T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RİFAKSİMİN YÜKLÜ MİSELLERİN ÜRETİLMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Seher AR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Serap DERMAN

Eş Danışman

Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI

Ağustos, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RİFAKSİMİN YÜKLÜ MİSELLERİN ÜRETİLMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Seher AR tarafından hazırlanan tez çalışması 14.08.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap DERMAN Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serap DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Ayten KİMİRAN, Üye
İstanbul Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Serap DERMAN ve eş danışmanım Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Rifaksimin Yüklü Misellerin Üretilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Seher AR

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK BİDEB 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

nişanlıma,

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tez konumun belirlenmesi dahil tüm aşamalarda değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen, yol göstericimiz danışman hocam Prof. Dr. Serap DERMAN'a,

Çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle beni hiç yalnız bırakmayan, desteğini ve güvenini her daim hissettiğim eş danışmanım sayın hocam Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI'ya,

Biyouyumluluk analizi için laboratuvarının kapılarını açan, jüri üyesi sayın hocam Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a ve çalışmaları gerçekleştirmemde yardımcı olan Buşra AKGÜL'e,

Antibakteriyel aktivite çalışmalarında laboratuvarını kullanmama olanak tanıyan sayın hocam Doç. Dr. Tülin ÖZBEK'e ve deneylerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Esra BEDİR'e,

Değerli yorumlarıyla tezime katkı sağlayan jüri üyesi sayın hocam Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Tezimi 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

Her soruma büyük bir içtenlikle yanıt veren, yardımını esirgemeyen hocam Arş. Gör. Melis IŞIK TOKSOY'a,

Sonsuz ve koşulsuz sevgileriyle hayatım boyunca her adımımda beni destekleyen, güç veren, gölgelerini hep üzerimde hissettiğim canım Aileme,

Sevgisi, anlayışı ve sabrıyla hep yanımda olan, beni her koşulda destekleyen, motive eden canım Nişanlıma,

Son olarak çalışmalarımı daha keyifli kılan, tüm Derman'S Lab ekibine ve YTÜ 306-307 Polimer ve Aşı Laboratuvarı'nın tüm üyelerine

Teşekkürlerimi sunarım.

Seher AR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v
SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xii
TABLO LİSTESİ xv
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Bakteriyel Enfeksiyonlar 4
2.2 Antibiyotikler 9
2.2.1 Antibiyotiklerin Çeşitleri ve Etki Mekanizmaları 10
2.3 Rifaksimin 26
2.4 İlaçta Çözünürlük ve Çözünürlüğü Artırma Yolları 27
2.4.1 Çözünürlüğün Artırılmasında Nanoteknolojik Yaklaşımlar 30
2.5 Polimerik Nanopartiküller 31
2.5.1 Nanokapsüller ve Nanoküreler 32
2.5.2 Polimerzomlar 32
2.5.3 Dendrimerler 33
2.5.4 Polimerik Miseller 33
3 DENEYSEL YÖNTEM 40
3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 40
3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar 41
3.3 Deneylerde Kullanılan Ölçüm Yöntemleri 43
3.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi 43
3.3.2 Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) 44
3.3.3 Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^{1}H-NMR) Spektroskopisi 44
3.3.4 Floresans Spektroskopisi 44
3.3.5 Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi 45

3.3.6 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılımı 46
3.3.7 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) 48
3.3.8 Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) 49
3.4 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 49
3.4.1 Kitosan Çözeltileri 49
3.4.2 0,01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) 50
3.4.3 DPPH Çözeltisi 50
3.5 Deneysel Yöntem 50
3.5.1 mPEG-*b*-PCL Diblok Kopolimerinin Sentezi 50
3.5.2 Sentezlenen Diblok Kopolimerinin Karakterizasyonu 52
3.5.3 Rifaksimin Yüklü Misellerin Üretilmesi 53
3.5.4 Rifaksimin Yüklü Misellerin Karakterizasyonu 56
3.5.5 Misellerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi 59
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 62
4.1 Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu 62
4.1.1 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması 62
4.1.2 FT-IR Analizi Sonuçları 62
4.1.3 ^{1}H-NMR Analizi Sonuçları 63
4.1.4 GPC Analizi Sonuçları 66
4.1.5 Kritik Misel Konsantrasyonunun (CMC) Belirlenmesi 67
4.2 Rifaksimin Yüklü Misellerin Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu 69
4.2.1 Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması 69
4.2.2 Misel Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu 69
4.2.3 Kitosan Kaplı Misel Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu 71
4.2.4 Ortalama Boyut, PDI ve Zeta Potansiyel Ölçümü 74
4.2.5 Misellerin FT-IR Spektroskopisi Analizi 76
4.2.6 Morfolojik Yapı Tayini 79
4.2.7 *In-Vitro* Salım Çalışması 81
4.2.8 Kolloidal Stabilite 83
4.3 Misellerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi 84
4.3.1 Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi 84
4.3.2 Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi 86
4.3.3 Biyouyumluluk Analizi 87
5 SONUÇ VE ÖNERİLER 90

KAYNAKÇA **94**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **110**

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
d	Yoğunluk
Da	Dalton
dak	Dakika
dk	Dakika
g	Gram
I_{335}	335 nm'deki floresans şiddeti
I_{338}	338 nm'deki floresans şiddeti
kV	Kilovolt
L	Litre
M	Molar
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M_n	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
mV	Milivolt
M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
T	Geçirgenlik
W	Watt
β	Beta
ζ	Zeta potansiyel
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
°C	Derece santigrat

KISALTMA LİSTESİ

ATR	Zayıflatılmış Total Reflektans
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
BDDCS	Biyofarmasötik İlaç Dispozisyon Sınıflandırma Sistemi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BSE	Geri Saçılan Elektronlar
$CDCl_3$	Döterokloroform
$CDCl_3$	Döterokloroform
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
CO_2	Karbondioksit
CS	Kitosan
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH	2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
ELS	Eektroforetik Işık Saçılımı
FBS	Fetal Bovine Serum
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Spektroskopisi)
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LPS	Lipopolisakkarit
MBK	Minimum Bakterisid Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
mPEG	Metoksi poli(etilen glikol)
mPEG-*b*-PCL	Metoksi poli(etilen glikol)-*blok*-poli(ε-kaprolakton)
MRSA	Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
MS	Milattan Sonra

MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
MWCO	Moleküler Ağırlık Ayırma Sınırı
$Na_2HPO_4.7H_2O$	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
NAG	N-asetil glukozamin
$NaH_2PO_4.2H_2O$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NAM	N-asetil muramik asit
OPT-C-M	Optimum Koşullarda Üretilen CS Kaplı Miseller
OPT-M	Optimum Koşullarda Üretilen Miseller
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Poli(etilen glikol)
RFX	Rifaksimin
RNA	Ribonükleik Asit
RV	Reaksiyon Verimi
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SE	İkincil Elektronlar
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu/Mikroskopisi
$Sn(Oct)_2$	Kalay oktoat
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
UDP	Üridin difosfo
UPW	Ultra Saf Su
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
YK	Yükleme kapasitesi
ε-CL	ε-kaprolakton
^{1}H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
7-ASA	7-amino sefalosporanik asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Bakterilerin temel morfolojik yapıları (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir). 6

Şekil 2.2 Bakteri hücresinin genel yapısı. 7

Şekil 2.3 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapısı. 8

Şekil 2.4 Antibiyotiklerin etki mekanizmaları. 10

Şekil 2.5 Hücre duvarı sentezi. 12

Şekil 2.6 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde hücre zarfı yapısı. 16

Şekil 2.7 Bazı rifamisinlerin kimyasal yapıları. 25

Şekil 2.8 Rifaksiminin kimyasal yapısı. 26

Şekil 2.9 Nanokapsül ve nanoküre yapılarının şematik gösterimi. 32

Şekil 2.10 Polimerzom, dendrimer ve polimerik misellerin şematik gösterimi (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir). 32

Şekil 2.11 Misel yapısının şematik gösterimi (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir). 34

Şekil 2.12 Normal ve ters miselin şematik gösterimi 34

Şekil 2.13 Kitosanın kimyasal yapısı. 37

Şekil 2.14 Diyaliz yöntemi ile misel üretiminin şematik gösterimi. 38

Şekil 2.15 İnce film hidrasyon yönteminin şematik gösterimi. 38

Şekil 3.1 Jablonski diyagramı. 45

Şekil 3.2 Işığın sıvı ortamda soğurulması yoluyla Beer-Lambert Yasasının şematik gösterimi. 46

Şekil 3.3 Negatif yüklü bir parçacığın kolloidal ortamda elektriksel potansiyeli. 48

Şekil 3.4 Halka açılması polimerizasyonu ile mPEG-*b*-PCL diblok kopolimer sentezinin şematik gösterimi. 52

Şekil 3.5 Nanoçöktürme yöntemiyle RFX yüklü mPEG-*b*-PCL misellerin üretimi. (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir.) 54

Şekil 4.1 mPEG polimeri, ε-CL ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL kopolimerinin karşılaştırmalı FTIR spektrumları. 63

Şekil 4.2 mPEG polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu. 64

Şekil 4.3 mPEG-*b*-PCL polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu. 65

Şekil 4.4 mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerinin karşılaştırmalı ^{1}H-NMR spektrumları. 65

Şekil 4.5 Sentezlenen mPEG-*b*-PCL kopolimerinin GPC kromatogramı. 66

Şekil 4.6 Değişen kopolimer konsantrasyonuna göre pirenin floresans spektrumları. 68

Şekil 4.7 Pirenin 338 ve 335 nm'deki floresans şiddetlerinin oranının (I_{338}/I_{335}) kopolimer konsantrasyonuna bağlı değişimi. 68

Şekil 4.8 RFX kalibrasyon eğrisi. 69

Şekil 4.9 Misellerin ortalama boyut ve enkapsülasyon etkinliğinin eklenen etkin madde miktarına göre değişimi. 70

Şekil 4.10 %0,25 konsantrasyonda CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan formülasyona ait ortalama boyut ve PDI değerlerinin zamanla değişimi. 72

Şekil 4.11 %0,5 konsantrasyonda CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan formülasyona ait ortalama boyut ve PDI değerlerinin zamanla değişimi. 73

Şekil 4.12 %1 konsantrasyonda CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan formülasyona ait ortalama boyut ve PDI değerlerinin zamanla değişimi. 73

Şekil 4.13 OPT-M örneğinin boyut dağılımı. 75

Şekil 4.14 OPT-C-M örneğinin boyut dağılımı. 75

Şekil 4.15 OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin karşılaştırmalı boyut dağılım grafikleri. 76

Şekil 4.16 Boş mPEG-*b*-PCL misel, optimum koşullarda üretilen RFX yüklü miseller (OPT-M) ve serbest rifaksimine (RFX) ait FT-IR spektrumları. 77

Şekil 4.17 Boş miseller ve OPT-M örneğinin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları. 78

Şekil 4.18 Serbest kitosan (CS) ve optimum koşullarda üretilen miseller (OPT-M) ve kitosan kaplı misellere (OPT-C-M) ait FT-IR spektrumları. 79

Şekil 4.19 Boş misellere ait SEM mikrografı. 79

Şekil 4.20 OPT-M örneğine ait SEM mikrografı. 80

Şekil 4.21 OPT-M örneğinin TEM mikrografı. 80

Şekil 4.22 OPT-C-M örneğine ait TEM mikrografı. 81

Şekil 4.23 OPT-M ve OPT-C-M'nin karşılaştırmalı salım profilleri. 82

Şekil 4.24 Süspansiyon içindeki OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin boyutlarının zamana göre değişimi. 83

Şekil 4.25 Süspansiyon içindeki OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin PDI değerlerinin zamana göre değişimi. 84

Şekil 4.26 DPPH yönteminin mekanizması. 85

Şekil 4.27 DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite analizine ait mikroplaka görüntüsü. 86

Şekil 4.28 RFX, OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin antioksidan aktivitelerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişimi. 86

Şekil 4.29 24 saat için farklı konsantrasyonlarda RFX boş misel OPT-M, OPT-C-M, örnekleri ile muamele edilen L929 hücrelerinin hücre canlılıkları. 88

Şekil 4.30 72 saat için farklı konsantrasyonlarda RFX boş misel OPT-M, OPT-C-M, örnekleri ile muamele edilen L929 hücrelerinin hücre canlılıkları. 89

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Ökaryotik ve prokaryotik hücreler arasındaki temel farklılıklar. 5

Tablo 2.2 BCS'ye göre ilaçların özellikleri. 28

Tablo 2.3 BDDCS'ye göre ilaçların sınıflandırılması. 29

Tablo 2.4 Çözünürlüğü artırmada kullanılan yöntemler. 29

Tablo 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları. 40

Tablo 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları. 41

Tablo 3.3 Misel üretimi optimizasyonunda kullanılan kopolimer ve etkin madde miktarları. 54

Tablo 4.1 Polimer sentezi reaksiyon verimi. 62

Tablo 4.2 mPEG, ε-CL ve mPEG-*b*-PCL FT-IR spektrumlarındaki bantlar ve bu bantların ilişkili olduğu kimyasal bağlar. 63

Tablo 4.3 mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları. 66

Tablo 4.4 GPC analizi sonucu elde edilen Mw değeri. 66

Tablo 4.5 Üretilen misellerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel, RV, EE ve YK değerleri. 70

Tablo 4.6 %0,25 (C-$M_{(0,25)}$), %0,5 (C-$M_{(0,5)}$) ve %1 (C-$M_{(1)}$) CS içeren çözeltilerle hazırlanan formülasyonlara ait ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri. 71

Tablo 4.7 OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyelleri. 76

Tablo 4.8 RFX, boş miseller, OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin *S. aureus* üzerinde ait MİK ve MBK değerleri. 87

ÖZET

Rifaksimin Yüklü Misellerin Üretilmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Seher AR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serap DERMAN

Eş-Danışman: Öğr. Gör. Dr. Pelin PELİT ARAYICI

Rifaksimin (RFX) özellikle enterik patojenler üzerinde etkinliği kanıtlanmış, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Sulu ortamlardaki düşük çözünürlüğü ve buna bağlı olarak sınırlı biyoyararlanımı, terapötik etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Öyle ki yapılan klinik çalışmalar, uygulanan RFX dozunun büyük bir kısmının işleme uğramadan vücuttan atıldığını göstermektedir. Bir etkin maddenin biyoyararlanımı çözünürlüğü ile doğrudan ilişkili olduğundan RFX gibi hidrofobik etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Etkin maddenin, amfifilik moleküllerin sulu ortamlarda kendiliğinden oluşturduğu misellere yüklenmesi bu amaç için kullanılan en temel yöntemlerden biridir. Hidrofobik etkin madde misellere yüklenerek sulu ortamlarda çözünürlüğünün iyileştirilmesinin yanı sıra bozunmaya karşı korunması, kontrollü salım yapılarak doz alım sıklığının azaltılması ve plazmadaki ilaç konsantrasyonunun terapötik pencerede tutulabilmesi sağlanmaktadır. Bu tez kapsamında, RFX etkin maddesinin metoksi poli(etilen glikol)-*blok*-poli(ε-kaprolakton) (mPEG-*b*-PCL) misellere yüklenerek çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının artırılması hedeflenmiştir.

Hedef doğrultusunda ilk olarak mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri, ε-kaprolakton (ε-CL)'un; mPEG'in başlatıcı olduğu, kalay oktoat ($SnOct_2$) katalizörlüğünde ve mikrodalga destekli olarak gerçekleşen halka açılması polimerizasyonuyla sentezlenmiştir. Polimerin başarılı bir şekilde sentezlenmesinin ardından literatürde ilk kez RFX yüklü mPEG-*b*-PCL miseller, nanoçöktürme yöntemiyle üretilerek biyouyumluluğunun, antioksidan aktivitesinin, antibakteriyel aktivitesinin ve stabilitesinin artması sağlanmıştır. Ayrıca bu miseller kitosan (CS) ile kaplanarak RFX yüklü mPEG-*b*-PCL misellerin stabilitesinin artırılması hedeflenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimum koşularda üretilen RFX yüklü mPEG-*b*-PCL misellerin (OPT-M) ortalama boyutu 75,18 nm, polidispersite indeksi (PDI) 0,081 ve zeta potansiyeli -5,60 mV olarak ölçülmüş, enkapsülasyon etkinliği %89 olarak hesaplanmıştır. Miseller optimum koşullarda CS ile kaplandığında (OPT-C-M) ortalama boyutları 213,95 nm, PDI değerleri 0,250 ve zeta potansiyelleri +28,4 mV olarak ölçülmüştür. Misellerin morfolojik yapısı ve PDI değerleri göz önünde bulundurulduğunda, küresel formda ve uniform boyut dağılımına sahip oldukları anlaşılmaktadır. Ayrıca kolloidal stabilite çalışması sonuçları CS kaplamanın stabiliteyi artırma yönündeki başarısını kanıtlamaktadır. Her iki formülasyonda üretilen misellerin serbest RFX'in antioksidan aktivitesinde önemli bir artış sağladığı görülmüştür. Misellerin antibakteriyel aktivitesi *Staphylococcus aureus* üzerinde incelenmiştir. Serbest RFX'in minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) 0,125 µg/mL iken OPT-M örneğinin 0,015 µg/mL, OPT-C-M örneğinin ise 0,031 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca yapılan biyouyumluluk analizi sonucunda 24 ve 72 saat sonunda antibakteriyel aktivite görülen konsantrasyonlarda L929 hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğu görülmüş, yüksek biyouyumluluğa sahip formülasyonların geliştirildiği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, misel, mPEG-*b*-PCL, nanoçöktürme, rifaksimin.

ABSTRACT

Production of Rifaximin Loaded Micelles and Evaluation of Biological Activity

Seher AR

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Serap DERMAN

Co-supervisor: Lect. Ph.D Pelin PELİT ARAYICI

Rifaximin (RFX) is a broad-spectrum antibiotic with proven efficacy especially against enteric pathogens. However, its low solubility in aqueous media and consequent limited bioavailability significantly reduces its therapeutic efficacy. In fact, clinical studies show that most of the administered RFX dose is eliminated from the body without being processed. Since the bioavailability of an active pharmaceutical ingredient is directly related to its solubility, various methods have been developed to increase the solubility of hydrophobic active substances such as RFX. Loading the active pharmaceutical ingredient into micelles that formed spontaneously by amphiphilic molecules in aqueous environments is one of the basic methods used for this purpose. By loading the hydrophobic agent onto the micelles, it is ensured that its solubility is improved in aqueous media, as well as protection against degradation, reduction of dose intake frequency, and keeping the drug concentration in the plasma within the therapeutic window by controlled release. This thesis, it is aimed to increase the solubility and bioavailability of the RFX agent by loading it into methoxy poly(ethylene glycol)-*block*-poly(ε-caprolactone) (mPEG-*b*-PCL) micelles. In this context, firstly, the mPEG-*b*-PCL

diblock copolymer was synthesized through microwave-assisted ring-opening polymerization of ε-caprolactone (ε-CL) using by stannous octoate ($SnOct_2$) as a catalyst and mPEG as initiator. After the successful synthesis of the polymer, for the first time in the literature, RFX-loaded mPEG-*b*-PCL micelles were produced by nanoprecipitation, and increasing its biocompatibility, antioxidant activity, antibacterial activity and stability. In addition, it was aimed to increase the stability of RFX-loaded mPEG-*b*-PCL micelles by coating these micelles with chitosan (CS). As a result of characterization studies, the average size of RFX-loaded mPEG-*b*-PCL micelles produced under optimum conditions (OPT-M) was measured as 75.18 nm, polydispersity index (PDI) as 0.08 and the zeta potential as -5.60 mV, and the encapsulation efficiency was calculated as 89%. When micelles were coated with CS under optimum conditions (OPT-C-M), their average size was measured as 213.95 nm, PDI values were 0.250 and zeta potential was +28.4 mV. Considering the morphological structure and PDI values of the micelles, it is understood that they have a spherical form and uniform size distribution. In addition, the results of the colloidal stability study prove the success of the CS coating in increasing the stability. It was observed that the micelles produced in both formulations provided a significant increase in the antioxidant activity of free RFX. The antibacterial activity of micelles was examined on *Staphylococcus aureus*. While the minimum inhibition concentration (MIC) of free RFX was 0.125 μg/mL, it was calculated as 0.015 μg/mL for the OPT-M and 0.031 μg/mL for the OPT-C-M. However, as a result of the biocompatibility analysis, it was observed that L929 cell viability was over 80% at concentrations that showed antibacterial activity at the end of 24 and 72 hours and it has been proven that formulations with high biocompatibility have been developed.

Keywords: Chitosan, micelle, mPEG-*b*-PCL, nanoprecipitation, rifaximin

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Rifaximin (RFX), başta yolcu ishali olmak üzere çeşitli gastrointestinal bozuklukların tedavisinde ve hepatik ensefalopatide güçlü etkinliğiyle tanınan bir antibiyotiktir [1]. Bununla birlikte, terapötik faydalarına rağmen, RFX'in klinik kullanımı, optimal olmayan biyoyararlanımı nedeniyle sınırlanmaktadır. RFX'in düşük biyoyararlanımı, sulu ortamlardaki düşük çözünürlüğüyle ilişkilendirilmiştir. Rifamisin grubu antibiyotiklerin yarı sentetik bir türevi olan RFX yapısında diğer türevlerden farklı olarak bir piridoimidazol halkası içerir ve bu RFX'i büyük ölçüde suda çözünmez, zayıf emilebilir ve zayıf hücre içi geçirgenliğe sahip bir antibiyotik haline getirir [2].

İlaçların sulu ortamdaki çözünürlüğü farmasötik bilimler açısından kritik bir faktördür. Çünkü ilacın fizyolojik ortamda terapötik konsantrasyona ulaşabilmesi çözünürlüğüyle doğrudan ilişkilidir. Düşük çözünürlüklü etkin maddeler gastrointestinal sistem sıvılarında genellikle yetersiz biyoyararlanıma sahiptir [3]. Ayrıca bu etkin maddelerin farmakokinetik parametreleri birey içi ve bireyler arasında farklılık gösterdiğinden doz orantısızlığı meydana gelir ve ilaç geliştirme süreçleri olumsuz etkilenir [4]. Bununla birlikte üzerinde çalışılan etkin maddelerin büyük kısmının hidrofobik olduğu bilinmektedir [5]. Dolayısıyla ilaç geliştirme süreçlerinde çözünürlüğü artırmaya yönelik yaklaşımlar büyük öneme sahiptir.

Düşük çözünürlüklü ilaçların biyoyararlanımlarını artırmaya yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen geleneksel kimyasal ve fiziksel tabanlı metotlar, günümüzde yerini nanoteknolojik yaklaşımlara bırakmaktadır. Düşük çözünürlüklü etkin maddelerin polimerik nanopartiküllere yüklenmesi, suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların çözünürlüğünü arttırmak için kullanılan umut verici bir nanoteknolojik yaklaşımdır. Etkin maddelerin polimerik nanopartiküllere yüklenmesinin çözünürlüğün artırılmasının yanında; fizyolojik koşullarda stabilitesini artırarak etkin maddenin hedeflenen bölgeye ulaşma ihtimalini artırması, hedefli ve kontrollü salım imkanı sağlaması, sistemik toksisiteyi azaltması gibi çeşitli avantajları vardır [6].

Polimerik miseller çözünürlüğün artırılması amacıyla sıklıkla tercih edilen nanopartikülledir. Amfifilik moleküllerin sulu ortamlarda kendiliğinden oluşturduğu çekirdek kabuk yapılı nano boyutlu sistemlerdir [7]. Sulu ortamda hidrofobik etkin maddelerin miselin hidrofobik çekirdeğine kolaylıkla yüklenebilmesi, yüzey fonksiyonelleştirme işlemleri gerektirmeksizin hidrofilik bir koronaya sahip olmaları ve nispeten kolay üretim prosesleri miselleri ilgi odağı haline getirmiştir [8]. Sudaki çözünürlüğün, biyolojik bariyerlerden geçirgenliğin iyileştirilmesi ve biyoyararlanımın artırılmasında önemli ve yenilikçi araçlardır [9].

Misellerin üretilmesinde diblok ve triblok kopolimerler kullanılsa da çalışmalar diblok kopolimerler üzerine yoğunlaşmıştır [10]. Diblok kopolimerin hidrofilik bloğunu genellikle poli etilen glikol (PEG) oluştururken, hidrofobik blok olarak amaca göre farklı polimerler tercih edilebilmektedir. PEG stabilitenin artırılmasına katkı sağladığı, çözünürlük ve biyouyumluluğu artırdığı ve partikülü retiküloendotelyal sistem tarafından alımdan koruduğu için araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır [11]. Hidrofobik bir polimer olan poli kaprolakton (PCL) ise yüksek biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu nedeniyle kontrollü salım çalışmalarında kapsamlı biçimde araştırılmıştır [12]. PCL'nin yavaş bozunması, ilaçların uzun bir süre boyunca sürekli olarak salımına olanak tanır [12, 13]. Bu sayede aktif bileşenin konsantrasyonu uzun süre boyunca terapötik seviyede tutulabilir.

Polimerik misellerin fizyolojik koşullarda düşük stabiliteye sahip olması ilaç taşıyıcı olarak etkinliğini azaltabilir [14]. Stabilitenin artırılmasına yönelik çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlardan yüzey modifikasyonları ve kaplamalar sıklıkla tercih edilmektedir. Farmasötik nanoteknoloji alanında kitosan (CS) yüksek biyouyumluluğu ve fizyolojik koşullardaki stabilitesi sebebiyle partikül oluşturucu bir polimer olarak ve en yenilikçi şekilde yüzey kaplaması olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar nanotaşıyıcıların yüzeylerinin kitosanla kaplanmasının; fizikokimyasal stabiliteyi artırma, mukozal yapışmayı ve hücre etkileşimlerini modüle etme, biyoyararlanımı artırma gibi çeşitli olumlu etkileri olduğunu göstermektedir [15].

1.2 Tezin Amacı

Tez kapsamında, RFX metoksi poli(etilen glikol)-blok-poli(kaprolakton) (mPEG-*b*-PCL) misel sistemlerine yüklenerek çözünürlüğünün ve dolayısıyla biyoyararlanımının arttırılması amaçlanmaktadır.

Bu amaca ulaşmak üzere belirlenen hedefler ise şu şekildedir:

- mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerin sentezlenmesi.
- Sentezlenen diblok kopolimerden RFX yüklü misellerin üretilmesi.
- Kitosan kaplama ile misellerin stabilitesinin iyileştirilmesi.
- Üretilen misellerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada;

- RFX'in biyoyararlanımının, farklı hidrofobik etkin moleküllerin suda çözünürlüğünü ve dolayısıyla biyoyararlanımını artırdığı bilinen mPEG-*b*-PCL misellere yüklenerek artırılabileceği ve
- Miseller CS ile kaplanarak daha stabil bir sistem oluşturulabileceği

hipotezi üzerinde durulmuştur.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Bakteriyel Enfeksiyonlar

Küresel biyokütle rezervini oluşturan en önemli ikinci taksonomik grup bakterilerdir [16]. Bakteriler; kaplıcalar, derin denizlerdeki hidrotermal bacalar veya asidik ortamlar gibi aşırı koşulların hakim olduğu ortamlar dahil hemen her yerde bulunurlar. Vücudumuzda ise gastrointestinal sistem, solunum yolu, deri ve diğer çeşitli nişlerde bulunabilirler. Yaşamın devamlılığı için hem doğada (ekolojik dengenin korunmasında) hem de vücudumuzda (özellikle sindirimin düzenlenmesinde) önemli role sahiptirler [17]. Bununla birlikte küçük bir kısmının enfeksiyon ve çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmekte ve bunlar "patojenik bakteriler" olarak adlandırılmaktadır.

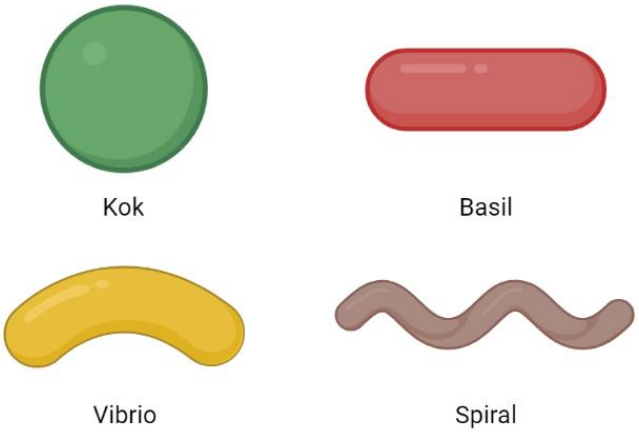
Bakteriler; prokaryotik, tek hücreli mikroorganizmalardır. Boyut, hücre yapısı, içerdiği organeller, üreme şekli, deoksiribonükleik asit (DNA) organizasyonu gibi özellikleri bakımından ökaryotik hücrelerden ayrılırlar (Tablo 2.1) [18]. Bu ayrımlar; onların hayatta kalmalarına, çeşitli ortamlarda kolonize olabilmelerine katkı sağlar. Örneğin prokaryotik hücrelerinin boyutunun ökaryotik hücrelerden küçük olması prokaryotlar için kritik avantajlar sağlar. Küçük hücrelerin yüzey alanı / hacim (S/V) oranı daha büyüktür ve bu birim hücre hacmi başına daha fazla besin alınmasına olanak tanır. Bu sayede küçük hücreler belirli bir miktar kaynak için, daha büyük bir hücre popülasyonu sağlamış olurlar. Popülasyondaki bu hızlı artış hücrelerin evrimini de doğrudan etkileyecektir. Hücre sayısının hızlı artışı DNA eşlenmesi sırasında olabilecek mutasyonların sayısını da arttırır. Mutasyon sayısının artışı ve prokaryotların mutasyonların daha hızlı ifade edilmesine olanak tanıyan haploid genomu sayesinde daha hızlı evrimleşirler. Prokaryotik ve ökaryotik hücreler arasındaki bu temel boyutsal ve genetik farklılıklar, prokaryotların değişen çevre koşullarına ve yeni yaşam alanlarına daha kolay adapte olabilmelerine olanak tanır [17].

Tablo 2.1 Ökaryotik ve prokaryotik hücreler arasındaki temel farklılıklar [18-21].

ÖZELLİK	ÖKARYOTİK HÜCRE	PROKARYOTİK HÜCRE
ANA GRUPLAR	Bitkiler, hayvanlar, alg, fungus protozoa	Bakteriler, arkeler
BOYUT	> 5 µm	0,5 – 3 µm
NÜKLEUS	Nükleer membran bulunur.	Nükleer membran yoktur.*
KROMOZOM YAPISI	Diploid DNA genom dizisi	Haploid, dairesel DNA**
ORGANELLER	Mitokondri, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozom vb. membranla kaplı organeller içerir.	Membranla kaplı organelleri içermez. Ribozom bulunur.
RİBOZOM YAPISI	30 S + 50 S (Toplam 70 S)***	40 S + 60 S (Toplam 80 S)
SİTOPLAZMİK MEMBRAN	Steroller bulunur.	Sterol bulunmaz.****
ÜREME	Eşeyli, eşeysiz	Eşeysiz (ikili fisyon)

** Prokaryotik hücrelerde genetik materyal, sitoplazma içerisinde nükleoid olarak adlandırılan bölgede bulunur. ** Bazı bakterilerde plazmit adı verilen kromozomdan ayrı, kendini eşleyebilen, çift iplikli, dairesel DNA parçası bulunur. *** S: Sedimentasyon katsayısı. **** Mikoplazma hariç.*

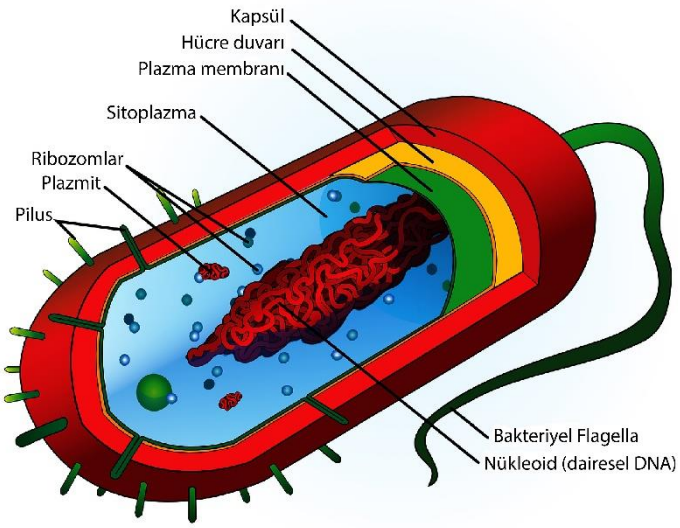
Bakteriler, genetik yapılarına bağlı olarak, çeşitli morfolojik yapılarda bulunabilirler. Bu yapılardan başlıcaları: kok (örn. *Staphylococcus*), basil (örn. *Bacillus anthracis*), spiral (örn. *Helicobacter pylori*) ve vibrio (örn. *Vibrio cholerae*) (Şekil 2.1) [17, 22]. Çoğu bakteri monomorfiktir (tek bir şekle sahiptir) ve bu bakterilerin yapıları uygun koşullar altında nispeten stabildir [23]. Dolayısıyla bakterilerin morfolojilerinin bilinmesi, başta bakteri kaynaklı hastalıkların teşhisi olmak üzere, patojenik mekanizmalar ve antijenik özelliklerin anlaşılmasında ayrıca enfeksiyonların önlenmesinde fayda sağlayacaktır [22]. *Rhizobium* ve *Corynebacterium* gibi bazı bakteriler ise genetik olarak pleomorfiktir, yani sadece bir değil birçok şekle sahip olabilirler [23].



Şekil 2.1 Bakterilerin temel morfolojik yapıları (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir).

Morfolojik yapıları farklılık gösterse de tüm bakteriler belirli bazı komponentlerden oluşur (Şekil 2.2). Tüm bakteriler yaşamlarını sürdürebilmek için gerek duydukları enzimler, proteinler, nükleik asitler gibi bileşenleri içeren bir sitoplazmaya sahiptirler. Bakteriyel sitoplazmanın önceleri farklılaşmamış bir ortam olduğu kabul görse de günümüzde kapsamlı ve nispeten özelleşmiş mikro bölmeler, inklüzyon cisimcikleri, granüller ve hatta zarla kaplı veziküller içerdiği bilinmektedir [24]. Sitoplazmanın etrafı, hücre ile dış ortam arasında maddelerin geçişini düzenleyen, sitoplazma bütünlüğünü koruyan bir bariyer görevi gören membran ile çevrilidir [25]. Bu membran ökaryotlarda olduğu gibi lipid çift tabakadan meydana gelir. Prokaryotlarda sitoplazma membranı, ökaryotlarda çeşitli organellere atfedilen bazı görevleri (örneğin ökaryotlarda mitokondri tarafından gerçekleştirilen elektron taşınması ve enerji üretimi) de yerine getirmektedir [18]. Prokaryotik hücrelerin sitoplazması yüksek konsantrasyonda çözünmüş madde içerdiğinden yüksek bir osmotik basınca sahiptir [17]. Çoğu bakteride hücrelerin bu basınca dayanması, hücre şeklinin ve yapısal bütünlüğün korunması için gerekli olan karmaşık, ağ benzeri yapıda bir hücre duvarı bulunur [26]. Hücre duvarını oluşturan peptidoglikan (murein) tabaka, N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) polimerize zincirlerinden oluşan glikan bir omurga ve omurgadaki NAM ünitelerine bağlı kısa peptid dizilerinden meydana gelir [27]. Hücre duvarının yapısı ve işlevinin bilinmesi, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bazı antibiyotiklerin bu yapının sentezini hedef alarak bakteriyi işlevsiz kılması nedeniyle önemlidir [17]. Birçok bakteri çeşitli

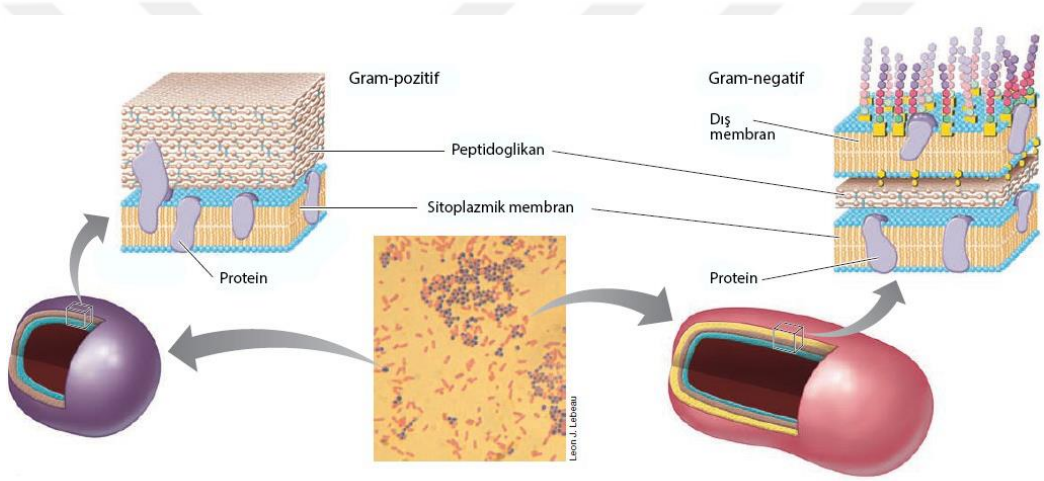
fonksiyonları gerçekleştirebilmek için dış uzantılar geliştirmiştir. Bu uzantılardan biri olan flagella bakterilerin hareketinden sorumludur. Organizmanın besinlere doğru hareket etmesini, toksik kimyasallardan uzaklaşmasını veya (bakterinin oksijen ihtiyacına, beslenme şekline göre) oksijen veya ışığa yönelmesini sağlar [28]. Yine bu uzantılardan, pilus veya fimbria ise flagellaya göre daha küçük, protein yapılı uzantılardır. Hücrelerin yüzeye tutunmalarına olanak sağlayan bu yapılar konak-patojen ilişkisinde adezyonu sağlarlar [29]. Ayrıca bakteri hücrelerinin konjugasyonunda (bakteri hücrelerinin birbirine temas ederek genetik madde aktarımında) da rol alırlar [30]. Bazı bakteriler ise hücre duvarının dışında koruyucu bir tabaka olan kapsüle sahiptir. Kapsül hidratlı bir polisakkarit yapıdır ve çoğu bakteride glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış monosakkaritlerden oluşur [31]. Bu yapı, bakterilerin konak canlının bağışıklık tepkisinden kaçınabilmesini sağlar.



Şekil 2.2 Bakteri hücresinin genel yapısı [28].

Bakteriler hücre duvarı yapısına göre "Gram-pozitif" ve "Gram-negatif" olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Şekil 2.3). Gram-negatif bakterilerde sitoplazma membranı, ince bir peptidoglikan hücre duvarı ve bir dış zar bulunur. Dış zar, toksik molekülleri dışlayarak ve hücre etrafında ek bir stabilize edici tabaka sağlayarak gram-negatif organizmaların çevreden korunmasında önemli bir rol oynar [32]. Gram-pozitif bakterilerde ise sitoplazma membranı üzerinde kalın bir peptidoglikan hücre duvarı bulunur. Ayrıca Gram-pozitif baterilerde teikoik asit, lipoteikoik asit gibi antijenik özellikli bileşenler bulunur [32]. Bir bakterinin Gram-pozitif veya

Gram-negatif olduğuna Gram boyama prosedürü (Hans Christian Gram tarafından 1882 yılında geliştirilmiştir) uygulanmasının ardından mikroskoptaki görünümüne göre karar verilir. Gram boyama prosedürü uygulandığında Gram-pozitif bakteriler boyar maddeyi hücre duvarlarında tutarak mavi-mor renkte; Gram-negatif bakteriler ise nispeten ince hücre duvarına sahip olduklarından boyar maddeyi tutamayıp kırmızı-pembe renkte görünürler. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin patojenitelerine katkı sağlayan farklı özellikleri vardır. Gram-pozitif bakteriler oksinler, enzimler ve adezyon faktörleri; Gram-negatif bakteriler ise adezinler, kapsüller ve lipopolisakkaritler (LPS) dahil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerine sahiptirler. Özellikle Gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan LPS'ler, güçlü bir enflamatuar tepkiye ve endotoksik şoka neden olabilir [33, 34].



Şekil 2.3 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapısı [17].

İnsan vücudu sürekli olarak çevrede bulunabilen veya konakçıyla simbiyoz halinde yaşayan bakterilere maruz kalmaktadır [35]. Maruz kalınan bakterilerin çoğu organizmalar ve çevre açısından oldukça faydalıdırlar. Ancak bir kısmı pek çok hastalığa neden olabilen patojenik bakterilerdir [36]. Normalde fiziksel bariyerler (deri veya epitel hücre katmanları) vücudu bakteriyel enfeksiyonlardan başarıyla korur. Patojenik bakteriler bu bariyerleri aşıp invaze olduklarında ise vücudun bağışıklık sistemi tarafından yok edilirler [35]. Bakteriler geliştirdikleri çeşitli mekanizmalarla vücudun bu etkisinden kaçınıp kolonize olabilirler [37]. Patojenik bakteriler kolonizasyon sonrasında organizmanın iç dokularına girip buralarda çoğalabilir ve bu esnada dokularda tahribata neden olup enfeksiyon gelişmesine sebebiyet verebilirler.

2.2 Antibiyotikler

İnsanlar binlerce yıl, salgın boyutuna dahi ulaşıp milyonlarca insanın ölümüne sebep olabilecek çeşitli enfeksiyon hastalıklarıyla mücadele etmişlerdir. Antik çağlarda, bu hastalıkların tedavisinde; bitkiler, bal, bira mayası, küfler ve çeşitli organik bileşiklerden faydalanıldığına dair tarihi kanıtlar mevcuttur [38, 39]. Özellikle küflü ekmeğin, yara ve yanık tedavisinde topikal uygulanmasının iyileşme sürecindeki pozitif etkileri antik Mısır'dan beri bilinmektedir [40]. Ayrıca orta çağda Çin ve Yunan uygarlıklarının da çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde küflü dokulardan faydalandıkları bilinmektedir [41]. Tüm bu doğal bileşenlerin yanı sıra, bazı modern antibiyotiklerin dahi eski çağlarda kullanıldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, günümüzde birçok bakteriyel enfeksiyonda kullanılan tetrasikline ait izler; Sudan'ın Nubia Bölgesi'nden çıkarılan, milattan sonra (MS) 350-550 yıllarına ait insan iskeleti kalıntılarında bulunmuştur [40, 42].

19. yüzyıldan itibaren bazı mikroorganizmaların diğerleri üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu fark edilmiştir [43]. 1889 yılında Jean Paul Vuillemin, "antibiyoz" kelimesini "bir canlı organizmanın kendi varlığını sürdürmek için diğerini öldürdüğü" herhangi bir biyolojik ilişki olarak tanımlamıştır [41]. Modern antibiyotik çağının başlangıcı ise genellikle Paul Ehrlich ve Alexander Fleming ile ilişkilendirilir [40]. Paul Ehrlich, 1909 yılında frengi etkeni olan *Treponema pallidum*'a karşı etkili bir arsenik türevi olan arsfenamin'i keşfetmiş ve bu molekül birkaç yıl sonra ticarileştirilmiştir [41]. Alexander Fleming ise 1928'de *Penicillium notatum* küfünden penisilini keşfetmiştir [44]. Nihayetinde bu keşifler, 1940'larda Howard Florey ve Ernst Chain'in öncülük ettiği modern antibiyotiklerin geliştirilmesi ve seri üretiminin yolunu açmıştır [45].

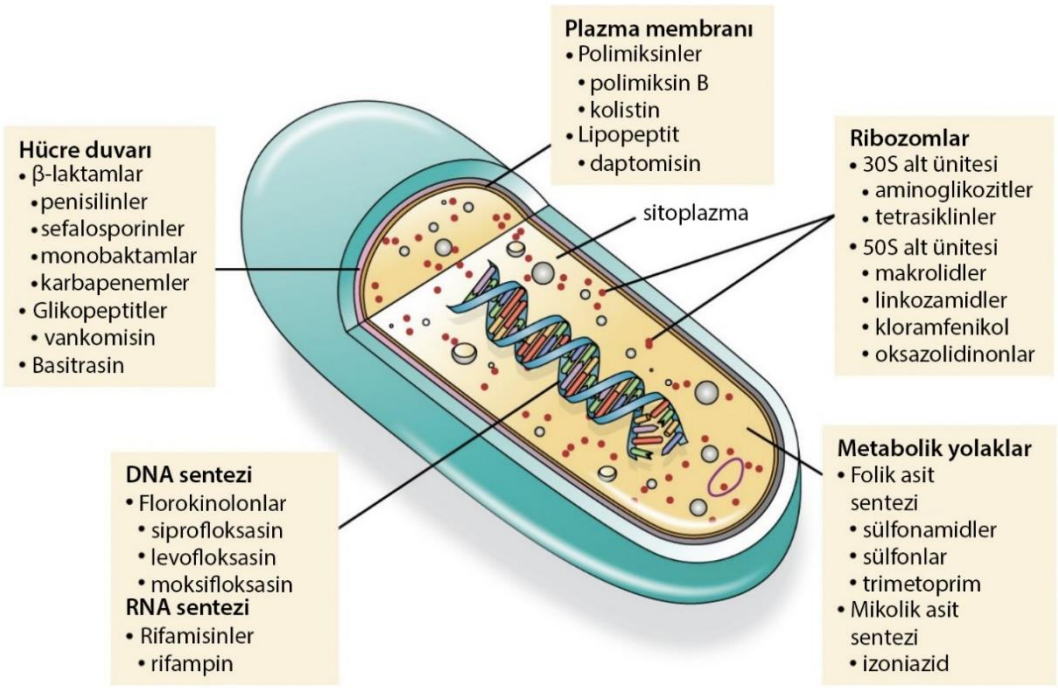
Antibiyotik kelimesi Yunanca karşı (anti) ve yaşam (bios) kelimelerinden türetilmiştir [46]. Selman A. Waksman, 1947 yılında antibiyotik terimini; mikroorganizmalar tarafından üretilen, bakteri ve diğer mikroorganizmaların üremesini engelleme, hatta yok etme kapasitesine sahip kimyasal madde olarak açıklamıştır [47, 48]. Günümüzde ise antibiyotik terimi farklı şekillerde tanımlanabilmektedir [38, 49]:

- Patojenik bakterilerin üremesini engelleyen veya öldüren, doğal veya sentetik kökenli kimyasal ajanlar,

- Herhangi bir antimikrobiyal madde veya
- Mikroorganizma kaynaklı, diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip maddeler.

2.2.1 Antibiyotiklerin Çeşitleri ve Etki Mekanizmaları

Antibiyotikler temelde bakterisidal ve bakteriyostatik olmak üzere iki şekilde etkilerini gösterirler. Bakterisidal etki gösteren antibiyotikler, bakterilerin doğrudan öldürülmesini sağlarken; bakteriyostatikler, bakterilerin üremesini inhibe edip durağan (stasyoner) fazda kalmalarını sağlayarak etki gösterir [50]. Antibiyotikler bakterisidal ve/veya bakteriyostatik etkilerini hedef organizma üzerinde farklı mekanizmalar kullanarak gösterirler. Kullandıkları mekanizmalara göre ise hücre duvarı sentezini inhibe edenler, membran bütünlüğünü bozanlar, protein sentezini inhibe edenler, nükleik asit sentezini inhibe edenler ve metabolik yolakları bozanlar olmak üzere beş gruba ayrılırlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Antibiyotiklerin etki mekanizmaları [51].

2.2.1.1 Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler

Hücre duvarının ana bileşeni peptidoglikan tabakadır. Bu tabaka NAG ve NAM ünitelerinin birbirine β(1-4) glikozid bağı ile bağlanması ve NAM'a bağlı peptid zincirleri arasında çapraz bağların oluşmasıyla meydana gelir. Yapının sentezi

sitoplazmada gerçekleşen, membran ilişkili ve sitoplazma dışında gerçekleşen olmak üzere 3 aşamada tamamlanır (Şekil 2.5) [52].

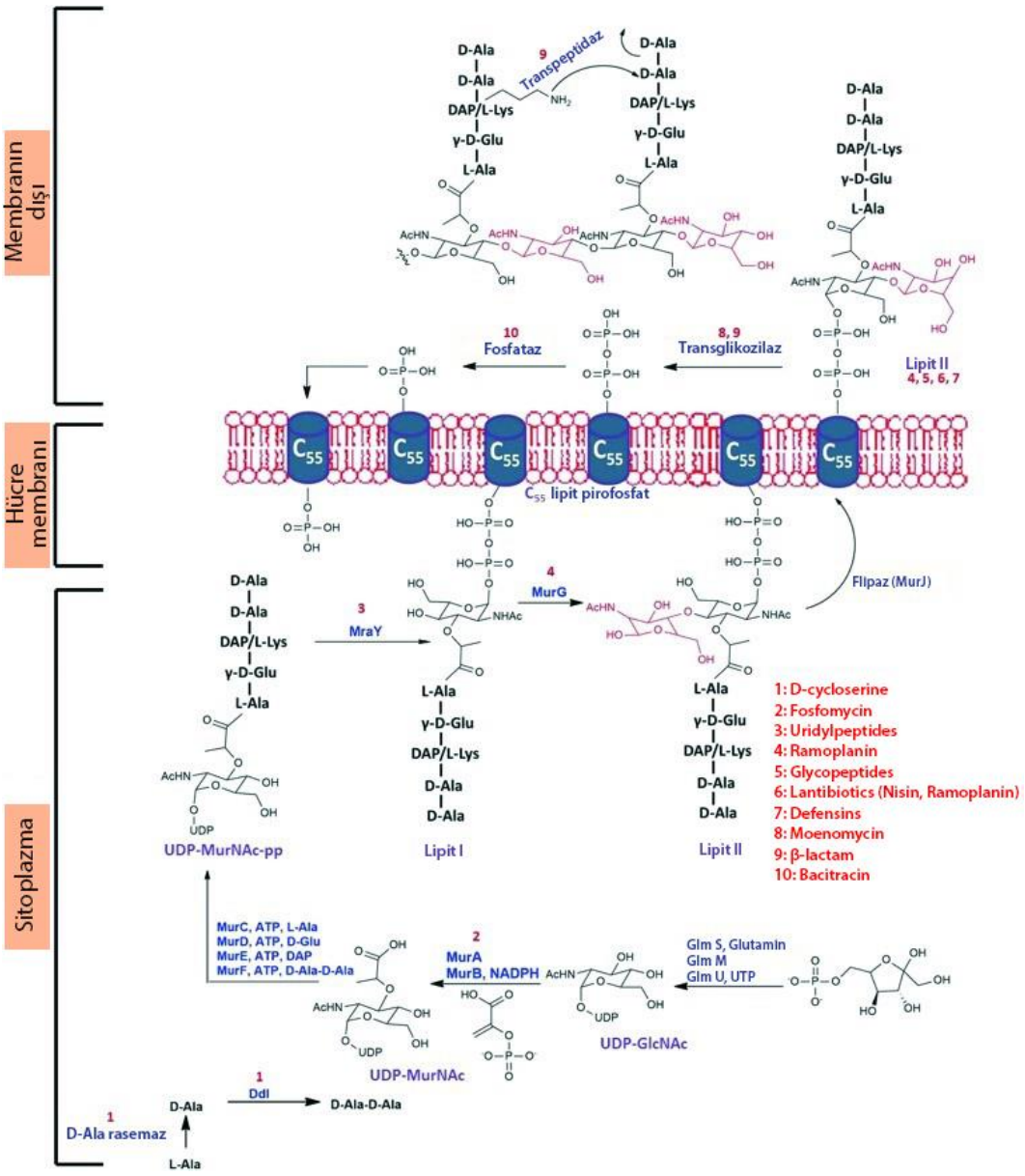
Birinci aşamada, sitoplazmada peptidoglikan öncüllerinin sentezlenir. İlk olarak üridin difosfo-N-asetil glukozamin (UDP-NAG) sentezlenir, daha sonra UDP-NAG üzerinde gerçekleşen çeşitli modifikasyonlarla üridin difosfo-N-asetil muramik asit (UDP-NAM) üretilir. UDP-NAM'ın üretiminin ardından laktil karboksil grubuna pentapeptit (pp) dizisindeki amino asitler farklı enzimler aracılığıyla son iki aminoasit hariç tek tek eklenirler. Son iki aminoasit dipeptit yapıda D-alanil-D-alanin olarak eklenir ve UDP-NAM-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (UDP-NAM-pp) molekülü üretilir.

İkinci aşamada, ilk aşamada sentezlenen suda çözünebilir yapıdaki öncüller lipid taşıyıcı vasıtasıyla membranın dış yüzüne aktarılır. C_{55} isoprenoid alkolün monofosfo esteri olan bu taşıyıcı (fosfoundekaprenol veya baktoprenol), UDP-NAM-pp molekülüne UDP kısmından pirofosfat köprüsü ile bağlanır ve üridin monofosfat grubu yapıdan ayrılır. Bu yer değiştirme sonucu oluşan undekaprenil pirofosforil-N-asetil muramil pentapeptid (C_{55}-PP-NAM-pp) yapıdaki Lipid I kompleksi oluşur. Daha sonra UDP-NAG'ın Lipid I'e muramik asidin 4. karbonundan β(1-4) glikozid bağı ile bağlanmasıyla Lipid II molekülü sentezlenir. Lipofilik molekül baktoprenol, hidrofilik öncül moleküllerin sulu ortamdan (sitoplazmadan) büyüyen peptidoglikan zincirine dahil edilmek üzere hücre zarının dışına taşınmasına yardımcı olur [52].

Üçüncü ve son aşama ise peptidoglikan öncüllerinin lipid taşıyıcıdan ayrılıp büyümekte olan peptidoglikan zincirine eklenmesini ve komşu peptidoglikan zincirleri arasında çapraz bağların kurulmasını içerir. Peptidoglikan öncülü transglikolizasyon (translokasyon) ile lipid taşıyıcıdan ayrılıp pentapeptid omurgasına aktarılır. Taşıyıcı molekül tekrar sentez döngüsüne katılırken oluşan doğrusal peptidoglikan zincirleri transpeptidazlar tarafından kurulan peptid köprüleriyle çapraz bağlanır. Transpeptidazlar penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) ve RodA gibi enzimlerden oluşur [53].

Bu aşamalar türlere göre ufak farklılıklar gösterse de temelde tüm bakterilerde aynıdır. Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler bu süreçte herhangi bir aşamada görev alan herhangi bir molekülü (enzimler, öncül moleküllerin bileşenleri

gibi) hedef alarak aktivite gösterirler [52]. Beta-laktamlar ve glikopeptidler bu gruba dahildir.



Şekil 2.5 Hücre duvarı sentezi [52].

- **Beta-Laktam Grubu Antibiyotikler**

Yapılarında ortak bir beta-laktam (β-laktam) halkası taşıyan bakterisidal antibiyotik grubudur. β-laktam grubu antibiyotikler hücre duvarı yapısındaki pentapeptid ünitesinin terminal D-Ala-D-Ala kısmını taklit ederler [54] ve PBP'lere kovalent

bağlarla geri dönüşümsüz bağlanarak onları inhibe ederler [55, 56]. Yapılarındaki β-laktam halkasına bağlı yan gruplarına göre penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve β-laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş sınıfa ayrılırlar [53].

Penisilinler keşfinden bu yana sıklıkla kullanılan bilinen en eski antibiyotiklerden biridir. *Penicillium* mantarından elde edilirler. Penisilinler elde ediliş biçimlerine göre doğal ve yarı sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Doğal penisilinler *Penicillium chrysogenum* mantarının fermantasyon ürünlerinden, yarı sentetik penisilinler ise penisilinlerin çekirdeği olarak bilinen 6-aminopenisilanik asit (6-APA) yapısından türetilir [57]. Penisilin G ve Penisilin V gibi doğal penisilinler dar bir terapötik spektruma (bazı Gram-pozitif bakteri türlerine karşı etkilidir) sahip olma eğilimindedir [58]. Ayrıca bazı bakteriler β-laktam antibiyotikleri etkisiz hale getiren β-laktamaz enzimini üreterek doğal penisiline dirençli hale gelmiştir [59]. 1950'lerde bilim insanları, β-laktam çekirdeğine farklı fonksiyonel gruplar bağlayarak ampisilin ve amoksisilin gibi yarı sentetik penisilinler üreterek penisilinlerin terapötik spektrumunu genişletmiş ve onları β-laktamazlara dirençli hale getirmişlerdir [59].

β-laktam grubu antibiyotiklerin bir diğer üyesi sefalosporinler ortak olarak 7-aminosefalosporinik asit (7-ASA) yapısı içerirler [60]. Etki spektrumlarına göre farklı jenerasyonlara (veya kuşaklara) ayrılmışlardır. Birinci kuşak sefalosporinler arasında sefalotin, sefazolin, sefaleksin, sefadroksil sayılabilir ve bunlar Gram-pozitif bakteriler üzerinde daha etkilidir [61]. Sefaklor, sefuroksim, sefprozilinin de aralarında bulunduğu ikinci kuşak sefalosporinler Gram-negatif bakteriler üzerinde birinci kuşak sefalosporinlere göre daha etkilidir ve hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerinde aktivite gösterirler. Ancak beyin omurilik sıvısından (BOS) yeterli oranda geçemezler. Üçüncü kuşak sefalosporinler arasında başta sefotaksim olmak üzere sefdinir, sefiksim, seftazidim ve seftriakson bulunur. BOS'a, eklem sıvılarına ve seröz boşluklara geçişi yeterli düzeyde olan bu sefalosporinler bu bölgelerde bakterisidal aktivite gösterebilirler [60]. Bir diğer grup dördüncü kuşak sefalosporinler özellikle Gram-negatif bakterilerde etkili olmakla birlikte Gram-pozitif bakteriler üzerinde üçüncü kuşak sefalosporinlere nazaran daha etkilidir. Sefepim bu grupta yer alır. Son olarak seftarolin ve seftobiprolün yer aldığı beşinci kuşak sefalosporinler metisiline dirençli

Staphylococcus aureus (MRSA) ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler dahil Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler üzerinde etkilidirler [62].

Karbapenemler, çok geniş bir terapötik spektruma sahip başka bir β-laktam antibiyotik grubudur. *Streptomyces cattleya* adlı bir bakteri tarafından sentezlenirler ve β-laktamaz enzimlerine karşı oldukça dirençlidirler. Bu onları *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bulaşıcı ajanlar diğer antibiyotiklere direnç gösterdiğinde çok yararlı bir "son çare" antibiyotik haline getirir. Değerlendirilen ilk karbapenemler arasında, tienamisin en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösteren olmuştur ve sonraki tüm karbapenemler için ana bileşik haline gelmiştir [59].

Monobaktamlar, 2-oksoazetidin-1-sülfonik asit varlığı ile karakterize edilen monosiklik β-laktam ajanlardır [63]. Penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemlerin aksine, monobaktamlar bitişik bir halkayla kaynaşmazlar [64]. Monobaktamlar benzersiz bir β-laktam yapısına sahiptir ve *Chromobacterium* türlerinden izole edilen, doğal olarak oluşan bir antibiyotiktir. Monobaktam ajanlar, dar ve karakteristik bir aktivite spektrumuna sahiptir. *Pseudomonas aeruginosa* dahil olmak üzere Gram-negatif basillere karşı etkilidirler ve Gram-pozitif bakterilere ve anaeroblara karşı aktif değildirler [65]. Klinik olarak kullanılan tek monobaktam aztreonamdır [66].

- **Glikopeptidler**

Glikopeptitler, çeşitli filamentöz aktinomiset suşları tarafından üretilen glikosile edilmiş siklik veya polisiklik ribozomal olmayan peptitlerdir. Doğal glikopeptidler, amino asit çekirdeğine iki aminoşekerin bağlı olduğu yedi amino asitten oluşan siklik bir peptit çekirdeğinden oluşur. Terapötik maddenin peptid omurgası, sitoplazmik zarın dış yüzeyinde lokalize olan pentapeptit içeren öncüllerin D-Ala-D-Ala terminallerine hidrojen bağlarıyla bağlanarak hücre duvarı peptidoglikan sentezinin geç aşamalarını inhibe ederler [67]. Enterokoklar, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Clostridium difficile* gibi Gram-pozitif patojenlerin tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedirler.

Glikopeptid ailesinin ilk ve en önemli üyesi vankomisindir [68]. *Amycolatopsis orientalis* tarafından üretilen vankomisin, proteinojenik (Tyr, Leu, Asn, Ala ve Glu)

ve proteinojenik olmayan (4-hidroksifenilglisin, 3,5-dihidroksifenilglisin ve β-hidroksitirozin) amino asit kalıntıları içerir.

Teikoplanin, aktinomiset *Actinoplanes teichomyceticus* tarafından üretilen bir glikopeptid antibiyotiktir [69]. Teikoplanin, altı benzer glikopeptid molekülünden oluşan bir komplekstir [70]. MRSA ve enterokoklar da dahil olmak üzere Gram-pozitif bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde uygulama alanı bulmuştur [71].

2.2.1.2 Membran Bütünlüğünü Bozanlar

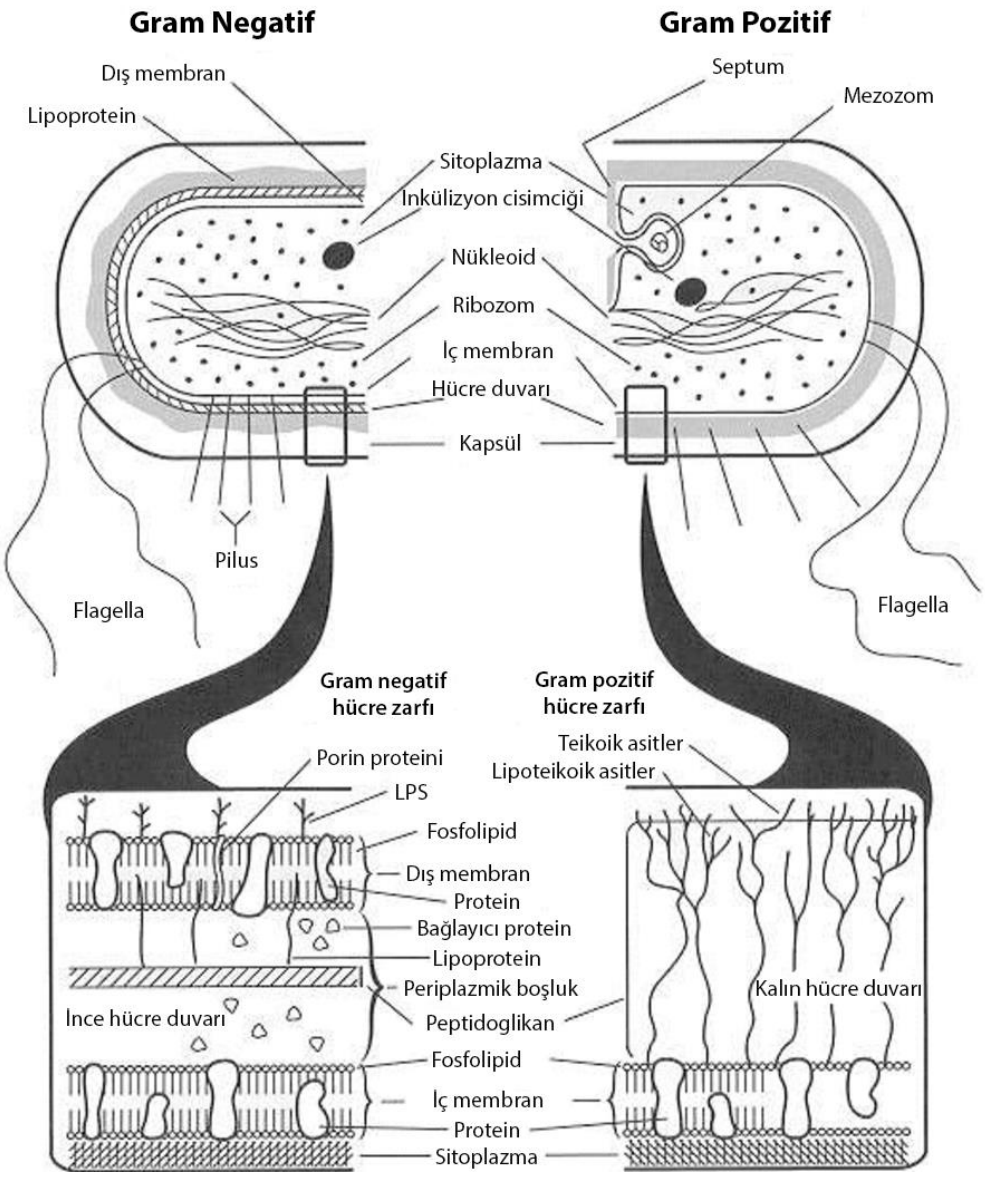
Gram-pozitif bakterilerde sitoplazma membranı üzerinde kalın bir hücre duvarı bulunurken Gram-negatif bakterilerde sitoplazma membranı üzerinde nispeten ince bir hücre duvarı ve bir dış membran vardır. Membran bütünlüğünü bozan antibiyotikler bu membranlardaki çeşitli bileşenleri hedef alarak etki gösterirler.

Bakterilerde sitoplazmik membran (veya plazma membranı) fosfolipidlerden meydana gelir. Ökaryotlarda olduğu gibi bakteriyel plazma membranı fosfolipid çift tabakadan oluşmakla birlikte protein-lipid oranları yaklaşık 3:1 olup mitokondriyal membrana benzer [37]. Ayrıca ökaryotik hücre zarının aksine, bakteriyel hücre zarında (mikoplazma türleri ve bazı metilotropik bakteriler hariç) sterol bulunmaz. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde plazma membranının bileşimleri benzer olmasına rağmen, Gram-pozitif bakterilerin sitoplazmik membranları, zara bağlı teikoik asit ve lipoteikoik asit içermesiyle farklılık gösterir (Şekil 2.6). Bu yapılar negatif yüklü bileşenlerdir ve pozitif yüklü maddeleri elektrostatik etkileşimlerle tutabilirler. Dolayısıyla konak hücrelere yapışma ile ilişkilendirilmişlerdir [37].

Gram-negatif bakterilerdeki dış membran ise fosfolipidler ve proteinlerle birlikte lipopolisakkaritlerden meydana gelir. Dış membran da sitoplazmik membranda olduğu gibi bir lipid çift tabakadan oluşur; ancak iç kısımda fosfolipidlerin dış kısımda ise lipopolisakkaritlerin bulunduğu asimetrik bir yapı sergiler [72]. Fosfolipidlerin arasında bulunan ve peptidoglikan tabakaya kadar uzanan lipoproteinler katmanlar arası bağlantıyı sağlarlar.

Membran, hücre sitoplazmasını çevreleyen ana sınırı oluşturur; hücre içi ve hücre dışı boşluk arasında sayısız küçük molekülün ve salgılanan proteinlerin taşınmasını veya difüzyonunu kontrol eder. Transmembran elektrokimyasal gradyan, birçok

önemli hücre işlevine güç sağlar. Prensip olarak, membran yüzeyleri, hücrenin şeklini ve bölünmesini kalıplamak için morfojenik sistemler tarafından kullanılan topolojik işaretler olarak işlev görebilir [73]. Dolayısıyla yapısındaki bozulmalar bakterinin ölümüyle sonuçlanacaktır.



Şekil 2.6 Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde hücre zarfı yapısı [37].

- **Polimiksinler**

Polimiksiler 1947'de *Bacillus polymyxa* bakterisinden izole edilmiş ve keşfedilmiştir. Şimdiye kadar, aralarında en öne çıkanların polimiksin B ve polimiksin E (kolistin olarak da bilinir) olduğu on beşten fazla polimiksin çeşidi

izole ve karakterize edilmiştir. Polimiksinler tipik bir polikatyonik peptidden oluşan halka ve yağ asitleri ile bağlanmış tripeptit zincirinden oluşan kuyruk yapısına sahiptirler. Polimiksin B ve kolistin, peptit halkasındaki tek bir amino asit kalıntısında farklılık gösterir; polimiksin B'deki D-fenilalanin yerine kolistinde bir D-lösin kalıntısıyla bulunur. Katyonik peptit halkası, polimiksinlere hidrofilik bir yapı sağlarken, yağlı açil zinciri hidrofobiktir. Bu yapısal özellik genellikle polimiksinlerin hücre zarlarına girerek membranın parçalanmasına yol açabilme kabiliyetine atfedilir [74].

- **Daptomisin**

Daptomisin, yeni bir antibiyotik sınıfı olan siklik lipopeptidlerin bir üyesidir. Bir fermantasyon ürünü olarak *Streptomyces roseosporus*'tan elde edilir. Daptomisin bakterisidal bir antibiyotiktir ve aerobik, fakültatif ve anaerobik Gram-pozitif bakterilere karşı aktiftir. Daptomisin Ca^{2+}'ye bağlanarak misel benzeri oligomerik yapılar oluşturur ve 'deterjan benzeri' bir biçimde bakteri zarına iletilir. Burada daptomisin sitozolik içeriklerin sızmasına ve dolayısıyla hızlı bir bakterisidal etkiye neden olur. Daptomisin yalnızca Gram-pozitif bakterilere karşı aktiftir çünkü Gram-negatif organizmaların dış zarını geçemez. Bununla birlikte MRSA'ya karşı güçlü bakterisidal aktiviteye sahiptir [75].

2.2.1.3 Protein Sentezini İnhibe Edenler

Protein sentezi üç aşamada gerçekleşir: başlama (initiation), uzama (elongation) ve sonlanma (termination) [76]. Bakterilerde sentez N-formil metiyonin ile başlar. Başlama aşamasında ilk olarak ribozomun küçük (30S) alt birimi, başlama faktörleri (IF-1, IF-2 ve IF-3) ve formilize olmuş metiyonin amino asidi taşıyan tRNA molekülü (fMet-$tRNA^{fMet}$) eşliğinde mRNA'da başlangıç kodonunun birkaç nükleotid dizisi gerisindeki Shine–Dalgarno dizisinden mRNA'ya bağlanır [77]. Bakteriyel ribozomlarda aminoaçil-tRNA molekülünün bağlandığı A bölgesi, peptidil-tRNA molekülünün bağlandığı P bölgesi ve yüksüz tRNA molekülünün gönderildiği bir E bölgesi bulunur. Sentezin başlaması için ribozomun mRNA'ya başlangıç kodonu 5'-AUG ribozomun P bölgesine gelecek şekilde birleşmesi ve fMet-$tRNA^{fMet}$ molekülünün buraya bağlanması sağlanır. Oluşan bu komplekse 50S büyük ribozomal alt birimin bağlanmasıyla başlama faktörleri ortamdan ayrılır ve uzama aşamasına geçilir. Zincir uzama aşaması için başlangıç kompleksinin yanı

sıra aminoaçil-tRNA, uzama faktörleri (EF-Tu, EF-Ts ve EF-G) ve Guanozin-5'-trifosfat (GTP) gereklidir. Başlama aşamasından sonra ribozomal P bölgesinde başlatıcı fMet-tRNA^{fMet} molekülü bulunurken A bölgesi boş kalır. Uzamanın ilk basamağında, uygun aminoaçil-tRNA, EF-Tu-GTP kompleksine bağlanarak, 705 başlangıç kompleksinin A bölgesine yerleşir. Bu sırada GTP hidroliz olurken EF-Tu-GDP kompleksten ayrılır. EF-Tu-GTP'nin yeniden oluşabilmesi için EF-Ts, EF-Tu-GDP'ye bağlanarak GDP'nin yerine GTP'nin bağlanmasını sağladıktan sonra EF-Tu'dan uzaklaşır. Ribozomun A ve P bölgelerine bağlı iki aminoasit kalıntısı arasında ribozomun 50S alt birimine ait peptidil transferaz aktivitesi ile peptid bağı oluşur. P bölgesine bağlı formilmetiyonin grubu A bölgesindeki tRNA'ya bağlı amino asidin amin grubuna aktarılırken A bölgesinde bir dipeptidil tRNA, P bölgesinde ise yüksüz yani deaçillenmiş tRNA bulunur. Uzamanın son adımı ise translokasyonda ise ribozom mRNA'nın 3' ucuna doğru bir kodon ilerler. Bu hareket EF-G proteini aracılığıyla gerçekleşir. İlerlemeyle birlikte dipeptidil-tRNA A bölgesinden P bölgesine geçerken A bölgesi komşu kodona denk gelir. P bölgesindeki deaçillenmiş tRNA ise önce E bölgesine oradan da sitozole aktarılır. Uzama aşaması bitiş (UAA, UGA, UAG) kodonlarından birine denk gelene kadar devam eder. Bu kodonlardan biri ribozomunn A bölgesine denk geldiğinde sonlanma faktörleri (RF-1, RF-2 ve RF-3) devreye girer. Sonlanma faktörlerinden biri bitiş kodonuna bağlanınca peptidil transferaz peptidil-tRNA bağını keser. P bölgesindeki deaçillenmiş tRNA E bölgesine aktarılıp uzaklaştırılır. Ribozom alt birimleri ayrışarak sentez sonlanır.

Protein sentezi bakterilerin hayatta kalması ve büyümesi için gerekli kritik bir süreçtir. Bu süreçte görev alan başlıca yapı bakteriyel ribozom, birlikte 70S ribozomunu oluşturan büyük bir 50S ve küçük bir 30S alt biriminden oluşur. Bu yapı, 60S ve 40S olmak üzere büyük ve küçük ribozomal alt birimlerden oluşan 80S ökaryotik ribozom kompleksinden farklılık gösterir. Protein sentezi inhibitörleri seçici olarak bakteri hücrelerinin ribozomal alt birimlerini hedefler. Bu tipteki antibiyotikler, etki tarzlarına bağlı olarak, protein sentezinin farklı aşamalarına müdahale edebilirler. Aminoglikozidler, tetrasiklinler ve makrolidler gibi antibiyotik grupları bu sınıfa dahildir.

- **Makrolidler**

Makrolid antibiyotikler aktinomisetler tarafından üretilen ve makrosiklik lakton halkası ile karakterize antibiyotiklerdir [78]. Makrolidler, makrosiklik halkalarındaki atom sayısına göre alt sınıflandırılır [79]. Makrosiklik laktonda 14 atom içeren yani 14 üyeli makrolidler (eritromisin, roksitromisin, klaritromisin, diritromisin, fluritromisin), 15 üyeli makrolidler (azitromisin), 16 üyeli makrolidler (spiramisin, josamisin, midekamisin, rokitamisin, miokamisin) gibi gruplara ayrılırlar [80]. Makrolidler, bakterileri tamamen öldürmek yerine bakteriyel büyümeyi baskılayan veya inhibe eden bakteriyostatik antibiyotiklerdir. Klinik olarak, makrolid ilaçları Gram-pozitif bakterilere karşı en etkilidir, ancak aynı zamanda çeşitli Gram-negatiflere, özellikle üst solunum yolu patojenlerine karşı da etkinliğe sahiptirler. Makrolidler, 50S ribozomal alt biriminin peptidil transferaz enzimi ile reaksiyona girerek protein zincirinin uzamasını engeller. Protein sentezi sırasında, makrolid molekülünün hidrofobik tarafı, özellikle çıkış tünelinin yan duvarına bağlanır ve kısa peptidil-tRNA'ların erken salınmasına yol açar [78].

- **Ketolidler**

Ketolidler eritromisinin A'nın türevleridir ve 14 üyeli makrolidler gibi 14 üyeli lakton halkasına sahiptirler. Makrolidlerden farklı olarak, makrolidlerdeki kladinoz sakkaridinin yerini bir keton grubu alır [63]. Ketolidler bakteriyel ribozomun 50S alt biriminde yer alan peptidil transferaz bölgesiyle etkileşime girerek protein sentezini inhibe ederler [81]. Telitromisin ve ketromisin bu gruba örnektir [82]. Ketolidler makrolidlere dirençli suşlara, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes*'e karşı aktiviteye sahiptir [83].

- **Linkozamidler**

Linkozamid sınıfı antibiyotikler doğal linkozamid linkomisin ve yarı-sentetik türevleri klidamisin ve pirlimisinden gibi çeşitli bilşenler bu sınıfa dahildir [84]. İlk keşfedilen linkozamid, 1962 yılında *Streptomyces lincolnensis* 'ten izole edien linkomisindir [85]. Linkozamidler yapısal olarak bir alışılmadık (proteinojenik olmayan) amino asit (N-metil-4-n-l-prolin) ve bir şeker molekülünün (6-amino-6,8-dideoksi-1-tiyo-d-galaktopiranosid) amid bağı ile bağlanmasıyla oluşurlar [85, 86]. Linkozamidlerin aktivite spektrumu, hem aerobik hem de anaerobik türlere karşı geniştir ve stafilokok ve streptokok türleri gibi Gram-pozitif bakterilere karşı iyi

aktiviteye sahiptirler. Terapötik dozlarda linkozamid ve klindamisinin bakteriyostatik olduğu kabul edilir ve bakterilerin 50S ribozomal alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler [86].

- **Aminoglikozitler**

Aminoglikozitler, protein sentezinin bakterisidal inhibitörleri olarak işlev gören bir grup antibiyotiktir. Yapısal olarak, aminosiklitol halkasına glikosidik bağlarla bağlı amino şekerin varlığı ile karakterize edilirler [87]. Aminoglikozidlerin ilk üyesi streptomisin *Streptomyces griseus*'tan izole edilmiştir. Ardından neomisin, kanamisin, gentamisin, netilmisin, tobramisin, amikasin gibi diğer önemli aminoglikozidler farklı türlerden izole edilmiştir [88, 89]. Bu antibiyotikler, mikrobiyal genetik kodun translasyonuna müdahale etmek ve protein sentezini inhibe etmek için 30S ribozomuna geri dönüşümsüz olarak bağlanır [90]. Aminoglikozidler sıklıkla Gram-negatif aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Ayrıca diğer antibakteriyellerle birlikte Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır [91].

- **Tetrasiklinler**

Tetrasiklinler *Streptomyces* suşlarından elde edilen veya yarı sentetik olarak hazırlanan geniş spektrumlu antibiyotiklerdir [92]. Naftasen çekirdeği olarak bilinen dört aromatik halka içerirler. Bu sınıfın ilk antibiyotiği olan klorotetrasiklin, *Streptomyces aureofaciens*'in metabolik bileşenlerinden izole edilmiştir [93]. Grubun bilinen diğer bir üyesi oksitetrasiklin ise klorotetrasiklin ile yaklaşık olarak aynı zamanlarda (her ikisi de 1940'ların sonunda) *Streptomyces rimosus*'tan izole edilmiştir. Tetrasiklin ve demetilklorotetrasiklin gibi doğal tetrasiklinlerin yanı sıra metasiklin, doksisiklin, minosiklin gibi yarı sentetik türevleri de mevcuttur. Ayrıca suda çözünürlüğü iyileştirilmiş tetrasiklin türevleri (rolitetrasiklin ve limesiklin) de mevcuttur [94]. Tetrasiklinler 30S ribozomal alt üniteye bağlanıp bakteriyel protein sentezini inhibe ederler. Ribozoma bağlanma geri dönüşümlüdür, bu da antibiyotiğin bakteriyostatik olmasını açıklamaktadır. Bu bağlanma mRNA ribozomal kompleksteki "acceptor" bölgeye (A bölgesi) aminoaçil tRNA'nın bağlanmasını engeller böylece büyüyen peptid zincirine yeni bir aminoasit eklenemez. [95]. Tetrasiklinler özellikle *Staphylococcus, Streptococcus, Pneumococcus, Gonococcus,* kolera, dizanteri basili, boğmaca, *Rickettsia,*

Chlamydia ve mikoplazma gibi çok çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etkilidir [96].

2.2.1.4 Metabolik Yolakları Hedef Alan Antibiyotikler

Bazı sentetik ilaçlar, bakteriyel metabolik enzimler için rekabetçi inhibitörler olan antimetabolitler olarak işlev görerek bakteriyel enfeksiyonları kontrol eder. Örneğin sülfonamidler ve trimetoprim, folik asit sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir. Folik asit, nükleik asit ve amino asit sentezi, hücre çoğalması gibi hayati işlemlerde görev alan bir vitamindir [97]. Folik asit (gıdadaki bir vitamin olarak) memeli hücrelerine alınır. Ancak folik asit bakteri hücre duvarlarını difüzyon veya aktif taşıma yoluyla geçemez. Bu nedenle bakterilerin folik asit sentezlemesi gerekir. Folik asit, bakteriler tarafından para-amino-benzoik asitten (PABA) sentezlenir [98]. Sülfonamidler ve trimetoprim folik asit sentezini inhibe ederek aktivite gösterirler.

- **Sülfonamidler**

Sülfonamidler bakteriyel folik asit sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etkiye sahiptir. Bu grubun önemli temsilcileri sülfadiazin, sülfadoksin, sülfalen, sülfamerazin, sülfametizol ve sülfametoksazoldür [99]. Sülfonamidler, bir benzen halkasına doğrudan bağlanan bir kükürt dioksit (SO_2) kısmı ve bir azot (N) kısmı ile karakterize edilir [100]. Sülfametoksazol gibi sülfonamidler, bakterilerin folik asit sentezi için ihtiyaç duyduğu bir faktör olan PABA'nın yapısal bir analoğu olan p-amino-benzen-sülfonamidden türetilir. Antibakteriyel aktivite için 4. pozisyonda serbest bir amino grubu ve 1. pozisyonda bir sülfonamid grubu gereklidir. Sülfonamidin yerini alan heterosiklik veya aromatik halkalar, emilimi ve gastrointestinal toleransı değiştirerek bu aktiviteyi artırır [67].

- **Trimetoprim**

Trimetoprim (2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoksibenzil)pirimidin) kimyasal olarak diaminoprimidin grubuna dahildir [101, 102]. Sülfonamidlerle kombinasyon halinde ve yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antibakteriyeldir [102]. Trimetoprim, bakteriyel folik asit sentezinin son adımını katalize eden enzim dihidrofolat redüktazı inhibe eder [103].

2.2.1.5 Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler

Bu antibiyotikler, nükleik asit sentezine müdahale ederek, bakterilerin çoğalma ve temel işlevleri yerine getirme yeteneğini bozar ve bakteriyel hücre ölümüne yol açar. Nükleik asit sentezi inhibitörleri DNA sentezi inhibitörleri ve RNA sentezi inhibitörleri olmak üzere iki gruba ayrılır.

DNA sentezini engelleyen antibiyotikler, bakteriyel DNA'nın replikasyonuna müdahale ederek bakterilerin etkili bir şekilde çoğalmasını engeller. Prokaryotlarda DNA replikasyonu A ve T (adenin ve timin) nükleotidleri açısından zengin orijin bölgesinden başlar. Bakteriyel replikasyon kompleksinin (replizom) iki kopyasının bu bölgeye bağlanmasının ardından çift iplikli DNA replizomdaki helikaz enzimiyle açılarak replikasyon çatalı oluşturulur. Replikasyon başladıktan sonra iki replizom DNA'nın iki ayrı ipliği üzerinde zıt yönde hareket eder. DNA polimeraz sentezi daima 5'-3' yönünde gerçekleştirir. Bu nedenle kopyalanan DNA'nın bir iplikçiği üzerinde sentez kesintisiz devam ederken (kesintisiz veya öncü iplik (leading strand)), diğer iplikçik üzerinde Okazaki fragmentleri olarak adlandırılan küçük DNA dizileri oluşturularak sentez devam eder (kesintili veya gecikmeli iplik (lagging strand)). İki replikasyon çatalı zıt yönlere doğru ilerlerken, çift sarmalın açılmasına bağlı olarak çatalın önünde pozitif bir süper sarmal bölge oluşur. Oluşan süper sarmal bölge DNA'yı daha kompakt hale getirerek çift sarmalın açılmasını zorlaştırır. Hücreler replikasyonun aynı hızda ilerlemesi için bu süper sarmal derecesini azaltan topoizomeraz enzimlerine sahiplerdir. Topoizomerazlar iki tipte olabilir: Tip I enzimler bir ipliği keserken, tip II enzimler her iki ipliği de keser. Bir veya her iki iplik kesildikten sonra, bağlantı numarasını değiştirmek için DNA bükülür ve ardından kesilen uçlar yeniden birleştirilir. Tip II bir enzim olan DNA giraz replikasyon ve transkripsiyon için tüm bakterilerde gereklidir ancak insanlar da dahil olmak üzere yüksek ökaryotlarda mevcut değildir ve bu durum, enzimi antibiyotiklerin geliştirilmesi için ideal bir hedef haline getirir [104]. İyi bilinen bir DNA sentezi inhibitörü grubu, siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin gibi ilaçları içeren florokinolonlardır.

RNA sentezini inhibe eden antibiyotikler ise, RNA moleküllerinin DNA şablonlarından sentezlendiği transkripsiyon sürecini hedefler. Tüm hücresel organizmalarda, gen ekspresyonunun ilk ve muhtemelen en yüksek düzeyde düzenlenen adımı olan transkripsiyon, DNA'ya bağımlı RNA polimerazlar

tarafından gerçekleştirilir [105]. Bakteriyel RNA polimeraz 2 adet α, β, β' ve ω alt birimlerinden oluşan kompleks bir yapıya sahiptir [106]. Ancak yapısında DNA'daki promotör dizisini tanıyacak spesifik bir eleman bulunmaz bunun için σ faktörüne ihtiyaç duyar. Başlangıç aşamasında uygun σ faktörüne bağlanan holoenzim yapıdaki RNA polimeraz kapalı promotör kompleksine bağlanır bunun üzerine kompleks transkripsiyon başlama bölgesinden yaklaşık 18 baz çifti uzaklıktan DNA'nın çift zincirinin ayrılmasıyla açık konuma gelir [107]. Klasik modele göre uzama aşamasına geçilmesiyle birlikte σ faktörü kompleksi terk eder [104] ancak son çalışmalar bunun yerine, aksi takdirde RNA çıkış kanalından çıkan yeni oluşan RNA'nın uzantısına bir bariyer görevi görecek bazı σ alanlarının sıralı yer değiştirmesi vardır [107]. RNA zinciri şablon DNA ile tamamlayıcı nükleotidlerin eklenmesiyle uzar. RNA polimeraz DNA zinciri üzerinde bir durdurma sinyali veya sonlandırıcı diziye ulaşana kadar hareket eder ve ulaştığında transkripsiyon bölgesinden ayrılarak süreç sonlanır [104]. RNA sentezini hedef alan antibiyotiklerden rifamisinler bu grubun iyi bilinen bir örneğidir.

- **Kinolonlar**

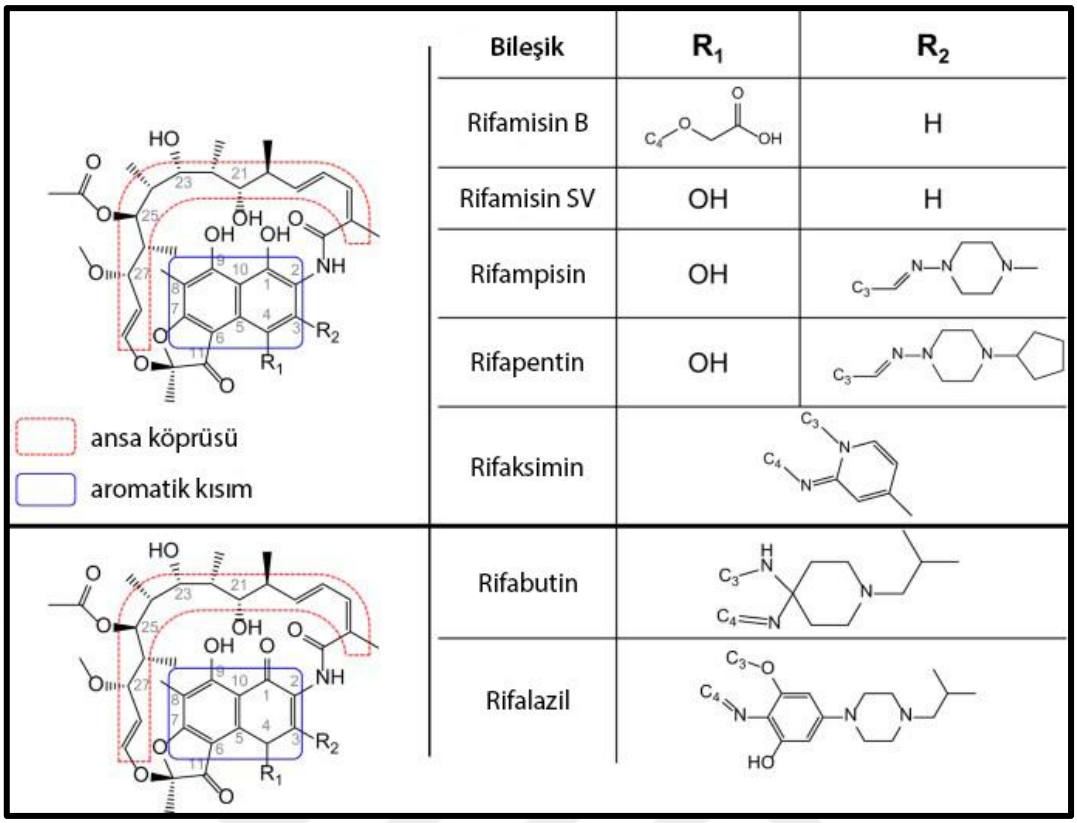
Kinolonlar bir organizmadan izole edilen antibiyotiklerin aksine kimyasal yollarla üretilen sentetik antibiyotiklerdir. DNA girazı ve DNA giraz gibi işlev gören topoizomeraz IV'ü inhibe edip DNA replikasyonuna engel olarak aktivite gösterirler [104]. Kinolonların Gram-negatif etkinliği DNA giraz, Gram-pozitif etkinliği ise topoizomeraz IV inhibisyonuyla bağlantılıdır [108]. Kinolonlar dört farklı jenerasyona ayrılmıştır. Nalidiksik asit, oksolinik asit, sinoksasin, piromidik asit, pipemidik asit ve flumekini kapsayan birinci kuşak kinolonlar *Pseudomonas* türleri hariç aerob ve Gram-negatif bakteriler üzerinde etkilidirler. Florokinolonlar olarak da adlandırılan ikinci kuşak kinolonlar arasında norfloksasin, siprofloksasin, lomefloksasin ve ofloksasin yer almaktadır. *Pseudomonas* türleri de dahil tüm Gram-negatif bakterilerde etkilidirler. Ayrıca bazı Gram-pozitif (*Streptococcus pneumoniae* hariç) ve *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* gibi bazı atipik mikroorganizmalara karşı aktiviteleri vardır. Levofloksasin, sparfloksasin, gatifloksasin ve grepafloksasinin yer aldığı üçüncü kuşak kinolonlarda *Streptococcus pneumoniae* dahil olmak üzere Gram-pozitif bakterilerde etki spektrumu genişlemiş ve atipik mikroorganizmalar üzerinde etkinliği artırılmıştır. Dördüncü kuşak kinolonlar ise üçüncü kuşak kinolonların etki

spektrumuna ek olarak anaerobik mikroorganizmaları da kapsar. Trovafloksasin moksifloksasin ve gemifloksasin bu gruba dahildir [109, 110].

- **Rifamisin Grubu Antibiyotikler**

Rifamisin grubu antibiyotikler *Amycolatopsis rifamycinica* tarafından üretilen ve çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı güçlü etkinlikleriyle bilinen bir antimikrobiyal ajan sınıfıdır [111]. Rifamisinler, ilk olarak 1957'de Fransa'daki çam ormanlarının topraklarından elde edilen *Amycolatopsis mediterranei* (eski adıyla *Streptomyces mediterranei*) aktinomiset suşunun fermantasyon ürünlerinden izole edilmiştir [112]. Fermantasyon ürünlerinin ekstraktındaki beş antimikrobiyal madde kâğıt kromatografisindeki mobilitelerine göre rifamisin A, B, C, D ve E; bu beş maddenin tamamı ise "rifamisin kompleksi" olarak adlandırılmıştır [113, 114]. Kompleks içindeki bileşenlerin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılarının stabil olmaması nedeniyle zor olsa da rifamisin B saf kristal formda izole edilebilmiştir [113]. Rifamisin B kompleksin en az aktif bileşeni olmasına rağmen düşük toksisitesi, orta derecede terapötik aktiviteye sahip olması, üretiminin nispeten kolay olması ve stabilitesi ileri çalışmalarda kullanımının önünü açmıştır [115]. Günümüzde terapötik amaçlı kullanılan tüm rifamisinler, rifamisin B'nin türevleridir [112].

Rifamisinler, bir alifatik zincirin bir naftalin halkasının bitişik olmayan iki konumu arasında bir köprü oluşturduğu (ansa) 25 üyeli bir siklik yapı ile karakterize edilir [112]. Alifatik bir ansa köprüsü tarafından kapsanan aromatik halka ile karakterize edilen rifamisinler gibi doğal ürünlere "ansamisinler" de denir. Bazı rifamisinlerin kimyasal yapıları Şekil 2.7'de verilmiştir. Araştırılan çok sayıda rifamisin türevi arasında, rifampisin (rifampin) en yaygın kullanılanıdır. Başta rifabutin, rifapentin ve rifaximin olmak üzere çeşitli diğerleri de dünyanın çeşitli yerlerinde kullanılmaktadır. Rifamisin SV ve rifamid çok daha az yaygın olarak bulunur [116].



Şekil 2.7 Bazı rifamisinlerin kimyasal yapıları [114].

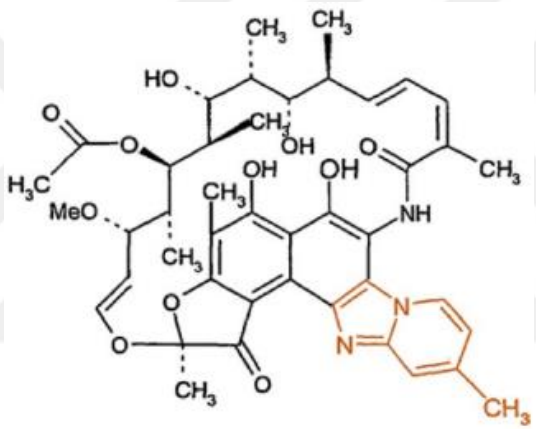
Rifamisinler bakterisidal antibiyotiklerdir. Bakteriyel DNA bağımlı RNA polimerazın β alt ünitesine bağlanarak nükleik asit sentezini inhibe ederler. Ökaryotik hücrelerdeki analog enzimlere zayıf ilgileri onları seçici kılmaktadır [117]. Rifampisin ve RNA polimeraz arasındaki ayrıntılı etkileşimler, rifampisin ile komplekslenmiş *Thermus aquaticus* çekirdek enziminin yüksek çözünürlüklü kristal yapı çalışmaları ile aydınlatılmıştır [118]. Çalışmalar sonucunda rifampisinin, aktif merkezden yaklaşık 12 Å uzakta olan RNA kanalı içindeki β alt biriminin derin bir kısmına bağlandığı ve transkript iki ila üç nükleotid uzunluğa ulaştığında uzayan RNA'nın yolunu bloke ederek aktivite gösterdiği anlaşılmıştır.

Rifamisinler, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarının tedavisinde ve diğer ilaçlarla kombinasyon tedavilerinde kullanılan geniş spektrumlu antibiyotikler ve birinci basamak ilaçlardır. Bunun nedeni, direncin hızlı bir şekilde geliştirilebilmesine rağmen, mikobakteri türlerinde hücre ölümünü tetikleyebilmeleridir. Rifamisinler, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonlarına karşı kullanımları dışında kronik stafilokok enfeksiyonlarına karşı da kullanılabilmektedir [119]. Ayrıca *Leprosy*, *Streptococcus* ve *Pneumococcus*,

özellikle ilaca dirençli *Staphylococcus aureus* gibi Gram-pozitif bakteriler üzerinde güçlü etkileri olduğu bilinmektedir [120].

2.3 Rifaksimin

Rifaksimin (4-deoksi-4'-metilprido(1',2'-1,2)imidazo(5,4C)rifamisin) (RFX), yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip, suda çözünmeyen ve sistemik olmayan bir antibiyotiktir. Azaltılmış sistemik toksisitesi ve az sayıda ilaç etkileşimi olan benzersiz bir rifamisindir [63]. Rifamisin grubunun yarı sentetik bir üyesi olan RFX, yapısında bir pirido-imidazol halkası içerir (Şekil 2.8). Piridoimidazol halkasının eklenmesi, RFX'i büyük ölçüde suda çözünmez, zayıf emilebilir ve zayıf hücre içi geçirgenliğe sahip bir antibiyotik haline getirir [2].



Şekil 2.8 Rifaksiminin kimyasal yapısı [2].

Hem deneysel hem de klinik veriler, RFX'in Gram-pozitif ve Gram-negatif, aerobik ve anaerobik bakterileri kapsayan geniş spektrumlu bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir. RFX genellikle *Escherichia coli (E. coli), Shigella* [121] ve *Clostridium difficile*'nin [122] neden olduğu akut ve kronik gastrointestinal bozuklukların önlenmesi veya tedavisinde kullanılır. RFX'in antibakteriyel mekanizması, diğer rifamisinlerde olduğu gibi, bakteriyel DNA bağımlı RNA polimerazın β alt ünitesine geri dönüşümsüz bağlanarak RNA sentezini inhibe etmesiyle açıklanmaktadır [123]. RFX ayrıca bakteriyel adezyonu, içselleştirmeyi (bir hücre veya organizmanın dışarıdan bakteriyi alıp yapısına dahil etmesi) ve translokasyonu bozarak patojenik virülansı önler [124]. Bununla birlikte hastanın inflamatuar bağışıklık tepkisini azaltır ve gastrointestinal sisteminin mikrobiyotasında olumlu değişikliklere neden olur [125]. Ek olarak yapılan klinik

çalışmalarda RFX'in hepatik ensefalopati (HE)'de NH_3'ün plazma konsantrasyonunu azalttığı, nörolojik semptomları iyileştirdiği, HE'nin ciddiyet derecesini ve HE nedeniyle hastaneye yatırılma riskini azalttığı ortaya konulmuştur [126].

Rifaksimin ilk olarak 1985 yılında akut bakteriyel diyare tedavisi için İtalya'da lisans almıştır. Daha sonra 2004 yılında *E. coli* kaynaklı yolcu ishali ve 2010 yılında ise HE tedavisinde kullanımı için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nden kullanım onayı almıştır [127]. Rifaksimin halihazırda farklı ticari isimlerle kullanılıyor olsa da düşük çözünürlüğü, biyoyararlanımını önemli ölçüde azaltmakta (< %0,4) ve alınan dozun büyük kısmı kullanılmadan vücuttan uzaklaştırılmaktadır [128].

2.4 İlaçta Çözünürlük ve Çözünürlüğü Artırma Yolları

Çözünürlük, ilaçtan gerekli farmakolojik yanıtın elde edilmesi için sistemik dolaşımda gereken etkin madde konsantrasyonuna ulaşmada önemli bir parametredir. Suda çözünürlüğü düşük ilaçlar, terapötik plazma konsantrasyonuna ulaşmak için yüksek dozda alım gerektirir. Bu ilaçların, düşük çözünürlüğe ve düşük çözünme hızına sahip olması sulu gastrointestinal sistem sıvılarında genellikle yetersiz biyoyararlanıma sahip olmasıyla sonuçlanmaktadır [3]. Aynı zamanda bu durum birey içi ve bireyler arasında doz orantısızlığına neden olur [129]. Doz-yanıt ilişkisinin değerlendirilmesini ve optimum dozun ayarlanmasını zorlaştırır [4]. Tüm bunlarla birlikte piyasadaki ilaçların %40'ından fazlasının etkin maddesi, üzerinde çalışılmakta olan ilaçların ise %60 kadarı hidrofobik özelliktedir [5]. Dolayısıyla düşük çözünürlüklü ekenlerin verimli kullanılabilmeleri için uygun formülasyonlarının geliştirilmesi ilaç endüstrisi için oldukça önemli bir süreçtir.

İlaçların sınıflandırılmasında kabul gören uluslararası Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) etkin maddelerin çözünürlük ve permeabilitesini temel alan bir sistemdir. BCS'ye göre ilaçların özellikleri Tablo 2.2'de verilmiştir. Burada yüksek çözünürlük bir etkin maddenin kullanımdaki en yüksek dozunun pH değeri 1 ile 7,5 aralığında iken 250 mL suda çözünebildiğini, yüksek geçirgenlik ise uygulanan dozun %90'ından fazlasının emilebildiğini anlatmaktadır [4]. BCS, ilaçların çözünürlüğü ve emilimi hakkında bilgi verdiğinden formülasyon geliştirme aşamasında büyük bir öneme sahiptir. Burada özellikle sınıf II ve IV'e

dahil etkin maddelerin çözünürlüğünün ve çözünme hızlarının artırılmasına yönelik yaklaşımların biyoyararlanımlarını da artırabileceği bilinmektedir [130]. Düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeler için çözünürlüğü artırmaya yönelik formülasyonların tasarlanması, ilacın emilimini artırabilir ve bu da daha tutarlı bir terapötik etki sağlayabilir.

Tablo 2.2 BCS'ye göre ilaçların özellikleri [129].

BCS Sınıfı	**Çözünürlük**	**Geçirgenlik**	**Emilim Modeli**	**Örnek**
I	Yüksek	Yüksek	İyi emilir	Metoprolol, diltiazem, propranolol
II	Düşük	Yüksek	İyi emilir	Fenitoin, nifedipin, karbamazepin
III	Yüksek	Düşük	Değişken	Simetidin, ranitidin, insülin
IV	Düşük	Düşük	Az emilir	Hidroklorotiyazid, taksol, **rifaksimin**

Çözünme hızının matematiksel ifadesi Noyes -Whitney denklemi (Eşitlik 2.1) etkin maddelerin çözünürlüğünün iyileştirilmesi konusunda ipuçları taşır [129].

$$\frac{dC}{dt} = A\frac{D}{h}(C_s - C_t) \tag{2.1}$$

Denklemde (Eşitlik 1.1) dC/dt çözünme hızını, A yüzey alanını, D bileşiğin difüzyon katsayısını, h difüzyon yüzeyi katmanının kalınlığını, C_s bileşiğin ortamdaki çözünürlüğünü (dogunluk konsantrasyonu) ve C_t ise t anında ortamdaki bileşiğin konsantrasyonunu temsil eder. Sink koşullarda çözünme olayında C_s değeri C_t'ye göre çok daha yüksektir, D değeri ilaç molekülleri için göreceli olarak yüksektir ve h değerinin *in vivo* koşullarda değiştirilmesi mümkün değildir [4]. Bu nedenle etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmaya yönelik yaklaşımlar katı bileşiğin parçacık boyutunu azaltarak ve/veya bileşik yüzeyinin ıslanabilirlik özelliklerini optimize ederek çözünme için mevcut yüzey alanını (A) arttırmak ve fizyolojik koşullar altında ilacın görünür çözünürlüğünün (C_s) geliştirilmesi yönündedir [131].

BCS ilaç klirensinin potansiyel mekanizmasını açıklamak ve emilim, dağılım, metabolizma ve eliminasyon üzerindeki etkilerini anlamak için Biyofarmasötik İlaç Dispozisyon Sınıflandırma Sistemi (BDDCS) olarak genişletilmiştir [132]. BDDCS'ye göre ilaçların özellikleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3 BDDCS'ye göre ilaçların sınıflandırılması [129, 133].

BDDCS Sınıfı	Çözünürlük	Metabolizma	Eliminasyon	Geçirgenlik
I	Yüksek	Yüksek	Metabolize olurlar	Yüksek
II	Düşük	Yüksek	Metabolize olurlar	Yüksek
III	Yüksek	Zayıf	Böbrek ve safra yoluyla değişmeden atılır	Düşük
IV	Düşük	Zayıf	Böbrek ve safra yoluyla değişmeden atılır	Düşük

Literatürde düşük çözünürlüklü etkin maddelerin çözünürlüğünü artırma amacıyla çeşitli fiziksel, kimyasal ve nanoteknolojik tabanlı yöntemler geliştirilmiştir. Çözünürlüğü artırmada kullanılan bazı yöntemler Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4 Çözünürlüğü artırmada kullanılan yöntemler [4].

Fiziksel Yöntemler	Kimyasal Yöntemler	Çözücüde Yapılan Değişiklikler	Diğer
• Çözünür polimorf kullanımı • Poröz yapılara yükleme • Partikül boyutu küçültme • Fiziksel kompleks oluşturma	• Ön-ilaç oluşturma • Tuz oluşturma • Ko-kristalizasyon	• pH ayarlama • Kosolvan kullanımı • Hidrotropi • Miselizasyon	• Miseller • Mikro-emülsiyonlar • Nano-emülsiyonlar • Lipid Taşıyıcılar • Lipozomlar

Son zamanlarda zayıf çözünürlük sorununun üstesinden gelinmesinde ön ilaç oluşturma, kosolvan kullanımı, hidrotropi, kompleksleştirme gibi geleneksel yöntemlerden ziyade nanoteknolojik yaklaşımlara, özellikle nano boyutlu ilaç taşıma sistemlerine, ilgi artmaktadır. Nanoteknolojiye dayalı ilaç taşıma sistemleri, ilacın doğru yere, doğru zamanda ve optimum dozda hedeflenmesini ve iletilmesini amaçlamaktadır [134]. Bu bağlamda özellikle ilaçların zayıf çözünürlüğünün üstesinden gelmek, biyoyararlanımlarını arttırmak ve sistemik toksisiteyi azaltmak için lipozomlar ve polimerik miseller gibi nano boyutlu taşıyıcılar geliştirilmiştir [135].

2.4.1 Çözünürlüğün Artırılmasında Nanoteknolojik Yaklaşımlar

Nanoteknoloji, boyutu 100 nm'den küçük, yeni özellik ve işlevlere sahip malzemeler, cihazlar ve sistemler yaratmak için bu ölçekte maddenin kasıtlı ve kontrollü manipülasyonunu içeren multidisipliner bir alandır [136]. Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (National Nanotechnology Initiative (NNI), 2010) nanoteknolojiyi "benzersiz fenomenlerin yeni uygulamalara olanak sağladığı, yaklaşık 1 ila 100 nm arasındaki boyutlardaki maddenin anlaşılması ve kontrolü" olarak tanımlamaktadır [29]. Nanoteknoloji fizik, kimya, biyoloji ve mühendislik gibi çeşitli bilimsel disiplinleri kapsamaktadır [137].

Maddelerin nano ölçekteki özellikleri yığın özelliklerinden farklıdır [138]. Parçacık boyutu değiştikçe yüzey kimyası değişir ve parçacığın ortamında farklı yüzey etkileşimlerine yol açar. Biyolojik sistemdeki nanoparçacıkların alımı, nanomateryalin boyutu ve yüzey kimyası tarafından kontrol edilir. Parçacık boyutuna ve özelliklerine bağlı olarak, bir malzeme farklı hücresel alım mekanizmalarına ve dolayısıyla farklı bir hücre içi tepkiye ve ayrıca biyolojik ortamda farklı bir metabolik sonuca sahip olabilir [29]. Boyuta bağlı benzersiz özellikleri, nano boyutlu malzemeleri biyolojik uygulamalar dahil olmak üzere insan faaliyetinin birçok alanında vazgeçilmez kılmaktadır [139].

Son zamanlarda suda az çözünen birçok ilacın çözünme hızlarını ve biyoyararlanımını arttırmak için nano boyuta indirgemeye yönelik çeşitli stratejiler ortaya çıkmıştır. Bu stratejiler arasında ilaç tozlarının yüzey alanı/hacim oranlarının artırılması, kristal formların değiştirilmesi ve kontrollü salım için taşıyıcı görevi görebilecek yeni nanomateryallerin tasarlanması yer almaktadır. Bu yöntemler, ilaç

çözünürlüğünün ve farmakokinetiğinin iyileşmesini sağlamanın yanında sistemik yan etkileri de azaltabilir. Hidrofobik ilaçların nano boyuta indirgenmesi genellikle kimyasal çökeltme veya parçalanma yoluyla ilaç nanokristallerinin üretimini içerir. Alternatif olarak nanoemülsiyonlar ve polimerik nanopartiküller gibi nanoteknoloji bazlı ilaç taşıma sistemleri de kullanılabilir [140, 141].

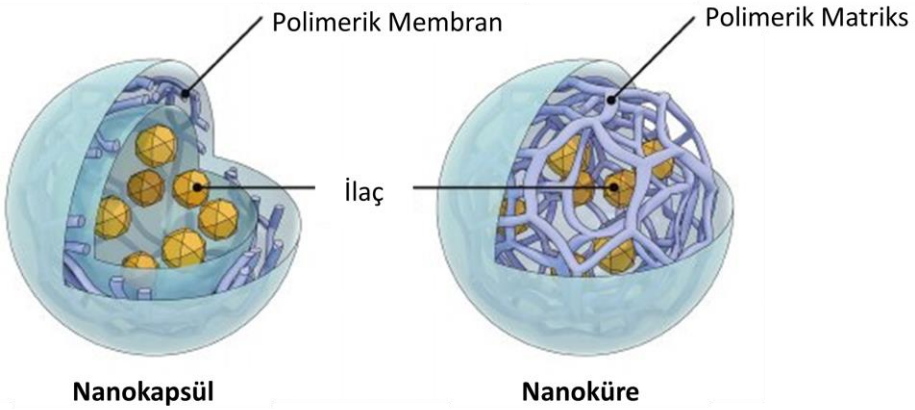
2.5 Polimerik Nanopartiküller

Nanoteknolojinin tıp alanındaki uygulamalarından nanopartiküller, benzersiz özellikleri ve potansiyel uygulamalarından dolayı ilgi odağı haline gelmiştir. Nanopartiküller, boyutları birkaç nanometre ile birkaç yüz nanometre arasında değişen katı kolloidal parçacıklardır [142]. Morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı kategorilerde incelenebilirler. Fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre iyi bilinen bazı nanopartikül sınıfları arasında karbon bazlı, metalik, seramik, yarı iletken, lipid bazlı ve polimerik nanopartiküller sayılabilmektedir [143].

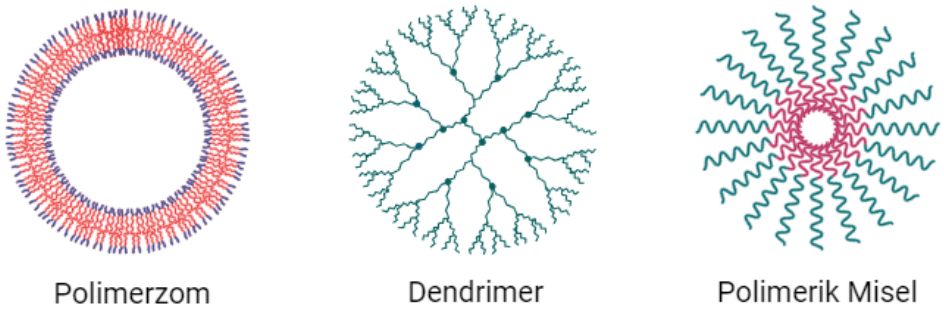
Polimerik nanopartiküller biyouyumluluk, biyobozunurluk, düşük toksisite, kontrollü salım, biyolojik ortamda yüksek stabilite gibi özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedirler [144]. Etkin maddelerin polimerik nanopartiküllere yüklenmesi çeşitli avantajlar sağlar. Fizyolojik koşullarda stabilitesi nispeten yüksek olan polimerik nanopartiküller etkin maddenin hedeflenen bölgeye ulaşma ihtimalini artırır. Etkin maddenin hedefli ve kontrollü salımına olanak tanıyarak uzun süre boyunca istenen bölgede, terapötik konsantrasyonda tutulmasını sağlar. Ayrıca etkin maddenin hedefli ve kontrollü salımı vücudun diğer bölümlerinde sistemik toksisiteyi azaltır. Partiküllerin küçük boyutu, terapötik bileşenlerin vücut bariyerlerinden geçişini ve hücresel alımı iyileştirip hedeflenen bölgelere taşınmasını kolaylaştırır. Polimerik nanopartiküller yüksek yükleme kapasiteleri (ilaç/nanopartikül oranı) sayesinde ilacın dağılımını iyileştirmektedir. Tüm bunlarla birlikte polimerik nanopartiküllerin yüklenen hidrofobik etkin maddenin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını önemli ölçüde artırdıkları bilinmektedir [6].

Polimerik nanopartiküller hazırlanış biçimlerindeki farklılıklara bağlı olarak etkin madde partikül içindeki dağılımına göre nanokapsül ve nanoküre olmak üzere iki gruba ayrılır (Şekil 2.9) [145]. Ayrıca polimerik veziküller (polimerzomlar),

dendrimerler ve polimerik miseller de polimerik nanopartiküller başlığı altında incelenmektedir (Şekil 2.10) [146].



Şekil 2.9 Nanokapsül ve nanoküre yapılarının şematik gösterimi [145].



Şekil 2.10 Polimerzom, dendrimer ve polimerik misellerin şematik gösterimi (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir).

2.5.1 Nanokapsüller ve Nanoküreler

Nanokapsüller, biyoaktif malzemeyi içerecek bir rezervuar görevi gören sulu veya yağlı bir çekirdeğe sahip membran duvar yapıları ile karakterize edilirken nanoküreler biyoaktif malzemenin parçacıklar boyunca dağıldığı matriks sistemleri sergiler [147]. Bununla birlikte etkin maddenin polimerik yüzeye adsorbe olduğu durumlar da söz konusudur [148].

2.5.2 Polimerzomlar

Polimerzomlar amfifilik kopolimerlerin supramoleküler bir yapı oluşturmak üzere bir araya geldiği, çift katmanlı membran ile çevrelenmiş içi boş veziküllerdir [149, 150]. Lipozom analogları olarak kabul edilirler [151]. Polimerzomlar esas olarak viral kapsidlerin ve hücre zarlarının özelliklerini ve yapısını simüle edecek şekilde

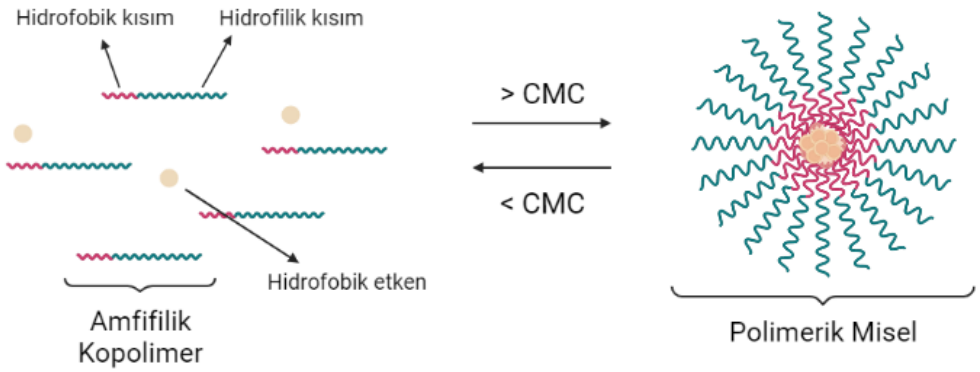
tasarlanmıştır. Yüksek stabilite, yüzey işlevselleştirme ve kimyasal çok yönlülükleri sayesinde polimerozomlar, biyolojik olarak aktif moleküllerin taşınmasında umut verici adaylardır [150].

2.5.3 Dendrimerler

Dendrimerler küresel üç boyutlu morfoloji oluşturan aşırı dallanmış sentetik polimerlerdir [152]. Bir çekirdek, çekirdek etrafında dallanma birimleri ve dallanmış fonksiyonel grup olarak da adlandırılan ve etkin maddelerin yüklenmesiyle ilgili parametreleri belirleyen yüzey gruplarından meydana gelir [153, 154]. Farmasötik bilimlerde dendrimerler öncelikle suda çözünürlüğü zayıf olan ilaçların çözünürlüğünün artırılması amacıyla kullanılmaktadır [155].

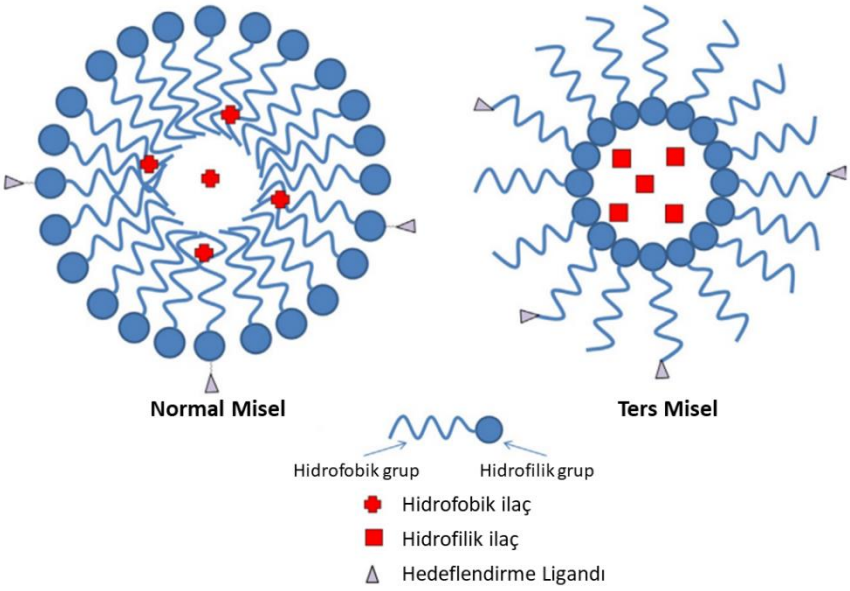
2.5.4 Polimerik Miseller

Polimerik miseller, hidrofobik bir çekirdek ve hidrofilik bir kabuk kısmından oluşan nano-boyutlu yapılardır. Polar çözücüler içinde (sulu ortamda) amfifilik moleküllerin konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunu (CMC) geçtiğinde çeşitli itme ve çekme kuvvetlerinin etkisiyle polimerin hidrofobik kısımları bir araya gelerek çekirdek yapısını, hidrofilik kısımları ise su ile arayüzde kabuk (veya korona) kısmını oluşturur (Şekil 2.11). Etkili olan çekme kuvvetleri çekirdek segmentinin sulu fazdan ayrılmasını yöneten hidrofobik etkileşimleri, elektrostatik etkileşimleri ve kompleksleşmeyi içerir [156]. Öte yandan, sterik etkileşimler, elektrostatik itme kuvveti ve hidrasyon itme kuvvetlerine katkıda bulunur [156].



Şekil 2.11 Misel yapısının şematik gösterimi (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir).

Polar çözücüler içerisinde amfifilik moleküller tipik bir hidrofobik çekirdek ve hidrofilik korona kısmından meydana gelen ve hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak tanıyan normal miselleri oluştururlar. Bununla birlikte literatürde hidrofilik molekülleri hidrofilik bir çekirdekte tutabilen ters miseller de rapor edilmiştir. Normal misel ve ters miselin şematik gösterimi Şekil 2.12'de verilmiştir.



Şekil 2.12 Normal ve ters miselin şematik gösterimi [157]

İlaç taşıma sistemlerinde misellerin kullanımı çeşitli avantajlar sağlamaktadır:

- Çözünürlüğü düşük etkin maddelerin çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının iyileştirilmesine katkı sağlarlar.
- Etken maddenin biyolojik ortamda inaktivasyonunun önüne geçebilirler.

- Küçük boyutları (boyutları genellikle 100 nm'nin altındadır) damarlanmanın zayıf olduğu bölgelerde akümüle olmalarına olanak sağlar.
- İlacın gerekli bölgede toplanabilmesi için dolaşımda yeterince uzun süre kalabilirler.
- Spesifik ligandlar bağlanarak hedeflendirilebilirler.
- Kolaylıkla büyük miktarlarda ve tekrarlanabilir biçimde üretilebilirler [158, 159].

Polimerik misellerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımı avantajları göz önünde bulundurulduğunda umut vericidir. Bununla birlikte miselin başarısı için bazı tasarım kriterlerini taşıyor olması gerekmektedir:

- Dokuya etkili biçimde nüfuz edebilecek kadar küçük boyutlu olmalı.
- Hedef dokuda birikmenin sağlanabilmesi için yeterli bir süre boyunca vücutta dolaşmalı ve bu süre zarfında immün sistem tarafından tanınmayacak durumda olmalıdır.
- Bozunma veya çözünmesinin ardından vücuttan uzaklaştırılabilmelidir.
- Ayarlanabilir stabiliteye sahip olmalıdır.
- Enkapsüle edilen ilacın farmakokinetik özelliklerini iyileştirebilmelidir.
- Yüksek yükleme kapasitesine sahip olmalıdır.
- Maddi açıdan uygun, tekrarlanabilir ve kolay bir yöntemle üretilebilmelidir [14].

Polimerik misellerin üretiminde diblok ve triblok amfifilik kopolimerler tercih edilebilmektedir. Diblok kopolimerler, aynı moleküler ağırlıkta veya hidrofilik-lipofilik dengedeki triblok kopolimerlere göre daha düşük CMC değerlerine ve dolayısıyla daha fazla termodinamik stabiliteye sahiptir. Ayrıca daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi ile karakterize edilir [10]. Dolayısıyla misel üretim süreçlerinde daha çok diblok amfifilik kopolimerler üzerine yoğunlaşılmıştır.

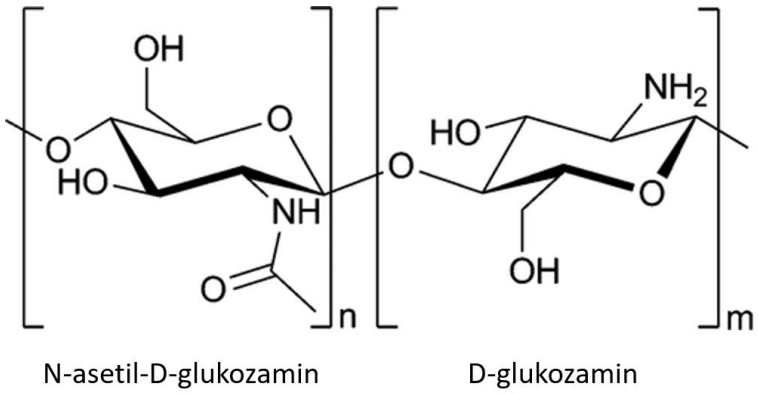
Misel üretiminde kullanılan diblok kopolimerlerin hidrofilik bloğunun oluşturulmasında genellikle poli etilen glikol (PEG) tercih edilmiştir. PEG stabilitenin artırılmasına katkı sağladığı, çözünürlük ve biyouyumluluğu artırdığı ve partikülü retiküloendotelyal sistem tarafından alımdan koruduğu için araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır [160, 161]. Hidrofobik blok olarak ise çeşitli polimerler tercih edilebilmektedir. Literatürde kullanılan

polimerlerden bazıları, poli(aspartik asit), poli(beta-benzil-L-aspartat), polikaprolakton (PCL), poli(gama-benzil-L-glutamat), poli(D,L-laktid), poliakrilik asit, poli(oksi propilen), ve polistirendir [159]. Bu polimerlerden PCL yüksek biyouyululuğu ve biyobozunurluğu nedeniyle kontrollü salım çalışmalarında kapsamlı biçimde araştırılmıştır [162]. Biyouyumluluk ve biyobozunurluğu polimerin vücutta kullanımını güvenli kılmaktadır. Ayrıca PCL'nin yavaş bozunması, ilaçların uzun bir süre boyunca sürekli olarak salımına olanak tanır [13]. Bu sayede aktif bileşenin konsantrasyonu uzun süre boyunca terapötik seviyede tutulabilir.

Sonuç olarak, nispeten küçük partikül boyutları, kolay üretilmeleri ve çözünme özellikleri geliştirme kabiliyetleri miselleri ilgi odağı haline getirmiştir [8]. Son zamanlarda polimerik miseller çözünürlüklerini, stabilitelerini ve biyoyararlanımlarını artırmak amacıyla birçok hidrofobik etkin maddenin enkapsüle edilmesiyle araştırmacılar tarafından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [163]. Çalışmaya da konu olan mPEG-*b*-PCL miseller daha önce RFX gibi hidrofobik olan honokiol [164] ve kurkumin [165] gibi etkin maddelerin çözünürlüğünü arttırma amaçlı kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda, hedeflendiği üzere maddelerin suda çözünürlüğünün arttırılmış olduğu ve güvenle kullanılabilecek, biyouyumluluğu yüksek sistemlerin oluşturulduğu bildirilmiştir.

Polimerik miseller vücut sıvılarında diğer nanopartiküllere nazaran daha düşük stabilite gösterirler [8]. Misellerin stabilitesini artırmaya yönelik çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlardan biri polimerik misellerin çeşitli materyallerle kaplanmasıdır. Farmasötik nanoteknoloji alanında kitosan, parçacık oluşturucu bir polimer olarak ve en yenilikçi şekilde yüzey kaplaması olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kitosan, kitinin deasetillenmiş bir türevidir ve rastgele dağılmış β-(1 → 4) bağlı N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin ünitelerinden oluşur (Şekil 2.13) [166]. Kitosanın katyonik karakteri yapısındaki D-glukozamin ünitelerinin varlığından gelir. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bu tür nano taşıyıcıların yüzeyinin kitosan ile kaplanarak değiştirilmesinin, birçok avantaj sağlayabileceğini göstermiştir: i) fizikokimyasal stabiliteyi geliştirir; ii) ilaç salımını kontrollü hale getirir iii) mukozaya yapışmayı ve doku penetrasyonunu teşvik eder iv) hücre etkileşimlerini modüle eder (hücresel alım ve toksisite), v)

antimikrobiyal etkileri artırır ve vi) biyoyararlanımı ve ilaç etkinliğini geliştirir [15, 167].



Şekil 2.13 Kitosanın kimyasal yapısı [168].

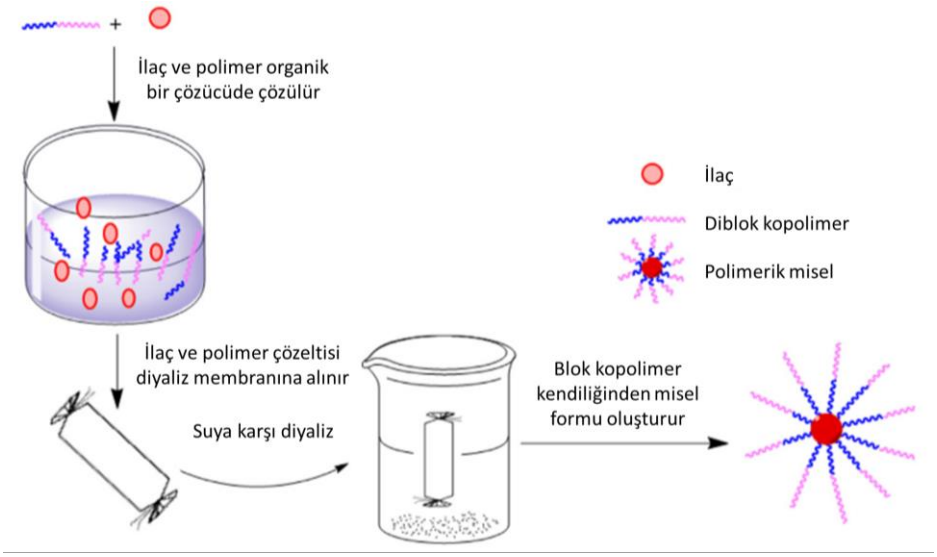
2.5.4.1 Polimerik Misellerin Üretim Yöntemleri

- **Doğrudan Dissolüsyon**

Polimerik misellerin üretiminde kullanılan en temel ve basit yöntemdir. Yöntem, hem polimerin hem de etkin maddenin suda çözünebilir olduğunu varsayar ve CMC veya CMC'nin üzerindeki bir konsantrasyonda polimer ve etkin maddenin direkt olarak su fazına aktarılması yoluyla uygulanır [169]. CMC'de veya üzerindeki bir konsantrasyonda, kopolimer ve ilaç kendi kendine birleşerek yüklü polimerik miselleri oluşturur. Teknik genellikle düşük ilaç yüklemesiyle sonlansa da sıcaklık artışı bu durumun önüne geçmede bir miktar fayda sağlayabilir [170].

- **Diyaliz**

Diyaliz tekniği, monodispers yapıda polimerik misellerin hazırlanması için etkili bir tekniktir. Kısaca ilaç ve polimerler, suyla karışabilen organik çözücülerle çözüldükten sonra uygun moleküler ağırlık ayırma sınırı (MWCO) olan bir diyaliz membranına yerleştirilir. Organik faz (çözücü), diyaliz membranından su fazına yayılır. Çözücünün yer değiştirmesi polimerlerde çözünürlük kaybına neden olur ve polimerler aşamalı olarak çöker. Polimerlerin hidrofobik etkin maddeyi enkapsüle ederek çökmesiyle misel yapı meydana gelir [171, 172].



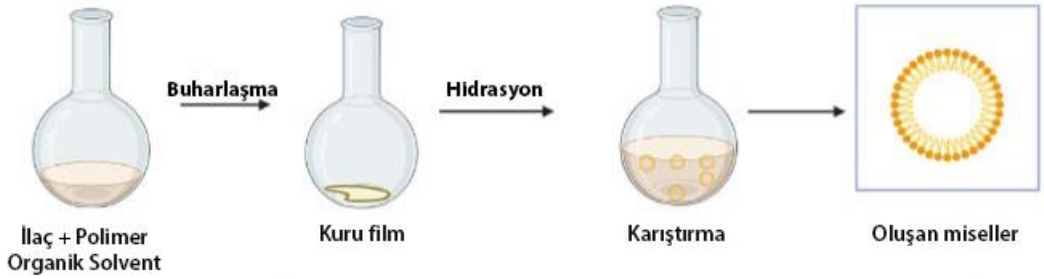
Şekil 2.14 Diyaliz yöntemi ile misel üretiminin şematik gösterimi [173].

- **Su İçinde Yağ (*o/w*) Emülsiyonu**

Su içinde yağ (*o/w*) emülsiyon yönteminde, diklorometan veya kloroform gibi suyla karışmayan uçucu bir çözücü kullanılır. Bu yöntemde, kopolimer (ve ilaç molekülü) organik bir çözücüde çözülür ve oluşan bu organik faz karıştırma (sonikasyon veya homojenizasyon) kullanılarak sulu bir ortama eklenir. Bu bir emülsiyon oluşumuna yol açar. Daha sonra organik çözücünün buharlaştırılmasıyla miseller oluşur [170].

- **İnce Film Hidrasyon / Çözücü Buharlaştırma**

Bu yöntemde etkin madde ve polimer organik bir çözücü içinde çözülür. Daha sonra çözücü buharlaştırılır ve reaksiyon kabında polimer ve etkin maddeden oluşan ince bir film kalır. Bu ince film su fazıyla karıştırılarak misellerin oluşması sağlanır [174]. Yöntemin şematik gösterimi Şekil 2.15'te verilmiştir.



Şekil 2.15 İnce film hidrasyon yönteminin şematik gösterimi [175].

- **Nanoçöktürme**

Polimerik misellerin üretimi için pek çok farklı yöntem geliştirilmesine karşın nanoçöktürme yöntemi basit ve düşük maliyetli olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir [176]. Nanoçöktürme, bir diğer tabirle çözücü yer değiştirme, yöntemi 1989 yılında Fessi ve ark. tarafından geliştirilmiştir [177]. Yöntemde organik faz (solvent) ve su fazı (anti solvent) olmak üzere birbiriyle karışabilen iki faz kullanılır. Genellikle organik faz polimer ve etkin maddeyi çözerken su fazının çözmemesi beklenir [178]. Organik fazı oluşturmak amacıyla birden fazla çözücü kullanılacaksa bunların da birbiriyle karışabiliyor olması beklenir. Çözünürlük, çözünmezlik ve karışabilirlik koşulları sağlandığı sürece iki organik faz veya iki su fazının kullanılması mümkündür [179]. Nanoçöktürme yönteminde en sık kullanılan çözücüler (organik fazı oluşturan) etanol, aseton, hekzan, metilen klorür veya dioksandır. Su fazı olarak ise agregasyonu önleme amacıyla su fazında çözünebilen surfaktanlar içeren çözeltiler kullanılabilmesine karşın genelde yalnızca su kullanılmaktadır [180]. Organik fazın su fazına aktarılmasıyla organik fazda çözünmüş haldeki polimer ve etkin madde su fazına geçip miselleri oluşturarak çökerler. Misellerin oluşumu organik faz ve su fazı arasında meydana gelen akış, difüzyon ve yüzey gerilimi gibi biriken olayların bir sonucudur [181]. Bu olaylar sıvı arayüzeylerinde yüzey gerilimi farkından kaynaklanan kütle aktarımını ifade eden Marangoni etkisiyle açıklanmaktadır [176]. Prosedürün temel değişkenleri, organik fazın enjeksiyon hızı, sulu faz karıştırma hızı, organik faz ekleme yöntemi ve organik faz/sulu faz oranı gibi, organik faz ve su arasındaki etkileşimler ile ilişkili olanlardır [178, 179]. Bununla birlikte etkin maddenin ve polimerin doğası ve konsantrasyonu da prosedür için belirleyici faktörlerdir. Tüm bu faktörler misel boyutunu, polidispersitesini, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesini önemli ölçüde etkilemektedir [179]. Nanoçöktürme tekniği, misel üretimi konusunda iyi tanımlanmış, herhangi bir katkı maddesi olmadan, nispeten daha basit, daha az enerji gerektiren ve aynı zamanda yaygın olarak kullanılan uygulanabilir bir tekniktir [181].

3
DENEYSEL YÖNTEM

3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları.

Kimyasal	Firma	Kullanım Amacı
Metoksi poli(etilen glikol) (Mw 5000 Da)	Fluka	Polimer sentezi
ε-kaprolakton (d=1,03 g/mL, %97)	Sigma-Aldrich	Polimer sentezi
Kalay oktoat ($Sn(Oct_2)$)	Sigma-Aldrich	Polimer sentezi
Kloroform	Riedel-de Haën	Polimer sentezi
Dietil eter	Riedel-de Haën	Polimer sentezi
Piren	Sigma-Aldrich	Polimer sentezi
Rifaksimin	Sigma-Aldrich	Misel üretimi
Aseton	Tekkim	Misel üretimi
Düşük molekül ağırlıklı kitosan	Bostonchem	Misel üretimi
Asetik asit (glasiyal)	Merck	Misel üretimi
Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($NaH_2PO4.2H_2O$)	Riedel-de Haën	Fosfat tamponu hazırlama
Sodyum fosfat dibazik heptahidrat ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Fluka	Fosfat tamponu hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Fluka	Fosfat tamponu hazırlama
Sodyum azid (NaN_3)	Applichem	Fosfat tamponu hazırlama
Sodyum hidroksit (NaOH)	Fluka	Fosfat tamponu hazırlama
DPPH	Sigma-Aldrich	Antioksidan aktivite
Etanol	Sigma-Aldrich	Antioksidan aktivite

Tablo 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları (devamı).

S. aureus (ATCC 25923)	YTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kültür Koleksiyonu	Antibakteriyel aktivite
Fare fibroblast hücreleri (L929) (ATCC CCL-1)	YTÜ Hücre Kültür Koleksiyonu	Biyouyumluluk analizi
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F12)	Capricorn	Biyouyumluluk analizi
Fetal Bovin Serum (FBS)	Capricorn	Biyouyumluluk analizi
Penisilin streptomisin	Capricorn	Biyouyumluluk analizi
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	Biyouyumluluk analizi
Tripsin-EDTA (0.25%)	Sigma-Aldrich	Biyouyumluluk analizi
MTT	Biomatik	Biyouyumluluk analizi

3.2 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Cihaz	**Marka/Model**	**Kullanım Amacı**
Hassas Terazi	Sartorius CP22D	Tüm deneyler için gereken kimyasalların tartımı
Vorteks	Heidolph	Örneklerin çözünmesi
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonorex	Örneklerin çözünmesi
Çoklu Manyetik Karıştırıcı	IKA	Misel sentezi
Mikrodalga Sentez Ünitesi	MicroSYNTH Milestone	Polimer sentezi

Tablo 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devamı).

ATR aparatlı FT-IR Spektrofotometresi	Shimadzu, Japan	Polimer ve misellerin karakterizasyonu
GPC	Viskotek GPCmax	Polimer karakterizasyonu
NMR	Mercury- VX 400 BB	Polimer karakterizasyonu
Floresans Spektrofotometre Cihazı	QuantaMaster	Polimer karakterizasyonu
Ultra Saf Su Cihazı	Milipore-Q MilliQ Gradient	Deneylerde kullanılan ultra saf suyun temini
Zetasizer	Malvern Zetasizer Nano ZS	Misel karakterizasyonu
Liyofilizatör	Heto Drywinner	Örneklerin dondurularak kurutulması
pH Metre	HANNA HI 2211	Fosfat tamponu hazırlanması
SEM	Thermoscientific, Quattro S SEM	Misel karakterizasyonu
TEM	JEOL JEM-1220	Misel karakterizasyonu
Çalkalamalı Su Banyosu	N-Biotek	Misel karakterizasyonu
Steril Kabin	SafeFast Classic 212	Antibakteriyel aktivite
Otoklav	Hirayama HV50-L	Antibakteriyel aktivite
Çalkalamalı İnkübatör	Biosan ES-20	Antibakteriyel aktivite
Mikroplaka okuyucu	Biotek	Antioksidan ve antibakteriyel aktivite
Etüv	Memmert UN55	Antibakteriyel aktivite
Laminar akış kabini	Faster	Biyouyumluluk analizi
İnkübatör	Binder	Biyouyumluluk analizi
İnvert mikroskop	Olympus	Biyouyumluluk analizi
Santrifüj	Himac	Biyouyumluluk analizi
Mikroplaka okuyucu	Multiskan™ FC	Biyouyumluluk analizi

3.3 Deneylerde Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

Elektromanyetik spektrumun 0,8-1000 µm dalga boyu (12500-10 cm^{-1} dalga sayısı) aralığındaki bölge kızılötesi (infrared (IR)) bölgesidir. Bölge geniş bir aralığı kapsadığından en kısa dalga boylu ve en uzun dalga boylu IR ışını arasında enerjisel açıdan önemli bir fark oluşur. Bu nedenle bölge üç farklı kısıma ayrılmıştır: 0,8-2,5 µm dalga boyu (12500-4000 cm^{-1} dalga sayısı) aralığı yakın IR (NIR), 2,5-50 µm dalga boyu (4000-400 cm^{-1} dalga sayısı) aralığı orta IR (MIR), 2,-1000 µm dalga boyu (400-10 cm^{-1} dalga sayısı) aralığı uzak IR (FIR) bölgesi olarak adlandırılmaktadır [182]. IR spektroskopisi çoğunlukla MIR bölgesine yoğunlaşmıştır [183]. Bu bölgedeki IR ışının maddeyle etkileşimi sonucunda maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağlarda titreşim meydana gelir. IR spektroskopisi fonksiyonel grupların temel titreşimlerine karşılık gelen karakteristik IR absorpsiyon bantlarıyla ilişkilendirilmesi prensibine dayanır [184]. IR spektroskopisi, interferometre kullanımı ve iletilen tüm enerjinin aynı anda tespit edilmesine olanak tanıyan hızlı Fourier dönüşüm algoritmasının uygulanmasıyla büyük ölçüde geliştirilmiştir. FT-IR spektroskopisi, ölçümlerin çözünürlüğünü ve hassasiyetini geliştirmek için Fourier dönüşümü tekniğini kullanan bir IR spektroskopisi türüdür [185]. FT-IR spektroskopisi tahribatsız, kalibrasyon gerektirmeden hassas bir yöntem, hızlı ve nispeten basit bir yöntemdir [186]. Organik ve inorganik numunelerin kimyasal analizlerinde sıklıkla tercih edilir. IR spektrumları geçirgenlik veya yansıma yöntemiyle elde edilebilir. Geçirgenlik yöntemi, dedektörün numuneden geçen IR radyasyonunun yoğunluğunu ölçtüğü en eski ve en yaygın kullanılan düzenlemedir. Opak filmler veya katı numunelerin yüzeyleri gibi ışığı iletemeyen numuneler, zayıflatılmış toplam yansıma (ATR), gibi çeşitli yansıtma yöntemleri kullanılabilir. Bu yöntem tahribatsız bir yöntemdir ve numune hazırlama gerektirmez. ATR, ince filmlerin/plakaların yüzeye yakın bölgeden IR spektrumlarını elde etmek için en yaygın yöntemdir. ATR bağlantısında IR radyasyonu optik olarak daha yoğun olan kristalden geçer ve numunenin yüzeyine yansır. Numune, ~5 mm'lik bir numune derinliğine karşılık gelen bir yansıma spektrumuna yol açacak şekilde bu radyasyonun bir kısmını emer [187].

3.3.2 Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Jel geçirgenlik kromatografisi, bir diğer adıyla boyut dışlama kromatografisi (SEC), moleküllerin boyut veya molekül ağırlığı farklarına göre ayrıldığı bir kromatografik yöntemdir [188]. Polimerizasyon tepkimelerinde molekül ağırlığının ve polidispersite indeksi değerlerinin aydınlatılarak reaksiyonun kontrol düzeyi hakkında bilgi edinilmesini sağlar [189]. Yöntem kapsamında polimerler, gözenekli jel (çapraz bağlı polistirenler (Styragels), poli(vinil asetat)lar (Fractogel PVA), sakkaritler (Sephadex)) bir kolon yardımıyla hidrodinamik boyuta göre ayrılırlar [190, 191] . Küçük moleküller kolondaki gözeneklerin içinde daha uzun süre bulunurken büyük moleküller sterik engellemeler nedeniyle gözeneklere girmeden, hareketli faz ile birlikte kolondan daha kısa sürede ayrılırlar [192]. Çıktılar uygun bir dedektör (kırılma indisi, lazer ışın saçılımı, diferansiyel viskozite ve ultraviyole (UV) dedektörleri gibi) yardımıyla alınıp analiz edilir [190]. Cihazın kalibrasyonu standart bir lineer polimer ile gerçekleştirilir [190].

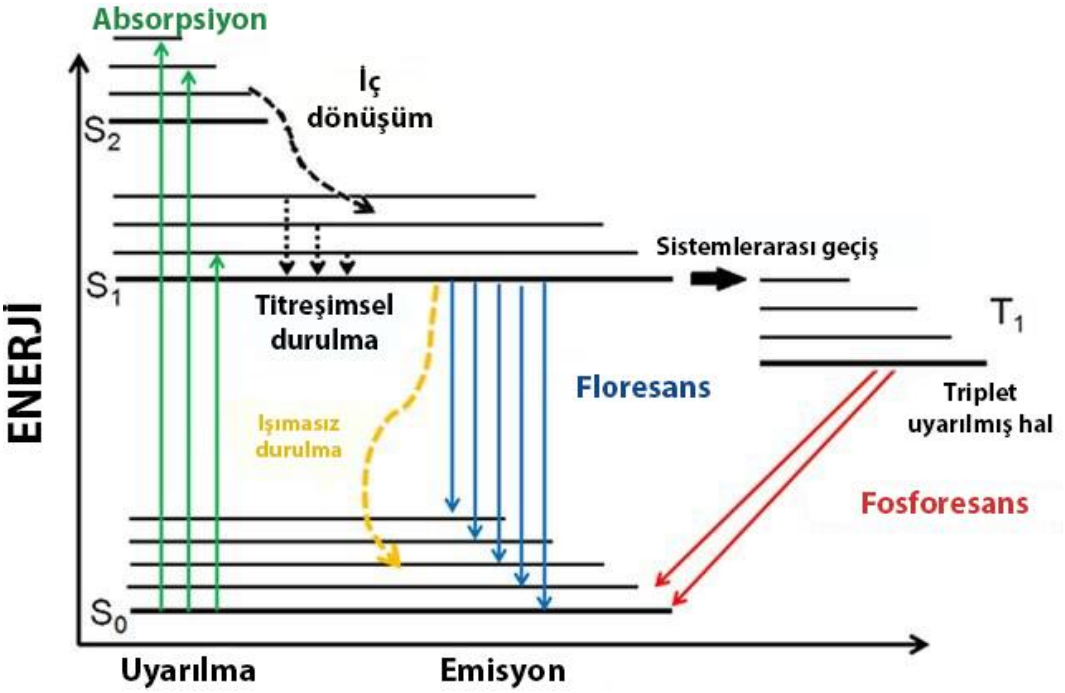
3.3.3 Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^{1}H-NMR) Spektroskopisi

NMR kimya, biyokimya gibi çeşitli alanlarda kimyasal kayma ve spin-spin bağlantılarını kullanarak maddelerin moleküler düzeyde yapısını incelemek amacıyla kullanılan bir analitik tekniktir [193]. Moleküler yapının yanı sıra faz değişiklikleri, konformasyonel ve konfigürasyonel değişiklikler, molekül ağırlığı, çözünürlük ve difüzyon potansiyel belirlenebilir [194]. NMR spektroskopisi elektronlar değil atom çekirdeği ile ilgilidir. Atomik çekirdeğin manyetik momentinin kuvvetli bir manyetik alanla etkileşiminden doğan rezonansın radyo dalgaları vasıtasıyla izlenmesi prensibine dayanır [195]. Bir elementin NMR spektroskopisiyle incelenebilmesi için manyetik momenti 0'dan farklı, spin kuantum sayısı ise 0'dan büyük olmalıdır. Yaygın olarak ^{13}C-NMR ve ^{1}H-NMR spektrumları incelenmektedir [196]. ^{1}H-NMR bir maddenin moleküler yapısını belirlemek amacıyla, maddenin molekülleri içindeki hidrojen-1 çekirdeklerine göre NMR spektroskopisinde nükleer manyetik rezonansın uygulanmasıdır [197].

3.3.4 Floresans Spektroskopisi

Floresans spektroskopisi, doğal ve sentetik makromoleküllerin konformasyonunu ve dinamiklerini incelemek için sıklıkla kullanılan emisyon temelli bir analiz yöntemidir [198]. Moleküllerde temel halde (S_0) bulunan elektronlar bir

elektromanyetik radyasyon ile uyarılmasıyla daha yüksek enerji düzeylerine (S_1) çıkar. Molekül bu uyarılmış durumda kararsızdır. Temel enerji düzeyine dönebilmek için absorbladığı enerjinin fazlasını Şekil 3.1'de görüldüğü üzere floresans dahil farklı mekanizmalarla atabilir [199]. Floresans spektroskopisi numune bir ışık ışınıyla (genellikle ultraviyole-görünür bölge spektrumları) uyarılmasının ardından numunenin yaydığı floresansın ölçüldüğü bir tür spektroskopik yöntemdir.

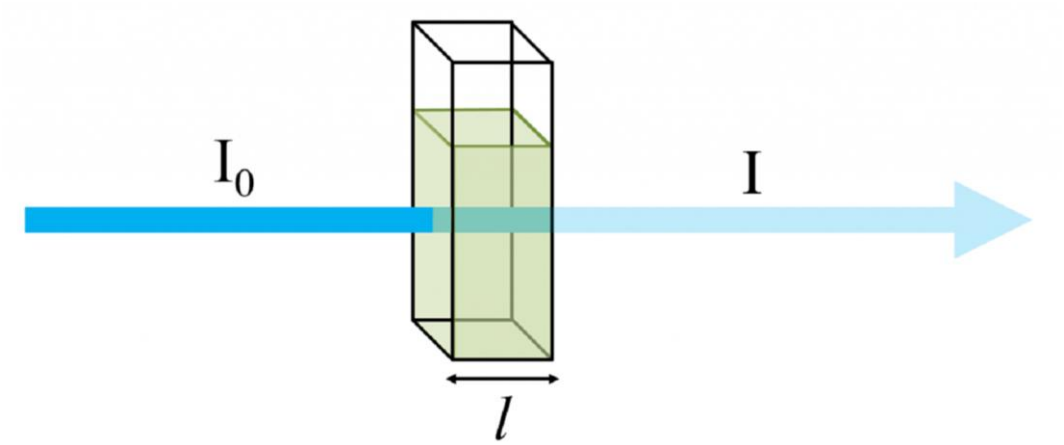


Şekil 3.1 Jablonski diyagramı [200].

3.3.5 Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi

Elektromanyetik spektrumun 10-400 nm dalga boyu aralığı UV bölgesidir. Bu bölgenin 10-200 nm aralığı uzak UV (veya vakum UV), 200-400 nm aralığı yakın UV bölgesi olarak adlandırılır. Spektrumun 400-800 nm dalga boyu aralığı ise görünür bölgeyi oluşturur. UV-Vis spektrofotometre cihazları genellikle 200-800 nm dalga boyu aralığında ölçüm yapar. UV-Vis spektroskopisi, bu aralıktaki UV ve Vis ışığın moleküller tarafından absorbsiyonunu ölçen, hızlı ve yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir [201]. UV-Vis enerjisine eşdeğer elektronik geçiş enerjisi farklılıklarına sahip kovalent olarak doymamış bileşikler (π veya bağa katılmayan n elektronları bulunmalı) kromoforlar olarak bilinir ve UV-vis ışının absorbsiyonundan sorumludurlar. UV-Vis elektromanyetik radyasyonu absorbe

etmeyen ancak kromofor gruplarının emilimini etkileyen kovalent olarak doymuş gruplara oksokromlar denir [201, 202]. UV-Vis spektroskopisi, Beer-Lambert yasasına göre bir çözeltideki element konsantrasyonlarını niceliksel olarak belirlemek için kullanılır (Şekil 3.2) (Eşitlik 3.1).



Şekil 3.2 Işığın sıvı ortamda soğurulması yoluyla Beer-Lambert Yasasının şematik gösterimi [203].

$$A = \varepsilon lc = -\log\frac{I}{I_0} = -\log T \tag{3.1}$$

Burada A absorbansı, ε numunenin molar absorbsiyon katsayısını, l ışının numune boyunca katettiği yolu, c numunenin konsantrasyonunu, I_0 gelen ışık şiddetini, I numuneden çıkan ışının şiddetini temsil eder. Ayrıca I/I_0 oranı geçirgenliği verir ve T ile gösterilir.

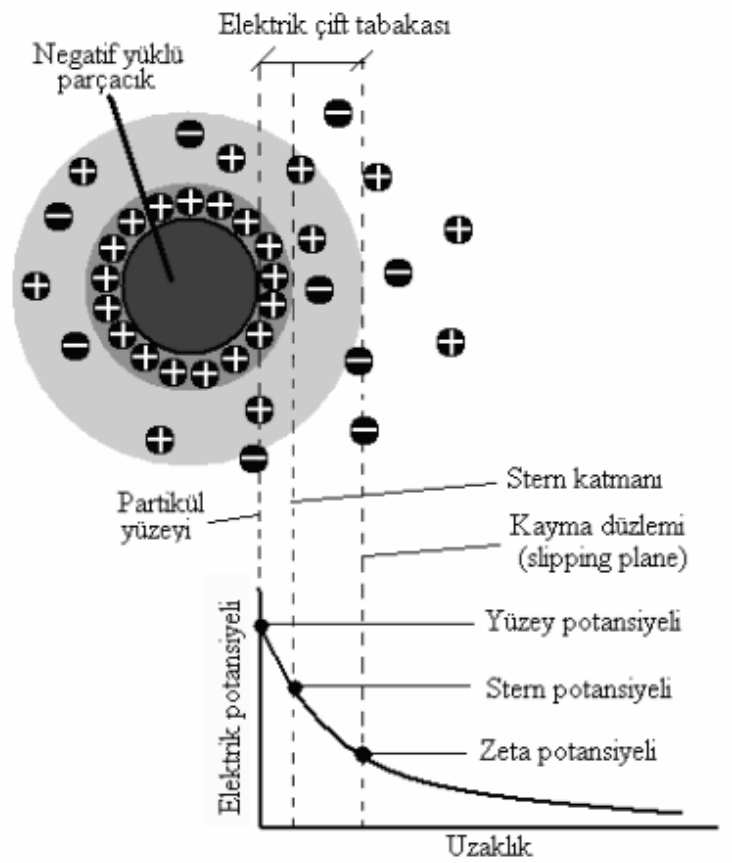
3.3.6 Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılımı

Dinamik ışık saçılımı (DLS) kolloidal süspansiyon içerisindeki hidrodinamik boyut ve polidispersitesinin ölçülmesinde kullanılır. DLS yönteminde kolloidal bir çözeltiden geçen lazerden saçılan ışının yoğunluk farkından faydalanılır. Kolloidal bir sistemdeki partiküllerin hareketi hidrodinamik çaplarıyla ilişkilidir ve partikül boyutu ne kadar küçük olursa o kadar hızlı yayılır [204]. Partiküllerin Brownian hareketi nedeniyle, saçılan ışığın dalga yoğunluğunda zaman içinde dalgalanmalar olur. DLS yönteminde bu dalgalanmalar analiz edilip Stokes-Einstein denkleminden faydalanılarak partiküllerin difüzyon katsayısı ve hidrodinamik çapı hesaplanır (Eşitlik 3.2) [205].

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \tag{3.2}$$

Burada D_H hidrodinamik çapı, D translasyonel (öteleme) difüzyon katsayısını, k Boltzman sabitini, T mutlak sıcaklığı ve η çözücü viskozitesini temsil eder.

Elektroforetik ışık saçılımı (ELS) kolloidal bir sistem içerisindeki parçacıkların zeta potansiyellerinin belirlenmesine kullanılan bir tekniktir. Kolloidal sistemde yüklü bir parçacığın yüzeyi, zıt yüklü ince bir tabakayı çeker ve ona sıkı bir şekilde bağlanarak Stern tabakasını oluşturur. Partikül yüzeyinden biraz daha uzakta, partiküller birlikte hareket eden ancak yüzeye nispeten daha zayıf bağlı, dağınık, zıt yükleri içeren bir elektriksel çift tabaka bulunur [206]. Kolloidal bir parçacık dispersiyon ortamında hareket ettiğinde, onu çevreleyen bu elektriksel çift tabakanın sınırına kayma düzlemi (kayma düzlemi), kayma düzlemindeki elektrik potansiyelinin değerine ise zeta potansiyeli adı verilir [207]. Zeta potansiyel, kolloidal parçacıkların etkileşimi teorisinde çok önemli bir parametredir. Negatif yüklü bir parçacığın kolloidal ortamdaki elektriksel potansiyelinin şematik gösterimi Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3 Negatif yüklü bir parçacığın kolloidal ortamda elektriksel potansiyeli.

Numuneye bir elektrik alan uygulandığında yüklü parçacıkların hareketinde değişim meydana gelir. Parçacıkların hızı, prensipte lazer Doppler hız ölçümü tekniği olan, hareketli parçacıklardan saçılan ışığın bir referans ışıkla girişimiyle ölçülür [208]. Elektroforetik hareketlilik, ölçülen hız ve elektrik alanının genliği ile hesaplanabilir. Son olarak zeta potansiyeli, Henry fonksiyonu gibi bazı uygun teorik modellere göre hareketlilikten belirlenir (Eşitlik 3.3) [209].

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(k_a)}{3\eta} \tag{3.3}$$

Burada U_E elektroforetik hareketliliği, ε ortamın dielektrik sabitini, ζ zeta potansiyeli, $f(k_a)$ Henry fonksiyonunu ve η ortamın viskozitesini temsil eder.

3.3.7 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

SEM mikro ve nanopartiküllerin morfolojilerinin incelenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [204]. Malzeme yüzeyi, elektron kaynağından çıkan yüzeye odaklanmış yüksek enerjili elektronlarla taranır. Elektronlar yüzeye

vakumlanmış bir kolondan düz bir eksen boyunca kayba uğramadan iletilir [210]. Elektronların malzeme yüzeyiyle etkileşimi sonucu yayılan ikincil elektronlar (SE), geri saçılan elektronlar (BSE) ve X-ışınları kullanılan SEM moduna göre farklı detektörler yardımıyla toplanır [211]. SE'ler topografik kontrast, BSE'ler ise hem topografik hem de kompozisyonel bilgi sağlamak amacıyla kullanılır. Ayrıca X-ışınları maddenin kimyasal yapısı ile ilgili bilgi verir [212]. Detektörlerden elde edilen sinyaller ilgili SEM moduna göre dijital sinyallere dönüştürülerek monitörize edilir. İletken malzemeler herhangi bir ön işleme tabi tutulmaksızın SEM ile incelenebilir. Ancak biyolojik numuneler, nispeten düşük atom numaralı elementlerden oluştukları için, düşük SE ve BSE verimine sahip olmaları nedeniyle metal kaplamalar ve karmaşık numune hazırlama işlemleri gerektirir [212]. Bununla birlikte ESEM modu kaplama gerektirmeksizin, biyolojik numunelerin bağıl nemi ve sıcaklığı kontrol altında tutularak inceleme olanağı tanır [213].

3.3.8 Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

TEM çeşitli biyolojik örneklerin görüntülenmesine, yapısal olarak incelenmesine imkan sağlayan bir yöntemdir [214]. Özellikle nanopartiküllerin morfoloji tayini için oldukça elverişlidir [215]. Elektron kaynağında oluşturulan elektronlar, mikroskop kolonunun yüksek vakumunda çok yüksek bir enerji ile hızlandırılırlar ve elektronik mercekler yardımıyla numune üzerine odaklanıp numunenin içinden geçirilirler [214, 216]. Numuneyi terk eden iletilen ve/veya kırılan elektronlar diğer merceklerden geçerek numunenin bir görüntüsünü oluşturur. Bu, numune morfolojisinin ve yapısının nanometrik ölçeğe kadar araştırılmasına olanak tanır. Ayrıca numunenin elektron ışını ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan ikincil sinyaller de numunenin bileşimi hakkında bilgi edinmek için kullanılabilir [216].

3.4 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1 Kitosan Çözeltileri

%1'lik (w/v) kitosan (CS) çözeltisi %1'lik asetik asit (AcAc) (v/v) içerisinde hazırlanmıştır. %1'lik AcAc çözeltisi hazırlamak için, balon joje içerisindeki 70 mL ultra saf su (UPW) üzerine 1 mL glasiyal AcAc eklenip son hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında birkaç dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. %1'lik CS çözeltisi hazırlamak için ise, hazırlanan %1'lik AcAc

çözeltisinden 50 mL alınıp üzerine 70 °C'de yüksek hızlı manyetik karıştırma altında 0,5 g CS yavaş yavaş eklenmiştir. Çözelti yarım saat boyunca aynı koşullarda karıştırıldıktan sonra 1 gece boyunca oda sıcaklığında yine yüksek hızlı manyetik karıştırma altında karışmaya bırakılmıştır.

%0,5 ve %0,25 CS çözeltileri, hazırlanan %1'lik CS çözeltisi ve %1'lik AcAc çözeltisi sırasıyla birbirlerine göre 1:1 ve 1:3 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tüm çözeltiler 0,45 μm por boyutlu şırınga ucu selüloz asetat (CA) filtre ile süzüldükten sonra kullanılmıştır.

3.4.2 0,01 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)

0,78005 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (M_w=156,01 g/mol), 1,34035 g $Na_2HPO_4.7H_2O$ (M_w=268,07 g/mol), 0,2922 g NaCl tartılıp 500 mL'lik balon jojede 450 mL UPW içinde çözülmüştür. Karışıma son olarak 250 mg NaN_3 eklenmiş (mikrobiyal üremeyi engelleme amacıyla) ve son hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım homojen hale gelene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya devam edilmiştir. Çözeltinin pH'ı ölçülüp 0,1 M NaOH çözeltisi ile 7,4'e ayarlanmıştır. Kullanım öncesinde çözelti 0,45 μm por boyutlu şırınga ucu CA filtreden geçirilmiştir.

3.4.3 DPPH Çözeltisi

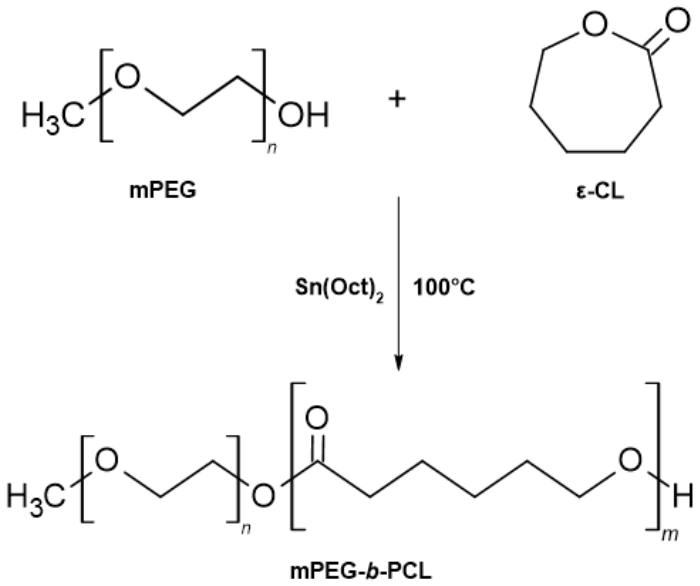
0,1 mM DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil) çözelti hazırlamak üzere 0,5 mg DPPH tartılıp alüminyum folyo ile sarılı 15 mL'lik falkona alınmış ve üzerine 12,68 mL etanol eklenmiştir. Karışım homojen bir hal alana kadar vorteks cihazı ile karıştırılmıştır. Çözelti günlük olarak hazırlanmış ve ışıkla temasından kaçınılmıştır.

3.5 Deneysel Yöntem

3.5.1 mPEG-*b*-PCL Diblok Kopolimerinin Sentezi

mPEG-b-PCL diblok kopolimeri, mPEG'in başlatıcı olduğu ε-CL'un kalay oktoat ($Sn(Oct_2)$) katalizörlüğünde halka açılması polimerizasyonu ile mikrodalga destekli olarak sentezlenmiştir (Şekil 3.4) [217]. Sentez için ilk olarak 2 g mPEG tartılıp cam balon içerisine aktarılmış ve üzerine 4 mL ε-CL (d: 1,03 g/mL, %97)

eklenmiştir. Karışım homojen bir hal alana kadar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, sonrasında üzerine 177 µL $Sn(Oct)_2$ eklenmiş ve bir süre daha karıştırılmıştır. Reaksiyon için gereken inert koşulların sağlanabilmesi amacıyla karıştırma işlemleri azot ortamında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen karışım mikrodalga sentez ünitesine yerleştirilmiş ve maksimum 300 W güçte, 100 °C'de 30 dk boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra 10 dk'lık bir soğutma işlemi uygulanmış ve kopolimer katı halde elde edilmiştir. Elde edilen katı haldeki kopolimerin üzerine 4 mL kloroform eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Çözünen kopolimer 50 mL'lik falkona aktarılmış, çöktürme amacıyla üzerine çeker ocak altında 40-45 mL soğuk dietil eter eklenmiş ve vorteks cihazıyla birkaç saniye karıştırılmıştır. Ardından kopolimerin tamamen çökmesi için 6000 rpm ve 4 °C'de, 10 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst faz uzaklaştırılmış, pellet üzerine ise yeniden 40-45 mL soğuk dietil eter eklenerek vortekslenmiş ve aynı koşullarda santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmış bu sayede reaksiyona girmeyen monomer ve katalizör uzaklaştırılarak mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri saf halde elde edilmiştir. Son olarak santrifüj işlemi sonucunda pellet halde elde edilen kopolimer petri kabına yayılmış, üzeri delikler açılmış alüminyum folyo ile kapatılıp 3 gün boyunca çeker ocak altında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.4 Halka açılması polimerizasyonu ile mPEG-*b*-PCL diblok kopolimer sentezinin şematik gösterimi.

3.5.2 Sentezlenen Diblok Kopolimerinin Karakterizasyonu

3.5.2.1 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Reaksiyon verimi (RV) gravimetrik yöntemle hesaplanmıştır. Kısaca kurutulan kopolimerin kütlesi hassas terazi ile ölçülmüş ve Eşitlik 3.4'e göre başlangıçta reaksiyona giren katı madde kütlesiyle oranlanarak yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

$$RV\ (\%) = \frac{Sentezlenen\ kopolimer\ miktarı\ (g)}{Eklenen\ mPEG\ + \varepsilon - CL\ miktarı\ (g)} x100 \qquad (3.4)$$

3.5.2.2 FT-IR Spektroskopisi Analizi

Eklenen mPEG, ε-CL ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL kopolimerinin kimyasal yapıları, ATR aparatlı IR Prestige 2100 FTIR Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte 16 tekrarlı olarak alınan spektrumlar karşılaştırılarak incelenmiştir. Katı haldeki PEG ve mPEG-*b*-PCL ATR aparatının kristali üzerine kristali kapatacak kadar konulup aparatın kolu ile sıkıştırılarak, sıvı haldeki ε-CL ise kristal üzerine damlatılarak analiz edilmiştir.

3.5.2.3 ^{1}H-NMR Spektroskopisi Analizi

Elde edilen kopolimerin kimyasal yapısı ^{1}H-NMR spektroskopisi ile incelenmiştir. İnceleme çözücü olarak dötero kloroform ($CDCl_3$) kullanılarak 400 MHz'de gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.4 GPC Analizi

Kopolimerin ortalama molekül ağırlığı ve dağılımı GPC ile analiz edilmiştir. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmış olup çözücü olarak tetrahidrofuran (THF) kullanılmıştır. Kopolimer, 1500 – 35500 Da aralığındaki monodispers polistiren standartlara göre nispi elüsyon süresinden faydalanılarak ölçümden önce elde edilen kalibrasyon eğrisine göre karakterize edilmiştir.

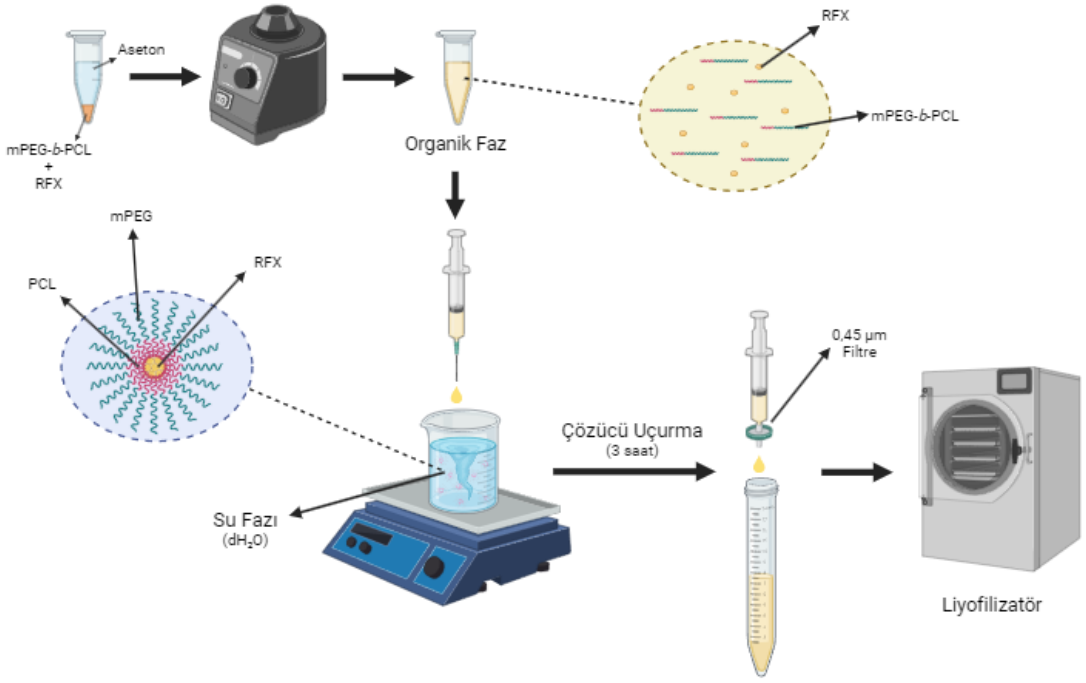
3.5.2.5 Kritik Misel Konsantrasyonunun Hesaplanması

Kritik misel konsantrasyonu (CMC) bir molekülün misel oluşturabileceği minimum konsantrasyondur. mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerin CMC değeri, prob olarak hidrofobik yapılı ve floresans özellikteki pirenin kullanılmasıyla belirlenmiştir [218]. Öncelikle, sulu ortam içerisinde polimer konsantrasyonu $1x10^{-5}$ mg/mL ile 1 mg/mL arasında değişen ve piren konsantrasyonu $6x10^{-7}$ M olarak sabit tutulan çözeltileri hazırlamıştır. Çözücü olarak aseton kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler daha sonra sulu faz üzerine şırınga yardımıyla damla damla eklemiştir. Reaksiyonun gerçekleştiği penisilin şişeleri piren molekülünün etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılıp bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda bırakılmıştır. Bekleme süresinin ardında örnekler uyarma dalga boyu 300-360 nm ve emisyon dalga boyu 390 nm olacak şekilde floresans spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Pirenin 338 ve 335 nm'de floresans şiddetlerinin oranı (I_{338}/I_{335}) belirlenmiş ve bu oranlar polimer konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek CMC değeri hesaplanmıştır.

3.5.3 Rifaksimin Yüklü Misellerin Üretilmesi

Miseller nanoçöktürme yöntemiyle üretilmiştir [219]. Yöntemin şematik gösterimi Şekil 3.5'te verilmiştir. İlk olarak üretim parametrelerinin optimizasyonu sağlanmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda optimum koşullarda üretim için organik fazın su fazına oranı 1:10 (v/v), kopolimerin su fazı içerisindeki konsantrasyonu ise 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. Üretimde kullanılacak etkin

madde miktarının belirlenmesi için ise farklı miktarlarda RFX içeren formülasyonlar hazırlanıp (Tablo 3.3) ortalama boyut, PDI, EE ve YK değerleri incelenmiştir. İstenen ortalama boyut ve PDI değerlerine sahip ve yüksek verimde üretilen formülasyon (OPT-M) ileri analizler için kullanılmıştır. Üretimde çözücü olarak aseton kullanılmıştır. Aseton hem mPEG-*b*-PCL hem de RFX'i çözebildiği, su ile karışabildiği ve sentez ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabildiği için tercih edilmiştir.



Şekil 3.5 Nanoçöktürme yöntemiyle RFX yüklü mPEG-*b*-PCL misellerin üretimi. (BioRender.com kullanılarak çizilmiştir.)

Tablo 3.3 Misel üretimi optimizasyonunda kullanılan kopolimer ve etkin madde miktarları.

Formülasyon	mPEG-*b*-PCL (mg)	RFX (mg)
M1	5	0
M2	5	0,25
M3	5	0,5
M4	5	0,75
M5	5	1

Tablo 3.3 Misel üretimi optimizasyonunda kullanılan kopolimer ve etkin madde miktarları (devamı)

M6	5	1,5
M7	5	2

Tablo 3.3'te belirtilen miktarlarda mPEG-*b*-PCL ve RFX tartılıp ependorf tüpe alınmış ve üzerine 500 µL aseton eklenip homojen şekilde karışana kadar vorteks cihazı ile karıştırılarak organik faz elde edilmiştir. Bu organik faz şırınga yardımıyla oda sıcaklığında 700 rpm sabit karıştırma altında penisilin şişelerinde bulunan 5 mL ultra saf su üzerine (UPW) (su fazı) damla damla aktarılmıştır. Bu aşamada aseton ve suyun karışmasıyla kopolimer ve etkin madde su fazına geçmiştir. Kopolimerin hidrofobik blokları sulu ortamda bir araya gelerek miselin hidrofobik çekirdeğini oluşturmuş, bu sırada hidrofobik etkin madde bu çekirdek içerisine enkapsüle olmuştur. Kısaca kopolimer ve etkin maddenin organik fazdan su fazına geçip çökmesiyle boş (M1 formülasyonu) ve RFX yüklü mPEG-*b*-PCL miseller kendiliğinden meydana gelmiştir. Elde edilen süspansiyon üzerine delikli alüminyum folyo kapatılarak 3 saat boyunca, oda sıcaklığında 700 rpm sabit karıştırma altında bekletilmiş bu sayede aseton ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bekleme süresinin ardından süspansiyon 0,45 µm'lik selüloz asetat (CA) şırınga ucu filtreden geçirilerek 15'lik falkona aktarılmış, ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) cihazıyla ölçülmüş ve dondurulup liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işleminin ardından örnekler +4 °C'de saklanmıştır.

3.5.3.1 Kitosan Kaplı Misellerin Üretilmesi

Öncelikle optimum kitosan çözeltisi konsantrasyonu ve karıştırma süresi belirlenmiştir. Bunun için oda sıcaklığında, 700 rpm sabit karıştırma altındaki optimum koşullarda üretilen RFX yüklü mPEG-*b*-PCL misellerin (OPT-M) süspansiyonu üzerine 1:1 (v/v) oranda farklı konsantrasyonlarda kitosan çözeltileri (%0,25, %0,5 ve %1 (w/v)) şırınga yardımıyla damla damla aktarılmıştır. Süspansiyondan belirli sürelerde (15, 30, 45 ve 60. dakikalarda) örnek alınıp ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) cihazı kullanılarak incelenmiştir.

Optimum değerlerin belirlenmesinin ardından üretim optimizasyonun yapıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir [220]. Kısaca; penisilin şişesinde, oda sıcaklığında, 700 rpm sabit karıştırma altındaki OPT-M misel süspansiyonu üzerine 1:1 (v/v) oranda belirlenen konsantrasyonda kitosan çözeltisi şırınga yardımıyla damla damla aktarılmıştır. Penisilin şişesinin üzeri delikler açılmış alüminyum folyo ile kaplanarak belirlenen süre boyunca aynı koşullarda karışmaya bırakılmıştır. Bu sürenin tamamlanmasının ardından optimum koşullarda üretilen kitosan kaplı misellerin (OPT-C-M) ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) cihazı ile tespit edilmiştir. Örnek dondurulup liyofilize edilmiş ve kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.5.4 Rifaksimin Yüklü Misellerin Karakterizasyonu

3.5.4.1 Rifaksiminin Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

1 mg RFX 1 mL asetonda çözülerek 1 mg/mL stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alınıp asetonla 1 mL'ye tamamlanarak 0,1 - 0,01 mg/mL konsantrasyonları arasında çözeltiler elde edilmiştir. Bu çözeltiler (0,1 mg/mL konsantrasyondaki çözelti hariç) 1:10 oranında seyreltilip 0,009 – 0,001 mg/mL'lik çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanan 0,1 – 0,001 mg/mL konsantrasyonları arasındaki tüm RFX çözeltileri 200-800 nm dalga boyu arasında UV-Vis spektrofotometre cihazı ile incelenmiştir. 458 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedilmiş ve konsantrasyona karşı grafiği çizilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

3.5.4.2 Ortalama Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI), Zeta Potansiyel Ölçümü

Misellerin ve kitosan kaplı misellerin ortalama boyut ve PDI değerleri 4 mW güçte 633 nm dalga boylu He-Ne lazer bulunan Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) cihazı kullanılarak dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle tespit edilmiştir. Ölçümler çözeltiler için 0,8872 cP viskozite ve 1,330 kırılma indisi parametrelerinde, 25 ± 0,1 °C'de, 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Misellerin ve kitosan kaplı misellerin zeta potansiyel (ζ) değerleri ise elektroforetik ışık saçılımı (ELS) tekniği ile yine aynı cihaz kullanılarak tespit edilmiştir. Ölçümler 0,8872 cP viskozite, 79 dielektrik sabiti, 1,50 f (ka) (Smoluchowski) parametrelerinde, 25 ± 0,1 °C'de ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.4.3 Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması

Misellerin ve kitosan kaplı misellerin reaksiyon verimi (RV) gravimetrik yöntemle miseller için Eşitlik 3.5'e, kitosan kaplı miseller için Eşitlik 3.6'ya göre hesaplanmıştır.

$$RV\ (\%) = \frac{\text{Üretilen misel miktarı } (mg)}{\text{Eklenen kopolimer ve RFX miktarı } (mg)} x100 \quad (3.5)$$

$$RV\ (\%) = \frac{\text{Üretilen kitosan kaplı misel miktarı } (mg)}{\text{Eklenen kitosan, kopolimer ve RFX miktarı } (mg)} x100 \quad (3.6)$$

3.5.4.4 Enkapsülasyon Etkinliği (EE) ve Yükleme Kapasitesi (YK) Değerlerinin Hesaplanması

Misellere yüklenen RFX miktarı direkt yöntemle belirlenmiştir. Yüklü miseller 0,1 mg/mL konsantrasyonda asetonda çözülmüş, boş misellerin 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi baseline alınarak UV-Vis spektrofotometre ile 458 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri ve daha önce hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi denkleminden faydalanılarak misellere yüklenen RFX miktarı hesaplanmıştır. Misellerin enkapsülasyon etkinliği (EE) ve yükleme kapasitesi (YK) değerleri sırasıyla Eşitlik 3.7 ve Eşitlik 3.8'e göre yüzde cinsinden hesaplanmıştır.

$$EE\ (\%) = \frac{\text{Misellere yüklenen RFX miktarı } (mg)}{\text{Eklenen RFX miktarı } (mg)} x100 \quad (3.7)$$

$$YK\ (\%) = \frac{\text{Misellere yüklenen RFX miktarı } (mg)}{\text{Üretilen misel miktarı } (mg)} x100 \quad (3.8)$$

Kitosan kaplı misellere yüklenen ilaç miktarı miseller üzerinden hesaplanmıştır. Üretimde misel süspansiyonunun son hacmi 10 mL olacak şekilde hazırlanmış, 5 mL kaplama için kullanılmış, kalan 5 mL ise liyofilize edilip direkt yöntemle yüklenen ilaç miktarı hesaplanmıştır.

3.5.4.5 Morfolojik Yapı Tayini

Üretilen misellerin yüzey morfolojisi, şekli ve boyutunun homojenliği taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Thermoscientific, Quattro S SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (JEOL JEM-1220) kullanılarak analiz edilmiştir. Boş

miseller ve OPT-M karşılaştırmalı olarak SEM ile OPT-M ve OPT-CM karşılaştırmalı olarak TEM ile incelenmiştir.

SEM analizi literatürde daha önce tarif edildiği gibi miseller kurutulduktan sonra, çift taraflı siyah karbon bant üzerine yerleştirilip, kenarlarına iletkenliği artırması için bakır şeritler yerleştirilerek +4°C'de, 10000 kV güçte, ESEM modunda gerçekleştirilmiştir.

TEM analizi için ise ilk olarak örnekler distile su ile disperse edilip bakır grid üzerine damlatılıp kurutulmuştur. İnceleme 100 kV güçte ve yüksek çözünürlük modunda gerçekleştirilmiştir.

3.5.4.6 *In-Vitro* Salım Çalışması

In-vitro salım çalışması daha önce literatürde belirtilen dissolüsyon yönteminde [221] küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. OPT-M ve OPT-C-M örneklerinden 1'er mg tartılıp üzerine 3 mL PBS (0,01 M, pH 7,4) eklenmiştir. Aynı işlem boş miseller ve boş kitosan kaplı miseller için de gerçekleştirilmiştir. Süspansiyonlar 37 °C'de 150 rpm karıştırma altında çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Örnekler belirli zaman aralıklarıyla (1, 2, 3, 4 ve 6. saatler ve 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 ve 28. günler) 9000 rpm, + 4 °C'de 20 dk boyunca santrifüj edilmiş ve üst fazlar Uv-Vis spektrofotometre ile analiz edilmek üzere ayrı ayrı toplanmıştır. Katı pellet üzerine aynı miktarda taze salım ortamı eklenerek aynı koşullarda inkübasyona devam edilmiştir. Analiz edilmek üzere toplanan RFX yüklü misellere ve kitosan kaplı RFX yüklü misellere ait üst fazlar, sırasıyla boş miseller ve boş kitosan kaplı misellerden alınan üst fazlar baseline alınarak Uv-Vis spektrofotometre ile 458 nm'de incelenmiştir. RFX salım miktarı daha önce hazırlanan kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak hesaplanmıştır.

3.5.4.7 Kolloidal Stabilite Çalışması

OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin süspansiyonundan 1,5 mL alınıp +4 °C'de inkübe edilmiştir. Belirlenen sürelerde (1, 7, 14, 20 ve 30. günlerde) örneklerin ortalama boyut ve PDI değerleri Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern) cihazı ile tespit edilmiştir.

3.5.5 Misellerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

3.5.5.1 Antioksidan Aktivite Tayini

Misellerin antioksidan aktivitesi DPPH metodu ile Algharib ve ark. tarafından uygulanan metotta bazı modifikasyonlar yapılarak incelenmiştir [222]. UPW içerisinde farklı konsantrasyonlarda (1, 20, 40, 60, 80 µg/mL) serbest RFX çözeltileri ve bu konsantrasyonlarda RFX içerecek şekilde OPT-M ve OPT-C-M çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka kuyucuklarına hazırlanan çözeltilerden 50'şer µL alınıp üzerine taze hazırlanmış 0,1 mM konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 100'er µL eklenmiştir. Kontrol numunesi 50 µL UPW üzerine 100 µL DPPH çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Plaka alüminyum folyo ile kaplanmış ve örnekler karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilip belirlenen sürelerde (30, 60 ve 90. dk) mikroplaka okuyucu ile 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki serbest RFX, OPT-M ve OPT-C-M çözeltilerinden 50'şer µL alınıp üzerine DPPH çözeltisi yerine aynı miktarda (100 µL) etanol eklenip absorbans değerleri yine mikroplaka okuyucu ile 517 nm dalga boyunda incelenmiştir. DPPH içeren örneklerin absorbansından DPPH içermeyen örneklerin absorbansı çıkarılarak miseller ve kitosan kaplı misellerin absorbansı elimine edilmiştir. Elde edilen değer örneğin absorbansı kabul edilmiştir. Örneklerin antioksidan aktivitesi (AA) yüzde cinsinden Eşitlik 3.9 ile hesaplanmıştır.

$$AA\ (\%) = \frac{A_{kontrol} - A_{\text{örnek}}}{A_{kontrol}} x100 \qquad (3.9)$$

3.5.5.2 Antibakteriyel Aktivite Tayini

Serbest RFX, boş miseller, OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin antibakteriyel aktivitesi broth mikrodilüsyon yöntemi ile *S. aureus* üzerinde incelenmiştir. Kullanılan RFX, OPT-M ve OPT-C-M stok çözeltileri eşit konsantrasyonda RFX içerecek şekilde, boş misel stok çözeltisi ise yüklü misellerin (OPT-M) stok çözeltisindeki polimer konsantrasyonuyla aynı konsantrasyonda polimer içerecek şekilde hazırlanmıştır. Çözücü olarak besiyeri kullanılmıştır. Örnekler seri dilüsyonlar halinde, 2 - 0,01 µg/mL RFX içerecek şekilde 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına aktarılmıştır. Son olarak, her bir bakteriyel süspansiyondan 10^6

KOB/mL, ardışık kuyucuklara inoküle edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra bakteri büyümesi, bulanıklık yöntemi ile görsel olarak ve 600 nm'de absorbans ölçümü ile spektrofotometrik olarak değerlendirilmiş ve bakteri büyümesini inhibe eden en düşük konsantrasyonu ifade eden minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri hesaplanmıştır. Ardından bulanıklık olmayan kuyucuklardaki örnekler katı besiyerine aktarılıp bir gece inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapılarak minimum bakterisid konsantrasyon (MBK) değeri başlangıçtaki bakteri popülasyonunu %99,99 oranında azaltabilen en düşük antibakteriyel konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

3.5.5.3 Biyouyumluluk Analizi

Biyouyumluluk testlerinde L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin kültürü %10 FBS, %1 penisilin streptomisin içeren DMEM/F12 besiyeri ortamında gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon koşulları için %5 CO_2, %95 nem ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatör kullanılmıştır. Hücreler flask yüzeyinde %70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin-EDTA ile toplanarak santrifüj edilip, elde edilen pellet 1 mL besiyeri ile süspanse edilerek thoma lamında tripan mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gerekli sayıdaki hücre besiyeri ile seyreltilerek 96 kuyulu plakalara her kuyuda 10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Plakalar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda kontrol grubu taze besiyeri ile değiştirilirken deney grupları hazırlanan konsantrasyonlarda kuyulara üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. Plakalar 24 ve 72 saat inkübe edildikten sonra MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi ile deney gruplarının hücreler üzerindeki sitotoksisiteleri analiz edilmiştir [223].

MTT tuzunun yapısında bulunan tetrazolyum bileşeni canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından formazana dönüştürülmektedir. Bu test ile kuyularda oluşan formazan yoğunluğuna bağlı olarak hücre canlılığı analiz edilmiştir. MTT uygulaması için her bir kuyuya 1X PBS ile hazırlanmış 10 mg/mL MTT solüsyonu eklenmiş ve plakalar karanlık ortamda 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda oluşan formazan kristallerini çözmek için her bir kuyuya 100 µL DMSO eklenip plakalar 30 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Ardından oluşan formazan yoğunlukları 570 nm'ye ayarlanmış

mikroplaka okuyucuda ölçülmüştür. Elde edilen verilerden Eşitlik 3.10 kullanılarak hücre canlılığı (%) ve standart sapma hesaplanmıştır (n=3).

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{OD_{deney\ grubu}}{OD_{kontrol}} x100 \qquad (3.10)$$

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu

4.1.1 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

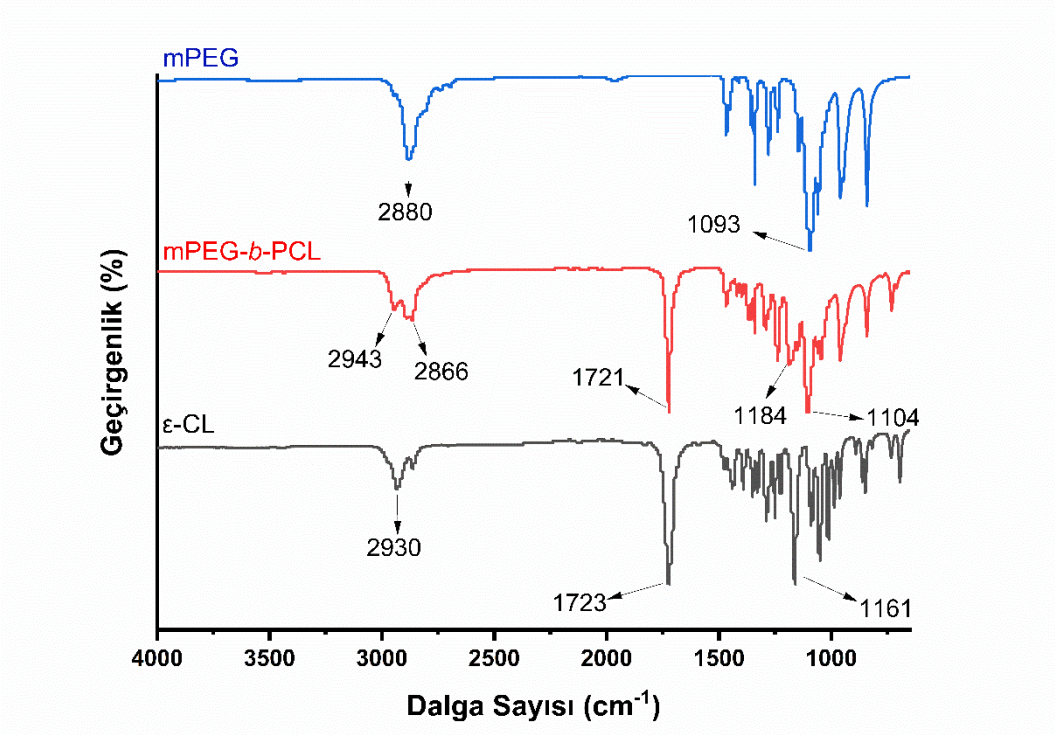
Polimerin reaksiyon verimi gravimetrik yöntemle, yüzde cinsinden hesaplanmıştır. Başlangıçta eklenen mPEG miktarı 2 g, ε-CL miktarı (4 mL, d: 1,03 g/mL, %97) 3,9964 g'dır. Sonuçlar Tablo 4.1 'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Polimer sentezi reaksiyon verimi.

Reaksiyona giren toplam mPEG ve ε-CL miktarı (g)	**Elde edilen mPEG-*b*-PCL miktarı (g)**	**RV (%)**
5,9964	5,2637	87,78

4.1.2 FT-IR Analizi Sonuçları

mPEG, ε-CL ve sentezlenen mPEG-b-PCL kopolimerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Spektrumlardaki bantlar ve bu bantların ilişkili olduğu bağlar Tablo 4.2'de görülmektedir. ε-CL'a ait spektrumda 1723 cm^{-1}'de bulunan karboksilik ester (C=O) gerilmesi bandı mPEG-*b*-PCL'nin spektrumunda 1721 cm^{-1}'de görülmektedir. Ayrıca mPEG'e ait 1093 cm^{-1}'de görülen eter (C-O) bandı mPEG-*b*-PCL'ye ait spektrumda 1104 cm^{-1}'de görülmektedir. Görülen bu iki şiddetli bant mPEG bloklarına PCL'nin başarılı bir şekilde eklenerek sentezin gerçekleştiğinin göstergesidir.



Şekil 4.1 mPEG polimeri, ε-CL ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL kopolimerinin karşılaştırmalı FTIR spektrumları.

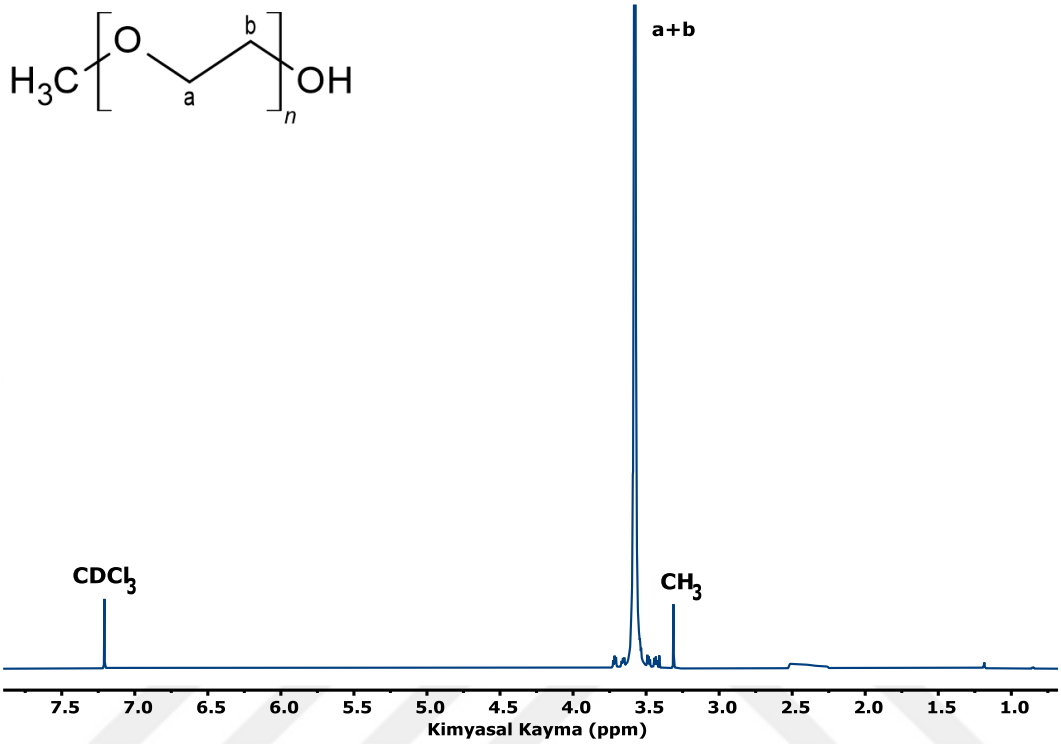
Tablo 4.2 mPEG, ε-CL ve mPEG-*b*-PCL FT-IR spektrumlarındaki bantlar ve bu bantların ilişkili olduğu kimyasal bağlar.

Bağ	**mPEG**	**ε-CL**	**mPEG-*b*-PCL**
C-H	2880 cm^{-1}	2930 cm^{-1}	2866 ve 2943 cm^{-1}
C-O	1093 cm^{-1}	-	1104 cm^{-1}
C=O	-	1723 cm^{-1}	1721 cm^{-1}

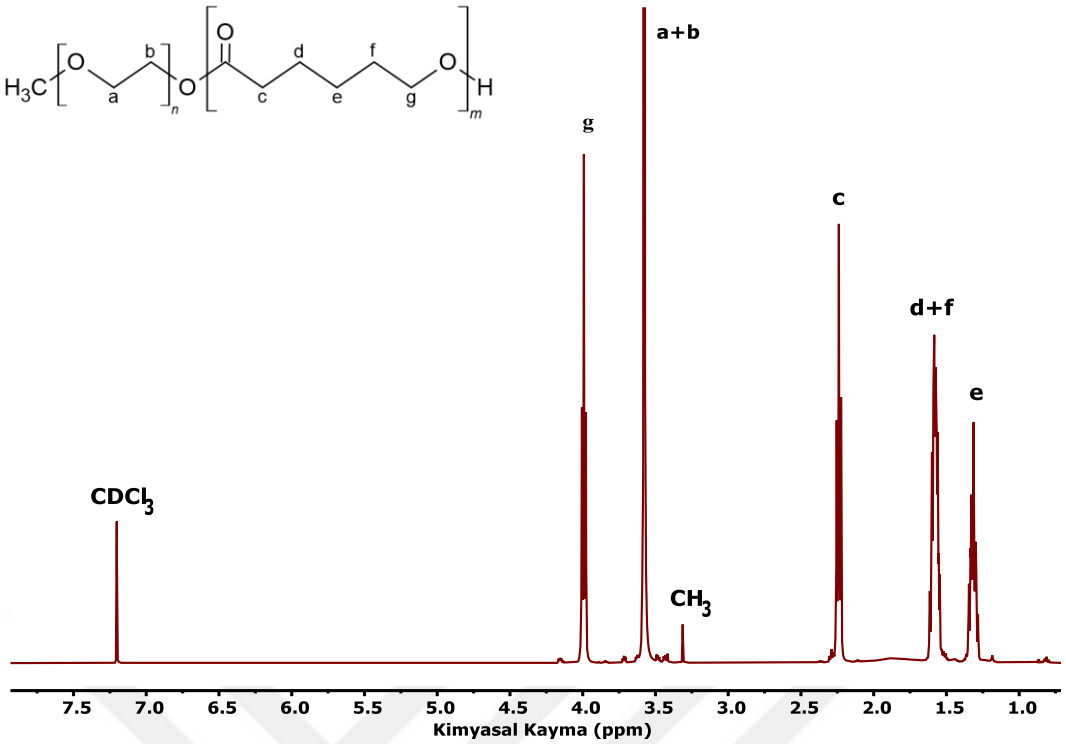
4.1.3 ^{1}H-NMR Analizi Sonuçları

mPEG ve mPEG-*b*-PCL'nin ^{1}H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Hem mPEG hem de mPEG-*b*-PCL'ye ait spektrumlarda 7,20 ppm'de $CDCl_3$ çözücüsünden kaynaklı pikler görülmektedir. Ayrıca yine iki spektrumda da görülen 3,58 ppm'deki pik PEG bloğundaki alifatik zincirin (-CH_2-CH_2) protonlarına aittir. mPEG-*b*-PCL kopolimerinin spektrumunda, mPEG'in spektrumundan farklı olarak 1,32, 1,58, 2,24 ve 3,99 ppm'de görülen piklerin ise PCL bloğundaki alifatik -CH_2 protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen

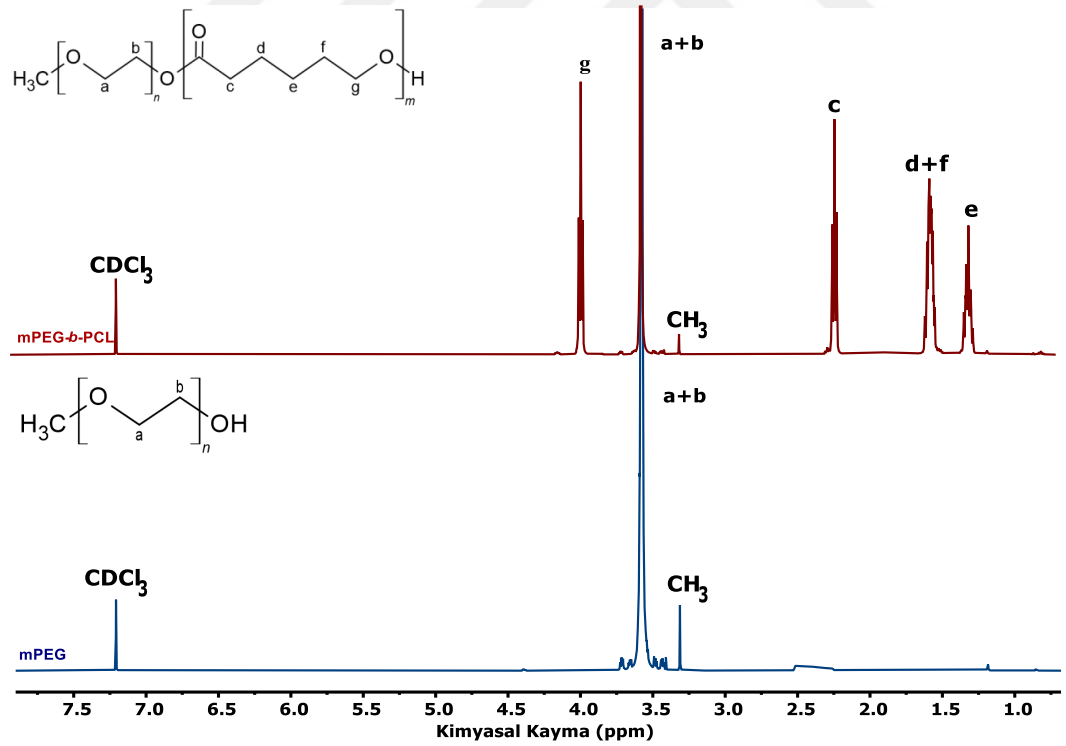
sonuçlar literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermekte [224] ve mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlar niteliktedir. Başlatıcı mPEG ve sntezlenen mPEG-*b*-PCL diblok koplimerine ait karşılaştırmalı ^{1}H-NMR spektrumları Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.2 mPEG polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu.



Şekil 4.3 mPEG-*b*-PCL polimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu.



Şekil 4.4 mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerinin karşılaştırmalı ^{1}H-NMR spektrumları.

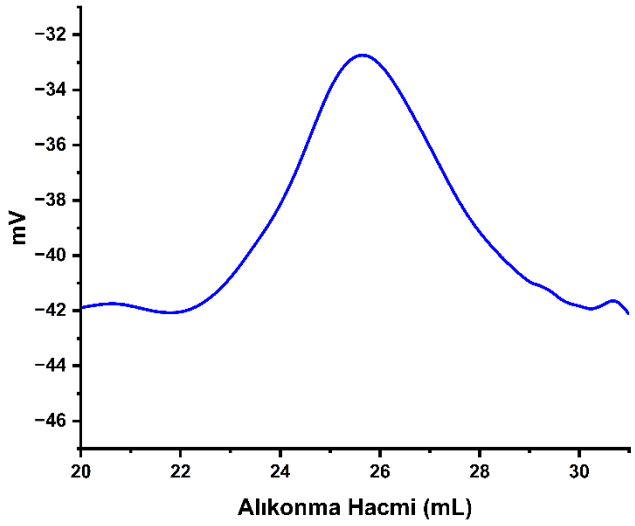
Elde edilen ^{1}H-NMR spektrumlarındaki pik alanlarının hesaplanıp ilgili oranlamalar yapılarak sentezde kullanılan mPEG ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL polimerlerinin sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n) hesaplanmış ve Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları.

Örnek	**M_n (Da)**
mPEG	5301
mPEG-*b*-PCL	8323

4.1.4 GPC Analizi Sonuçları

Kopolimerin molekül ağırlığı ve PDI değeri GPC ile analiz edilmiştir. mPEG-*b*-PCL kopolimerine ait kromatogram Şekil 4.5'te, molekül ağırlığına ilişkin veriler ise Tablo 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Sentezlenen mPEG-*b*-PCL kopolimerinin GPC kromatogramı.

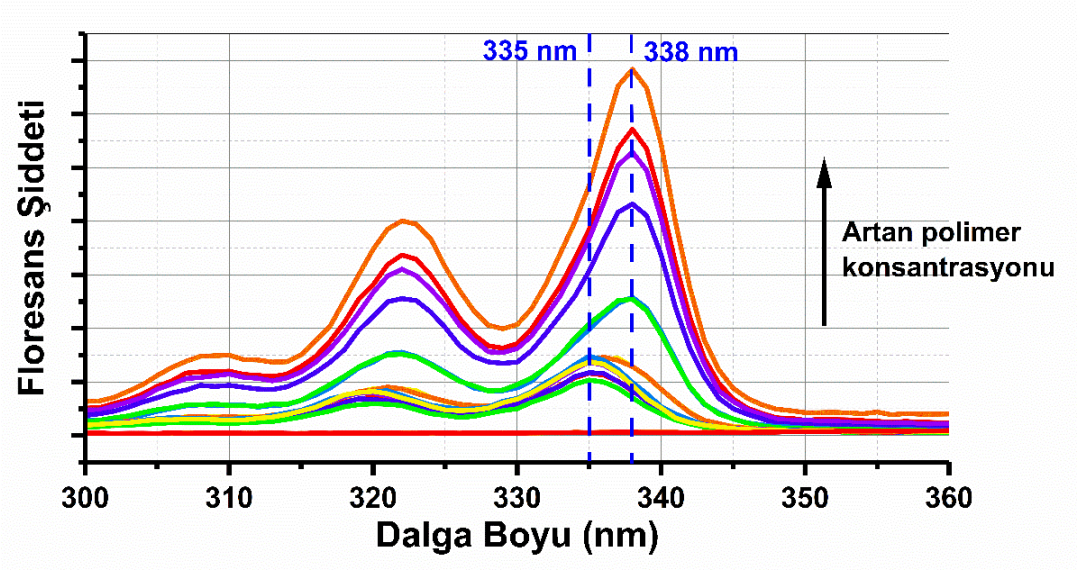
Tablo 4.4 GPC analizi sonucu elde edilen Mw değeri.

Örnek	**M_w (Da)**
mPEG-*b*-PCL	7,875

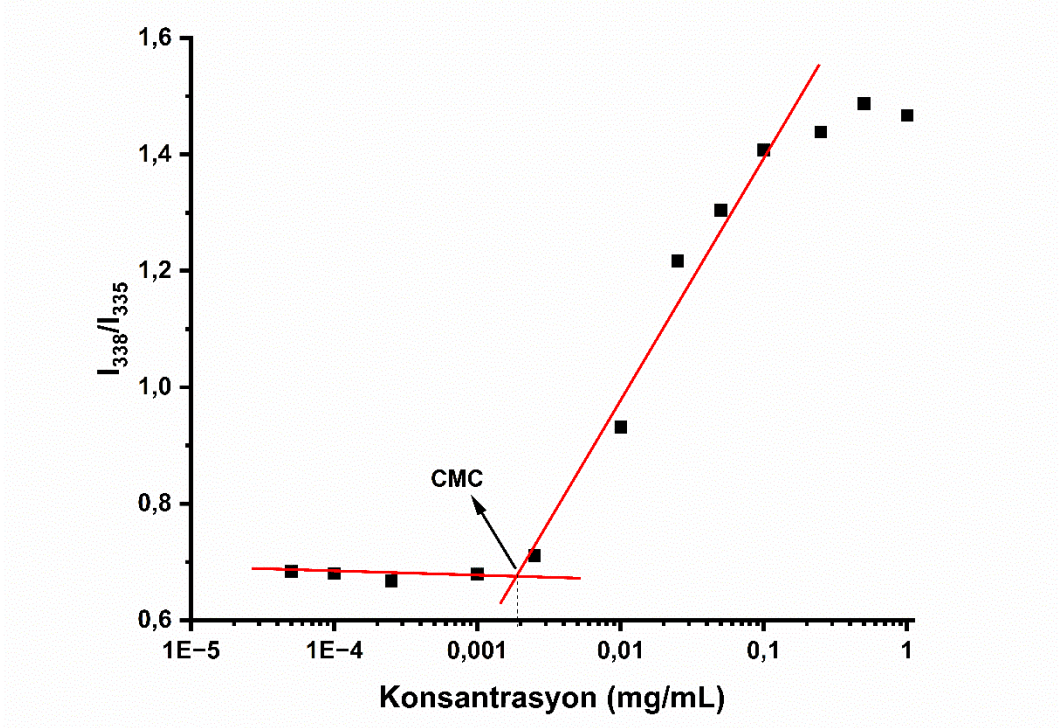
4.1.5 Kritik Misel Konsantrasyonunun (CMC) Belirlenmesi

CMC süspansiyon içerisinde misel oluşumunun ilk görüldüğü amfifilik polimer konsantrasyonu olarak tanımlanır. Amfifilik moleküller polar bir çözgene (su gibi) eklendiğinde molekülün hidrofobik kısımları birbirini iterken hidrofilik kısımları çözgen ile etkileşimde olma eğilimindedir. Amfifilik polimerin sudaki konsantrasyonu arttığında hidrofobik zincirler birbiriyle etkileşerek bir araya gelir, hidrofilik kısımlar ise su molekülleri ile etkileşime geçer. CMC'ye ulaşıldığında hidrofobik kısımların birbirlerine olan çekim kuvveti ile hidrofilik kısımların suya çekimi bir dengeye ulaşır ve böylece misel yapısı meydana gelir. Su veya herhangi bir polar çözgen içerisindeki amfifilik moleküllerin hirofobik kısımlarının bir araya gelmesi enerjetik açıdan daha kararlı bir yapının oluşmasına olanak tanır. Yani CMC, misellerin termodinamik açıdan kararlılığının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir [225].

Bu çalışmada kritik misel konsantrasyonu (CMC), piren probu kullanılarak florometrik yöntemle tayin edilmiştir [218]. Çalışmada kopolimer konsantrasyonunun artmasıyla pirenin floresans şiddetinin de arttığı görülmüştür (Şekil 4.6). Ayrıca kopolimer konsantrasyonunun artmasıyla piren hidrofobik bir ortama geçmiş ve bu nedene piki 335 nm'den 338 nm'ye kaymıştır. CMC değeri, pirenin 338 ve 335 nm'deki floresans şiddetlerinin birbirine oranının (I_{338}/I_{335}), logaritmik skalada konsantrasyona karşı grafiğe dökülmesiyle hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Grafikte eğimin değiştiği noktaya karşılık gelen konsantrasyon değeri $1{,}9 \times 10^{-3}$ mg/mL, CMC olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6 Değişen kopolimer konsantrasyonuna göre pirenin floresans spektrumları.

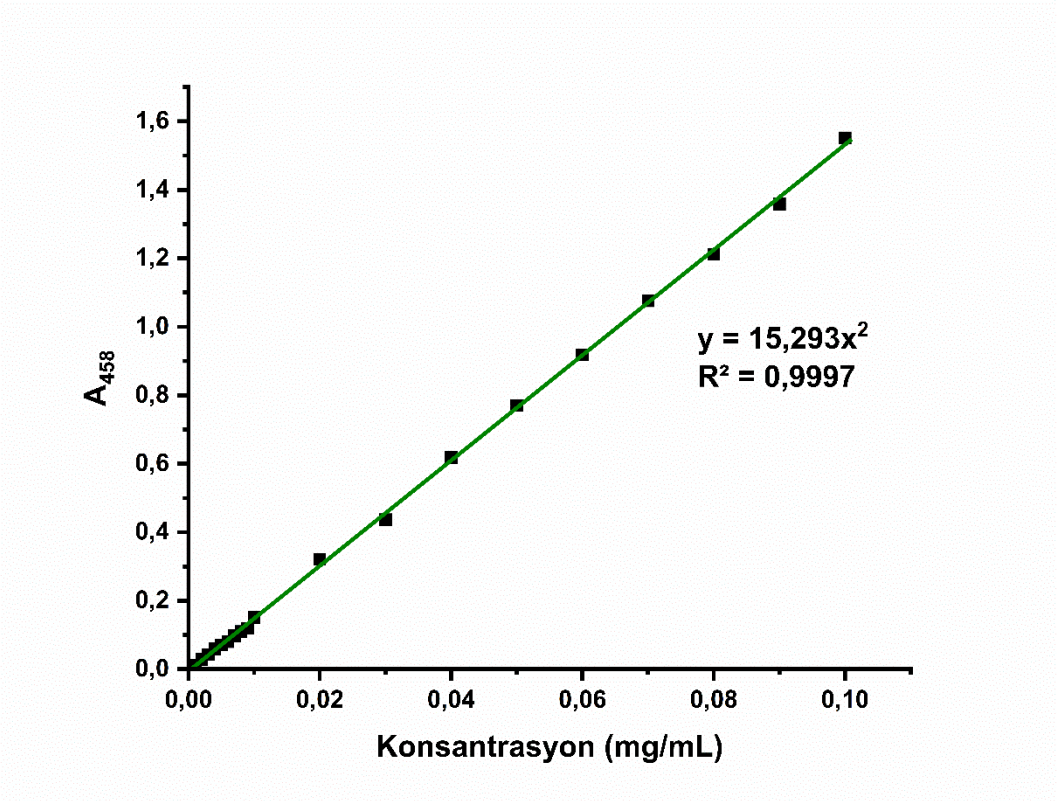


Şekil 4.7 Pirenin 338 ve 335 nm'deki floresans şiddetlerinin oranının (I_{338}/I_{335}) kopolimer konsantrasyonuna bağlı değişimi.

4.2 Rifaksimin Yüklü Misellerin Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu ve Karakterizasyonu

4.2.1 Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

RFX'in 0,1 – 0,001 mg/mL konsantrasyonlarında asetonda çözülmesiyle elde edilen çözeltilerin UV-Vis spektrofotometre ile 458 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüş ve konsantrasyona göre değişimi Şekil 4.8'de görüldüğü üzere grafiğe dökülmüştür. Eğrinin R^2 değeri (0,9997) 1'e oldukça yakın olup kalibrasyon eğrisinin güvenilirliği yüksektir.



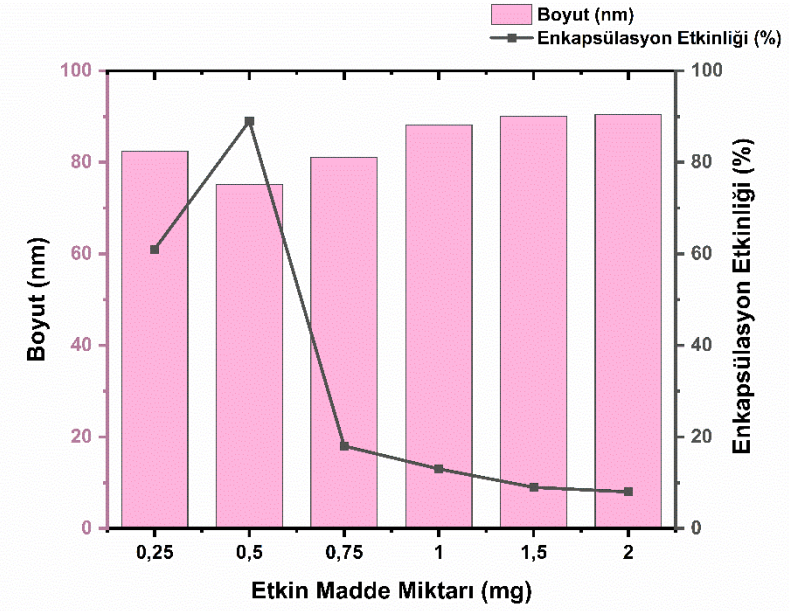
Şekil 4.8 RFX kalibrasyon eğrisi.

4.2.2 Misel Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu

Tez kapsamında boyutları 100 nm'nin [158], PDI değeri 0,3'ün altında [226] monodispers misellerin üretimi hedeflenmiştir. Üretilen misellere ait ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri ve reaksiyon verimi (RV), enkapsülasyon etkinliği (EE), RFX yükleme kapasiteleri (YK) Tablo 4.5'te verilmiştir. Sentezde kullanılan etkin madde miktarına göre ortalama boyut ve enkapsülasyon etkinliğindeki değişim ise Şekil 4.9'da görülmektedir.

Tablo 4.5 Üretilen misellerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel, RV, EE ve YK değerleri.

Formülasyon Kodu	Boyut (nm)	PDI	Zeta Pot. (mV)	RV (%)	EE (%)	YK (%)
M1	69,53 ± 0,463	0,057 ± 0,027	-5,93 ± 0,783	56	-	-
M2	82,38 ± 0,629	0,087 ± 0,006	-8,79 ± 0,244	47	61	7
M3	75,18 ± 0,624	0,081 ± 0,014	-5,60 ± 0,245	54	89	15
M4	81,15 ± 0,323	0,090 ± 0,016	-7,30 ± 0,755	42	18	6
M5	88,09 ± 1,024	0,083 ± 0,014	-8,42 ± 0,338	31	13	5
M6	90,06 ± 0,773	0,109 ± 0,011	-9,53 ± 0,575	39	9	6
M7	90,49 ± 0,745	0,107 ± 0,015	-8,06 ± 0,636	48	8	5



Şekil 4.9 Misellerin ortalama boyut ve enkapsülasyon etkinliğinin eklenen etkin madde miktarına göre değişimi.

Hedeflendiği üzere tüm miseller boyutu 100 nm'nin, PDI değerleri ise 0,3'ün altında olacak şekilde başarıyla sentezlenmiştir. Hem kimyasal madde kaybının hem de maddi kaybın önlenmesi açısından eklenen etkin maddenin en fazla oranda yüklendiği formülasyon optimum kabul edilmiştir. Bunun için formülasyona

eklenen etkin maddenin yüzde cinsinden ne kadarının yüklendiğini gösteren enkapsülasyon etkinliği değerinden faydalanılmıştır. Şekil 4.9'da görüldüğü üzere 0,5 mg RFX kullanılan formülasyon (M3) hem boyut olarak diğer formülasyonlardan daha küçük hem de EE diğerlerine göre daha yüksektir. Ayrıca Tablo 4.5 incelendiğinde M3 formülasyonuna ait PDI değerinin diğer RFX yüklü misellerin PDI değerinden daha düşük olduğu (0'a daha yakın olduğu) yani bu formülasyondaki misellerin daha monodispers bir yapı sergilediği görülmüştür.

4.2.3 Kitosan Kaplı Misel Üretim Parametrelerinin Optimizasyonu

%0,25, %0,5 ve %1 konsantrasyonda CS çözeltileri kullanılarak hazırlanan örneklere ait ölçülen ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.6'da, örneklerin boyut ve PDI değerlerindeki zamana bağlı değişim sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

Tüm koşullarda CS kaplamanın misellerin ortalama boyutunda önemli derecede artışa sebep olduğu görülmüştür. Bununla birlikte artan CS konsantrasyonu, kaplama kalınlığının ve dolayısıyla ortalama partikül boyutlarının artmasıyla sonuçlanmıştır. Optimizasyon sırasında en yüksek konsantrasyonda (%1) CS kullanılan örnekte PDI değerlerinin diğer örneklere nazaran daha yüksek olduğu, yani örneğin daha polidispers bir yapı sergilediği görülmüştür.

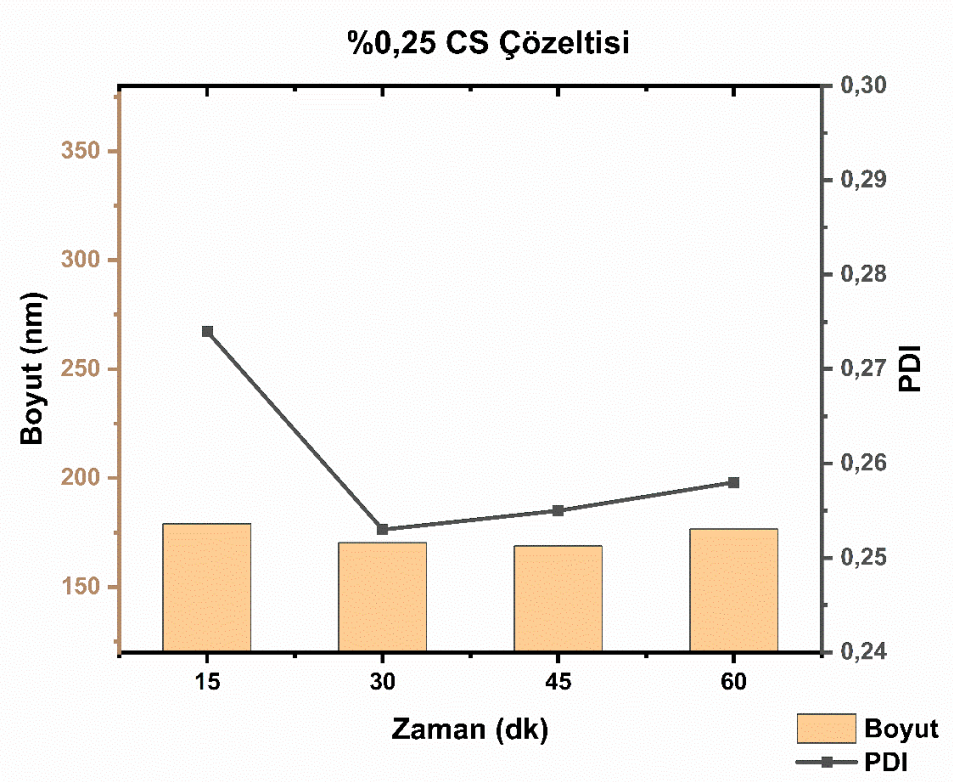
Ölçülen zeta potansiyel değerlerinin kaplamasız misellerde negatif iken CS kaplamayla birlikte pozitife dönmesi kaplamanın başarıyla gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Tüm örneklere ait zeta potansiyel değerleri incelendiğinde CS konsantrasyonundaki artışın zeta potansiyeli artırdığı görülmüştür.

Tablo 4.6 %0,25 (C-$M_{(0,25)}$), %0,5 (C-$M_{(0,5)}$) ve %1 (C-$M_{(1)}$) CS içeren çözeltilerle hazırlanan formülasyonlara ait ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

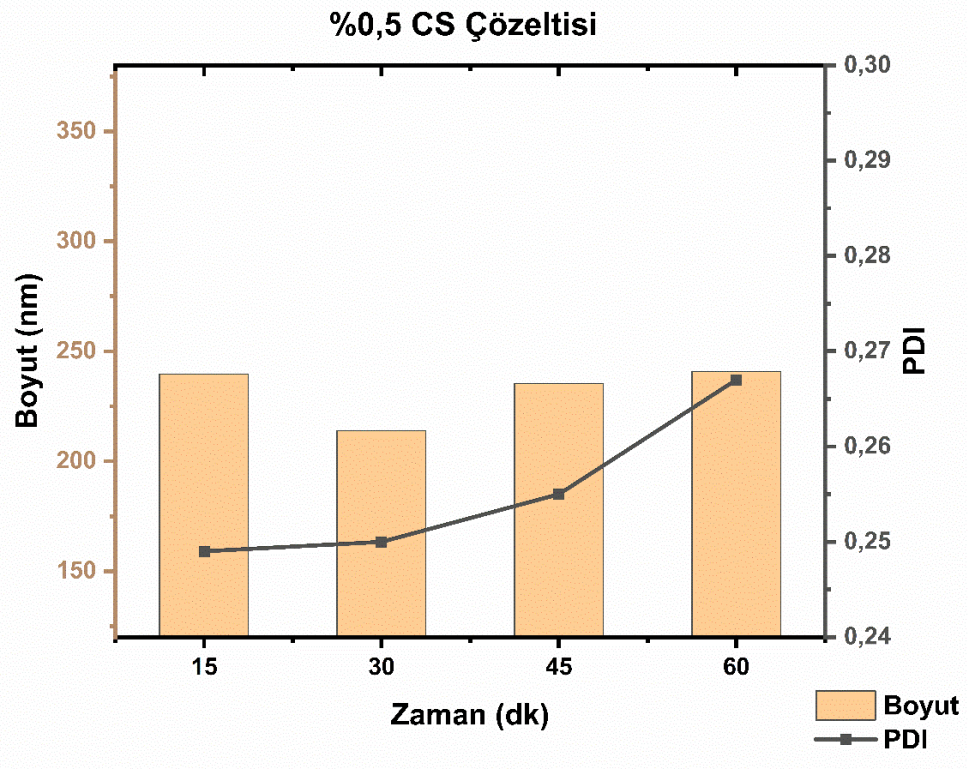
Örnek	Karıştırma süresi (dk)	Ort. Boyut (nm)	PDI	Zeta Pot. (mV)
C-$M_{(0,25)}$	15	179,0 ± 2,201	0,274 ± 0,011	24,0 ± 5,76
	30	170,3 ± 2,862	0,253 ± 0,009	22,7 ± 3,32
	45	168,7 ± 3,270	0,255 ± 0,004	25,8 ± 2,62
	60	176,5 ± 3,853	0,258 ± 0,024	26,7 ± 4,73

Tablo 4.6 %0,25 (C-$M_{(0,25)}$), %0,5 (C-$M_{(0,5)}$) ve %1 (C-$M_{(1)}$) CS içeren çözeltilerle hazırlanan formülasyonlara ait ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri (devamı).

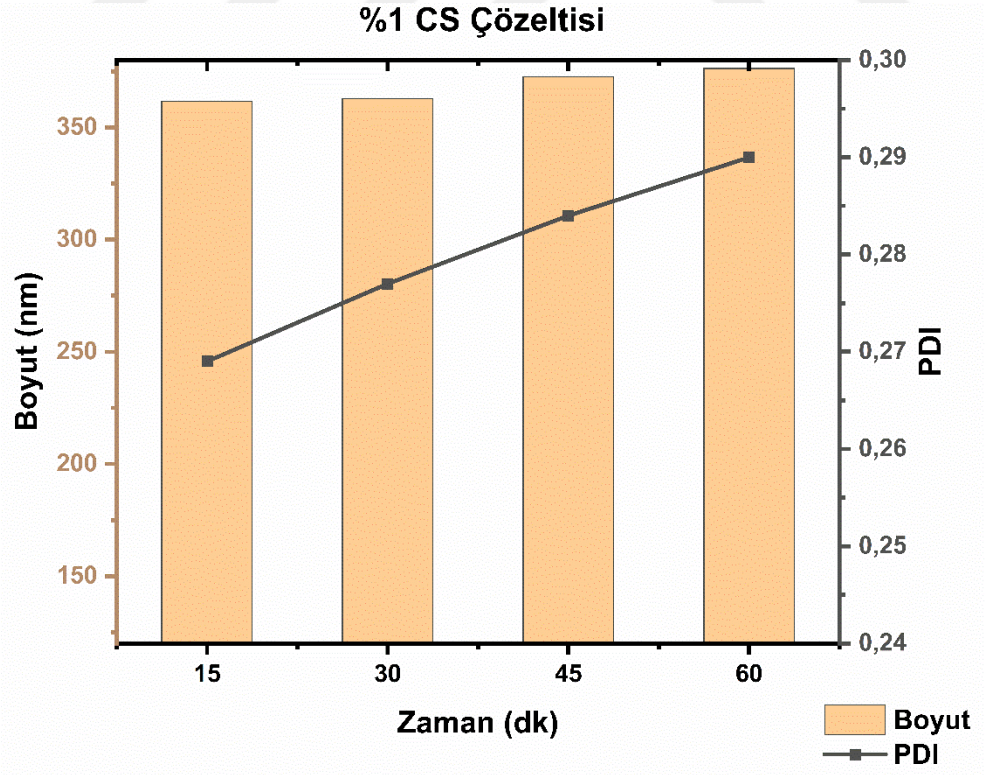
C-$M_{(0,5)}$	15	239,6 ± 0,833	0,249 ± 0,014	22,1 ± 1,86
	30	213,9 ± 6,260	0,250 ± 0,002	28,4 ± 2,46
	45	235,3 ± 5,178	0,255 ± 0,001	23,3 ± 2,10
	60	240,4 ± 7,089	0,267 ± 0,019	26,9 ± 3,90
C-$M_{(1)}$	15	361,6 ± 7,157	0,269 ± 0,005	26,9 ± 4,30
	30	362,9 ± 2,272	0,277 ± 0,004	29,5 ± 3,95
	45	372,5 ± 8,169	0,284 ± 0,001	31,1 ± 3,26
	60	376,3 ± 5,052	0,290 ± 0,036	29,7 ± 1,21



Şekil 4.10 %0,25 konsantrasyonda CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan formülasyona ait ortalama boyut ve PDI değerlerinin zamanla değişimi.



Şekil 4.11 %0,5 konsantrasyonda CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan formülasyona ait ortalama boyut ve PDI değerlerinin zamanla değişimi.



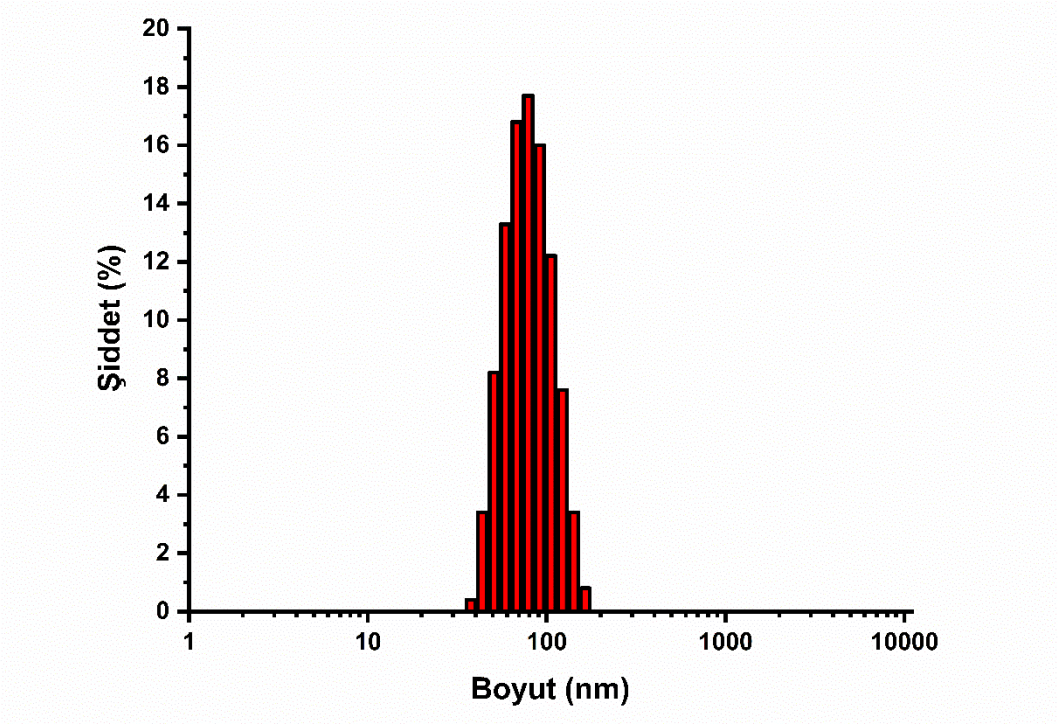
Şekil 4.12 %1 konsantrasyonda CS çözeltisi kullanılarak hazırlanan formülasyona ait ortalama boyut ve PDI değerlerinin zamanla değişimi.

Kolloidal bir sistem içerisindeki parçacıkların stabilitesi zeta potansiyelleriyle ilişkilidir. Sistemdeki partiküllerin zeta potansiyeli (pozitif veya negatif yönde) yüksek olduğunda itme kuvvetleri çekme kuvvetlerini aşar ve bu da nispeten kararlı bir sistemle sonuçlanır [227]. Literatürde zeta potansiyelin -30 mV'dan düşük ve +30 mV'dan yüksek olması durumunda daha iyi koloidal stabilite elde etmek için yeterli itme kuvvetinin sağlandığı kabul edilir [228]. Örneklere ait zeta potansiyel değerleri incelendiğinde %1'lik kitosan çözeltisi ile hazırlanan örneklerin bu koşulu sağladığı görülmüş ancak boyut ve PDI değerleri açısından beklenen sonuçlara ulaşılamamıştır. %0,25 konsantrasyonda CS ile hazırlanan örnekte ise boyut ve PDI değerleri nispeten beklenilen yönde olmasına karşın istenilen zeta potansiyel değerine ulaşılamamıştır. Ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel açısından en uygun değerler %0,5'lik CS çözeltisi ile hazırlanan örnekte 30. dakikada elde edilmiştir. Sonuç olarak %0,5 CS konsantrasyonunda 30 dk karıştırma uygulanarak hazırlanan örnek optimum (OPT-C-M) kabul edilmiştir.

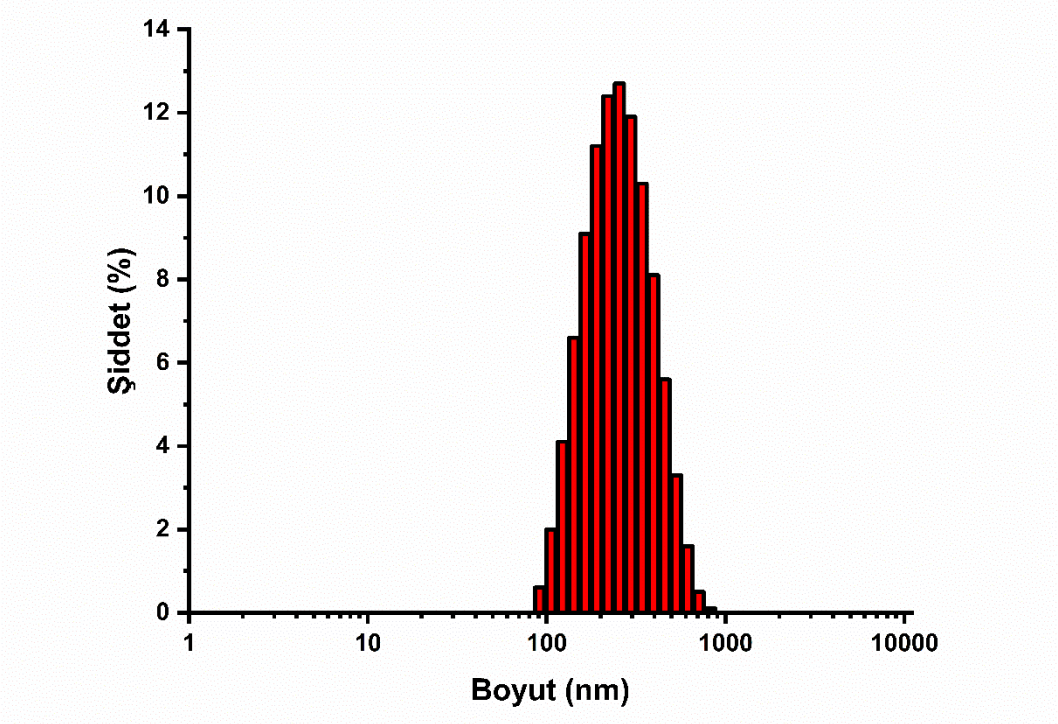
4.2.4 Ortalama Boyut, PDI ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Üretilen OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait ortalama boyut ve PDI değerleri DLS, zeta potansiyel ise ELS yöntemiyle ölçülmüştür. OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait boyut grafikleri sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir. Ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyelleri ise Tablo 4.7'de verilmiştir.

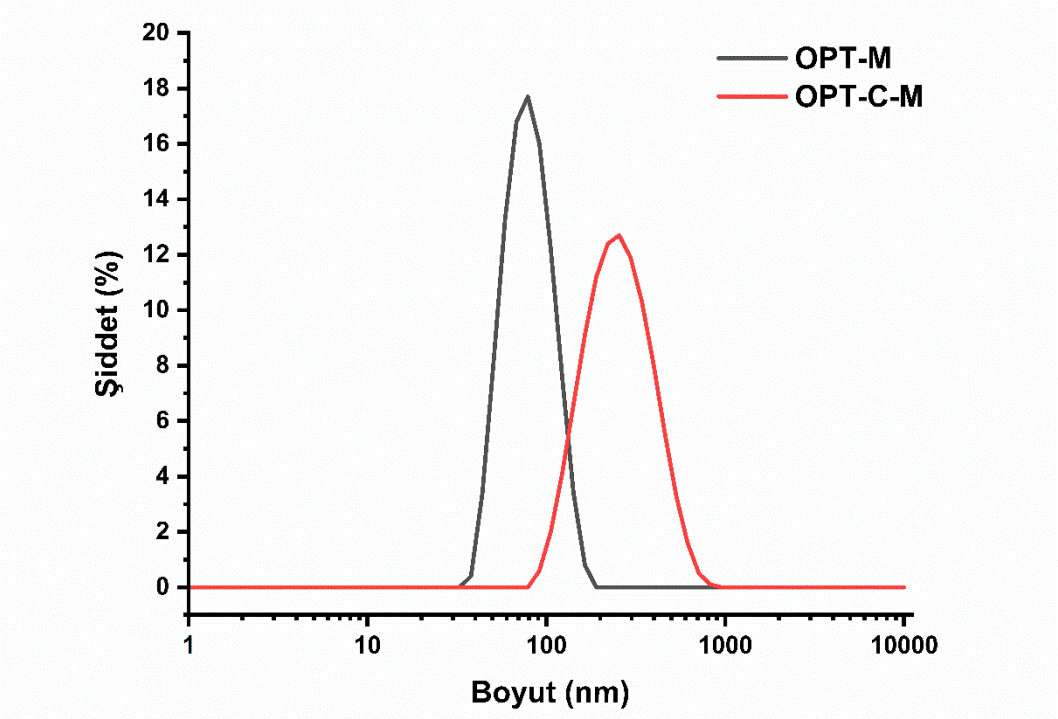
OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait boyut dağılım grafikleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde (Şekil 4.15) CS kaplamanın hem boyutlarda önemli bir artışa neden olduğu hem de OPT-C-M örneğinde boyutların daha geniş bir aralığa yayıldığı görülmektedir. Tablo 4.7'de verilen örneklere ait boyut ve PDI değerleri de bu veriyi destekler niteliktedir. Bununla birlikte her iki örneğin de PDI değerinin 0,3'ün altında olması monodispers sistemlerin üretildiğini göstermektedir. Ayrıca örneklerin zeta potansiyelleri incelendiğinde OPT-M örneğinin kaplama sonrası zeta potansiyelinin 34 mV arttığı görülmektedir. Bu durum hem kaplamanın başarılı olduğunu hem de beklendiği üzere kolloidal ortamda stabilitenin artırılmış olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.13 OPT-M örneğinin boyut dağılımı.



Şekil 4.14 OPT-C-M örneğinin boyut dağılımı.



Şekil 4.15 OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin karşılaştırmalı boyut dağılım grafikleri.

Tablo 4.7 OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyelleri.

Örnek	Ortalama Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
OPT-M	75,18 ± 0,624	0,081 ± 0,014	-5,60 ± 0,245
OPT-C-M	213,95 ± 6,260	0,250 ± 0,002	28,40 ± 2,46

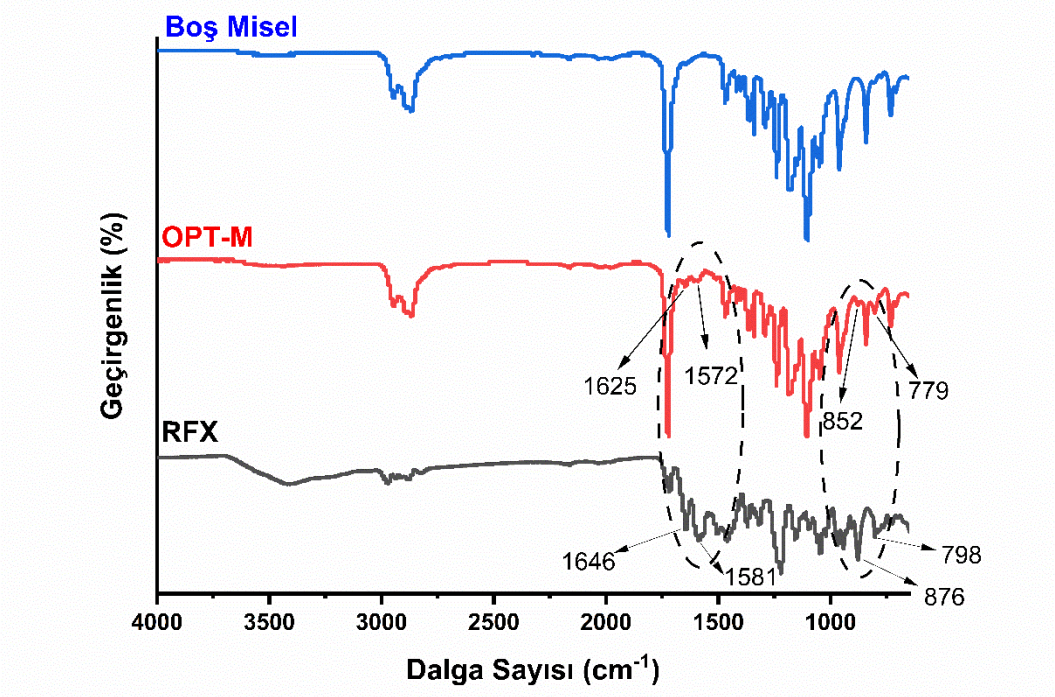
4.2.5 Misellerin FT-IR Spektroskopisi Analizi

Etkin madde ve polimerik miseller arasındaki olası etkileşimlerin ve kaplama işleminin başarısının incelenmesi amacıyla FT-IR spektroskopisinden faydalanılmıştır.

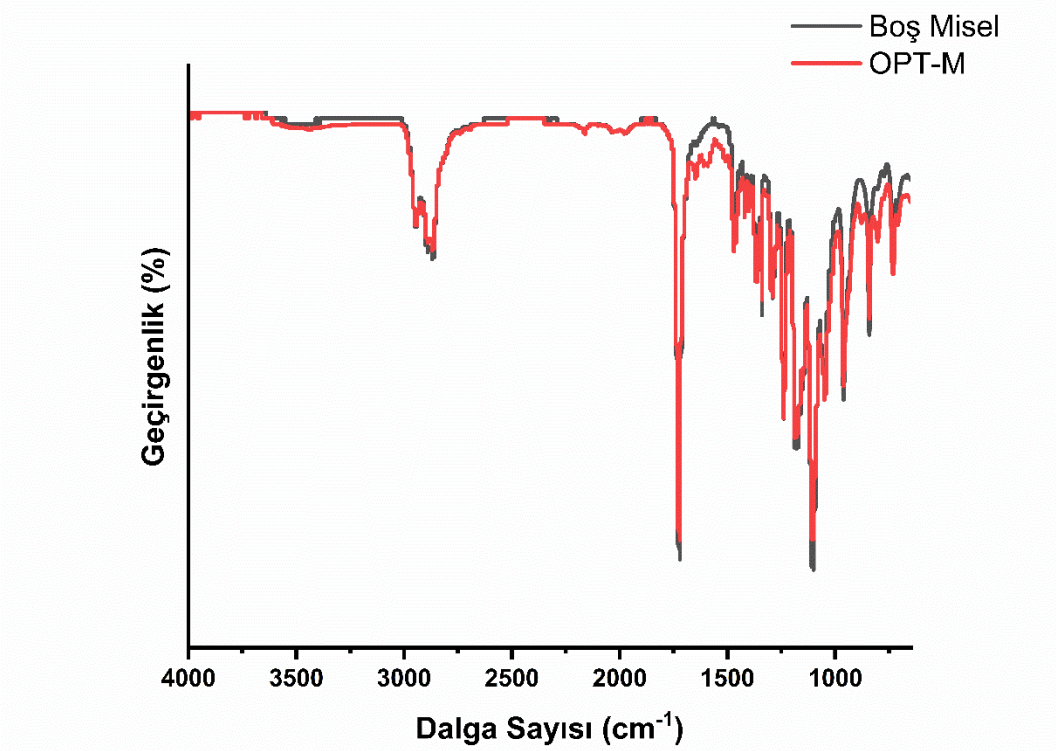
Boş misel, optimum koşullarda üretilen miseller ve RFX'e ait FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.16'da verilmiştir. Boş misellerin ve OPT-M örneğinin spektrumlarında mPEG-*b*-PCL polimerinin karakteristik C-H gerilmesi bantları 2946 ve 2869 cm^{-1}, C-O gerilmesine ait bant 1720 cm^{-1} ve C=O gerilmesine ait bant ise 1102 cm^{-1} dalga sayısında görülmektedir (Şekil 4.17). Serbest RFX'e ait spektrum incelendiğinde görülen 3408 cm^{-1} dalga sayısındaki bant O-H gerilmesi,

1721 cm^{-1}'deki bant keton grubuna ait C=O gerilmesi, 1644 cm^{-1}'deki bant ester bağı, 1588 cm^{-1}'deki bant pirol halkası ve 1158 cm^{-1}'deki bant ise C-N gerilmesine aittir [229, 230].

Boş miseller ile OPT-M formülasyonuna ait FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında OPT-M spektrumunda boş misellerde de görülen mPEG-*b*-PCL'ye ait bantların baskın olduğu görülmektedir (Şekil 4.17). Bu durum RFX'in misellere enkapsüle olduğunun bir kanıtıdır; ancak OPT-M spektrumunda 1625, 1572, 852 ve 779 cm^{-1} dalga sayısındaki düşük şiddetli bantların RFX spektrumundaki bantlarla örtüşüyor olması bir miktar RFX'in misellerin yüzeyine adsorbe olmuş olabileceğini göstermektedir.

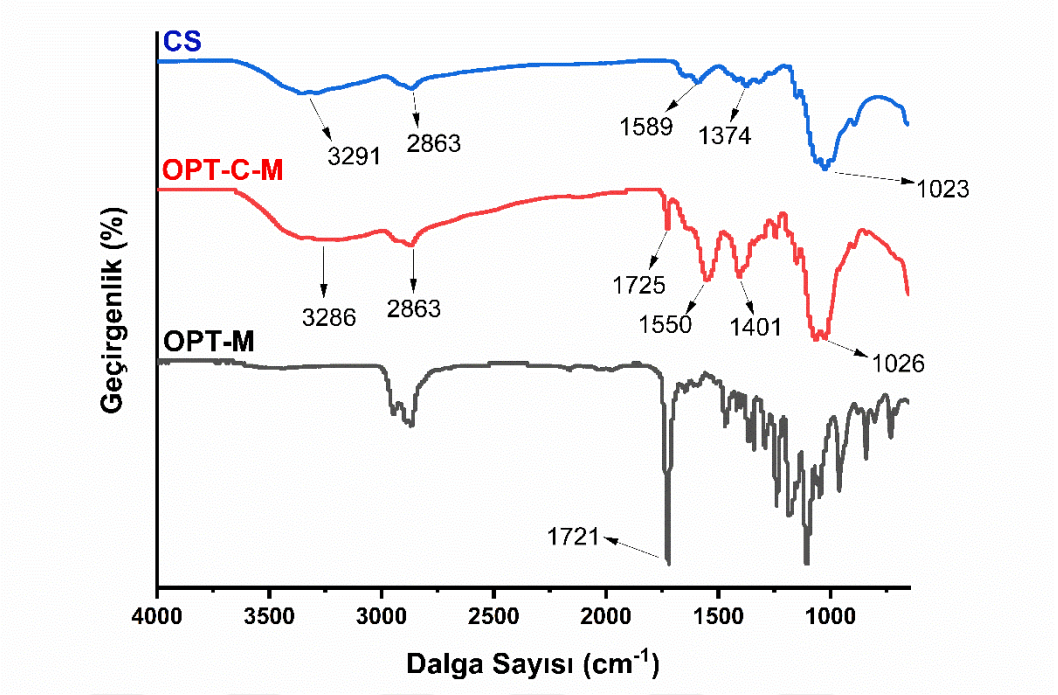


Şekil 4.16 Boş mPEG-*b*-PCL misel, optimum koşullarda üretilen RFX yüklü miseller (OPT-M) ve serbest rifaksimine (RFX) ait FT-IR spektrumları.



Şekil 4.17 Boş miseller ve OPT-M örneğinin karşılaştırmalı FT-IR spektrumları.

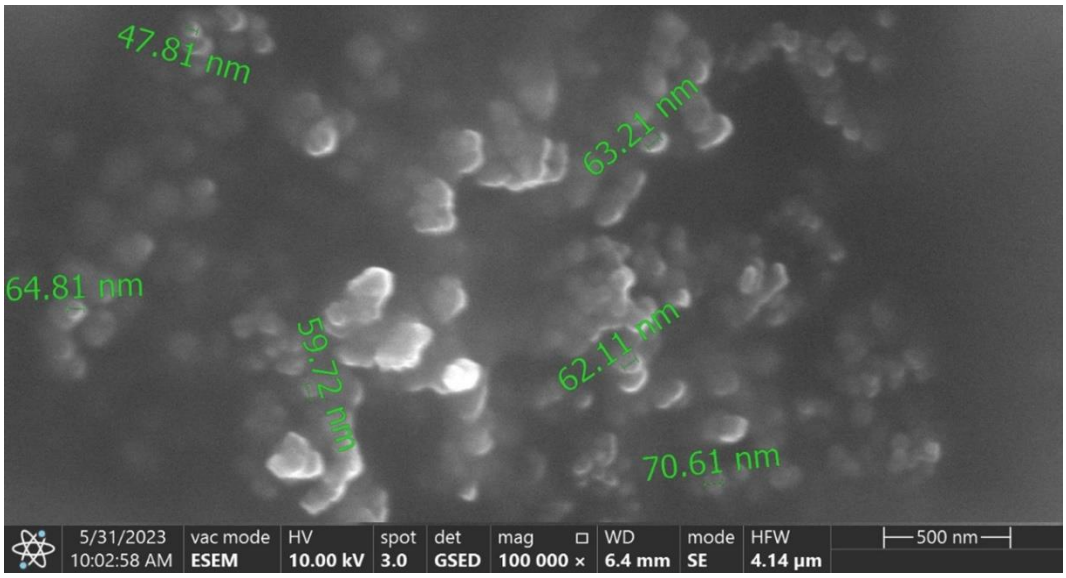
Kitosan (CS), optimum koşullarda üretilen RFX yüklü miseller (OPT-M) ve optimum koşullarda üretilen RFX yüklü, CS kaplı misellere (OPT-C-M) ait FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.18'de verilmiştir. Literatürde CS spektrumunda görülen 3356 cm^{-1} ve 3289 cm^{-1} dalga sayısındaki bantlar O-H ve N-H gerilme titreşimlerine, 2869 cm^{-1}'deki bant -CH gerilmesine, 1650 cm^{-1}'deki bant C-O bağına, 1592 cm^{-1}'deki bant -NH gerilmesine, 1375 cm^{-1}'deki bant CH_2 grubundaki asimetrik C-H gerilmesine ve 1025 cm^{-1}'deki bant C-O-C bağına atfedilmiştir [231-233]. OPT-C-M'ye ait spektrumda CS spektrumunda görülen piklerin baskın olması kaplamanın başarılı olduğunu göstermektedir.



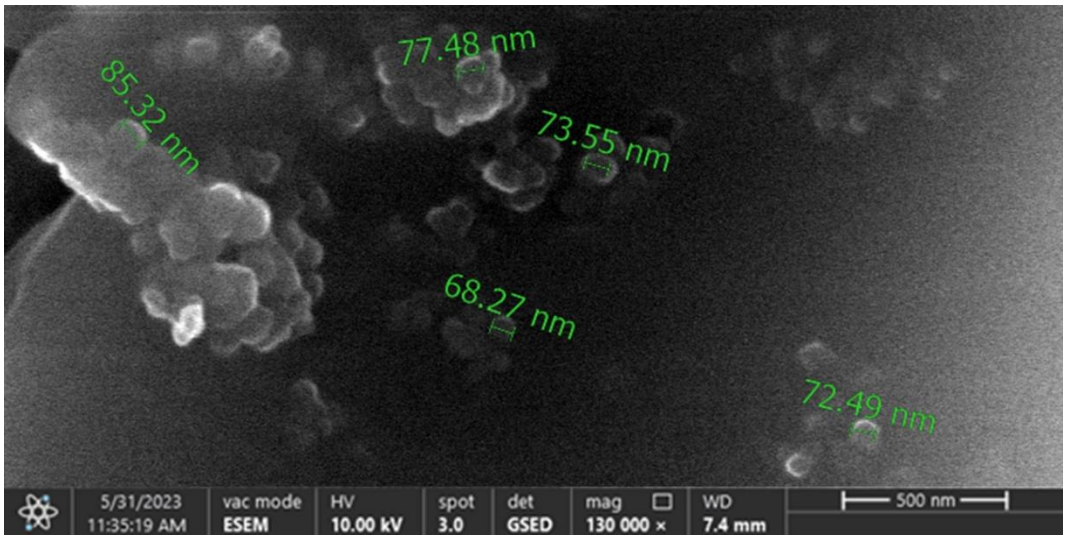
Şekil 4.18 Serbest kitosan (CS) ve optimum koşullarda üretilen miseller (OPT-M) ve kitosan kaplı misellere (OPT-C-M) ait FT-IR spektrumları.

4.2.6 Morfolojik Yapı Tayini

Boş miseller ve OPT-M örneğine ait SEM mikrografları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir.



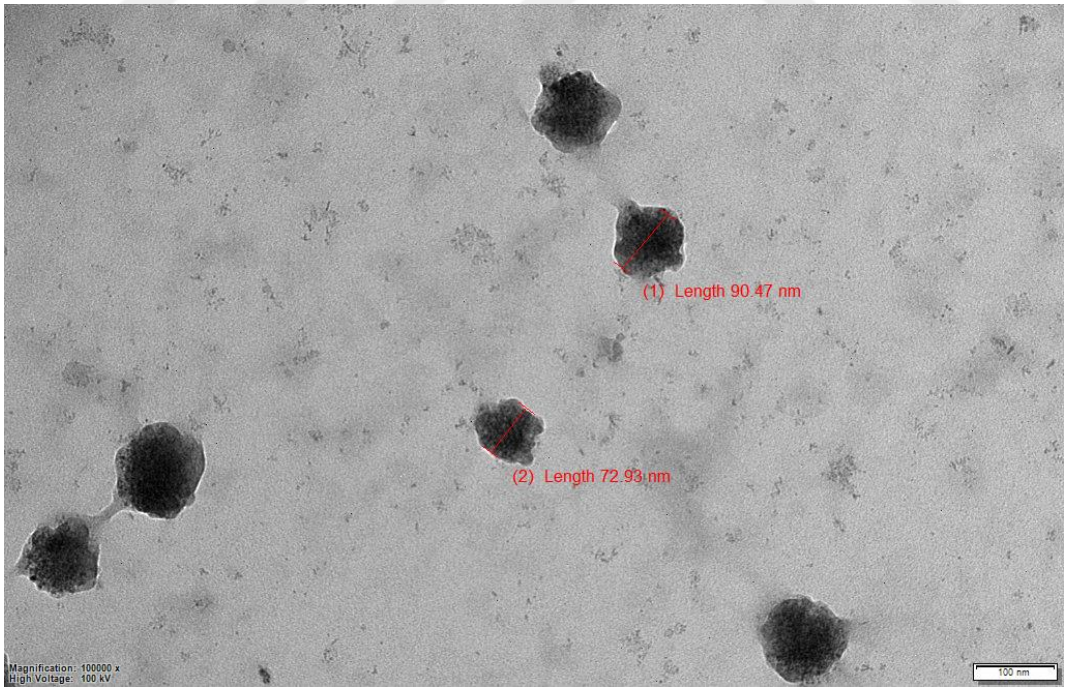
Şekil 4.19 Boş misellere ait SEM mikrografı.



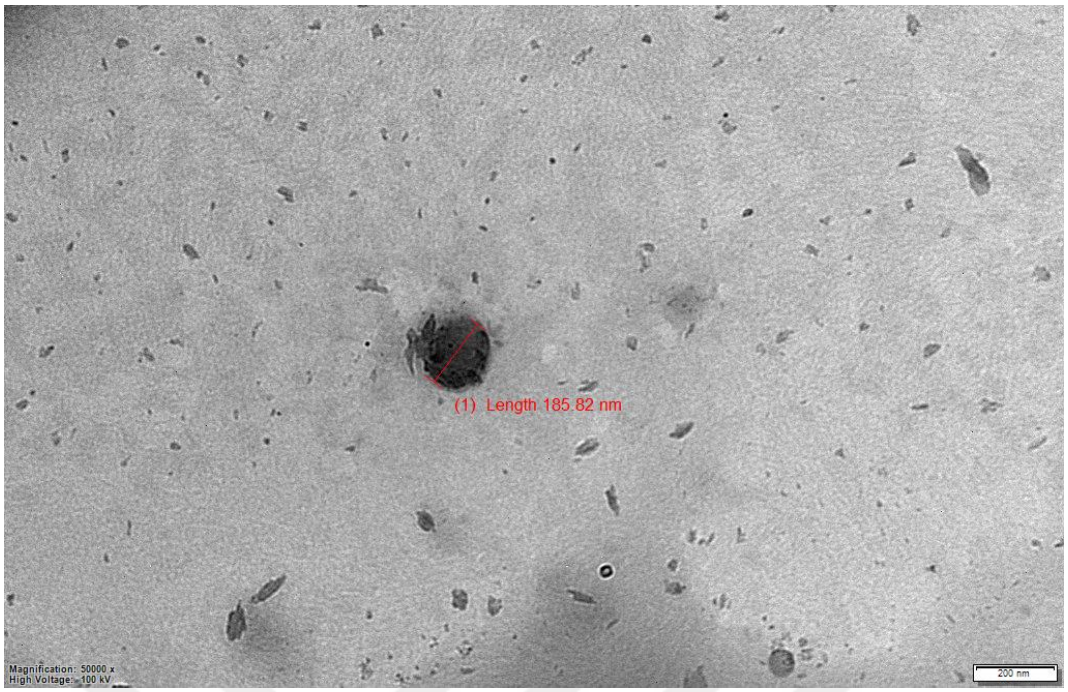
Şekil 4.20 OPT-M örneğine ait SEM mikrografı.

SEM analizi sonucu elde edilen mikrograflarda misellerin beklenen küresel morfolojide ve oldukça monodispers yapıda oldukları görülmektedir. Ayrıca SEM ile ölçülen boyutlar DLS ile ölçülen boyutları destekler niteliktedir.

OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait TEM mikrografları sırasıyla Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4.21 OPT-M örneğinin TEM mikrografı.



Şekil 4.22 OPT-C-M örneğine ait TEM mikrografı.

OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait TEM mikrograflar incelendiğinde örneklerin küresel morfolojide olduğu görülmektedir. Bununla birlikte örneklerin TEM ile ölçülen boyutları, DLS ile ölçülen boyutları doğrular niteliktedir.

TEM ve SEM mikrografları karşılaştırıldığında örneklerin hem liyofilize hem de sulu ortamda disperse edilmiş halde küresel morfolojilerini korudukları ayrıca disperse edildiklerinde agregasyonun görülmediği gözlenmiştir.

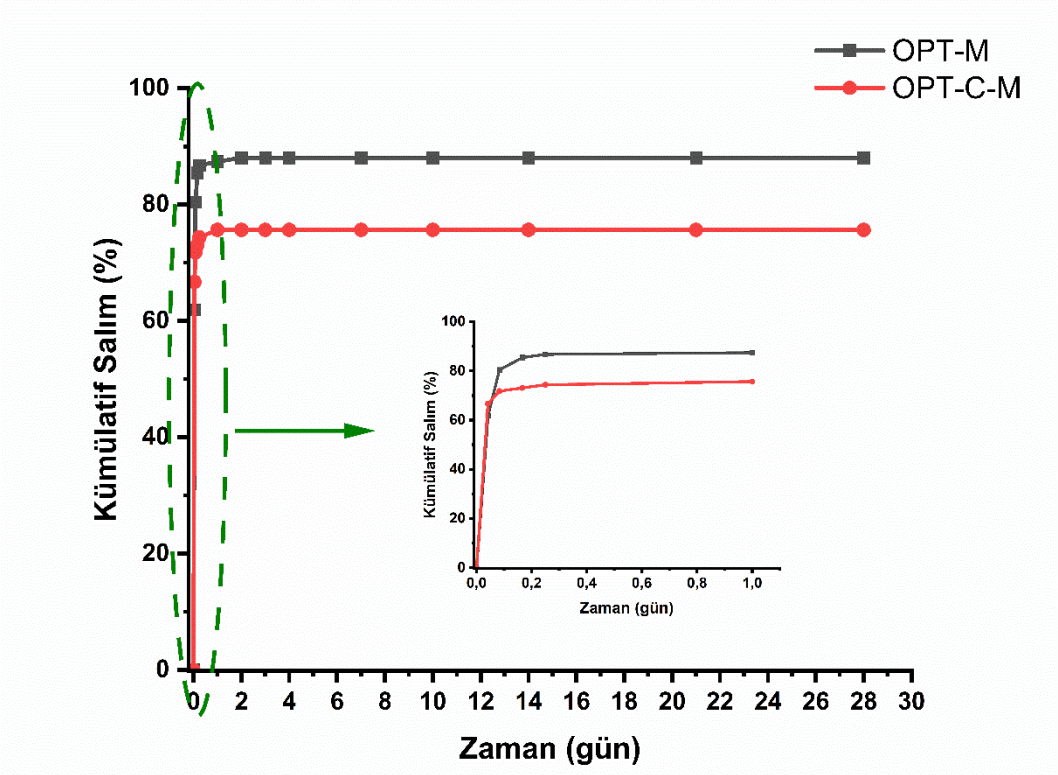
4.2.7 *In-Vitro* Salım Çalışması

OPT-M ve OPT-C-M örneklerinden RFX salımı karşılaştırmalı olarak *in-vitro* dissolüsyon metodu ile incelenmiştir. İlk 6 saatte OPT-M ve OPT-C-M örneklerinden salınan RFX miktarı sırasıyla %86,74 ve %74,36'ya ulaşmıştır. Kalan RFX'in salımı müteakip 28 gün boyunca izlenmiş ve OPT-M örneğinden salım %88,05'e, OPT-C-M örneğinden ise %75,64'e ulaşarak tamamlanmıştır (Şekil 4.23).

OPT-M örneğinde, hidrofobik PCL bloğundan oluşan bir çekirdek içerisine enkapsüle olmuş RFX'in salımı, kopolimerin degradasyonu ve miselden difüzyonu yoluyla gerçekleşmiştir. Jiang ve ark. yaptıkları çalışmada mPEG-*b*-PCL misellerin bozunma mekanizmasını açıklamışlardır [234]. Çalışma sonuçlarına göre misellerdeki bozunma ilk olarak PEG ve PCL bloklarının arayüzeyinde

başlamaktadır. Bu nedenle önce PEG zincirleri ortamdan ayrılır, kalan PCL çekirdeğinde ise zamanla çatlaklar ve kanallar meydana gelir. Polimer matrisin miselin kabuk kısmından başlayarak zamanla bozunmasını takiben çekirdekte meydana gelen kanallar ve gözenekler vasıtasıyla misel içerisine enkapsüle edilen etkin maddenin salımı gerçekleşir.

Hem OPT-M hem de OPT-C-M örneğinden RFX'in salımının ilk iki saatte çok hızlı şekilde/patlama şeklinde (burst release), ardından daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Başlangıçtaki patlama etkisi misellerin yüzeyine yakın kısımlarına tutunup kolayca desorbe edilen ilaca; daha yavaş salım ise misel çekirdeğinde tutulan ilacın difüzyonuna atfedilir. Bununla birlikte CS kaplamanın patlama salımını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Elmowafy ve ark. tarafından yapılan çalışma ile örtüşmektedir [220].

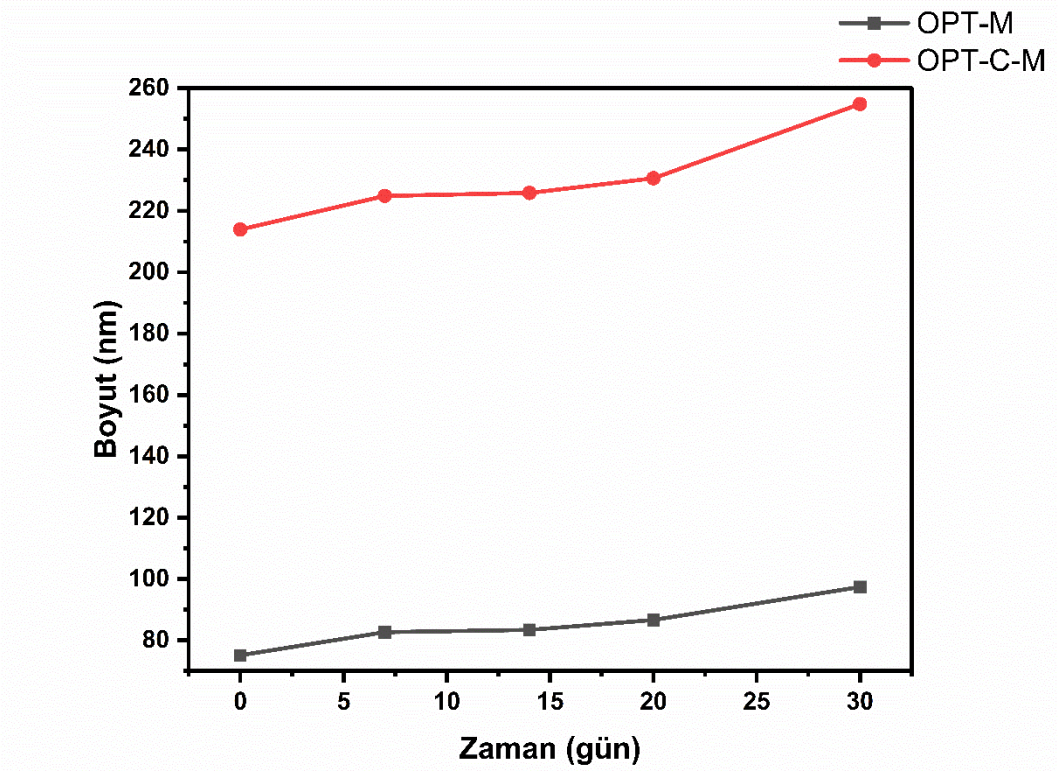


Şekil 4.23 OPT-M ve OPT-C-M'nin karşılaştırmalı salım profilleri.

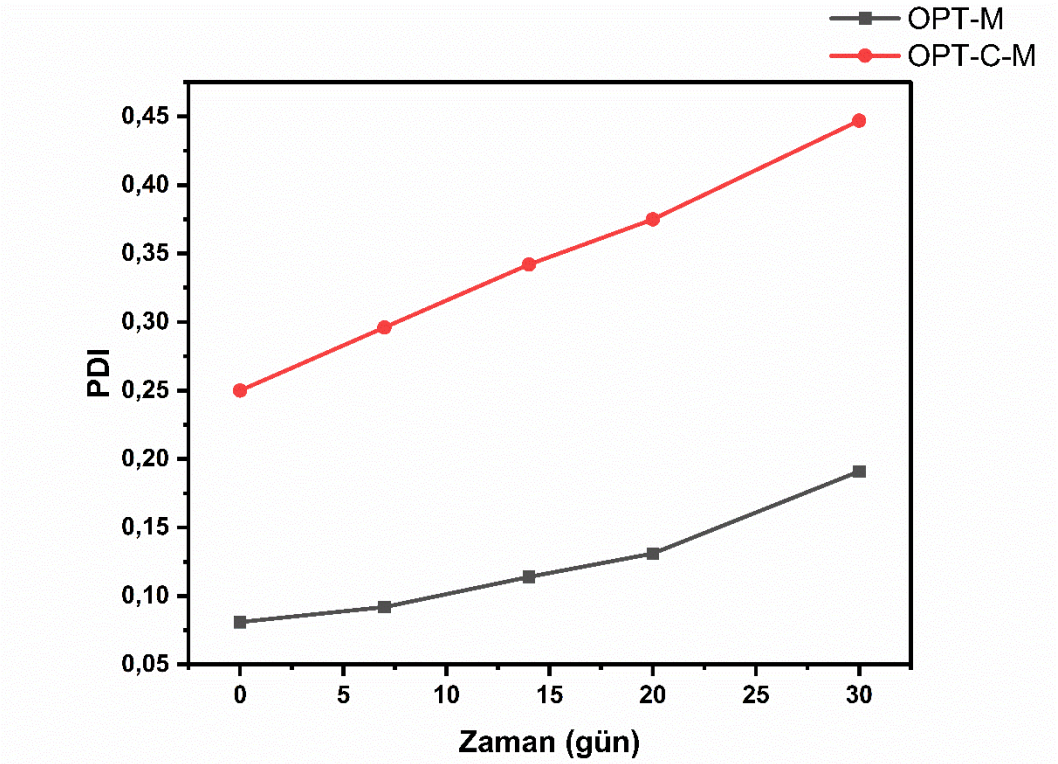
4.2.8 Kolloidal Stabilite

Çalışmada OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin kolloidal stabilitesi 30 gün boyunca belirli aralıklarla örneklere ait ortalama boyut, PDI ve absorbans değerleri ölçülerek analiz edilmiştir.

Örneklerin ortalama boyut değerlerindeki değişim Şekil 4.24'te verilmiştir. 30 günün sonunda, OPT-M örneğinin boyutları %29,59 oranında artarken OPT-C-M örneğinin boyutlarında %19,12'lik bir artış olmuştur. PDI değerleri incelendiğinde (Şekil 4.25) OPT-M örneğinde %135,67'lik, OPT-C-M örneğinde ise %78.90'lık artış olduğu görülmüştür. OPT-M örneğinin ortalama boyut ve PDI değerlerinin OPT-C-M örneğine göre çok daha fazla artması, hedeflendiği üzere CS kaplamanın misellerin stabilitesini artırmada etkili olduğunun bir göstergesidir. Boyutlardaki artış literatürde Ostwald olgunlaşması fenomeniyle açıklanmıştır [235]. Bu fenomene göre süspansiyon içerisindeki küçük partiküller bozunup nispeten daha büyük partiküllerin üzerine çökerek daha büyük boyutlu yapılar meydana gelir ve süspansiyonun ortalama boyutlarında bir artış gözlenir [236, 237].



Şekil 4.24 Süspansiyon içindeki OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin boyutlarının zamana göre değişimi.

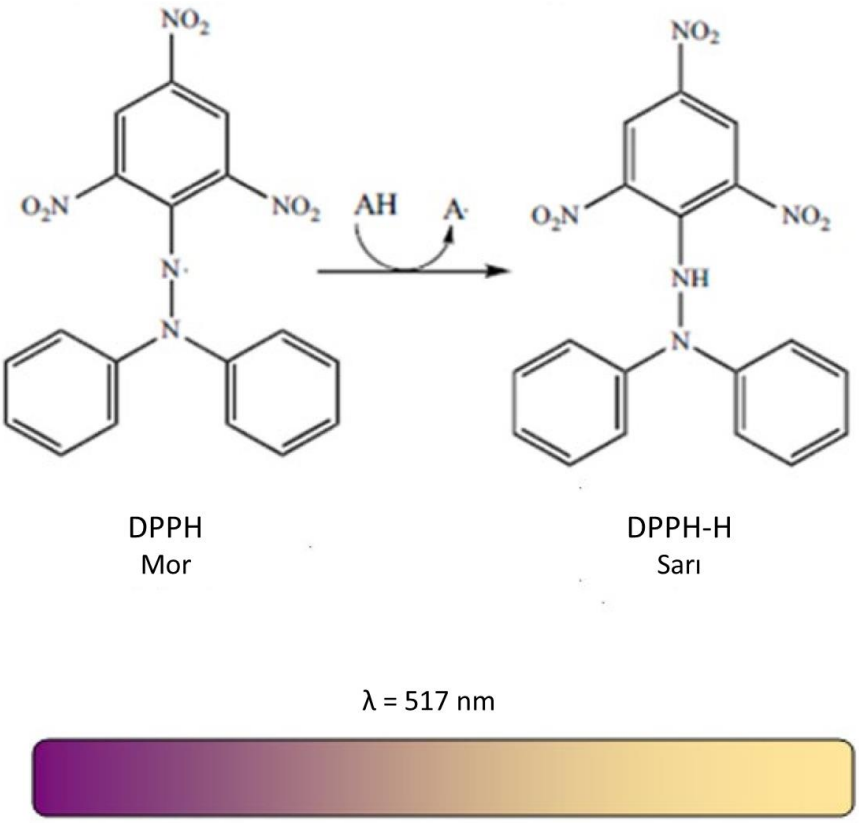


Şekil 4.25 Süspansiyon içindeki OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin PDI değerlerinin zamana göre değişimi.

4.3 Misellerin Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

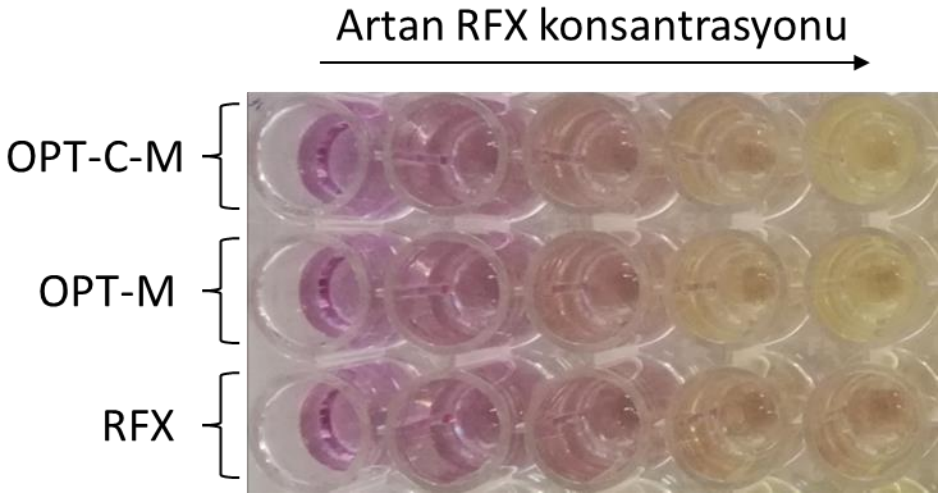
4.3.1 Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Organizmaların bünyesinde serbest radikallerin aşırı artması proteinler, lipidler ve nükleik asitlerin yapı ve işlevinde bozukluklara neden olabilmektedir ve bu reaktif bileşikler literatürde pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir [238]. Antioksidanlar vücuttaki serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarının durdurulması veya yavaşlatılmasını sağlayan bileşiklerdir. Bu nedenle antioksidan aktivite tayini serbest radikallerle ilişkilendirilen hastalıklara karşı etkili yaklaşımların geliştirilebilmesi adına büyük önem taşır. DPPH yöntemi, radikal bileşik kararlı olduğundan, ön işlem gerekmediğinden ve antioksidanların radikal süpürme aktivitesini değerlendirmek için geçerli, doğru, kolay ve ekonomik bir yöntem olduğundan antioksidan aktivite tayininde sıklıkla tercih edilir [239]. DPPH radikali koyu mor bir renge ve 517 nm civarında güçlü bir absorpsiyona sahiptir. Ortamda bulunan antioksidan bileşikler tarafından nötralize edildiğinde ise soluk sarı bir renk alır (Şekil 4.26) [240].

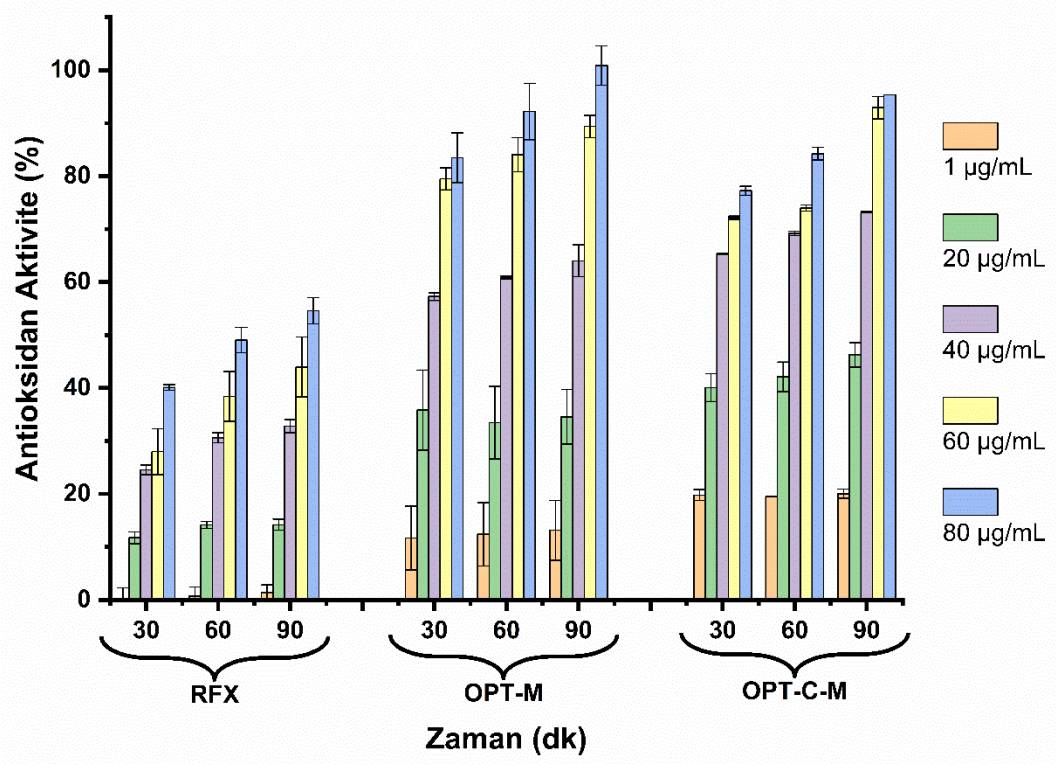


Şekil 4.26 DPPH yönteminin mekanizması [241].

Bu çalışmada RFX, OPT-M ve OPT-C-M'nin antioksidan aktiviteleri örnekler eş konsantrasyonlarda RFX içerecek biçimde hazırlanarak DPPH metodu ile değerlendirilmiştir. Deneyin tek tekrarına ait plaka görüntüsü Şekil 4.27'de, her bir örneğin antioksidan aktivitesindeki değişim zamana ve konsantrasyona bağlı olarak Şekil 4.28'de, verilmiştir. Çalışma sonucu serbest RFX için elde edilen değerler daha önce Algharib ve ark. tarafından yapılan çalışma ile örtüşmektedir [222]. Ayrıca hedeflendiği üzere hem OPT-M hem de OPT-C-M örneğinde RFX'in antioksidan aktivitesinin önemli ölçüde artırıldığı görülmüştür. OPT-M örneğinin antioksidan aktivitesinin OPT-C-M örneğine kıyasla daha yüksek görünmesi örneklere ait salım profillerini destekler niteliktedir. OPT-M örneğinden RFX salımının belirtilen süre aralığında nispeten daha yüksek olması daha yüksek antioksidan aktivite ile sonuçlanmıştır.



Şekil 4.27 DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite analizine ait mikroplaka görüntüsü.



Şekil 4.28 RFX, OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin antioksidan aktivitelerinin zaman ve konsantrasyona bağlı değişimi.

4.3.2 Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Serbest RFX, boş miseller, RFX yüklü miseller (OPT-M) ve CS kaplı RFX yüklü miseller (OPT-C-M) örneklerinin antibakteriyel aktivitesi broth mikrodilüsyon yöntemiyle incelenmiş ve elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve

minimum bakterisid konsantrasyon (MBK) değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir. Hesaplamalar örneklerin içerdiği RFX miktarları üzerinden yapılmıştır.

Çalışmada serbest RFX'in *S. aureus* için MİK değeri 0,125 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada RFX'in *S. aureus* üzerindeki aktivitesini farklı izolatlar üzerinde değerlendirilmiş ve MİK değerlerinin 0,031-0,125 µg/mL aralığında olduğu görülmüştür [242]. Pistiki ve ark. tarfından yapılan başka bir çalışmada ise yine farklı *S. aureus* izolatları üzerinde MİK değerleri ≤0,25 µg/mL olarak hesaplanmıştır [243]. Yani çalışmada elde edilen değerler literatürle örtüşmektedir.

Sonuç olarak OPT-M formülasyonun *S. aureus* üzerinde serbest RFX'e göre yaklaşık 8 kat, OPT-C-M formülasyonun ise yaklaşık 4 kat daha fazla aktivite gösterdiği görülmüştür.

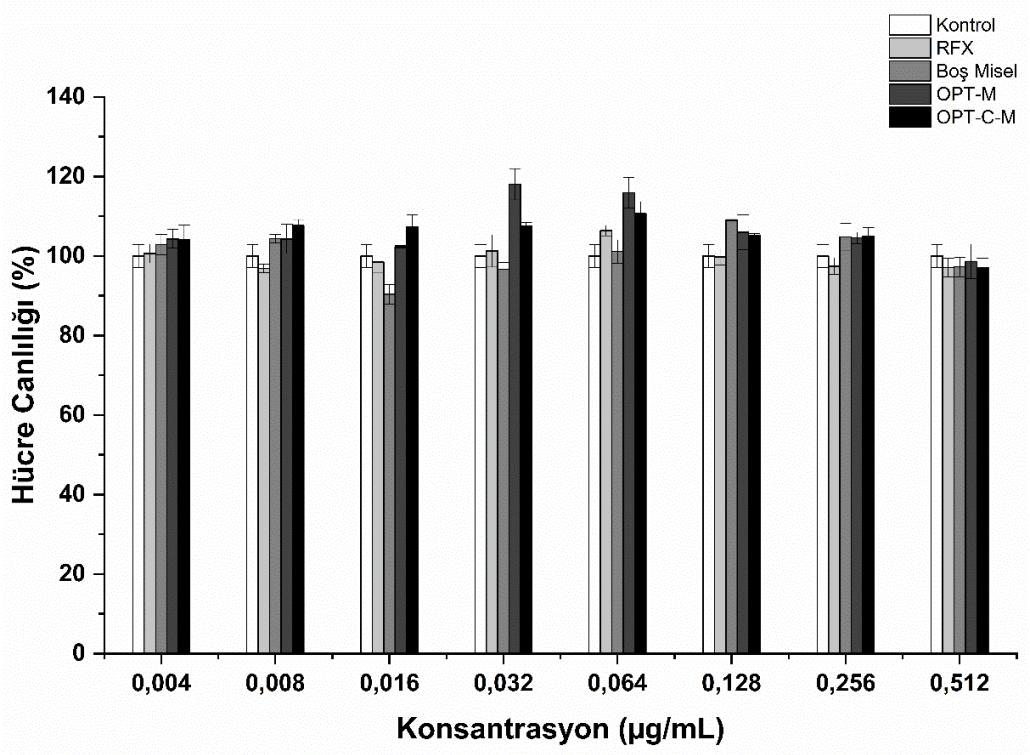
Tablo 4.8 RFX, boş miseller, OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin *S. aureus* üzerinde ait MİK ve MBK değerleri.

	S. aureus	
	MİK (µg/mL)	**MBK (µg/mL)**
RFX	0,125	0,250
Boş misel	> 2	> 2
OPT-M	0,015	0,031
OPT-C-M	0,031	0,062

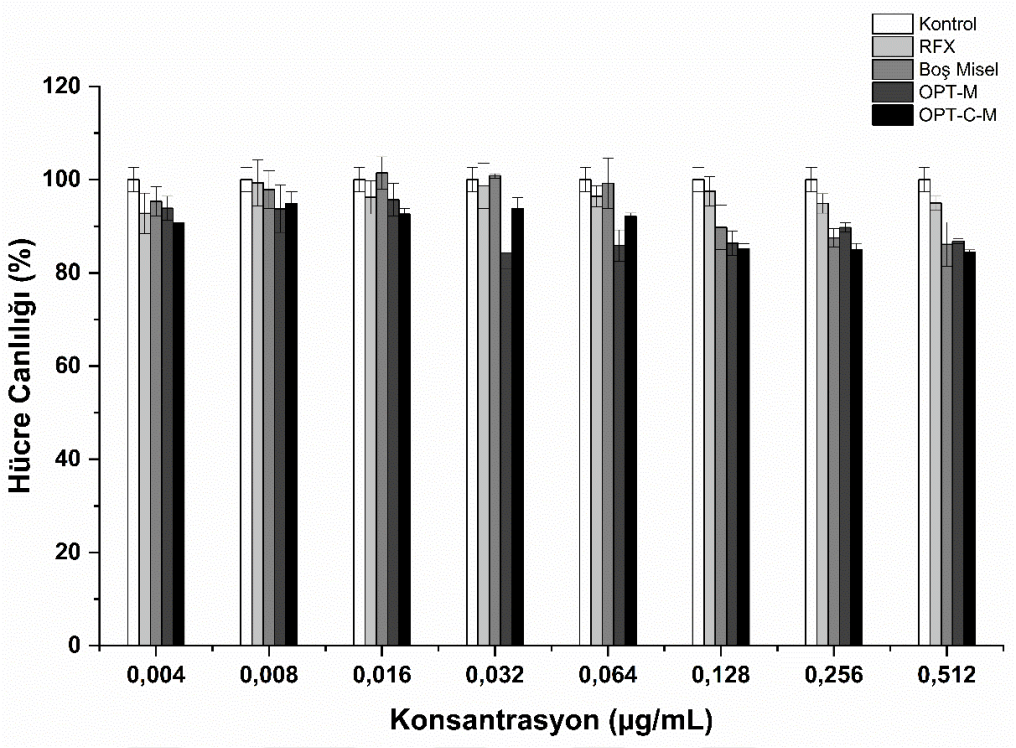
4.3.3 Biyouyumluluk Analizi

MTT analizi hücre canlılığının *in-vitro* tayininde kullanılan, canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri aracılığıyla tespitine dayanan kolorimetrik bir yöntemdir [244]. RFX ve boş misellerle karşılaştırmalı OPT-M ve OPT-C-M'nin L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki hücre canlılığına etkisi MTT analizi ile değerlendirilmiş ve elde edilen hücre canlılığı grafikleri 24 ve 72 saat için sırasıyla Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Her oran için yüzde değerleri kontrol ile karşılaştırılmıştır.

Elde edilen veriler, tüm örneklerin test edilen en yüksek konsantrasyon değerinde (0,512 µg/mL) bile >%80 hücre canlılığı ile L929 hücre hattı üzerinde önemli bir sitotoksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Sonuç olarak OPT-M ve OPT-C-M'lerin antibakteriyel aktivite gösterdiği dozlarda biyouyumlu olduğu gözlenmiştir. Misellerin hücre canlılığı çalışmaları, misellerimizin canlı organizmalarda kullanımına ilişkin bir ön çalışma oluşturma yeteneğine sahiptir.



Şekil 4.29 24 saat için farklı konsantrasyonlarda RFX boş misel OPT-M, OPT-C-M, örnekleri ile muamele edilen L929 hücrelerinin hücre canlılıkları.



Şekil 4.30 72 saat için farklı konsantrasyonlarda RFX boş misel OPT-M, OPT-C-M, örnekleri ile muamele edilen L929 hücrelerinin hücre canlılıkları.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında RFX'in düşük çözünürlüğünün getirdiği düşük biyoyararlanım problemine, **literatürde ilk kez** polimerik misellerin kullanımıyla çözüm getirilmiştir.

Çalışmada ilk olarak mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri, mPEG'in başlatıcı ve $Sn(Oct)_2$'ın katalizör olarak kullanıldığı ε-kaprolakton'un mikrodalga destekli halka açılması polimerizasyonuyla başarıyla sentezlenmiştir. Mikrodalga sentez ünitesinin kullanımı reaksiyon süresini kısaltmış ve sentez sıcaklığına hızlı ve homojen bir şekilde ulaşılarak polimer saf halde elde edilebilmiştir. Sentezin gerçekleştiği FT-IR ve ^{1}H-NMR spektroskopisiyle doğrulanmış, sentezlenen polimerin molekül ağırlığı hem GPC hem de ^{1}H-NMR spektroskopisi ile tayin edilmiştir. Diblok kopolimerin CMC değeri piren probu kullanılarak floresans spektroskopisi ile $1{,}9 \times 10^{-3}$ olarak tayin edilmiştir.

Polimer sentezinin ardından RFX yüklü mPEG-*b*-PCL miseller nanoçöktürme yöntemiyle üretilmiştir. Yöntem kapsamında gereken organik faz olarak hem kopolimer hem de etkin maddeyi çözebilmesi ve sistemden kolayca uzaklaştırılabilmesi sebebiyle aseton tercih edilmiştir. Su fazı olarak ise yalnızca UPW kullanılmıştır. Misel üretiminde kullanılan kopolimer miktarı (5 mg), organik faz hacmi (0,5 mL) ve su fazı hacmi (5mL) sabit tutulup etkin madde üzerinden bir optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Optimum formülasyonun belirlenmesinde ortalama boyut, PDI ve EE değerlerinden faydalanılmıştır. Hedeflendiği üzere tüm miseller ortalama boyutları 100 nm'nin ve PDI değerleri 0,3'ün altında olacak şekilde başarıyla üretilmiştir. Tüm formülasyonlara ait değerler incelendiğinde ortalama boyutunun nispeten daha küçük, PDI değerinin 0'a daha yakın olması ve tüm formülasyonlar içinde en yüksek EE değerine sahip olması sebebiyle 0,5 mg RFX kullanılarak üretilen M3 formülasyonu optimum kabul edilmiş ve OPT-M olarak adlandırılmıştır.

Optimum koşullarda üretilen misellerin biyolojik özelliklerinin ve stabilitesinin artırılması amacıyla miseller CS ile kaplanmıştır. CS kaplama için misel süspansiyonu üzerine 1:1 (v/v) oranda farklı konsantrasyonlarda (%0,25, %0,5 ve %1) CS çözeltileriyle karıştırılarak CS konsantrasyonu, karıştırma işlemi farklı

sürelerde uygulanarak (15, 30, 45 ve 60 dk) sentez süresi optimize edilmiştir. Optimizasyonda ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri baz alınmıştır. Değerlendirmelerin sonucunda %0,5 CS çözeltisi ile 30 dk'da hazırlanan formülasyon optimum kabul edilmiş ve OPT-C-M olarak adlandırılmıştır.

CS kaplamanın misellerin ortalama boyutlarında ve zeta potansiyellerinde artışa sebep olduğu görülmüştür. Kaplama öncesi OPT-M örneğinin zeta potansiyeli -5,6 mV iken kaplama sonrası OPT-C-M örneğinin zeta potansiyeli 28,4 mV ölçülmüştür. Bu 34 mV kadarlık artış olması kaplamanın gerçekleştiğinin bir göstergesidir. Ayrıca zeta potansiyelin +30 mV sınırına yaklaşmış olması kolloidal süspansiyon içerisinde agregasyonun önlenmesi için gereken itme kuvvetinin sağlanabilecek düzeyde olup nispeten stabil örneklerin üretildiğini göstermektedir.

Misellerin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar FT-IR spektroskopisiyle incelenmiştir. Boş mPEG-*b*-PCL miseller, OPT-M ve RFX'in spektrumları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde boş misellere ve OPT-M örneğine ait spektrumların büyük ölçüde örtüştüğü görülmekte ve bu durum RFX'in misellere enkapsüle edilebildiğini göstermektedir. Benzer şekilde CS, OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait spektrumlar karşılaştırmalı olarak incelendiğinde OPT-C-M ve CS'ye ait bantların önemli ölçüde örtüştüğü görülmüştür. Bu durum OPT-M örneğinin CS ile kaplanmasının başarılı olduğunun bir kanıtıdır.

Örneklerin morfolojik analizleri SEM ve TEM ile gerçekleştirilmiştir. OPT-M ve OPT-C-M örneklerine ait mikrograflarda küresel yapıda misellerin üretildiği görülmektedir. TEM mikrografları liyofilize miseller UPW içerisinde disperse edilerek alınmış olup, bu mikrograflardan misellerin sulu ortamda agrege olmadan iyi şekilde disperse olabildikleri görülmüştür.

Misellerden RFX'in salımı *in-vitro* dissolüsyon yöntemiyle analiz edilmiş olup OPT-M örneğinden yüzdesel açıdan daha fazla RFX salımı olduğu görülmüştür. Bu durum beklendiği üzere CS kaplamanın misellerin stabilitesini artırmasından kaynaklanmaktadır.

Misellerin kolloidal stabilitesi 30 gün boyunca belirli günlerde örnek alınıp ortalama boyut ve PDI değerleri ölçülerek takip edilmiştir. 30 günün sonunda OPT-M örneğinin boyutlarında yaklaşık %30'luk bir artış gözlenirken OPT-C-M örneğinin ortalama boyutları yaklaşık %19 artmıştır. Benzer şekilde OPT-M

örneğinin PDI değerinde yaklaşık %136, OPT-C-M örneğinin PDI değerinde ise yaklaşık %79 kadar artış gözlenmiştir. Beklenildiği üzere CS kaplı miseller daha uzun süre boyutlarını korumuş, daha yüksek stabilite göstermişlerdir.

OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin antioksidan aktiviteleri serbest RFX ile karşılaştırmalı olarak, konsantrasyon ve zamana bağlı incelenmiştir. OPT-M ve OPT-C-M örnekleri serbest RFX ile eş konsantrasyonda RFX içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hem OPT-M hem de OPT-C-M örneğinin serbest RFX'e göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Zaman geçtikçe OPT-M örneğinin antioksidan aktivitesinin OPT-C-M'ye göre daha yüksek olarak hesaplanması OPT-M örneğinden daha fazla RFX salımı olmasıyla açıklanmıştır.

Serbest RFX, boş miseller, OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin *S. aureus* üzerinde antibakteriyel aktiviteleri broth mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. RFX, OPT-M ve OPT-C-M örnekleri eş konsantrasyonda RFX, boş miseller ise OPT-M ile eş konsantrasyonda kopolimer içerecek şekilde hazırlanmıştır. MİK ve MBK değerleri RFX miktarı üzerinden hesaplanmıştır. OPT-M formülasyonun *S. aureus* üzerinde serbest RFX'e göre yaklaşık 8 kat, OPT-C-M formülasyonun ise yaklaşık 4 kat daha fazla aktivite gösterdiği görülmüştür.

Üretilen misellerin biyouyumluluğu MTT testi ile L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde analiz edilmiştir. OPT-M ve OPT-C-M örneklerinin biyouyumlulukları boş miseller ve serbest RFX ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Tüm örnekler için 24 ve 72 saat sonunda hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğu görülmüş, biyouyumluluğu yüksek sistemlerin geliştirildiği kanıtlanmıştır.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda, hedeflendiği üzere, RFX'in biyolojik aktivitesi artırılmış, düşük konsantrasyonlarda **yüksek antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösteren, biyouyumlu formülasyonlar** geliştirilmiştir.

Tezden elde edilen sonuçlar; piyasada halihazırda kullanılmakta olan bir etkin maddenin biyoyararlanımını artırılmış olup üretici firmalarla iş birliğine müsait bir alan yaratıldığını, elde edilen misellerin enfeksiyonların tedavisinde bir alternatif oluşturacağı düşünüldüğünden ileri çalışmalarının tez sonrasında devam ettirilip projelendirilerek ve patentlenerek uzun vadede ülke ekonomisine katkı sunma potansiyeli taşıdığını göstermektedir.

İleri çalışmalarda hazırlanan formülasyonların antibakteriyel aktivitesi başta antibiyotik direnci sorunu yaşanan suşlar olmak üzere farklı mikroorganizmalar üzerinde test edilebilir ve CS kaplamanın antibakteriyel aktivite üzerine etkisi detaylı olarak incelebilir.

KAYNAKÇA

[1] E. Scholar, "Rifaximin," in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S. J. Enna and D. B. Bylund Eds. New York: Elsevier, 2009, pp. 1-4.

[2] P. Caraceni *et al.*, "The use of rifaximin in patients with cirrhosis," *Hepatology,* vol. 74, no. 3, pp. 1660-1673, 2021.

[3] K. T. Savjani, A. K. Gajjar, and J. K. Savjani, "Drug solubility: importance and enhancement techniques," *International Scholarly Research Notices*, vol. 2012, 2012.

[4] H. Nazli, B. Mesut, and Y. Özsoy, "Çözünürlüğü düşük olan etken maddeler için farmasötik yaklaşımlar ve aprepitantın çözünürlüğü," *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 46, no. 3, pp. 325-344, 2021.

[5] A. Fahr and X. Liu, "Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs," *Expert opinion on drug delivery,* vol. 4, no. 4, pp. 403-416, 2007.

[6] S. Derman, K. Kızılbey, and Z. M. Akdeste, "Polymeric nanoparticles," *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences,* vol. 31, no. 1, pp. 107-120, 2013.

[7] H. K. Yadav, A. A. Almokdad, I. Sumia, and M. S. Debe, "Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers," in *Nanocarriers for drug delivery*: Elsevier, 2019, pp. 531-556.

[8] M. Ghezzi *et al.*, "Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions," *Journal of Controlled Release,* vol. 332, pp. 312-336, 2021.

[9] W. Xu, P. Ling, and T. Zhang, "Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs," *Journal of drug delivery,* vol. 2013, 2013.

[10] Y. H. Hussein and M. Youssry, "Polymeric micelles of biodegradable diblock copolymers: Enhanced encapsulation of hydrophobic drugs," *Materials,* vol. 11, no. 5, p. 688, 2018.

[11] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, and U. S. Schubert, "Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives," *Angewandte chemie international edition,* vol. 49, no. 36, pp. 6288-6308, 2010.

[12] V. Soni, V. Pandey, S. Asati, V. Gour, and R. K. Tekade, "Chapter 11 - Biodegradable Block Copolymers and Their Applications for Drug Delivery," in *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, R. K. Tekade Ed.: Academic Press, 2019, pp. 401-447.

[13] C. K. Arakawa and C. A. DeForest, "Chapter 19 - Polymer Design and Development," in *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, A. Vishwakarma and J. M. Karp Eds. Boston: Academic Press, 2017, pp. 295-314.

[14] S. C. Owen, D. P. Chan, and M. S. Shoichet, "Polymeric micelle stability," *Nano today,* vol. 7, no. 1, pp. 53-65, 2012.

[15] L. Frank, G. Onzi, A. Morawski, A. Pohlmann, S. Guterres, and R. Contri, "Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 147, p. 104459, 2020.

[16] Y. M. Bar-On, R. Phillips, and R. Milo, "The biomass distribution on Earth," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 115, no. 25, pp. 6506-6511, 2018.

[17] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms*, 14 ed. Pearson, 2014.

[18] P. R. Murray, K. S. Rosenthal, and M. A. Pfaller, *Medical Microbiology*, 8 ed. Elsevier, 2015.

[19] D. L. Nelson and M. M. Cox, "Lehninger Principles of Biochemistry 6th Edition (2013)."

[20] N. Chaffey, "Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn," ed: Oxford University Press, 2003.

[21] J. W. Wilson, M. J. Schurr, C. L. LeBlanc, R. Ramamurthy, K. L. Buchanan, and C. A. Nickerson, "Mechanisms of bacterial pathogenicity," *Postgraduate medical journal*, vol. 78, no. 918, pp. 216-224, 2002.

[22] Y. Li *et al.*, X. Zhou and Y. Li, Eds. *Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease*, 2 ed. Springer, 2020.

[23] G. J. Tortora, B. R. Funke, and C. L. Case, *Microbiology: An Introduction*, 11 ed. Pearson, 2013.

[24] E. A. Abbondanzieri and A. S. Meyer, "More than just a phase: the search for membraneless organelles in the bacterial cytoplasm," *Current genetics*, vol. 65, no. 3, pp. 691-694, 2019.

[25] S. Murínová and K. Dercová, "Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane," *International journal of microbiology*, vol. 2014, 2014.

[26] T. Dörr, P. J. Moynihan, and C. Mayer, "Bacterial cell wall structure and dynamics," vol. 10, ed: Frontiers Media SA, 2019, p. 2051.

[27] P.-J. Matteï, D. Neves, and A. Dessen, "Bridging cell wall biosynthesis and bacterial morphogenesis," *Current opinion in structural biology*, vol. 20, no. 6, pp. 749-755, 2010.

[28] R. Nazir, S. Rehman, M. Nisa, and U. ali Baba, "Exploring bacterial diversity: from cell to sequence," in *Freshwater Microbiology*: Elsevier, 2019, pp. 263-306.

[29] R. K. Robinson, *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press, 2014.

[30] B. Dhakal, J. Bower, M. Mulvey, and X. Yang, "Pili, Fimbriae," 2019.

[31] R. Lowry, S. Balboa, J. L. Parker, and J. G. Shaw, "Aeromonas flagella and colonisation mechanisms," *Advances in microbial physiology*, vol. 65, pp. 203-256, 2014.

[32] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, "The bacterial cell envelope," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 2, no. 5, p. a000414, 2010.

[33] C. R. Raetz and C. Whitfield, "Lipopolysaccharide endotoxins," *Annual review of biochemistry,* vol. 71, no. 1, pp. 635-700, 2002.

[34] H. F. Wertheim *et al.*, "The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections," *The Lancet infectious diseases,* vol. 5, no. 12, pp. 751-762, 2005.

[35] D. A. Heesterbeek, M. L. Angelier, R. A. Harrison, and S. H. Rooijakkers, "Complement and bacterial infections: from molecular mechanisms to therapeutic applications," *Journal of Innate Immunity,* vol. 10, no. 5-6, pp. 455-464, 2018.

[36] D. Mara and N. J. Horan, *Handbook of water and wastewater microbiology*. Elsevier, 2003.

[37] S. Baron, "Medical microbiology," 1996.

[38] K. I. Mohr, "History of Antibiotics Research," (in eng), *Curr Top Microbiol Immunol,* vol. 398, pp. 237-272, 2016, doi: 10.1007/82_2016_499.

[39] K. Gould, "Antibiotics: from prehistory to the present day," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* vol. 71, no. 3, pp. 572-575, 2016.

[40] R. I. Aminov, "A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future," *Frontiers in microbiology,* vol. 1, p. 134, 2010.

[41] G. A. Durand, D. Raoult, and G. Dubourg, "Antibiotic discovery: history, methods and perspectives," *International journal of antimicrobial agents,* vol. 53, no. 4, pp. 371-382, 2019.

[42] E. J. Bassett, M. S. Keith, G. J. Armelagos, D. L. Martin, and A. R. Villanueva, "Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350)," *Science,* vol. 209, no. 4464, pp. 1532-1534, 1980.

[43] M. Topal, G. U. Şenel, E. I. A. Topal, and Ö. Erdal, "Antibiyotikler ve kullanım alanları," *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi,* vol. 31, no. 3, pp. 121-127, 2015.

[44] A. Fleming, "On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae," *British journal of experimental pathology,* vol. 10, no. 3, p. 226, 1929.

[45] R. Gaynes, "The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use," *Emerging infectious diseases,* vol. 23, no. 5, p. 849, 2017.

[46] M. A. Hassan, Y. Kamal, M. R. S. Ramlan Aziza, and A. Hesham, "Antibiotics as microbial secondary metabolites: Production and application," *J Sci Eng 2012; 59 (1): 101,* vol. 111, 2012.

[47] J. Clardy, M. A. Fischbach, and C. R. Currie, "The natural history of antibiotics," *Current biology,* vol. 19, no. 11, pp. R437-R441, 2009.

[48] S. A. Waksman, "What is an antibiotic or an antibiotic substance?," *Mycologia,* vol. 39, no. 5, pp. 565-569, 1947.

[49] R. Bentley and J. Bennett, "What is an antibiotic? Revisited," *Advances in applied microbiology,* vol. 52, pp. 303-332, 2003.

[50] S. Bernatová *et al.*, "Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using Raman spectroscopy," *Molecules,* vol. 18, no. 11, pp. 13188-13199, 2013.

[51] W. Keenleyside, "Microbiology: canadian edition," *Open Library PressBooks. Available online: https://ecampusontario. pressbooks. pub/microbio/front-matter/preface/(accessed on 20 August 2020),* 2019.

[52] P. Sarkar, V. Yarlagadda, C. Ghosh, and J. Haldar, "A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics," *Medchemcomm,* vol. 8, no. 3, pp. 516-533, 2017.

[53] Z. Gülay, "Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller," *Ankem Derg,* vol. 17, no. 3, pp. 192-204, 2003.

[54] R. Hubbard and S. Fidanze, "Therapeutic areas II: cancer, infectious diseases, inflammation and immunology and dermatology," *Comprehensive Medicinal Chemistry II,* 2007.

[55] S. M. Reed, W. M. Bayly, and D. C. Sellon, *Equine Internal Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2017.

[56] J. E. Sykes and M. G. Papich, "Antiviral and immunomodulatory drugs," *Canine and feline infectious diseases,* p. 54, 2014.

[57] M. Absollhi, *Encyclopedia of toxicology*. Elsevier, 2014.

[58] C. L. Marek and S. R. Timmons, "Antimicrobials in pediatric dentistry," in *Pediatric Dentistry*: Elsevier, 2019, pp. 128-141. e1.

[59] M. Al Sorkhy and R. Ghemrawi, "Legacy and Innovative Treatment: Projected Modalities for Antimicrobial Intervention," in *Microbiomics*: Elsevier, 2020, pp. 279-298.

[60] İ. Yıldız, M. A. Varkal, and E. Ünüvar, "Günümüzde sefalosporinler ve antibiyotik direnci," *Çocuk Dergisi,* vol. 14, no. 1, pp. 22-27, 2014.

[61] T. Bui and C. V. Preuss, "Cephalosporins," in *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

[62] I. W. Fong, *New Antimicrobials: For the Present and the Future,* 1 ed. Springer Cham, 2023.

[63] B. R. Masters, "Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, (2015) Eds: John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. ISBN: 13-978-1-4557-4801-3, Elsevier Saunders," ed: Springer, 2016.

[64] J. B. Sauberan, M. N. Neely, and J. S. Bradley, "292 - Antibacterial Agents," in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Sixth Edition)*, S. S. Long Ed. Philadelphia: Elsevier, 2023, pp. 1537-1563.e4.

[65] T. Kuriyama, T. Karasawa, and D. W. Williams, "Antimicrobial chemotherapy: Significance to healthcare," in *Biofilms in Infection Prevention and Control*: Elsevier, 2014, pp. 209-244.

[66] T. Midtvedt, "Penicillins, cephalosporins, other beta-lactam antibiotics, and tetracyclines," in *Side Effects of Drugs Annual*, vol. 33: Elsevier, 2011, pp. 491-508.

[67] J. Cohen, W. G. Powderly, and S. M. Opal, *Infectious Diseases E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2016.

[68] R. Nagarajan, *Glycopeptide antibiotics*. CRC Press, 1994.

[69] H.-K. Kang and Y. Park, "Glycopeptide antibiotics: Structure and mechanisms of action," *Journal of Bacteriology and Virology*, vol. 45, no. 2, pp. 67-78, 2015.

[70] J. Yee, "xPharm: The comprehensive pharmacology reference," *xPharm: The comprehensive pharmacology reference. Editor BYLUND SJEADB, editor. Elsevier*, 2008.

[71] S. Biondi, E. Chugunova, and M. Panunzio, "Chapter 8 - From Natural Products to Drugs: Glyco- and Lipoglycopeptides, a New Generation of Potent Cell Wall Biosynthesis Inhibitors," in *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 50, R. Atta ur Ed.: Elsevier, 2016, pp. 249-297.

[72] J. Sun, S. T. Rutherford, T. J. Silhavy, and K. C. Huang, "Physical properties of the bacterial outer membrane," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 20, no. 4, pp. 236-248, 2022.

[73] H. Strahl and J. Errington, "Bacterial membranes: structure, domains, and function," *Annual review of microbiology*, vol. 71, pp. 519-538, 2017.

[74] S. S. Mohapatra, S. K. Dwibedy, and I. Padhy, "Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions," *Journal of Biosciences*, vol. 46, no. 3, p. 85, 2021.

[75] M. Fischer, S. S. Long, and C. G. Prober, *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2017.

[76] D. Gür, "Protein Sentezini Etkileyen Antibakteriyeller," *ANKEM Dergi*, 2003.

[77] S. Arenz and D. N. Wilson, "Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition," *cold spring harbor perspectives in medicine*, vol. 6, no. 9, 2016.

[78] I. Arslan, "Trends in antimicrobial resistance in healthcare-associated infections: A global concern," 2022.

[79] L. Katz and A. Mankin, "Macrolides," 2009.

[80] K. Aydın, "Makrolidler ve Linkozamidler," *ANKEM Dergi*, vol. 21, pp. 57-61, 2007.

[81] G. G. Zhanel *et al.*, "The ketolides: a critical review," *Drugs*, vol. 62, pp. 1771-1804, 2002.

[82] J. K. Aronson, *Meyler's Side Effects of Drugs 15E: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. Newnes, 2014.

[83] F. Van Bambeke, "Renaissance of antibiotics against difficult infections: focus on oritavancin and new ketolides and quinolones," *Annals of medicine*, vol. 46, no. 7, pp. 512-529, 2014.

[84] M. Morar, K. Bhullar, D. W. Hughes, M. Junop, and G. D. Wright, "Structure and mechanism of the lincosamide antibiotic adenylyltransferase LinB," *Structure*, vol. 17, no. 12, pp. 1649-1659, 2009.

[85] S. Schwarz *et al.*, "Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: mode of action and mechanisms of resistance," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 6, no. 11, 2016.

[86] L. E. López-Jacome *et al.*, "Anti-Bacterial Agents," 2022.

[87] E. Scholar, "Aminoglycosides," in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, S. J. Enna and D. B. Bylund Eds. New York: Elsevier, 2007, pp. 1-4.

[88] K. M. Krause, A. W. Serio, T. R. Kane, and L. E. Connolly, "Aminoglycosides: an overview," *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, vol. 6, no. 6, 2016.

[89] G. Aynali, "Aminoglikozit ototoksisitesini önleme," *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, vol. 16, no. 2, pp. 39-44, 2009.

[90] P. Kumar, "Pharmacology of specific drug groups," *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry, 7th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands*, pp. 457-487, 2017.

[91] A. A. Palmer and B. W. Skinner, "Aminoglycosides," 2022.

[92] G. O. Rankin and M. A. Valentovic, "Kidney," in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, P. Wexler Ed. Oxford: Academic Press, 2014, pp. 20-39.

[93] M. M. Konai, S. Barman, Y. Acharya, K. De, and J. Haldar, "Recent development of antibacterial agents to combat drug-resistant Gram-positive bacteria," in *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*: Elsevier, 2020, pp. 71-104.

[94] I. Chopra and M. Roberts, "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance," *Microbiology and molecular biology reviews*, vol. 65, no. 2, pp. 232-260, 2001.

[95] G. R. Yılmaz, "Tetrasiklinden Tigesikline," *ANKEM Dergi*, vol. 27, 3, pp. 118-123, 2013.

[96] R. Cánovas, N. Sleegers, A. L. van Nuijs, and K. De Wael, "Tetracycline antibiotics: Elucidating the electrochemical fingerprint and oxidation pathway," *Chemosensors*, vol. 9, no. 7, p. 187, 2021.

[97] M. Lucock, "Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes," *Molecular genetics and metabolism*, vol. 71, no. 1-2, pp. 121-138, 2000.

[98] P. Constable, K. Hinchcliff, S. Done, and W. Grünberg, "Practical antimicrobial therapeutics," *Vet. Med*, vol. 1, pp. 153-174, 2017.

[99] S. Padberg, "Anti-infective agents," in *Drugs during pregnancy and lactation*: Elsevier, 2015, pp. 115-176.

[100] C. Desai, "Meyler's side effects of drugs: The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions," *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 48, no. 2, p. 224, 2016.

[101] T. Singh, S. A. Dar, S. Das, and S. Haque, "Importance of efflux pumps in subjugating antibiotic resistance," in *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria*: Elsevier, 2020, pp. 273-299.

[102] G. P. Bettinetti, F. Giordano, A. La Manna, and G. Giuseppetti, "Trimethoprim crystal forms," (in eng), *J Pharm Pharmacol*, vol. 28, no. 1, pp. 87-8, Jan 1976, doi: 10.1111/j.2042-7158.1976.tb04037.x.

[103] M. Kester, K. D. Karpa, and K. E. Vrana, "4 - Treatment of Infectious Diseases," in *Elsevier's Integrated Review Pharmacology (Second Edition) (Second Edition)*, M. Kester, K. D. Karpa, and K. E. Vrana Eds. Philadelphia: W.B. Saunders, 2012, pp. 41-78.

[104] M. K. Bhattacharjee, *Chemistry of antibiotics and related drugs*. Springer, 2016.

[105] D. Temiakov *et al.*, "Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin," *Molecular cell*, vol. 19, no. 5, pp. 655-666, 2005.

[106] S. Borukhov, "RNA polymerase structure, bacterial," in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*: Elsevier Inc., 2013, pp. 173-184.

[107] L. A. Allison, *Fundamental molecular biology*. John Wiley & Sons, 2021.

[108] A. C. Gentry and N. Osheroff, "DNA Topoisomerases: Type II," in *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, W. J. Lennarz and M. D. Lane Eds. Waltham: Academic Press, 2013, pp. 163-168.

[109] T. D. Pham, Z. M. Ziora, and M. A. Blaskovich, "Quinolone antibiotics," *Medchemcomm*, vol. 10, no. 10, pp. 1719-1739, 2019.

[110] S. Ulusoy, "1986'dan 2010'a Kinolonlar," *ANKEM Dergi*, vol. 24, pp. 96-100, 2010.

[111] J. J. Wu, *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2012.

[112] S. Alihodžić *et al.*, "Current trends in macrocyclic drug discovery and beyond-Ro5," *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 57, pp. 113-233, 2018.

[113] P. Sensi, "History of the development of rifampin," *Reviews of infectious diseases*, vol. 5, no. Supplement_3, pp. S402-S406, 1983.

[114] R. A. Adams *et al.*, "Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure," *The Journal of antibiotics*, vol. 74, no. 11, pp. 786-798, 2021.

[115] W. Lester, "Rifampin: a semisynthetic derivative of Rifamycin-A prototype for the future," *Annual Reviews in Microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 85-102, 1972.

[116] R. G. Finch, D. Greenwood, R. J. Whitley, and S. R. Norrby, *Antibiotic and chemotherapy e-book*. Elsevier Health Sciences, 2010.

[117] A. Ficai and A. M. Grumezescu, *Nanostructures for antimicrobial therapy*. Elsevier, 2017.

[118] J. B. Taylor and D. J. Triggle, "Comprehensive medicinal chemistry II," *(No Title)*, 2007.

[119] P. Kesharwani, S. Chopra, and A. Dasgupta, *Drug discovery targeting drug-resistant bacteria*. Academic Press, 2020.

[120] X. Zhao, L. Zhu, X. Wu, W. Wei, and J. Zhao, "2.14 - Bio-inspired catalysis," in *Comprehensive Inorganic Chemistry III (Third Edition)*, J. Reedijk and K. R. Poeppelmeier Eds. Oxford: Elsevier, 2023, pp. 373-406.

[121] J. Ruiz *et al.*, "In vitro antimicrobial activity of rifaximin against enteropathogens causing traveler's diarrhea," *Diagnostic microbiology and infectious disease*, vol. 59, no. 4, pp. 473-475, 2007.

[122] A. Marchese, A. Salerno, A. Pesce, E. A. Debbia, and G. C. Schito, "In vitro activity of rifaximin, metronidazole and vancomycin against Clostridium difficile and the rate of selection of spontaneously resistant mutants against representative anaerobic and aerobic bacteria, including ammonia-producing species," *Chemotherapy*, vol. 46, no. 4, pp. 253-266, 2000.

[123] H. L. DuPont, "Biologic properties and clinical uses of rifaximin," *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 12, no. 2, pp. 293-302, 2011.

[124] T. Hori, Y. B. Owusu, and D. Sun, "US FDA-Approved Antibiotics During the 21st Century," in *Encyclopedia of Infection and Immunity*, N. Rezaei Ed. Oxford: Elsevier, 2022, pp. 556-585.

[125] F. R. Ponziani, M. A. Zocco, F. D'Aversa, M. Pompili, and A. Gasbarrini, "Eubiotic properties of rifaximin: Disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation," *World journal of gastroenterology*, vol. 23, no. 25, p. 4491, 2017.

[126] K.-U. Petersen, "rifaximin und Polyethylene Glycol as treatment Modalities in Hepatic Encephalopathy," 2011.

[127] N. Çabuk Çelik, "Fruktozla oluşturulan nonalkolik yağlı karaciğer modelinde rifaksiminin önleyici rolü," 2014.

[128] H. S. Pentikis, M. Connolly, C. B. Trapnell, W. P. Forbes, and D. K. Bettenhausen, "The effect of multiple-dose, oral rifaximin on the pharmacokinetics of intravenous and oral midazolam in healthy volunteers," *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 27, no. 10, pp. 1361-1369, 2007.

[129] S. Kumar, N. Dilbaghi, R. Saharan, and G. Bhanjana, "Nanotechnology as emerging tool for enhancing solubility of poorly water-soluble drugs," *Bionanoscience*, vol. 2, pp. 227-250, 2012.

[130] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, and S. Onoue, "Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications," *International journal of pharmaceutics*, vol. 420, no. 1, pp. 1-10, 2011.

[131] J. Singh, M. Walia, and S. Harikumar, "Solubility enhancement by solid dispersion method: a review," *Journal of drug delivery and Therapeutics*, vol. 3, no. 5, pp. 148-155, 2013.

[132] M. V. Varma *et al.*, "pH-Dependent solubility and permeability criteria for provisional biopharmaceutics classification (BCS and BDDCS) in early

drug discovery," *Molecular pharmaceutics*, vol. 9, no. 5, pp. 1199-1212, 2012.

[133] D. Sarısaltık and T. ZŞ, "Biyoeşdeğerlik Çalışmalarından Vazgeçilmesinde Biyofarmasötik İlaç Sınıflandırma Sistemlerinin Değerlendirilmesi: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) ve Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi (BDDCS)," *Türkiye Klinikleri J Pharm Sci,* vol. 1, no. 1, pp. 16-30, 2012.

[134] A. Babu, A. K. Templeton, A. Munshi, and R. Ramesh, "Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer," *Aaps Pharmscitech,* vol. 15, pp. 709-721, 2014.

[135] J. Zaman, "Addressing solubility through nano based drug delivery systems," *J Nanomed Nanotechnol,* vol. 7, no. 376, p. 2, 2016.

[136] A. K. Adya and E. Canetta, "Nanotechnology and its applications to animal biotechnology," in *Animal Biotechnology*: Elsevier, 2020, pp. 309-326.

[137] I. Capek, "Science and nanotechnology-Fundamental principles and colloidal particles," *Nanocomposite structures and dispersions,* vol. 23, pp. 1-301, 2006.

[138] S. E. Hunyadi Murph, K. J. Coopersmith, and G. K. Larsen, "Nanoscale Materials: Fundamentals and Emergent Properties," *Anisotropic and Shape-Selective Nanomaterials: Structure-Property Relationships,* pp. 7-28, 2017.

[139] O. V. Salata, "Applications of nanoparticles in biology and medicine," *Journal of nanobiotechnology,* vol. 2, no. 1, pp. 1-6, 2004.

[140] H. Chen, C. Khemtong, X. Yang, X. Chang, and J. Gao, "Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs," *Drug discovery today,* vol. 16, no. 7-8, pp. 354-360, 2011.

[141] R. Kumar, "Nanotechnology based approaches to enhance aqueous solubility and bioavailability of griseofulvin: a literature survey," *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* vol. 53, p. 101221, 2019.

[142] B. Bhushan, *Springer handbook of nanotechnology*. Springer, 2017.

[143] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian journal of chemistry,* vol. 12, no. 7, pp. 908-931, 2019.

[144] L. Peltonen, M. Singhal, and J. Hirvonen, "Principles of nanosized drug delivery systems," in *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*: Elsevier, 2020, pp. 3-25.

[145] G. Suffredini, J. East, and L. M. Levy, "New applications of nanotechnology for neuroimaging," *American Journal of Neuroradiology,* vol. 35, no. 7, pp. 1246-1253, 2014.

[146] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, and R. Langer, "Engineering precision nanoparticles for drug delivery," *Nature reviews drug discovery,* vol. 20, no. 2, pp. 101-124, 2021.

[147] I. R. Khalil *et al.,* "Bacterial-derived polymer poly-γ-glutamic acid (γ-PGA)-based micro/nanoparticles as a delivery system for antimicrobials and other biomedical applications," *International journal of molecular sciences,* vol. 18, no. 2, p. 313, 2017.

[148] M. Elmowafy *et al.*, "Polymeric Nanoparticles for Delivery of Natural Bioactive Agents: Recent Advances and Challenges," *Polymers*, vol. 15, no. 5, p. 1123, 2023.

[149] C. Misra, R. K. Paul, N. Thotakura, and K. Raza, "Biodegradable self-assembled nanocarriers as the drug delivery vehicles," in *Nanoparticle Therapeutics*: Elsevier, 2022, pp. 293-325.

[150] M. S. Attia, M. Abdel-Mottaleb, and E. H. Mohamed, "Smart nanovesicles for drug delivery," in *Systems of Nanovesicular Drug Delivery*: Elsevier, 2022, pp. 367-385.

[151] H. Zhu, C. Yang, and K. Ma, "Nanovesicles for transdermal drug delivery," *Applications of Nanovesicular Drug Delivery*, pp. 103-114, 2022.

[152] B. Singh, S. Saini, S. Lohan, and S. Beg, "Systematic development of nanocarriers employing quality by design paradigms," in *Nanotechnology-based approaches for targeting and delivery of drugs and genes*: Elsevier, 2017, pp. 110-148.

[153] M. Bulut and E. Akar, "Dendrimerlerin önemi ve kullanım alanları," *Teknik Bilimler Dergisi*, vol. 2, no. 1, pp. 5-11, 2012.

[154] S. Nimesh, *Gene therapy: Potential applications of nanotechnology*. Elsevier, 2013.

[155] R. Y. Sathe and P. V. Bharatam, "Drug-dendrimer complexes and conjugates: Detailed furtherance through theory and experiments," *Advances in colloid and interface science*, vol. 303, p. 102639, 2022.

[156] A. Tiwari and S. Rohiwal, "Synthesis and bioconjugation of hybrid nanostructures for biomedical applications," in *Hybrid nanostructures for cancer theranostics*: Elsevier, 2019, pp. 17-41.

[157] R. Narayan, *Nanobiomaterials: nanostructured materials for biomedical applications*. Woodhead Publishing, 2017.

[158] V. Rana and R. Sharma, "Recent advances in development of nano drug delivery," *Applications of targeted nano drugs and delivery systems*, pp. 93-131, 2019.

[159] Z. Sezgin, "İlaç taşıyıcı sistemler olarak polimerik misellerin hazırlanması ve karakterizasyonu," 2003.

[160] Ö. Sayıner and T. Çomoğlu, "Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme," 2016.

[161] C. F. van Nostrum, T. Lammers, and W. E. Hennink, "Questionable micelle formation of the double hydrophilic block copolymer PEG-pHPMA," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 626, pp. 1-3, 2022.

[162] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly-є-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *Journal of Controlled Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15-33, 2012.

[163] H. R. Badwaik, L. Kumari, K. Nakhate, V. S. Verma, and K. Sakure, "Phytoconstituent plumbagin: Chemical, biotechnological and pharmaceutical aspects," *Studies in natural products chemistry*, vol. 63, pp. 415-460, 2019.

[164] M. Gou *et al.*, "Self-assembled hydrophobic honokiol loaded MPEG-PCL diblock copolymer micelles," *Pharmaceutical research*, vol. 26, pp. 2164-2173, 2009.

[165] H. K. Manjili, P. Ghasemi, H. Malvandi, M. S. Mousavi, E. Attari, and H. Danafar, "Pharmacokinetics and in vivo delivery of curcumin by copolymeric mPEG-PCL micelles," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 116, pp. 17-30, 2017.

[166] S. Islam, M. A. R. Bhuiyan, and M. N. Islam, "Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering," *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 25, no. 3, pp. 854-866, 2017/09/01 2017, doi: 10.1007/s10924-016-0865-5.

[167] A. Bernkop-Schnürch and S. Dünnhaupt, "Chitosan-based drug delivery systems," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 81, no. 3, pp. 463-469, 2012.

[168] C. Ardean *et al.*, "Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 14, p. 7449, 2021.

[169] A. Parra, I. Jarak, A. Santos, F. Veiga, and A. Figueiras, "Polymeric micelles: A promising pathway for dermal drug delivery," *Materials*, vol. 14, no. 23, p. 7278, 2021.

[170] B. S. Makhmalzade and F. Chavoshy, "Polymeric micelles as cutaneous drug delivery system in normal skin and dermatological disorders," *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, vol. 9, no. 1, p. 2, 2018.

[171] K. Krishnamoorthy and M. Mahalingam, "Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: multi-criteria decision making approach," *Advanced pharmaceutical bulletin*, vol. 5, no. 1, p. 57, 2015.

[172] Y. H. Feng, X. P. Zhang, J. Y. Li, and X. D. Guo, "How is a micelle formed from amphiphilic polymers in a dialysis process: Insight from mesoscopic studies," *Chemical Physics Letters*, vol. 754, p. 137711, 2020.

[173] A. Kapse, N. Anup, V. Patel, G. K. Saraogi, D. K. Mishra, and R. K. Tekade, "Polymeric micelles: a ray of hope among new drug delivery systems," in *Drug Delivery Systems*: Elsevier, 2020, pp. 235-289.

[174] X. Ai, L. Zhong, H. Niu, and Z. He, "Thin-film hydration preparation method and stability test of DOX-loaded disulfide-linked polyethylene glycol 5000-lysine-di-tocopherol succinate nanomicelles," *asian journal of pharmaceutical sciences*, vol. 9, no. 5, pp. 244-250, 2014.

[175] R. H. Vinchurkar and A. B. Kuchekar, "Polymeric micelles: a novel approach towards nano-drug delivery system," *Biosciences Biotechnology Research Asia*, vol. 18, no. 4, pp. 629-649, 2021.

[176] O. I. Martínez-Muñoz and C. E. Mora-Huertas, "Nanoprecipitation technology to prepare carrier systems of interest in pharmaceutics: An overview of patenting," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 614, p. 121440, 2022.

[177] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement," *International journal of pharmaceutics,* vol. 55, no. 1, pp. R1-R4, 1989.

[178] N. Lammari, O. Louaer, A. H. Meniai, and A. Elaissari, "Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects," *Pharmaceutics,* vol. 12, no. 5, p. 431, 2020.

[179] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, "Polymer-based nanocapsules for drug delivery," *International journal of pharmaceutics,* vol. 385, no. 1-2, pp. 113-142, 2010.

[180] C. J. M. Rivas *et al.,* "Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery," *International journal of pharmaceutics,* vol. 532, no. 1, pp. 66-81, 2017.

[181] A. Bukhari, A. Idris, and M. Atta, "Effect of organic and aqueous dispersion medium on the development of polystyrene nanoparticles in nanoprecipitation method," *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences,* vol. 10, no. 1, 2014.

[182] Y. Ozaki, "Infrared spectroscopy—Mid-infrared, near-infrared, and far-infrared/terahertz spectroscopy," *Analytical Sciences,* vol. 37, no. 9, pp. 1193-1212, 2021.

[183] I. Pupeza *et al.,* "Field-resolved spectroscopy in the molecular fingerprint region," in *The European Conference on Lasers and Electro-Optics*, 2017: Optica Publishing Group, p. CH_2_4.

[184] C. Berthomieu and R. Hienerwadel, "Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy," *Photosynthesis research,* vol. 101, pp. 157-70, 07/01 2009, doi: 10.1007/s11120-009-9439-x.

[185] Q. Wu, D. Kong, W. Peng, R. Zong, X. Yu, and S. Feng, "Deciphering the Biochemical Similarities and Differences Among Human Neuroglial Cells and Glioma Cells Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy," *World Neurosurgery,* vol. 168, pp. e562-e569, 2022.

[186] S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, and R. Kumar, *Spectroscopic methods for nanomaterials characterization*. Elsevier, 2017.

[187] T. S. Kumar, "Physical and chemical characterization of biomaterials," in *Characterization of Biomaterials*: Elsevier, 2013, pp. 11-47.

[188] N. Pérez-Lemus, R. López-Serna, S. I. Pérez-Elvira, and E. Barrado, "Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review," (in eng), *Anal Chim Acta,* vol. 1083, pp. 19-40, Nov 20 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.06.044.

[189] K. J. Rodriguez, M. M. Pellizzoni, M. Divandari, E. M. Benetti, and N. Bruns, "Biocatalytic ATRP in solution and on surfaces," in *Methods in enzymology,* vol. 627: Elsevier, 2019, pp. 263-290.

[190] M. Malkoch, E. Malmström Jonsson, and A. Nyström, "Dendrimers: properties and applications," 2012.

[191] J. Owen, "Comprehensive polymer science and supplements," ed: Elsevier Amsterdam, 1989.

[192] R. Scott, "Encyclopedia of analytical science," *Reference Reviews, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands*, vol. 19, pp. 554-561, 2005.

[193] F. Chen *et al.*, "Quantitative density operator analysis of correlation spectroscopy NMR experiments," *Chemical Papers*, vol. 74, pp. 3641-3649, 2020.

[194] M. K. Singh and A. Singh, "Chapter 14 - Nuclear magnetic resonance spectroscopy," in *Characterization of Polymers and Fibres*, M. K. Singh and A. Singh Eds.: Woodhead Publishing, 2022, pp. 321-339.

[195] S. Szymański, P. Bernatowicz, S. Szymański, and P. Bernatowicz, "Principles of NMR Spectroscopy," *Classical and Quantum Molecular Dynamics in NMR Spectra*, pp. 7-83, 2018.

[196] N. M. Stark, D. J. Yelle, and U. P. Agarwal, "Techniques for characterizing lignin," *Lignin in polymer composites*, pp. 49-66, 2016.

[197] S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. Kumar, and S. Thomas, *Characterization and biology of nanomaterials for drug delivery: nanoscience and nanotechnology in drug delivery*. Elsevier, 2018.

[198] Z. Limpouchová and K. Procházka, "Theoretical Principles of Fluorescence Spectroscopy," in *Fluorescence Studies of Polymer Containing Systems*, K. Procházka Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 91-149.

[199] A. J. Gomes, C. N. Lunardi, F. S. Rocha, and G. S. Patience, "Experimental methods in chemical engineering: Fluorescence emission spectroscopy," *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 97, no. 8, pp. 2168-2175, 2019.

[200] T. Schweizer, H. Kubach, and T. Koch, "Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems," *Automotive and Engine Technology*, vol. 6, pp. 275-287, 2021.

[201] F. S. Rocha, A. J. Gomes, C. N. Lunardi, S. Kaliaguine, and G. S. Patience, "Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis," *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 96, no. 12, pp. 2512-2517, 2018.

[202] H. Wang and P. K. Chu, *Characterization of Biomaterials: Chapter 4. Surface Characterization of Biomaterials*. Elsevier Inc. Chapters, 2013.

[203] "The Beer-Lambert Law." Edinburgh Instruments Ltd. https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/ (accessed 2023).

[204] N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S. R. Youngren-Ortiz, M. B. Chougule, and R. K. Tekade, "Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development," in *Basic fundamentals of drug delivery*: Elsevier, 2019, pp. 369-400.

[205] M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil-Watson, and U. Nobbmann, "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering," *Journal of nanoparticle research*, vol. 10, pp. 823-829, 2008.

[206] A. J. Shnoudeh *et al.*, "Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles," in *Biomaterials and bionanotechnology*: Elsevier, 2019, pp. 527-612.

[207] S.-J. Park and M.-K. Seo, "Intermolecular force," *Interface science and technology,* vol. 18, pp. 1-57, 2011.

[208] A. Mehmet, "Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri," *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* vol. 11, no. 1, pp. 63-69, 2018.

[209] G. Huang *et al.*, "Symmetric electrophoretic light scattering for determination of the zeta potential of colloidal systems," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* vol. 587, p. 124339, 2020.

[210] B. Büken, H. B. Üner, Ü. Çetinkaya, A. S. Çağdır, and Ş. B. Kırangil, "Adli Tıpta Taramalı Elektron Mikroskobu Uygulamaları," *Adli Tıp Bülteni,* vol. 6, no. 1, pp. 23-31, 2001.

[211] L. Tayebi and K. Moharamzadeh, *Biomaterials for oral and dental tissue engineering*. Woodhead Publishing, 2017.

[212] W. Zhou and Z. L. Wang, *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. Springer science & business media, 2007.

[213] J. Zhao and X. Liu, "Electron microscopic methods (TEM, SEM and energy dispersal spectroscopy)," 2022.

[214] D. İlknur, "Farklı Biyolojik Örnekler Geçirimli Elektron Mikroskop için Nasıl Hazırlanır?," *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi,* vol. 11, no. 1, pp. 27-32, 2018.

[215] M. Nasrollahzadeh, M. Atarod, M. Sajjadi, S. M. Sajadi, and Z. Issaabadi, "Plant-mediated green synthesis of nanostructures: mechanisms, characterization, and applications," in *Interface science and technology*, vol. 28: Elsevier, 2019, pp. 199-322.

[216] D. Dorfs, R. Krahne, A. Falqui, L. Manna, C. Giannini, and D. Zanchet, "Quantum dots: synthesis and characterization," in *Comprehensive Nanoscience and Technology. 1: Nanomaterials*: Elsevier, 2011, pp. 219-270.

[217] A. Karagöz and S. Dinçer, "Microwave-Assisted Synthesis of Poly (ε-caprolactone)-block-poly (ethylene glycol) and Poly (lactide)-block-poly (ethylene glycol)," in *Macromolecular symposia*, 2010, vol. 295, no. 1: Wiley Online Library, pp. 131-137.

[218] M. Topuzogullari, V. Bulmus, E. Dalgakiran, and S. Dincer, "pH-and temperature-responsive amphiphilic diblock copolymers of 4-vinylpyridine and oligoethyleneglycol methacrylate synthesized by RAFT polymerization," *Polymer,* vol. 55, no. 2, pp. 525-534, 2014.

[219] A. Minost, J. Delaveau, M.-A. Bolzinger, H. Fessi, and A. Elaissari, "Nanoparticles via nanoprecipitation process," *Recent patents on drug delivery & formulation,* vol. 6, no. 3, pp. 250-258, 2012.

[220] E. Elmowafy, M. O. El-Derany, L. Casettari, M. E. Soliman, and R. I. El-Gogary, "Gamma oryzanol loaded into micelle-core/chitosan-shell: from

translational nephroprotective potential to emphasis on sirtuin-1 associated machineries," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 631, p. 122482, 2023.

[221] S. Derman, "Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size," *Journal of Nanomaterials,* vol. 16, no. 1, pp. 318-318, 2016.

[222] S. A. Algharib *et al.*, "Designing, structural determination and biological effects of rifaximin loaded chitosan-carboxymethyl chitosan nanogel," *Carbohydrate polymers,* vol. 248, p. 116782, 2020.

[223] S. Rekha and E. Anila, "In vitro cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay," *Materials Letters,* vol. 236, pp. 637-639, 2019.

[224] W. Xiong, L. Peng, H. Chen, and Q. Li, "Surface modification of MPEG-b-PCL-based nanoparticles via oxidative self-polymerization of dopamine for malignant melanoma therapy," *International journal of nanomedicine,* pp. 2985-2996, 2015.

[225] L. Huang, M. Cai, X. Xie, Y. Chen, and X. Luo, "Uptake enhancement of curcumin encapsulated into phosphatidylcholine-shielding micelles by cancer cells," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* vol. 25, no. 13, pp. 1407-1424, 2014.

[226] Y. Xiong, L. Cheng, X.-Y. Wang, Y.-H. Shen, C. Li, and D.-F. Ren, "Chitosan/tripolyphosphate nanoparticle as elastase inhibitory peptide carrier: characterization and its in vitro release study," *Journal of Nanoparticle Research,* vol. 25, no. 2, p. 30, 2023.

[227] G. W. Lu and P. Gao, "Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery," in *Handbook of non-invasive drug delivery systems*: Elsevier, 2010, pp. 59-94.

[228] E. Joseph and G. Singhvi, "Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier," *Nanomaterials for drug delivery and therapy,* pp. 91-116, 2019.

[229] D. Kumar, S. Kumar, S. Kumar, S. Rohatgi, and P. P. Kundu, "Synthesis of rifaximin loaded chitosan-alginate core-shell nanoparticles (Rif@CS/Alg-NPs) for antibacterial applications," *International Journal of Biological Macromolecules,* vol. 183, pp. 962-971, 2021/07/31/ 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.022.

[230] M. J. N. Amaldoss, I. A. Najar, J. Kumar, and A. Sharma, "Therapeutic efficacy of rifaximin loaded tamarind gum polysaccharide nanoparticles in TNBS induced IBD model Wistar rats," (in eng), *Rep Pract Oncol Radiother,* vol. 26, no. 5, pp. 712-729, 2021, doi: 10.5603/RPOR.a2021.0100.

[231] A. Drabczyk *et al.*, "Physicochemical investigations of chitosan-based hydrogels containing Aloe vera designed for biomedical use," *Materials,* vol. 13, no. 14, p. 3073, 2020.

[232] N. Buyuk, P. Arayici, S. Derman, Z. Mustafaeva, and S. Yucel, "Synthesis of Chitosan Nanoparticles for Controlled Release of Amiodarone," *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 82, no. 1, 2020.

[233] S. Kumar, J. Koh, H. Kim, M. Gupta, and P. Dutta, "A new chitosan–thymine conjugate: Synthesis, characterization and biological activity," *International journal of biological macromolecules*, vol. 50, no. 3, pp. 493-502, 2012.

[234] Z. Jiang, Z. Zhu, C. Liu, Y. Hu, W. Wu, and X. Jiang, "Non-enzymatic and enzymatic degradation of poly (ethylene glycol)-b-poly (ε-caprolactone) diblock copolymer micelles in aqueous solution," *Polymer*, vol. 49, no. 25, pp. 5513-5519, 2008.

[235] Z. Fu, L. Li, M. Wang, and X. Guo, "Size control of drug nanoparticles stabilized by mPEG-b-PCL during flash nanoprecipitation," *Colloid and Polymer Science*, vol. 296, pp. 935-940, 2018.

[236] K. Çınar, "A review on nanoemulsions: preparation methods and stability," *Trakya Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi,* 2017.

[237] P. Taylor, "Ostwald ripening in emulsions," *Advances in colloid and interface science*, vol. 75, no. 2, pp. 107-163, 1998.

[238] H. Karabulut and M. Ş. Gülay, "Serbest radikaller," *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* vol. 4, no. 1, 2016.

[239] S. B. Kedare and R. Singh, "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay," *Journal of food science and technology*, vol. 48, pp. 412-422, 2011.

[240] B. Hoe, A. Priyangaa, J. Nagarajan, O. Chien Wei, R. N. Ramanan, and K. Prasad, "Carotenoids," 2017, pp. 313-362.

[241] I. G. Munteanu and C. Apetrei, "Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 7, Mar 25 2021, doi: 10.3390/ijms22073380.

[242] H. Wang, C. Chen, X. Chen, J. Zhang, Y. Liu, and X. Li, "PK/PD modeling to assess rifaximin clinical dosage in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced mastitis," *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 8, p. 651369, 2021.

[243] A. Pistiki, I. Galani, E. Pyleris, C. Barbatzas, M. Pimentel, and E. J. Giamarellos-Bourboulis, "In vitro activity of rifaximin against isolates from patients with small intestinal bacterial overgrowth," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 43, no. 3, pp. 236-241, 2014.

[244] S. Derman *et al.*, "The study of synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles cytotoxicity in vitro," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, no. 2a, pp. 1646-53, 2017.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Seher AR, Pelin PELİT ARAYICI, Serap ACAR DERMAN. "Rifaksimin yüklü misellerin üretilmesi ve biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi", 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022) November 23-25, 2022, Ankara, Turkey.

Ödüller

1. TÜBİTAK BİDEB 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı.