T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

MUSTAFA KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. İSMAİL KOCAÇALIŞKAN

EŞ DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. TÜLİN ARASOĞLU

İSTANBUL, 2016

Bu çalışma, TÜBİTAK 3001 – Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı'nın 114Z093 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilgi ve tecrübeleriyle sürekli yanımda olan desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN'a ve eş danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU'na içtenlikle teşekkür ederim. Aynı zamanda laboratuar çalışmaları süresince bilgi ve tecrübeleriyle yine destek veren Sayın Yrd. Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU ve Sayın Dr. Serap DERMAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca yüksek lisans öğrenimimde kendilerinden aldığım dersler sayesinde bilgileriyle perspektif kazandıran ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT'a, Yrd. Doç. Dr. Emel ORDU'ya, Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e, Yrd. Doç. Dr. Zerrin ÇALIŞKAN'a, Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a ve Prof. Dr. Mustafa CEMEK'e emekleri için teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca bilgi, fikir ve yardımları ile desteğini esirgemeyen proje arkadaşım Gözde YELKENCİ'ye, bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Mine KUÇAK'a, Arş. Gör. Burcu TUNCER'e, Özlem TURAN'a ve Gözde ZEYTUN'a;

Sadece evi değil, sevinçleri ve hüzünleri paylaştığımız ev arkadaşlarım Ercan KARAÇELİK ve Alper GÖRÜR'e,

Yüksek lisans döneminde tanıştığım ve iyi ki varlar dediğim tüm değerli dostlarıma,

Hayatın belli noktalarından geçerken tam da olması gerektiği anda tanışmış olduğum, bir sözle, bir eylemle, daha da ötesi var olmalarıyla dahi destek aldığım burada ismini sayamadığım tüm arkadaş, akran, akraba ve saygı, sevgi duyduğum kişilere,

Her türlü desteğiyle gönlünü ortaya koyan, her zaman yanımda yer alan canımdan öte aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Şubat, 2016

Mustafa KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ....vii

KISALTMA LİSTESİ....viii

ŞEKİLLER TABLOSU x

ÇİZELGE LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT....xiii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER.... 4

2.1 Nanoteknoloji 4
2.1.1 Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi 4
2.1.2 Nanoteknolojinin Amaçları 8
2.1.3 Nanoteknolojinin Kullanım Alanları 8
2.1.4 Nanoteknolojinin Yaraları ve Avantajları 10
2.1.5 Nanoteknolojinin İlaç Taşınımdaki Yeri 11
2.2 İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler 11
2.2.1 Polimerik Partiküller İlaç Taşıyıcı Sistemler 13
2.2.1.2 Polimerik Nanopartiküller.... 13
2.3 Nanopartikül Üretimi.... 14

2.3.1 Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Polimerler 14
2.3.2 Nanopartikül Üretim Yöntemleri 18
2.4 Allelopati ve Allelokimyasallar 25
2.6 Cevizin Orjini ve Dünyadaki Yayılımı 29
2.7 Juglonun Moleküler Etki Mekanizmaları 30
2.8 Juglonun Antimikrobiyal Etkisi 34
2.9 Antibakteriyel Nanopartiküllerin Sağladığı Özellikler 35
2.9.1 Polimerik Nanopartiküllerin Antibakteriyel Çalışmalarda Kullanımı 37
2.10 *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* 38
2.10.1 *Escherichia coli* 38
2.10.2 *Staphylococus aureus* 39

BÖLÜM 3

BÖLÜM 3 41

3.1 Materyal 41
3.1.1 Kullanılan Cihazlar 41
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar 42
3.1.3 Kullanılan Çözeltiler 42
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmalar 43
3.2 Metod 43
3.2.1 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi 43
3.2.2 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Salımı 44
3.2.3 Antibakteriyel Çalışmalarda Kullanılan J-NP5 ve serbest juglon Stok Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 44
3.2.4 Bakteri Süspansiyonlarının Ekimler İçin Hazırlanmaları 44
3.2.5 Juglon Nanopartiküllerinin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler 44

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR 47

4.1 Nanopartikül Hazırlanması ve Karakterizasyonu 47
4.2 Juglon Yüklü Nanopartiküllerin Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi 48

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER 57

KAYNAKLAR 61

ÖZGEÇMİŞ 71

SİMGE LİSTESİ

ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
M	Molar
°C	Derece Santigrat
rpm	Dakikada Dönme Hızı
mV	Milivolt
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AR-GE	Araştırma-Geliştirme
ASTM	American Society for Testing and Materials
CFU	Colony-forming Unit
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CO_2	Karbondioksit
DCM	Diklorometan
DL	Drug Loading
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EE	Encapsulation Efficiency
FDA	Food and Drug Administration
H_2O	Su
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IBM	International Business Machines
J-NP5	Juglon Nanopartikül 5
MHA	Muller Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibitor Konsantrasyon
MIT	Massachusetts Institute of Technology
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
NaCl	Sodyum Klorür
NB	Nutrient Broth
NNI	National Nanotechnology Initiative
NP	Nanopartikül
OD	Optik Density
PBS	Fosfat Tamponu
PCA	poli (siyano- akrilat)
PCL	poli carprolactone
PEG	polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PLGA-PLH-PEG	poly(D, L-lactic-co-glycolic acid)-b-poly(L-histidine)-b-poly(ethylene glycol)
PNP	Polimerik Nanopartikül
PVA	Polivinil Alkol

RESS	Sıvı Çözücü İçinde Süperkritik Sıvının Hızla Genişletilmesi
ROS	Reactive oxygen species-İndüklenen oksijen türleri
RY	Reaction Yield
SAS	Süperkritik Antisolvent
SST	Süperkritik Sıvı Teknolojisi
TiO_2	Titanyum Dioksit
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultra Violet
ZnO	Çinko Oksit

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 2.1 Farklı skaladaki maddelerin nanometre ölçeğinde kıyaslanması 4
Şekil 2.2 Altın yüzey üzerinde hareket edebilen nano arabaların görüntüsü 7
Şekil 2.3 Tarihsel süreç içinde nanoteknoloji alanındaki önemli gelişmeler 8
Şekil 2.4 Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan nanomateryaller 12
Şekil 2.5 Polimerik partiküler ilaç taşıyıcılar 13
Şekil 2.6 PLGA nanopartikülünün hücre içine alımının şematik gösterimi 17
Şekil 2.7 PLGA'nın hidrolizi 18
Şekil 2.8 Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya nanopartikül üretim yöntemleri 19
Şekil 2.9 S/Y/S çift emülsiyon hazırlanması 20
Şekil 2.10 Diyaliz yöntemi 22
Şekil 2.11 Miniemülsiyon yöntemi 24
Şekil 2.12 Juglonun yapısal formülü 27
Şekil 2.13 Juglonun olası biyosentez yolağı 29
Şekil 2.14 Juglans regia'nın doğal olarak yetiştiği dağılım alanları 30
Şekil 2.15 Juglon toksik forma dönüşümünün şematik gösterimi 31
Şekil 2.16 PPIazların sınıflandırılması. 32
Şekil 2.17 Juglonun DNA üzerinde etkisi 33
Şekil 2.18 Farklı boyutlarda aynı hacimdeki maddenin değişen yüzey alanı 35
Şekil 2.19 Etken yüklü veya metal nanopartiküllerin bakteri üzerindeki etkisi 36
Şekil 2.20 Bakteri hücre duvarı hedefli tasarlanmış etken yüklü nanopartikül sistemi .. 38
Şekil 4.1 J-NP5'in 24 saatlik dilimde göstermiş olduğu salım 48
Şekil 4.2 J-NP5'in 43 günlük dilimde göstermiş olduğu salım 48
Şekil 4.3 *E. coli* inhibisyon zon çapı 50
Şekil 4.4 *S. aureus* zon inhibisyon çapı 50
Şekil 4.5 Yüzde indirgeme 0. Saatteki sonuçları 52
Şekil 4.6 Yüzde indirgeme 3. saat sonuçları 53
Şekil 4.7 Yüzde indirgeme 6. saat sonuçları 54
Şekil 4.8 Yüzde indirgeme 24. saat sonuçları 55
Şekil 4.9 Yüzde indirgeme 48. saat sonuçları 56

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Kontrollü taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerlerin sınıflandırılması..... 15
Çizelge 2.2 Cevizin çeşitli bölümlerindeki juglon miktarının mevsimsel değişimi 28
Çizelge 4.1 J-NP5 nanopartikülünün karakterizasyon sonuçları 47
Çizelge 4.2 Agar kuyucuk yöntemi inhibisyon zon çapları 49
Çizelge 4.3 J-NP5'de bakterilerde MİK değerleri 51

ÖZET

JUGLON YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa KAYA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Bu çalışmada juglon yüklenmiş nanopartiküllerin (J-NP5) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakteri türleri üzerine antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla J-NP5 nanopartiküllerinin elde edilmesinde çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Diğer taraftan antibakteriyel aktivite belirlemede agar kuyucuk, broth mikrodilüsyon ve yüzde indirgeme yöntemleri kullanılmıştır. J-NP5'in Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir. Juglonun hem serbest hem de enkapsüle formunun Gram negatif bakteri olan *E. coli*'de çok daha düşük inhibisyon gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak serbest juglonun antibakteriyel etkisi J-NP5'e göre daha yüksek olmakla birlikte J-NP5 nanopartikül sistemi, juglonun çözünürlüğünü artırması suretiyle onun biyouyumluluğunu ve biyoyararlanımını artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Juglon, nanopartikül, PLGA, antibakteriyel aktivite

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF NANOPARTICULES ENCAPSULATED JUGLONE

Mustafa KAYA

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Ismail KOCACALISKAN

Co-Adviser: Assist. Prof. Dr. Tülin ARASOGLU

In this study antibacterial effects of juglone encapsulated nanoparticules (J-NP5s) on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial species have been researched. For this aim solvent evaporation diffusion method was used for obtaining J-NP5 nanoparticles. On the other hand; agar well, broth microdilution and percentage reduction methods were used to determine antibacterial activity. J-NP5 was observed to has higher inhibitory effect on *S. aureus* which is Gram pozitif bacterium. In contrary, both free juglon and J-NP5 were seen to have much more lower inhibitory effect on *E. coli* which is Gram negative bacterium. As a result, antibacterial activity of free juglone was higher than J-NP5. However, J-NP5 nanopartical system increased biocompatibility and bioavailability of juglone by increasing its solubility.

Keywords: Juglone, nanoparticles, PLGA, antibacterial activity.

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda mikron altı boyutlardaki nanopartiküler sistemlerle ilgili olarak; nanoteknoloji, tıp ve biyoteknoloji alanlarında yapılan çalışmaların sayısında önemli artış olmuştur. Özellikle nanopartiküler sistemlerle ilgili yapılan çalışmalarda; ilaç, gen, antibakteriyel ajanlar ile antijenlerin taşınması, *in vitro*/*in vivo* diagnostiklerin uygulanması, geliştirilmiş biyouyumlu materyallerin üretimi gibi konular göze çarpmaktadır. Bu çalışmalarda nanopartiküler sistemler içerisinden polimerik yapıda olanların; biyouyumluluk, biyobozunurluluk, sürekli salım ve güvenilirlik gibi birçok teknolojik avantaja sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle antibakteriyel özelliğe sahip maddelerin Poli-(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerinin içerisine yüklenmesi ile oluşturulan sistemlerin, aynı etken maddelerin serbest formuna göre; farmakokinetik özelliklerinin, terapötik indekslerinin ve biyouyumluluklarının dikkat çekici bir şekilde arttırıldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin, 1µm boyuta sahip mikropartiküllere göre hücre içerisine alınan etken madde miktarını 2,5 kat arttırdığı, 10 µm boyuttaki bir mikropartiküle göre ise 6 kat arttırdığı gösterilmiştir [1, 2]. Benzer sonuçlar *in situ* intestinal loop model sıçanlarda yapılan çalışmalarda da elde edilmiş ve 100 nm boyutlardaki nanopartiküllerin 1-10 µm boyutlarındaki mikropartiküllere göre hücre içi alımlarda 15-250 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir [2, 3].

Bu çalışmada etken olarak kullanılan juglon molekülü (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone); ceviz ağacının (*Juglans* sp.) ağaç ve meyve kabuğundan, meyve ve yapraklarından doğal olarak izole edilen naftokinon yapılı bir allelokimyasaldır. Literatürde bu bileşiğin

önemli antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bundan dolayı cevizin birçok ülkede tıbbi bitki olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Bu bileşiğin en önemli özelliği, diğer bitkilerin metabolik fonksiyonu için gerekli olan belirli enzimleri inhibe ederek allelopatik etki göstermesidir ve aynı zamanda birçok bitki için de toksiktir [4-8]. Araştırmalar incelendiğinde juglon bileşiğinin; herbisit [9], antibakteriyel; [9-15], antiviral [16] , antifungal [17, 18], antitümör [13, 19], antikanser [12, 14], sitotoksik ve genotoksik [20, 21], anti-proliferatif [22] antihipertansif [23], larvasidal ve mollussisidal [13], akarisidal [24], antioksidant [13, 14, 25, 26] gibi etkilere sahip olduğu ve bu amaçla da birçok ülkede tıbbi bitki olarak kullanıldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte gıda ve kozmetik sanayide renklendirici ajan, mürekkep, tekstil boyası gibi farklı amaçlarla da kullanımı mevcuttur.

Juglonun geniş bir skalada algler, bakteriler, fungusların dâhil olduğu mikroorganizmaları inhibe ettiği gösterilmiştir [27]. *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Mycobacterium smegmatis, Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae, Helminthosporium sp., Pycnoporus sanguineus* ve *Microsporum gypseum* üzerinde yapılan çalışmalarda juglonun antimikrobiyal özelliği gösterilmiştir [27], [28], [29].

1.2 Tezin Amacı

Literatürde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiş olan juglon allelokimyasalının PLGA nanopartiküler sisteme yüklenmesiyle bu etkisinin artırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca çalışmanın ilk defa gerçekleştiriliyor olması elde edilecek verilerin önemini daha da artırmakta ve bilim dünyasına önemli kazanımlar sağlayacağı düşünülmektedir.

1.3 Hipotez

Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin nanopartiküler sistemlere yüklenerek uygulandığında biyolojik aktivitelerinin ve biyouyumluluğunun etkin bir şekilde artırıldığı ve özellikle zamansal etkinlikte artış olduğu literatürde gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızın hipotezi; cevizden salgılanan, allelokimyasal özelliği ve

antibakteriyal etkisi bilenen Juglon maddesinin PLGA nanopartiküler sisteme enkapsülasyonu ile antibakteriyel etkisinin artırılması öngörüsüyle oluşturulmuştur.

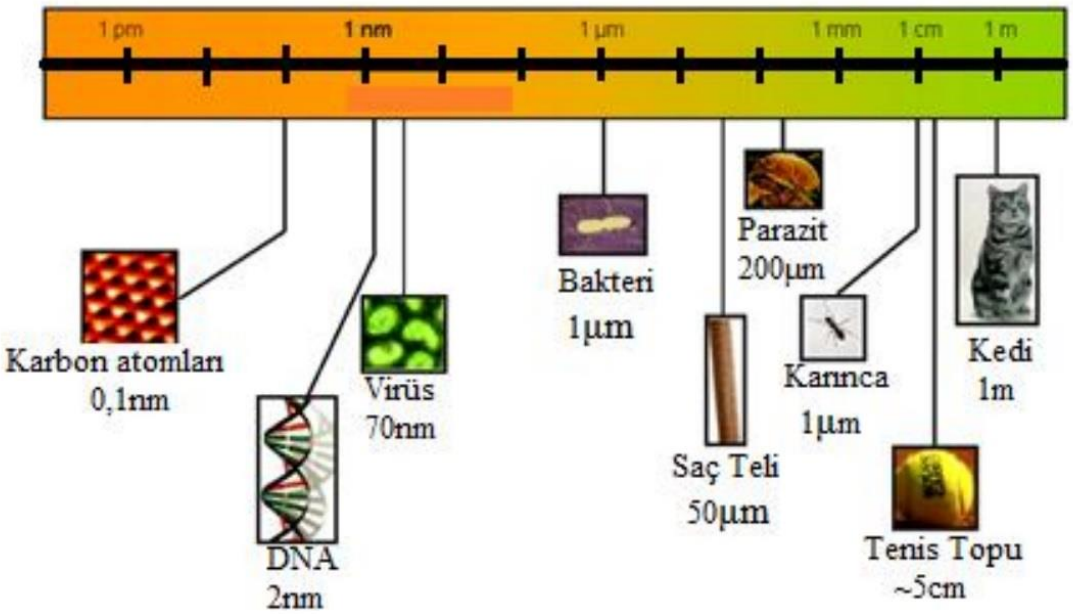
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

2.1.1 Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi

Nano, bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri anlamına gelen bir ön ektir. Nanoteknoloji kelimesindeki nano, nanometreden gelmektedir. Nanometre 10^{-9} metreye eşittir. Nanometre ölçeği mikron altı oluşumların yer aldığı bir skaladır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Farklı skaladaki maddelerin nanometre ölçeğinde kıyaslanması [30]

Nanoteknolojinin en kapsamlı tanımı ABD "Ulusal Nanoteknoloji Adımı-NNI" tarafından şu şekilde belirlenmiştir: "Nanoteknoloji, aşağı yukarı 1 – 100 nanometre aralığında olan boyutlardaki maddenin incelenmesi ve işlenmesidir. Bu boyutlarda yapılan bu

çalışmalarda gerçekleşen benzersiz fenomenler, yepyeni uygulamalara olanak sağlamaktadır. Nano-boyuttaki bilimi, mühendisliği ve teknolojiyi kapsayan nanoteknoloji, maddenin bu boyut ölçeğinde görüntüleme tekniğini, ölçümünü, modellemesini ve manipülasyonunu içermektedir. Nano-boyut bilimi malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, tek tek atomların ve moleküllerin ya da kütlesel haldeki malzemenin özelliklerinden temel alarak geliştirilmektedir. Nanoteknoloji alanında AR-GE, bu yeni özelliklere sahip olan gelişmiş malzemeler, aygıtlar ve sistemlerin anlaşılması ve üretilmesine yönelmiştir" [31].

Atomlar ve moleküller evrendeki her şeyin temel yapı taşıdır. Bu yapı taşları tarafından yapıların nasıl inşa edildiğini öğrenmek, birbiriyle olan etkileşimlerini ve özelliklerini belirlemede hayati öneme sahiptir [32]. Nanoteknoloji, atomik ve moleküler düzeyde düzenlemeye imkân vermektedir [33] ve farklı üretim yolları geliştirilebilmesine olanak sağlamaktadır. Günümüzde nanoteknolojide uygulanan üretim yollarını iki başlık altında toplamak mümkündür:

a. Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımı: En küçük yapıları dahi nanometrik boyutlara getirmeyi olanaklı kılar. Bu sayede var olan makro düzeydeki yapıdan, çok farklı özelliklere sahip nano yapılar geliştirilir.

b. Aşağıdan Yukarı Yaklaşımı: Tek tek atomları, molekülleri ya da molekül kümelerinden yeni nano yapılar eldesini amaçlayan bir yaklaşımdır. Bu organizasyonel yönüyle moleküler biyolojiye benzemektedir [34].

Biyoloji, kimya, elektronik, fizik, malzeme bilimleri ve mühendislik alanlarında nano ölçekteki çalışmalarının hepsi bir birine yakınsamaya başlamakta ve belli bir disiplinin incelediği özellik olmaktan çıkmaktadır [31]. Massachusetts Teknoloji Enstitüsü (MIT) araştırmacılarından Tom Knight ise nanoteknolojinin kesinlikle biyolojiye ait olduğunu savunmakta ve moleküler biyolojiden nanoteknolojiye uygulanabilecek birçok bilginin olduğunu belirtmektedir [35]. Bu bakış açısıyla hücrede olan tüm moleküler faaliyetlerin de [makro moleküllerin (DNA, proteinler vb.) küçük yapı taşlarına kadar parçalanması (nükleotidler, aminoasitler vb.), tekrardan küçük yapılardan makro moleküllerin inşa edilebilmesi] nanoteknoloji üretim yaklaşımlarındaki gibi olduğu düşünülebilir [36].

Maddenin atomik boyutta işlenebilirliği ile ilgili ilk söylem Richard Feynman'a aittir. “Temelde yeterince boş yer var” başlıklı tarihsel konuşmasında “Vurgulamak istediğim şey, bir şeyleri küçük ölçekte manipüle etmek ve kontrol etmektir” demiştir. Temelde öne sürdüğü fizik yasalarına aykırı olmasa da o dönemde oldukça fantastik gelmiştir. Basitçe argümanı ‘Tekrarlamalı Minyatürcülük’ denilebilir; bir ölçekte bulunan makine seti geliştirmek, sonrasında bunlar yardımıyla yüzde bir makine seti oluşturmak ve böylece atom düzeyinde manipülasyon yapabilecek bir makine seti geliştirme mantığına dayanmaktadır.

Nanoteknoloji terimi ise ilk kez ‘On The Basic Concept of Nanotechnology’’ (Nanoteknolojinin Esas Fikri) adlı bir makalede Norio Taniguchi tarafından 1974 yılında ortaya atılmıştır. Taniguchi’nin tanımlamasına göre nanoteknoloji, mevcut teknolojilerin küçültülmesine ve ileri düzeyde duyarlıklarına dayalı olarak hızla ortaya çıkan teknolojilerdir [37].

Moleküler üretime ait fikirler ise ilk olarak Feynman’ın fikirlerinin gerçekleştirile bilirliğini öngören K. Eric Drexler’in “Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı” konulu makalesinde yer almıştır. Sonraki bir çalışmasında kendi kendini derleyebilen bir yapı kurgulamıştır [38]. Moleküllerin yerlerini belirleyerek kimyasal tepkimeleri güdümleyebilecek bu yapı modelinin oluşturulması, aşağıdan yukarı üretim yaklaşımının ilk örneği olması açısından ayrı bir öneme sahiptir. Makalenin yayınlandığı tarih olan 1980’lerde sıfırdan protein tasarlanmıyordu, hatta bunu yapmanın aşırı zor ve imkânsız olduğu düşünülmekteydi. Fakat ilerleyen 10 yıl içerisinde protein tasarımları yapılmaya başlandı [39].

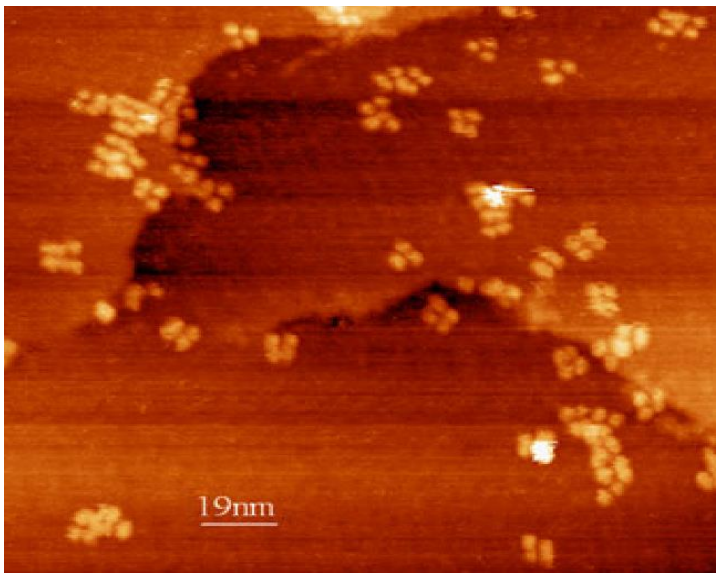
Yapılan nano ölçekteki manipülasyonları ve bunların görüntülenmesini sağlayan “Taramalı Tünelleme Mikroskopu” 1981 yılında icat edilmiştir. Bu nanoteknolojide dönüm noktası olmuştur. Sınırlı müdahale yetisine sahip de olsa taramalı sonda ile molekülleri bir parça itelemek mümkün hale gelmiş ve atom ölçeğinde bunların görüntülenmesi sağlanmıştır.

Curl Kroto ve Smalley tarafından 1985’te top şeklinde karbon atomlarının örüntüsünden oluşan fullerenler 1985’te üretilmiştir. 1986’da “Atomik Kuvvet Mikroskopu” icat edilmiştir.

İlk katı hal transistoru Bell Laboratuvarları'nda 1940'lı yıllarda Shockley, Bardeen ve Brattain tarafından yapılan ve bir yumruk büyüklüğünde olan bir transistordur. İletkenliğin kuantum özelliği ise ilk defa 1987'de gözlenmiştir, T.A. Fulton ve G.J. Dolan ilk defa tek elektron transistoru yapmıştır. 1987'deki bu gelişmeyle transistorların boyutları yüz milyonda bir küçülme gösterdiği ortaya konmuştur [40].

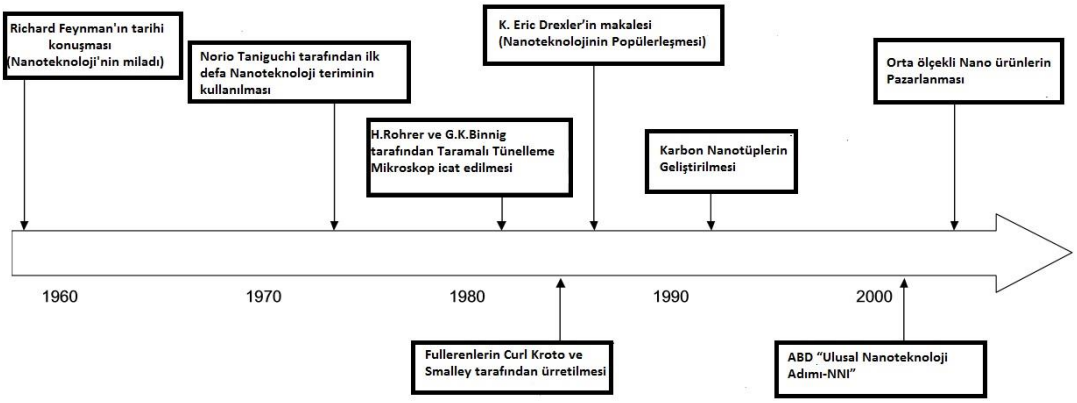
1991 yılında ise fullerenlerden silindirik karbon tüpler üretilmiştir [33]. Bu tüpler, hem elektronik hem de malzeme mühendisliği alanlarında geniş uygulama alanı bulması açısından önemlidir. Bir diğer önemli gelişme ise 1989'da IBM'in bünyesinde yer alan Don Eigler ve Erhard Schweizer 35 Xenon atomunu işleyerek IBM'in logosunu oluşturmuşlar ve Feynman'ın 30 yıl önce söylediklerini doğrulamışlardır [41].

Sonraki yıllarda da ise 1991'de Japon Lijima tarafından çok duvarlı karbon nanotüpleri keşfedilmiştir. 1993'te Lijima ve Bethune tek duvarlı karbon nanotüpleri keşfetmişlerdir. 1997'de N. Seeman ilk kez DNA molekülünü kullanarak nanomekanik aygıt yapmıştır ve aynı yıl içinde Rice Üniversitesinde (ABD) Nanoteknoloji laboratuarı kurulmuştur. M. Reed ve J.M. Tour tarafıdan 1999'da ilk defa tek organik molekül ile elektronik anahtar yapılmıştır. Ayrıca W. De Grado 1998 yılında ekibiyle beraber suni protein yapmayı başarmıştır [40]. 2001'de ZnO nanotel laseri yapılmıştır. 2002'de Süperörgü nanoteller yapılmıştır. Hareket ettirilebilen ilk dört tekerlekli nano araba modeli ise 2005'te yapılmıştır [40]. Bu gelişme Feyman'ın fikrinin ne kadar ilerletilebileceğini kanıtlamıştır (Şekil 2.2) [42].



Şekil 2.2 Altın yüzey üzerinde hareket edebilen nano arabaların görüntüsü

Nanoteknolojinin miladı olarak kabul edilen Feynman'ın konuşmasından günümüze önemli gelişmeler şekil 2.3'de özetlenmiştir. Son günlerde yaygınlaşan nano ürünler hayatımızın bir parçası olmaya başlamıştır.



Şekil 2.3 Tarihsel süreç içinde nanoteknoloji alanındaki önemli gelişmeler

2.1.2 Nanoteknolojinin Amaçları

Nanoteknoloji; tek tek atomların, moleküllerin veya molekül kümelerinin kendi kendine düzenlenmelerine olanak sağlayarak yeni veya oldukça farklı özellikteki malzeme ve yapıları üretmeyi amaçlamakta ve bu yapılan nano ölçekli sistemlerin ve yapıların günlük hayatın her evresinde kullanılabilirliğini hedeflemektedir.

2.1.3 Nanoteknolojinin Kullanım Alanları

Nanoteknolojinin kullanıldığı alanlarda daha hafif, daha dayanıklı, daha ekonomik yatırımlı, daha kolay üretilebilen malzeme ve sistemlerin üretimi hedeflenmektedir. Bu sistemlerin ve malzemelerin üretileceği alanları aşağıdaki başlıklar altında toplamak mümkündür [33]:

- Bilgisayar ve bilgi teknolojileri: Nano ölçekte elektronik devre elemanlarının üretilmesiyle bilgisayar mimari tasarımında yeni gelişmeler beklenmektedir. Söz konusu elemanların üretimi henüz birbirleriyle uyumlu çalışacak bir şekilde birleştirme işlemleri tam olarak bilinmemektedir. Daha az hacimde daha çok bilginin depolandığı günümüzde, nano ölçekte bilgi depolama elemanları ayrı bir önem kazanmaktadır. Nano ölçekte elektronik devre elemanları daha az enerji ile işlevlerini yerine getirebildiğinden nanoteknoloji ürünü bilgisayarların

günümüz teknolojisiyle üretilen bilgisayarlara kıyasla ebat olarak daha küçük, hız ve kapasite olarak çok daha büyük kullandığı, enerji bakımından çok daha ekonomik olacağı çok açıktır. Bu alandaki gelişmeler bilişim teknolojilerinin gelişmesini de sağlamış olacaktır [40].

- Otomotiv ve İnşaat: Asfalt ve beton yapıları (su deformasyonuna karşı) daha dayanıklı yapmak için nanomoleküler yapılar geliştirilmiştir. İnfrared ışıma ve zararlı UV ışınları önleyici ısıl ve UV direnci olan nano parçacıklar, ucuz ve hafif yapılar, özelliği geliştirilmiş kaplamalar sayesinde hem yapı hem de otomotiv sektöründe birçok soruna çözüm geliştirilmektedir. Ses ve ısı yalıtımı için nanometaryeller üretilmektedir. Kendi kendini temizleyen antimikrobiyal kaplamalar sayesinde yapıların, sadece inşa evresinde değil sonrasında da işlevselliğini artırmak mümkündür. Nanotekonoloji; otomotiv açısından güç aktarma organları, hafif yapı iskelesi, kirlilik algılama ve azaltma, sürüş dinamikleri, soğutma sistemleri ve birçok alanda olanaklar sunmaktadır [43]. İnşaat açısından ise düşük elektriksel direnç, kendini algılama yeteneği, kendi kendini temizleme, kendi kendini iyileştirme, yüksek süneklik ve çatlakların kendini kontrolü, üstün mekanik performans ve dayanıklılık gibi yeni özelliklere sahip çimentolu kompozitler gibi nano ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktır [44] [45].
- Tıp: Tıp ve sağlık bilimlerinde bir başka deyimle biyomedikal uygulamalarda nanoteknolojik yaklaşımlar, günümüze kadar çözüm bulunamamış pek çok hastalığın teşhis ve tedavisine önemli katkılar sağlamakta ve sağlamaya devam edeceği düşünülmektedir. Hastalarda şeker, kolesterol ve CO_2 miktarını anında belirleyen nanotüp nanoparçacık sensörler, karbon nanotüp esaslı nanosensörler, biyosensörler, hastalık tanısında kullanılan nanotel-nanoribon sensörler ve kuantum parçacıklar, nanosensör olarak manyetik nano parçacıklar, medikal imajı iyileştirecek nano parçacıklar, HIV ve kanser tanısında kullanılan antibody-dendrimer konjugatlar, otomatik tanı sistemleri, nanolitre sistemler (yonga üzerinde laboratuvar), ilaç taşıma sistemleri gibi yeni uygulamalar sağlık sektöründe yerini almıştır [33].
- Çevre ve Enerji Teknolojileri: Nanoteknoloji sayesinde; karbon nanotüp ve diğer hafif malzemeler kullanarak hazırlanan hidrojen depolama sistemleri, kuantum

noktacıklardan hazırlanmış fotovoltaik hücreler üretilmesi, güneş panelleri için karbon nanotüp esaslı kompozit filmlerin geliştirilmesi ve hidrojen üretiminde nano katalizörlerin yapılması suretiyle yenilenebilir enerji için büyük katkılar sağlanmaktadır. İlaveten protein-polimer hibrit biyoesinli membranlar, nano gözenekli zeolitler, nano gözenekli polimerler, TiO_2 nano parçacıklar, manyetik nano parçacıklar, patojen bakterilerin ve kontaminasyonların belirlenmesi için sensörler, zehirli maddelerin uzaklaştırılması ve tuzsuzlaştırmak için nanomembranlar geliştirilmesi sayesinde içme suyu temizliği ve su saflaştırılması gerçekleştirilmektedir. Ayrıca TiO_2 nano parçacık esaslı fotokatalitik parçacıklar ile hava kirliliği yapan organik bileşenler temizlenebilmektedir. Araçlarda kullanılan katalitik konvektörlerin daha hafif, daha ucuz ve daha aktif nano katalizör ile hazırlanması, toksik malzemelerin ve kaçakların nanosensörler ile tanınması, nanoaygıtlar ile gaz separasyonu nanaoteknolojinin çevre ve enerji için diğer katkıları olarak sıralanabilir [33].

- Gıda Teknolojileri: Nano kompozit uygulamaları ile gıda paketlemesinde kullanılan film ve kaplama malzemelerinin geliştirilmesi, gıda ekipmanları, paketleri ya da gıdalarda antimikrobiyal emülsiyonlarla dekontaminasyonun önüne geçilmesi, patojen tanısı için nanoteknoloji esaslı antijen tanısı yapan biyosensörler geliştirilmesi gibi nanoteknolojik ilerlemeler sayesinde gıda yollu hastalıkların önüne geçilmektedir [33].

2.1.4 Nanoteknolojinin Yaraları ve Avantajları

Nanoteknoloji, bilim ve mühendisliği aynı platforma taşıyan ve üreticiliği tetikleyen bir bilim dalıdır; bu açıdan endüstri, tıp ve ekonomide sınırsız etkilere sahiptir. Gelişimi lineer olmayan oranlarla hızlanan bir yolda ilerlemektedir.

Yaşamın ve insan yapımı sistemlerin temeline ulaşma olanağı sayesinde güçlü araçların elde edilebilmesini sağlar. Evrenselliği sayesinde tüm dünyada piyasa ve çevresel sorunlarına çözüm sunmaktadır. Nanoteknoloji ile yapılan üretim ucuz ve temiz olmakla birlikte elde edilen ürünlerin finansal karşılığı ve yatırım maliyeti oldukça yüksektir [46]. Nano ürünler çok küçük boyutlarından ötürü benzersiz etkileşimlere neden olabilirler:

- Madde içerisindeki elektronların dalgalanma özellikleri nanometrik ölçekte değişmelerden etkilenir.
- Nanometrik boyutlarda maddenin kimyasal bileşimi değiştirmeksizin; erime sıcaklığı, mıknatıslanma, şarj kapasitesi vb. temel özelliklerini değiştirmek mümkündür.
- Nano ölçekli bileşenler çok yüksek yüzey alanına sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde kompozit malzemeler, çekirdek reaktörleri, ilaç dağıtımı ve enerji depolamada kullanmak için ideal bir alternatif sunmaktadır.
- Nano ölçekte, yüzey gerilimi ve lokal elektromanyetik etkiler nano yapılı malzemeleri daha sert ve daha az kırılgan yapma bakımından önemli bir yere sahiptir [47].

2.1.5 Nanoteknolojinin İlaç Taşınımdaki Yeri

İlaç taşınımı, ilaç etkin maddelerinin klinik yarar sağlamak üzere in-vivo olarak doğru zamanda doğru yerde olmalarını sağlayacak kimyasal ve biyolojik prensiplerin birlikte uygulanması olarak tanımlanabilir. İdeal bir ilaç taşıyıcı sistem, iki önemli özelliğe sahip olmalıdır;

- Hedef organ ya da dokuya ilacı etkin bir şekilde taşıyabilmek
- Etken madde salımını kontrol edebilmek [48] [49].

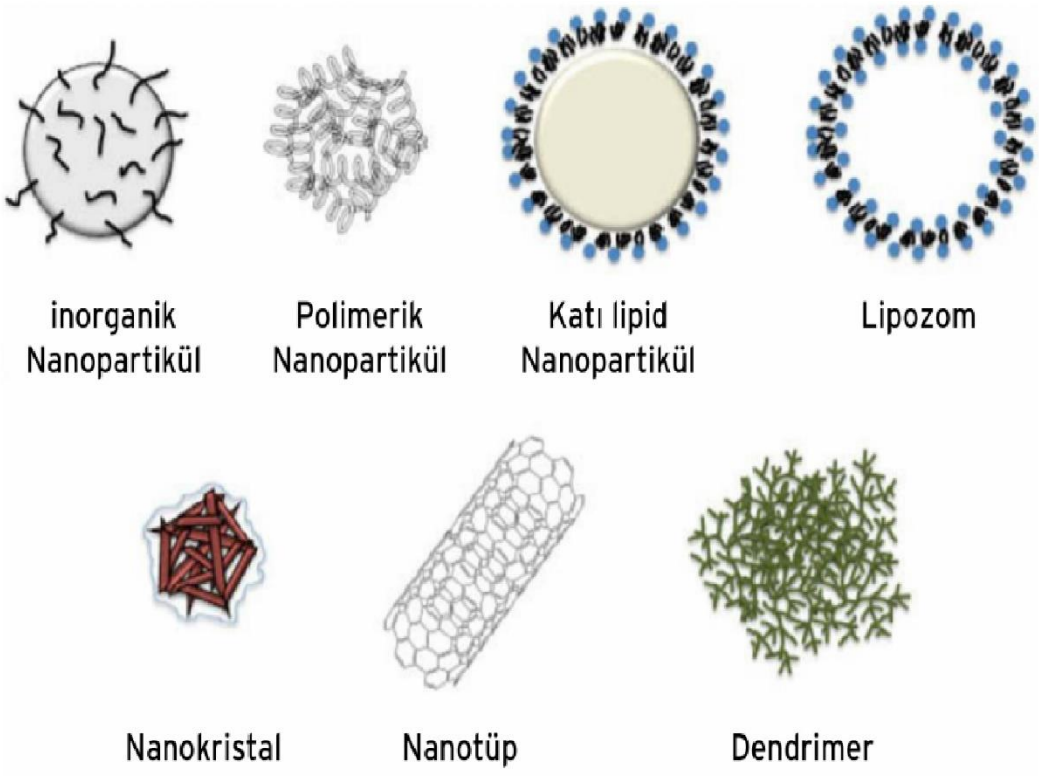
Nanoteknolojinin uygulamalarından ilaç taşıyıcı partiküler sistemler; etkinliğin artırılması, toksisitenin azaltılması, biyodağılımın kontrol edilebilmesi, hücre içi penetrasyonu arttırması, kontrollü ve uzatılmış salım sağlaması gibi avantajları sayesinde bu iki özelliği tam anlamıyla bünyesinde bulundurmaktadır. Bu yüzden partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı birçok hastalığın tedavisinde kayda değer çözüm yolları sunmaktadır [50].

2.2 İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemlerin birçoğunda, ilaç konsantrasyonunun süresi ve konformasyonel lokalizasyonu organ fizyolojisi ve metabolizması tarafından kısıtlanmakta bundan dolayı tedavi süresince belirli periyotlarla ilacın yeniden verilmesi gerekmektedir. Bir ilacın lokalizasyonu enjeksiyonla kontrol edilmesine rağmen, bunun da uygulandığı bölgeyle

ilgili mekânsal kısıtları ve enjeksiyon sonrası kısa süreli aktivite göstermesi olumsuz yönleridir. Kontrollü ilaç taşıma sistemleri terapötik ajanların hem mekânsal lokalizasyonu hem de zaman sorunları için alternatif bir yaklaşım sunmaktadır.

Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar, nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Temel olarak tümüne nanopartiküller sistemler denilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerde aktif ajan diğer bileşenlerle (genellikle polimerik) bir araya gelerek taşınım sistemini oluşturmaktadırlar. Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler arasında dendrimerler, polimerik lipozomlar, nanojeller ve nanopartiküller yer almaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan nanomateryaller [51]

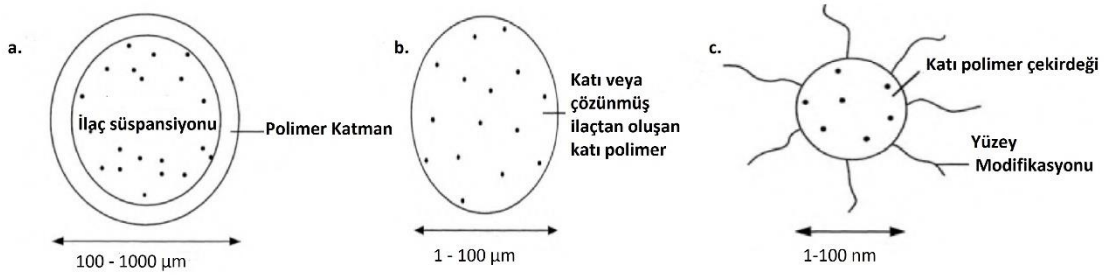
İlaç taşıyıcı sistemler çeşitli başlıklar altında toplanabilmektedir:

- Rezervuar ve deriye nüfuz eden sistemler,
- Matris salınım sistemleri,
- Hidrojel salınım sistemleri,
- Parçalanabilir taşıyıcı sistemler,

- Partiküler taşıyıcı sistemler,
- Duyarlı taşıyıcı sistemler [49].

2.2.1 Polimerik Partiküller İlaç Taşıyıcı Sistemler

Polimerler özellikle son yıllarda nanoteknolojik ilaç formülasyonlarının geliştirilmesinde ve biyomühendislik gibi medikal uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Kontrollü salım sağlayan dozaj şekilleri tasarlanması sırasında polimerlerin seçiminde; kullanılış yolu, etkin maddenin cinsi, dozu ve salım süresi dikkate alınır. Küçük boyutları sebebiyle polimerik partiküler sistemler istenen dokuya veya kan dolaşımına kolaylıkla enjekte edilebilirler. Polimerik partiküler sistemler cerrahi işlem gerekmeden enjeksiyonla kolayca implante edilebilmeleri sebebiyle büyük avantaja sahiptir. Mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller; partiküler ilaç taşıyıcı sistemler sınıfında yer alırlar (Şekil 2.5) [49]. Bu çalışmada ise partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden nanopartiküller seçilmiştir.



Şekil 2.5 Polimerik partiküler ilaç taşıyıcılar

2.2.1.2 Polimerik Nanopartiküller

Nanopartiküller 1-100 nm boyutlarında olan kolloidal yapılardır. Nanopartiküllerin tasarımında biyoparçalanabilir doğal ve sentetik polimerler, lipitler, fosfolipitler hatta metaller kullanılmaktadır. Makromoleküllerin nano boyutta çeşitli fonksiyonlar kazanabilmelerinden kaynaklı nanopartiküller, bu sahip olduğu foksiyonel özelliklerden dolayı yaygın kullanım alanına sahiptir. Üretimlerinde genellikle polimerik yapılar kullanılmaktadır. Üretim sırasında hafif, ucuz, akıllı ve temiz malzemeler elde etmek amaçlanmaktadır.

Kullanılan polimer tipi ve polimerin spesifik özellikleri, üretilen nanopartikülün çeşitli özellikler (biyobozunur, biyouyumlu, termal vb.) kazanmasını sağlar. Polimer bazlı nanopartiküllerin düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisiteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması ve dokulara etkin madde hedeflenebilmesi, kontrollü etkin madde salımı önemli avantajları arasındadır. Yüzey alanı/ hacim oranının mikropartiküllere göre çok yüksek olması hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda daha çok tercih edilmesini sağlamaktadır. Partiküllerden etkin madde salımı; difüzyon, polimer erozyonu, polimer hidrolizi veya iyon değiştirme mekanizmaları ile gerçekleşir. Bu mekanizmaların biri veya birkaçı birlikte görülebilir.

2.3 Nanopartikül Üretimi

2.3.1 Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Polimerler

Kontrollü taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan polimerler;

- doğal-biyolojik olarak parçalanabilir,
- sentetik-biyolojik olarak parçalanabilir ve
- sentetik-biyolojik olarak parçalanabilir olmayan

şeklinde doğal ve sentetik kaynaklı olmak üzere başlıca üç gruba ayrılır (Çizelge 2.1.)[52].

Çizelge 2.1 Kontrollü taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerlerin sınıflandırılması

Polimer	Polimer Sınıfı	Örnekler
Doğal-biyolojik olarak parçalanabilir	Proteinler	Albümin
	Polisakkaritler	Selüloz Kondroitin sülfat Nişasta
Sentetik-biyolojik olarak parçalanabilir	Poliesterler	Poli(laktik asit)
		Poli(laktik-ko-glikolik asit)
	Polianhidrinler	Poli [bis (p-karboksifenoksi) propan ko-sebasik asit] Poli (yağ asidi dimeri-ko-sebasik asit)
	Poli (orto esterler)	
Sentetik-biyolojik olarak parçalanabilir olmayan	Silikon elastomerler	
	Poli (etilen-ko-vinil asetat)	
	Poliakrilatlar	Poli izobütil siyanakrilat Poli izoheksil Siyanoakrialat Poli (metil metakrilat

Vücuttan atılımının zor olmasından dolayı biyolojik olarak parçalanabilir olmayan polimerler, parçalanabilir olanlara kıyasla kontrollü taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasında tercih edilmemektedir [53].

Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Komplikasyon ve enfeksiyon riski taşıyan, ayrıca ek maliyet gerektiren bir cerrahi işlemle çıkarılmaları gerekmez.
- İnert ve biyolojik olarak uyumlu moleküllere parçalanırlar.
- Hasta için daha uygun ve basit sistemlerdir [53].

Bu çalışmada sentetik-biyolojik olarak parçalanabilir olan Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimeri tercih edilmiştir.

2.3.1.1 PLGA

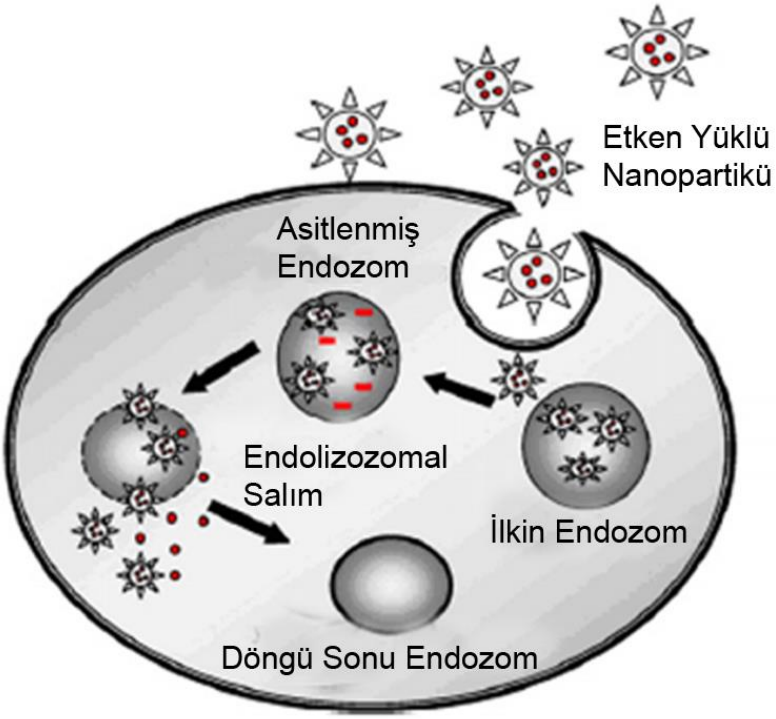
Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde en yaygın kullanılan biyobozunur polimerler; Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimeri olan Poli(laktik-ko-glikolik asit)-PLGA'dır. Bunlardan PLGA:

i. Biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu ,
ii. FDA tarafından onaylanmış olması,
iii. Fizyolojik ortamda inert olması,
iv. Çeşitli ilaç tiplerine (hidrofilik, hidrofobik) uyumlu iyi bilinen üretim yöntemlerine sahip olması,
v. Kontrollü salım gerçekleştirmesi,
vi. Sürdürülebilir salıma sahip olması,
vii. İstenmeyen vücut hücrelerince tutunmalarının engellenmesini ve hedef hücre tutulum özelliklerinin artırılmasını sağlayan yüzey modifikasyonlarına olanak vermesi,
viii. Hücreye veya organa özgü nanopartikül üretiminin yapılabilmesi,

özelliklerinden dolayı en çok tercih edilenidir [54].

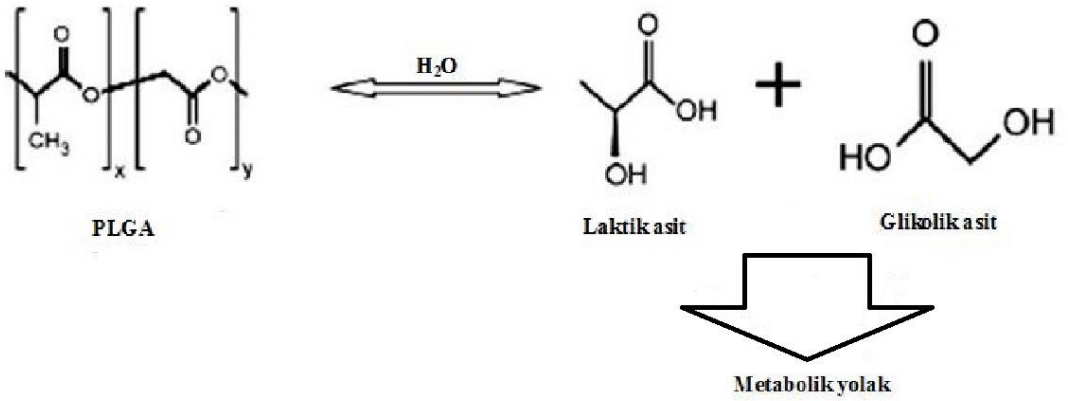
PLGA tabanlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler biyomedikal uygulamalar arasında aşı, kanser, enfeksiyonal hastalıklar gibi birçok alanda kullanılmaktadır [54]. PLGA D, L-laktik ve glikolik asidin kopolimerizasyonu ile hazırlanır. PLGA yapısındaki ester bağlarının hidrolizi sonucu laktik asit ve glikolik asit son ürünlerini oluşturacak şekilde bozunmaktadır. Bu iki monomer iç yıkımsal süreçte kreps çemberine girererek kolayca metabolize oldukları için minimal sistemik toksisitiye sebep olmaktadır. Bu durum bozunma sonrası insan vücudundan atımını inert bir şekilde gerçekleştirmesini sağlar [55]. PLGA'nın bozunma süresi molekül ağırlığına ve kopolimer oranına (polimerlerin yüzdeliklerine) bağlı olarak birkaç yıl veya birkaç ay zaman dilimleri arasında değişkenlik göstermektedir [56]. PLGA'lar genellikle kopolimer oranlarından tanımlanır. Örneğin, PLGA 50:50 olarak tanımlanan bir polimer birleşimi, % 50 laktik asit ve % 50 glikolik asit kopolimerinden oluşmaktadır. PLGA'yı oluşturan kopolimerlerden hidrofilik yapıda olan PGA 2-4 hafta arasında bozunurken, metil gruplarını barındıran hidrofobik yapıdaki PLA ise hidrofiliteyi azaltarak PLGA'nın daha yavaş bozunmasına neden olmaktadır [57].

PLGA nanopartikülleri pinositoz veya kaltrin aracılı endositoz yoluyla kısmen sıvı içeriği ile hücre içerisine alınır. Hızla endolizozomlardan kaçan PLGA nanopartikülleri 10 dakikalık bir dilimde sitoplazmada serbestlenirler. Nanopartikül ile vezikül membranının etkileşimi sonucu vezikül membranında geçici ve bölgesel istikrarsızlıklar oluşur. Bu durum nanopratiküllerin sitozole kaçışıyla sonlanmaktadır (Şekil 2.6) [58].



Şekil 2.6 PLGA nanopartikülünün hücre içine alımının şematik gösterimi

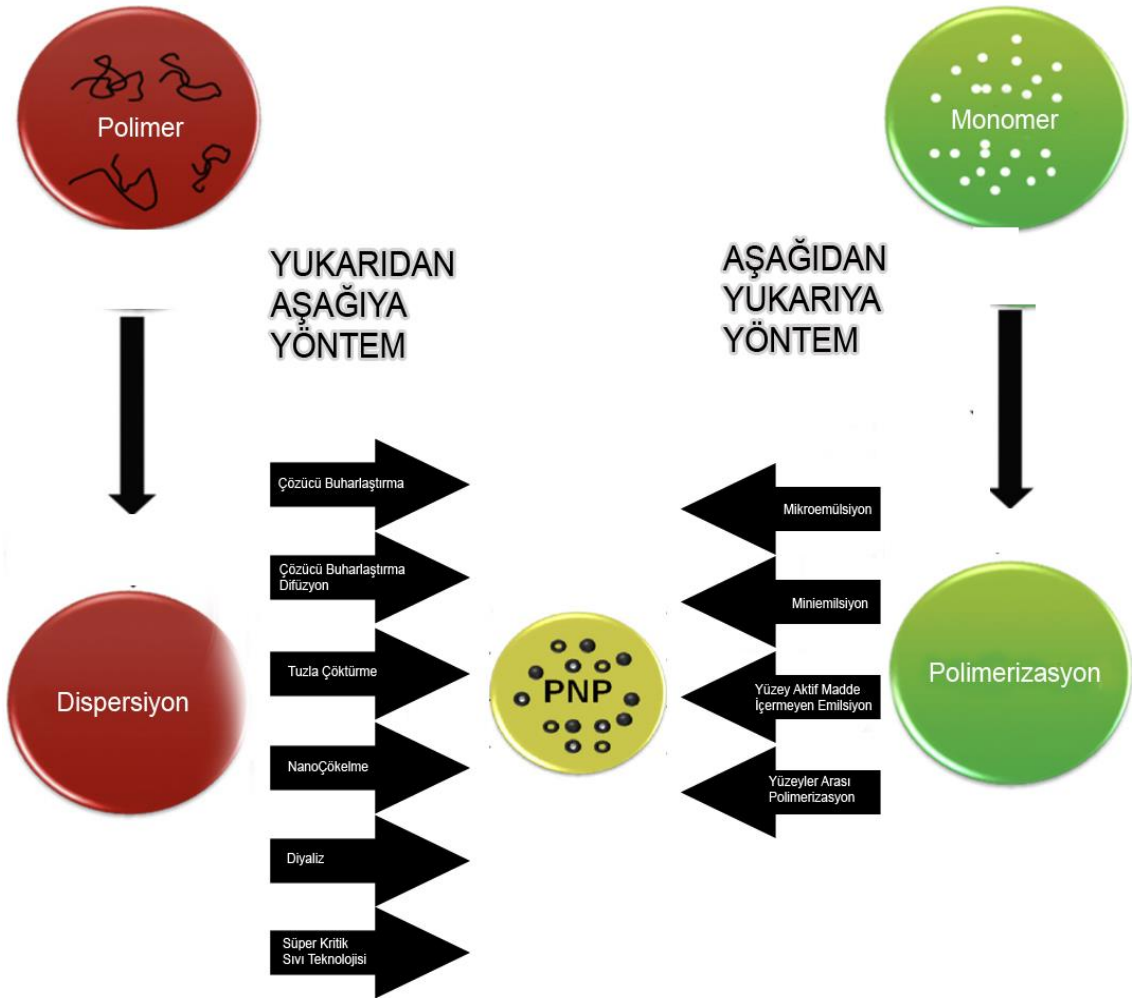
Sitozolde serbest kalan PLGA nanopartikülleri salınımını gerçekleştirmesi ve bozunma süresinin sonunda glikolik asit ve laktik asit monomerlerine ayrışmakta ve sitrik asit döngüsüne girmektedir. Son ürün olarak CO_2 ve H_2O'ya dönüşen glikolik asit ise böbrekler tarafından vücuttan uzaklaştırılmaktadır (Şekil 2.7) [59].



Şekil 2.7 PLGA'nın hidrolizi

2.3.2 Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Polimerik nanopartiküller (PNP), yukarıdan aşağıya polimerlerin parçalanıp şekillenmesiyle ya da aşağıdan yukarıya direkt olarak monomerlerden polimerizasyon yöntemi ile polimerler elde edilmesiyle hazırlanabilir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı ile nanopartikül üretimi: çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme, nanoçökelme, diyaliz ve süperkritik sıvı teknolojisi gibi yöntemsel yaklaşımlar ile yapılmaktadır. Diğer bir yandan aşağıdan yukarı yaklaşımı ile nanopartikül üretimi, mikroemülsiyon, miniemülsiyon, dispersiyon ajanı içermeyen emülsiyon ve yüzeyler arası polimerizasyon yöntemleri gibi birçok polimerizasyon yöntemleri kullanılarak direkt olarak monomerlerin polimerizasyonuyla sentezlenebilmektedir (Şekil 2.8) [60], [61], [62].



Şekil 2.8 Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya nanopartikül üretim yöntemleri

2.3.2.1 Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımı ile Nanopartikül Üretimi

Yukarıdan aşağıya yöntemi; tam olarak karakterize edilmiş, önceden sentezlenmiş polimerlerin veya doğal polimerlerin dispersiyonuyla üretim yöntemidir.

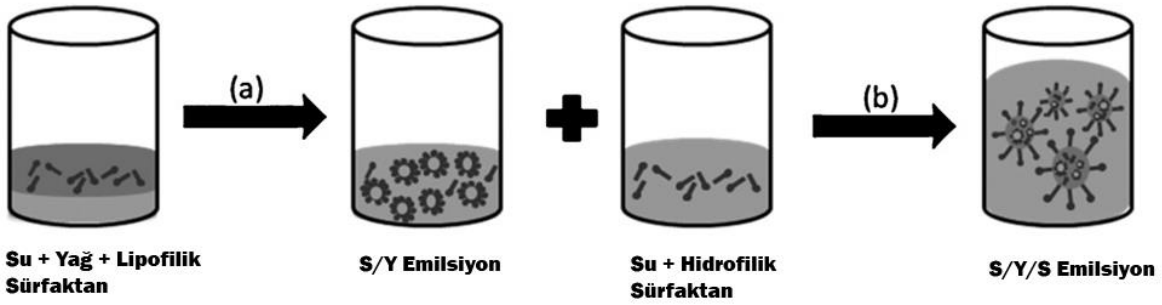
2.3.2.1.1 Çözücü Buharlaştırma

Çözücü buharlaştırma, önceden oluşturulmuş bir polimerden polimerik nanopartikül hazırlamak için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntem, su ile karışmayan diklorometan, kloroform gibi klorlu bir çözücü içerisinde polimerin çözülmesi ve sonrasında sürfaktan (yüzey aktif madde) içeren sulu fazda emülsüfiye edilmesidir. Sürfaktan iç fazdaki damlacıkların stabilitesi ve agrege olmasının engellenmesi işlevi görmektedir. Sulu fazda jelatin, poli-vinil alkol (PVA), polisorbat, poloksamer gibi sürfaktanları kullanılır. Sürfaktanlar amfifilik özellikte olduğundan iki faz arasındaki yüzeyler arası serbest

enerjiyi düşürerek stabiliteyi destekler. Ayrıca, damlacık yüzeyinde bir yük ya da sterik engel oluşturulması sonucu, birleşme ve topaklaşma önlenmektedir.

Emülsifikasyon süreci mekanik karıştırma, sonikasyon ya da yüksek basınçlı homojenizasyonla gerçekleştirilir. Sonrasında ise oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda ya da düşük basınç altında çözücünün buharlaştırılması ile gerçekleştirilir. Sertleşen nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanır ve distile su ile bir kaç kez yıkanarak dispersiyon ajanı gibi katkı maddelerinin uzaklaşması sağlanır. Son olarak örnek liyofilize edilir.

Literatürde, polimerik nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan en yaygın yöntem çözücü buharlaştırma tekniğidir. Etken maddenin hidrofilik ya da hidrofobik oluşuna göre emülsiyon oluşması için iki ana strateji izlenmektedir: Tek emülsiyon hazırlama [yağ içinde su fazı (s/y) veya su içinde yağ fazı (y/s)] ya da çift emülsiyon hazırlama [s/y/s emülsiyonu]. Çift emülsiyon genellikle suda çözünen ilaçların hapsedilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Genellikle polimer organik sürfaktan içinde çözünerek yağ fazını oluştururken, su fazında da stabilizatör bulunmaktadır (Şekil 2.9) [60], [61], [62].



Şekil 2.9 S/Y/S çift emülsiyon hazırlanması

2.3.2.1.2 Çözücü Buharlaştırma-Difüzyon

Bu yöntem, çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Bu yöntem PVA veya jelatin gibi sürfaktan bir madde içeren su fazının, su ile kısmen karışabilen benzil alkol ve etil asetat gibi organik bir çözücü içinde çözünmüş halde bulunan polimer çözeltisine eklenmesi ve ilk etapta yağ içinde su tipi bir emülsiyonun oluşturulması esasına dayanmaktadır. Organik çözücü kısmen su ile karıştığından bir miktar daha su ilavesi ile organik çözücünün tamamen su faza difüze olması sağlanmakta ve polimer nanopartiküller halinde çökmektedir. Bu yöntemin; genellikle

%70 üstü yüksek enkapsülasyon etkinliği, homojenizasyona gerek duyulmaması, yüksek oranlarda ve tekrar edilebilir üretimi, ölçek büyütme kolaylığı, dar boyut dağılımı gibi avantajları vardır [60], [61], [62].

2.3.2.1.3 Tuzla Çöktürme

Tuzla çöktürme yöntemi emülsifikasyon/çözücü difüzyon yönteminin modifiye halidir. Emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde yer alan toksik çözücü bu yöntemde kullanılmamaktadır ve bu durum yöntemin en önemli avantajlarından biridir. Sulu polimer çözeltisine tuz ekleme ile polimerin çözeltiden ayrılıp başka bir faz oluşması esasına dayanan bir yöntemdir. Dezavantajı ise son üründe ilaç salımında yan etki oluşturabilecek yüksek oranda tuzun bulunmasıdır.

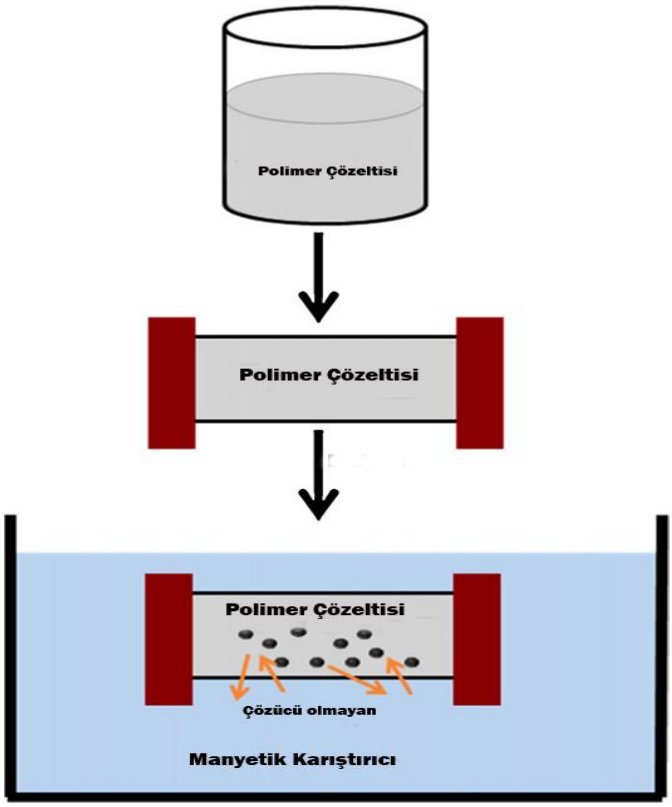
Organik faz, polimer ve etkin maddenin aseton gibi bir çözücüde çözünmesiyle elde edilmektedir. Sonrasında tuzla çökeltme ajanı (magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi elektrolitler) içeren polivinilpiroldon gibi koloidal stabilizatörler, sulu jel çözeltisi içerisinde emülsifiye edilirler. Kullanılan elektrolit madde ile doygun halde bulunan sulu çözelti asetonun su fazına difüzyonunu engellemektedir. Oluşan yağ/su emülsiyonu çözücünün difüzyonu için yeterli hacime kadar seyreltilir ve difüzyon sonucu nanopartiküller elde edilmektedir [60], [61], [62].

2.3.2.1.4 Nanoçökelme

Bu yöntemde temel prensip, aseton gibi suyla karışabilen bir organik faz içinde çözünen polimerik materyalin, PVA gibi sürfaktan bir madde içeren su fazına manyetik karıştırma altında ilave edilmesi ile nanokürelerin kendiliğinden çökmesidir. Nanoçöktürme yöntemi üç temel bileşenden oluşur; polimer (sentetik, yarı-sentetik veya doğal), polimer çözücüsü, polimerin çözünmediği bir çözücü. Organik çözücüler (örneğin etanol, aseton, hekzan, diklorometan) su ile karışabilir ve kolaylıkla buharlaşabilen özellikte olanlar seçilir. Bu yüzden aseton bu yöntem için en çok kullanılan polimer çözücüsüdür. Bazen aseton ve az miktarda su, aseton ile etanol ve metanol gibi ikili çözücü karışımları kullanılmaktadır [60], [61], [62].

2.3.2.1.5 Diyaliz

Diyaliz yönteminin temeli, polimerin organik bir çözücüde çözünmesi ve uygun molekül ağırlığına göre diyaliz yapan diyaliz tüpü içerisine yerleştirilerek çözücünün diyalizine dayanmaktadır. Diyaliz sonucu yer değiştirmesine bağlı olarak polimer çözünürlüğü kaybetmekte ve polimerin kademeli kümeleşmesi meydana gelmekte ve böylece homojen nanopartikül süspansiyonu elde edilmektedir (Şekil 2.10). Bu yöntem küçük ve dar dağılımlı nanopartiküllerin oluşturulmasında kullanılan basit ve etkili bir yöntemdir [60], [61], [62].



Şekil 2.10 Diyaliz yöntemi

2.3.2.1.6 Süperkritik Sıvı Teknolojisi (SST)

Süperkritik sıvılar genel olarak süperkritik sıcaklığı üzerinde, basıncın değişmesine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanırlar. Bu yöntem süper kritik sıvı kullanılarak nanopartikül üretimi temel prensibiyle geliştirilmiştir. Kullanılan çözücülerin toksik özellikte olmayıp, bu yöntemde partiküllerin yüksek saflıkta ve herhangi bir organik çözücü kalıntısı olmadan üretilmesine olanak vermesi bu

yöntemin başlıca avantajlarındandır. Genel olarak süperkritik sıvılarla en çok gerçekleştirilen üretim yöntemleri süperkritik anti-solvent (SAS) ve kritik sıvının hızla genişletilmesidir (RESS). Kritik olduğu durumlara (Tc=31,1 ˚C, Pc=73.8 bar) uyumlu olması, toksik olmaması, yanıcı olmaması ve ucuz olması özelliklerinden dolayı CO_2 en yaygın kullanılan süperkritik sıvıdır [60], [61], [62].

2.3.2.1.5.1 Süperkritik Antisolvent (SAS)

SAS yönteminde süperkritik sıvı ile tamamen karışabilen (örneğin metanol) bir sıvınının içinde süpekritik sıvıda çözünmeyen solut ile tamamen mikronize edilir. Çözücünün süpekritik sıvı içinde ekstrakte edilmesi solutun aniden çökmesine, sonuç olarak da nanopartikülün oluşmasına sebep olur [60], [61], [62].

2.3.2.1.5.2 Sıvı Çözücü İçinde Süperkritik Sıvının Hızla Genişletilmesi (RESS)

RESS yönteminde temel prensip, çözelti oluşturmak için çözünen madde süperkritik sıvıda çözünür enjektör karşısında hızla büyüyüp genişlemesine dayanmaktadır. Yüksek derecede aşırı doygunluk, hızlıca basıncın azalması ile birlikte, süperkritik sıvıların çözücü gücü birden azalır ve solut çökmesi sonucu iyi dağılmış partikül oluşumu gerçekleşmektedir. Yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerin süper kritik sıvıda çözünmeleri sınırlıdır. Yüksek molekül ağırlığına sahip polimerlerin kullanılamaması bu yöntemin dezavantajıdır [60], [61], [62].

2.3.2.2 Aşağıdan Yukarı Yaklaşımı ile Nanopartikül Üretimi

2.3.2.2.1 Mikroemülsiyon

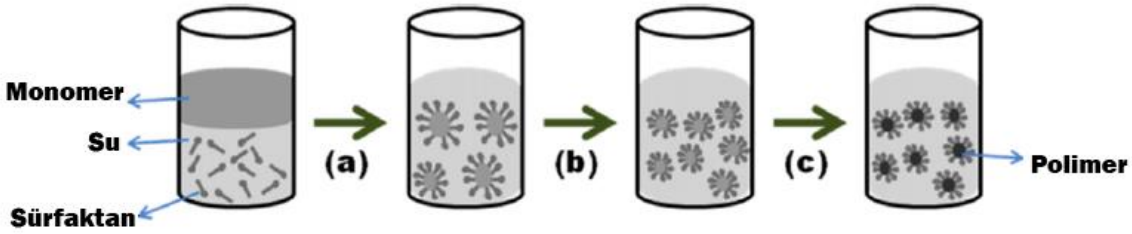
Mikroemülsiyonlar ara yüzeyleri film veya yüzey aktiflerle sabitlenmiş nano ölçekte damlacıklar halinde birbiri içinde karışmış sıvılardır. Mikro ölçekte heterojen bir yapıya sahip olmalarına rağmen makro ölçekte homojen görünümlüdürler. Mikroemülsiyon tekniği nanopartiküller S/Y veya Y/S emülsiyonları şeklinde hazırlanır ve yüzey etkin veya polimerik bir film ile stabilize edilmesi prensibine dayanmaktadır [60], [61], [62].

2.3.2.2.2 Miniemülsiyon

Miniemülsiyon polimerizasyon süreci dengeli bir emülsiyon ya da 50-500 nm boyutlarındaki nano damlacıkların stabilize dispersiyonuna dayanmaktadır. Başlatıcı ve

çözücü içeren bir organik faz, su ve yüzey aktif madde ihtiva eden bir sulu faz (sürfaktan), sabit karıştırma altında karıştırılır. Bu olgu emülsiyonu artırmaya yaramaktadır.

Nanodamlacık halinde damlacıkları parçalamak için kullanılan geleneksel emülsiyon yöntemi için gereken enerji bir mekanik parçalayıcı yardımıyla yapılmaktadır. Genellikle bu parçalayıcı bir sonikatör olmaktadır. Mekanik parçalanma boyunca damlacık monomerler hızlı bir şekilde kararsız bir boyutlarda dalgalanır ve sonunda minimale ulaşarak nanopartikül boyutlarında bir denge durumuna ulaşmaktadır (Şekil 2.11) [60], [61], [62].



Şekil 2.11 Miniemülsiyon yöntemi

2.3.2.2.3 Yüzey Aktif Madde İçermeyen Emülsiyon

Sürfaktanların (yüzey aktif madde) ortadan kaldırılması hem uzun zaman almakta hem de maliyetli olmaktadır. Ayrıca yüzey aktif madde içeren süreçler enerji ve çevre açısından ciddi endişeleri barındırmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon yöntemi geliştirilmiştir. Sistem içeriği suda çözünebilen bir başlatıcı, monomerler ve deiyonize sudan oluşmaktadır. Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyon mekanizması su içinde monomer çözünürlüğüne bağlıdır. Polimerik nanopartiküller iyonik ko-monomerler veya iyonize başlatıcılar kullanılarak stabilize edilmektedir [60], [61], [62].

2.3.2.2.4 Yüzeyler Arası Polimerizasyon

Yüzeyler arası polimerizasyon, polimerik nanopartiküller üretmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. İki reaktif madde ya da monomerler karışmayan iki sıvı içerisinde disperse

edilir. Reaksiyon karışmayan fazın ara yüzeyinde gerçekleşmektedir. Nanopartiküller anında sulu fazda dağılır ve bu şekilde nanopartikül üretimi gerçekleşir [60], [61], [62].

2.4 Allelopati ve Allelokimyasallar

Bir bitki tarafından sentezlenen ve salınan kimyasalların başka bir bitki üzerine etkisine allelopati denilmektedir. Bu tanıma günümüzde genişletilerek mikroorganizmalar ve böcekler de dâhil edilmiştir. Bir diğer tanıma göre ise yaşayan organizmanın ürettiği ve çevreye saldığı biyoaktif moleküllerin yine aynı türe veya farklı bir türe gelişme ve büyüme sürecindeki direkt veya indirekt etkileri bütününe verilen biyolojik olgudur [63]. Salınan bu maddelere allelokimyasal denir. Bir allelokimyasal bitki türüne göre olumlu veya olumsuz etki gösterebilir. Genel olarak allelokimyasallar olumsuz etki göstermektedir. Bu durum allelopati rekabet ile karıştırılmasına sebep vermektedir. Rekabet, iki veya daha fazla organizmanın doğadaki sınırlı kaynağın paylaşımını esas alır ve organizmlar arasında büyüme faktörleri için bir yarışma söz konusudur. Allelopatide ise organizma sadece çevreye gelişim engelleyici madde salar. Stresin neden olduğu bir rekabet sonucunda bir organizma toksik allelopatik maddelerin üretimini artırabilir ve etki ettikleri diğer organzimaları çevre şartlarına duyarlı hale getirebilir. Bu durumda allelopati ile gelişimi engellenen bitkinin rekabet kabiliyeti azaltılmış olur [64].

Allelokimyasallar genellikle bitkinin yaprak ve köklerinde çoğunlukla yer almakla beraber hemen hemen her dokusunda bulunabilmektedir. Bu kimyasallar bitkilerden suyla temas, buharlaşma, köklerden salım, bitki artıkları şekilde bulundukları çevreye salınmaktadır. Allelokimyasallar hücre çeperinin yapısını bozarak ve hücre bölünmesini engelleyerek; solunum, fotosentez, membran geçirgenliği, protein sentezi, tohum çimlenmesi gibi birçok olaya sebep olurlar [63].

Allelokimyasallar çoğunlukla primer yolakların yan ürünleri olan sekonder metabolitlerdir. Bunlar farklı yapı ve özelliklerine göre genellikle 10 başlık altında sınıflandırılırlar:

1. Suda Çözünebilir Organik Asitler, Düz Zincirli Alkoller, Alifatik Aldehit, Alifatik Ketonlar
2. Basit Doymamış Laktonlar

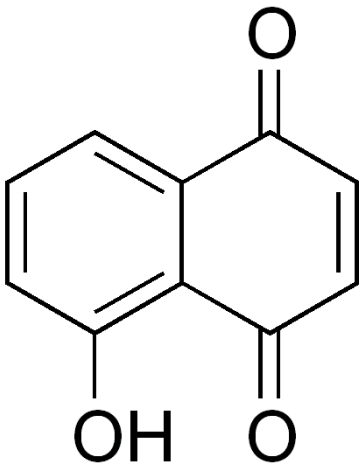
3. Uzun Zincirli Yağ Asitleri, Poliasetilenler
4. Kinonlar (Benzokinon, Antrokinon ve Kompleks Kinonlar)
5. Fenolikler
6. Sinnamik Asit ve Türevleri
7. Kumarinler
8. Flavonoidler
9. Taninler
10. Steroidler ve Terpenoidler (Seskiterpen Laktonlar, Diterpenler ve Triterpenoidler) [65].

Listede yer alan kinonlar, halkalı konjüge endionlardır. Doğada yaygın olarak bulunurlar ve yüksek reaktif özellik gösterirler. Bu bileşikler, meyve ve sebzeler kesildiği zaman meydana gelen kararma reaksiyonundan sorumludurlar. Bitkilerde kinon yapısında pek çok doğal boyar madde bulunmaktadır [66].

Enkapsülasyonu gerçekleştirilen juglon kinonlar içerisinde yer almaktadır. Juglon, kinonların alt grubu olan naftakinonlar arasındadır.

2.5 Juglon ve Ceviz Ağacı

Ceviz içerdiği juglon bileşeni nedeniyle allelopatik bir bitkidir. Cevize sarı rengi veren de juglondur [67]. Ceviz ağacının toksik etkisi 2000 yıldır bilinmektedir [68]. Dibinde ekilen yonca otlarının yağmurdan sonra kısa sürede öldüğü, yapraklarından damlamasıyla toplanan yağmur sularıyla sulanan saksı domateslerinin öldüğü, cevize yakın yetişen elma ağaçlarının cevizden taraftaki kök ve yapraklarında kuruma olduğu yıllar içerisinde gözlenmiştir [69]. Adlandırılması 5-Hidroksi-1, 4-naftakinon olarak yapılan juglon, $C_{10}H_6O_3$ moleküler formülüne sahiptir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Juglonun yapısal formülü

Literatürde juglon ile ilgili yapılan çalışmalar;

- Cevizin toksik etkisine ait bilinen ilk yayın 1881 yılında "Toxic action of black walnut" (Siyah Cevizde Toksidite) adlı makaledir [70].
- Juglonun sentezi ve karakterizasyonu ise 1887'de gerçekleştirilmiştir [71].
- 1925 yılında ceviz kabuğunun domates bitkileri üzerine zehirli etkisi olduğu bildirilmiştir [72].
- 1927 - Cevize yakın elma ağaçlarının öldüğü açıklanmıştır [73].
- 1928 yılında cevizin toksik etkisinin juglondan kaynaklı olduğu aydınlatılmıştır. Yapılan çalışmada yonca ve domates bitkisine enjekte edilen juglonun yüksek toksisite etkisi bildirilmiştir [74].
- 1941'de domates, yonca ve elma ile yapılan üç yıllık ceviz ağacı saha çalışmasında juglonun hiçbir toksisite göstermediği bildirildi [75].
- 1950 – USDA "Test Clears Walnut Reputation" adı altında basın açıklaması yayınlanmıştır. Açıklamada juglonun domates üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığı öne sürülmüştür.
- 1951 yılına kadar 12 yıllık süren 298 varyete üzerinde toksisite inceleyen Maurice G. Brooks isimli araştırmacı, daha önceki cevizin toksisiteye sahip olduğunu beyan eden tüm çalışmaları doğrulamıştır. Sadece ceviz ağacının kökleri diğerleri ile birlikte olduğunda juglonun toksik etki gösterdiği çıkarımına ulaşmıştır [76].

- 1975'e kadar geniş çaplı araştırmalarla juglonun toksisitesi çeşitli açılardan onaylanmıştır. Bu toksisiteden kaynaklı olarak ceviz ve diğer bitkiler antagonist yaşamaktadırlar. Sadece üçgül ve uzun çayır, juglondan etkilenmeden cevizin dibinde iyi geliştiği bilinmektedir. Ayrıca kavun fidelerinde yapılan çalışmada da olumlu etkileri rapor edilmiştir [77].
- 1990 ve 2007 yıllarındaki yayınlarda juglonun allelopatik etki göstermesinin pH, toprağın özelliği, organik besin içeriği gibi toprak ve ortamla ilgili birçok etmene bağlı olduğu bildirilmiştir [78], [79]. Bu da 1940'daki MacDaniel'in deneyinde neden juglonun toksisite göstermemesini açıklamaktadır.

şeklinde sıralanabilir.

Juglon tüm ceviz türlerinde yer almakla birlikte en çok *Juglans regia*'da bulunmaktadır. Sentezi sonrası toksik olmayan indirgenmiş form hidrojuglon şeklinde yapraklarda, meyve kabuklarında ve en çok da köklerde bulunmaktadır [80]. Hidrojuglon yapraklardan yağmur sonrası su damlalarıyla, köklerden salımla toprağa karışır.

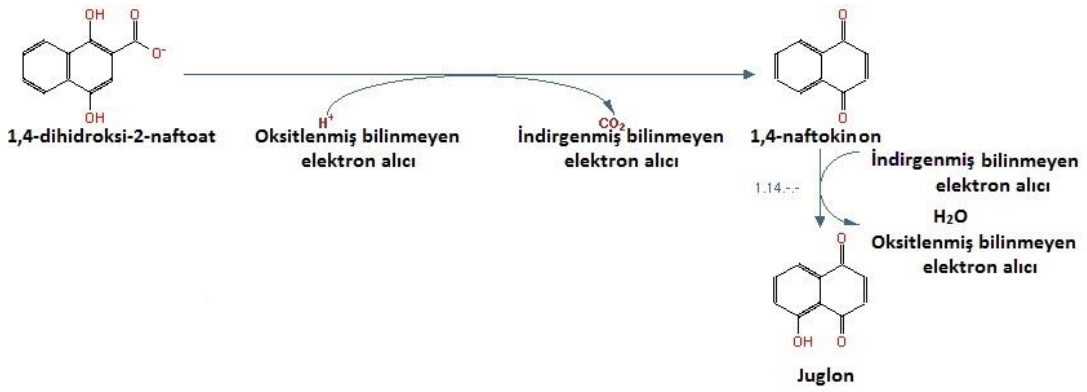
Ağaç bölümlerinde bulunan juglon miktarı değişkenlik göstermektir. Ağaç bölümlerinin kuru ağırlığındaki juglon miktarı ve mevsimsel olarak kök, gövde ve yapraklardaki juglon miktarı çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 2.2) [80].

Çizelge 2.2 Cevizin çeşitli bölümlerindeki juglon miktarının mevsimsel değişimi ve cevizde yer alan bölümlerdeki juglon içeriği

Juglon İçeriği		Aylara Göre Juglon İçeriği		
Ağaç Bölümü	mg/g kuru ağırlık	Ay	mg/g kuru kabuk	mg/g kuru yaprak
Yaprak	1.23	Haziran	9.3	2.9
Gövde(Kabuk)	6.71	Temmuz	10.3	2.8
Kök	7.73	Ağustos	11.5	2.5
		Eylül	10.9	1.8

Juglonun biyosentezi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte olası olarak şikimat yolu öne sürülmüştür [80]. Juglonun ileri sürülen yolağı Müller ve arkadaşları radyoaktif izli

yaptığı çalışmaya dayanmaktadır [82]. Juglonun olası biyosentezi Şekil 2.13'de şematik olarak gösterilmiştir. Yolakta herhangi bir enzim karakterize edilmemiştir [83].



Şekil 2.13 Juglonun olası biyosentez yolağı

Dünyanın birçok yerinde yaygın olarak bulunan ceviz bitkisinin allelokimyasalı olan juglonun, antiviral ve antibakteriyel özelliği yıllardır Çin'de geleneksel tıpta kullanılmaktadır [84]. Juglon bileşiğinin; herbisit, antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antitumor, antikanser, sitotoksik ve genotoksik, antioksidan gibi etkilere de sahip olduğu bilinmektedir. Bu amaçla Çin dışında da birçok ülkede tıbbi bitki olarak kullanılmıştır [27]. Bununla birlikte gıda ve kozmetik sanayide renklendirici ajan, mürekkep, tekstil boyası gibi farklı amaçlarla da kullanımı mevcuttur.

2.6 Cevizin Orjini ve Dünyadaki Yayılımı

Cevizgiller (*Juglandaceae*) familyasını temsil eden en önemli cinsin *Juglans* cinsi olduğu, bu cinsin önemli türlerinin kara ceviz (*Juglans nigra*), kafkasya cevizi (*Juglans regia*) ve ak ceviz (*Juglans cinere*) türlerinden oluştuğu bildirilmiştir. 20-30 metreye kadar boylanabilen geniş taçlı ağaçlardır. Orjini Doğu Avrupa, Türkiye, Irak, İran ve Himalaya dağlarının ötesinin kapsayan bir alan olduğu düşünülen ceviz, Akdeniz' den Doğu Asya' ya kadar yabani olarak yetişmektedir (Şekil 2.14). Aynı zamanda kültüre de alınmış bir tür olarak tanımlanmıştır. Amerika'da ise *Juglans nigra* yaygın olmakla birlikte *Juglans regia* da yayılış göstermektedir. *Juglans regia*, *Juglandaceae* ailesinin bir üyesi ve Avrupa'nın güney bölgesi, Asya'nın küçük bir bölgesi, Hindistan ve Çin' de yetişen, çok yıllık bir bitki olarak tanımlanmıştır [85], [86].



Şekil 2.14 Juglans regia'nın doğal olarak yetiştiği dağılım alanları [86]

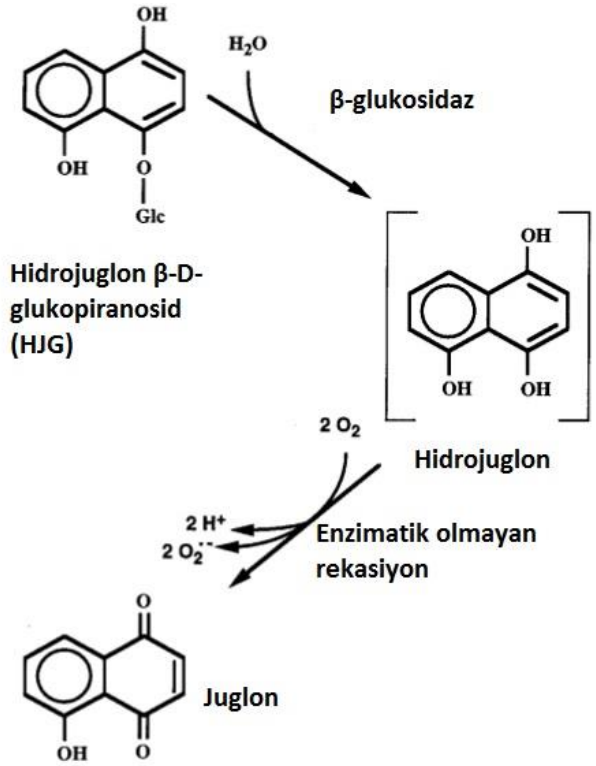
Ülkemizin hemen her tarafında ceviz bitkisine rastlanır. Bununla birlikte özellikle Kastamonu, Bilecik, Manisa, Kütahya, Afyon, Tunceli, Tokat, Bolu, Konya, Samsun, Trabzon ve Bitlis illerinde yayılış gösterir [87].

2.7 Juglonun Moleküler Etki Mekanizmaları

Juglon (5-hidroksi-1,4 .Naftakinon), *Juglandaceae* ailesine ait birçok bitkinin doku ve organlarından izole edilen bir allelokimyasaldır [88]. Juglonun toksik mekanizması bütünüyle hala aydınlatılmış değildir. Belki farklı organizmalarda farklı etki şekillerine de sahiptir. Juglon için; hücre ölümü, hücre döngüsünü bozma, DNA modifikasyonları (özellikle hızlı bölünen hücrelerde), mRNA sentezinin engellenmesi, temel proteinin tiyol veya amin gruplarının alkilasyonu, p53 gibi tümör baskılayıcı seviyesini düşürme gibi birçok mekanizma ortaya atılmıştır [21]. H+-ATPaz olası mekanizmadır ve bununla birlikte K^+ pompasının blokasyonuna neden olmaktadır [89]. Ayrıca Juglon, mitokondri ve kloroplastlardaki enzimler tarafından oksidatif strese sebep olan seminkinon haline indirgenmektedir [67].

Yaşayan bitkide juglon çoğunlukla toksik olmayan glikolize formda (hidro juglon β-D-glukopiranosid) yer alır. Hava veya toprak bileşenleri ile etkileşmesi halinde bu allelo

kimyasal hızla okside ve aşırı toksik forma dönüşür (Şekil 2.15). Toksik juglon serbest radikallerle etkileşimi sonucu yükseltgenme indirgenme tepkimeleri vermektedir ve hücresel nükleofillere elektrofilik reaktivite gösterir [90].

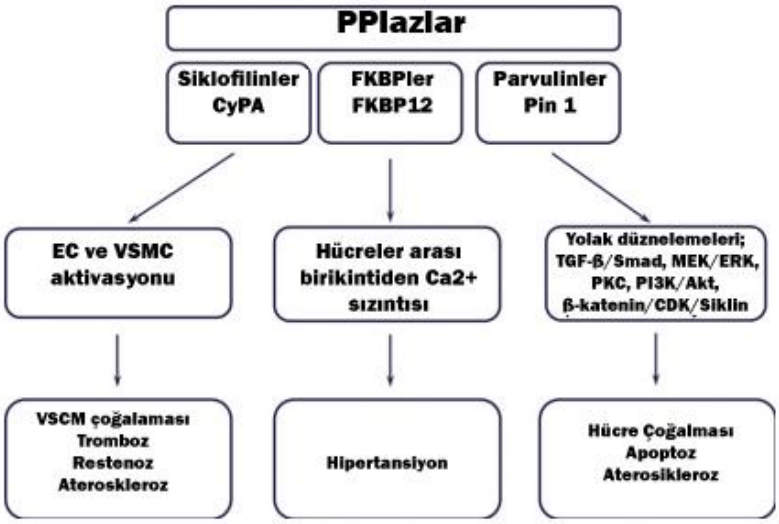


Şekil 2.15 Juglon toksik forma dönüşümünün şematik gösterimi

Juglonun bitki büyümesini engelleme mekanizması; mısır ve soya kök fraksiyonlarında H+-ATP-az aktivitesinin azaltması [89], p-hidroksifenilpiruvat dioksigenaz (plastokinon sentezinin önemli bir enzimi) inhibisyonu, mitokondri elektron taşınmasının inhbisyonu [91], yaprak dokularda fotosentezi azaltma, terleme ve stomal iletimin engellenmesi [92] ve kökler tarafından su geri alımının azaltılmasıdır [89]. İndüklenen reaktif oksijen türleri (ROS) bitkiyi patojenlere karşı korumada kritik bir rol oynayabilmektedir [93].

Juglon, her türlü saldırgan veya organizmaya (istilacı bitkiler, nametodlar, mantarlar, bakteriler, virüsler, çeşitli hayvanlar) karşı kullandığı bir diğer caydırıcı reaksiyon olan tiyol (-SH) proteinleriyle etkileşir. Juglon reseptörde yer alan sistein amino asitlerinin serbest –SH grubu ile reaksiyona girer ve proteinde yer alan serbest sisteinler arasında disülfit bağı kurar. Disülfit bağları reseptörün üç boyutlu yapısını ve dolayısıyla fonksiyonunu değiştirir [94] [95].

Hücre içerisinde yer alan tüm protein aracılı biyolojik süreçlerin, kelimenin tam anlamıyla çok keskin bir şekilde mekânsal ve zamansal olarak düzenlendiği bilinmektedir. Bunlardan biri, peptidil prolil cis-trans izomerazlar (PPIaz) tarafından hem protein katlanması hem de proteinin doğal konumuna kavuşması sırasında etkili bir şekilde gerçekleşen PPIaz etkili düzenlemelerdir [96]. PPIazlar bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçlara bağlanmakta, dolayısıyla immünofilinler olarak adlandırılmaktadırlar. PPIazların üç sınıfı vardır; Siklofilinler, FKBMler ve parvulinlerdir. Parvulinler, bakteri ve insanlardaa korunmuş 3. sınıf PPIazlardır (Şekil 2.16).



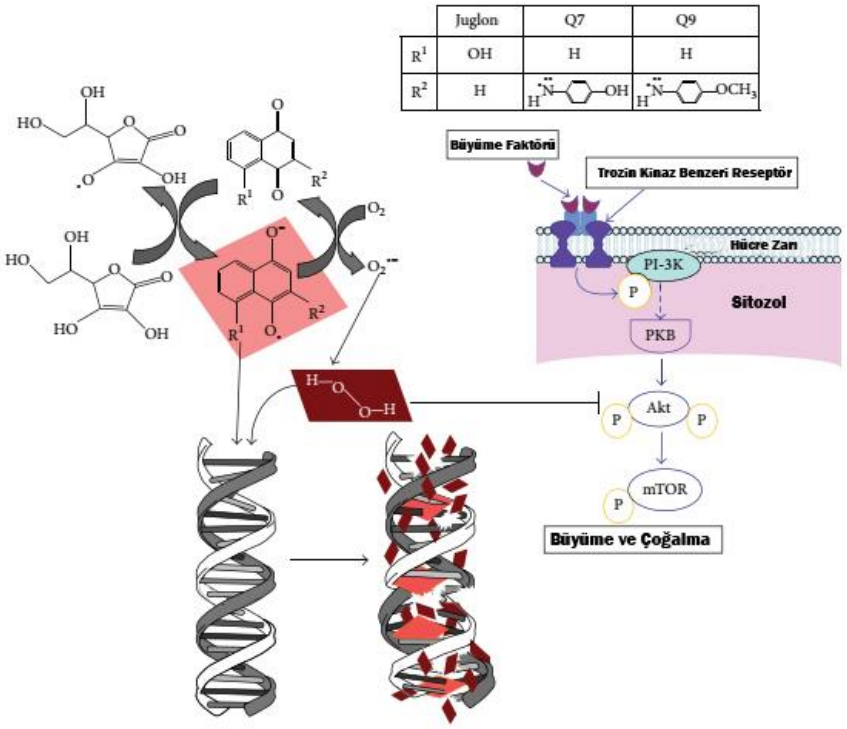
Şekil 2.16 PPIazların sınıflandırılması. Her bir grubun etkilediği hücresel yolaklar ve sonucunda ortaya çıkan olaylar özetlenmiştir.

Mitoz sırasında görev alan esansiyel bir protein olan sisteince zengin olan parvulin proteini 92 aminoasitlik bir proteindir ve ilk *E. coli*'de keşfedilmiştir [97]. Ökaryotik homologu pin1, hücre döngüsünde G2'den M fazına geçişi sağlamaktadır [98]. Yapılan bir çalışmada juglonun mitotik fosfoproteinlerinde yer alan serin proteinini fosforilleme suretiyle parvulini inaktive ettiği *in vivo* olarak gösterilmiştir [99].

Pin 1'in rolü kardiyovasküler hastalıklar açısından da ilgi çekicidir. Pin1'in kalpte kardiyovasküler sinyal ağındaki iletilerin genlik ve süre aralığının hassas ayarlanmasından sorumlu bir 'moleküler orkestra şefi' gibi görev yapması kritik rolünü kanıtlamaktadır [100]. Nitrik oksit (NO) damar genişletici ve damar koruyucu etkiye sahiptir. NO arterosklerotik lezyonların formasyonu ve kan basıncın kontrolünden sorumlu olması sebebiyle de önemlidir. Endotelyal NO sentaz (eNOS), endotel

hücrelerinde NO üretmeden sorumludur. eNOS aktivitesinin Pin1 tarafından konformasyonel bir değişimle belirlendiği bildirilmiştir. Endotel hücrelerinde Pin1 RNAi'lerce susturulur ya da juglon eNOS enzimindeki Ser^{116} fosforilleyerek inhibe edilir [101]. İki hafta boyunca juglona maruz bırakılan farelerde ve Pin1 susturulmuş farelerde her iki grupta da ortak artan aortik Ser^{116} fosforilasyonun hipertansiyona ve endotelyal disfonksiyona yol açtığı gözlenmiştir [101].

Juglonun askorbat ile kombinasyonu serbest radikalleri tetikler; semikinon juglon ve dehidroaskorbat ürünlerini verir. Semikinon DNA ile etkileşmesi sonucunda DNA hasara uğrar. Yapılan bir çalışmada tümör hücrelerinde yer alan DNA, askorbatla kombine edilmiş Juglon sonucunda oluşan semikinona maruz bırakılmış ve DNA'nın degrede olduğu görülmüştür; bu sayede Akt yolağı baskılanmış, büyüme ve çoğalma durdurulmuştur (Şekil 2.17) [102].



Şekil 2.17 Juglonun DNA üzerinde etkisi

2.8 Juglonun Antimikrobiyal Etkisi

Juglonun geniş bir spektrumda algler, bakteriler ve fungusların da dâhil olduğu mikroorganizmaları inhibe ettiği gösterilmiştir [27]. *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Mycobacterium smegmatis, Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae, Helminthosporium sp., Pycnoporus sanguineus ve Microsporum gypseum* üzerinde yapılan çalışmalarda juglonun antimikrobiyal özelliği gösterilmiştir [27], [28], [29].

Antimikrobiyal etkisine rağmen bir araştırma grubu, topraktaki juglonu indirgeyip degrede edebilen bir bakteri grubunu keşfetmişlerdir [103] ve başka bir çalışmada juglonu karbon kaynağı olarak kullanma yetisine sahip bazı *Psödomonas* türleri olduğu gösterilmiştir [104].

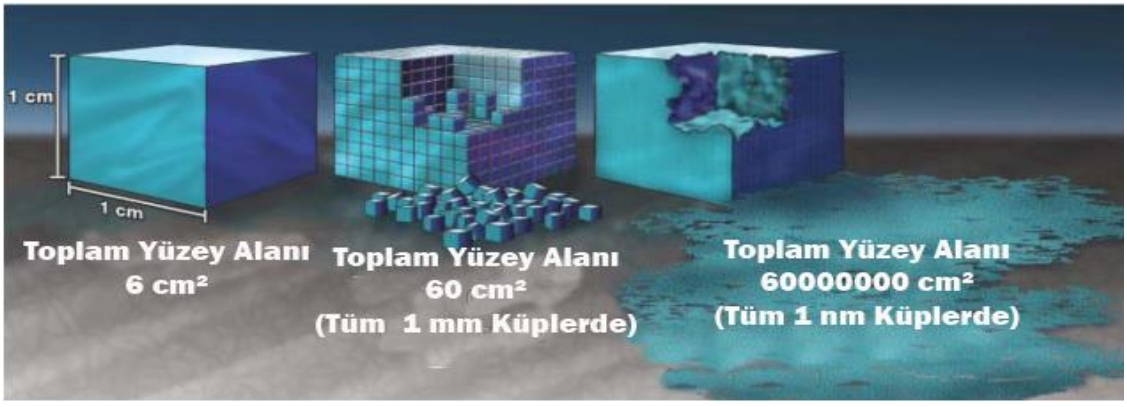
Juglon, bilinen ilk doğal parvulin inhibitörüdür. PPIazlardan keşfedilen parvulin ailesinin ilk üyesi *E.coli* de yer alan Par10 enzimidir [105]. Par10 ilave N- ve C- terminallere sahip olmayan sadece PPIaz domaininden oluşan bir sitozolik proteindir. FKBPs ve siklofilinler ile karşılaştırıldığında çok küçük kalan ve moleküler ağırlığı 10 kDa civarında olan bir proteindir. Latince Parvulus (Minik) anlamındaki kelimeden esinlenerek parvulin adı verilmiştir. Par10'un substrat spesifisitesi, FKBP izomerazlara benzerdir. Genellikle prolin rezidüsünden önce gelen uzun hidrofobik yan zincirle etkileşime girmekte olduğu bilinmesine rağmen hala tam anlaşılamamıştır [106]. Bilinen parvulinlerden bir tanesi mitotik regülatör Pin1 olduğundan bir önceki bölümde bahsedilmiştir. İnsan genomu Pin1 yanı sıra birçok parvulin geni içerir. Bunlar kromozom X üzerinde lokalize Xq13'de kodlanan Par14 ve Par17'dir. Bu parvulinlerin, çok hücreli canlılarda çekirdek sekansı mayalar hariç hepsinde yer almaktadır [107]. Par 14 lisin, serin ve glisin rezidüleri açısından zengin bir N-terminali esnek domaine sahiptir [108]. Par 14, *E.coli* parvulin Par10 ile hemen hemen aynı sekonder yapı özelliklerini paylaşmaktadır. Par 10, içerdiği Gly76-Pro77 dipeptidin yerini, Par 14'de Asp113-Pro114-Pro115 dizisi almaktadır. Bu bölgenin proteinin üç boyutlu yapısının oluşumunda güçlü kısıtlamalara sahip olmadığı bilinmektedir [109]. Bugüne kadar *Bacillus subtilis* PrsA [110], *Arabidopsis thaliana* Pin1 [111], *E. coli* SurA [112] ve *Candida albicans* Ess1 [113] birçok parvulinin yapısı ve karekterizasyonu yapılmıştır. Bakteri ve mantarlarda bulunan parvulin yapılarının hiç birinde Par 14 yer alan Val103'ten Asp107 dizisi yoktur.

Bu dizi sadece çok hücreli ökaryotlara özgü gibi görünmektedir [114]. Antibakteriyel ve antifungal ilaçların geliştirilmesi için bakteriler ve mantarlarda yer alan parvulin dizilerinin var olan kullanılabilme potansiyeli, gelişmelere oldukça açık bir alandır.

Juglon parvulin inhibitörü olarak ilk keşfedildiği çalışma 1998 yılında Hennig ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada juglonun; *E. coli* parvulin, insan Pin1 ve maya Ptf1/Ess1 proteinlerini tersinmez bir şekilde ve spesifik olarak inaktive ettiği gösterilmiştir [95]. Aynı çalışmada siklofilin (CyP) ve FKBP (FK506 bağlayıcı proteinlere) üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. *E. coli* parvulin inaktivasyonu mekanizması, juglonun *E. coli* parvulinde Cys41 ve Cys69 tiyol gruplarının Tiyol-Micheal katılması sonucu parvulinin aktif bölgesinde meydana gelen değişim sonucu oluşur [95].

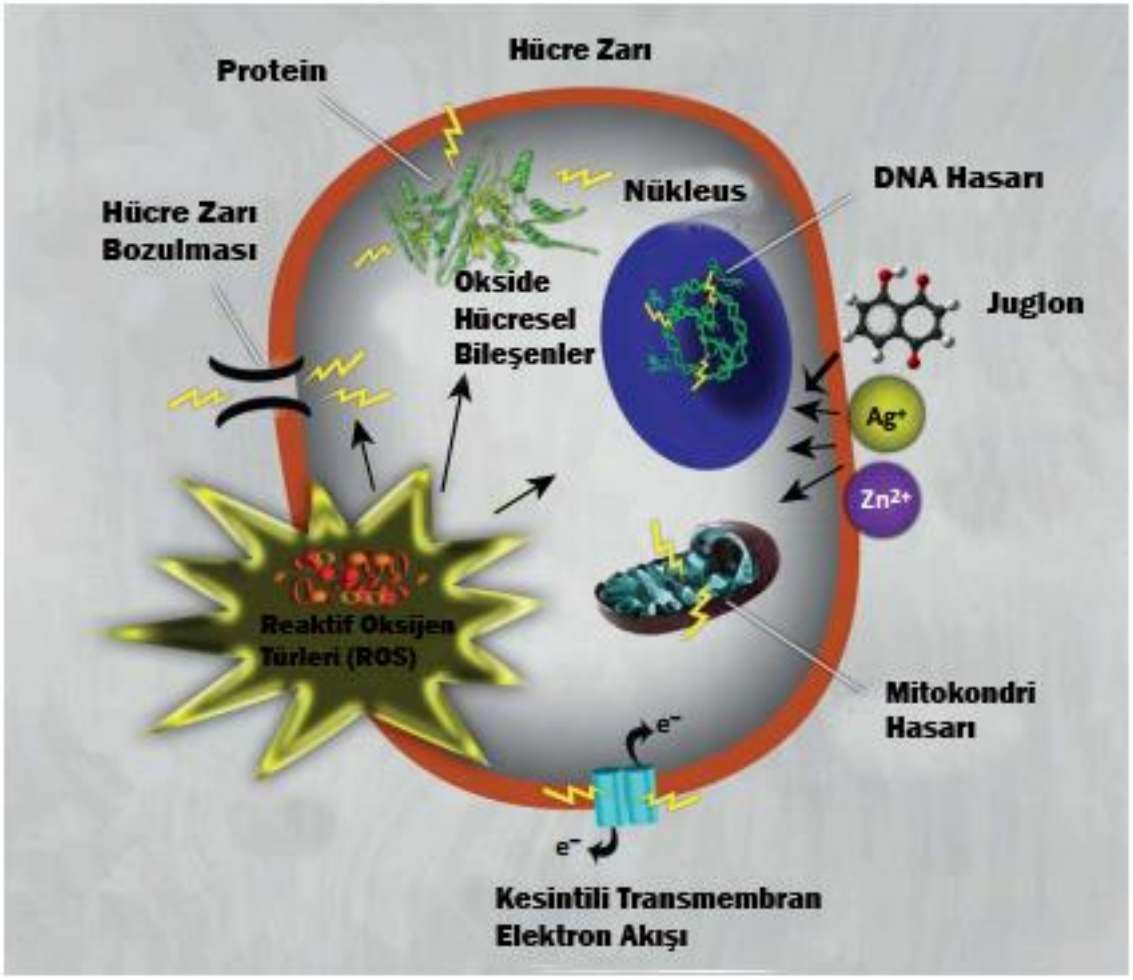
2.9 Antibakteriyel Nanopartiküllerin Sağladığı Özellikler

Klasik antibiyotik yöntemi yerine nanopartiküler sistemlerin tercih edilmesinin sebebi, yüksek yüzey alanı/hacim özelliğidir. Nanometrik ölçeklere gidildikçe hacim değişmezken yüzey alanı oldukça artmaktadır (Şekil 2.18). Yüksek yüzey alanı, bilinen maddenin özelliklerinden farklı olarak yeni mekanik, kimyasal, elektrik, optik, manyetik, elektro-optik, manyeto-optik birçok özelliği beraberinde getirmektedir [115]. Aynı hacimlerde olan klasik antibiyotik ile enkapsüle antibiyotik karşılaştırıldığında enkapsüle antibiyotiğin yüksek yüzey alanına sahip olması bakteri ile etkileşimini artırmakta ve daha efektif olmasını sağlamaktadır.



Şekil 2.18 Farklı boyutlarda (santimetrik, milimetrik ve nanometrik) boyutlarda aynı hacimdeki maddenin değişen yüzey alanı

Nanopartiküllerin, yüzey modifikasyonlarına olanak tanıması sayesinde hedefe özgü ilaç geliştirilmesi [116] ve kontrollü salım yapması sonucu dozaj ayarının yapılabilmesi ise diğer avantajlarıdır [117]. Nanopartiküller, bakteri hücre membranına elektrostatik etkileşim yoluyla bağlanmaktadır ve hücreyi bütünlüğünü bozan sürece sürüklemektedir [118]. Bakteri için toksik etki mekanizması, nanopartikül ve içerdiği etkenin (iyonlar, organik bileşikler vb.) indüklenen oksijen türleri (ROS) gibi serbest radikaller oluşturması (veya üretmesi) sonucu oksidatif stresin artmasına sebep olmaktadır. İndüklenen oksijen türleri (ROS) ise bakterilerde; membrana, DNA'ya, mitokondriye geri dönüşümsüz hasar vererek bakterinin ölümüne yol açmaktadır (Şekil 2.19) [119].



Şekil 2.19 Etken yüklü veya metal nanopartiküllerin bakteri üzerindeki etkisi

2.9.1 Polimerik Nanopartiküllerin Antibakteriyel Çalışmalarda Kullanımı

Bakteriyel ilaç taşıma sistemlerinde polimerik nanopartiküller kullanılması iki önemli sebebe dayanmaktadır:

1. Yapısal olarak daha stabil ve daha büyük boyut hassasiyetinde sentez edilme olanağına sahiptirler.
2. Kimyasal olarak modifiye edilebilir gruplara sahiptirler. Bakteri hücre duvarındaki karbonhidratlara bağlanabilen lektin, polimerik bakteri ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [120].

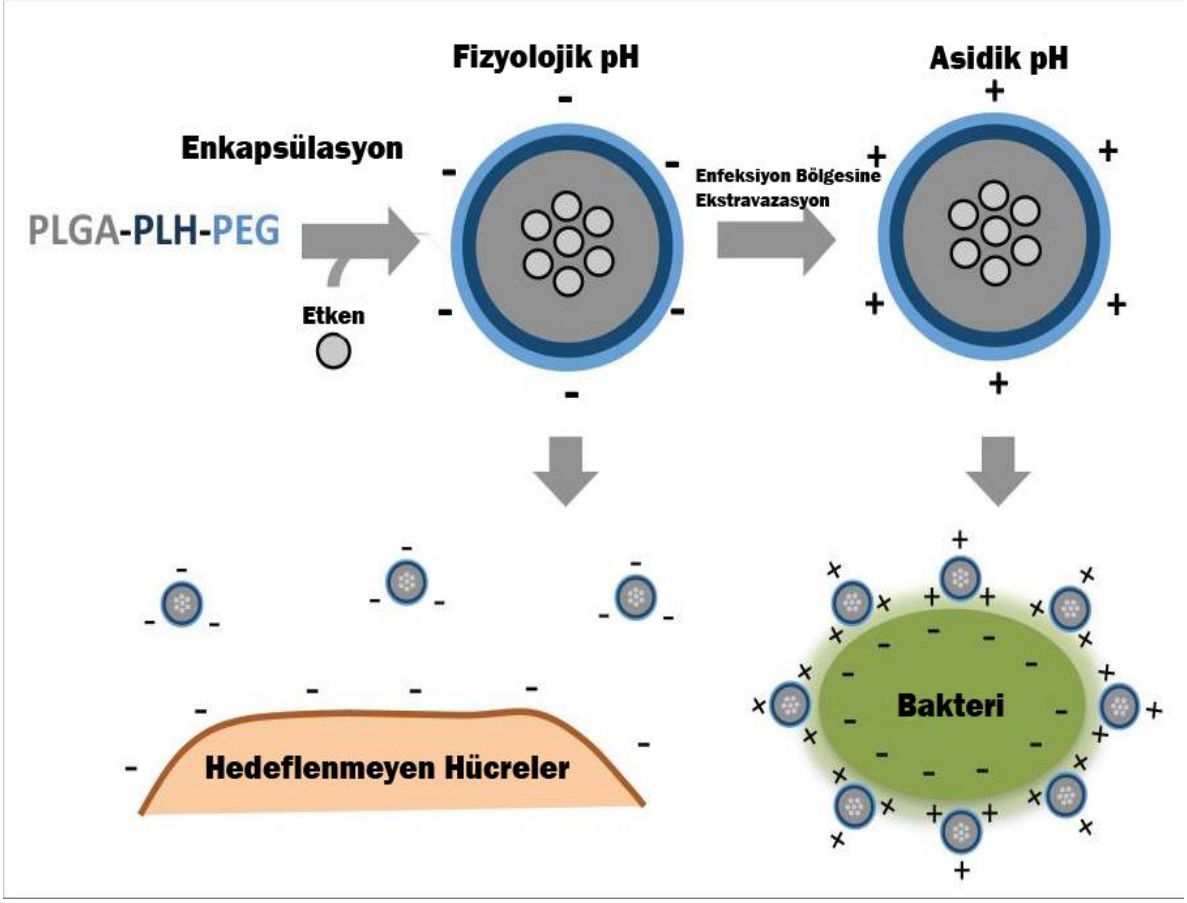
Antibakteriyel ilaç taşınım sistemleri için kullanılan polimerik nanopartiküllerin iki tipi vardır [121]. Bunlardan birisi hidrofobik ve hidrofilik parçalara sahip kendi kendini inşa edebilien diblok kopolimerlerdir. Hidrofobik kısım etkeni tutan çekirdek kısmı oluşturmaktadır. Hidrofobik zincirin uzunluğu etken salınımının hızını kontrol etmektedir. Biyoçözünür polimerler olan poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktid-ko-glikolid) (PLGA), poli carprolactone (PCL), poli (siyano- akrilat) (PCA) hidrofobik çekirdeği oluşturmak için kullanılırken, polietilen glikol (PEG) ise en yaygın kullanılan hidrofilik parçasıdır. Nanopartikül çekirdeğinin hidrofobik yapısı, polimerik nanopartiküllerde suda az çözünen etkenleri taşımasını sağlamaktadır.

Polimerik nanopartiküllerin ikinci tipi ise polialkil akrilatlar ve polimetil metakrilat formlarındaki lineer nanopartiküllerdir. Bunlarda etken (örneğin antibiyotik) yüzeye absorbe edilmektedir veya kovalent bağlanmaktadır. Kovalent bağlanmanın etkenin veya antibiyotiğin aktivitesini etkileyip etkilemediği göz önünde tutulmalıdır.

Salmonella typhimurium bakterisine karşı normal antibiyotik yerine, PLGA ile nanopartike edilmiş gentamisin [122], azitromisin [123] ve klaritromisin [124] antibiyotiklerinin kullanıldığı deneylerde nanopartiküler antibiyotiklerin daha efektif olduğu ispatlanmıştır. Bu durum nanopartiküler sistemin bakteride adezyonu kolaylaştırdığını göstermektedir. PLGA'dan yapılmış olan katyonik eudragit nanopartiküllerin *S. aureus*'a adhezyonu rapor edilmiştir [125].

Bakteri hücre duvarları negatif yüklenme eğilimindedir [126]. Bu durum polimerik bakteriyel nanopariküllerin hedeflenmesinde yardımcı olmaktadır. Etken emülsiyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül içerisine enkapsüle

edilmektedir. Hafif bir negatif yük ve yüzey PEGilasyondan kaynaklı olarak fizyolojik pH 7.4'de nanopartiküllerin normal hücrelere bağlanması ve alımı önlenmiş olmaktadır. Enfeksiyon bölgesindeki enflamasyon bölgesel damar geçirgenliğini artırmaktadır. Bu durum nanopartiküllerin ekstravazasyonuna (damardan sızma) neden olmaktadır. Enfeksiyon bölgesinde yer alan düşük asidik koşullar yüzey yükü anahtarlama mekanizmasını aktive etmektedir. Aktivasyon sonucu nanopartikül negatif yüklü bakteriye bağlanmış olmaktadır. Son olarak etken yüklü enkapsüle nanopartikülün kontrollü salımı antibakteriyel etkiye yol açmaktadır (Şekil 2.20) [127].



Şekil 2.20 Bakteri hücre duvarı hedefli tasarlanmış etken yüklü nanopartikül sistemi

2.10 *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*

2.10.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Dr. Theodor Escherich tarafından bebek dışkılarında bulunmuştur ve ismi kalın bağırsakta bulunan bir bakteri olduğu için *Bacterium coli commune* konulmuştur. 19. yüzyılın sonlarına doğru *Escherichia* cins ismi olmuştur.

1950 yılına kadar insan ve hayvanların bağırsak sisteminde normal florada bulunan, patojen olmayan bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir. Gıda hijyeninde indikator mikroorganizma olarak kabul edilen ve fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilen *E. coli*; bazı serotiplerinin hastalıklara neden olduğunun ortaya çıkmasıyla potansiyel bir patojen olarak tanımlanmıştır [128], [129].

E. coli Gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, fakültatif anaerob bir mikroorganizma olup insanların ve çoğu sıcakkanlı hayvanların doğal bağırsak florasında yer alır [130]. Peritrik flagellalarıyla hareketlidir, fakat hareketleri yavaştır. Hareketsiz suşları da vardır [131]. Tipik *E. coli* suşları 44.0-45.5 ^{o}C'de 1-2 gün içinde laktozu fermente ederek asit ve gaz üretirler. Ortalama 1,1-1,5x2,0-6,0 µm boyutlarındadır. Optimum üreme sıcaklığı 37 ^{o}C olup 7-46 ^{o}C'ler arasında üreme görülür. pH 4,4 ile pH 9,0 değerlerinde canlılığını koruyabilmektedir [132], [133].

2.10.2 *Staphylococus aureus*

Stafilokoklar İlk kez 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. 1880'de Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881'de Alexander Ogston insan apse materyalinden elde ettiği bakteriyi üzüm benzeri küme yapması nedeniyle *Staphylococcus* olarak adlandırmıştır. Daha sonrasında ise fare ve kobaylar için stafilokokların patojen olduklarını bildirmiştir. Rosenbach 1884'de besiyerindeki beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir [131].

Stafilokoklar katalaz üretebilen, Gram pozitif, aerobik ve anaerobik ortamda uzun süre canlı kalabilen dirençli mikroorganizmalardır. Stafilokoklar glukozu fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. *S. aureus* anaerobik ortamda mannitolü fermante edebilen tek *S. aureus* suşudur. Stafilokokların çoğunluğu % 7.5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilirlerken, *S. aureus* yüksek miktarda NaCl'ü tolere edebilir. Suşların optimal üreme ısıları 30-37 ^{o}C ve pH 7- 7.5 arasında olmasına karşın *S. aureus* ısıya ve kuraklığa dayanıklıdır. Bu dayanıklılığı sayesinde *S. aureus* spor oluşturmadığı halde vücut dışında canlılığını uzun süre koruyabilen tek insan patojenidir. Geniş bir ısı aralığında üreyebilirler (6-46 ^{o}C). Toksin oluşturmaları için

gerekli minimum ve maksimum sıcaklık dereceleri daha yüksek olup 10-48 ^{o}C' dir [131], [134], [135] .

Hücre duvarı peptidoglikan (N-asetil muramik asit ve N-asetil glukozamin), teikoik asit (gliserol fosfat polimerleri) ve protein A tabakalarından oluşur. Konağın immün sistem yanıtına neden olduğu için hücre duvarı bileşenleri *S. aureus'*un patojenitesinde önemlidir [131], [135], [136].

BÖLÜM 3

MATERYAL METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi - Shimadzu
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Buzdolabı – Dometic 50818
- Etüv – Ecocell
- Vorteks – Biosan V-1 plus
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – IKA
- Spektrofotometre – Sp-2000UV
- Kabin – SafeFast Classic 212
- Santrifüj Cihazı – Hettich Zentrifugen (Universal 32 R)
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Zeta Potansiyel ve Parçacık Ölçüm Cihazı – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- İnkübatör – Biosan, ES 20
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- Milipore-Q Gradient Su Cihazı

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

- Juglon (5-Hidroksi-1, 4-naftakinon) - Sigma Aldrich H47003-5G
- *Poli*(*laktik*-ko-glikolik asit) PLGA - Sigma Aldrich 719900
- Diklorametan (DCM) - Sigma Aldrich 24233-2
- Poly(vinyl alcohol) (PVA) – Sigma Aldrich 363138
- Muller Hinton Agar (MHA) – Oxoid CM0337
- Nutrient Broth (NB) – Oxoid CM0001
- Gentamisin – Oxoid CT0024B
- Ampisilin – Oxoid CT0004B
- Ofloksasin – HIMEDİA SD087-ICT

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler

- Juglon-PLGA

Juglon	50 mg
PLGA	100 mg
Diklorametan	3 ml

Toplam hacim 3 ml olacak şekilde Juglon ve PLGA diklorametan içerisinde çözdürülmüştür.

- Polivinil Alkol Çözeltisi (% 3)

Polivinil alkol	15mg
Distile Su	500 ml

Manyetik karıştırıcıda 60-70 ^{o}C'de homojen çözelti elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Sonrasında stok olarak saklanmıştır.

- Polivinil Alkol Çözeltisi (% 0.1)

Polivinil alkol	0.7 mg
Distile Su	700 ml

Manyetik karıştırıcıda 60-70 ^{o}C'de homojen çözelti elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Sonrasında stok olarak saklanmıştır.

- Agar Besiyeri

Muller Hinton Agar (MHA)	19 mg
Distile Su	500 ml

Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp otoklavlanmıştır. Daha sonra soğumasını takiben petrilere dökümü gerçekleştirilmiştir.

- Broth Besiyeri

Nutrient Broth (NB)	3.25 mg
Distile Su	250 ml

Manyetik karıştırıcıda karıştırılıp otoklavlanmıştır. Daha sonra sıvı besiyeri için gerekli seyreltme kullanımları stok olarak saklanmıştır.

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Mikroorganizmalar

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.2 Metod

3.2.1 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Üretimi

Daha önceki çalışmamızda sentezlenen J-NP5 nanopartikülü; 50 mg juglon ve 100 mg PLGA polimeri DCM içerisinde çözdürüldü. Oluşan organik faza 3.5 ml %3 (w/v)'lük PVA çözeltisi eklendi. Karışım, buz banyosunda 2 dakika 70 W (%80 Güç) enerji altında sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra oluşan y/s emülsiyonu, manyetik karıştırıcı üzerindeki 35 ml %0,1'lik PVA çözeltisi üzerine enjektör aracılığıyla damla damla eklendi. Elde edilen tekli emülsiyon çözücünün uzaklaştırılması için gece boyu manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra örnekler 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi, üst faz uzaklaştırıldıktan sonra pelet ultra saf su ile yıkandı ve santrifüj işlemi tekrar yapıldı. Üç yıkama sonrasında üst fazın uzaklaştırılması ile elde edilen nanopartiküller liyafilizatörde kurutularak antibakteriyel aktivitesinin tayini için +4 °C'de saklandı [137].

3.2.2 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Salımı

5 mg J-NP5 nanopartikülü 2 ml PBS tamponunda süspanse edilerek pH 7.4'e ayarlandı ve 37 ^{o}C'de 220 rpm'de yatay çalkalayıcıya bırakıldı. Periyodik olarak çalkalayıcıdan alınıp 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek, üst faz uzaklaştırıldı. Pellet tekrar 2 ml PBS içerisinde süspanse edildi. Elde edilen üst fazın 424 nm dalga boyunda UV değerleri kaydedildi. UV değerlerinden juglonun salım miktar tayini yapıldı [137].

3.2.3 Antibakteriyel Çalışmalarda Kullanılan J-NP5 ve serbest juglon Stok Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Gerçekleştirilen antibakteriyel çalışmaların tümünde juglon-PLGA-nanopartikül (J-NP5) konsantrasyonu 3 mg/ml olarak belirlenmiştir (J-NP5 stok konsantrasyon). Buna eş değer serbest juglon miktarı çizelge 4.1.'de yer alan veriler baz alınarak 1 mg/ml olarak hesaplanmış ve tüm çalışmalarda bu konsantrasyon kullanılmıştır (Serbest juglon stok konsantrasyon). Hesaplama için kullanılan formül aşağıda belirtildiği gibidir:

$$\text{Konsantrasyon}_{\text{Juglon}} = \frac{Enkapsüle\ juglon\ miktarı}{J{-}NP5\ toplam\ miktarı}\ x\text{Konsantrasyon}(\text{stok J} - \text{NP5}) \qquad (3.1)$$

3.2.4 Bakteri Süspansiyonlarının Ekimler İçin Hazırlanmaları

MHA besiyerinde üretilmiş olan bakterilerden birkaç koloni alınarak NB çözeltisi içeren tüpler içerisine inoküle edilmiştir. Bu tüpler, bir gece boyunca 37 °C ve 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri süspansiyonlarından spektro ölçümü yapılarak OD 475 nm de 0.28±0.02 olacak şekilde konsantrasyon ayarlanmıştır. Bu spektro ölçüm değeri çalışmamızdaki tüm antibakteriyel yöntemler de kullanılan 1.5–3.0 × 10^{8} CFU ml^{-1} bakteriyel inokulum değerine karşılık gelmektedir.

3.2.5 Juglon Nanopartiküllerinin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

3.2.5.1 Agar Kuyucuk Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

Agar kuyucuk yöntemi Irshad ve arkadaşları tarafından literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. 3.2.4 başlığında tanımlandığı şekilde hazırlanmış *Escherichia coli* ve

Staphylococcus aureus bakteri süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak steril MHA besiyerlerine swap yardımıyla tüm yüzeye yayılacak şekilde ekilmiştir. Sonrasında petrilerin yüzeyinde 6 mm çapında dört kuyucuk açılmıştır. Bu kuyucuklara sırasıyla;

1. Kuyucuk; Serbest juglon stok çözeltisinden 100 µl
2. Kuyucuk; J-NP5 stok çözeltisinden 100 µl,
3. Kuyucuk; ½ oranında dilüe edilen serbest juglon stok çözeltisinden 100 µl
4. Kuyucuk; ½ oranında dilüe edilen J-NP5 stok çözeltisinden 100 µl ilave edilmiştir.

Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Çalışmada pozitif kontrol olarak; gentamisin (10 µg/disk), oflaksosin (5 µg/ disk) ve ampisilin (5 µg/10 disk) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

3.2.5.2 Broth Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

Broth mikrodilüsyon yöntemine göre antibakteriyel aktivite testleri CLSI (ISSN 1558-6502; January 2012, 'Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard') standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir [138]. Bu yöntem serbest ve PLGA'ya enkapsüle edilmiş juglonun MİK (Minimum İnhibitor Konsantrasyon) değerlerini belirlemek için kullanılmıştır. Başlık 3.2.3'de hazırlanan enkapsüle ve serbest juglon stok çözeltilerden, içerisinde 200, 100, 50, 25, 12,5 ve 6,25 µg/ml bulunan bir seri dilüsyon hazırlanarak 96 kuyucuklu mikroplağın ilk altı kuyucuğuna sırasıyla 250 µl ilave edilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol grubu oluşturmak için 7. kuyucuğa ampisilin solüsyonu 250 µl ilave edilmiştir. 8. Kuyucuğa ise 250 µl steril broth çözeltisi ilave edilerek negatif kontrol grubu oluşturulmuştur. Sonrasında her bir kuyucuğa $1.5–3.0\times10^{6}$ CFU ml^{-1} bakteri süspansiyondan 50 µl eklenmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri büyümesi; turbidite yöntemiyle görsel olarak, spektrofotometrik yöntemle OD 570 nm okuma ve standart petri sayım yöntemi canlı bakteri sayısı belirlenerek değerlendirilmiştir.

3.2.5.3 Yüzde İndirgeme (Reduction Percentage) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

Yüzde indirgeme yöntemi ASTM standardına (Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions) göre uygulanmıştır [139]. Bu yöntem bakteri ve etken maddenin aynı ortam içerisinde doğrudan etkileşimine dayanmaktadır. Konsantre bir bakteri süspansiyonu içerisinde çalkalamalı etüvde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem süspansiyon içerisindeki bakteri-etken etkileşimi öncesi ve sonrasında seri dilüsyonlarla kültüre etme prensibiyle yapılmaktadır. Kültüre edilmiş bakterlerin sayımı sonucunda 'Yüzde İndirgeme Oranı' belirlenir ve süspansiyon içersindeki bakteri sayısının tayini gerçekleşmektedir.

Bu çalışma da, 5 ml'lik NB içeren tüplere enkapsüle ve serbest juglon madde 3.2.3'de belirtilen miktarlara göre ilave edilmiştir. Sonrasında tüplere 1.5–3.0×10^8 CFU ml^{-1} bakteri süspansiyondan 50 µl eklenmiş ve 37 ^oC de 220 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Seçilen zaman aralıklarında (0, 3, 6, 24 ve 48. saat) tüplerden 100 µl inokülüm alınarak seri dilüsyonlarla MHA'ya ekim gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda gözle görülebilir koloniler sayılarak aşağıdaki formülle yüzde indirgeme hesaplanmıştır:

Reduction % CFU ml 100 = (B-A/B)x100 [138]

B: Belirtilen etkileşim süresi sonrasında J-NP5 çözeltisindeki canlı bakteri sayısı (CFU/ml)

A: Belirtilen etkileşim süresi sonrasında serbest juglon çözeltisindeki canlı bakteri sayısı CFU/ml)

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR

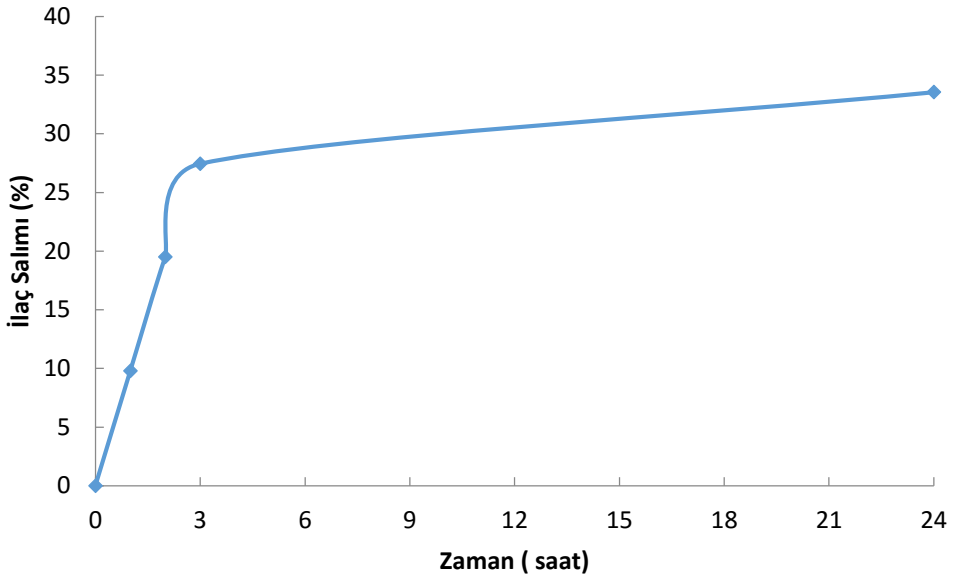
4.1 Nanopartikül Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Daha önceki çalışmalarımızdan sentezlenen J-NP5 nanopartikülünün enkapsülasyon etkinliği ve yüklenme verimi sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir [137].

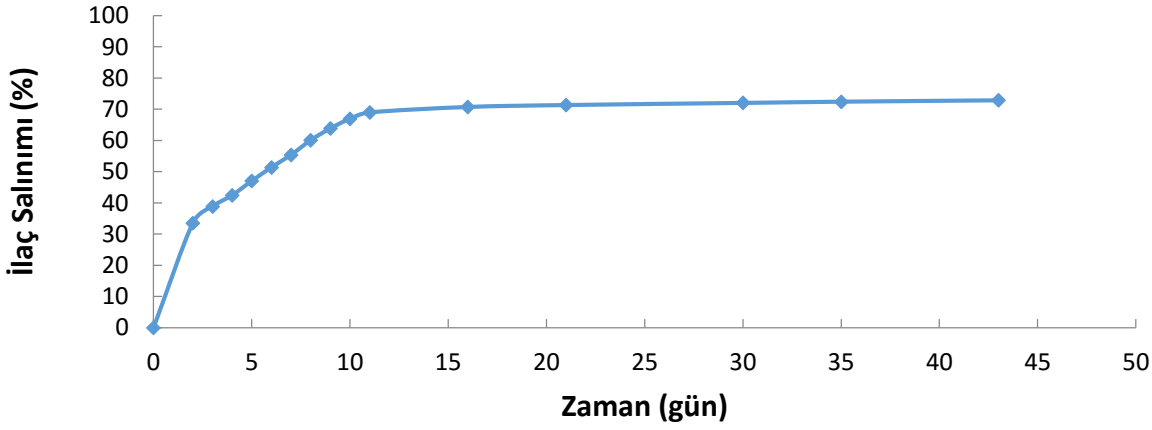
Çizelge 4.1 J-NP5 nanopartikülünün karakterizasyon sonuçları [137]

NP	Reaksiyon Verimi (RY)		Enkapsülasyon Etkinliği % (EE)			Etken Yüklenme Verimi % (DL)			Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
	Miktarı (mg)	Verimi (%)	İndirekt Yöntem	Direkt Yöntem	Ortalama	İndirekt Yöntem	Direkt Yöntem	Ortalama			
J-NP5	106,1	70,73	83,08	66,77	74,92	39,15	31,46	35,30	291,0	0,238	-21,2

Elde edilen J-NP5 nanopartikülünün zamana bağlı salımı incelediğinde; ilk üç saatlik zaman dilimde %28'lik juglon salımını gerçekleşmiştir. J-NP5, bir günün sonunda içindeki etken maddenin 1/3'ünü ortama saldığı tespit edilmiştir. Takip eden günlerde salım hızı düşmüş ve 10. günden sonra %70'lerde uzun süreli sabit kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). İlk saatlerde bu kadar hızlı salımın gerçekleşmesi, nanopartikülün yüzeyinde difüze olan etkenin hızlı bir şekilde ortama salınmasından kaynaklanmaktadır. Daha sonraki zaman dilimlerinde ise nanopartikülün matriksinde yer alan juglonun salınımı gerçekleşmektedir.



Şekil 4.1 J-NP5'in 24 saatlik dilimde göstermiş olduğu salım



Şekil 4.2 J-NP5'in 43 günlük dilimde göstermiş olduğu salım

4.2 Juglon Yüklü Nanopartiküllerin Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Yapılan çalışmada enkapsüle juglon ve serbest juglonun antibakteriyel aktivitesi *E. coli ve S. aureus* bakterileri üzerinde agar kuyucuk, broth mikrodilüsyon ve yüzde indirgeme metodları kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm çalışmalarda verilen değerler 3.2.3'de yer alan stok çözelti üzerinden yürütülmüştür.

Buna göre,

$$\text{Konsantrasyon}_{\text{Juglon}} = \frac{Enkapsüle\ juglon\ miktarı}{J{-}NP5\ toplam\ miktarı}\ x\text{Konsantrasyon(stok J} - \text{NP5)} \qquad (3.1)$$

Konsantrasyon$_{Juglon}$ = $\frac{35\ mg}{106\ mg}\ x\ 3mg/ml$ =1 mg/ml olarak bulunur. Yani çalışmada yer alan J-NP5 stok çözeltisindeki juglon konsantrasyonu 1 mg.ml^{-1}'dir.

4.2.1 Agar Kuyucuk Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivite Değerlendirme Sonuçları

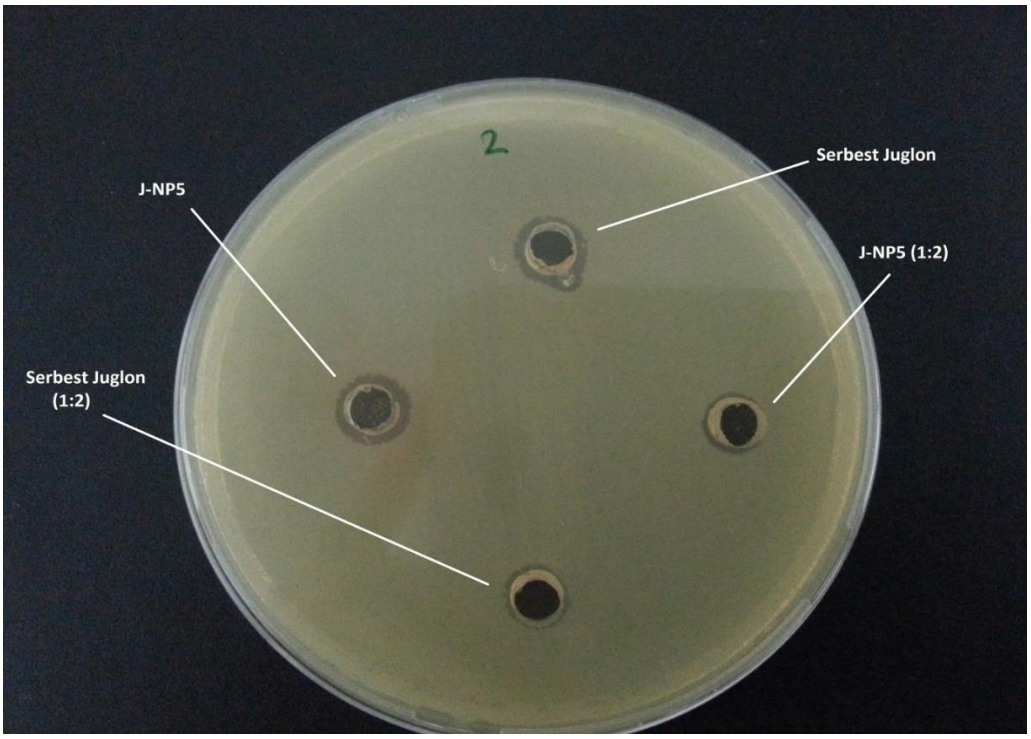
Agar kuyucuk yöntemiyle antibakteriyel aktivite, test edilen mikroorganizmalarının oluşturduğu inhibisyon zon çaplarının ölçülmesi (mm) ile belirlenmiştir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.3 ve 4.4). Zon çapının yüksek olması inhibisyonun yüksekliğini dolayısıyla antibakteriyel aktivitenin etkinliği göstermektedir.

Çizelge 4.2 Agar kuyucuk yöntemi inhibisyon zon çapları

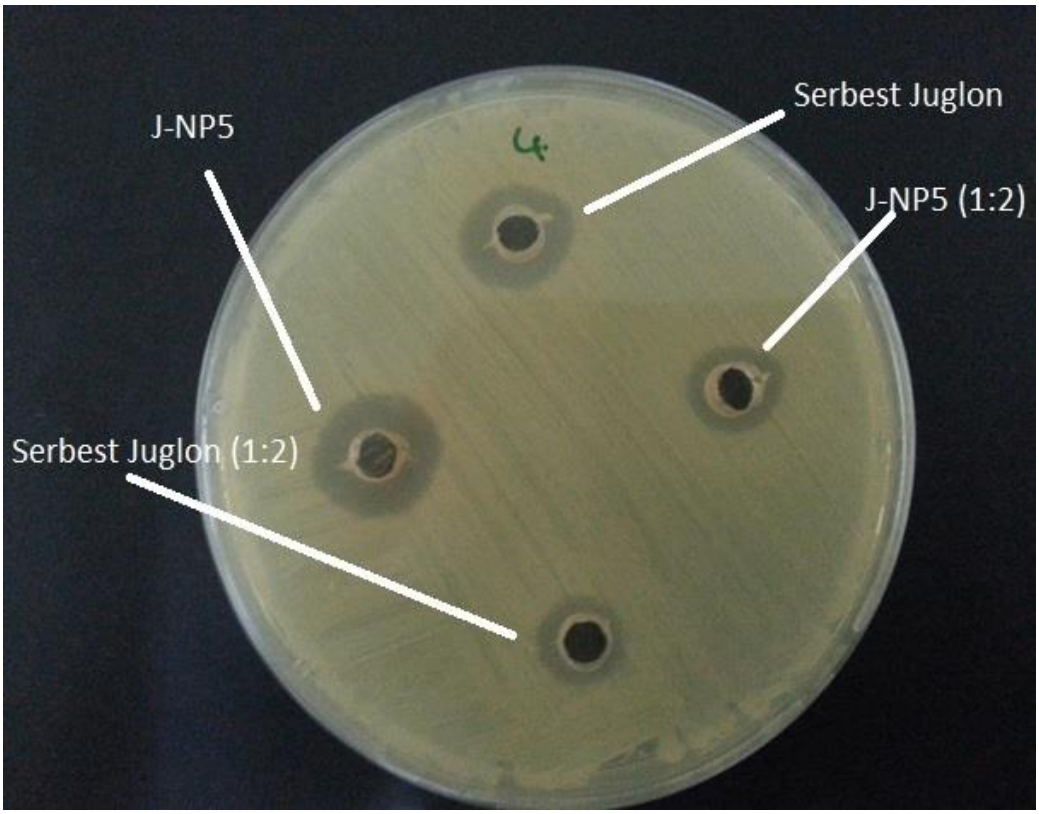
Mikroorganizmalar	NP5	NP5(1:2)	Serbest Juglon	Serbest Juglon(1:2)
E. coli	7 mm	6 mm	7 mm	6 mm
S. aureus	13 mm	10 mm	12 mm	10 mm

*Kuyucukların çapı olan 6 mm sonuçlarda dâhil edilmiştir.

Pozitif kontrol grubunda yer alan disklerin inhibisyon zon çapı ölçüldüğünde; *E. coli* ve *S. aureus* için sırasıyla: Gentamisin 13-12 mm, oflaksosin 17-17 mm inhibisyon zon çapları ölçülmüş, ampisilinde ise zon oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.3 *E. coli* inhibisyon zon çapı



Şekil 4.4 *S. aureus* zon inhibisyon çapı

4.2.2.Broth Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirme Sonuçları

Broth mikrodilüsyon yöntemine göre elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.3'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; serbest juglonun antibakteriyel aktivitesinin nanopartikül formulasyonundan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak özellikle Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* üzerinde nanopartikül formülasyonunun antibakteriyel aktivitesinin serbest juglon ile aynı etkinlikte olduğu gözlenmiştir. Bu durum organizmanın hücre duvar yapısıyla doğrudan ilişkilidir. Gram negatif bakteri olan *E. coli* üzerine yapılan antibakteriyel çalışmadan elde edilen sonuçlarda serbest juglonun MİK değerinin nanopartikül formülasyonundan iki doz daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

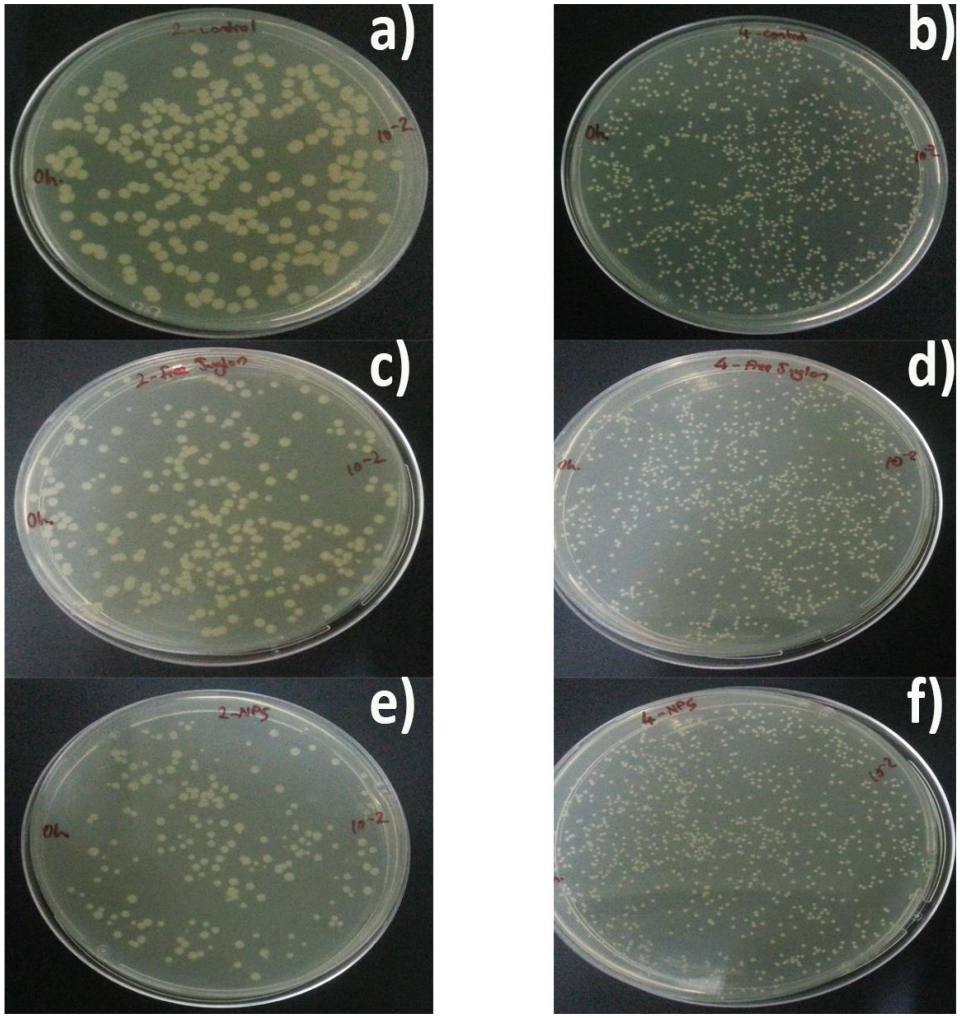
Çizelge 4.3 J-NP5'de bakterilerde MİK değerleri

Test Edilen	MİK (µg/ml)	
Bakteri	J-NP5	Serbest Juglon
S. aureus	6.25	6.25
E. coli	25	<6.25

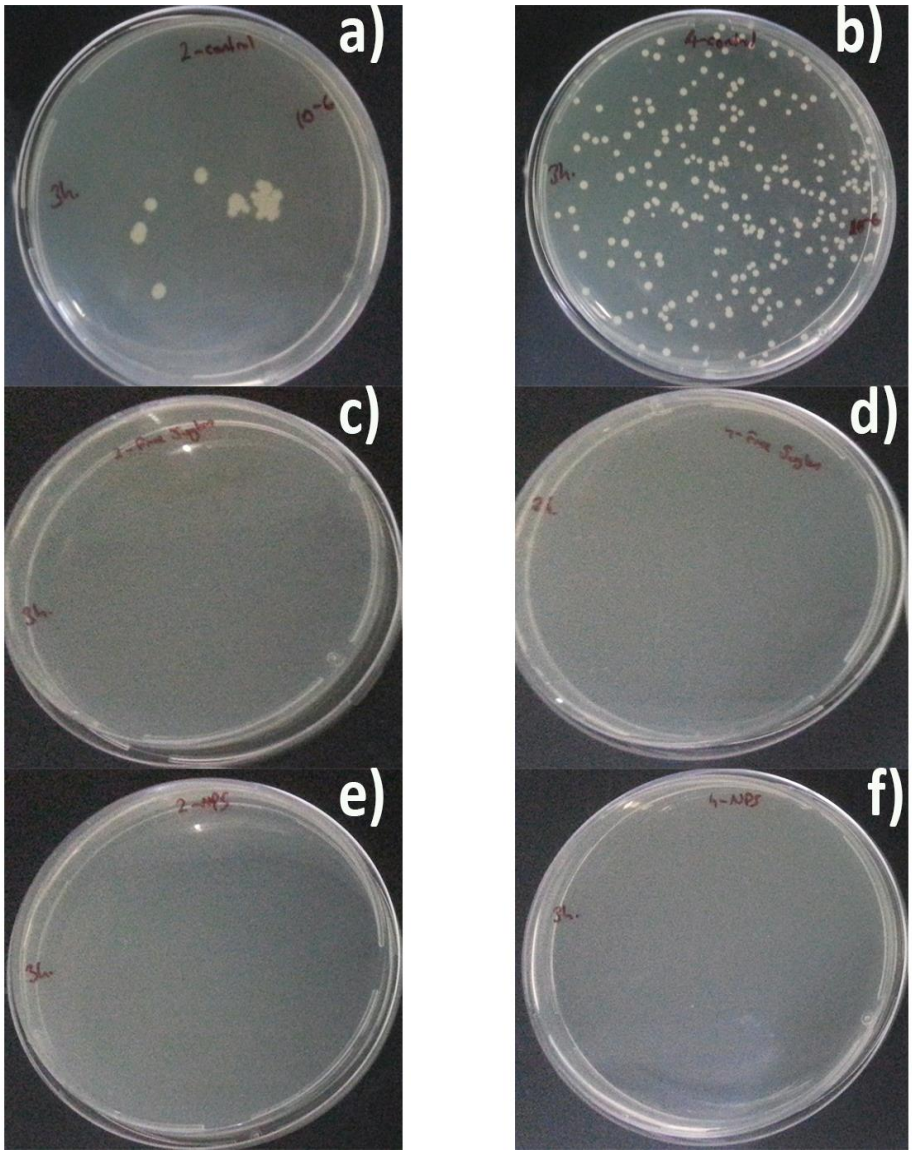
4.2.3 Yüzde İndirgeme (Reduction percentage) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirme Sonuçları

Canlı mikroorganizma sayısı esas alınarak yürütülen yüzde indirgeme metodu ile elde edilen sonuçlar şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9'de gösterilmiştir. Başlangıçta 1.5–3.0×10^6 CFU ml^{-1} bakteri süspansiyonu içeren kültürlerde (Şekil 4.5) üçüncü saate ulaşıldığında (Şekil 4.6) hem nanopartikül formülasyonu hem de serbest juglonun mikroorganizmaları inhibe ettiği ve güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 3. saatte yapılan standart petri sayım yöntemine göre kültürlerde hiçbir canlı mikroorganizma tespit edilememiştir. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (6, 24, 48. saat) aynı çalışma tekrarlanmış ve etkinin devam ettiği gözlenmiştir. Dolayısıyla

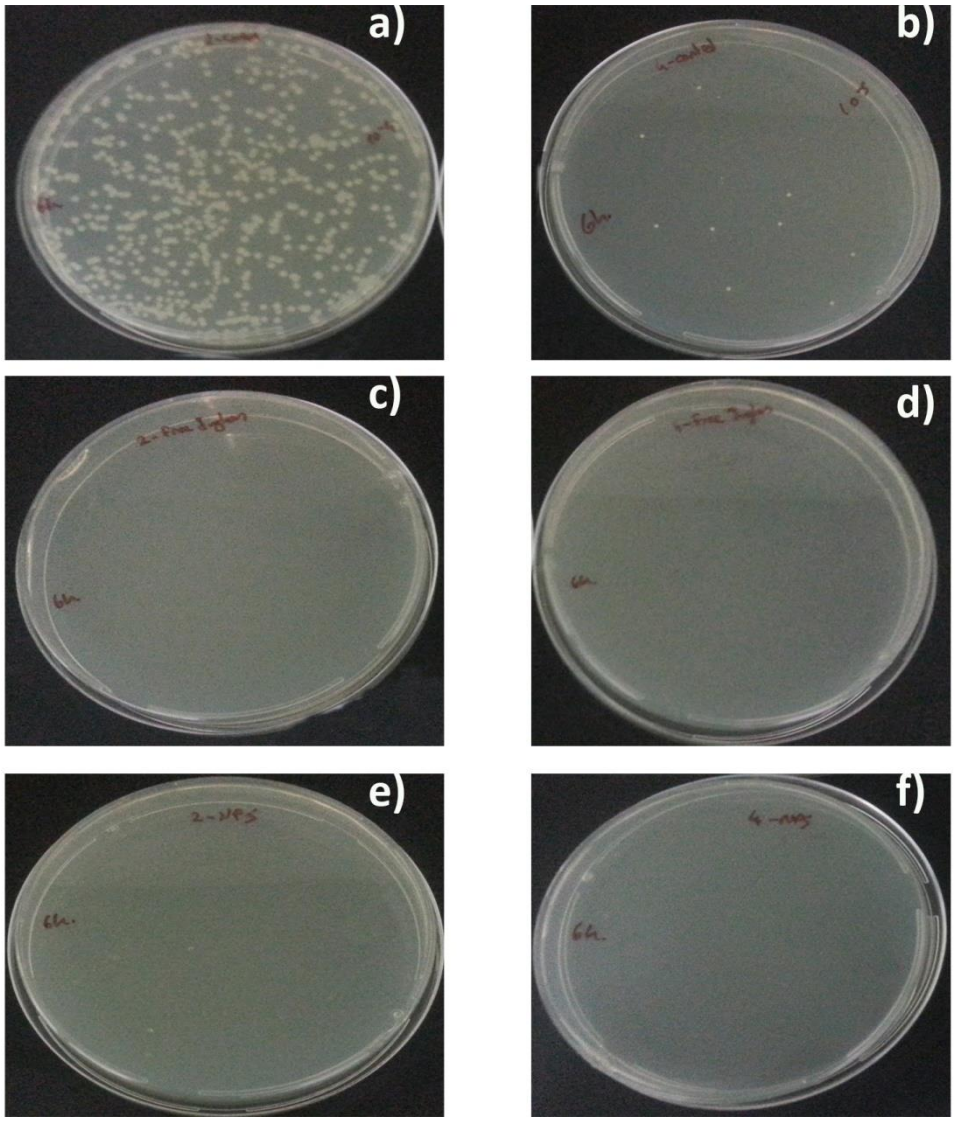
hem serbest juglon hem de J-NP5'in yüzde indirgeme oranının % 100 olduğu gözlenmiştir.



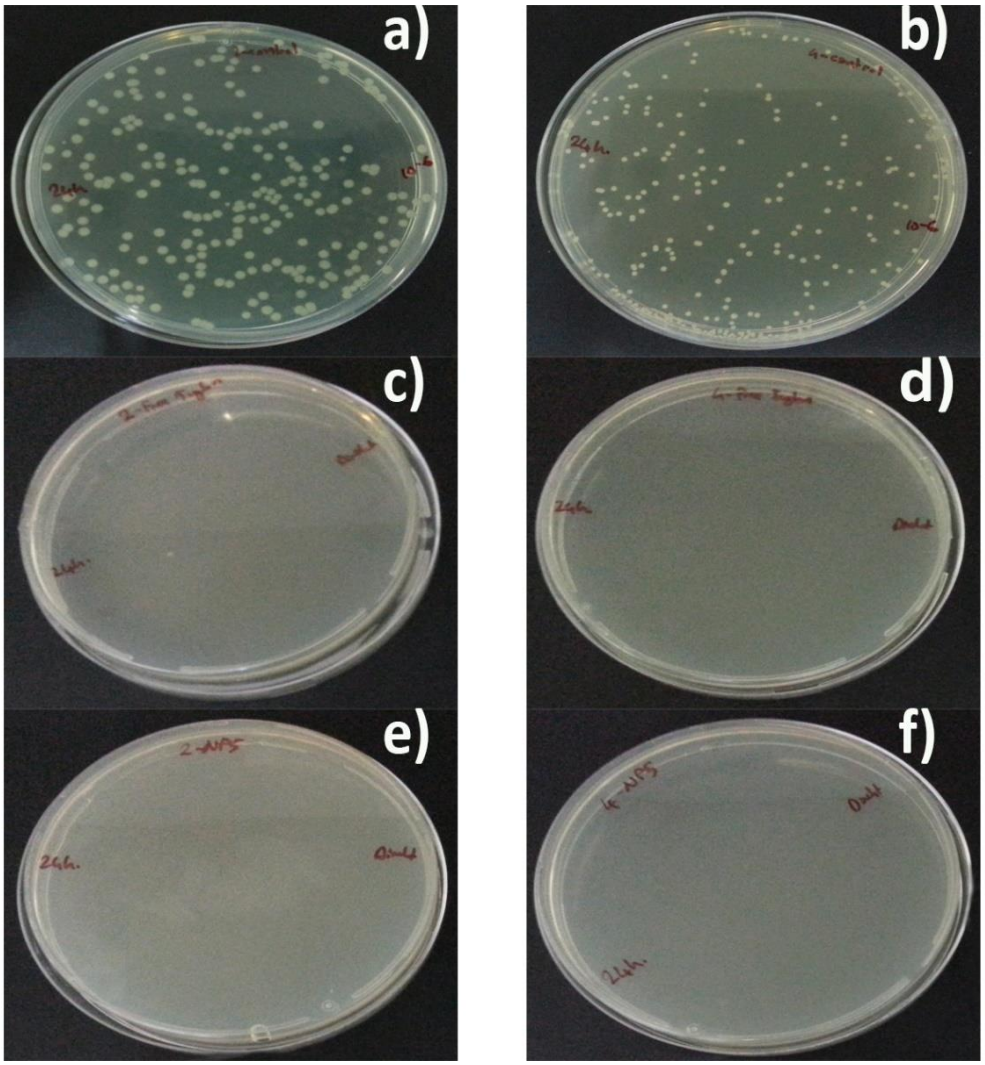
Şekil 4.5 Yüzde indirgeme 0. Saatteki sonuçları (Tüm gruplarda 100 kat seyreltme vardır) a) *E.coli*'de kontrol b) *S. aureus*'da kontrol c) *E.coli*'de serbest juglon d) *S. aureus*'da serbest juglon e) *E.coli*'de J-NP5 f) *S. aureus*'da J-NP5



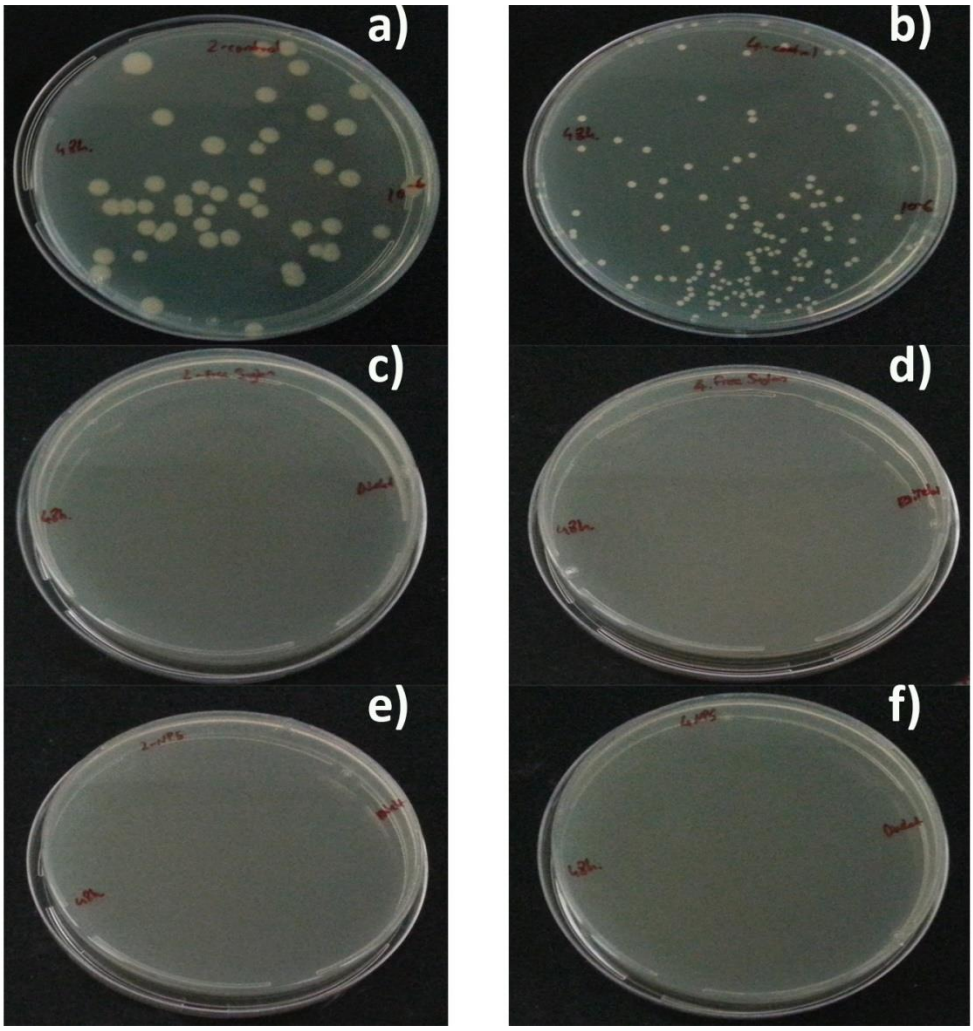
Şekil 4.6 Yüzde indirgeme 3. saat sonuçları (Kontrol grubu 10^6 seyreltilmiş; diğerleri direk ekim görüntüleridir) a*) E. coli*'de kontrol b) *S. aureus*'da kontrol c) *E.coli*'de serbest juglon d) *S. aureus*'da serbest juglon e) *E.coli'*de J-NP5 f) *S. aureus*'da J-NP5



Şekil 4.7 Yüzde indirgeme 6. saat sonuçları (Kontrol grubu 10^6 seyreltilmiş; diğerleri direk ekim görüntüleridir) a) *E.coli*'de kontrol(b) *S. aureus*'da kontrol c) *E.coli*'de serbest juglon d) *S. aureus*'da serbest juglon e) *E.coli*'de J-NP5 f) *S. aureus*'da J-NP5



Şekil 4.8 Yüzde indirgeme 24. saat sonuçları (Kontrol grubu 10^6 seyreltilmiş; diğerleri direk ekim görüntüleridir) a) *E.coli*'de kontrol b) *S. aureus*'da kontrol c) *E.coli*'de serbest juglon d) *S. aureus*'da serbest juglon e) *E.coli*'de J-NP5 f) *S. aureus*'da J-NP5



Şekil 4.9 Yüzde indirgeme 48. saat sonuçları (Kontrol grubu 10^6 seyreltilmiş; diğerleri direk ekim görüntüleridir) a) *E.coli*'de kontrol b) *S. aureus*'da kontrol c) *E.coli*'de serbest juglon d) *S. aureus*'da serbest juglon e) *E.coli*'de J-NP5 f) *S. aureus*'da J-NP5

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Juglon gibi allelokimyasal maddelerin gerek bitkiler gerekse mikroorganizmalar üzerinde çoğunlukla inhibisyon etki gösterdiği bilinmektedir. Bu durum allelokimyasal maddenin çeşidine, konsantrasyonuna ve mikroorganizmanın türüne göre değişmektedir. Bu çalışmada juglon allelokimyasalının nanopartikül formülasyonu (J-NP5) ile serbest formunun antibakteriyel aktivitesi; *S. aureus* ve *E. coli* türleri üzerinde üç farklı yöntemle araştırılmıştır.

Agar kuyucuk yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre hem J-NP5 hem de serbest juglonun antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Daha önce Qa'dan ve arkadaşları tarafından *Psidium guajava* ve *Juglans regia* bitkilerinin yapraklarının özütleriyle disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada Propionibacterium acnes, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermisis* bakterilerinde sırası ile oluşan inhibisyon zon çapları 15.8-17.6 mm, 11.3-15.7 mm ve 12.9-15.5 mm olarak ölçülmüştür [140]. Krajci ve Lynch yaptıkları çalışmada juglon ve ceviz özütlerini çeşitli konsatrasyonlarda uygulamış (1,0 – 0.0156 mg.ml-1) ve kullandıkları bütün mikroorganizmalarda juglonun ve ceviz özütünün inhibe edici etkisini göstermişlerdir [27]. Abbas tarafından 11 farklı mikroorganizma kullanılarak juglonun (DMSO; 0,1 mg.ml-1) antibakteriyel etkisini belirlemek için yapılan çalışmada; agar kuyucuk yönteminde *S. aureus* için 29,3 mm inhibisyon çapı tespit edilmiş ve *E. coli* için antibakteriyel aktivite gözlenmemiştir [10]. Serbest juglonla yürütülen çalışmamızda antibakteriyel aktivite; juglonun, hidrofobik karakterinden dolayı suda iyi çözünmemesi ve agar yüzeyinde yeterince difüze olmamasından dolayı düşük bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen serbest juglona ait inhibisyon zon çaplarının literatürdeki

çalışmalardan farklı oluşunun en önemli sebebi kullanılan çözücü farklılığıdır. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde iki önemli sonuca ulaşılmıştır:

- Çeşitli çözücüler kullanılarak elde edilmiş bitki ekstraktlarında var olan juglonun antibakteriyal özelliğinin test edilmesi: Bitki ekstraklarında juglonla birlikte var olan diğer sekonder metabolitlerin sinerjik etki göstererek antibakteriyal etkiyi artırdığı düşünülmektedir [29] [141].
- Serbest juglonun çeşitli çözücüler içerisinde homojenize edilerek antibakteriyal çalışmaların gerçekleştirilmesi: Suda çözünmeyen juglonun alkol, DMSO gibi çözücülerle çözdürülmesinden dolayı çözücülerden kaynaklı antibakteriyal aktivitenin yüksek olduğu düşünülmektedir [142]. Nitekim literatürde Park ve İkegaki tarafından yapılan çalışmada, propolisin etanol ve sulu ekstrakları antibakteriyel aktivite açısından karşılaştırılmıştır [143]. Bu çalışmada: %10-20 etanol ekstraktının hiçbir antibakteriyal aktiviteye sahip olmadığı ancak %30 etanol ekstratında mikrobiyal inhibisyonun gözlendiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada propolisin %60-80 etonol ekstraktının güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum etanol konsantrasyonun antibakteriyal aktivite üzerinde önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan çözücüler yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir.

PLGA nanopartikül sistemler, juglon gibi hidrofobik etkenlerin çözünürlüğünü arttırmasından dolayı J-NP5'in antibakteriyel aktivitesi serbest juglona göre daha etkili bulunmuştur. Juglonun nanopartikül formulasyonunun antibakteriyel aktivitesi, ilk defa bu çalışmada gerçekleştirildiğinden literatürde nanopartikül formülasyonuyla karşılaştırılacak veri bulunamamıştır. Nitekim literatürde, PLGA nanopartikül sistemlerin inert oluşu ve hidrofobik etkenlerin çözünürlüğünü arttırmasından dolayı antibakteriyel tedaviye yönelik ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmasının avantajlı olduğu belirtilmektedir.

Clark ve arkadaşlarının juglonun bir kısım bakteri ve fungus üzerinde yaptığı antibakteriyel etkileri ile ilgili çalışmasında bakteriler arasında en düşük MİK değeri *Saccharomyces cerevisia* 0.39 µg/ml olarak bulurlarken, en yüksek MİK değeri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* türleri için 12.5 µg/ml olarak bulmuşlardır. *E.*

coli de dâhil olmak üzere Gram negatif bakterilerde antibakteriyel aktivite gözlenmediği rapor edilmiştir [15]. Zakavi ve arkadaşlarının ağız florasında yer alan bakterilerden *S. aureus* üzerine *Juglans regia* kabuğunun sulu ve etanolik özütlerini kullanarak yaptığı çalışmada; sulu özüt için 125 µg/ml ve etanolik özütte ise 2 µg/ml MİK değerleri tespit edilmiştir [14]. Abbas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *Juglans regia* varyetelerinden Şebin özütünün ve juglonun *S. aureus* bakterisine ait MİK değerleri sırasıyla 65 µg/ml ve 6.25 µg/ml olarak tespit edilmiştir [10]. Yapılan çalışmalarda saptanan MİK değerlerinin özellikle özütlerde farklılık göstermesi özütleme süreçlerinin değişkenliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz MİK değerleri serbest juglon yerine enkapsüle juglon konsantrasyonu esas alınarak değerledirildiğinden literatürde yer alan MİK değerlerinden çok daha düşüktür. Ayrıca yukarıda bahsedilen bitkinin özütlenmesiyle elde edilen ekstratlardaki metabolitlerin sinerjik etkisi ve farklı çözücülerin kullanılması faktörleri de MİK sonuçlarına etki eden diğer unsurlardır.

Yüzde indirgeme yönteminde ise ilk üç saatte salımın büyük bir kısmının gerçekleşmesinden dolayı J-NP5 ve serbest juglon arasında önemli bir fark tespit edilememiştir. Metod sonuçları incelendiğinde hem serbest juglon hem de J-NP5 3. saatten itibaren çalışılan test bakterileri üzerinde güçlü bir antibakteriyel etki göstermiş ve aynı anda yapılan standart petri sayım yönteminde hiçbir bakteri üremesi gözlenmemiştir. Bu metodla elde edilen güçlü antibakteriyal sonuçların metottan kaynaklandığı düşünülmektedir. Broth mikrodilüsyon metodunda son hacim 300 µl iken, yüzde indirgeme metodunda 5 ml dir. İlaveten yüzde indirgeme metodunda hem serbest juglon hemde J-NP5; içerisinde yaklaşık 106 bakteri içeren 5 ml lik NB besiyerine doğrudan ilave edilirken, broth mikrodilüsyon metodunda test maddeleri bakteri içermeyen steril NB besiyerinde çözünürken bu çözeltiden sadece 250 µl alınarak mikrokuyucuk plağına eklenmiştir. Bundan dolayı broth mikrodilüsyon yönteminde düşük hacimde çok az miktarda etken madde (J-NP5 ve serbest juglon) bulunurken, yüzde indirgeme metodunda miktar bakımından daha fazla etken aynı konsantrasyondaki bakteriye maruz bırakılmaktadır. Çünkü yüzde indirgeme metodunda test örneği doğrudan ve sürekli bakteri ile etkileşime girerken, broth mikrodilüsyon metodunda sadece kuyucuğa ilave edilen miktardaki test örneği bakteri

ile etkileşime girmektedir [142]. Bu yüzden yüzde indirgeme metodunda antibakteriyel aktivite, diğer yönteme kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir.

Araştırmamızda elde ettiğimiz antibakteriyel sonuçlar; hem serbest juglonun hem de J-NP5 nanopartikülünün antibakteriyel etkisinin, Gram negatif bakteri ile karşılaştırıldığında Gram pozitif bakteriler üzerinde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum çalışmada kullanılan bakterilerin hücre duvar yapısı ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çünkü Gram negatif mikroorganizmaların dış membran yapısı hem serbest juglonun hem de nanopartikül formülasyonunun hücre içine penetrasyonunun sınırlayan veya engelleyen koruyucu katmanlar içermektedir [142]. Ayrıca literatür çalışmalarında belirtildiği gibi serbest juglon Gram pozitif bakteriler üzerine daha etkili bir antibakteriyel ajandır.

Sonuç olarak PLGA nanopartiküler sistem içerisine juglonun enkapsülasyonu, serbest juglon ile karşılaştırıldığında antibakteriyel etkiyi artırmıştır. Ayrıca daha önceki çalışmamızda serbest juglonla kıyaslandığında enkapsüle juglonun % hücre canlılığı oranlarının daha yüksek olması J-NP5'in serbest juglona göre daha az toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir [137]. Bu durum etkenlerin toksisitesinin polimer partiküler ilaç taşıyıcı sistemler oluşturulmasıyla düşürüldüğünü göstermektedir. Bu bağlamda enkapsüle juglon, serbest juglona göre daha az toksisitesi ve antibakteriyel tedaviye yönelik kayda değer bir kullanılabilirliğe sahiptir. Sonuçta, PLGA nanopartikül sistemler; juglonun çözünürlüğünü, biyouyumluluğunu ve biyoyararlanımını artırmakta dolayısıyla biyoaktivitesini yükseltmektedir.

Juglonun doğal bir parvulin inhibitörü olması açısından, polimerik nanopartiküler ilaç sistemleri tasarlayarak bakteriyel parvulinlere hedeflenmesi ilerleyen çalışmalarda düşünülebilir. Ayrıca Radovic ve arkadaşlarının çalışmalarında [127] yer aldığı gibi insan vücudundaki enfeksiyon bölgesinde yüzey yükü anahtarlama mekanizmasını aktive edilmesiyle bakteriyel yüzey yüküne hedefli enkapsüle juglon içeren PLGA nanopartikül sistemleri geliştirilebilir. Bu sayede juglon diğer hücrelere en az düzeyde toksisiteye sebep olacak şekilde antibakteriyel tedaviye yönelik rahatlıkla kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalar için gerekli in vivo ve faz çalışmaları önerilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Desai, M.P. vd., (1997). "The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells is Size Dependent", Pharmaceutical Research, 14(11): 1568-1573.

[2] Panyam, J. ve V. Labhasetwar, (2012). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", Advanced Drug Delivery Reviews, 55(3): 329-347.

[3] Desai, M.P., vd., (1996). "Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size", Pharmaceutical Research, 13(12): 1838-1845.

[4] İsmail, K., (2006). Allelopati, Bizim Büro Basım Yayınevi, Ankara, Türkiye.

[5] Altikat, S., vd., (2013). "Allelopathic Effects of Juglone on Growth of Cucumber and Muskmelon Seedlings with Respect to Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation", Journal of Environmental Protection and Ecology, 14(3 a): 1244-1253.

[6] Kocacaliskan, İ. ve Terzi, İ., (2001). "Allelopathic Effects of Walnut Leaf Extracts and Juglone on Seed Germination and Seedling Growth", Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76(4): 436-440.

[7] Terzi, İ.,vd., (2003). "Effects of Juglone on Growth of Cucumber Seedlings with Respect to Physiological and Anatomical Parameters" Acta Physiologiae Plantarum, 25(4): 353-356.

[8] Topal, S., vd., (2007). "Herbicidal effects of juglone as an allelochemical" Phyton, 46(2): 259-269.

[9] Dama, L., B. Poul, ve B. Jadhav, (1998). "Antimicrobial activity of naphthoquinonic compounds", Journal of Ecotoxicology & Environmental Monitoring, 8(3): 213-215.

[10] Albayrak, A., (2006). Ceviz Yaprak Özütleri ve Juglonun Bazı Mikroorganizmalar Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kütahya.

[11] Oliveira, I., vd., (2008). "Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husks", Food and Chemical Toxicology, 46(7): 2326-2331.

[12] Xu, H., vd., (2013). "Juglone, Isolated from *Juglans mandshurica Maxim*, Induces Apoptosis via Down-Regulation of AR Expression in Human Prostate Cancer LNCaP Cells", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.

[13] Tan, D.T.C., vd., (2012). "Synthesis and Antibacterial Activity of Juglone Derivatives", Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 6(1): 84-89.

[14] Zakavi, F., (2013). "Antibacterial effect of Juglansregia bark against oral pathologic bacteria", International Journal of Dentistry.

[15] Clark, A.M., T.M. Jurgens, ve C.D. Hufford, (1990). "Antimicrobial activity of juglone" Phytotherapy Research, 4(1): 11-14.

[16] Montenegro, R.C., vd., (2010). "Cytotoxic Activity of Naphthoquinones with Special Emphasis on Juglone and Its 5-O-methyl Derivative", Chemico-Biological Interactions, 184(3): 439-448.

[17] Bonjar, G.S., S. Aghighi, ve A.K. Nik, (2004) "Antibacterial and Antifungal Survey in Plants Used in Indigenous Herbal-Medicine of South East Regions of Iran, Journal of Biological Sciences, 4(3): 405-412.

[18] Bonjar, G.S., (2004). Anti Yeast Activity of Some Plants Used in Traditional Herbal Medicine of Iran, J Biol Sci, 2004. (4): 212-5.

[19] Sugie, S., vd., (1998). "Inhibitory Effects of Plumbagin and Juglone on Azoxymethane-Induced Intestinal Carcinogenesis in Rats", Cancer letters, 127(1): 177-183.

[20] Kiran Aithal, B., vd., (2009). "Juglone, a Naphthoquinone from Walnut, Exerts Cytotoxic and Genotoxic Effects Against Cultured Melanoma Tumor Cells", Cell Biology International, 33(10): 1039-1049.

[21] Paulsen, M.T. ve M. Ljungman, (2005). "The Natural Toxin Juglone Causes Degradation of p53 and Induces Rapid H2AX Phosphorylation and Cell Death in Human Fibroblasts", Toxicology and Applied Pharmacology, 209(1): 1-9.

[22] Xu, H.-L., vd., (2010). "Anti-proliferative Effect of Juglone from *Juglans mandshurica Maxim* on Human Leukemia Cell HL-60 by Inducing Apoptosis Through the Mitochondria-Dependent Pathway", European Journal of Pharmacology, 645(1): 14-22.

[23] Bhosale, S., vd., (1999). "Pharmacological Studies of Isomeric Juglones on the Isolated Frog Heart", Indian Journal of Pharmacology, 31(3): 222.

[24] Lee, C.-H., B.-K. Sung, ve H.-S. Lee, (2006). "Acaricidal Activity of Fennel Seed Oils and Their Main Components Against *Tyrophagus putrescentiae*, a Stored-Food Mite", Journal of Stored Products Research 42(1): 8-14.

[25] Chobot, V. ve F. Hadacek, (2009). "Milieu-Dependent Pro-And Antioxidant Activity of Juglone May Explain Linear and Nonlinear Effects on Seedling Development", Journal of Chemical Ecology, 35(3): 383-390.

[26] Yiğit, D., vd., (1993). "Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyal Aktivitesi", Türk Mikrobiyol Cem Derg, 39(1-2): 7-11.

[27] Krajci, W. ve D. Lynch, (1977) "Inhibition of Various Microorganisms by Crude Walnut Hull Extracts and Juglone", Microbios Letters, 4: 175-181

[28] Pereira, J.A., vd., (2007). "Walnut (*Juglans regia* L.) Leaves: Phenolic Compounds, Antibacterial Activity and Antioxidant Potential of Different Cultivars", Food and Chemical Toxicology, 45(11): 2287-2295.

[29] Sharma, N., vd., (2009) "Microwave-Assisted Efficient Extraction and Stability of Juglone in Different Solvents from *Juglans regia*: Quantification of Six Phenolic Constituents by Validated RP-HPLC and Evaluation of Antimicrobial Activity", Analytical Letters, (16): 2592-2609.

[30] Köroğlu, M., (2013). Ultrasonik Sprey Piroliz Ve Hidrojen Redüksiyonu Yöntemi ile (usp-hr) Nano Yapılı Gümüş–Bakır Alaşım Partiküllerinin Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniveristesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[31] Sharifzadeh, M., (2006) Nanotechnology Sector Report, Cronus Capital Markets, 1st Quarter.

[32] Schrödinger, E., (1944). What is life? Cambridge University Press.

[33] Luther, D.W., (2006). International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology.

[34] Ramsden, J., (2009). Essentials of Nanotechnology, Ventus Publishing Aps.

[35] Jones, R., (2006). "What can biology teach us?" Nat Nanotechnol, 1(2): 85-86.

[36] Cliffel, D.E., B.N. Turner, ve B.J. Huffman, (2009). "Nanoparticle-based biologic mimetics. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. 1(1): 47-59.

[37] Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nanotechnology. in Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering.

[38] K. Eric Drexler, (1981). "Molecular Engineering: An Aproach to the Development of General Capalities for Molecular Manipılation", Proceedings of the National Academy for Molecular Manipulation, 78(9): 5275-78.

[39] Regan, Lynne, ve William F. DeGrado. (1988). "Characterization of a helical protein designed from first principles." Science, (241): 976-78.

[40] Erkoç, Ş.,(2007). Nanobilim ve Nanoteknoloji, ODTÜ Yayıncılık.

[41] "IBM" atoms. (1990). http://www-03.ibm.com/ibm/history/exhibits/vintage/vintage_4506VV1003.html 22 Aralık 2015.

[42] Milburn, C., (2011). "Just for Fun: The Playful Image of Nanotechnology", NanoEthics, 5(2): 223-232.

[43] Presting, H. ve U. König, (2003). "Future Nanotechnology Developments for Automotive Applications", Materials Science and Engineering, 23(6): 737-741.

[44] Mukhopadhyay, A.K., (2011). "Next-generation Nano-based Concrete Construction Products: a Review, in Nanotechnology in Civil Infrastructure", Springer, 207-223.

[45] Sanchez, F. ve K. Sobolev, (2010). "Nanotechnology in Concrete – a Review", Construction and Building Materials, 24(11): 2060-2071.

[46] Roco, M.C., (2001). "International Strategy for Nanotechnology Research", Journal of Nanoparticle Research, 3(5-6): 353-360.

[47] Yalçın, K.A., (2010). Nanoteknoloji ve Gıda Sanayiinde Uygulama Alanları, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Namık Kemal Üniversitesi.

[48] Allen, T.M. ve P.R. Cullis, (2004). "Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream" Science, 303(5665): 1818-1822.

[49] Saltzman, W.M., (2001). Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy, Oxford University Press, USA.

[50] Couvreur, P. ve C. Vauthier, (2006). "Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease", Pharmaceutical Research, 23(7): 1417-1450.

[51] Kavaz, D., (2011). "Nanopartiküller", Nanobülten, Aylık Nanoteknoloji Ve Nanotıp Dergisi, (13):12-19.

[52] Fung, L.K. ve W.M. Saltzman, (1997). "Polymeric Implants for Cancer Chemotherapy", Advanced Drug Delivery Reviews, 26(2): 209-230.

[53] Markland, P. ve V.C. Yang, (2002). "Biodegradable Polymers as Drug Carriers", Encyclopedia of Pharmaeutical Technology, (1): 176-193.

[54] Danhier, F., vd., (2012). "PLGA-based Nanoparticles: an Overview of Biomedical Applications", Journal of Controlled Release, 161(2): 505-522.

[55] Kumari, A., S.K. Yadav, ve S.C. Yadav, (2010). "Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 75(1): 1-18.

[56] Prokop, A. ve J.M. Davidson, (2008). "Nanovehicular Intracellular Delivery Systems", Journal of Pharmaceutical Sciences, 97(9): 3518-3590.

[57] Makadia, H.K. ve S.J. Siegel, (2011). "Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier", Polymers, 3(3): 1377-1397.

[58] Vasir, J.K. ve V. Labhasetwar, (2007). Biodegradable Nanoparticles for Cytosolic Delivery of Therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. 5(8): 718-728.

[59] Yenice, İ., (2001). Ortopedide Kullanılan Biyoparçalanır Polimerler ile Hazırlanan Teikoplanin İçeren Mikropartiküler Sistemli İmplantların Formülasyonu ve in vitro / in vivo Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Hacettepe Üniversitesi.

[60] Nasir, A., A. Kausar, ve A. Younus, (2015). "A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials" Polymer-Plastics Technology and Engineering, " 54(4): 325-341.

[61] Rao, J.P. ve K.E. Geckeler, (2011). "Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters", Progress in Polymer Science, 36(7): 887-913.

[62] Nagavarma, B., vd., (2012) "Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles—a Review" Asian J. Pharm. Clin. Res, 5(3): 16-23.

[63] Seigler, D.S., (1996) "Chemistry and Mechanisms of Allelopathic Interactions. Agronomy Journal.

[64] Yergin Özkan, R., (2014). Küçük Tohumlu Yonca Küskütü'nün Çimlenme Fizyolojisi ve Çıkış Özellikleri ile Bazı Bitkilerin Küçük Tohumlu Yonca Küskütüne ve Yonca'ya Allelopatik Etkilerinin Belirlenmesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüzüncü yıl Üniversitesi.

[65] Dorota Soltys, U.K., Renata Bogatek ve Agnieszka Gniazdowska, (2013). "Allelochemicals as Bioherbicides — Present and Perspectives",

[66]. Tüzün, C., (1999). Organik Kimya. Palme Yayın Dağıtım, Ankara.

[67] Inbaraj, J.J. ve C.F. Chignell, (2004). "Cytotoxic Action of Juglone and Plumbagin: a Mechanistic Study Using HaCaT Keratinocytes", Chemical Research in Toxicology, 17(1): 55-62.

[68] Willis, R. J. (2007). The history of allelopathy. Springer Science & Business Media.

[69] Hale, M. G., & Orcutt, D. M. (1987). The physiology of plants under stress. John Wiley & Sons.

[70] Stickney, J.S., ve P.R. Hoy, (1881). "Toxic action of black walnut", Transactions of the Wisconsin Horticultural Society.

[71] Berntsen, A., ve A. Semper, (1887). "Ueber die Constitution des Juglons und Seine Synthese aus Naphtalin", Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft (20): 934–994.

[72] Massey, A., (1925). "Antagonism of the Walnuts (*Juglans nigra* L. and *J. cinerea* L.) in Certain Plant Associations", Phytopathology.

[73] Schneiderhan, F. J. (1927). "The Black Walnut (*Juglans nigra* L.) as a Cause of the Death of Apple Trees", Phytopathology, (17): 529-40.

[74] Davis, E.F., (1928). "The Toxic Principle of *Juglans nigra* as Identified with Synthetic Juglone and Its Toxic Effects on Tomato and Alfalfa Plants" Am. J. Bot, 15(10): 620.

[75] MacDaniels, L.H., ve W.C. Muenscher, (1941) "Black Walnut toxicity", Northern Nut Growers Association Annual Report, 31: 172–179.

[76] Brooks, M., (1951). "Effects of Black Walnut Trees and Their Products on Other Vegetation", WV. Agricultural Extension State Bulletin, 347.

[77] Kocacaliskan, I vd., (2001). "Allelopathic Effects of Walnut Leaf Exctracts and Juglone on Seed Germination and Seedling Growth", Journal of Horticultural Sicence&Biotechnology, 436-40.

[78] De Scisciolo, B., D.J. Leopold, ve D.C. Walton, (1990). "Seasonal Patterns of Juglone in Soil beneath *Juglans nigra* (Black Walnut) and Influence of *J. nigra* on Understory Vegetation", Journal of Chemical Ecology, (16): 1111–1130.

[79] von Kiparski, G.R., L.S. Lee, ve A.R. Gillespie, (2007). "Occurrence and Fate of the Phytotoxin Juglone in Alley Soils Under Black Walnut Trees", Journal of Environmental Quality, 709–717.

[80] Lee, K.-C. ve R. Campbell, (1960). "Nature and Occurrence of Juglone in *Juglans nigra* L.", HortScience.

[81] Babula, P., vd., (2009). "Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones - their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis", Current Pharmaceutical Analysis, 5(1): 47-68.

[82] Müller, W.-U. ve E. Leistner, (1976). "1, 4-Naphthoquinone, an Intermediate in Juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) Biosynthesis", Phytochemistry,15(3): 407-410.

[83] Zhang, P., (2008). "MetaCyc Pathway: Juglone Biosynthesis" Erişim web sitesi: http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5795&detail-level=3#.

[84] Fang, F., vd., (2015). "Juglone Exerts Antitumor Effect in Ovarian Cancer Cells", Iran J Basic Med Sci, 18(6): 544-8.

[85] Seçmen, Ö., Gemici,Y., Görk, G., Berkat,L., Leblebici, E., (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi.

[86] Thakur, A. (2011). "Juglone: A Therapeutic Phytochemical from *Juglans regia* L.", Journal of Medicinal Plants Research, 5(22): 5324-5330.

{87] Akbaş, H., (1993). Farklı Yöre Çeşitlerden Derlenen Cevizlerin Teknolojik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Samsun 19 Mayıs Ünivesitesi Gıda Mühendisliği Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı.

[88] Bertin, C., X. Yang, ve L.A. Weston, (2003). "The Role of Root Exudates and Allelochemicals in the Rhizosphere", Plant and Soil, 256(1): 67-83.

[89] Hejl, A.M. ve K.L. Koster, (2004). "Juglone Disrupts Root Plasma Membrane H+-ATPase Activity and Impairs Water Uptake, Root Respiration and Growth in Soybean (Glycine max) and Corn (Zea mays)" Journal of Chemical Ecology, 30(2): S. 453-471.

[90] Duroux, L., vd., (1998). "Insight Into Naphthoquinone Metabolism: β-glucosidase-catalysed Hydrolysis of Hydrojuglone β-D-glucopyranoside", Biochem. J, (333): 275-283.

[91] Jose, S. ve A.R. Gillespie, (1998). "Allelopathy in Black Walnut (*Juglans nigra* L.) Alley Cropping. II. Effects of Juglone on Hydroponically Grown Corn (Zea maysL.) and Soybean (Glycine maxL. Merr.) Growth and Physiology", Plant and soil, 203(2): 199-206.

[92] Hejl, A.A., F.A. Einhellig, ve J.A. Rasmussen, (1993). "Effects of Juglone on Growth, Photosynthesis, and Respiration", Journal of Chemical Ecology, 19(3): 559-568.

[93] Mahoney, N., R.J. Molyneux, ve B.C. Campbell, (2000). "Regulation of Aflatoxin Production by Naphthoquinones of Walnut (*Juglans regia*)", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(9): 4418-4421.

[94] Hai-Hang Li, H.N., Koji Hasegawa ve Junya Mizutani, (1993). "Some Physiological Effects and The Possible Mechanism of Action of Juglone in Plants", Weed Research, Japan, 38(3): 214-222.

[95] Hennig, L., vd., (1998). "Selective Inactivation of Parvulin-like Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerases by Juglone", Biochemistry, 37(17): 5953-60.

[96] Andreotti, A.H., (2003). "Native State Proline Isomerization: an Intrinsic Molecular Switch", Biochemistry, 42(32): 9515-9524.

[97] Rahfeld, J.U., vd., (1994). "A Novel Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase from *Escherichia coli*", FEBS letters, 343(1): 65-69.

[98] Göthel, S. ve M. Marahiel, (1999). "Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerases, a Superfamily of Ubiquitous Folding Catalysts" Cellular and Molecular Life Sciences, 55(3): 423-436.

[99] Fila, C., C. Metz, ve P. van der Sluijs, (2008). "Juglone Inactivates Cysteine-Rich Proteins Required for Progression Through Mitosis", Journal of Biological Chemistry, 283(31): 21714-21724.

[100] Rostam, M.A., vd., (2015). "Peptidyl-prolyl Isomerases: Functionality and Potential Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease" Clin Exp Pharmacol Physiol, 42(2): 117-24.

[101] Chiasson, V.L., vd., (2011). "Pin1 Deficiency Causes Endothelial Dysfunction and Hypertension" Hypertension, 58(3): 431-438.

[102] Ourique, F., vd., (2015). "DNA Damage and Inhibition of Akt Pathway in mcf-7 Cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in Combination with Ascorbate", Oxid Med Cell Longev, 2015: 495305.

[103] Inouye, H., ve E. Leistner, (1988). Biochemistry of Quinones. In the Quinonoid Compounds, John Wiley & Sons, Rappoport. Vol. 2., New York.

[104] Schmidt, S.K., (1988). "Degradation of Juglone by Soil Bacteria", Journal of Chemical Ecology, 14: 1561–1571.

[105] Rudd, K.E., vd., (1995). "A New Family of Peptidyl-prolyl Isomerases", Trends in Biochemical Sciences, 20(1): 12-14.

[106] Fanghänel, J. ve G. Fischer, (2004). "Insights into the Catalytic Mechanism of Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerases", Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library, (9): 3453-3478.

[107] Mueller, J.W., vd., (2006). "Characterization of Novel Elongated Parvulin Isoforms that are Ubiquitously Expressed in Human Tissues and Originate from Alternative Transcription Initiation", BMC Molecular Biology, 7(1): 9.

[108] Terada, T., vd., (2001). "Solution Structure of the Human Parvulin-like Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase, hPar14", Journal of Molecular Biology, 305(4): 917-926.

[109] Kühlewein, A., vd., (2004). "Solution Structure of *Escherichia coli* Par10: The Prototypic Member of the Parvulin Family of Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerases", Protein Science, 13(9): 2378-2387.

[110] Tossavainen, H., vd., (2006). "NMR Solution Structure and Characterization of Substrate Binding Site of the PPIase Domain of PrsA Protein from *Bacillus subtilis*", FEBS Letters, 580(7): 1822-1826.

[111] Landrieu, I., vd.,(2002). "Solution Structure of the Single-Domain Prolyl cis/trans Isomerase PIN1 at from *Arabidopsis thaliana*", Journal of Molecular Biology, 320(2): 321-332.

[112] Bitto, E. ve D.B. McKay, (2002). "Crystallographic Structure of SurA, a Molecular Chaperone that Facilitates Folding of Outer Membrane Porins" Structure, 10(11): 1489-1498.

[113] Li, Z., vd., (2005). "The Structure of the *Candida albicans* Ess1 Prolyl Isomerase Reveals a Well-Ordered Linker That Restricts Domain Mobility", Biochemistry, 44(16): 6180-6189.

[114] Mueller, J.W. ve P. Bayer, (2008). "Small Family with Key Contacts: par14 and par17 Parvulin Proteins, Relatives of pin1, Now Emerge in Biomedical Research", Perspectives in Medicinal Chemistry, 2: 11.

[115] Whitesides, G.M., (2005). "Nanoscience, nanotechnology, and chemistry", Small, 1(2): 172-179.

[116] Gaspar, R., (2013). "Nanoparticles: Pushed Off Target with Proteins", Nature Nanotechnology, 8(2): 79-80.

[117] Siegel, R.A. ve M.J. Rathbone, (2012). "Overview of Controlled Release Mechanisms in Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery", Springer, 19-43.

[118] Thill, A., vd., (2006). "Cytotoxicity of CeO2 Nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism", Environmental Science & Technology, 40(19): 6151-6156.

[119] Soenen, S.J., vd., (2011). "Cellular Toxicity of Inorganic Nanoparticles: Common Aspects and Guidelines for Improved Nanotoxicity Evaluation" Nano Today, 6(5): 446-465.

[120] Umamaheshwari, R. ve N. Jain, (2003). "Receptor Mediated Targeting of Lectin -Conjugated Gliadin Nanoparticles in the Treatment of *Helicobacter pylori*", Journal of Drug Targeting, 11(7): 415-424.

[121] Zhang, L., vd., (2010). "Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery", Current Medicinal Chemistry, 17(6): 585-594.

[122] Ranjan, A., vd., (2009). "Antibacterial Efficacy of Core-Shell Nanostructures Encapsulating Gentamicin Against an in vivo Intracellular *Salmonella* model", International Journal of Nanomedicine, (4): 289.

[123] Mohammadi, G., vd., (2010). "Development of Azithromycin–PLGA Nanoparticles: Physicochemical Characterization and Antibacterial Effect Against *Salmonella typhi*", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 80(1): 34-39.

[124] Mohammadi, G., vd., (2011). "Physicochemical and Anti-bacterial Performance Characterization of Clarithromycin Nanoparticles as Colloidal Drug Delivery System", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 88(1): 39-44.

[125] Dillen, K., vd., (2008). "Adhesion of PLGA or Eudragit®/PLGA Nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*", International Journal of Pharmaceutics, 349(1): 234-240.

[126] Al-Kobaisi, M.F., (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Sultan Qaboos University Medical Journal, 7(3): 273.

[127] Radovic-Moreno, A.F., vd., (2012). "Surface Charge-switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall-targeted Delivery of Antibiotics", ACS Nano, 6(5): 4279-4287.

[128] Topçu, A., Söyletir, G., ve Doğanay, M., (2002). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji içinde: Bakteriyel İnfeksiyonlar, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul. 1564-1575.

[129] Robinson, R.K. ve C.A. Batt, (1999). Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press.

[130] Gönül, S. ve M. Karapınar, (1994). "*Escherichia coli* Patojenitesi ve Gıdalardaki Önemi" Tr. J. of Biology, (18): 47-60.

[131] Bilgehan, H., (1993). Klinik Mikrobiyoloji: Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları (Uygulama Konuları ile), Fakülteler Kitapevi, Barış Yayınları.

[132] İşman ÇokaY, B., (2001). Fish ve Standart Mikrobiyolojik Yöntemlerle Gıda ve Sulardaki Önemli Bakterilerin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.

[133] Cebiroğlu, H., (1998). Dondurulmuş Hamburger Köfte ve Diğer Köfte Çeşitlerinde Enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7 Suşunun Varlığı Üzerine Araştırmalar, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi.

[134] Que, Y.A. ve P. Moreillon, (2010). "*Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock)", Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, (2): 2543-2578.

[135] Moreillon, P., Y. Que, ve M. Glauser, (2005). *Staphylococcus aureus,* Mandel GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease, 6: 2321-51.

[136] Gülmez, D., vd., (2012). "Toplumdan Kazanılmış ve Nozokomiyal *Staphylococcus aureus* Suşlarında SCCmec Tiplerinin ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması: Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları ile Diğer Enfeksiyonların Karşılaştırılması" Mikrobiyol Bul, 46(3): 341-351.

[137] Yelkenci, G., (2015). Juglon Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[138] CLSI, Cockerill, F., (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard, Clinical and Laboratory Standards Institute.

[139] ASTM, (2013). Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions, US.

[140] Qa'dan, F., vd., (2005). "The Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* Leaf Extracts to Acne-developing Organisms", The American Journal of Chinese Medicine, 33(02): 197-204.

[141] Karaman, I., vd., (2003). "Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Juniperus oxycedrus* L.", Journal of Ethnopharmacology, 85(2): 231-235.

[142] Arasoglu, T., S. Derman, ve B. Mansuroglu, (2015). "Comparative Evaluation of Antibacterial Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester and PLGA Nanoparticle Formulation by Different Methods", Nanotechnology, 27(2): 025103.

[143] Park, Y.K. ve M. Ikegaki, (1998). "Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 62(11): 2230-2232.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mustafa KAYA

Doğum Tarihi ve Yeri : 01.01.1990/DENİZLİ

Yabancı Dili : İnglizce-Almanca

E-posta : kaya.kayamustafa@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Cumhuriyet Üniversitesi	2012
Lise	Fen-Matematik	Türk Eğitim Vakfı Anadolu Lisesi	2008