99 (1986).
 - [53] Tu, S. I.; Huttchinson, H. , “Temperature Dependence of Light-Induced Reconstituted Purple Membrane” Archives of Biochemistry and Biophysics, 228, 609-616 (1984).
 - [54] Valera, F. R.; Berraquero, F. R.; Cormenzana, A. R. , “Characteristics of the Heterotrophic Bacterial Populations in Hypersaline Environments of Different Salt Concentrations” Microbial Ecology, 7, 235-243 (1981).
 - [55] Valera, F. R., “In Halophilic Bacteria” Vol 1-2, CRS Pres, Baco Raton (1988).

- [56] Van Winden, E. C. A., Cromellin, D. Y. A. "Short Term Stability of Freeze-Dried, Cryoprotected Liposomes" *Journal of Controlled Release*, 58, 69-86 (1999).
- [57] Vemuri, S., Rhodes, C. T. , "Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: a review" *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 70, 95-111 (1995).
- [58] Venkatesan, N., Vyas, S. P., "Polysaccharide Coated Liposomes for Oral Immunization Development and Characterization" *International Journal of Pharmaceutics*, 203, 169-177 (2000).
- [59] Vreeland, R. H., "Taxonomy of Halophilic Bacteria", In *The Biology of Halophilic Bacteria*, Vreeland, R. H.; Hochstein L. I.: EDS.; FI: CRS Pres, Baco Raton, 105-134 (1993).
- [60] Vrhovnik, K., Kristl, J., Sentjurc, M., Smid-Korbar, J., "Influence of Liposome Bilayer Fluidity on the Transport of the Encapsulated Substances into the Skin Studied by EPR" *Pharmaceutical Research*, 15, 523-529 (1998).
- [61] Westbrook, C. A., Chpura, S. J., Arenas, R. B., Kim, S. Y., Otto, G., "Human APC Gene Expression in Rodent Colonic Epithelium" *Human Molecular Genetics*, 3, 2005-2010 (1994).
- [62] <http://dermnetz.org/treatments/rifampicin.html> (Eriřim Tarihi: Mayıs 2006).
- [63] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Rifampisin> (Eriřim Tarihi: Mayıs 2006).
- [64] <http://www.avatilipids.com/PreparationOfLiposomes.html> (Eriřim Tarihi: Ekim 2006).

ÖZGEÇMİŞ

29.08.1981 tarihinde Ardahan’ da dünyaya geldim. Lise eğitimimi İstanbul’ da Pendik Lisesi’ nde tamamladım. 1999 yılında İstanbul Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’ nde lisans eğitime başladım ve 2003 yılında tamamladım. 2004 yılında Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bölümü’ nde Yüksek Lisans eğitime başladım ve halen Yüksek Lisans eğitime devam etmekteyim. 2003 yılında MONROL Nükleer Ürünler Ticaret ve Sanayi A.Ş. firmasında kalite kontrol laboratuvarında çalışmaya başladım ve halen çalışmaya devam etmekteyim.