



Hasan SUSAR^{1, a}
İzzet KARAHAN^{1, b}

¹ Balıkesir Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı,
Balıkesir, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-7121-1468

^b ORCID: 0000-0002-5108-7770

Geliş Tarihi : 28.05.2019

Kabul Tarihi : 24.09.2019

Yazışma Adresi Correspondence

Hasan SUSAR
Balıkesir Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı,
Balıkesir – TÜRKİYE

susarhasan20@gmail.com

DERLEME

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2019; 33 (3): 211 - 219
http://www.fusabil.org

Lipozomlar ve Genel Özellikleri

İlaç taşıyıcı sistemlerden birisi olan lipozomlar tek veya birçok tabakadan oluşan, aynı zamanda aralarında sulu bir faz bulunan küresel keseciklerdir. Hidrofilik ve hidrofobik bölgeler içermelerinden dolayı su ve yağda eriyen maddeleri taşıyabilme, etken maddeleri kontrollü salıverme, bu etken maddeleri hedef bölgeye taşıyabilme ve biyolojik olarak yıkılma özelliklerine sahiptir.

Esas olarak lipozomlar fosfolipitlerden oluşur; yapı ve içerik bakımından hücre zarına benzerlik göstermesi, zehirliliği olmaması ve kimyasal içeriklerinin araştırmacılarca ayarlanabilmesi sebeplerinden dolayı, araştırmacılar tarafından yıllardan beri model zar olarak kullanılmıştır. Lipozomlar son yıllarda en fazla araştırılan konulardan biridir. Bu derlemede lipozomların genel özellikleri, sınıflandırılmaları, hazırlanma şekilleri ve kullanım alanları ile ilgili bilgiler verilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Lipozom, fosfolipitler, model membran

Liposomes and Their General Characteristics

Liposomes, one of the drug delivery systems, are spherical vesicles consisting of single or multiple layers and also having an aqueous phase between them. They are capable of transporting molecules in water and oil, controlled-releasing active ingredients, transporting these substances to the target region, and biologically degrading themselves, due to the hydrophilic and hydrophobic regions they contain.

Liposomes, mainly composed of phospholipids, have been used as model membranes by scientists for many years because of their similarity to the cell membrane in terms of structure and content, lack of their toxicity and their chemical content that can be adjusted by the researchers. Liposomes are one of the most studied topics in recent years. In this review, information on related with general characteristics, classification, preparation forms and application areas of liposomes are given.

Key Words: Liposomes, phospholipids, model membran

Giriş

Lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olup, tek tabaka veya yapılarında sulu faz içeren iç içe birkaç tabakadan oluşan, 0.02 - 3.5 µm çapında küresel keseciklerdir. Alec Bangham tarafından 1960'larda hücre membranına model oluşturması için açıklanmış ve fosfolipidlerin hücre zarlarına benzeyen lipid tabakalarla çevrili kapalı vezikülleri oluşturma kabiliyeti gösterilmiştir (1, 2).

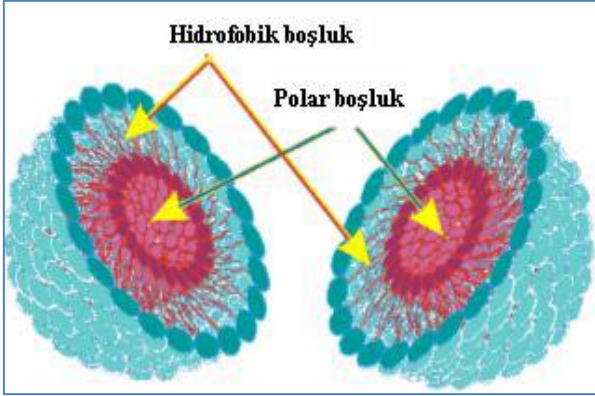
Toksik olmayan, aynı zamanda bağıışıklık da oluşturmayan lipozomlar; suda ve yağda çözünen etken maddeleri içeren, etken maddeleri kontrollü olarak salıverebilen, bu etken maddeleri hedef bölgeye taşıyabilen ve biyolojik olarak yıkılabilen yapıdadırlar (1).

Lipozomların temel yapıları hücre membranı yapısına çok benzediğinden, in vitro araştırmalarda uzun yıllardır model membran olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, lipozomlar ilaç taşıyıcı sistemi olarak da kullanılabilmeleri nedeniyle son yıllarda üzerinde çok çalışılan ve araştırmaların ilgi odağı konumunda yer almaktadırlar (1, 3).

Yunancada yağ anlamına gelen "Lipos" ve vücut anlamına gelen "Soma" kelimelerinden "Lipozom" kavramı türetilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi üç boyutlu dış görünüşü bir topu andıran lipozomlar hem hidrofilik polar hem de hidrofobik apolar boşluklar içermektedir (4). Bu sayede suda çözünebilen maddeleri polar boşluklarında, yağda çözünebilen maddeleri ise hidrofobik boşluklarında kapsülleyerek bunlar için bir taşıyıcı vazifesi görürler (4-7).

1. LİPOZOMLARIN HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Lipozomların hazırlanmasında en çok fosfatidilkolin (Lesitin), daha az olarak Disetilfosfat ve Stearilamin gibi diğer maddeler kullanılır. Fosfolipitler suya eklendiklerinde, suyu seven ve emen (hidrofilik) bölgeler suya doğru yönelirken, suyu sevmeyen ve emmeyen (hidrofobik) bölgeler sudan uzaklaşarak kesecik (vezikül) şeklini alır. Böylelikle Şekil 2 (a) ve (b)'de görüldüğü gibi tek (monolayer) ve çok tabakalı (multiple layer) lipozom şekilleri oluşur (4). Çift tabakalı lipozom yapısının oluşmasını fosfolipitler ile su fazı arasındaki hidrofobik etkileşimler ile fosfolipit moleküllerinin içerdiği Van der Waals bağları sağlar (8).



Şekil 1. Lipozomun Üç Boyutlu Yapısı.



Şekil 2. Tek (Monolayer) Lipozom (a) ve Çok tabakalı (Multiplelayer) Lipozom (b)

Hazırlama yöntemlerinin farklılıklarından dolayı, çok tabakalı (Multi Lamellar Vesicle (MLV)) ve küçük tek tabakalı (Small Unilamellar Vesicle (SUV)) ile büyük tek tabakalı (Large Unilamellar Vesicle (LUV)) lipozomlar oluşturulur. Lipozomlar tabaka sayısı, büyüklük dağılımı ve hazırlama yönteminden doğrudan etkilenebilir. Bu nedenle amaca yönelik en uygun yöntem seçilmelidir (9).

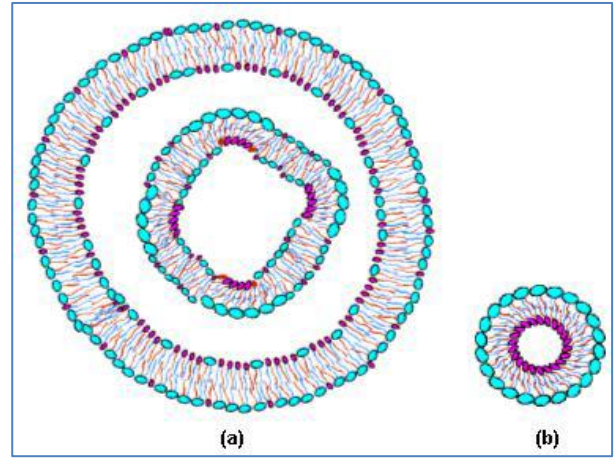
1.1. Multilamellar Veziküller (MLV) Hazırlama Yöntemi

Lipozom bileşimine girecek lipidler kloroform gibi organik çözücülerde çözündürülür ve çözücü maddenin gaz azot yardımıyla uçurulmasıyla lipid film elde edilir. Bir tampon çözelti aracılığıyla lipid film, oda sıcaklığında hidrate edilir. Hidrate edilen lipid film, anafaz geçiş sıcaklığının üstünde bir sıcaklıkta (+20 °C)'de su içinde birkaç dakika bekletilir. Buradan çıkarılan lipid film birkaç dakika süreyle vorteksle çalkalanır. Çok tabakalı lipozomların eldesi için, bu işlemlerin onbeş dakika boyunca devam ettirilmesi gerekir (Şekil 3a) (4, 9).

1.2. Küçük (SUV) ve Büyük Ünilemellar Veziküller (LUV) Hazırlama Yöntemi

Kuru lipid film hidrasyonu ile elde edilen heterojen ve büyük çok tabakalı lipozomların büyüklüğü ve tabakaların özelliklerini değiştirmede çeşitli işlemler

uygulanmaktadır. Bu işlemlerin başlıcaları sonikasyon, ekstrüzyon, vortekslemedir. Bu yöntemler sayesinde MLV'ler SUV veya LUV haline dönüştürülürler (Şekil 3b). Lipozomları ayırmada por çapına göre lipozom ekstrüzyon cihazı kullanılır. Eğer lipozomlar küçük çapa sahipse porlardan geçerek ayrışır. Sonikasyon cihazıyla MLV'lere yüksek düzeyde enerji uygulanarak SUV elde edilebilir. SUV ve LUV eldesi için diğer yöntemde ise, çözücü olarak deterjan kullanılır ve bu da proteinlerin lipid-protein karışımından ayrıştırılmasını sağlar. Burada tampon çözelti işlevini kolloidler üstlenir. Santrifüj, jel filtrasyonu veya hızlandırılmış diyaliz yöntemlerinden deterjanın ortamdaki uzaklaştırılmasında faydalanılır (4, 9-11).



Şekil 3. Büyük Çok Tabakalı Lipozom (a) ve Çok Küçük Tek-İki Tabakalı Lipozom (b)

2. LİPOZOMLARIN DAYANIKLILIKLARI VE ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Lipozomların tam çözülmemiş problemlerinden biri elde edilmelerinden kullanılmalarına kadar geçen süredeki kimyasal ve fiziksel dayanıklılıklarıdır (12). Lipozomların ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasında iki önemli sorun ortaya çıkmaktadır. Bunlardan birincisi, lipozomların uygulandıklarında bütünlüklerini koruyamadıkları için, etken maddenin hedef bölgeye ulaşmadan kanda salınması; ikincisi ise lipozomların Retiküloendotelial sistem (RES) hücrelerinde tutularak hedef hücrelere ulaşmamasıdır (13).

Fiziksel ve kimyasal dayanıklılıklarının sağlanmasında öncelikle lipozomun bileşimi, etkili maddenin tutulduğu faz, büyüklüğü, yükü, hazırlanma şartları ve etkili maddenin fizikokimyasal özellikleri gibi faktörler rol oynamaktadır (1, 3, 14, 15).

2.1. Lipozomların Kimyasal Stabilitesi

Lipozomların temel yapılarını oluşturan fosfolipidlerin kimyasal dayanıklılığını etkileyen en temel faktördür. Lipozom yapısındaki fosfolipidler, oksidasyon ve hidrolizle kimyasal parçalanmaya uğrarlar (16).

2.1.1. Oksidasyon (Lipid Peroksidasyonu)

Doğal fosfolipidlerin yapısı, oksidatif hidrolitik olaylarla bozulmaya uygundur. Lipozomların yapısına katılan fosfolipidlerin moleküler yapılarındaki doymamış Açıl zincirleri oksidatif parçalanmaya uygundur. Bu nedenle yapılarında doymamış yağ asidi bulunan fosfolipidlerle hazırlanan lipozomlar lipid peroksidasyona uğramaya meyilli hale gelirler. Örnek olarak, lesitin'in oksidasyonu oksidatif peroksi ve epoksi gibi metabolitler meydana gelir. Daha sonra bu metabolitler karbonil bileşikler, hidrokarbonlar ve furanlara dönüşüp bozulurlar. Ayrıca, zehirli bozulma ürünleri de meydana gelebilir (14, 16, 17).

İstenmeyen lipid peroksidasyonun bir kaç yöntemle minimum seviyeye indirilmesiyle lipozomların kimyasal stabilitesinin korunabileceği bildirilmiştir. Bu yöntemler; doymamış fosfolipidlerin en az düzeyde kullanılması, ortamdaki oksijen varlığının azot ve argon gazı kullanılarak azaltılması, ortamdan ağır metallerin uzaklaştırılması ile α -tokoferol gibi antioksidanlardan yararlanılmasıdır (15, 17, 18).

2.1.2. Hidroliz (Yağ Asit Esterlerinin Hidrolizi)

Fosfolipidin zincir uzunluğu ve yapısı, iyonik güçler, ortam pH'sı, sıcaklık, süre ile kullanılan tampon özellikleri hidroliz olayında en etkili faktörlerdir. Lesitin'in hidroliziyle lizo-lesitin oluşumu, fosfolipid molekülündeki ester bağlarının su varlığında hidrolize olmasına örnektir. Lipid tabakalarda belli miktarda lizo-lesitin bulunması lipozomların dayanıklılığını artırmaktadır ve lizo-lesitin oluşumunun fosfolipidlerin kimyasal dayanıklılığını sağlayan bir etken olarak düşünülmüştür. Diğer yandan, depolamada ise lizolesitin oluşumu belli sınırların üzerine çıkmaması gereklidir. Hazırlamada faydalanılan sonikasyon ve benzeri yöntemler de lizolesitin oluşumunu etkiler. Fosfolipid miktarı en uygun şekilde ayarlanarak lizo-lesitin oluşumu kontrol edilebilir (19, 20).

2.2. Lipozomların Fiziksel Dayanıklılığı

Lipozomların fiziksel dayanıklılığı; yapısı, etkili maddenin hidrofilik veya hidrofobik olması ile depolanma şartlarına bağlılık göstermektedir (1, 15, 21).

Lipozom preparatlarının fiziksel özelliklerinde oluşan değişimler genellikle keseciklerin bir araya toplanması (aggregasyon) ya da lipozomun hacim olarak büyümesi şeklindedir. Lipozomların zar yapısında, üretim esnasında keseciklerde oluşan sızma ile füzyon olaylarına bağlı olarak hasarlar oluşmaktadır. Bu duruma özellikle SUV'lerin faz geçiş sıcaklığı altında hazırlanmasında rastlanırken, faz geçiş sıcaklığı üzerinde hazırlanmasında da membran yapısında hasarlar meydana gelebilir. Tek tabakalı lipozomlarda daha çok meydana gelen etkili maddenin lipozomdan dışarı geçmesi olayına, çok tabakalı lipozomlarda az rastlanır. Çok tabakalı lipozomun, lipid tabakada tutulan etkili maddenin dışarı sızması sulu fazda bulunan etkili maddenin geçişine göre daha zor olur (21).

Lipozomlardan küçük molekül ağırlıklı maddelerin dışarı geçişleri daha kolay olurken, büyük molekül ağırlıklı (MA > 1000) maddelerin dışarı geçişleri daha zor

olmaktadır. Van der Waals bağları nötral lipozomların bir araya toplanması ve çökmelerine yol açabilir. Bundan dolayı zarların birbirleriyle temas etmesi daha büyük yapıların oluşması ve böylece zar tabaka sayısı artış ve büyük keseciklerin oluşumuna neden olur. Nötr lipozomlarda bu durum çok daha fazla görülür. Artık çözücülerin iyi uçurulmaması ve iz elementlerin olması bu olaya katkıda bulunarak bu durumu arttırabilirler. Tek tabakalı lipozomlar, faz geçiş sıcaklığında, özellikle membranın eğrisel yapısından ileri gelen direncin az olması sebebiyle geçişe (füzyon) daha çok meyillidir. Faz geçiş sıcaklığında meydana gelen bu olayı engellemek için lipozom dispersiyonları faz geçiş sıcaklığından farklı bir sıcaklıkta saklanmalıdır. Zar yapısına yeterli kolesterol ilavesiyle faz geçiş azaltılmış veya ortadan kaldırılmış olur. Lipozom zarlarının geçirgenliği, lipid tabaka ve lipozomda tutulan etkili maddenin yapısına bağlıdır. Lipozom zarları arasında bulunan özellikle polar veya iyonize büyük maddeler, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik maddelerden daha etkili tutulmaktadır (14, 15, 19).

3. LİPOZOMLARIN KULLANIM ALANLARI

3.1. Lipozomların Beşeri ve Veteriner Hekimlikte Kullanılması

Lipozomların farklı doku ve hücreleri etkilemeleri, yüzeylerinin farklı özellikteki molekülleri taşıması, sağlar. Lipozomlar kanser, dermatolojik, paraziter ve bakteriyel hastalıklar, enzim eksikliği tedavisi, akut-kronik ağrıların giderilmesi, şelat yapıcı ajanların taşınması ve aşılama gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

Lipozomlardan sağlık alanında yararlanmasında en önemli sorunlardan biri, vücudun fagositik sistemlerince immunolipozomların yok edilmesidir. Bu sorunu çözmek için, lipozom yüzeyinin bağışıklık sistemini aktive etmeyen moleküllerle kaplanması denense de, tedavi amaçlı kullanılan lipozomlarla istenen çözüm elde edilememiştir (22).

Bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda kullanılan ilaçlar nefrotoksik ve nörotoksik etki gösterebilmektedir. Bu zehirli maddelerin etkileri başka ilaçlarla bağ yaptırılarak veya lipozomlarla enkapsüle edilerek büyük ölçüde azaltılmış olur (23). Genellikle antibakteriyel ve antiviral tedavilerde kullanılan etkili maddeler doğrudan alınır, ancak bunların çok zehirli olanları enkapsüle edilerek lipozomlarla kullanılmaktadır (24).

3.1.1. Lipozom Tabanlı Kanser Tedavileri

Modern kanser tedavisi birçoğu kemoterapötik olan birkaç antineoplastik ajan içermektedir. Bu ilaçlar in vitro ortamda kanser hücrelerini ortadan kaldırmada güçlü etkinlik gösterirler. Fakat in vivo etkinlik için önemli engellerle karşılaşılır. (25). Bu engeller kanser hücreleri için seçiciliğin yoksunluğu, tümör bölgelerinde düşük biyoyararlanım, daha büyük hacimlerde dağılım ve normal dokulara toksisitedir (26). Tedavi için kan dolaşımına doğrudan verilen lipozomlarla istenen sonuçlar sağlanamamakla birlikte, nanoparçacık bazlı kanser terapötikleri son yıllarda kapsamlı bir şekilde değerlendirilmektedir (25, 27).

Lipozomlar gibi nanoteknoloji tabanlı ilaç sistemleri bu engelleri birçok mekanizma yoluyla aşarlar. Küçük boyutlara sahip olmalarından dolayı (10-100 nm) hücre içi alımı için ideal, yüksek kapsülleme yeteneğine sahip ve tümörün spesifik hedeflenmesi için tasarlanabilmektedirler (25, 26). Ayrıca, tümör dokusu vaskülaritesinde bozulma ve yoğun şekilde zarar görmüş lenfatik drenaj gibi özellikleri nanoparçacıkların tümör içinde birikmesine izin verir. Katı tümörlerdeki kan dolaşımının yetersizliğinden dolayı, tedavi amaçlı kan dolaşımına verilen lipozomlar ile istenilen sonuç sağlanamamıştır. (22, 25).

Lipozomlar, hayvanlarda antikanser ilaçların verilmesi için umut vadeden bir gelişme ortaya koymuştur. 1995'in sonlarında Canine Splenic Hemangiosarkomlu köpeklerde yapılan klinik denemelerde, lipozom kapsüllü muramyl tripeptit (fosfatidiletanolamin) geliştirilmiş ve bununla konjuge edilen Doksorubisin tedavisinde köpeklerin hastaliksız hayatta kalma süreleri uzamıştır. Bu çalışmalar, veteriner onkolojide lipozom temelli kanser tedavilerinin, insanlardaki kadar önemli, cesaret verici sonuçlarının olduğunu göstermiştir (28). İnsanlarda lipozom kapsüllü Doksorubisin serbest Doksorubisine göre daha az kardiyotoksikite ve farmakokinetik özelliklerde önemli değişiklikler göstermiştir. Doksorubisin içeren polietilen glükollenmiş lipozomların (Doxil ve Caelyx gibi) klinik kullanım için uygun olduğu bildirilmiştir (29).

Lipozom formülasyonlarının diğer kanser (tümör) tedavileriyle birlikte kullanılması veteriner onkolojiye çok yönlü bir yaklaşım da sağlamıştır. Lipozom tabanlı ilaçlar *in vivo*, daha uzun süreli dolaşıma sahip olduklarından dolayı kanserde radyoterapi tedavisi öncesinde sensitizörler olarak lipozomlara yüklenebilir. Yumuşak doku sarkomları olan kedilerde, günlük palyatif radyoterapiye ek olarak Doksorubisin verilince önemli terapötik iyileşmeler olduğu ortaya konmuştur. Küçük örnek büyüklüğüne rağmen 237 gün kullanım süresince 10 kediden 5 tanesinde kısmi, 2 tanesinde ise tamamen iyileşme görülmüştür (30).

3.1.2. Lipozom Tabanlı Antibakteriyel ve Antiparaziter İlaçlar

Genel olarak ilaçlar, ilaç ve patojen türüne bakılmaksızın NP'ler tarafından taşınırken daha iyi etkinlik sunmaktadır. Hem inorganik hem de organik NPler, farklı ilaç türlerinin (antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve antiparaziter) aktivitelelerini ve patojenlere karşı etkinliklerini teşvik eden diğer maddelerinde etkilerini arttırmaktadırlar (31-35).

NPlerin kullanımı, ilaç etkinliğinin geliştirilmesinin yanı sıra, daha hasta dostu rejimleri mümkün kılmaktadır. Hedef olmayan dokularda daha düşük miktarda biriken ilacın yan etkileri ve toksisitesi azalmaktadır. Organik NPlerle birleştirilerek hazırlanan asiklovir, lamivudin, amfoterisin B, primakin gibi ilaçların oluşturduğu hematolojik sorunların ve nefrotoksik etkilerinin azaldığı bildirilmiştir (31, 34, 36-39). Ayrıca, ilaç içeren NPlerle tedaviden sonra, mikroorganizmalarda direnci tekrardan uyarma olasılıklarının daha düşük olduğu gösterilmiştir. NPler

bakterilere saldıracak çok işlevli mekanizmalara sahiptir, bu nedenle serbest ilaç tedavisinden sonra oluşan direnç, NPlerle tedavi edilenlere oranla çok daha yaygındır (40-42).

Bakteri biyofilmlerinin, biyolojik yüzeylere yapışan kompakt bakteri kümeleri olduğu, nüfuz etmesi zor bir hücre dışı polimerik matris ürettikleri ve böylece ilaç direncini arttırdıkları belirtilmiştir. Bunlar, genellikle ulaşılmaması zor bölgelerde lokalize olduklarından mevcut tedaviler nadiren başarılı olur (43-45).

Lipozomların damar yoluyla verilmesiyle fagositik sistemce yok edildiğinin anlaşılmasıyla lipozom aracılı ilaç taşınımı makrofajlara sağlanmıştır. Bu durumda lipozomlar, fagositik hücrelerdeki parazitlere karşı tedavilerde önemli rol oynamışlardır. Leishmaniasis ve mantar enfestasyonları bu parazitlerin neden olduğu hastalıklardan en sık görülenleridir. Bu hastalıklarda kullanılan lipozomlar enfekte bölgede yoğun bulunur ve biriken lipozomların zehirli etkileri daha azdır. (46).

Birdane ve Baş (10), koyunlarda serbest ve lipozomal ampisilini damar içi vererek kan farmakokinetik değerlerinin karşılaştırılmasını yapmışlardır. Çalışmada, lipozomal formda ampisilin kullanımıyla etkili kan düzeylerinin uzun süre korunabilmesiyle sık aralıklarla ilaç kullanımının engelleneceği, doza bağlı yan etkilerin azalacağı, eşit miktar etken madde kullanımıyla *in vivo* ortamda daha uzun süre antibakteriyel etkinin sağlanabileceği görüşüne varmışlardır.

Lee ve ark. (11), tarafından yapılan çalışmada, PLGA ve poloksamer (POL)'den oluşan marbofloksasin (MAR) içeren, intramüsküler enjekte edilebilir polimerik mikropartiküller (MP) (kapsüller) geliştirilmiştir. Sonuçlar, MAR-MP'nin yüksek bir yükleme verimi olduğunu ve hidrofilik ilaçların kapsüllemesi için diğer MP'lere kıyasla yüksek seviyede ilaç içerdiğini ortaya koymuştur ve MAR-MP'nin veteriner hekimlikte sürekli bir ilaç salınım taşıyıcısı olarak uygun olduğunu, antibiyotiklerin kötüye kullanımını azaltabileceğini saptamışlardır.

Hrckova ve Velebny (47), tarafından laboratuvar farelerinde *Mesocoestoides corti tetrathyridia* enfeksiyonlarında serbest ve lipozomlanmış albendazolün her iki formülasyonunun *M. corti* enfeksiyonunun ortadan kaldırılmasında kısmen etkili olduğu saptanmıştır.

Antibiyotiklerle etiketlenmiş NPlerin kullanımı bu tip enfeksiyonları tedavi etmede yardımcı olmaktadır. Nafsilin, vankomisin ve daptomisin gibi antibiyotikler osteoblast zardan geçmeyi kolaylaştırmakta ve hücre içi bakterilere daha iyi nüfuz etmektedirler (48, 49). Ayrıca, alendronat veya kalsiyum gibi ligandlar, kemik dokusuna yüksek afinitye sahip olması nedeniyle ilaç hedeflemeye tercih edilmektedirler. NPlerin diğer bir avantajı da, kronik hastalıklarda terapötik rejimi iyileştirerek yıllarca sürebilen sürekli salınımıdır (50, 51).

3.1.3. Lipozom Tabanlı Analjezi

İnsan ve hayvanlarda akut ve kronik ağrıların tedavisinde kullanılan birçok farmakolojik madde, yüksek dağılım hacmine ve sistemik yanılanma ömrüne sahiptir.

Ağızdan kullanılan ağrı kesicileri insanlar kendileri alabilirler. Veteriner ağrı yönetiminde ise sık doz ve sıkı uygulama protokolleri, yüksek lojistik maliyetleri gerektirmekle birlikte hayvanlarla ilgilenen işçilerin zoonotik enfeksiyon riskini artırır. Bu engellerin üstesinden gelmek için yeni ilaç dağıtım sistemleri sürekli geliştirilmektedir (52-54).

Sıçanlarda ağrı tedavisinde lipozomal bupivakainin sızma kapasitesi üzerine yapılan çalışmada, depo formülasyonlarının daha etkili olduğu gösterilmiştir. Çeşitli hayvan türlerinde lipozom kapsüllü analjeziklerin farmakokinetik ve farmakodinamiklerini inceleyen çalışmalar ve teknolojik gelişmeler farklı analjeziklerin lipozomlara dahil edilmesini sağlamıştır (55).

Opioidler, lipozomal salınım için en yaygın olarak incelenen analjezik ilaç olarak kalmaya devam etmektedir (53, 57). Sıçanlarda oluşturulan nöropatik hiperaljeziyi önlemede lipozom kapsüllü oksimorfonun (LE-oksimorfon) ve lipozom kapsüllü hidromorfonun (LE-Hydro) etkileri araştırılmıştır. LE-Hydro'nun, sıçanlara uygulanmasını takiben 5 gün süreyle hiperaljeziyi önlediği sonucuna varılmıştır. (54, 56-58).

Lipozomları, veteriner hekimlikte analjezik salınım, davranışsal ve farmakodinamik cevapları değerlendirmek için köpekler gibi daha büyük hayvanlarda da çalışmalar yapılmıştır. Bir farmakodinamik çalışmada sağlıklı Beaglelarda, LE-Hydro'nun yan etkileri ve aynı hastanede ovariohistektomi (OVH) geçiren diğer köpeklerde analjezik etkinliğinin belirlenmesi incelenmiştir. LE-Hydro kullanımıyla solunum depresyonunun iyi tolere edildiği saptanmıştır. Bu çalışmanın, lipozomların opioidler için toksik olmayan ve sürekli salınan formülasyonlar gibi hareket edebildiğini tespit etmede hayati önem taşıdığı bildirilmiştir (59).

3.1.4. Aşılar da Lipozomlar

Aşılar da sağlanan faydanın artırılması amacıyla da lipozomlardan faydalanılmaktadır. Lipozomal aşı hazırlanmasında lipozomun içindeki sulu bölgeye suda çözünen maddelerin, lipitte çözünen maddelerin ise kesecik oluşumu esnasında lipit tabaka karıştırılır. Birçok hücre tarafından absorbe edilen lipozomlar, hücre içine girdiğinde içerdikleri maddeleri salar. Böyle hazırlanan lipozomal aşılar makrofajlarda dahil olmak üzere diğer fagositik hücreleri hedef almaktadırlar (60).

Aşı tasarımı için uygun yapılar olarak değerlendirilen lipozomlar, uygun antijen eklenerek verilmelerinden sonra, irer girmez ierdikleri antijeni hücreye salarlar. Bu antijenle hücrelerin karşılaşmasıyla bir immun yanıt meydana gelir. (61, 62). Bu nedenle lipozomlar gibi nanoparçacık dağıtım sistemlerinin kullanımını konusunda önemli araştırmalar yapılmış ve yeni aşıların immünojenliğini artırabilen adjuvanlar geliştirilebileceği düşünülmüştür (63, 64). Bu sistemler, potansiyel olarak bazı yollarla immünojenliği artırabilir. İlk olarak, birçok nanoparçacık, patojenle ilişkili moleküler kalıpları taklit edebilir, model-tanım reseptörleriyle doğuştan gelen bağışıklık tepkisini harekete geçirebilir (64). İkincisi, nanoparçacıklara

benzer olarak lipozomlar antijen sunan hücreler tarafından alınmakta ve bu da arttırılmış T hücresi aktivasyonuna neden olmaktadır (65).

DNA ile bağlanma ve bir bağışıklık tepkisi (immun yanıt) oluşturma yetenekleri gözönüne alındığında özellikli katyonik lipozomlar, güçlü aşı tasarımı platformları olarak görev yaparlar (65, 66). Ayrıca, bağışıklığın oluşturulmasında, gerçek virüs DNA'sı olmaksızın bazı nanoparçacıklar yüzeylerinde virüs benzeri parçacıklar oluşturularak gerekli bağışıklık uyarımını sağlayabilir (63). Lipozomlar antijen süresinin uzatılmasını sağlayan formülasyonlar gibi hedeflenebilir depo olarak görev yapabilir (66).

Veteriner hekimlikte patojenlere karşı aşılama için lipozomların potansiyel olumlu özelliklerinden dolayı, gıda hayvanlarında lipozom temelli aşılar çok ilgi uyandırmıştır. Kanatlılarda yapılan bir çalışmada, "subunit" aşılar için lipozomların vektör olarak canlılığı gösterilmiştir. Canlı *Salmonella enteritidis* mücadelesinde, aşılanmış grup immünize edilmemiş kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dışkıdaki bakterilerin atılımının önemli derecede azaldığı ve sekumda *S. enteritidis* kolonizasyonunun yaklaşık % 95'lik bir inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Enteropatojenlerin dışkıyla atılımının, yumurta kontaminasyonunun başlıca nedenlerinden biri olması nedeniyle, bu çalışmanın aynı zamanda gıda güvenliği ve insan sağlığı üzerine de etkileri vardır (67).

Newcastle (ND) gibi bazı hastalıklarda da, kitosan bazlı nanoparçacıklı aşı formülasyonlarının, piyasada bulunan diğer formülasyonlara kıyasla daha yüksek bir etkinlik gösterebileceğine dair kanıtlar da olduğu bildirilmiştir. La Sota aşısı, ND virüsünün lentojenik canlı La Sota suşunu içermekte ve bunun içine uygulanabilmektedir. Lipozomal ND aşısının ticari aşılardan daha iyi sonuç vermesinin nedenleri, çalışmada kullanılan lipozomların hücre zarlarıyla kaynaşabilen katyonik lipozomlar ve küçük bireysel parçacık boyutlarına sahip olmalarından dolayıdır (68).

3.1.5. İlaç ve Gen Veriminde Nanoparçacıklar

Nanoparçacıkların ilaç verme sistemleri olarak yoğun şekilde ilgi görmelerinin nedenleri küçük boyutları ve kan beyin bariyeri gibi biyolojik bariyerleri geçebilmeleridir. Ayrıca, nanoparçacıkların yüksek yüzey alanı/hacim oranı sağlamaları diğer konjugeler ve bileşiklerle reaktivite artışı sağlar. PLGA, polilaktik asit ve poligliserol asitten oluşan bir kopolimerdir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilir ve toksik olmadığı onaylanan PLGA'nın birçok araştırmacı tarafından ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasının fizibilitesini araştırılmıştır (69, 70).

3.1.6. Diğer Bazı İlaçlarda Lipozomlar

Araştırmacılar, ilaçların ve diğer bazı maddelerin hücre zarıyla etkileşim mekanizmasını incelemek için lipozomları model olarak kullanmışlardır. Hücre zarının fosfolipid tabakasına Vitamin K1'in etkilerine yönelik araştırmada, DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) ve DEPE (dielaidoylphosphatidyl-ethanolamine)

ile Vitamin K1'den oluşmuş bir model zar yapısı kullanılmıştır. Vitamin K1'in 25°C'de model zara ilavesiyle DMPC'nin interlaminalar boşluklarda artış oluşturduğu ve Vitamin K1'in DMPC sistemlerinde dairesel yapıyı bozarak, altıgen yapı oluşmasına sebep olduğu gösterilmiştir (71).

Lipozomlar tedavi edici uygulamalara ek olarak bir başka kullanım alanı da hayvanlarda beslenme takviyesidir. Postpubertal ineklerde yapılan bir çalışmada, lipozom kapsüllü α -tokoferol ağız yoluyla uygulandığında, diğer formülasyonlara göre daha yüksek plazma konsantrasyonu oluşturduğu ortaya konmuş ve gelecekte hayvan hastalıklarının önlenmesinde immün sistemini artırıcı eser mineral ve vitaminlerin lipozom kapsüllü şekilde verilmesinin faydalı olacağı düşüncesi ortaya çıkmıştır (72).

3.2. Balıklarda Nanoparçacık Uygulamaları

Su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotiklere karşı mikrobiyal dirençle mücadele için alternatif antimikrobiyaller olarak nanoparçacıkların kullanımı araştırılmıştır (73, 74). Balıklarda kitosan ve PLGA nanoparçacıkları ilaç uygulanmasında en çok araştırılanlardır (75-77).

Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'da C vitamini kullanımına yönelik yapılan bir çalışmada kitosan nanoparçacıkları ile konjuge edilip incelenmiştir. Vitamin C'nin oral uygulamadan 48 saat sonra serbest kaldığı, kitosan ve vitamin C arasındaki güçlü sinerjizmadan dolayı doğal bağışıklığın uyarıldığı gözlenmiştir (78). Zebra balık embriyoları üzerine yapılan çalışmada (79), PLGA nanoparçacıklarına antimikrobiyal ajan rifampisin yüklenmiş ve daha sonra enjekte edilmiştir. Tek başına rifampisin ile karşılaştırıldığında rifampisin-PLGA nanoparçacıklarının *M. marinum*'a karşı etkisi artmış ve embriyoların daha fazla süre hayatta kaldıklarını gösterilmiştir.

Oral DNA aşısı, *Vibrio parahemolyticus*'un dış zar proteini K (ompK) genini kitosan nanoparçacıklarına yükleyerek geliştirilmiştir. Bu rekombinant nanoaşı, siyah çipura (*Acanthopagrus schlegelii*)'da *Vibrio parahemolyticus*'a karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturmuştur (80). Asya levrekte (*Lates calcarifer*) *Vibrio anguillarum*'a karşı oral DNA aşısı, kitosan ve kitosan/tripoly fosfat nanoparçacıkları kullanılarak geliştirilmiştir. Nanoaşının, patojene karşı sadece orta düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir (81).

Kaynaklar

1. Gürsoy A, Pişkin E, Dortunç B, Peppas NA. Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler. İstanbul: Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Tekno Grafik-Ada Ofset, 1989.
2. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Dis 2005; 4: 145-160.
3. Taylan B, Özer AY. Application of liposomes in medicine. Pharmacia 1991; 31: 16-35.

3.3. Lipozomların Biyomühendislik Alanında Kullanımı

Kanser olayları ve kalıtsal hastalıkların tedavisinde, gen teknolojilerinin gelişmesi ve gen tanımlanmasıyla önemli gelişmeler olmuştur. Hastalığa sebep olan hasarlı gen yerine sağlıklı gen kopyalarının hücreye yerleştirilmesiyle genetik yapının düzeltilmesi gen tedavisinde temel amaçtır (82).

Gen tedavisinde, kalıtsal hastalık geninin, hedef hücrelerin kesin olarak belirlenmesi, sağlıklı genin kopyalanması hedef hücrelere ulaştırılması temel basamaklardır. Bu basamaklardaki en önemli aşama, etkin bir şekilde gen aktarımı yapılmasıdır. Hücrelere ve bölgelere genleri taşımada fiziksel yöntemler kullanılır. Bunlar, doğrudan DNA ve balistik gen enjeksiyonu ile lipozom formülasyonlardır. Doğrudan DNA enjeksiyonunda DNA'yı taşıyan plazmid kas içine verilir. Bu tipi klasik uygulamalarda taşıyıcı olarak lipozomlar kullanılır ve negatif yük içeren DNA molekülleri ile etkileşimi önlemede negatif yüklü LUV'lar kullanılır. Bunların yanında, kolesterol kullanılarak toksisitesi azaltılmış ve taşıma kapasitesi artırılmış pozitif yüklü lipozomlar vardır (83).

4. SONUÇ

İlk defa 1960'lı yıllarda tanımlanan lipozomların, yapılarının hücre zarına benzemesi, toksik olmaması, içerik ve yapısının istenilen şekilde hazırlanabilmesi ve istenilen hücreleri hedef alan etkili maddenin kontrollü salınımını sağlayabilme özellikleri diğer kontrollü serbestleştirilen sistemlere göre üstünlükleridir. Bu özellikler sayesinde lipozomlardan tıp ve veteriner hekimliği, biyomühendislik, gıda sanayiisi ve kozmetik gibi birçok alanda çeşitli amaçlarla yararlanılmaktadır. Özellikle tıp ve veteriner hekimliği alanında lipozomlanmış ilaçlar kullanıldığında; çok düşük dozda farmakolojik etki sağlanmakta, hastanın sık ilaç alma ihtiyacı, ilacın yan etkileri, toksisitesi ve alerjik etkileri azalmakta, ilacın istenilen sürede serbestleşmesi sağlanmaktadır. Ancak lipozomal ilaç şekillerinin; üretiminin maliyetli olması, hatalı üretimden kaynaklanabilecek doz hataları, fiziksel ve kimyasal dayanıklılık sorunları ile uygulama yollarının farklılığına göre dozun tam tespit edilememesi gibi faktörler kullanımını sınırlamaktadır. Bilim ve teknolojide meydana gelen gelişme ve ilerlemelerle, bu kısıtlamaların ortadan kaldırılacağı ve lipozomların daha fazla önem kazanacağı düşünülmektedir.

4. Yurdakul A, Atav R. Lipozomların yapısı ve sınıflandırılması. Ege Üniversitesi Dergipak/Tekstil ve Konfeksiyon 2007; 17: 243-247.
5. Barenholz Y, Gibbes D, Litman BJ, et al. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. Biochem 1977; 16: 2806-2810.
6. Barenholz Y. Liposome application: Problems and prospects. Cur Op Coll Int Sci 2001; 6: 66-77.

7. Lasch J, Berdichevsky VR, Torchilin VP, et al. A method to measure critical detergent parameters-preparation of liposomes. *Ann Biochem* 1983; 133: 486-491.
8. Coral G. Lipozom Protoplast Elektrofüzyon Metoduyla *Aspergillus Niger* Kökenli Glikoamilaz Geninin *Saccharomyces cerevisiae* Hücrelerine Aktarılması ve Ekspresyonu. Doktora Tezi, Mersin: Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2000.
9. Wang B, Hu L, Siahaan TJ, Soltero R. Drug delivery: Principles and applications. 2nd Edition, Hoboken New Jersey: John Wiley & Sons Inc, 2005.
10. Birdane YO, Baş AL. Damar içi yolla verilen serbest ve lipozomal ampisilin kan farmakokinetik profillerinin karşılaştırılması. *Kocatepe Veteriner Derg* 2014; 7: 23-31.
11. Lee J, Kwon HJ, Cho SH, et al. Marbofloxacin-encapsulated microparticles provide sustained drug release for treatment of veterinary diseases. *Mater Sci Engin* 2016; 60: 511-517.
12. Bozkır A, Koçyiğit S. Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabiliteilerinin incelenmesi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 1995; 24: 42-52.
13. Alkan H. Lipozomlar II. ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaları. *Farmasötik Bilimler Ankara Derneği (FABAD) Farmasötik Bilimler Dergisi* 1983; 8: 197-212.
14. Konings AWT. Lipid Peroxidation in liposomes. In Gregoriadis G. (Editor). *Liposome Technology*. Boca Raton: CRC Press, 1984: 141-161.
15. Riaz M, Weiner N, Martin F. Liposomes. In: Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. (Editors). *Pharmaceutical Dosage Forms Disperse Systems. Volume 2*, New York: Marcel Dekker Inc, 1989; 567-602.
16. Piraube C, Postaire E, Lize JM, Prognon P, Pradeau D. Evidence of chemical instability of phospholipids in liposomes. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 4600-4602.
17. Weiner N, Martin F, Riaz M. Liposomes as drug delivery system. *Drug Dev Ind Pharm* 1989; 15: 1523-1524.
18. Hunt CA, Tsang S. α -Tocopherol retards autooxidation and prolongs the shelf- life of liposomes. *Int J Pharm* 1981; 8: 101-110.
19. Ausborn M, Nuhn P, Schreier H. Stabilization of liposomes by freeze-thaw and lyophilization techniques: problems and opportunities. *Eur J Pharm Biopharm* 1992; 38: 133-139.
20. Grit M, Underberg WJM, Crommelin DJA. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidyl choline in aqueous liposome dispersions. *J Pharm Sci* 1993; 82: 362-366.
21. Arıca B, Özer Y, Hıncal AA. Primakin difosfat lipozomlarının stabilitesi üzerinde çalışmalar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 1994; 14: 39-49.
22. Nassander UK, Steerenberg PA, Storm G, et al. In vivo targeting of OV-TL3 immunoliposomes to ascitic ovarian carcinoma cells (OVCAR-3) in athymic nude mice. *Cancer Res* 1995; 52: 646-653.
23. Lopez-Berestein G, Fainstein V, Hopter R, et al. Liposomal Amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer. *J Infect Dis* 1985; 151: 704-710.
24. Svenson CE, Popescu MC, Ginsberg RC. Liposome treatments of viral, bacterial and protozoal infections. *Crit Rev Microbiol* 1988; 15: 1-31.
25. Egusquiaguirre S, Igartua M, Hernandez R, Pedraz J. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clin Trans Oncology* 2012; 14: 83-93.
26. Bae KH, Chung HJ, Park TG. Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol Cells* 2011; 31, 4: 295-302.
27. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 161-171.
28. Vail DM, MacEwen EG, Kurzman ID, et al. Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidyl-ethanolamine adjuvant immunotherapy for splenic hemangiosarcoma in the dog: A randomized multi-institutional clinical trial. *Clin Cancer Res* 1995; 1,10:1165-1170.
29. Judson I, Radford JA, Harris M, et al. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2001; 37: 870-877.
30. Kleiter M, Tichy A, Willmann M, Pagitz M, Wolfesberger B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet Rad Ultrasound* 2010; 51: 349-355.
31. Aditya NP, Vathsala PG, Vieira V, Murthy RS, Souto EB. Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Adv Colloid Interf Sci* 2013; 201: 1-17.
32. Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, et al. Coping with antibiotic resistance: Combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2011; 9: 1035-1052.
33. Grace AN, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles a brief study. *Colloids Surf* 2007; A 297: 63-70.
34. Italia JL, Yahya MM, Singh D, Ravi Kumar MN. Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous Fungizone. *Pharm Res* 2009; 26: 1324-1331.
35. Rastogi L, Kora AJ. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2012; 32: 1571-1577.
36. Amaral AC, Bocca AL, Ribeiro AM, et al. Amphotericin B in poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidiodomycosis. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 526-533.
37. Kamel AO, Awad GA, Geneidi AS, Mortada ND. Preparation of intravenous stealthy acyclovir nanoparticles with increased mean residence time. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009; 10: 1427-1436.
38. Mishra V, Mahor S, Rawat A, et al. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *J Drug Target* 2006; 14: 45-53.

39. Ribeiro TG, Franca JR, Fuscaldi LL, et al. An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 5341-5353.
40. Gnanadhas DP, Ben Thomas M, Elango M, et al. Chitosan–dextran sulphate nanocapsule drug delivery system as an effective therapeutic against intraphagosomal pathogen *Salmonella*. *J Antimicrob Chem* 2013; 68: 2576-2586.
41. Singh R, Smitha MS, Singh SP. The role of nanotechnology in combating multidrug resistant bacteria. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14: 4745-4756.
42. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 2014; 32: 327-37.
43. Chen CW, Hsu CY, Lai SM, et al. Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 78: 88-104.
44. Forier K, Raemdonck K, De Smedt SC, et al. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. *J Control Release* 2014; 190: 607-623.
45. Tamilvanan S, Venkateshan N, Ludwig A. The potential of lipid and polymerbased drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. *J Control Release* 2008; 128: 2-22.
46. New RRC, Chance SM, Thomas SC, et al. Nature antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature* 1978; 272: 55-56.
47. Hrkova G and Velebny S. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacol Toxicol and Endoc* 1994; 107: 71-77.
48. Peng KT, Chen CF, Chu IM, et al. Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles. *Biomaterials* 2010; 31: 5227-5236.
49. Pillai RR, Somayaji SN, Rabinovich M, et al. Nafcillin loaded PLGA nanoparticles for treatment of osteomyelitis. *Biomed Mater* 2008; 3: 1-7.
50. Cong Y, Quan C, Liu M, et al. Alendronate-decorated biodegradable polymeric micelles for potential bonetargeted delivery of vancomycin. *J Bio Sci Polym Ed* 2015; 26: 629-643.
51. Uskokovic V and Desai TA. Phase composition control of calciumphosphate nanoparticles for tunable drug delivery kinetics and treatment of osteomyelitis. I. Preparation and drug release. *J Biomed Mater Res* 2013; A101: 1416-1426.
52. Rathbone M, Brayden D. Controlled release drug delivery in farmed animals: commercial challenges and academic opportunities. *Curr Drug Deliv* 2009; 6: 383-390.
53. Rose JS, Neal JM, Kopacz DJ. Extended-duration analgesia: update on microspheres and liposomes. *Reg Anesth Pain Med* 2005; 30: 275-285.
54. Schmidt JR, Krugner-Higby L, Heath TD, Sullivan R, Smith LJ. Epidural administration of liposome encapsulated hydromorphone provides extended analgesia in a rodentmodel of stifle arthritis. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50: 507-512.
55. Grant GJ, Lax J, Susser L, et al. Wound infiltration with liposomal bupivacaine prolongs analgesia in rats. *Acta Anaesthesiologica Scan* 1997; 41: 204-207.
56. Richard BM, Newton P, Ott LR et al. The safety of EXPAREL (bupivacaine liposome injectable suspension) administered by peripheral nerve block in rabbits and dogs. *J Drug Deliv* 2012; 1-10.
57. Paul-Murphy JR, Krugner-Higby LA, Tourdot RL, et al. Evaluation of liposome encapsulated butorphanol tartrate for alleviation of experimentally induced arthritic pain in greencheeked conures. *Am J Vet Res* 2009; 70: 1211-19.
58. Lukyanov AN, Elbayoumi TA, Chakilam AR, Torchilin VP. Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded longcirculating liposomes modified with anti-cancer antibody. *J Cont Release* 2004; 100: 135-144.
59. Krugner-Higby L, Smith L, Schmidt B, et al. Experimental pharmacodynamics and analgesic efficacy of liposomeencapsulated hydromorphone in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47: 185-195.
60. Gregoriadis G. Immunological adjuvants: A role for liposomes. *Immunol Today* 1990; 11: 89-97.
61. Cox JM, Pavic A. Advances in enteropathogen control in poultry production. *J Appl Microb* 2010; 108: 745-755.
62. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Rev Cancer* 2012; 12, 1: 39-50.
63. Nordly P, Madsen HB, Nielsen HM, Foged C. Status and future prospects of lipid-based particulate delivery systems as vaccine adjuvants and their combination with immunostimulators. *Exp Op Drug Deliv* 2009; 6: 657-672.
64. Storni T, Kundig TM, Senti G, Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 333-355.
65. Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 140-157.
66. Caracciolo G, Amenitsch H. Cationic liposome/DNA complexes: From structure to inter-actions with cellular membranes. *Eur Biophysics J* 2012; 41: 815-829.
67. Li W, Watarai S, Iwasaki T, Kodama H. Suppression of *Salmonella enterica* serovar enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Dev Comp Immun* 2004; 28: 29-38.
68. Onuigbo EB, Okore VC, Ofokansi KC, et al. Preliminary evaluation of the immuno-enhancement potential of Newcastle disease vaccine formulated as a cationic liposome. *Avian Path* 2012; 41: 355-360.
69. Lu JM, Wang X, Marin-Muller C, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9: 325-341.
70. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011; 3: 1377-97.
71. Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kravchuk OV, et al. *Biomembranes*. Bachelor of Business Adm 1999; 1: 206-220.

72. Card JW, Jonaitis TS, Tafazoli S, Magnuson BA. An appraisal of the published literature on the safety and toxicity of food-related nanomaterials. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41: 22-51.
73. Gunalan S, Sivaraj R, Rajendran V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Prog Nat Sci Mater Int* 2012; 22: 693-700.
74. Swain P, Nayak SK, Sasmal A, et al. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol* 2014; 30: 2491-2502.
75. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomed* 2008; 3: 133-149.
76. Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 1-13.
77. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 765-774.
78. Alishahi A, Mirvaghefi A, Tehrani MR, et al. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydr Polym* 2011; 86: 142-146.
79. Fenaroli F, Westmoreland D, Benjaminsen J, et al. Nanoparticles as drug delivery system against tuberculosis in zebrafish embryos: direct visualization and treatment. *ACS Nano* 2014; 8: 7014-7026.
80. Li L, Lin SL, Deng L, Liu ZG. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*. *J Fish Dis* 2013; 36: 987-995.
81. Rajesh Kumar S, Ishaq Ahmed VP, et al. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol* 2008; 25: 47-56.
82. Nicolau C, Cudd A. Liposomes as carriers of DNA. *Crit Rev Therap Drug Carr Systems* 1989; 6: 239-271.
83. Lasic DD. Liposomes. *Am Sci* 1992; 80: 20-31.