

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

PNÖMONİ ETKENİ MİKROORGANİZMALARA KARŞI
ANTİBİYOTİKLERLE YÜKLÜ KİTOSAN
MİKROPARTİKÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE HÜCRE
TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

VİLDAN KÜÇÜKOĞLU

KOCAELİ 2019

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

PNÖMONİ ETKENİ MİKROORGANİZMALARA KARŞI
ANTİBİYOTİKLERLE YÜKLÜ KİTOSAN
MİKROPARTİKÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE HÜCRE
TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

VİLDAN KÜÇÜKOĞLU

Doç. Dr. Halime KENAR
Danışman, Kocaeli Üniversitesi
Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi
Prof. Dr. Özcan GÜNDOĞDU
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi
Doç. Dr. Erkan Türker BORAN
Jüri Üyesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Görke GÜREL PEKÖZER
Jüri Üyesi, Yıldız Teknik Üniversitesi


.....

.....

.....

.....

.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 29.08.2019

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında Türkiye’de ve dünyada ciddi mortalite oranlarına sahip hemen her ailenin yaşamında bir dönem sıkıntılara neden olan pnömoni hastalığı etkenleri fırsatçı patojen mikroorganizmalara karşı antibiyotik yüklü mikropartiküllerin etkililiği araştırıldı.

Öncelikle tez konusu seçerken ve tez çalışmam sırasında, değerli zamanını ayırarak çalışmamı yönlendiren beni her zaman motive edip bu uzun süreci tamamlamama yardımcı olan, bilim için harcanan zamanın sonunda, aile olduğumuzu hissettiğim değerli hocam sayın Doç. Dr. Halime KENAR’a, tez izleme komitesinde yer alarak değerli fikirlerini paylaşan, çalışmamın ilerleyişinde desteklerini hiç eksik etmeyen sayın Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ ve sayın Prof. Dr. Özcan GÜNDOĞDU’ya teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında yardımları sayesinde kendimi yalnız hissetmeme hiç izin vermeyen sayın Hüseyin UZUNER’e, istatistiksel verilerimin analizinde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Canan BAYDEMİR’e, mikropartikül analizinde yardımcı olan sayın Doç. Dr. Olcay MERT ve sayın Mehmet Onur Arıcan’a, doktora çalışmam sırasında desteklerini hiç üstümden çekmeyen sayın Prof. Dr. Şule ÖZDEMİR ve Prof. Dr. Engin ÖZDEMİR’e,

Tez çalışmam boyunca bana hep inanan ve destekleyen arkadaşlarım, Dr. Candan YILMAZ ÖZDOĞAN, Levent AYDIN, Dr. Doğanhan ER, Klinik Araştırmalar Birimi hemşireleri Banu TUREMEN ve Nurşen ALKAYA’ya ve tüm klinik araştırmalar birimi çalışanı mesai arkadaşlarıma, artık kız kardeşlerim olarak gördüğüm AYPERİSTLER’e,

Tez çalışmam sırasında iyi dilek ve temennilerini manevi desteklerini her zaman hissettiren başta annem ve babam olmak üzere tüm sevgili aileme, bu süre boyunca sabır ve hoşgörü ile yardımcı olan sevgili eşim Namık KÜÇÜKOĞLU’na ve canım oğlum Ali Arhan KÜÇÜKOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama maddi destek sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne (Proje numarası: 2015/46) teşekkür ederim.

Ağustos – 2019

Vildan KÜÇÜKOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER.....	4
1.1. Pnömoni Tarihçesi.....	4
1.2. Pnömoni Risk Grupları, Pnömoni Çeşitleri ve Pnömoniye Neden Olan Mikroorganizmalar	5
1.3. Pnömoni Tanı ve Tedavi Yöntemleri	9
1.4. Akciğerlerde Sürekli İlaç Salımı İçin Dağıtım Stratejileri.....	10
1.4.1. İlaç dağıtım sistemleri.....	10
1.4.2. İn hale bileşiklerin lokal uygunluğunu etkileyen faktörler.....	11
1.4.3. Akciğerlerde ilaç salımını kontrol etmek için uygulanan stratejiler.....	13
1.4.3.1. Nanotaşıyıcılar	14
1.4.3.2. Mikrotaşıyıcılar.....	14
1.4.3.3. Kitin ve kitosanın özellikleri.....	15
1.4.3.4. Kitosan mikropartiküller.....	17
1.4.4. Nano/Mikrotoksikoloji.....	19
1.4.4.1. Kitosan toksisitesi	21
1.4.5. Siprofloksasin	21
1.4.6. Amfoterisin B	23
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
2.1. Malzemeler.....	25
2.2. Yöntem	25
2.2.1. İyonik jelleşme yöntemiyle BSA yüklü kitosan mikropartiküllerin hazırlanması	25
2.2.2. İyonik jelleşme yöntemiyle sefoperazon sulbaktam yüklü mikropartikül hazırlanması	25
2.2.3. İyonik jelleşme yöntemiyle siprofloksasin ve amfoterisin B yüklü mikropartiküllerin hazırlanması	26
2.2.4. Kitosan mikropartiküllerde trehaloz kullanımı	27
2.2.5. Mikropartikül yapımında kullanılan farklı kitosan-ttp oranları	28
2.2.6. Kitosan mikropartiküllerin karakterizasyonu	31
2.2.7. BSA'nın konsantrasyonunun hesaplanması.....	31
2.2.8. Siprofloksasin ve amfoterisin B'nin konsantrasyonunun hesaplanması	31
2.2.9. Mikropartiküllerin yükleme verimliliği ve yüklenen ilaç	32
2.2.10. İn vitro bsa ve ilaç salım çalışmaları	32

2.2.11. Antimikrobiyal aktivite testleri	33
2.2.12. Sitotoksisite testi	34
2.2.13. Tem analizi	35
2.2.14. İstatistiksel Analiz	36
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
3.1. Kitosan Mikropartiküllerin Makroskopik Görüntüleri.....	37
3.2. Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri.....	38
3.3. Mikropartiküllerin Büyüklük ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	40
3.4. BSA Yüklü Mikropartiküllerin Yükleme Verimliliğinin, Yüklenen BSA ve İn vitro İlaç Salımının Değerlendirmesi.....	42
3.5. Siprofloksasin ve Amfoterisin B Yüklü Mikropartiküllerin Yükleme Verimliliğinin, Yüklenen İlaç ve İn vitro İlaç Salımının Değerlendirmesi	43
3.6. Antimikrobiyal Test Sonuçları	46
3.7. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	60
3.8. Siprofloksasin Yüklü Kitosan Mikropartikülleri İle Muamele Edilen E. coli, S. aureus ve BEAS-2B Hücrelerinin TEM Analizi.....	64
3.9. Amfoterisin B Yüklü Kitosan Mikropartikülleri İle Muamele Edilen BEAS-2B Hücrelerinin ve Muamele Edilmemiş Hücrelerin TEM Analizi.....	66
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	72
EKLER.....	80
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	84
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Kitin ve kitosanın yapısı.....	16
Şekil 1.2.	Farklı pH’larda kitosanın yapısı.....	17
Şekil 1.3.	Kitinin deasetillenmesiyle kitosan eldesi.....	18
Şekil 1.4.	İkinci kuşak bir kinolon olan siprofloksasinin yapısı.....	22
Şekil 1.5.	Amfoterisin B’nin yapısı	23
Şekil 2.1.	Sefoperazon sulbaktam kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan makropartiküller.....	26
Şekil 2.2.	Çeşitli kitosan ve TPP derişimlerinde kitosan Nanopartiküllerin oluşum bölgesi	29
Şekil 2.3.	Kitosan mikropartikül elde edilmesinden sonra ilk santrifügasyon sonrasında homojen dağılmayan pellet.....	29
Şekil 3.1.	BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin dondurarak kurutma sonrası görüntüsü.....	37
Şekil 3.2.	Kitosan mikropartiküllerin dondurarak kurutma sonrası görüntüsü. Siprofloksasin yüklü (A), AmB yüklü (B).....	37
Şekil 3.3.	BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin SEM görüntüsü.....	38
Şekil 3.4.	Taramalı elektron mikroskop görüntüleri; (A) Siprofloksasin yüklü Kitosan-PEG mikropartiküllerin (B) İlaç yüklü olmayan Kitosan-PEG mikropartiküllerin.....	39
Şekil 3.5.	Trehaloz ile muamele edilen siprofloksasin yüklü mikropartiküllerin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	40
Şekil 3.6.	Kitosan mikropartiküllerin taramalı elektron mikrografları. (A) Kitosan mikropartikülleri, (B) siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri, (C) AmB yüklü kitosan mikropartikülleri.....	41
Şekil 3.7.	14 gün içinde BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinden in vitro protein salımı.....	43
Şekil 3.8.	72 saat içinde kitosan mikropartiküllerinden in vitro siprofloksasin salımı (A) AmB salımı (B).....	44
Şekil 3.9.	Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun <i>E. coli</i> ATCC 25922 suşu üzerindeki sonuçları.....	49
Şekil 3.10.	Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 suşu üzerindeki sonuçları.....	50
Şekil 3.11.	Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun <i>S. aureus</i> ATCC 29213 suşu üzerindeki sonuçları.....	51
Şekil 3.12.	Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 suşu üzerindeki sonuçları.....	52

Şekil 3.13.	AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun <i>C. albicans</i> ATCC 90028 suşu üzerindeki sonuçları.....	53
Şekil 3.14.	Mikroplaka'da 24 saat <i>E.coli</i> 'nin üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklarının makroskopik görüntüsü.....	54
Şekil 3.15.	Mikroplaka'da 24 saat <i>S. pneumoniae</i> 'nin üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklarının görüntüsü.....	54
Şekil 3.16.	Mikroplaka'da 24 saat <i>C. albicans</i> 'in üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklarının görüntüsü.....	55
Şekil 3.17.	Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin minimum bakterisidal konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan bakteri inoküle edilmiş agar plakaları.....	58
Şekil 3.18.	AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin minimum fungisidal konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan maya inoküle edilmiş agar plakaları.....	59
Şekil 3.19.	37 °C'de 24 saat boyunca siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller (salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 0.093 µg/mL) ile inkübe edilmiş <i>E. coli</i> 'nin taramalı elektron mikrografları.....	59
Şekil 3.20.	Saf siprofloksasin, kitosan mikropartikül ya da siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile 24 saat muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinin MTT testi ile belirlenen hücre canlılığı sonuçları.....	61
Şekil 3.21.	<i>C. albicans</i> 'ın MİK değerine karşılık gelen Konsantrasyonda (salınan AmB konsantrasyonu: 0,96 µg/mL) saf AmB'nin, kitosan mikropartikül ya da AmB yüklü kitosan mikropartikülleri ile 24 saat muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinin MTT testi ile belirlenen hücre canlılığı sonuçları.....	62
Şekil 3.22.	<i>E. coli</i> 'nin geçirimlielektron mikrografları, 24 saat boyunca MİK değerlerine karşılık gelen konsantrasyonda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz bırakıldıktan sonra.....	64
Şekil 3.23.	<i>S. aureus</i> 'un geçirimlielektron mikrografları, 24 saat boyunca MİK değerlerine karşılık gelen konsantrasyonda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz bırakıldıktan sonra.....	65
Şekil 3.24.	Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinin ve 24 saat boyunca <i>E. coli</i> 'nin (serbest kalan siprofloksasin: 0.093 µg/mL) MİK değerine maruz kalan BEAS-2B hücrelerinin geçirimlielektron mikrografları.....	66
Şekil 3.25.	Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinin ve 24 saat boyunca <i>C. albicans</i> 'ın (serbest kalan AmB: 0.96 µg/mL) MİK değerine maruz kalan BEAS-2B hücrelerinin geçirimli elektron mikrografları.....	67
Şekil A.1.	BSA standart eğrisi.....	81
Şekil B.1.	Siprofloksasin standart eğrisi.....	82
Şekil C.1.	Amfoterisin B standart eğrisi.....	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Pnömoni sınıflaması.....	6
Tablo 2.1. Kitosan mikropartikül yapımında kullanılan kitosan/tpp oranları.....	30
Tablo 3.1. Saf kitosan mikropartiküllerinin, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli	41
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan bakteriler için serbest siprofloksasin ve siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin MİK ve MBK değerleri.....	57
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan <i>C. albicans</i> için serbest AmB ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin MİK ve MFK değerleri.....	57
Tablo 3.4. Serbest siprofloksasin ve siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinin frekansları üzerine etkisi.....	63
Tablo 3.5. Serbest AmB ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinin frekansları üzerine etkisi.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μm	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
pg	: Pikogram
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
mw	: Moleküler ağırlık
nm	: Nanometre
g	: Yer çekimi ivmesi, (m/s^2)
g/cm^3	: Gram/Santimetre küp
kDa	: Kilodalton
~	: Yaklaşık
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
M	: Molarite

Kısaltmalar

AmB	: Amphotericin B (Amfoterisin B)
BEAS-2B	: Human Bronchial Epithelial Cells (İnsan Akciğer Epitel Hücresi)
BSA	: Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümin)
CLSI	: The Clinical & Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü)
DKP	: Doku kültürü polistireninde büyütülmüş muamele görmemiş hücreler
DLS	: Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılımı)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun Modifiye Kartal Ortamı)
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EMB	: Eosin Methylen-Blue (Eozin Metilen Mavisi)
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serum)
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
HAP	: Hastane Kökenli Pnömoni
KM	: Kitosan Mikropartikül
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MFK	: Minimum Fungisidal Konsantrasyonu
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MIC	: Minimum Bactericidal Concentration
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MP	: Mikropartikül
OD	: Optical Densitometry (Optik Dansitometri)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tuzlu Tampon)

PEG	: Polyethylene Glycol (Polietilen Glikol)
PLGA	: Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) (Poli (Laktik-ko-Glikolik Asit))
SD	: Standard Deviation (Standart Sapma)
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar (Sabouraud Dekstroz Agar)
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SMP	: Siprofloksasin Yüklü Kitosan Mikropartikül
TEM	: Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
TKP	: Toplum Kökenli Pnömoni
TPP	: Tripolyphosphate (Tripolifosfat)
VAP	: Ventilatöre Bağlı Pnömoni
Yİ	: Yüklenen İlaç
YV	: Yükleme Verimliliği



PNÖMONİ ETKENİ MİKROORGANİZMALARA KARŞI ANTİBİYOTİKLERLE YÜKLÜ KİTOSAN MİKROPARTİKÜLLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE HÜCRE TOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Pnömoni ciddi komplikasyonları olan hayatı tehdit edici bir hastalıktır. Siprofloksasin ve Amfoterisin B (AmB) ise pnömoni tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdendir. Siprofloksasin ve AmB yüklü olan ve saf kitosan mikropartiküller (KM) iyonik jelasyon yöntemiyle tripolifosfat (TPP) kullanılarak hazırlandı. Mikropartiküllerin büyüklük ve zeta potansiyelleri belirlendi. Siprofloksasin yüklü KM'lerin *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae* suşlarına karşı in vitro antibakteriyel aktiviteleri minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonlarının hesaplanması ile değerlendirildi. AmB yüklü KM'lerin *Candida albicans*'a karşı in vitro antifungal aktivitesi MİK ve minimum fungisidal konsantrasyonunun hesaplanması ile değerlendirildi. Sonuçlar siprofloksasin yüklü KM'lerin bakteri üremesini inhibe ettiğini, AmB yüklü KM'lerin maya büyümesini inhibe ettiğini ancak test edilen konsantrasyonlarda saf KM'lerin inhibe etmediğini gösterdi. Siprofloksasin yüklü ve AmB yüklü KM'lerin sitotoksik etkisi, sağlıklı insan akciğer epitel hücresi (BEAS-2B) kültüründe MTT testi ile değerlendirildi. MTT test sonuçları bu partiküllerin sitotoksositeye neden olmadığını gösterdi. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), bakteri, maya ve epitel hücreleri ile mikropartikül etkileşimini ve hücre içi lokalizasyonunu belirlemek için kullanıldı. TEM analizleri, 200 nm'den küçük olan mikropartiküllerin, BEAS-2B hücreleri tarafından hücre içine alındığını ortaya koydu. Mikropartiküllerin, mikroorganizmaların hücre duvarına ve zarına zarar verdiği ve sitoplazmalarına girebildiği gözlemlendi. Bu mikropartiküller, özellikle 200 nm'den büyük olanlar, akciğerlere lokal ilaç uygulaması için mikro taşıyıcılar olarak kullanılma potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Amfoterisin B, BEAS-2B Hücre Hattı, Kitosan Mikropartikül, Pnömoni, Siprofloksasin.

DEVELOPMENT OF ANTIBIOTIC LOADED CHITOSAN MICROPARTICLES AGAINST PNEUMONIA CAUSING MICROORGANISMS AND INVESTIGATION OF THEIR CYTOTOXICITY

ABSTRACT

Pneumoniae can be associated with severe complications and is a life threatening disease. Ciprofloxacin and amphotericin B (AmB) are antibiotics used in the treatment of pneumoniae. Ciprofloxacin and AmB loaded chitosan microparticles (CM) and pristine CM were prepared by ionic gelation method using tripolyphosphate (TPP). The microparticle size and zeta potential were determined. The in vitro antibacterial activities of ciprofloxacin loaded CM against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* were evaluated by calculation of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration. The in vitro antifungal activity of AmB loaded CM against *Candida albicans* was evaluated by calculation of MIC and minimum fungicidal concentration. The results showed that ciprofloxacin loaded CM inhibit bacterial growth, AmB loaded CM inhibit yeast growth but not the pristine CM. The cytotoxic effect of ciprofloxacin loaded and AmB loaded CM was evaluated with MTT assay in healthy human lung epithelial cell (BEAS-2B) culture. MTT results showed that these particles did not cause any cytotoxicity. Transmission electron microscopy (TEM) was used to determine the microparticle association with the bacteria, yeast and epithelial cells and their intracellular localization. TEM analyses revealed that microparticles ≤ 200 nm in size were internalized by the BEAS-2B cells. The microparticles were able to damage the cell wall and membrane of the microorganisms and to enter their cytoplasm. These particles, especially the ones being ≥ 200 nm in size, have the potential to be used as microcarriers for local drug administration to the lungs.

Keywords: Amphotericin B, BEAS-2B Cell Line, Chitosan Microparticle, Pneumonia, Ciprofloxacin.

GİRİŞ

Pnömoni global anlamda geçmişteki salgınlar sonucu gerçekleşen ölümlerle karşılaştırıldığında sayı ve ölüm oranı olarak azalmış olmakla birlikte, özellikle bazı risk gruplarında hala önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Pnömoni, mikroorganizmaların neden olduğu bir akciğer enfeksiyonudur ve yüksek morbidite oranına sahiptir (Di Franco ve diğ., 2017). Tüberküloz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) ve akciğer kanseri sonrası sık görülen bir ölüm nedenidir (Niederman ve diğ., 1993). Çok sayıda mikroorganizma pnömoniye neden olabilir. İnflamasyon bakterisi, virüs ve mantar gibi mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Ancak bunların başında bakteriler gelir (Vallés ve Mariscal, 2005) Daha hızlı teşhis yöntemleri geliştirilinceye kadar çoğu hasta ampirik tedavi edilmektedir ve antimikrobiyal tedavinin temeli olmaya devam etmektedir (File, 2003).

Talha ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın pnömoni ajanları arasında olduğu bulunmuştur (Talha ve diğ., 2009). *Staphylococcus aureus*, özellikle kronik hastalıkları olan bireylerde ve yaşlı hastalarda pnömoni nedeni olarak sık görülmektedir (Gleeson ve Reynolds, 1994). *Streptococcus pneumoniae* toplum kökenli pnömonide en önemli patojen olmaya devam etmektedir (File, 2003). *Candida albicans*, en yaygın mantar insan patojenidir (Tan ve diğ., 2016). Yapılan bir çalışmada *C. albicans* ventilatör ilişkili pnömoni tanısı alan hastalarda en sık saptanan mikroorganizma olarak bulunmuştur (Souza, 2017). Meersseman ve arkadaşları solunum örneklerinde en sık üreyen *Candida* türünün *C. albicans* olduğunu belirtmişlerdir (Meersseman ve diğ., 2009).

Etken mikroorganizma sayısındaki artış ve değişen antibiyotik direnci, immün sistemin baskılanmasına neden olan tedavilerin uygulanması, organ transplantasyonları gibi nedenlerle pulmoner enfeksiyon sıklığı artmıştır. Tanı ve

tedavideki önemli gelişmelere karşın pnömoniler önemli bir sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir (Sevinç ve Uçan, 2000).

Pnömoni, İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ölüm nedenleri arasında altıncı sırada, enfeksiyonlara bağlı ölümler arasında ise birinci sırada yer almaktadır (Batista ve diğ., 2019). Ülkemizde alt solunum yolu enfeksiyonları, ölüm nedenleri arasında %4,2 ile 5. sırada yer almaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda pnömoniden ölüm oranının hastalığın ağırlığı ile ilişkili olarak %1 ile %60 arasında değiştiği ve hastanede tedavi edilen pnömonilerde oranın çok daha yüksek olduğu (%10,3-60) gösterilmiştir (Özlü ve diğ., 2007).

Antibiyotikler sistemik olarak uygulandığında istenmeyen toksik etkilerin görülme riski yüksektir. Lokal ilaç uygulaması, oral veya parenteral enjeksiyonla sistemik uygulamaya kıyasla, daha az doz uygulamaya olanak sağlar (Pastoriza ve diğ., 2014).

Kitosan geniş kullanılabilirlik, sürdürülebilirlik, fonksiyonellik ve biyobozunurluk gibi kendine özgü özellikler gösteren eşsiz bir doğal katyonik polisakkarittir (Gökçe, 2008). Çeşitli çalışmalarda kullanılan kitosan biyoyumlu, toksik olmayan, antihipertansif, antienflamatuar ve antimikrobiyal özellikler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Batista ve diğ., 2019). Kitosan nano ve mikropartikülleri ilaç dağıtım uygulamalarında kullanılabilen çok popüler malzemelerdir (Kumar ve diğ., 2004).

Çalışmada öncelikle iyonik jelasyon tekniği kullanılarak sığır serum albümin (BSA) yüklü kitosan mikropartiküller hazırlandı ve bu mikropartiküllerin karakterizasyonu (taramalı elektron mikroskobu ile), yükleme verimliliği ve in vitro salım gibi özellikleri araştırıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde pnömoni etkeni mikroorganizmalara karşı etkili olabilecek ilaç yüklü kitosan mikropartiküllerin yapımına karar verildi. Çalışmada deneylerimizde kullanacağımız mikroorganizmalar sıklıkla pnömoni etkeni olarak karşımıza çıkan *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* ve *C. albicans* olarak belirlendi. İlaç seçiminde ise bu mikroorganizmalara karşı kullanılan antibiyotikler denendi ve mikropartikül oluşumu ile en uyumlu iki ilaç olan

siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin yapımına karar verildi. İlaçların belirlenmesinde sıklıkla kullanılma, kolay erişim ve deney şartlarında ölçülebilme kriterleri göz önünde bulunduruldu.

Bu çalışmada amacımız, daha düşük nanotoksosite ve makrofajlar tarafından düşük lokal uzaklaştırılma avantajları sağlayabilen, 0,1-1,0 µm aralığında siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin hazırlanması ve bu mikropartiküllerin önemli pnömoni nedenlerinden olan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* ve *C. albicans*'a karşı in vitro antimikrobiyal aktivitesini ve bununla birlikte insan akciğer epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmektir. Çalışmamızda bakteriler ve BEAS-2B hücreleri ile kitosan mikropartiküllerin etkileşimi geçirimli elektron mikroskobu ile değerlendirildi.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Pnömoni Tarihçesi

Harrison'ın dahili tıp kitabı pnömoniye çeşitli organizmaların neden olduğu pulmoner parankimin bir enfeksiyonu olarak tanımlar. Pnömoni tek bir hastalık değil, her birinin farklı epidemiyoloji, patogenezi ve klinik seyri olan bir grup spesifik enfeksiyon olduğunu belirtir.

Pnömoni Yunanca nefes anlamına gelen 'pneuma' kelimesinden türetilmiştir (Sattar ve Sharma, 2019). Tarihte ilk olarak Hipokrat (MÖ 460-370) tarafından tarif edilmiştir (Mackenzie, 2016). Kariyeri boyunca pnömoni üzerine çalışan modern tıbbın kurucusu olan Dr. William Osler, insanlık üzerine yaptığı büyük zararlardan dolayı pnömoniye "ölüm adamlarının kaptanı" adını verdi (Sattar ve Sharma, 2019). Birinci Dünya Savaşı sırasında, 1918-1919 yıllarında Yaklaşık 20-40 milyon genç insanın ölümüne neden olan "İspanyol Gribi" olarak adlandırılan İnfluenza epidemisinde ölümlerin tamamına yakını pnömoni nedeniyle gerçekleşmiştir (Akçay ve diğ., 2017). 1930'larda, antibiyotiklerin ortaya çıkmasından önce, pnömoni ABD'deki üçüncü önde gelen ölüm sebebiydi. 2006 yılında, yaklaşık 55.000 ölümden sorumlu olarak sekizinci sırada yer aldı. Pnömoni dünyada hastaneye yatış ve ölümün önde gelen bulaşıcı hastalık sebebidir ve ekonomik ve insani açıdan muazzam bir maliyeti vardır. Dünya Sağlık Örgütü verileri, bu bağlamda pnömoni ile neredeyse eşanlamlı bir terim olan solunum yolu enfeksiyonlarının, dünyadaki çocuklar arasında herhangi başka bir nedenden -kanser ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere- daha fazla ölüme neden olduğunu göstermektedir (Sattar ve Sharma, 2019).

T.C. Sağlık Bakanlığı ve Devlet İstatistik Enstitüsü verileri, pnömonilerin ülkemiz için de önemli olduğunu göstermektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü ve Başkent Üniversitesi tarafından son yıllarda gerçekleştirilen ulusal hastalık yükü ve maliyet etkinlik projesi sonuçlarını açıklayan ve Aralık 2004 tarihinde yayınlanan final

rapora göre; hane halkı araştırmasında son iki ay içerisinde hekim tanısı konulmuş ilk 20 akut ve kronik hastalık arasında pnömoniler %1,15 sıklık ile 15. sırada yer almıştır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2002 yılında pnömoni tanısıyla hastanede yatırılarak tedavi edilen 119.330 olgunun (7372 viral, 111.958 diğer pnömoniler) %2,2'si (144 viral, 2341 diğer) ölümle sonuçlanmıştır (Özlü ve diğ., 2007).

1.2. Pnömoni Risk Grupları, Pnömoni Çeşitleri ve Pnömoniye Neden Olan Mikroorganizmalar

Sağlıklı bireyler pnömoni olabilir, ancak duyarlılık çeşitli kişisel özelliklere göre büyük ölçüde artar. Pnömoni olma riski özellikle bebeklerde ve yaşlılarda (65 yaş üstü) yüksektir. Zayıflamış bir bağışıklık sistemi, örneğin diyabet, böbrek sorunları veya kanser gibi durumlarda riskin daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Astım ve KOAH gibi akciğer hastalıkları, kalp hastalıkları, sigara içmek ve grip gibi bazı viral enfeksiyonlar da insanları pnömoniye daha yatkın hale getirebilir. Pnömoni özellikle yoksul ülkelerde yaygındır. Yoksul ülkelerde bebekler ve çocuklar en çok etkilenenler arasındadır (Sattar ve Sharma, 2019).

Bazı araştırmalarda pnömoninin tanımlanması ve sınıflandırılmasında netlik olmadığı düşünülmektedir. Pnömoni farklı özelliklere göre sınıflandırılabilmektedir (Tablo 1.1.) Radyolojik bulgulara göre sınıflandırmanın hastalığın seyrini ve etkeni tahmin etmede çok fazla yararı yoktur. Örneğin; lobar pnömoni en sık pnömokok tarafından oluşturulmasına rağmen *Klebsiella*, *Pseudomonas* da dahil olmak üzere birçok organizma bu pnömoniye oluşturabilmektedir. Her türlü invaziv veya non-invaziv girişime rağmen hastaların sadece yarısında etken izolasyonu sağlanabilir. Bu nedenle etken izolasyonuna göre sınıflamada pratik bir yöntem değildir. Güncel pnömoni sınıflaması hastalığın oluşma şekline ve ampirik tedavi yaklaşımına göre yapılmaktadır (Akçay ve diğ., 2017). Ampirik tedavi yaklaşımına göre sınıflama yaptığımızda pnömoni; toplum kökenli pnömoni, hastane kökenli pnömoni ve bağışıklığı baskılanmış hastalardaki pnömoni olarak üç ana başlık altında toplanmaktadır (Sevinç ve Uçan, 2000).

Tablo 1.1. Pnömoni sınıflaması (Akçay ve diğ., 2017)

Pnömoni nedenleri	Pnömoni çeşitleri
Etyolojik nedene göre	İnfeksiyöz Noninfeksiyöz
Anatomik yerleşime göre	Lober Bronkopnömoni (löbüler) İnterstisiyel
Klinik tabloya göre	Tipik pnömoni Atipik pnömoni
Ağırlık durumuna göre	Hafif pnömoniler Ağır pnömoniler
Ampirik tedavi yaklaşımına göre	Toplum kökenli pnömoniler Hastane kökenli pnömoniler Sağlık bakımı ilişkili pnömoni Ventilatör ilişkili pnömoni İmmün sistemi baskılanmış hastada pnömoni Aspirasyon pnömonisi

Hastane kaynaklı pnömoni hastaneye herhangi bir sebeple yatıştan en az 48 saat sonra ya da hastaneden çıktıktan sonraki ilk 48 saatte gelişen pnömonilere denir. Hastane kaynaklı pnömoniler dünyanın önde gelen hastane kaynaklı enfeksiyonlarından biridir ve önemli bir etkiye sahiptir (Pássaro ve diğ., 2016). Hastane kaynaklı pnömoni (HAP) tüm hastane enfeksiyonlarının %15'ini oluşturur ve hastanede yatan hastaların %0,5 ila 20'ini etkiler. HAP için mortalite oranı %30'u geçmektedir. HAP sonucunu optimize etmek için uygun antibiyotiklerin kullanımı esastır. Direnç oluşumunu önleyen ve maliyetleri kontrol altına alan en olası etken organizmaları kapsayan antimikrobiyal stratejilere ihtiyaç vardır. Ne yazık ki, antimikrobiyal direnç son on yılda çarpıcı biçimde artmıştır ve etkili antibiyotik seçimlerinin önünde engeller yaratmıştır. HAP'tan sorumlu olan etiyolojik ajanlar sayısız çalışmada açıklanmıştır. HAP vakalarının %55 ila 85'inde *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* ve enterik Gram negatif çubuklar dahil olmak üzere Gram negatif bakteriler; Gram-pozitif kok (özellikle *Staphylococcus aureus*) %20 ila 30'dur ve vakaların %40 ila 60'ı polimikrobiyaldir. Hastalığın keskinliği ve şiddeti, hastanede kalış süresi ve önceki antibiyotik maruziyeti olası patojenlerin ana belirleyicileridir. İlgili patojenlerin farkındalığı HAP için ampirik ve patojene yönelik başarılı tasarım antibiyotik tedavisine yönelmiştir. HAP ve antimikrobiyal direnç gelişimi için göze çarpan risk faktörlerini anlamak, HAP

nedeniyle mortalite ve morbiditeyi azaltmak için stratejilerin geliştirilmesini kolaylaştırabilir. Bu da sağlık sistemi üzerindeki toplam maliyeti ve yükü azaltacaktır (Lynch, 2001).

Hastane kökenli pnömonilerin önemli bir alt grubu da ventilatör ilişkili pnömonidir. Ventilatör ilişkili pnömoni ise endotrakeal entübasyondan 48-72 saat sonra ortaya çıkan pnömoni çeşididir. Ventilatör ilişkili pnömoni için önleyici tedbirler iyi bilinmesine rağmen, hastane kökenli pnömoninin önlenmesi için uygun önlemler hakkında daha az şey bilinmektedir (Pássaro ve diğ., 2016). Ventilatöre bağlı pnömoni (VAP), mekanik ventilasyon alan hastaların %8 ila 28'inin seyrini zorlaştırmaya devam etmektedir. Ölüm oranı düşük %1 ila 4 arasında değişen daha sık ilgili olan (örneğin idrar yolu ve cilt) enfeksiyonlarının aksine, VAP için ölüm oranı %24 ila %50 arasında değişebilir ve bazı özel ortamlarda %76'ya ulaşabilir ve çoğu zaman akciğer enfeksiyonu yüksek riskli patojenlerden kaynaklanır. Enfeksiyondan sorumlu baskın organizmalar *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*'dir, ancak etiyolojik ajanlar yoğun bakım ünitesindeki hasta popülasyonuna, hastanede kalış süresine ve önceki antimikrobiyal tedaviye göre büyük ölçüde farklılık gösterir. Çünkü hastaların uygun antimikrobiyal tedavisi VAP sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirir, enfekte olmuş hastaların daha hızlı tanımlanması ve antimikrobiyal ajanların doğru seçilmesi önemli klinik hedefleri temsil eder (Chastre ve Fagon, 2002).

Toplum kökenli pnömoni (TKP) dünya çapında bulaşıcı ölüm nedeni olarak birinci sıradadır. Mortalitesi ve uzun süreli morbiditesi nedeniyle maliyetli bir hastalıktır (Villafuerte ve diğ., 2019). Toplum kökenli pnömoni toplumda günlük yaşam sırasında ortaya çıkan pnömonidir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda önemli morbidite ve mortalite ile ilişkili ciddi bir alt solunum yolu enfeksiyonudur. Klinik tablo, olası etkenler ve ampirik tedavi yaklaşımı açısından tipik ve atipik olmak üzere iki farklı kategoride değerlendirilebilir. Toplum kökenli pnömoni, özellikle yaşlı erişkinlerde ve eşlik eden hastalığı olanlarda hayatı tehdit eden yaygın bir hastalıktır (File 2003; Sousa ve diğ., 2013; Serra ve diğ., 2008).

Dünya çapındaki çeşitli epidemiyolojik çalışmalar, yaşlı hastalarda artan oranda TKP'nin yıllık insidansını 1000 kişi başına 511 olarak bildirmiştir. TKP ile ilgili

tahmini yıllık maliyet 12 milyar ABD dolarından fazladır. En iyi TKP yönetimindeki ana konular, bir akciğer infiltratının pnömoniye bağlı olup olmadığı, sorumlu patojenin tanımlanması ve uygun tedaviye karar vermesi durumunda kesin teşhistir. Dünyanın dört bir yanındaki bazı solunum yolu ve bulaşıcı hastalık toplulukları, yerel terapötik faktörleri hesaba katarak, TKP'yi yönetmek için kılavuzlar oluşturmuştur. TKP'ye neden olan potansiyel organizmalar *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Staphylococcus aureus*, atipik organizmalar (yani, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella spp.*) ve virüslerdir (Brar ve Niederman, 2011).

Streptococcus pneumoniae, TKP hastalarında tespit edilen en yaygın bakteriyel patojen olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, TKP'li hastalarda hastane ortamlarıyla sınırlı olduğu düşünülen birkaç patojen daha sık izole edilmiştir. Bu patojenlerden *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* gibi Gram-negatif çubuklar ve *Enterobacteriaceae spp.* alt solunum yolu enfeksiyonlarının önemli nedenleri haline gelmiştir. Daha da önemlisi, bu Gram negatif bakteriler sıklıkla yüksek mortalite ile ilişkili ilaca dirençli mikroorganizmalardır ve kronik olarak hasta, sağlık bakımına maruz kalmış ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda enfeksiyonlara bağlanmıştır. Birkaç çalışma *Enterobacteriaceae spp.* prevalansını değerlendirmiştir. TKP hastalarında sıklıkla görülenler *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* ve *Serratia spp.* dir. Bu nedenle enterik Gram negatif çubuklar ile ilişkili risk faktörleri, özellikle dirençli *Enterobacteriaceae spp.* olan patojenler çok önemlidir (Villafructe ve diğ., 2019).

Bağışıklığın baskılanması, konağın yabancı bir antijeni normalden daha az algılaması veya hiç algılamaması olarak tanımlanabilir. Konak bazen kendi antijenlerini yabancı olarak da algılayabilir, "otoimmün hastalıklar" olarak genellenen bu tür hastalıklar da bağışıklığı baskılayan nedenler arasındadır. Bağışıklık baskılanması terimi genellikle sistemik savunma mekanizmalarında gelişen defektler için kullanılmaktadır. Doğuştan veya sonradan kazanılan sistemik savunma mekanizmalarında hasarlanma (bağışıklık baskılanması) nedenlerinin güncel listesi giderek genişlemektedir (Akçay ve diğ., 2017).

Solunum yolu enfeksiyonları ve sonraki komplikasyonlar, immün sistemi baskılanmış hastalarda yüksek mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Bağışıklık sistemi baskılanmış olguların sayısı son yıllarda hızla artmaktadır. Bu grupta kemoterapi alan kanser hastaları, organ transplantasyonu yapılmış hastalar veya romatalajik bozukluğu olup immünsüpresif tedavi alan hastalar, ya da AIDS gibi edinilmiş immün yetmezlik hastaları yer almaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda çeşitli neden ve oluşum mekanizmaları olan pulmoner komplikasyonların %75 gibi büyük bir kısmını enfeksiyonlar oluşturur. Bu hastalarda hastane kökenli enfeksiyon etkenleri olarak Gram negatif basiller, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* başta olmak üzere, kalıcı intravenöz kateteri olanlarda *S. aureus* ve koagülaz negtaif stafilokoklar görülmektedir. *Legionella* ve çok ilaca dirençli *M. tuberculosis*'e bağlı hastane epidemileri bildirilmiştir. Bu olgularda *S. pneumoniae* ve *H. influenza* gibi etkenlerle toplum kökenli pnömoni gelişebilme durumu söz konusudur (Uçan ve diğ., 1998; Bajaj ve Tombach, 2017).

1.3. Pnömoni Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Rutin kan ve balgam kültürü testleri pahalı ve genellikle verimleri düşüktür. Röntgen görüntüleme pnömoni tanısında önemli bir gereklilik olmasına rağmen, tedaviye karar verirken tüm klinik tablo göz önünde bulundurulmalıdır (Grief ve Loza, 2018). Klinik pratikte, akciğer enfeksiyonu belirtileri ve bulguları olan, göğüste infiltrasyonu olan ancak etyolojisi doğru olarak tespit edilemeyen hastalarla karşılaşmak mümkündür. Bu hastaların klinik örneklerinde spesifik mikroorganizma tespit edilemez ve klinik ve epidemiyolojik verilere dayanarak tedaviye ampirik olarak başlanır (Scholte ve diğ., 2015). Tüm tanısal zorluklara rağmen, pnömonide doğru antibiyotiğin erken ampirik olarak başlatılması hayat kurtarıcıdır (Kallander ve diğ., 2016).

Amerikan Torasik Derneği kılavuzları TKP hastalarında monoterapi olarak bir solunum florokinolonu veya beta-laktam antibiyotik (genellikle üçüncü kuşak sefalosporin) ilk tedavi olarak bir makrolid kullanılmasını önermektedir. Bununla birlikte, bu kılavuzlar 10 yıl önce yayımlandıktan sonra, TKP'ye neden olduğu bilinen yaygın bakteriyel patojenlerde bu birinci basamak antibiyotiklere karşı

antimikrobiyal dirençte endişe verici bir artış ortaya çıkmıştır (Villafuerte ve diğ., 2019).

1.4. Akciğerlerde Sürekli İlaç Salımı İçin Dağıtım Stratejileri

1.4.1. İlaç dağıtım sistemleri

Pulmoner ilaç uygulaması non-invaziv potansiyeli vardır ve kolay uygulanan bir yöntemdir. Akciğer dokusunun spesifik yapısı ve fonksiyonu nedeniyle, akciğer ve akciğer dışı hastalıklar alanında onlarca yıldır çok fazla ilgi çekmiştir; Akciğerler geniş yüzey alanına, ince mukozal hücre zarı ve kan damarlarına sahiptir. Oksijen ve karbondioksit değişim bölgesi olan alveol yüksek yoğunlukta kan kılcalları içerir. Ek olarak, ilaçlar alveoler endotel hücrelerinin ince katmanına kolayca nüfuz edebilir ve kana girebilir. Bu nedenle, akciğerleri hedef alan çeşitli inhale formülasyonlar ve ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmiştir. Bu formülasyonlar bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanan pnömoni, kistik fibrozis, astım, KOAH vb. hastalıkları hedef almıştır (Ozeki ve Tagami, 2014).

Klinik in vivo veriler, inhale antibiyotiklerin *P. aeruginosa* gibi Gram negatif bakterilerin kolonizasyonunu azalttığını ve enfeksiyonun başlamasını geciktirebildiğini göstermiştir (Zhou ve diğ., 2015).

Solunum yoluyla akciğerlere ilaç verilmesi, solunum yolu hastalıkları için hedefe yönelik bir ilaç tedavisi sunar. Ancak, inhale edilen ilaçların terapötik etkinliği, akciğerlerdeki hızlı klirensleri ile sınırlıdır. Akciğerlerde sürekli ilaç salımı sağlayan taşıyıcılar, inhale edilen ilaçların terapötik sonuçlarını iyileştirebilir, çünkü ilaç yükünü akciğerler içinde tutabilirler ve ilacı, giderek lokal olarak terapötik seviyelerde bırakabilirler.

Lokal ilaç uygulaması daha az doz uygulaması demektir. Lokal olarak uygulanan düşük doz ilaca olan sistemik maruziyeti ve böylece sistemik yan etkileri azaltır ve ilaç terapötik indeksini artırır. Akciğerlere verilen küçük partiküller, akciğer epiteline hızla yayılır ve birkaç dakika içinde kan dolaşımına nüfuz eder. Peptitler de hızlı bir şekilde sistemik sirkülasyona taşınır ancak önemli ölçüde lokal olarak metabolize edilir. Büyük partiküller birkaç saat boyunca sistemik sirkülasyonda

emilebilse de alveoler makrofajlar tarafından hızla alınabilir, mukosiliyer temizleme mekanizması tarafından çıkarılabilir ve lokal olarak da metabolize edilebilirler. Hızlı temizlenme sık sık doz uygulaması anlamına gelebilir bu da hastanın uyumunu tehlikeye atabilir.

Akciğerlerde sürekli ilaç salımı sağlayan taşıyıcılar, inhale edilen ilaçların terapötik sonuçlarını iyileştirebilir. Amaçları, ilaç yükünü uzun süre akciğerler içinde tutmak ve ilacı lokal olarak terapötik seviyelerde lokal olarak salıvermektir. Sürdürülebilir terapötik ilaç konsantrasyonları, lokal terapötik etkinliği arttırmalı ve sistemik dolaşım boyunca biyolojik dağılımın en aza indirilmesiyle sistemik yan etkileri azaltmalıdır. Ek olarak, sürekli salımlı bir inhale formülasyon, lokal ilaç konsantrasyonlarında pulmoner doku için toksik olabilecek zirvelerden kaçınabilir. Bu özellikle kemoterapötik ajanlarla ilgilidir. Akciğerlerde sürekli ilaç salımı, ilacın salınım hızını ve sistemik dolaşım içine taşınmasını kontrol ederek sistemik etkili ilaçlara da faydalı olabilir. Akciğerlerde sürekli ilaç salımı, inhale edilen ilaçların terapötik etkinliğini ve güvenliğini artırma potansiyeli yüksek olmasına rağmen, pazarda mevcut herhangi bir sürekli salım formülasyonu yoktur. Sadece birkaç sürekli salımlı formülasyonu klinik olarak geliştirilmektedir ve hepsi lipozomlar şeklindedir. Son yıllarda muazzam çabalar, pulmoner biriktirmeyi ve tekrarlanabilirliğini artırmak amacıyla yeni inhaler cihazların ve yeni formülasyonların geliştirilmesine odaklanmıştır. Bununla birlikte, kontrollü salımlı formülasyonların geliştirilmesi yoluyla inhalasyon aerosollerinde daha ileri derecede bir gelişmişliğe ulaşılabilir (Pastoriza ve diğ., 2014).

1.4.2. İn hale bileşiklerin lokal uygunluğunu etkileyen faktörler

Akciğerlere dağıtımdan sonra ilacın lokal uygunluğunu etkileyen birçok faktör vardır. İlk olarak, bir aerosol partikülünün solunum yolunun bir veya başka bir bölgesine yerleşme kabiliyeti aerodinamik çapına bağlıdır. İkincisi ilacın akciğerlerden temizlenme hızı ve oranı fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri ile belirlenir. Üçüncüsü, eğer ilaç formülasyonu sadece ilaç molekülü değilse, fakat bir taşıyıcıyı içeriyorsa, akciğerler içinde kendi temizlenme yollarından mutlaka kaçınmalıdır.

Akciğerlerde partikül birikmesini etkileyen mekanizmalar vardır. Bir aerosol partikülünün akciğerlere biriktirme bölgesi, aerodinamik çapına ve hastanın nefes alma şekline bağlıdır. 1 ila 5 µm aerodinamik çapındaki partiküller, merkezi ve distal kanallara yer çekimsel çökme ile birikir. Aerodinamik çapı 0,1 ile 1 µm arasında olan partiküller çoğunlukla dışarı verilir. Yavaş soluma genellikle üst solunum yollarındaki eylemsizlik etkisini en aza indirmek ve büyük parçacıkların akciğerlerine penetrasyonunu arttırmak için tercih edilirken, küçük parçacıklar hızlı/yavaş soluma manevralarına karşı daha az hassastır. Nefes tutma akciğerlere derinlemesine nüfuz etmiş partiküllere zaman verir. Ultra ince (<100 nm) partiküller, solunum yolundaki rasgele Brownian hareketi ile etkili bir şekilde biriktirilir ve <100 nm partiküller alveoler bölgeye ulaşırken, <10 nm partiküller, yüksek difüzyon katsayıları nedeniyle zaten trakeo-bronşiyal bölgede birikmektedir. Buna göre, büyük (< 5 µm) partiküller, yoğunluğu düşük olduğu sürece akciğerlere derin bir şekilde solunabilir. Partikül şekli, solunum sisteminin farklı bölgelerini hedeflemek için tasarlanabilir. Örneğin, lifler uzunluklarından birkaç kat daha küçük aerodinamik bir çapa sahiptir ve bu da derin akciğer birikmesine izin verir.

Akciğerlerde ilaç emilimini arttıran mekanizmalar vardır. Akciğer epitelinin çok çeşitli ilaç tiplerine yüksek derecede geçirgen olduğu bildirilmiştir. Lipofilik ve iyonlaştırılmamış bileşikler, solunum epitelinden kan dolaşımına hidrofilik bileşiklerden daha hızlı ve daha büyük miktarlarda taşınır. Genel olarak, küçük hidrofilik bileşikler yaklaşık 1 saatlik bir emilim için ortalama yarı ömre sahiptirler, buna karşın lipofilik küçük moleküller yaklaşık 1 dakika içinde emilir. Ayrıca, hava yolu lümeninden sistemik dolaşıma makro molekül taşımalarının oranı, molekül ağırlığı ile ters orantılıdır. 40 kDa'nın üzerinde bir moleküler ağırlığa sahip olan makromoleküller, solumadan birkaç dakika içinde kan dolaşımına ulaşan peptidlere veya daha küçük proteinlere zıt olarak birkaç saat boyunca emilir. Peptitler ve küçük proteinler lokal proteolize maruz kalabilir ve büyük makromoleküller alveolar makrofajlarla temizlenebilir. Solunum epitelinde taşınma mekanizmaları ilacın fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerine bağlıdır. Lipofilik ilaçlar esasen hücreler içerisindeki pasif difüzyonla emilirken, hidrofilik ilaçlar sıkı bağlantılar yoluyla difüzyonla emilir. Bazı bileşiklerin aktif emilim mekanizması olarak ilaç taşıyıcıları kullandıkları gösterilmiştir. İlaç taşıyıcıları akciğerde yüksek seviyede eksprese

edilir. Bağırsakta, karaciğerde, böbrek ya da beyinde eksprese edilen pek çok taşıyıcı da akciğerlerde bulunur. Örneğin, antikolinergik bir ilaç olan ipratropium bromid, organik katyon taşıyıcı Octn2'nin bir substratıdır ve trakeal doku içindeki bu taşıyıcı tarafından aktif olarak emilir. Solunum epiteli, bileşiklerin kan dolaşımına doğru taşınması için kapiler endotelden daha sıkı bir bariyer sunar (Pastoriza ve diğ., 2014).

Akciğerlerde taşıyıcı partiküllerin temizlenmesinde iki ana mekanizma vardır. Her ne kadar bu mekanizmalar havayollarını yabancı maddelere maruz kalmaktan koruyabilseler de, pulmoner ilaç dağıtımına engel teşkil eder. Akciğer yüzeyi makrofajları ile fagositoz, akciğerlerdeki mikropartiküllerin ana temizleme mekanizmasıdır. Semmler-Behnke ve diğerleri sıçanlarda inhalasyondan sonra 18 nm iridyum-192-radyoaktif işaretli partiküllerin ve 2,1 µm polistiren partiküllerin makrofaj alımlarını karşılaştırdı. Geri kazanılan radyoaktivitenin %20'si, nanopartikül verilmesinden sonraki 3 hafta boyunca alveolar makrofajlarla ilişkiliyken, geri kazanılmış mikro partiküllerin %80'i, aynı süre zarfında alveolar makrofajlar içinde tutuldu (Semmler-Behnke ve diğ., 2007). Geiser ve diğerleri yaptıkları çalışmada inhale 20 nm titanyum dioksit partiküllerinin sıçan akciğerlerinden temizlenmesinde akciğer yüzeyi makrofajlarının rolünü araştırdı. 24 saat boyunca akciğer yüzey makrofajları ile inhale edilen dozun yaklaşık %0,1'ini aldığını buldular (Geiser ve diğ., 2008).

Mukosilier temizleme mekanizmaları partikülleri ve solunum yollarında biriken çözeltileri ortadan kaldırır. Moller ve diğerleri yaptıkları bir çalışmada sağlıklı gönüllülerde bolus inhalasyon tekniği kullanılarak hava yolu ve akciğer çevresine 100 nm technetium 99 m etiketli karbon partikülleri hedeflenmiştir. Hava yollarını ve akciğer çevresini hedef alan nanopartiküllerin akciğer tutulumu 24 saat sonra sırasıyla %75 ve %96 idi. Mukosiliyer temizleme nano partiküllerin solunum yollarına tatbik edilmesinin ardından düşük tutulumun olası nedeni idi. Solunum mukusunun bileşimi ve klerensi, solunum hastalıkları çeken hastalarda sıklıkla değişir ve bu inhale ilaç taşıyıcılarının kaderini etkileyebilir (Moller ve diğ., 2008).

1.4.3. Akciğerlerde ilaç salımını kontrol etmek için uygulanan stratejiler

Akciğerlere ilaç vermek, diğer vücut bölgelerine göre birçok avantaja sahiptir, çünkü akciğerler geniş bir alveoler yüzey alanına, ince epitel bariyerine, geniş

vaskülarizasyona ve nispeten düşük enzimatik metabolik aktiviteye sahiptir. İntravenöz mikro kürecik enjeksiyonu ve soluma, ilaçları akciğerlere hedeflemede olası uygulama yollarıdır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar, partikül çapı 5 µm'den büyük olan mikro kürelerin kan kılcal damarlarını tıkayabildiğini ve kronik obstrüktif akciğer amfizemini indükleyebileceğini göstermiştir. Öte yandan, sık soluma akciğer fibrozunu tetikleyebilir. Bu nedenle, ilacın akciğere başarılı bir şekilde verilmesi için uygun bir taşıyıcı sistem tasarlamak çok önemlidir (Park ve diğ., 2010).

Akciğerlerde ilaç salımını sürdürmek için çeşitli formülasyon stratejileri geliştirilmiştir ve en çok incelenen yaklaşım partikül taşıyıcıları olmuştur. Partikül taşıyıcıları ilacın kontrollü bir şekilde terapötik olarak optimal oranda salımını sağlarlar. Bu sistemler, çözünabilir ilaçlara göre birçok avantaj sunar, bu avantajlar 1) akciğerlerde artan ilaç kalma süresi, 2) terapötik ajanın lokal bozulmaya karşı korunması, 3) ilaçları spesifik hücrelere hedefleme olasılığı ve 4) aerosol haline getirme sırasında üretilen kuvvetlere karşı bir stabilite (Pastoriza ve diğ., 2014).

1.4.3.1. Nanotaşıyıcılar

Nanotaşıyıcılar polimerik nanopartikülleri, miselleri, lipozomları ve katı lipid nanopartiküllerini içerir. Bu sistemlerin boyutları birkaç nanometre ile 1 µm arasında değişmektedir. Nanopartiküller, akciğerlerde ilaç salımını sürdürmek için özellikle ilginç taşıyıcılardır, çünkü bunlar, akciğer yüzeyi makrofajlarından büyük ölçüde kaçarak ve haftalarca akciğer dokusunda kalabilirler. Nanopartikülleri formüle etmek için kullanılan polimerler temel olarak PLGA, polikaprolakton, kitosan ve aljinattır (Pastoriza ve diğ., 2014).

1.4.3.2. Mikrotasıyıcılar

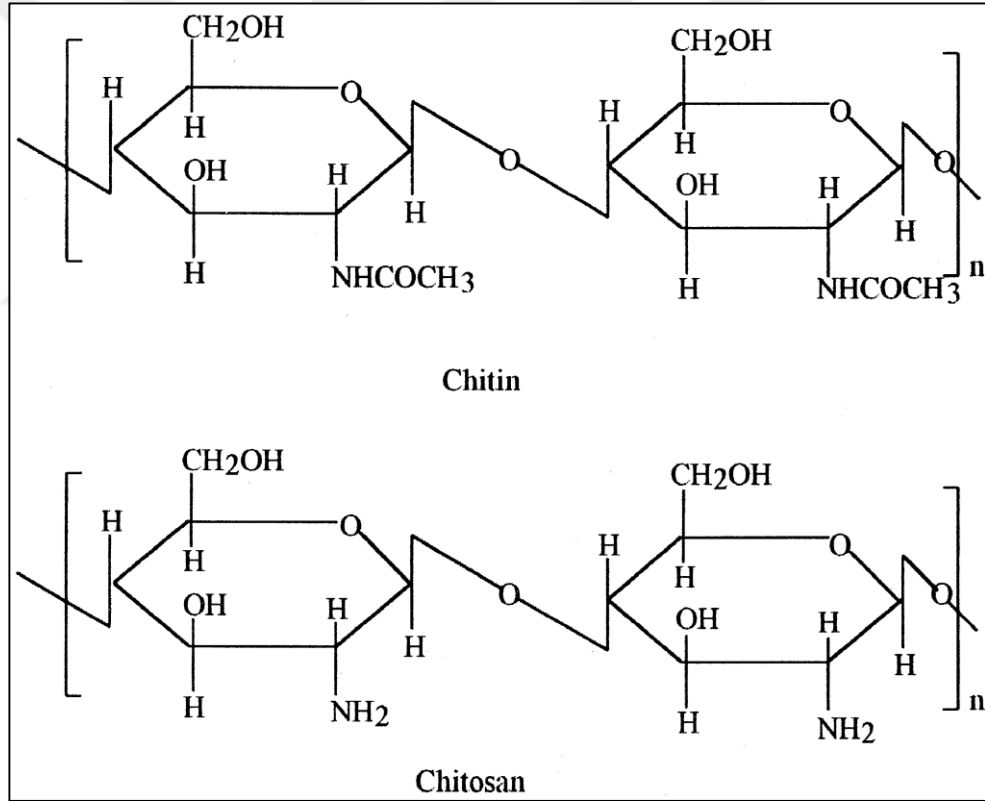
1 ila 3 µm arasında değişen geometrik boyutlara sahip ve 1 g/cm³'ye yakın kütle yoğunluğuna sahip olan geleneksel inhale partiküller, kuru toz inhalatöründeki partikül toplanmasına ve akciğer lümenindeki makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde temizlenmeye eğilimlidir. Büyük geometrik boyuta (>5 µm) ve düşük kütle yoğunluğuna (<0,4 g/cm³) sahip partiküllerin hazırlanması bu sınırlamaları hafifletebilir. Büyük gözenekli partiküllerin büyük geometrik boyutu partikül

dağılımının kolaylaşmasına yol açar. Düşük partikül yoğunluğundan kaynaklanan küçük aerodinamik boyutları, büyük gözenekli partiküllerin üst solunum yollarındaki etkiden etkili bir şekilde kaçmasını ve akciğerlere derinlemesine nüfuz etmesini sağlar. Mükemmel akış özelliklerinin yanı sıra, büyük gözenekli partiküller, büyük geometrik boyutlardan dolayı alveolar makrofajlar ile fagositozdan daha kolay kaçabilirler ve bu nedenle ilaç salgılamasının azalan temizlenmesi nedeniyle sürekli salımlı formülasyonların pulmoner uygulanmasını sağlayabilir. Poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA), pulmoner uygulama için sürekli salımlı mikropartiküllerin hazırlanması için en çok araştırılan polimerdir. Akciğerlerde uzun süreli ilaç salımı için mikropartiküller hazırlamak için PLGA'dan başka malzemeler de kullanılmıştır. Bunlar, aljinat, kitosan veya poli (gliserol adipate-ko- ω -pentadecalakton) gibi diğer polimerlerdendir (Edwards ve diğ., 1997; Ben-Jebria ve diğ., 1999).

1.4.3.3. Kitin ve kitosanın özellikleri

Kitin en bol bulunan doğal amino polisakarittir ve yıllık olarak neredeyse selüloz kadar üretildiği tahmin edilmektedir. Sadece az kullanılan bir kaynak olarak değil, aynı zamanda çeşitli alanlarda yüksek potansiyele sahip yeni bir işlevsel malzeme olarak büyük ilgi görmeye başlamıştır. Kitosan kitinin deasetillenmesiyle oluşmuş doğal bir polimerdir. N-deasetilasyon derecesine göre keskin bir isimlendirme, kitin ve kitosan arasında tanımlanmamıştır. Kitin ve kitosan, sentetik olarak selüloza (%1,25) kıyasla yüksek oranda nitrojen oranı (%6,89) nedeniyle ticari ilgi alanına girer. Günümüzdeki polimerlerin çoğu sentetik malzemeler olduğundan, biyolojik uyumlulukları ve biyolojik bozunabilirlikleri, selüloz, kitin, kitosan ve türevleri gibi doğal polimerlerinkilerden çok daha sınırlıdır. Bununla birlikte, bu doğal olarak bol miktarda bulunan materyaller reaktivite ve işlenebilirliklerinde bir sınırlama sergilerler. Bu bağlamda, uygun fonksiyonel materyaller olarak kitin ve kitosan önerilmektedir. Çünkü bu doğal polimerler mükemmel özelliklere sahiptir. Toksik olmayan, biyoyumlu, antibakteriyel ve biyobozunur özellikleri, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, yara iyileştirici pansuman vb. önemli biyomedikal ve farmasötik uygulamalara yönelik önemli araştırmalara yol açmıştır. Katyonik yapı, kontrollü ilaç salımı, muko-yapışma, yerinde jelleşme, antimikrobiyal, geçirgenlik artırma vb. gibi çeşitli özellikleri için kitosandaki primer amin grubu sorumludur.

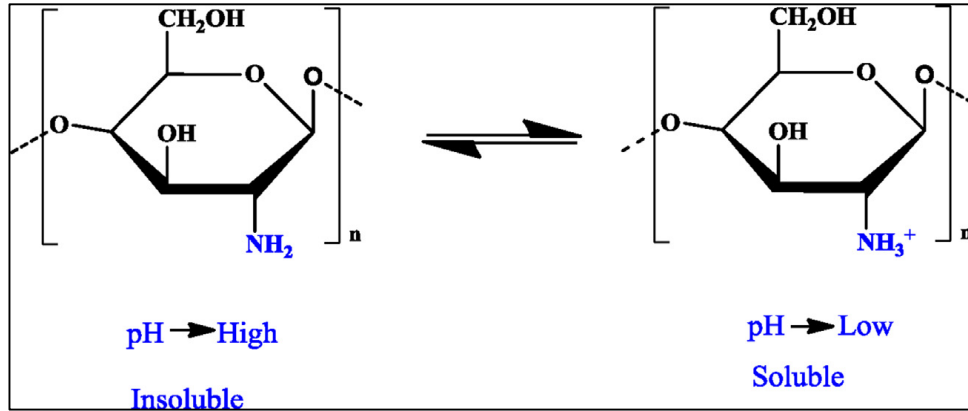
Kitosan, ilk kez 1859'da Rouget tarafından doğal bir polimer kitinin deasetil hale getirilmiş bir formu olarak keşfedilmiş ve tartışılmıştır. 1990'lı yılların başında kitosan ilaç alanına girerek araştırmacıların ve sanayicinin ilgisini daha etkili ve yeni bir tedavi sistemi oluşturmaya teşvik etti. Şekil 1.1 de kitin ve kitosanın yapısı gösterilmektedir. Kitin ve kitosan heteropolimer yapıdadır. Kitosanın çok yönlülüğü aktif amino gruplarından kaynaklanmaktadır. Yapısal olarak, her bir tekrar eden glikosidik birimde bir amino (NH_2) grubu ve iki hidroksil (OH) grubu olan (kopolimer) N-asetil-d-glukosamin ve D-glukosamin ünitelerinden oluşur. Düşük pH'da kitosan, amino grubunun protonasyonu nedeniyle çözünürlük özelliği artırılmış halde poli-katyonik bir tür olarak kalır (Şekil 1.2). (Ali ve Ahmed, 2018; Kumar, 2000).



Şekil 1.1. Kitin ve kitosanın yapısı (Kumar, 2000)

Kitosanın molekül ağırlığı 50-2000 kiloDalton (kDa) arasında değişebilmektedir. Molekül ağırlığına göre düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan diye sınıflandırılır. Kitinin deasetillenmesi sonucu elde edildiği için kitosanın deasetilasyon derecesinden de bahsedilir. Deasetillenme, %40-100 aralığında

gerçekleştirilebilir. Şekil 1.3’de kitinden deasetillenme ile oluşan kitosanın yapısı gösterilmektedir.



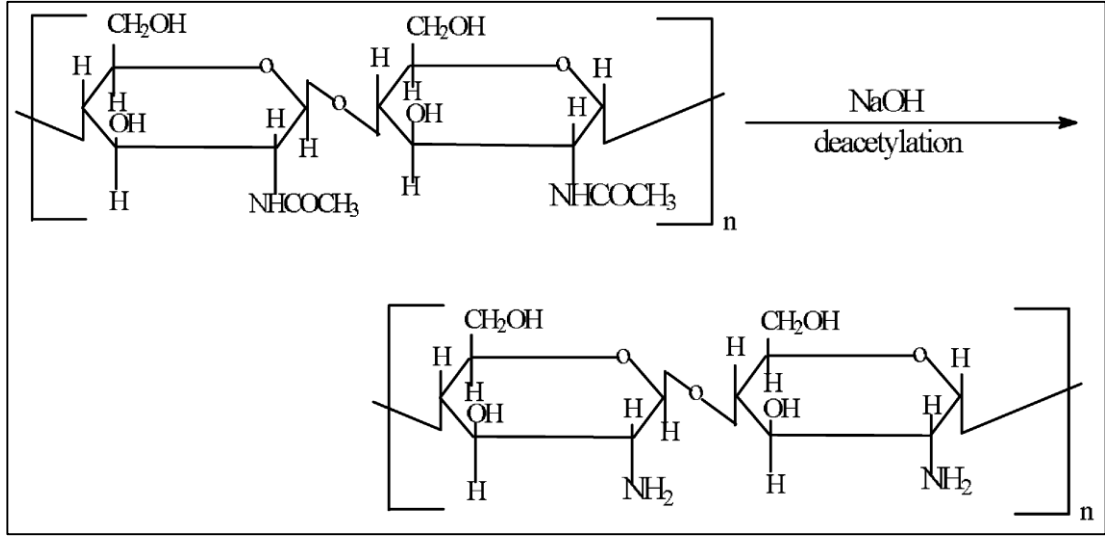
Şekil 1.2. Farklı pH’larda kitosanın yapısı (Ali ve Ahmed, 2018)

Kitosan, zayıf bazik gruplarından dolayı, pozitif yüklü, hidrofilik bir polimerdir. Bu özelliklerden dolayı, negatif yüklü polimerler, makromoleküller ve polianyonlarla etkileşime girme yeteneğine sahiptir. Kitosan zayıf bir bazdır suda ve organik çözücülerde çözünmez ancak seyreltik sulu asidik çözelti içinde çok iyi çözünür (pH < 6,5) (Sinha ve diğ., 2004). Fosforik, sülfürik, sitrik ve sebasik asit gibi asidik çözeltiler kitosan için iyi çözücüler değildir, ancak kitosan; formik, sitrik ve asetik asitin seyreltik çözeltilerinde iyi çözünür. Genellikle asetik asit çözeltisi kullanılır. Çözünürlük deasetillenmeye, derişime, asitin cinsine ve pH’ye bağlıdır. Asit derişiminin azalması ile çözünürlük azalmaktadır (Kumar ve diğ., 2004).

1.4.3.4. Kitosan mikropartiküller

Kitosan birçok amino ve hidroksil grubu içerir. Bu gruplar hem fiziksel hem de kimyasal çapraz bağlanma ile mikropartiküllerin oluşumunda rol oynarlar. İyonik çapraz bağlanma kovalent olmayan bir etkileşimdir ve pozitif yüklü kitosan molekülleri arasına tripolifosfat gibi negatif yüklü iyonların dahil edilmesi ile gerçekleşir (Liu ve Gao, 2009).

Özellikle kitosanın kolaylıkla kimyasal modifikasyona izin veren polimerik omurga üzerindeki aktif amino gruplarının varlığı polimerin hazırlanmasını basit ve kolay hale getirir. Bu özelliklerine dayanarak, kitosan ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için en popüler biyopolimerlerden biri haline gelmiştir (Gökçe, 2008).



Şekil 1.3. Kitinin deasetillenmesiyle kitosan eldesi (Kumar, 2000)

Farklı teknikler kullanılarak kitosan mikropartiküller hazırlanabilir. Bu tekniklerden bazıları; iyonik jelleşme, solvent buharlaştırma tekniği, çoklu emüsyon yöntemi, sprey kurutma yöntemi vb. Çalışmamızda da kullandığımız iyonik jelleşme tekniğinde asetik asit içinde kitosan çözeltileri hazırlanır ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış tripolifosfat sulu çözeltileri manyetik karıştırıcı altında bir iğneyle damla damla ekstrüde edilir. Mikropartiküller partikül boyutuna göre ya filtre edilerek ya da santrifüj edilerek ortamdan toplanabilir (Kaş, 2009).

Kitosan, ilaç verme uygulamaları için gerekli olan biyoyumumluluk ve düşük toksisite gibi iki zorunlu gereksinimi taşımaktadır (Grenha 2012). Ayrıca, kitosan musin ile pH bağımlı etkileşimler yapabilme yeteneği sayesinde yüksek muko adheziv özellik gösterir (Lehr, 1992; Batista ve diğ., 2019). Tüm bu vazgeçilmez özelliklerden dolayı kitosan biyoteknolojide (Mao, 2001), kozmetikte (Kumbıçak ve diğ., 2014) ve gıda biliminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Arora ve diğ., 2012).

Kitosan taşıyıcı uygulamaları ve fonksiyonlarına bağlı olarak çeşitli şekillerde kullanılabilir. İlaç dağıtım sistemlerinde kitosan farklı formülasyonlarda kullanılabilir. Biyo aktif maddelerin kimyasal ve termal stabilitesi, partikül boyutları, nihai ürünlerin kalıntı toksisitesi, salım kinetik profili ve dağıtım sisteminin tipi gibi faktörler göz önünde bulundurularak hazırlama yöntemlerinin seçilmesi gerekmektedir. Mikroküre bazlı dağıtım sisteminin uygulanması, çeşitli polimer ilaç kombinasyonlarının formülasyonunu dikkatlice düzenleyerek ilaç salım profili ve

spesifik hedef bölge üzerinde kontrol sağlar. Bu tür dağıtım sistemi artırılmış yaşam süresi, kontrollü salım hızı ve dahası bölge spesifik ilaç uygulaması sağlar (Ali ve Ahmed, 2018).

Nano ve mikropartiküller, ilaçların ve antijenlerin mukozal taşınması için yüksek potansiyel gösteren dağıtım sistemleridir (Rampino ve diğ., 2013). Kitosan nano-mikropartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi ve ilaç dağıtım özellikleri sıklıkla araştırılmıştır (Sobhani ve diğ., 2017; Du ve diğ., 2008; Sezer ve Cevher 2012). Akciğer enfeksiyonlarının tedavisi için antibiyotiklerin pulmoner yolla uygulanması parenteral ve oral gibi diğer dağıtım yollarına göre birçok avantaj sağlar (Zhang ve diğ., 2011). Akciğerlerden ilaç dağıtımı, solunum yolu hastalıklarında hedefe yönelik bir ilaç tedavisi sağlar. Bir ilacın lokal düşük doz uygulaması, sistemik maruziyetini ve sistemik yan etkilerini azaltır, böylece tedavi endeksini artırır. Ek olarak, portatif bir inhalasyon cihazı hastaya daha kullanışlı bir uygulama yolu sağlar (Pastoriza ve diğ., 2014).

1.4.4. Nano/Mikrotoksikoloji

Nanoteknoloji 21. yüzyılın önemli teknolojilerinden biri olarak kabul edilir ve dünyamızda devrim oluşturmuştur. Çalışmalar nanopartikülleri benzersiz kılan özelliklerinin potansiyel toksisitelerinden de sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur. Nanoteknoloji hali hazırda piyasada 1000'den fazla nano ürün ile hızla ilerlemektedir. Nanomalzemelerin test edilmesinde ve değerlendirilmesinde açık bir düzenleyici kılavuzun bulunmadığı göz önüne alındığında toksikolojik çalışmalar son derece önemli hale gelir. Nanotoksikoloji nanomalzemelerin neden olabileceği olumsuz sağlık etkilerini ele almak için yeni bir toksikoloji dalı olarak önerildi. Nanotoksikoloji fizikokimyasal belirleyicileri, maruz kalma yollarını, biyolojik dağılımını, moleküler belirleyicileri, genotoksisiteyi ve düzenleyici yönleri kapsar. Ek olarak, nanotoksikoloji, insan ve çevresel risk değerlendirmesinde nanomalzemeler için güvenilir, sağlam ve veri güdümlü test protokolleri önermektedir (Arora ve diğ., 2013).

İnhale ilaç molekülleri, diğer invaziv olmayan ilaç dağıtım yollarına göre akciğerlerden daha verimli bir şekilde emilir. İnhale ilaçların terapötik etkinliği, akciğerlerde hızlı temizlenmeleri nedeniyle sınırlıdır. Akciğer yüzey makrofajları

tarafından yapılan fagositoz, akciğerlerdeki mikropartiküllerin temel temizleme mekanizmasıdır. Bununla birlikte, 200 nm'den küçük partikülleri temizlemek için de yetersizdir (Pastoriza ve diğ., 2014).

Üst solunum yolu mukosilier temizleme sistemi tarafından büyük ölçüde tutulan ve temizlenen mikron büyüklüğündeki parçacıklardan farklı olarak 2,5 µm'den küçük olan partiküller alveollere inebilmektedir. İn hale edilen ultra ince partiküllerin (aerodinamik çap <100 nm) birikimi esas olarak alveoler bölgede meydana gelir. Alveoler bölgede, inhale ultra-ince partiküller biriktirilir. Akciğer epitelinden emildikten sonra, nanomateriyaller kemik iliğine, lenf nodlarına, dalak ve kalp hücrelerine ulaşmak için kan ve lenf hücrelerine girebilir. Kardiyovasküler olaylar ve ultra küçük partiküller arasındaki ilişki pıhtılaşma ve kardiyak ritim bozukluklarına neden olması gibi problemlerle kanıtlanmıştır (Arora ve diğ., 2012).

Nano/mikropartiküllerin şekilleri toksisiteyi etkilemektedir. Uzun şekilli partiküllerde, küresel partiküllere kıyasla daha yüksek bir akciğer toksisitesi rapor edilmiştir. Yüklü partiküller de, akciğerlerde nötr partiküllerden daha kolayca birirmektedir (Pastoriza ve diğ., 2014).

Mikropartiküller alveoler makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde fagositozlanır ve temizlenirken, 1 µm'den küçük partikül boyutuna sahip olan mikropartiküller fagositozdan ve mukosilier temizlemeden kaçabilirler (Kunda ve diğ., 2015).

Hem kütle bazlı hem de yüzey alanı bazlı maruz kalma metrikleri kullanılarak nano ölçekli ve mikro ölçekli malzemeler arasındaki toksisitenin akciğer ve bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri karşılaştırılması için seçilen maruz kalma konsantrasyonları ile test için iki farklı C60 agrega boyutu (50 nm ve 1 µm) seçilmiştir. Hem sıçanlarda hem de farelerde görülen akciğer histopatolojisi değerlendirmelerinden kaynaklanan insidans ve ortalama şiddetin genel karşılaştırması, nano-C60 test maddesinin, her iki partikül boyutu için aynı kütle bazlı maruz kalmada mikro-C60 test maddesine kıyasla daha büyük bir inflamatuvar tepki başlattığını göstermektedir. Bununla birlikte, maruz kalma yüzey alanına göre değerlendirildiğinde, bunun tersi gözlenmiştir; mikro-C60 test maddesi nano ile karşılaştırıldığında daha büyük veya en azından benzer bir inflamatuvar tepki başlatmıştır. Bu veriler, nano ve mikropartiküller arasındaki toksisiteyi

değerlendirirken dozlamının önemini vurgulamaktadır. Ancak mevcut paradigma nanopartiküllerin aynı bileşiminin mikropartiküllerinden daha toksik olabileceği yönündedir (Sayers ve diğ., 2016).

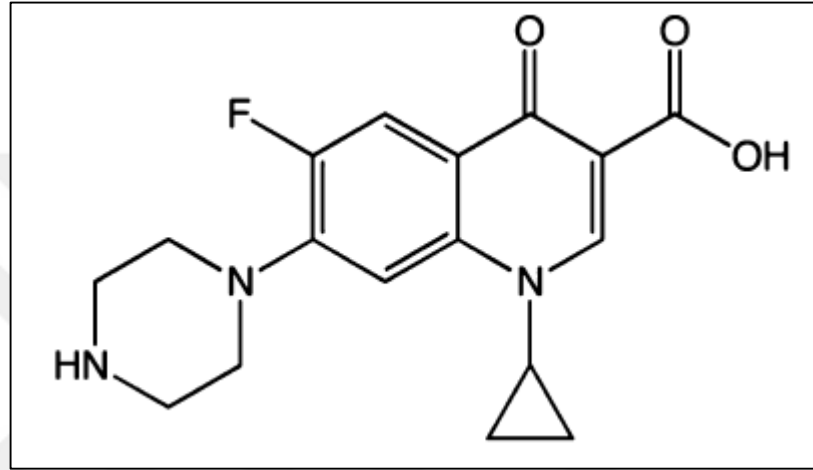
1.4.4.1. Kitosan toksisitesi

Kitosan, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu bir polimer olarak kabul edilir. Japonya, İtalya ve Finlandiya'daki diyet uygulamaları için ve yara sargılarında kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır. Kitosan üzerinde yapılan değişiklikler onu az çok toksik hale getirebilir ve artık reaktiflerin dikkatlice çıkarılması gerekir. Kitosanın bir ilaçla formülasyonunun farmakokinetik ve biyo-dağılım profillerini değiştirebileceğini düşünmek önemlidir. Ayrıca, hücresel alım kinetiği, yük etkileşimi nedeniyle değişebilir. Kitosan molekülü üzerindeki pozitif yüklerin dengelenmesi veya azalması, kitosanın hücreler ve mikro-ortam ile etkileşimi üzerinde etkilidir ve genellikle bu hücresel alımın ve toksisitenin azalmasına yol açar. Kovalent bir ilaç konjugatı durumunda, polimerin fizikokimyasal özellikleri (hidrofiliklik) ve konformasyonu, dağıtım ve hücre alımı üzerinde sonuçlanan bir etki ile değiştirilir (Kean ve Thanou, 2010).

1.4.5. Siprofloksasin

Kinolon ilaç sınıfının kurucu üyesi, nalidiksik asit, ilk olarak George Leshner ve arkadaşları tarafından 1962'de klorokin sentezinin bir yan ürünü olarak izole edilen bir naftiridindir. Nalidiksik asit, 1960'larda enterik bakterilerin neden olduğu komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisi için kliniğe sunuldu. 1970'lerde, en fazla dikkat çeken oksolinik asit olan birçok birinci nesil kinolon sentezlendi ve kliniğe sunuldu. Kinolonlar, ikinci nesil kinolonların geliştirildiği 1980'lerin başlarına kadar az kullanılmış bir ilaç sınıfıydı. Norfloksasin, siprofloksasin ve ofloksasin ile vurgulanan bu ikinci nesil yeni ilaçlar, giraza karşı önemli ölçüde geliştirilmiş aktivite, Gram-pozitif organizmalara daha fazla nüfuz etme ve arttırılmış farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler göstermişlerdir. Kinolon iskeletindeki en kritik değişiklikler, C6 pozisyonunda bir florin ve C7'de bir ana halka yer değişikliğidir (piperazin veya metil-piperazin) (şekil 1.4). Kinolonlar yapılarına florin dahil edilmesinden dolayı genellikle "florokinolonlar" olarak adlandırılırlar.

Siprofloksasin kinolon grubu bir antibiyotiktir. İdrar yolu dışındaki önemli aktivitelerde gösterilen ilk kinolon siprofloksasindir. Klinik kullanımda 20 yıldan uzun bir süre sonra, siprofloksasin en çok reçete edilen antibakteriyel ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir ve çeşitli Gram-negatif ve daha az ölçüde Gram-pozitif enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Siprofloksasinin klinik başarısı, özellikle Gram-pozitif türlere karşı daha geniş bir aktivite yelpazesi sergileyen bir dizi yeni nesil kinolon ortaya çıkarmıştır (Aldred ve diğ., 2014).



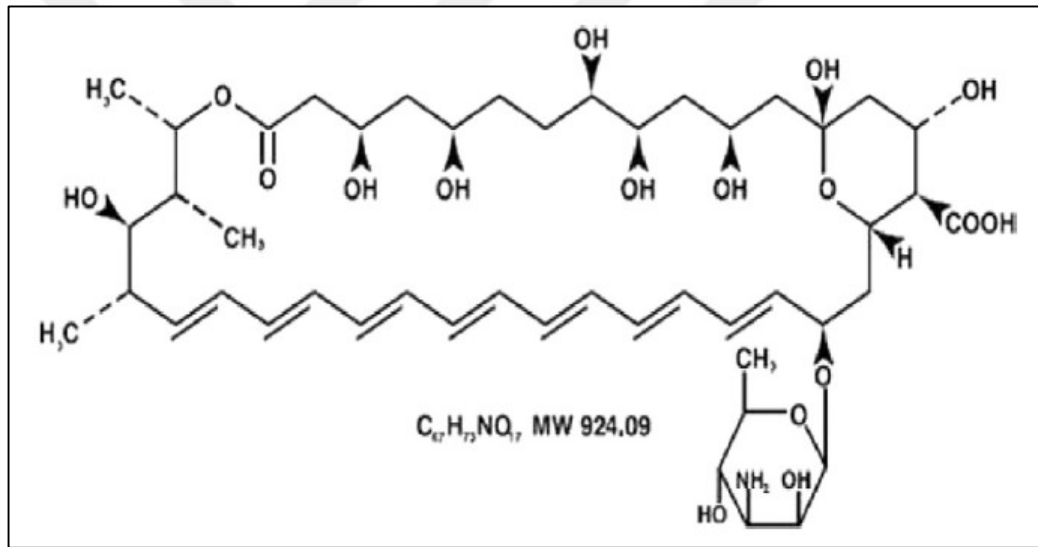
Şekil 1.4. İkinci kuşak bir kinolon olan siprofloksasinin yapısı (Aldred ve diğ., 2014)

Siprofloksasin, solunum yolu enfeksiyonları ve atipik pnömoninin tedavisinde kullanılabilir (Vardakas ve diğ., 2008). Siprofloksasin, *P. aeruginosa* dahil olmak üzere Gram-negatif bakteriler üzerinde geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Gram-pozitif bakterilerin çoğu siprofloksasine orta derecede duyarlıdır. Siprofloksasin, bakterilerin DNA gyrase enzimini inhibe etme etkisine sahiptir (Aldred ve diğ., 2014).

Yeni geliştirilen kinolonlar pnömoni tedavisi için uygun alternatiflerdir, ancak bunlardan birini seçmeden önce antibakteriyel etkisi, maliyeti ve yan etkileri değerlendirilmelidir. Hastalık yapıcı etkenin dirençli bir mikroorganizma olması muhtemel ise yeni kinolonlar kullanılmalıdır (Vardakas ve diğ., 2008).

1.4.6. Amfoterisin B

AmB büyük, oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bir polien makrolid antibiyotik olarak sınıflandırılır; özellikle, bir makrolid olarak bilinir, çünkü bir mikosamin şekeri ile bağlantılı bir poliketit içerir (Cuddihy ve diğ., 2019). AmB'nin bir deoksikolat çözünen tuzu olan Fungizone 1953'ten beri intravenöz infüzyon olarak fungal enfeksiyonlarda kullanılmak üzere pazarlanmaktadır. Bu parenteral formülasyon genellikle, uygulama sırasında ateş, titreme, kusma, baş ağrısı ve mide bulantısı (hastaların%80'i) ve dozdan sonra nefrotoksisite (hastaların %30'u) dahil olmak üzere çeşitli yan etkilerle ilişkilidir. AmB, şekil 1.5'te gösterildiği gibi hem hidrofobik (polien hidrokarbon zinciri) hem de hidrofilik (polihidroksil zinciri) alanlara sahiptir (Bushra ve diğ., 2014).



Şekil 1.5. Amfoterisin B'nin yapısı (Bushra ve diğ., 2014)

AmB, hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek mantar ve konakçı hücrelere zarar verebilir. Klinik kullanım için mevcut olan ilk sistemik antifungal antibiyotiktir ve yeni ajanların etkinliği ve toksisitesinin karşılaştırıldığı standart antifungal tedavi olarak da kullanılmaktadır (Ulozas, 2010).

Fungal pnömoni hemen hemen her zaman filamentli mantarlardan kaynaklanmaktadır. Son yıllarda pulmoner küf enfeksiyonları riski olan insanların sayısı kanser ve otoimmün bozuklukların, transplantasyona giren hasta sayısının artması ve popülasyonun yaşlanması nedeniyle artmaktadır. Fungal pnömoni

hastanede yatan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda karşılaşılan yaygın enfeksiyonlardandır (Maertens ve diğ., 2009). AmB sistemik kandidiyazis, histoplazmoz, mukomikoz, aspergilloz, blastomikoz, kossidioidomikoz, merkezi sinir sisteminin mantar ve maya enfeksiyonları ve fungal peritonit tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ulozas, 2010). Lipozomal formölasyonlar, AmB'nin toksisitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Wijnant et al., 2018). AmB uygulaması sırasında AmB ile ilişkili nefrotoksisiteyi ve diğeryan etkileri azaltmak için farklı taktikler araştırılmaktadır (Bushra ve diğ., 2014).



2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzemeler

Kitosan, tripolifosfat, asetik asit, AmB ve BSA Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Çalışma boyunca intravenöz formda hazırlanan ticari olarak temin edilebilir bir siprofloksasin (HAVER, Selfleks Ciprasel, 400 mg siprofloksasin/200 mL i.v. infüzyon çözeltisi) kullanıldı. Yüksek glikozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle'ın Medium'u (DMEM) Thermo Fisher'dan satın alındı. Primocin, InvivoGen'den satın alındı.

2.2. Yöntem

2.2.1. İyonik jelleşme yöntemiyle BSA yüklü kitosan mikropartiküllerin hazırlanması

Mikropartiküller negatif yüklü tripolifosfat ve deasetilasyon derecesi %80 olan kitosan kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlandı. %0,5'lik bir asetik asit çözeltisinde 2,5 mg/mL kitosan çözeltisi hazırlandı. TPP, 0,25 mg/mL olacak şekilde distile su ile hazırlandı. 4 mg/mL olacak şekilde BSA stok çözeltisi hazırlandı. BSA, TPP ve kitosan çözeltileri, 0,70 µm'lik bir membran ile filtre edildi.

Mikropartiküller hazırlanırken oda sıcaklığında önce 4,5 mL kitosan çözeltisi ile 0,5 mL BSA çözeltisi (4 mg/mL) karıştırıldı sonra bu karışıma 1 mL TPP çözeltisi 0,3 mL/dak hızla 1000 rpm manyetik karıştırma altında damla damla eklendi. Nihai çözelti, jelleşme için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. BSA yüklü kitosan mikropartikülleri, 10000 g'de 30 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenerek toplandı.

2.2.2. İyonik jelleşme yöntemiyle sefoperazon sulbaktam yüklü mikropartikül hazırlanması

Siprofloksasin ve AmB yüklü mikropartiküller hazırlanmadan önce pnömöni tedavisinde ilk sıralarda tercih edilebilecek çeşitli antibiyotikler iyonik jelleşme

yöntemi kullanılarak mikropartikül yapımı için denendi. Klaritromisin ve tetrasiklin spektrofotometrede absorbans ölçümü yapamadığımız için kullanılamadı. Ampisilin sulbaktam, piperasilin tazobaktam, sultamisin, seftazidim, penbisin, sefotaksim sodyum gibi başka antibiyotikler de tek tek iyonik jelasyon tekniği kullanılarak mikropartikül yapımı için denendi. Ancak bu antibiyotiklerin hepsi de mikropartikül yapımı sırasında % 0,5'lik bir asetik asit çözeltisindeki 2,5 mg/mL olan kitosan çözeltisi ile karıştırıldığında büyük makropartiküller şeklinde agregatlar oluşturdu (Şekil 2.1.). Çözeltinin pH'sı sodyum hidroksit ile pH 5,0'a ayarlandı ve tekrar denendi ancak yine makropartiküllerin oluştuğu görüldü.



Şekil 2.1. Sefoperazon sulbaktam kullanılarak iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan makropartiküller

2.2.3. İyonik jelleşme yöntemiyle siprofloksasin ve amfoterisin B yüklü mikropartiküllerin hazırlanması

Antibiyotik yüklü mikropartiküller negatif yüklü tripolifosfat ve deasetilasyon derecesi %80 olan kitosan kullanılarak iyonik jelasyon metodu ile hazırlandı. %0,5'lik, bir asetik asit çözeltisinde 2,5 mg/mL kitosan çözeltisi hazırlandı. Çözeltinin pH'sı TPP eklenmeden önce sodyum hidroksit ile pH 5,0'a ayarlandı.

TPP, 0,25 mg/mL olacak şekilde distile su ile hazırlandı. TPP ve kitosan çözeltileri, 0,45 µm'lik bir membran ile filtre edildi.

Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller hazırlanırken oda sıcaklığında önce 5 mL kitosan çözeltisi ve 4 mL siprofloksasin çözeltisi (2 mg/mL) karıştırıldı sonra bu karışıma 1 mL TPP çözeltisi 0,3 mL/dak hızla 1000 rpm manyetik karıştırma altında damla damla eklendi. Nihai çözelti, jelleşme için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri, 10000 g'de 30 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenerek toplandı. Hazırlıktan sonra, mikropartiküller liyofilize edildi ve kullanılabilecek kadar vakum altında saklandı. Kontrol kitosan mikropartikülleri ise mikropartikülleri hazırlarken siprofloksasin yerine 4 mL distile su ilave edilerek diğer tüm işlemler aynı olacak şekilde hazırlandı.

AmB yüklü kitosan mikropartiküller hazırlanırken oda sıcaklığında önce 50 µL AmB (20 mg/mL) ile 3950 µL distile su karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 5 ml kitosana eklendi. Elde edilen kitosan AmB karışımına 1 mL TPP çözeltisi 0,3 mL/dak hızla 1000 rpm manyetik karıştırma altında damla damla eklendi. Yine jelleşme için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. AmB yüklü kitosan mikropartikülleri, 10000 g'de 30 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenerek toplandı. Hazırlıktan sonra, mikropartiküller liyofilize edildi ve kullanılabilecek kadar vakum altında saklandı. Kontrol kitosan mikropartikülleri ise mikropartikülleri hazırlarken AmB yerine 50 µL distile su ilave edilerek diğer tüm işlemler aynı olacak şekilde hazırlandı.

2.2.4. Kitosan mikropartiküllerde trehaloz kullanımı

Dondurarak kurutulan nanopartiküller için en çok karşımıza çıkan dondurucu koruyucular trehaloz, sukroz, glukoz ve mannitol gibi şekerlerdir. Biyomoleküller için en çok tercih edileni ise trehalozdur. Bunun nedeni; diğer şekerlere göre daha az higroskopluk, iç hidrojen bağlarının yokluğu ile dondurarak kurutma sırasında nanoparçacıklarla daha esnek oluşumlara izin verme, çok düşük kimyasal reaktivite gibi birçok üstün özeliğe sahip olmasıdır (Gökçe, 2008).

Yeni hazırlanmış nanopartiküller ile artan konsantrasyonlarda kriyokoruyucular kullanıldığında liyofilize edilmiş nanopartiküllerin daha benzer özellikte olduğu

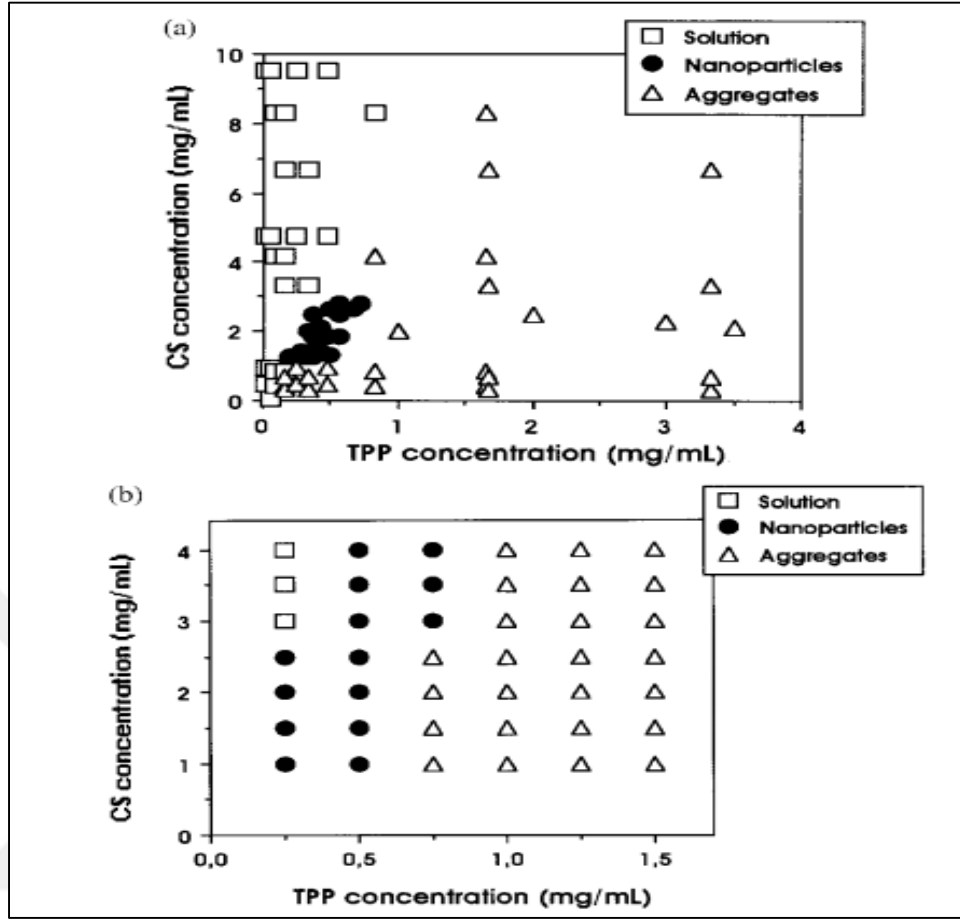
bulunmuştur. Şekerler veya PEG (polietilen glikol), en az %5 (w/v) oranında bir konsantrasyonda nanopartikül süspansiyonuna ilave edildiğinde bu gibi sonuçlar elde edilmiştir (Rampino ve diğ., 2013).

Çalışmamızda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlandığında ilk santrifügasyondan sonra 1 mg trehaloz ile muamele edildi. Liyofilize edilip SEM görüntüsü alındı.

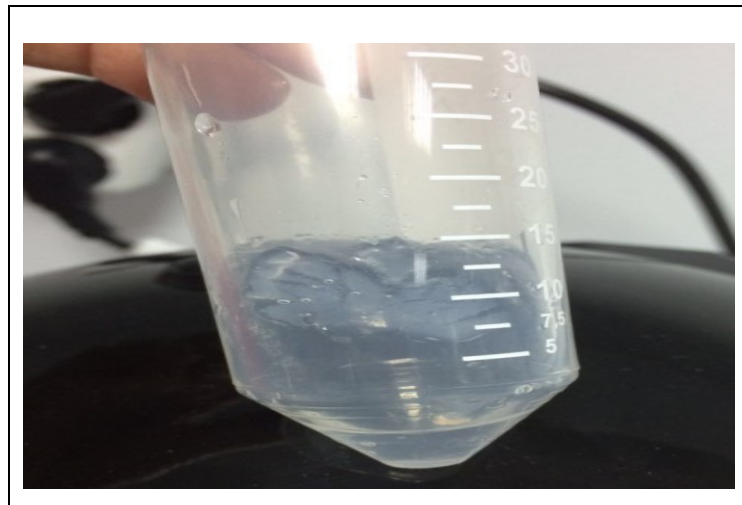
2.2.5. Mikropartikül yapımında kullanılan farklı kitosan-tpo oranları

Farklı oranlarda kitosan ve TPP kullanımının kitosanla üretilen nanopartiküllerin oluşumuna etki ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Calvo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada asetik asit derişimi, tüm deneylerde, kitosaninkinden 1,75 kat fazla seçilmiştir. TPP çözeltisi ise kitosan çözeltisi ile aynı derişimlerde hazırlanmıştır (%0,05, %0,1, %0,5 ve %1 (w/v)). Hazırlanan TPP çözeltileri (0,25, 1,0, 2,0, 2,5 ve 3 ml) oda sıcaklığında manyetik karıştırma altında 5 mL'lik kitosan çözeltisine eklenmiştir. Elde edilen örneklerde üç farklı sistemin oluştuğu gözlenmiştir. Bunlar; berrak çözelti, bulanık süspansiyon ve kümeleşmelerdir. Berrak çözelti, bulanık süspansiyon ve kümeleşmelerin oluşum koşulları kitosan ve TPP derişimine bağılı olarak Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Araştırmacılar en küçük parçacık büyüklüğünü en düşük derişimlerle çalışarak elde etmişlerdir (Calvo ve diğ., 1997).

Çalışmamızda ilaç salımını arttırmak için farklı moleküler ağırlıklarda PEG, jelatin, L-glutamin gibi malzemeleri farklı oranlarda kullanarak kitosan mikropartiküller yapılmaya çalışıldı. Bu oranlar tablo 2.1 de gösterilmektedir. Tablo 2.1'de görüldüğü üzere dört farklı kitosan/TPP oranında mikropartikül elde edildi. Ancak bu dört farklı konsantrasyondan sadece 2,5 mg/mL kitosan ve 0,25 mg/mL TPP içeren formulasyonda ilk santrifügasyon sonrası pellet homojen dağıldı ve in vitro salım değerlendirilebildi. Ancak diğeri üç konsantrasyonda mikropartikül elde edilmesinden sonraki santrifügasyon sonrasında homojen dağılmayan pellet varlığı in vitro salım çalışması yapmayı güçleştirdi. Bu konsantrasyonlarda ilk santrifügasyon sonrası 5 mg trehaloz kullanılmasına rağmen pelletin homojen dağılmadığı görüldü (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Çeşitli kitosan ve TPP derişimlerinde kitosan nanopartiküllerin oluşum bölgesi a. geniş derişim aralığında, b. Nanoparçacıkların oluştuğu derişimlerde (Calvo ve diğ., 1997)



Şekil 2.3. Kitosan mikropartikül elde edilmesinden sonra ilk santrifüjleme sonrasında homojen dağılmayan pellet

Tablo: 2.1. Kitosan mikropartikül yapımında kullanılan kitosan/tpp oranları

Kitosan Konsantrasyonu (mg/mL)	TPP Konsantrasyonu (mg/mL)	Jelatin	PEG (mw 200)	PEG (mw 4000)	PEG (mw 8000)	L-glutamin	Mikropartikül ya da agregat
2,5	5	-	-	-	-	-	agregat
2,5	2	-	-	-	-	-	agregat
2,5	0,25	-	-	-	-	-	Mikropartikül
2,5	2,5	-	-	-	-	-	Mikropartikül
4	2	-	-	-	-	-	Mikropartikül
2,5	0,5	12,5 mg	-	-	-	-	agregat
2,5	0,5	-	10 µl	-	-	-	agregat
2,5	0,8	12,5 mg	-	-	-	-	agregat
2,5	0,8	6,25 mg	-	-	-	-	agregat
1,5	2	1 mg	-	-	-	-	agregat
1,5	2	-	8,8 µl	-	-	-	agregat
2,5	2,5	-	-	-	-	50 µl	agregat
2,5	2,5	-	-	-	-	25 µl	agregat
2,5	2,5	-	-	-	-	5 µl	agregat
2,5	2,5	-	-	0.01 g	-	-	Mikropartikül
2,5	2,5	-	-	-	0,01 g	-	agregat

2.2.6. Kitosan mikropartiküllerin karakterizasyonu

Mikropartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli hazırlandıktan sonraki bir saat içinde fosfat tamponlu tuzlu suda (PBS, pH: 7,4) ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) kullanılarak dinamik ışık saçılımı (DLS) ile belirlendi. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmeden önce hazırlanan mikropartiküllerden suyu uzaklaştırmak için Labconco FreeZone Plus Cascade Freeze Dry System kullanıldı. Numuneler daha sonra altın / paladyum (Sputter Coater BAL-TEC, SCD 005) ile püskürtmeli kaplama ile kaplandı ve Jeol, JSM-6060 veya QUANTA 400F Alan Emisyon SEM ile analiz edildi.

2.2.7. BSA'nın konsantrasyonunun hesaplanması

BSA'nın absorbans ölçümlerini gerçekleştireceğimiz en uygun dalga boyunu belirleyebilmek için OD 200-800 nm arasında tarama yapıldı. Tarama sonucunda OD 750 nm BSA için absorbans ölçümlerinde kullanılacak en uygun dalga boyu olarak saptandı.

BSA yüklü kitosan mikropartikülleri hazırlandığında elde edilen ilk süpernatanttaki protein konsantrasyonu BSA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Süpernatantlardaki protein miktarı 750 nm'de ölçüldü. Standart eğri kullanılarak protein miktarı hesaplandı.

2.2.8. Sipprofloksasin ve amfoterisin B'nin konsantrasyonunun hesaplanması

Sipprofloksasinin ve AmB nin absorbans ölçümlerini gerçekleştireceğimiz en uygun dalga boyunu belirleyebilmek için her iki antibiyotiğe de OD 200-800 nm arasında tarama yapıldı. Tarama sonucunda OD 350 nm hem sipprofloksasin hem de AmB için absorbans ölçümlerinde kullanılacak en uygun değer olarak saptandı.

Sipprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartikülleri hazırlandığında elde edilen ilk süpernatanttaki antibiyotik konsantrasyonu sipprofloksasin standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Süpernatantlardaki sipprofloksasin ve AmB miktarı 350 nm'de ölçüldü. Standart eğriler kullanılarak antibiyotik miktarı hesaplandı.

2.2.9. Mikropartiküllerin yükleme verimliliği ve yüklenen ilaç

Antibiyotik yüklü kitosan mikropartiküllerinin santrifüj edilmesinden sonra elde edilen süpernatant içindeki antibiyotiğin absorbansı bir spektrofotometre (FlexStation3, Molecular Devices, UK) üzerinde 350 nm’de ölçüldü ve antibiyotiklerin konsantrasyonları standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin absorbansı 750 nm’de ölçüldü. Hepsi için yükleme verimliliği (YV) denklem 2.1 ve yüklenen ilaç (Yİ) denklem 2.2 kullanılarak hesaplandı;

$$(\%) YV = \frac{(W_{\text{başlangıç ilaç/bsa}}) - (W_{\text{yüklenmemiş ilaç/bsa}})}{(W_{\text{başlangıç ilaç/bsa}})} \times 100 \quad (2.1)$$

$$(\%) Yİ = \frac{(W_{\text{yüklenen ilaç/bsa}})}{(W_{\text{yüklenen ilaç/bsa}}) + (W_{\text{polimer}})} \times 100 \quad (2.2)$$

$W_{\text{başlangıç ilaç/bsa}}$, mikropartikül üretiminde kullanılacak polimerik çözeltiye ilave edilen ilaç/bsa ağırlığı ve $W_{\text{yüklenmemiş ilaç/bsa}}$ ise, mikropartikül hazırlama işleminin sonunda süpernatanda kalan ilaç/bsa ağırlığı ve $W_{\text{yüklenen ilaç/bsa}}$ ise enkapsüle edilen ilaç/bsa ağırlığıdır. W_{polimer} mikropartikül üretiminde kullanılacak kitosanın ağırlığı.

2.2.10. İn vitro bsa ve ilaç salım çalışmaları

BSA ve antibiyotik yüklü kitosan mikropartikülleri hazırlama işleminin sonunda oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 10000 g’de santrifüjlenerek toplandı. Pelet 1 mL PBS içerisinde dağıtıldı ve 24 kuyucuklu düz dipli bir plakaya aktarıldı ve 37 °C’de inkübe edildi. İn vitro salım absorbansın 350 nm’de (antibiyotikler için) ve 750 nm’de (BSA için) belirli zaman aralıklarında spektrofotometre ile ölçülmesiyle ve ardından serbest bırakılmış ilaç ve protein miktarının standart bir eğriden hesaplanmasıyla değerlendirildi. 10000 g’de 30 dakika santrifüjlemeden sonra elde edilen süpernatanın absorbansı her zaman noktasında ölçüldü ve mikropartiküller taze 1 mL PBS içinde çözüldü. Mikropartiküllerden invitro salım 14 gün boyunca takip edildi.

2.2.11. Antimikrobiyal aktivite testleri

E. coli (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 29213) ve *S. pneumoniae*'ya (ATCC 49619) karşı siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin, kitosan mikropartiküllerinin ve serbest siprofloksasinin antibakteriyel aktivitesi, minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) ve minimum bakteri öldürücü konsantrasyon (MBK) değerlerinin belirlenmesi ile değerlendirildi. Minimum inhibisyon konsantrasyonu The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S24, 2014'de önerilen bir broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Liyofilize kitosan mikropartikülleri %0,1'lik asetik asit içerisinde çözündürüldü. Siprofloksasin ile yüklü farklı miktarlarda kitosan mikropartikülleri içeren toplam 100 µL katyon ayarlanmış Mueller-Hinton broth (MHB) (*E. coli* için toplam ilaç konsantrasyonu aralığı 2450-4,7 µg toplam siprofloksasin/mL, *P. aeruginosa* için 7000-13,6 µg toplam siprofloksasin/mL, *S. aureus* için 7000-13,6 µg toplam siprofloksasin/mL ve *S. pneumoniae* için 7000-54,6 µg toplam siprofloksasin/mL), bir U tabanlı 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına ilave edildi. Diğer üç mikroorganizmadan farklı olarak *S. pneumoniae* için %5 hemolizli at kanı içeren katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (MHB) kullanıldı. Kontrol grubu olarak, her konsantrasyon için aynı miktarda kitosan mikropartikülleri kullanıldı.

Ayrıca serbest siprofloksasin MİK değerlerini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (*E. coli* için 0,1-0,0001 µg/mL, *P. aeruginosa* için 2-0,5 µg/mL, *S. aureus* için 1-0,12 µg/mL ve *S. pneumoniae* için 1024-0,001 µg/mL) uygulandı. 5×10^5 koloni oluşturuvcu ünite (cfu) ml⁻¹ bakteri içeren final inokülasyonlar CLSI kılavuzunun önerdiği şekilde doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlandı ve kuyucuklara ilave edildi. Plakalar 24 saat 37 °C'de inkübe edildi ve bakteri üremesini gösteren bulanıklık veya tortu varlığı açısından incelendi.

MİK tespitinden sonra görünür bir büyüme göstermeyen kuyucuklar çalışılarak MBK belirlendi. *E. coli* ve *P. aeruginosa* için eozin-metilen mavisi ağara (EMB) ve *S. aureus* ile *S. pneumoniae* için koyun kanlı agara 100 µL inokülasyonlar yayıldı. Agar plakaları, 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Bakteriyel büyüme, her plakadaki

bakteri kolonileri sayılarak değerlendirildi ve MBK (bakteri üremesi gözlenmeyen bakterilerin %99,9'unu öldüren en düşük konsantrasyon) belirlendi.

Candida albicans'a (ATCC 90028) karşı AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin, kitosan mikropartiküllerinin ve serbest AmB'nin antifungal aktivitesi, minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) ve minimum fungusit konsantrasyon (MFK) değerinin belirlenmesi ile değerlendirildi. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard) Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) Mayalarda Antifungal Duyarlılık Testi M27-A, 1997'de önerilen bir sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Liyofilize kitosan mikropartikülleri %0,1'lik asetik asit içerisinde çözündürüldü. *C. albicans* için toplam ilaç konsantrasyonu aralığı 870-1,69 µg toplam AmB /mL olan AmB ile yüklü kitosan mikropartikülleri içeren toplam 90 µL RPMI 1640 medium bir U tabanlı 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına ilave edildi. Kontrol grubu olarak, aynı miktarda kitosan mikropartikülleri kullanıldı. Serbest AmB MİK ve MFK değerlerini belirlemede *C. albicans* için 2048-0,003 µg/mL konsantrasyon aralığı çalışıldı. 10×10^4 koloni oluşturuvcu ünite (cfu) ml⁻¹ maya içeren final inokülasyonlar CLSI kılavuzunun önerdiği şekilde doğrudan koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlandı ve kuyucuklara ilave edildi. Plakalar 24 saat 37 °C'de inkübe edildi ve maya üremesini gösteren bulanıklık veya tortu varlığı açısından incelendi.

MİK değerlerinin belirlenmesinin ardından görünür büyüme göstermeyen kuyucuklar çalışılarak MFK değeri belirlendi. Bunun için 100 µL inokülasyon Sabouraud Dekstrozu Agar (SDA) ekildi ve 24 saat 37 °C'de inkübe edildi. MFK değeri agar plaklarda büyüyen maya kolonileri sayılarak değerlendirildi.

2.2.12. Sitotoksitesite testi

Mikropartiküllerin sitotoksitesite değerlendirmesi için sağlıklı insan akciğer epitel hücre dizisi (BEAS-2B) seçildi. Hücreler, %8 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37 °C'de %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %0,1 primosin (InvivoGen) ile desteklenmiş DMEM yüksek glukoz ortamında (Thermo Fisher) büyütüldü. Siprofloksasin yüklü, AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin ve kitosan mikropartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini test etmek için MTT testi kullanıldı. BEAS-

2B hücreleri, altı tekrarda düz tabanlı bir 96 kuyucuklu plaka ($1,0 \times 10^4$ hücre/kuyucuk) içine ekildi ve 24 saat boyunca büyütüldü. Daha sonra, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* için siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK ve MBK değerlerine, *Candida albicans* için de AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin MİK ve MFK değerlerine 24 saat maruz bırakıldılar ve ardından %10 MTT (hazırlanan büyüme ortamında) ile 37 °C’de 4 saat inkübatörde bekletildi. Kontrol grubu olarak, her konsantrasyon için aynı miktarda kitosan mikropartikülleri kullanıldı. Süre sonunda MTT solüsyonu atıldı ve tüm kuyucuklara 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilerek ve 96 kuyucuklu plakalar 5 dakika boyunca orbital karıştırıcıda (Heidolph Titramax 101) 300 rpm devirde çalkalanarak formazan kristalleri çözüldü. Spektrofotometrede (FlexStation3, Molecular Devices, UK) 570 nm’de absorbans ölçümleri alındı.

2.2.13. Tem analizi

E. coli ve *S. aureus* (1×10^7 hücre), katyon ayarlı 20 mL MHB’ye ayrı ayrı inoküle edildi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin *E. coli* MİK ve MBK değerlerine, *S. aureus* ise MİK değerine 24 saat boyunca maruz bırakıldı. Hücreler 10000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi ve pelletler %2,5 glutaraldehit içerisine sabitlendi, durulandı ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca 0,1 M potasyum fosfat içinde %1 OsO₄ ile yeniden sabitlendi, etanol içinde kurutuldu ve Epon-Araldite reçinesi içinde gömüldü. BEAS-2B hücreleri (yaklaşık $2,5 \times 10^6$ hücre), 75 cm²’lik şişelere ekildi. Hücrelere siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile *E. Coli*’nin MİK değeri ve AmB yüklü kitosan mikropartikülleri *C. albicans*’ın MİK değeri ile aynı konsantrasyonda muamele edildi. Hücreler %8 CO₂ olan inkübatör içinde 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. BEAS-2B hücreleri, accutase çözeltisi kullanılarak toplandı, üç kez PBS içerisinde yıkandı ve 5 dakika 5000 rpm’de santrifüjlendi. Pelet, bir ön fiksasyon adımı olarak 4 °C’de 24 saat 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4) içinde %2,5 glutaraldehid içerisinde sabitlendi ve aynı tampon içinde 1 saat süreyle %1’lik OsO₄ içinde tekrar sabitlendi. Sabitleme işleminden sonra, hücreler fosfat tamponunda üç kez durulandı ve 1 mm büyüklüğündeki %4 agar içeren küçük bloklara gömüldü. Agar blokları artan etanol konsantrasyonlarında (%50, %70, %96 ve %100) dehidre edildi ve Epon-Araldite reçinesine gömüldü. Ultrathin bölümleri (60 nm) uranil asetat ve kurşun sitrat ile

lekelendi ve JEOL JEM 1220 TEM ile incelendi. Muamele edilmemiş BEAS-2B hücreleri kontrol olarak kullanıldı.

2.2.14. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) paket programı ile yapıldı. Normal dağılım uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi. Nümerik değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (25.-75. persentil) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olan nümerik değişkenlerde Tek yönlü varyans analizi ve Dunnet çoklu karşılaştırma testi ile araştırıldı. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için Kruskal Wallis Tek yönlü varyans analizi ve Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile araştırıldı. İki yönlü testlerde $p < 0,05$ istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edildi.

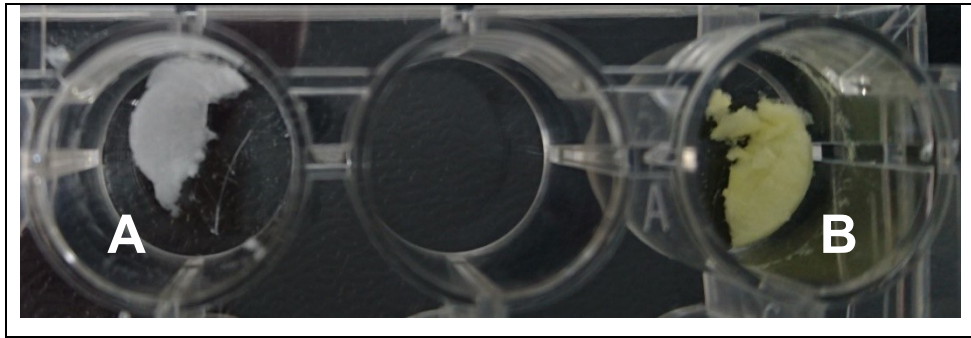
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Kitosan Mikropartiküllerin Makroskopik Görüntüleri

Mikropartiküller hazırlandıktan sonra pellet 24 kuyucuklu plakalarda 1 mL PBS ile sulandırıldı ve hemen hiç vakit kaybetmeden -80 °C'ye kaldırıldı. Donmuş haldeki mikropartiküller daha sonraki deneylerde kullanılmadan önce dondurarak kurutma tekniğiyle (liyofilizasyon) kurutuldu. BSA yüklü kitosan mikropartiküllerin liyofilize edildikten sonraki görüntüsü şekil 3.1.'de, siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin liyofilize edildikten sonraki görüntüsü ise şekil 3.2.'de görülmektedir.



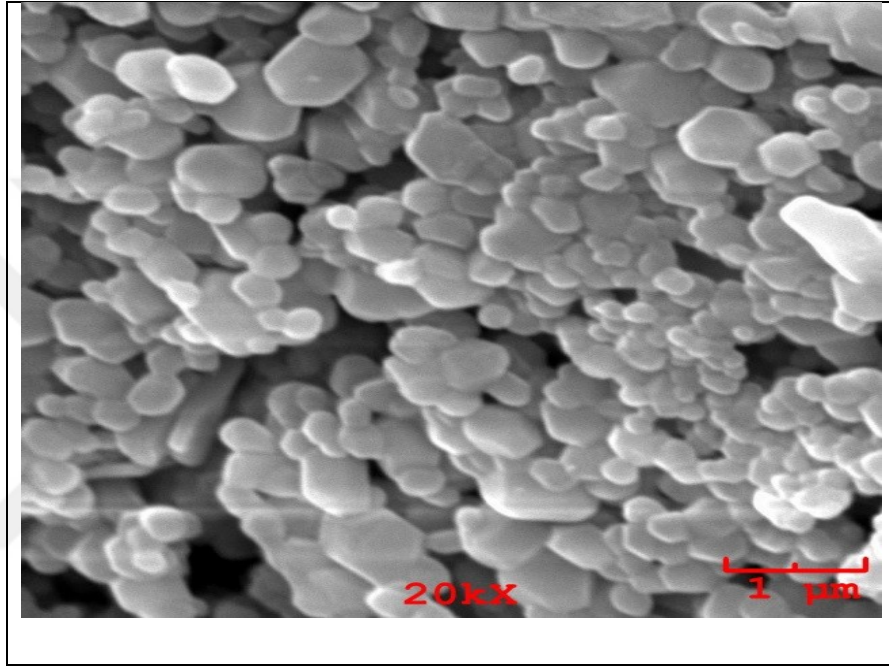
Şekil 3.1. BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin dondurarak kurutma sonrası görüntüsü



Şekil 3.2. Kitosan mikropartiküllerin dondurarak kurutma sonrası görüntüsü; siprofloksasin yüklü (A), AmB yüklü (B)

3.2. Mikropartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Taramalı elektron mikroskop analizleri, BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin, morfolojisi ve boyutlarını ortaya çıkardı (Şekil 3.3) ve iyonik jeleşme metodu kullanılarak kitosan mikropartikül yapabildiğimizi gösterdi. Bu sayede asıl hedefimiz olan antibiyotik yüklü kitosan mikropartiküllerin yapımı için kullanılacak yöntem seçildi.

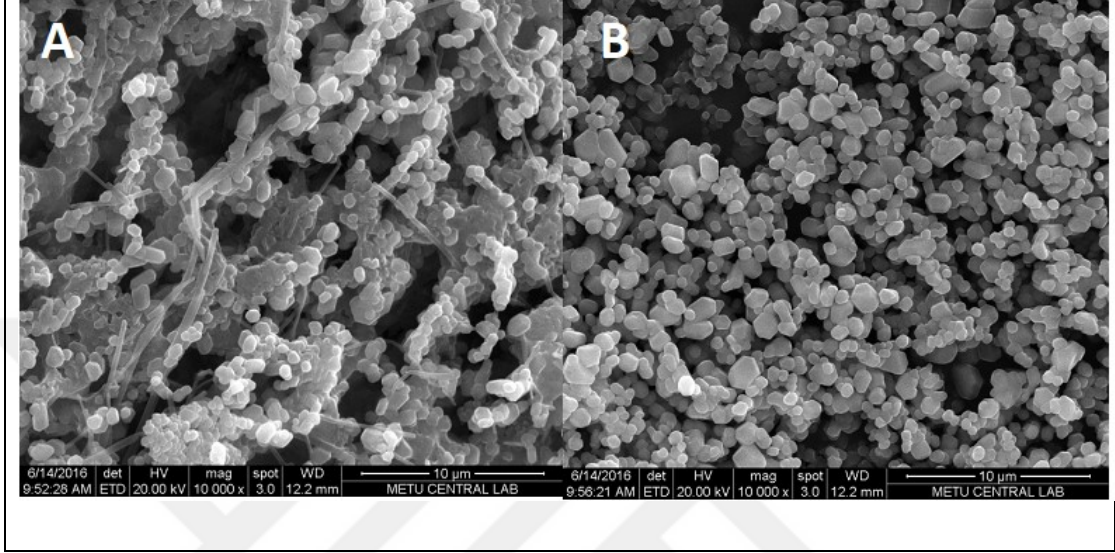


Şekil 3.3. BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin SEM görüntüsü

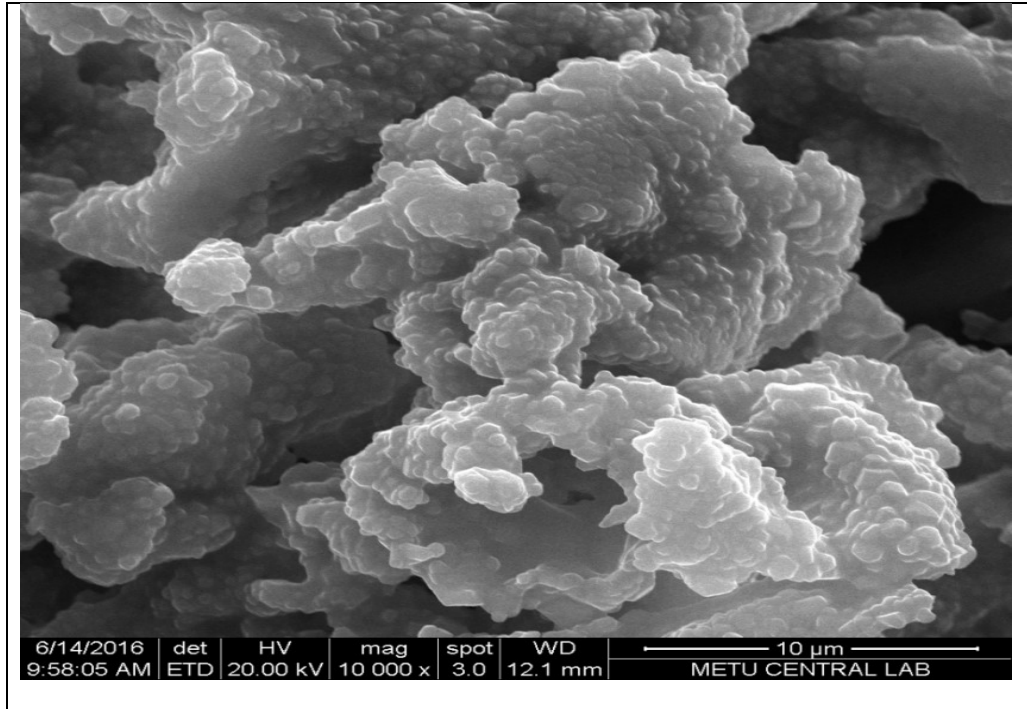
İn vitro salımı arttırmak için kullanılan PEG ile hazırlanan siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküllerin hazırlanması sonrasında oluşan pellet tam olarak homojen dağılmasa da hazırlanan mikropartiküller taramalı elektron mikroskobuna gönderildi. Taramalı elektron mikroskobu sonucunda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerde çubuğumsu yapılar gözlemlendi. Siprofloksasin yüklenmemiş olan kitosan mikropartiküllerde bu çubuğumsu yapılar görülmedi (Şekil 3.4). Elde edilen SEM görüntüleri değerlendirildiğinde in vitro ilaç salımını arttırmak için PEG kullanımından vazgeçildi.

Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül hazırlandıktan sonra liyofilize haldeki mikropartiküllerin taze hazırlanmış mikropartikül özelliği gösterebilmesi için 1 mg trehaloz kullanıldı. Trehaloz ile muamele edilen siprofloksasin yüklü kitosan

mikropartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü şekil 3.5’de gösterilmektedir. Trehaloz kullanılmasına rağmen pelletin homojen dağılmaması ve taramalı elektron mikroskop görüntüsünde mikropartiküllerin kümeleşme eğiliminde olması sonucunda trehaloz kullanılmamaya karar verildi.



Şekil 3.4. Taramalı elektron mikroskop görüntüleri; (A) Siprofloksasin yüklü Kitosan-PEG mikropartikülleri (B) İlaç yüklü olmayan Kitosan-PEG mikropartikülleri



Şekil 3.5. Trehaloz ile muamele edilen siprofloksasin yüklü mikropartiküllerin taramalı elektron mikroskop görüntüsü

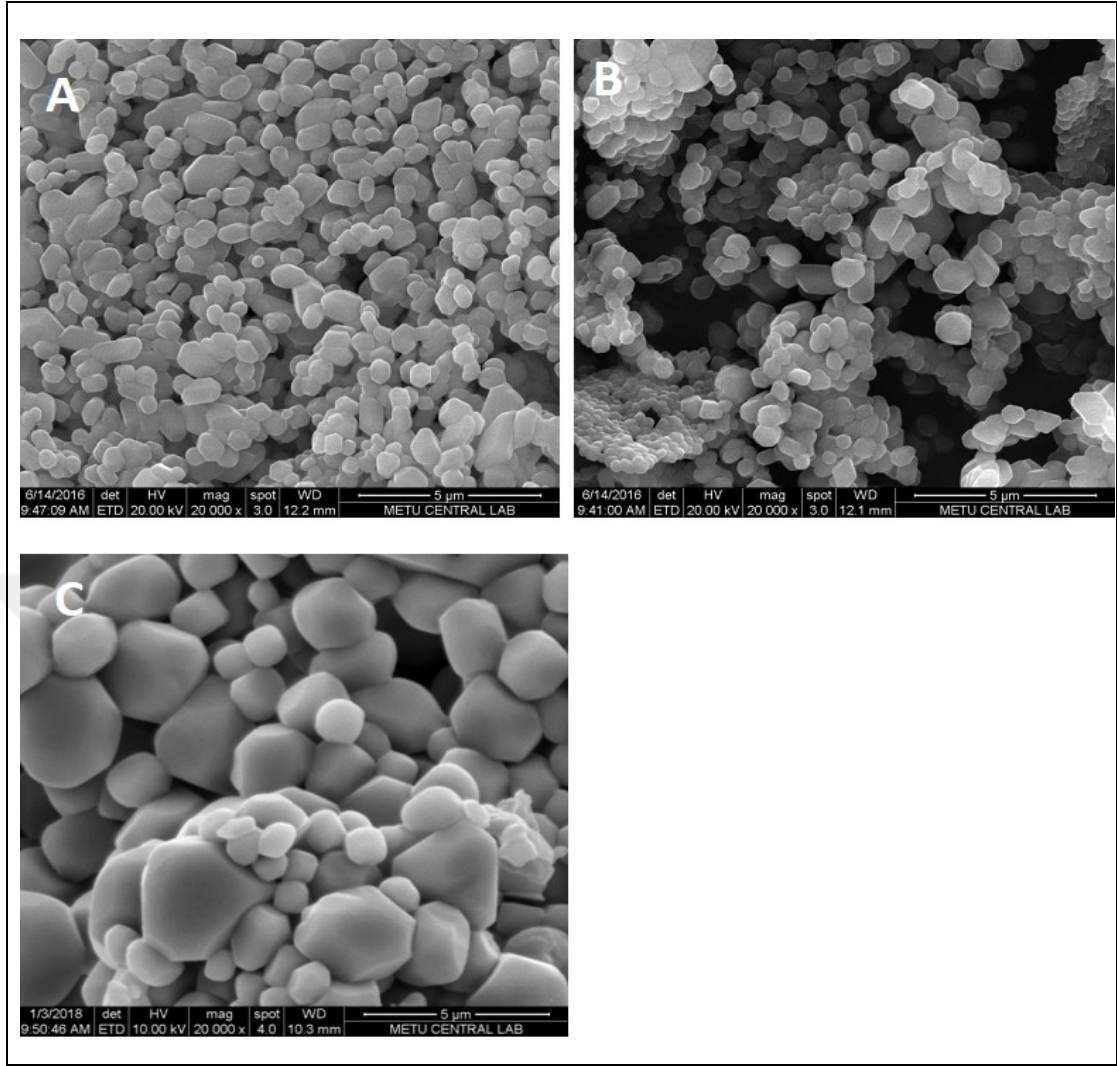
Tüm bu denemelerden ve taramalı elektron mikroskobu sonuçlarından sonra siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak kimyasallar, kitosan/TPP konsantrasyonları belirlenmiş oldu. Saf kitosan mikropartiküller, siprofloksasin yüklü ve AmB yüklü kitosan mikropartiküller bu oranlarda hazırlandı. Taramalı elektron mikroskop analizleri, saf kitosan mikropartiküllerinin, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin morfolojisi ve boyutlarını ortaya çıkardı (Şekil 3.6.).

Bu çalışmada hazırlanan mikropartiküller çokgen bir şekle sahip ve agregat oluşturma eğiliminde. Rampino ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, iyonik jelleşme yöntemiyle hazırlanan kitosan nanopartiküllerin kümelenme seviyeleri ilk iki saatte hızla artmış ve 24 saat sonra da hala devam etmiştir (Rampino ve diğ., 2013).

3.3. Mikropartiküllerin Büyüklük ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri ZetaSizer ile tek kullanımlık küvetlerde 25 °C’de yapıldı. Partiküllere siprofloksasin yüklenmesi, partiküllerin morfolojisinde veya boyutunda herhangi bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 3.6. ve Tablo 3.1.), ancak mikropartiküllerin zeta potansiyeli siprofloksasin yüklenmesi ile azaldı (Tablo 3.1.). Partiküllere AmB yüklemesi ile partiküllerin morfolojisi ve zeta potansiyelleri değişmezken (Şekil 3.6. ve Tablo 3.1.) partiküllerin boyutunda bir artış gözlenmektedir (Tablo 3.1.). Saf kitosan mikropartiküllerinin, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin polidispersite indeksleri sırasıyla 0,737, 0,476 ve 0,877 olarak bulundu.

Mikropartikül hazırlandıktan sonraki bir saat içinde gerçekleştirilen ölçümlerimiz, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin $720,9 \pm 153,3$ nm boyutunda olduğunu gösterdi. Yine aynı şekilde mikropartikül hazırlandıktan sonraki bir saat içinde gerçekleştirilen ölçümlerimiz, AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin $1127,5 \pm 130,9$ nm boyutunda olduğunu gösterdi. Mikropartiküllerin siprofloksasin için sadece ~%10’u, 100 nm’den küçük, AmB için sadece ~%11’i 100 nm’den küçük bir boyuta sahipti; bunlar ortalama partikül boyutunun belirlenmesine dahil edilmedi.



Şekil 3.6. Kitosan mikropartiküllerin taramalı elektron mikrografları. (A) Kitosan mikropartikülleri, (B) siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri, (C) AmB yüklü kitosan mikropartikülleri

Tablo 3.1. Saf kitosan mikropartiküllerinin, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli (SD: Standart sapma (n = 3))

	Partikül büyüklüğü (nm)	Zeta potansiyel (mV)
	(ortalama $\pm$ SD)	(ortalama $\pm$ SD)
Kitosan mikropartiküller	712,2 $\pm$ 122,2	(+) 48,4 $\pm$ 6,2
Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller	720,9 $\pm$ 153,3	(+) 32,3 $\pm$ 3,9
Amphoteresin b yüklü kitosan mikropartiküller	1127,5 $\pm$ 130,9	(+) 48,6 $\pm$ 1,4

Aynı iyonik jelasyon metodu ile hazırlanmasına rağmen, siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan partiküllerinin geliştirilmesini içeren çok yakın tarihli çalışmalarda, partiküllerin nano aralıkta bir büyüklüğü vardı, genellikle ≤ 200 nm, muhtemelen bileşenlerin konsantrasyonlarındaki farklılıklar, kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi, partikül oluşumu sırasındaki karıştırma hızı ve reaksiyonun gerçekleştiği pH nedeniyle partikül büyüklüğü farklı olmuştu (Elbi ve diğerleri., 2017; Sobhani ve diğerleri., 2017; Marei ve diğerleri., 2019; Patel ve diğerleri., 2019; Jain ve diğerleri., 2018; Singh ve diğerleri., 2015).

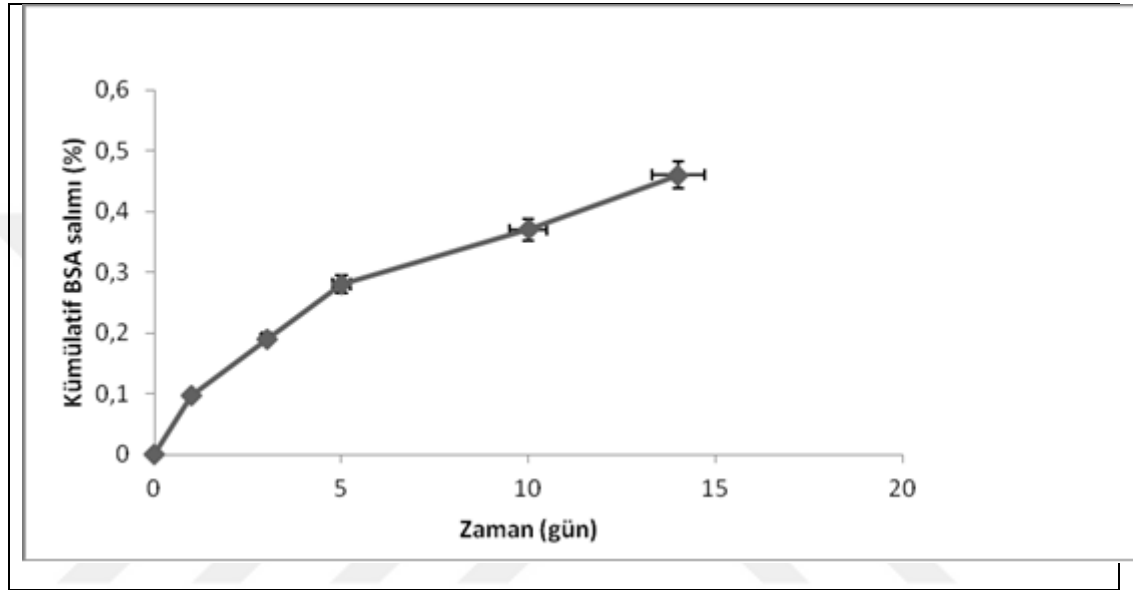
Liu ve Gao'nun çalışmasına göre, çözeltinin pH'ı partikül boyutunu ve yüzey yükünü etkileyen en büyük faktördür (Liu ve Gao, 2009). Çalışmamızda, mikropartiküller pH 5,0 olan bir çözelti içinde hazırlandı. Zeta potansiyeli, bir sıvıyla temasta olan partiküllü bir malzemenin yüzey elektrik yükünü bilmemize yarayan yararlı bir göstergedir ve kolloidal süspansiyonların stabilitesini tahmin etmek için kullanılabilir (Kim ve diğerleri, 2008; Mu ve Feng, 2001). Yüklerinden bağımsız olarak daha yüksek bir zeta potansiyeli değeri, daha dengeli bir süspansiyon anlamına gelir, çünkü yüklü parçacıklar birbirlerini daha iyi iter ve kümeleşme eğilimlerinin üstesinden gelir.

Çalışmamızda, zeta potansiyel değeri daha yüksek olan saf kitosan mikropartikülleri ve AmB yüklü kitosan mikropartikülleri, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinden daha düşük agregasyon eğilimine sahipti, bu aynı zamanda SEM mikrograflarında da belirgindi. Zeta potansiyeli, tuz konsantrasyonu, pH ve yüzey aktif madde konsantrasyonu gibi faktörlerle birlikte değişir (Mu ve Feng., 2001). TPP ile iyonotropik jelleşmeyle elde edilen kitosan nanopartiküllerinin kolloidal stabilitesinin hücre kültürü ortamlarında (çalışmamızda kitosan mikropartiküllerini süspanse etmek için kullanılan PBS'nin pH'ı 7.4) su: gliserol (70:30 h / h) (> 24 saate karşı > 4 ay) karışım ortamına göre daha az olduğu bulunmuştur (Goycoolea ve diğ., 2016).

3.4. BSA Yüklü Mikropartiküllerin Yükleme Verimliliğinin, Yüklenen BSA ve İn vitro İlaç Salımının Değerlendirmesi

BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinin yükleme verimliliği, ilaç yüklü her mikropartikül preparasyonundan sonra ölçüldü. Sadece bir kez yapılan ölçümden

elde edilen sonuca göre yükleme verimi %99, yüklenen BSA ise % 14,96 olarak bulundu. Her inkübasyon süresinden sonra süpernatantlardaki proteinin absorbansının 750 nm’de ölçülmesiyle elde edilen kümülatif salım grafikleri, ilk 14 gün içindeki protein salım paternini ortaya çıkardı (Şekil 3.7). Salım grafiği doğrusal bir artış gösterdi. BSA yüklü kitosan mikropartiküller ilk 24 saat içinde ~%0,1 saldı ve devamında 14 gün içinde toplam ~%0,5 salım gösterdi.



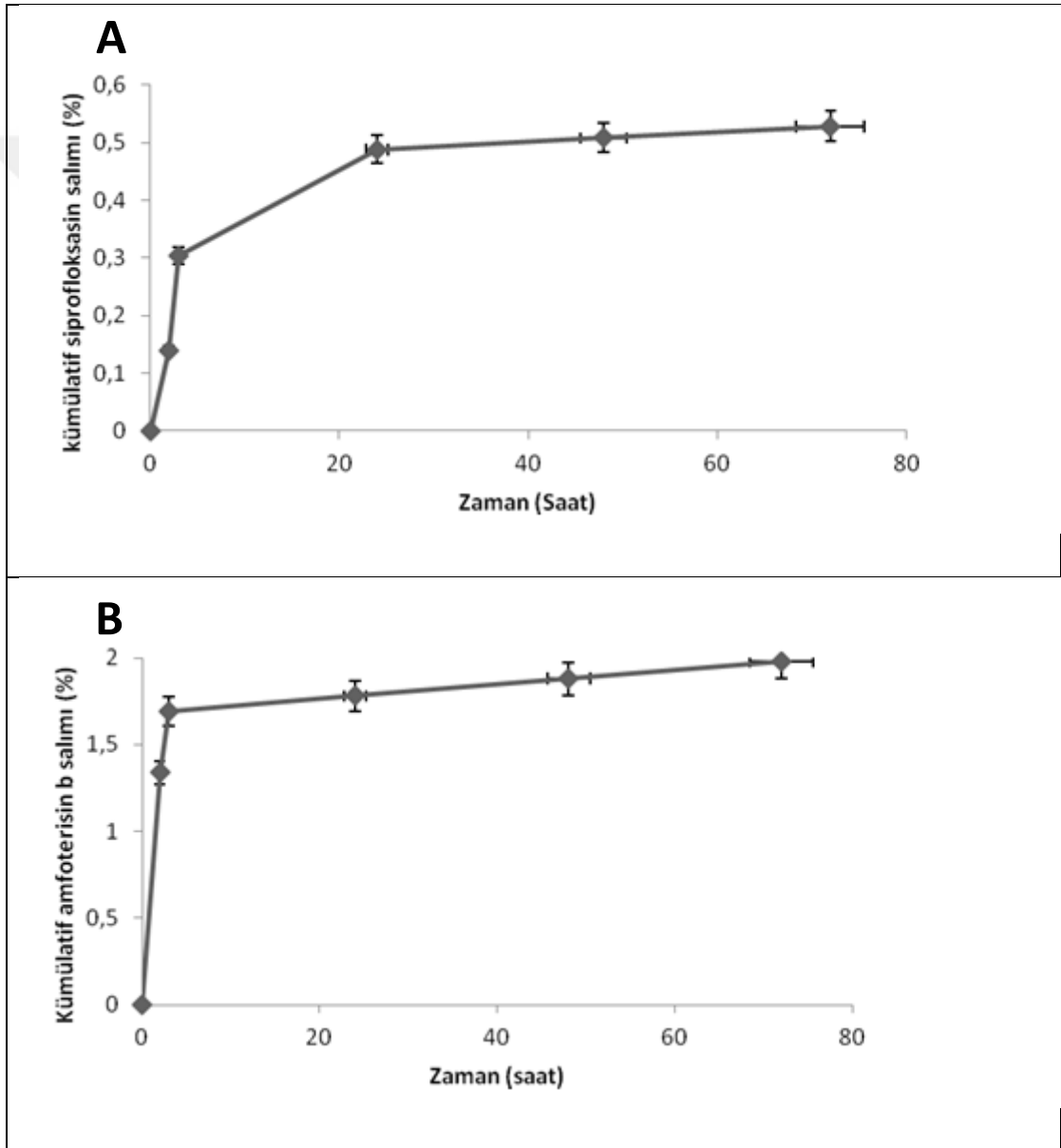
Şekil 3.7.14 gün içinde BSA yüklü kitosan mikropartiküllerinden in vitro protein salımı

3.5. Sipprofloksasin ve Amfoterisin B Yüklü Mikropartiküllerin Yükleme Verimliliğinin, Yüklenen İlaç ve İn vitro İlaç Salımının Değerlendirmesi

Sipprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin yükleme verimliliği, ilaç yüklü her mikropartikül preparasyonundan sonra ölçüldü. Beş bağımsız deneyden elde edilen sonuçlara göre, sipprofloksasin için ortalama yükleme verimi $87,4 \pm 1,6$, yüklenen ilaç ise $35,8 \pm 0,4$ olarak bulundu. AmB için ortalama yükleme verimliliği $87,0 \pm 2,0$, yüklenen ilaç ise $6,5 \pm 0,1$ olarak bulundu.

Her inkübasyon süresinden sonra süpernatantlardaki antibiyotiğin absorbansının 350 nm’de ölçülmesiyle elde edilen kümülatif salım grafikleri, ilk 72 saat içindeki ilaç salım paternini ortaya çıkardı (Şekil 3.8-A ve B). Sipprofloksasin için başlangıçta yüklenen ilaç miktarının 7 mg olduğu ve mikropartiküllerin 24 saat içinde ortalama %0,5 saldıgı göz önüne alındığında, salınan sipprofloksasin miktarı 24 saat sonunda

0,035 mg olarak tahmin edildi (Şekil 3.8-A). Siprofloksasin salımı 24 saat sonra durağan bir noktaya ulaştı ve ardından her 24 saatte bir ortalama %0,02 ilaç salımı gözlemlendi. AmB için başlangıçta yüklenen ilaç miktarının 870 µg olduğu ve mikropartiküllerin 24 saat içinde ortalama %1,78 saldıgı göz önüne alındığında, salınan AmB miktarı 24 saat sonunda 15,5 µg olarak tahmin edildi (Şekil 3.8-B). İlaç salımı 24 saat sonra durağan bir noktaya ulaştı ve ardından her 24 saatte bir ortalama %0,1 ilaç salımı gözlemlendi.



Şekil 3.8.72 saat içinde kitosan mikropartiküllerinden in vitro siprofloksasin salımı (A) ve AmB salımı (B)

Kitosan nano ve mikropartiküllerinin ilaç salım performansı, polimer matriks kompozisyonu ve ayrıca ortamın pH'ı gibi birçok faktörden etkilenir (Liu ve Gao, 2009; Rajan ve Raj, 2012; Ko ve diğ., 2002). Ek olarak, bir taşıyıcı partikülden ilaç salımı, sıcaklık, ultrason ve pH gibi farklı uyaranlarla da tetiklenebilir (Allen ve Cullis., 2013). Bizim çalışmamızda, siprofloksasinin yükleme verimliliği oldukça yüksek olmasına rağmen (yaklaşık %90), siprofloksasinin ~ %0,3'ü 3 saat içinde hızlı bir şekilde ve ~ %0,5'i ilk 24 saatte PBS'e salındı. Siprofloksasinin geri kalanı sonraki 14 gün boyunca olduğu gibi çok yavaş bir şekilde salındı. Çalışmamızda AmB nin yükleme verimliliği yine aynı şekilde oldukça yüksek bulundu (yaklaşık %90). AmB'nin in vitro salım oranı siprofloksasine göre nispeten yüksek olmasına rağmen bulunan değer ilk 3 saatte %1,69 ilk 24 saatte ise %1,78. AmB de takip eden 14 gün boyunca tıpkı siprofloksasin gibi oldukça yavaş bir salım oranı gösterdi. Yapılan bir çalışmada AmB yüklü PLGA mikropartiküllerinde büyük partikül boyutunun uzun süreli in vitro salımla ilişkili olduğu düşünülmüş (Batista ve diğ., 2019).

Kısmen kitosan ve ondan glutaraldehit çapraz bağlanması ile hazırlanan jellerin, lizozim tarafından in vitro olarak parçalandığı rapor edilse de (Hirano ve diğ., 1989), bu tür malzemelerin gerçek in vivo parçalanması hakkında çok az yayınlanmış bilgi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada paradontal dokunun rekonstrüksiyonunda kullanılan kitosan askorbatın yaklaşık iki ayda ağız boşluğunda bozunduğu gözlenmiştir (Muzzarelli ve diğ., 1989). Yine glutaraldehit çapraz bağlı kitosan kürelerin biyobozunması, sıçanların gluteal kasına implantasyon ile 3 aylık bir süre boyunca incelenmiştir. Mikro kürelerin bozunması 3 aylık bir süre içinde gerçekleşmiştir, ancak bozunma çok önemli bir ölçüde gerçekleşmemiştir (Jameela ve and Jayakrishnan, 1995). Yükünün tamamını veya çoğunu 24 saat içinde serbest bırakan siprofloksasin yüklü kitosan nanopartiküllerinin aksine (Elbi ve diğ., 2017; Patel ve diğ., 2019; Marei ve diğ., 2019), yavaş yavaş bırakma paterni nedeniyle çalışmamızda hazırlanan mikropartiküllerin tek bir doz uygulaması ile uzun süreli lokal terapötik bir etkiye sahip olması beklenmektedir.

3.6. Antimikrobiyal Test Sonuçları

CLSI standartlarına göre *Escherichia coli* ATCC 25922 için siprofloksasinin MİK değer aralığı 0,004-0,015 µg/mL. Mikroplate 2A-2B-2C kuyucuğuna 70 µL siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül solüsyonu 130 µL katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2D-2E-2F kuyucuğuna 70 µL siprofloksasin yüklü olmayan kitosan mikropartikül solüsyonu 130 µL katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2G VE 2H kuyucuğuna 0,1 µg/mL saf siprofloksasin yüklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı. Sterilite kontrol kuyucukları hariç her kuyucuğa hazırladığımız 0,5 McFarland süspansiyonundan (1/10 dilüe) 5 µL *E. coli* ATCC 25922 eklendi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Saf siprofloksasin için MİK değeri 0,006 µg/mL olarak bulundu. Yaptığımız çalışmayı gösteren şematik görüntü Şekil 3.9’da gösterilmektedir.

CLSI standartlarına göre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 için siprofloksasinin MİK değer aralığı 0,25-1 µg/mL. Mikroplate 2A-2B-2C kuyucuğuna 100 µL siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül solüsyonu 100 µL katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2D-2E-2F kuyucuğuna 100 µL kitosan mikropartikül solüsyonu 100 µL katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2G VE 2H kuyucuğuna 2 µg/mL saf siprofloksasin yüklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı. Sterilite kontrol kuyucukları hariç her kuyucuğa hazırladığımız 0,5 McFarland süspansiyonundan (1/10 dilüe) 5 µL *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 eklendi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Saf siprofloksasin için MİK değeri 0,5 µg/mL olarak bulundu. Yaptığımız çalışmayı gösteren şematik görüntü Şekil 3.10’da gösterilmektedir. CLSI standartlarına göre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 için siprofloksasinin MİK değer aralığı 0,12-0,5 µg/mL. Mikroplate 2A-2B-2C kuyucuğuna 100 µL siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül solüsyonu 100 µL katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2D-2E-2F kuyucuğuna 100 µL kitosan mikropartikül solüsyonu 100 µL katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Ve

pozitif kontrol kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2G VE 2H kuyucuğuna 1 µg/mL saf siprofloksasin yüklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı. Sterilite kontrol kuyucukları hariç her kuyucuğa hazırladığımız 0,5 McFarland süspansiyonundan (1/10 dilüe) 5 µL *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 eklendi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Saf siprofloksasin için MİK değeri 0,25 µg/mL olarak bulundu. Yaptığımız çalışmayı gösteren şematik görüntü Şekil 3.11’de gösterilmektedir.

CLSI standartlarına göre *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 için siprofloksasinin MİK değeri aralığı yoktur. Liyofilize haldeki siprofloksasin içeren mikroorganizmalar 100 µl %0,1 lik asetik asit ile çözüldükten sonra üstüne 400 µL (%5 hemolizli at kanı içeren) katyon ayarlı mueller hinton broth eklendi. Bu karışımdan mikroplate 3A-3B-3C kuyucuğuna 200 µL kondu. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Kitosan mikropartiküller için aynı işlem tekrarlandı ve mikroplate 3D-3E-3F kuyucuğuna 200 µL eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 100 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 3G VE 3H kuyucuğuna 1024 µg/mL saf siprofloksasin yüklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı. Saf siprofloksasin için yüksek konsantrasyonda siprofloksasin ile başladığımız için dilüsyona ikinci plate ile devam edildi. Platte 2 numaralı kuyucuklara 100 µL liyofilize halde olup %0,1 lik asetik asit ile çözdüğümüz mikropartiküller kondu. 3 numaralı kuyucuklara ise mikroorganizma eklenmedi. 4 numaralı kuyucuklardan itibaren her kuyucuğa hazırladığımız 0,5 McFarland süspansiyonundan (1/10 dilüe) 5 µL *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 eklendi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Saf siprofloksasin için MİK değeri 1 µg/mL olarak bulundu. Yaptığımız çalışmayı gösteren şematik görüntü Şekil 3.12’de gösterilmektedir. CLSI standartlarına göre *Candida albicans* ATCC 90028 için AmB’nin MİK değeri aralığı 0,5-2 µg/mL. Liyofilize haldeki AmB içeren mikroorganizmalar 100 µL % 0,1 lik asetik asit ile çözüldükten sonra üstüne 900 µL RPMI 1640 besiyeri eklendi. Bu karışımdan mikroplate 2A-2B-2C kuyucuğuna 180 µl kondu. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 90 µL seri dilüsyon yapıldı. Kitosan mikropartiküller için aynı işlem tekrarlandı ve mikroplate 2D-2E-2F kuyucuğuna 180 µL eklendi. Ve pozitif kontrol kuyucuğuna kadar 90 µL seri dilüsyon yapıldı. Mikroplate 2G VE 2H kuyucuğuna 2048 µg/mL saf AmB yüklendi. Ve pozitif

kontrol kuyucuğuna kadar seri dilüsyon yapıldı. AmB yüklü kitosan mikropartiküller, kitosan mikropartiküller ve saf AmB için dilüsyona ikinci plate ile devam edildi. Sterilite kontrol kuyucukları hariç her kuyucuğa hazırladığımız 0,5 McFarland süspansiyonundan (1/100 dilüe) 10 µL *Candida albicans* ATCC 90028 eklendi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Saf AmB için MİK değeri 0,5 µg/mL olarak bulundu. Yaptığımız çalışmayı gösteren şematik görüntü Şekil 3.13’de gösterilmektedir.

Yapılan deneyler sonucunda mikropelatete toplam hacmin 100 µL olduğu katyon ayarlı mueller hinton broth içinde 24 saat *E.coli*’nin üreme olan ve olmayan kuyucukları şekil 3.14’de gösterilmektedir. Mikroplatte toplam hacmin 100 µL olduğu %5 hemolizli at kanı içeren katyon ayarlı mueller hinton broth içinde 24 saat *Streptococcus pneumoniae*’nin üreme olan ve olmayan kuyucukları şekil 3.15’de gösterilmektedir. Mikroplatte toplam hacmin 100 µL olduğu RPMI 1640 besiyeri içinde 24 saat *Candida albicans*’ın üreme olan ve olmayan kuyucukları şekil 3.16’da gösterilmektedir. Yapılan şematik şekillerde görüldüğü üzere antibakteriyel aktivite testi sonuçları, sadece sipfloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin bakteriyel büyümeyi inhibe ettiğini fakat çalışılan konsantrasyonlarda kontrol kitosan mikropartiküllerin inhibe etmediğini gösterdi. Bu nedenle, çalışılan belirli mikropartikül konsantrasyonlarında, sipfloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi, sadece mikropartiküllerden salınan sipfloksasine bağlanmıştır. Sobhani ve diğ., (2017) yaptığı bir çalışmada, herhangi bir ilaç yüklü olmayan kitosan nanopartiküllerinin MİK değerlerinin sipfloksasin yüklü emsallerinden yaklaşık en az bin kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Antibakteriyel testin süresi olan 24 saat içinde mikropartiküllerden salınan sipfloksasin miktarı, salım yüzdesi grafiği göz önünde bulundurularak her bir kuyucuk için hesaplandı ve sipfloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesinde kullanıldı. Mikropartiküller 24 saat içinde yüklerinin ortalama %0,5’ini serbest bıraktığından, sipfloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK ve MBK değerleri toplam enkapsüle edilen sipfloksasinin %0,488’ine karşılık gelir (Tablo 3.2.). MİK değerleri sırasıyla *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *S. pneumoniae* için 0,093 µg/mL, 4,27 µg/mL, 17,08 µg/mL ve 1,06 µg/mL olarak belirlenmiştir.

		1 Sterilite kontrolü	2 *(2450)	3 *(1225)	4 *(612,5)	5 *(306,2)	6 *(153,1)	7 *(76,56)	8 *(38,28)	9 *(19,14)	10 *(9,57)	11 *(4,78)	12 Pozitif Kontrol
Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Kitosan mikropartikül	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saf siprofloksasin	G	-	*(0,1) -	*(0,05) -	*(0,025) -	*(0,012) -	*(0,006) -	*(0,003) +	*(0,0015) +	*(0,0007) +	*(0,0003) +	*(0,0001) +	+
	H	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Şekil 3.9. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun E. Coli ATCC 25922 suşu üzerindeki sonuçları. (+) işareti üremeyi, (-) işareti üreme olmadığını göstermektedir. *Her bir kuyucuğa yüklenen siprofloksasini gösterir. Konsantrasyon değerleri µg/mL dir

		1 Sterilite kontrolü	2 *(7000)	3 *(3500)	4 *(1750)	5 *(875)	6 *(437,5)	7 *(218,7)	8 *(109,3)	9 * (54,68)	10 *(27,34)	11 *(13,67)	12 Pozitif Kontrol
Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	C	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Kitosan mikropartikül	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saf siprofloksasin	G	-	*(2) -	*(1) -	*(0,5) -	*(0,25) +	*(0,125) +	*(0,062) +	*(0,031) +	*(0,015) +	*(0,007) +	*(0,003) +	+
	H	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Şekil 3.10. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu üzerindeki sonuçları. (+) işareti üremeyi, (-) işareti üreme olmadığını göstermektedir. *Her bir kuyucuğa yüklenen siprofloksasini gösterir. Konsantrasyon değerleri µg/mL dir

		1 Sterilite kontrolü	2 *(7000)	3 *(3500)	4 *(1750)	5 *(875)	6 *(437,5)	7 *(218,7)	8 *(109,3)	9 *(54,68)	10 *(27,34)	11 *(13,67)	12 Pozitif Kontrol
Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kitosan mikropartikül	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saf siprofloksasin	G	-	*(1) -	*(0,5) -	*(0,25) -	*(0,125) +	*(0,062) +	*(0,031) +	*(0,015) +	*(0,007) +	*(0,003) +	*(0,001) +	+
	H	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

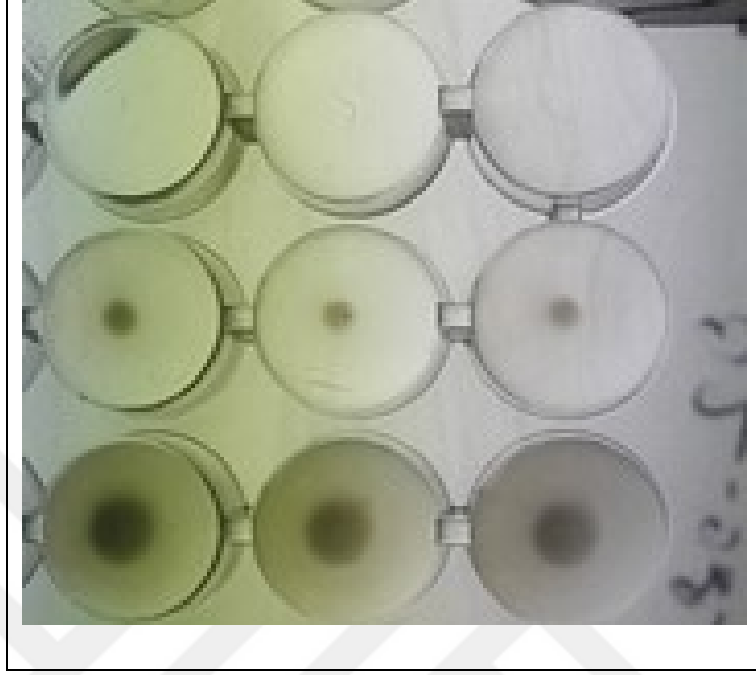
Şekil 3.11. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun *S. aureus* ATCC 29213 suşu üzerindeki sonuçları. (+) işareti üremeyi, (-) işareti üreme olmadığını göstermektedir. *Her bir kuyucuğa yüklenen siprofloksasini gösterir. Konsantrasyon değerleri µg/mL dir

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Sterilite kontrolü			*(7000)	*(3500)	*(1750)	*(875)	*(437,5)	*(218,7)	*(109,3)	*(54,68)	Pozitif Kontrol
Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Kitosan mikropartikül	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saf siprofloksasin	G	-	-	-	*(1024)	*(512)	*(256)	*(128)	*(64)	*(32)	*(16)	*(8)	+
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2.plate		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Sterilite kontrolü											Pozitif Kontrol
	A												
	B												
	C												
	D												
	E												
	F												
Saf siprofloksasin	G	-	*(4)	*(2)	*(1)	*(0,5)	*(0,25)	*(0,125)	*(0,062)	*(0,031)	*(0,015)	*(0,007)	+
	H	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

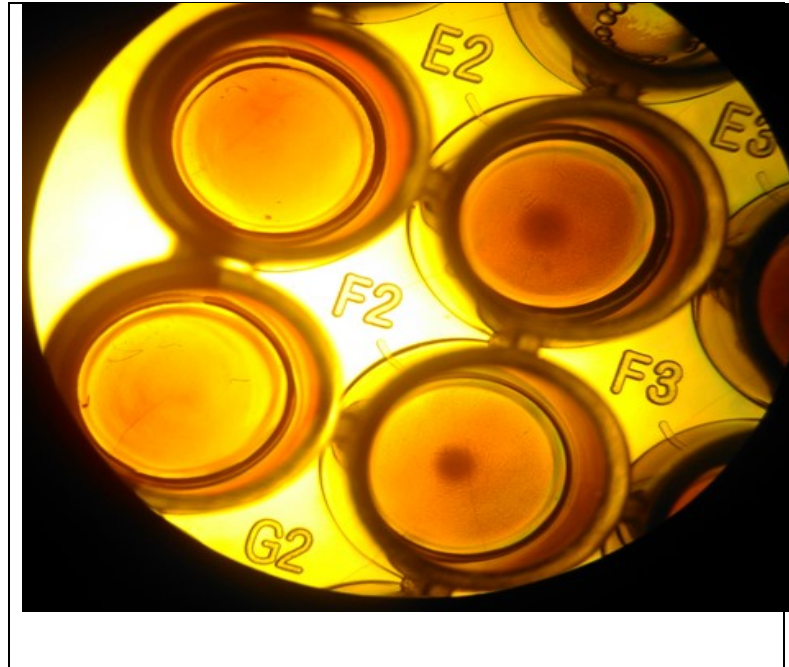
Şekil 3.12. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 suşu üzerindeki sonuçları. (+) işareti üremeyi, (-) işareti üreme olmadığını göstermektedir. *Her bir kuyucuğa yüklenen siprofloksasini gösterir. Konsantrasyon değerleri µg/mL dir

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Sterilite kontrolü	*(870)	*(435)	*(217,5)	*(108,7)	*(54,37)	*(27,18)	*(13,59)	*(6,79)	*(3,39)	*(1,69)	Pozitif Kontrol
Amfoterisin B yüklü kitosan mikropartikül	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Kitosan mikropartikül	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saf amfoterisin B	G	-	*(2048)	*(1024)	*(512)	*(256)	*(128)	*(64)	*(32)	*(16)	*(8)	*(4)	+
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2.plate		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Sterilite kontrolü	*(0,845)	*(0,422)	*(0,211)	*(0,105)	*(0,052)	*(0,026)	*(0,013)	*(0,006)	*(0,003)	*(0,001)	Pozitif Kontrol
Amfoterisin B yüklü kitosan mikropartikül	A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kitosan mikropartikül	D	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	F	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saf amfoterisin B	G	-	*(2)	*(1)	*(0,5)	*(0,25)	*(0,125)	*(0,062)	*(0,031)	*(0,015)	*(0,007)	*(0,003)	+
	H	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

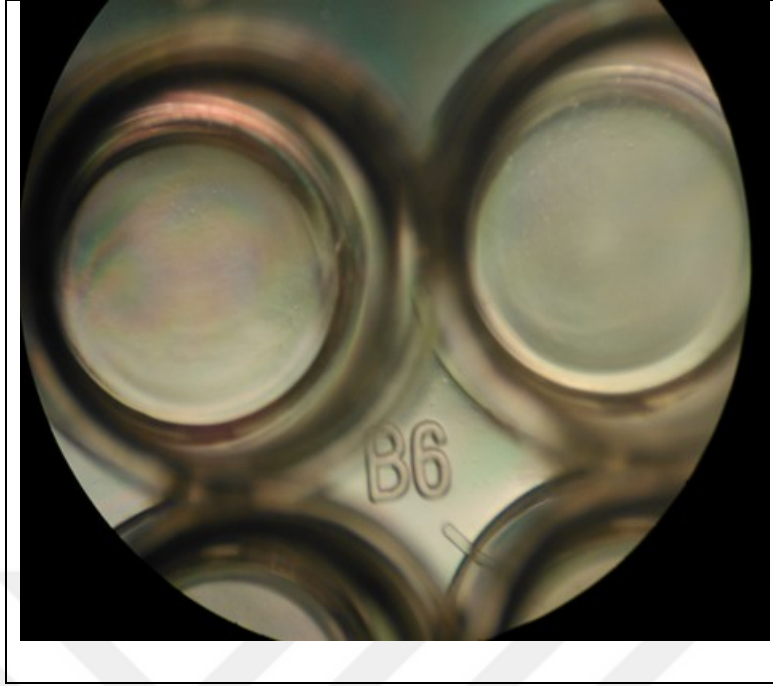
Şekil 3.13. AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin ve kitosan mikropartiküller ile yapılan mikrodilüsyonun *Candida albicans* ATCC 90028 suşu üzerindeki sonuçları. (+) işareti üremeyi, (-) işareti üreme olmadığını göstermektedir. *Her bir kuyucuğa yüklenen AmB'yi gösterir. Konsantrasyon değerleri µg/mL dir



Şekil 3.14. Mikroplaka'da 24 saat *E.coli*'nin üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklarının makroskopik görüntüsü



Şekil 3.15. Mikroplaka'da 24 saat *S. pneumoniae*'nin üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklarının görüntüsü



Şekil 3.16. Mikroplaka’da 24 saat *C. albicans*’ın üreme olan ve üreme olmayan kuyucuklarının görüntüsü

Bakteriyel büyümeyi tamamen ortadan kaldıran antibiyotik konsantrasyonları, Şekil 3.17-A ve 3.17-C’de gösterildiği gibi, *E. coli* ve *P. aeruginosa* için MBK değerleri olarak kabul edildi. MBK değerleri, *E. coli* ve *P. aeruginosa* için sırasıyla 0,093 µg/mL ve 17,08 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 3.2.). Serbest veya kapsüllenmiş formunda en yüksek antibiyotik konsantrasyonunda bile koyun kanlı agarda üzerinde *S.aureus* ve *S. pneumoniae* büyümesi (Şekil 3.17-E, 3.17-G) görüldüğü için siprofloksasinin *S.aureus* ve *S. pneumoniae* üzerinde bakterisidal etkisi olmadığı düşünülmüştür. Beklendiği gibi, muamele edilmemiş tüm petrilerde bakteri üremesi gözlemlenmiştir (Şekil 3.17-B, 3.17-D, 3.17-F, 3.17-H). Çalışmamızda serbest siprofloksasin için belirlenen MİK ve MBK değerleri Tablo 3.2’de gösterilmektedir. Bizim çalışmamızda hazırlanan siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK değeri (mikropartiküllerden 24 saat içinde salınan ilacın konsantrasyonuna tekabül eder) hesaplandığında CLSI standardına göre incelenen mikroorganizmaların büyümesini engellemek için gereken en yüksek serbest siprofloksasin konsantrasyonundan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Öte yandan, çalışmamızda hazırlanan siprofloksasin-kitosan formülasyonunun farmakokinetik ve farmakodinamik davranışı, CLSI standartlarını oluşturmak için kullanılan yöntemlerden farklı olduğu için sonuçlarımızın CLSI standardında verilen referans

değerlerle doğrudan karşılaştırılmasının yapılmaması gerektiğine inanıyoruz. Siprofloksasin mikropartiküllerden zamana bağlı bir şekilde salındığından ve yarı ömrü sadece 5 saat olduğundan (Zinner ve diğ., 2001), ve mikropartiküllerin diğer bileşenleriyle hala kısmen ilişkili olabileceğinden, MİK ve MBK değerlerinde böyle bir artış bu değişkenlere bağlanabilir.

Antifungal aktivite testi sonucunda, sadece AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin maya büyümesini inhibe ettiğini fakat çalışılan konsantrasyonlarda kontrol kitosan mikropartiküllerin inhibe etmediğini gösterdi. Bu nedenle, çalışılan belirli mikropartikül konsantrasyonlarında, AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin antifungal aktivitesi, sadece mikropartiküllerden salınan AmB ile ilişkili bulunmuştur.

Antifungal testin süresi olan 24 saat içinde mikropartiküllerden salınan AmB miktarı, salım yüzdesi grafiği göz önünde bulundurularak her bir kuyucuk için hesaplandı ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK ve MFK değerlerinin belirlenmesinde kullanıldı. Mikropartiküller 24 saat içinde yüklerinin ortalama %1,78'ini serbest bıraktığından, AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK ve MFK değerleri toplam enkapsüle edilen AmB'nin %1,78'ine karşılık gelir (Tablo 3.3.). *Candida albicans* için MİK değeri 0,06 µg/mL olarak bulunmuştur. Maya büyümesini tamamen ortadan kaldıran antibiyotik konsantrasyonu, Şekil 3.18-A'da gösterildiği gibi, *C. albicans* için MFK değerleri olarak kabul edildi. MFK değeri *C. albicans* için MİK değeri ile aynı 0,06 µg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 3.3.). Muamele edilmemiş petride maya üremesi gözlemlenmiştir (Şekil 3.18-B). Çalışmamızda serbest AmB için belirlenen MİK ve MFK değerleri Tablo 3.3'de gösterilmektedir.

Bizim çalışmamızda hazırlanan AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin MİK değeri (mikropartiküllerden 24 saat içinde salınan ilacın konsantrasyonuna tekabül eder) hesaplandığında CLSI standardına göre incelenen mikroorganizmaların büyümesini engellemek için gereken serbest AmB konsantrasyon aralığından daha düşük bulunmuştur. Yani AmB yüklü kitosan mikropartikülleri için bulunan MİK değerinin saf AmB'nin MİK değerine göre yaklaşık 10 kat daha az olduğu bulundu. Mahasen ve diğerleri'nin 2017 de yaptığı çalışmada saf AmB'ye göre AmB yüklü PLGA-PEG nanopartikül formülasyonunun MİK değeri yaklaşık dört kat daha az bulunmuştur.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan bakteriler için serbest siprofloksasin ve siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin MİK ve MBK değerleri

Microorganizmalar	*MİK (µg/mL)	*MBK (µg/mL)	MİK (µg/mL) serbest siprofloksasin	MBK (µg/mL) serbest siprofloksasin
<i>Escherichia coli</i>	0,093	0,093	0,006	0,006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,27	17,08	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	17,08	-	0,12	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,06	-	1	-

*MİK ve MBK değerleri, 24 saat içinde kitosan mikropartiküllerden salınan siprofloksasini gösterir

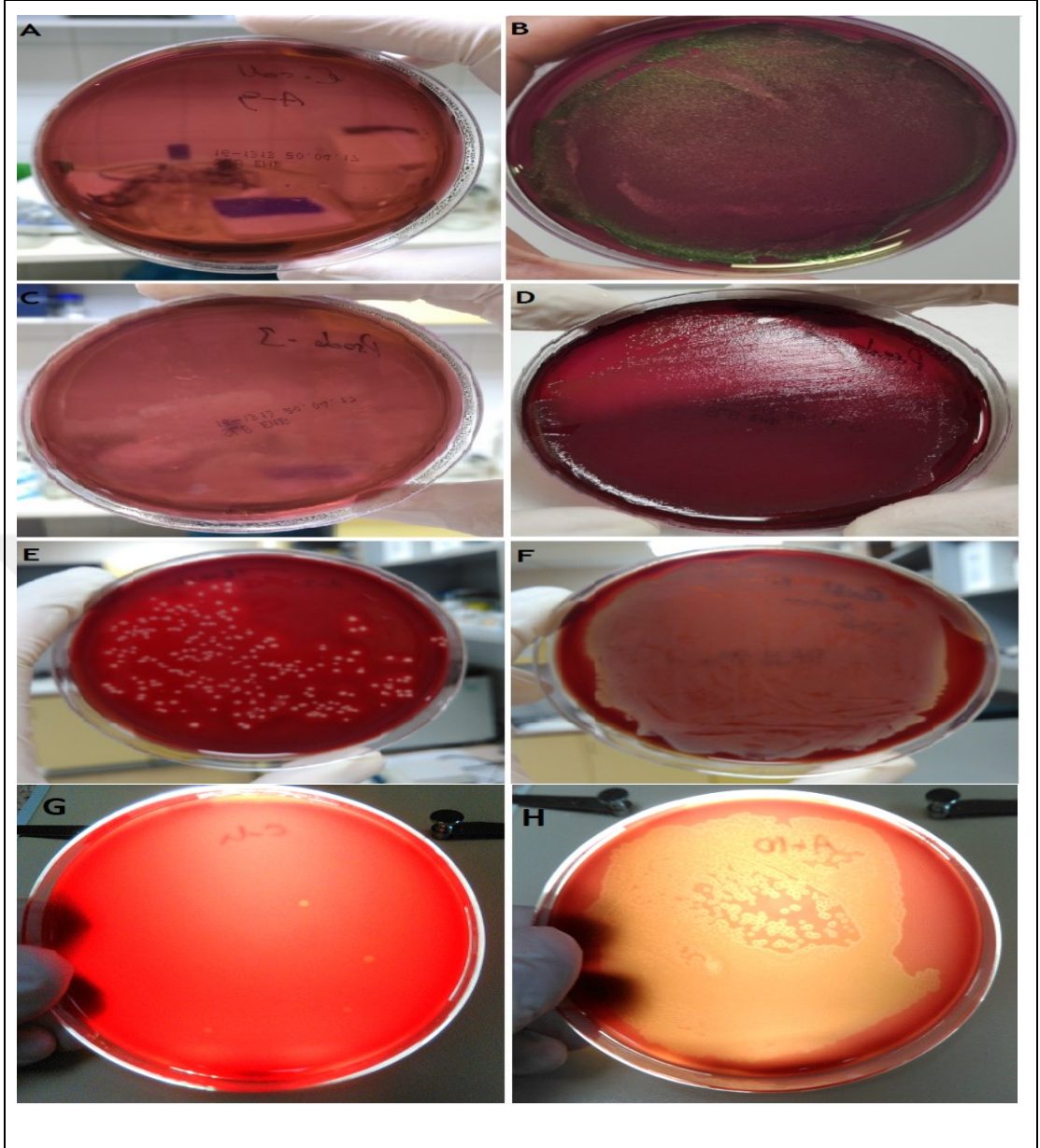
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan *C. albicans* için serbest AmB ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerin MİK ve MFK değerleri

Microorganizma	*MİK (µg/mL)	*MFK (µg/mL)	MİK (µg/mL) serbest amfoterisin B	MFK (µg/mL) serbest amfoterisin B
<i>Candida albicans</i>	0,06	0,06	0,5	0,5

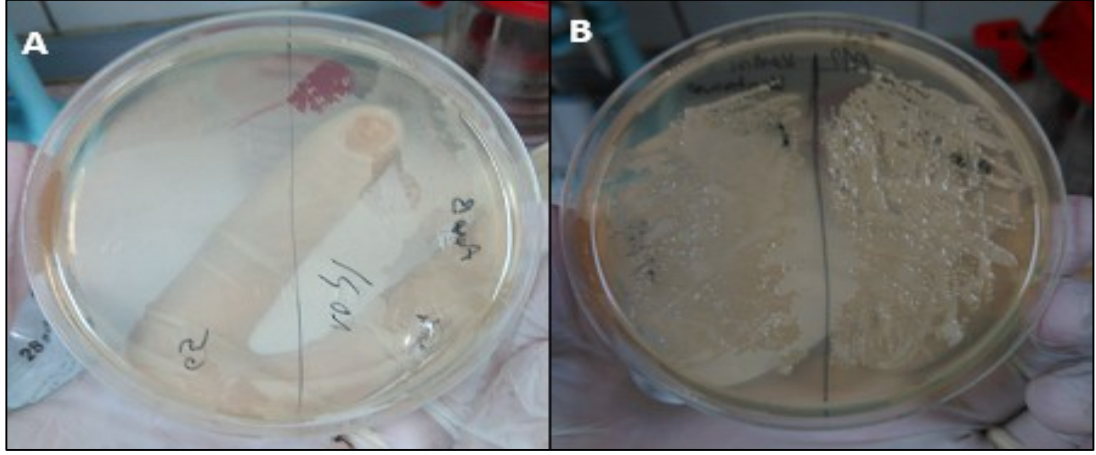
*MİK ve MFK değerleri, 24 saat içinde kitosan mikropartiküllerden salınan AmB'yi gösterir

Kendi MİK ve MBK değerlerine (salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 0,093 µg/mL) karşılık gelen konsantrasyonda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller ile 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilen *Escherichia coli*'nin taramalı elektron mikyografyaları mikropartiküllerin tüm bakteri yüzeyini kapladığı ve bakteri hücre duvarına bağlandığını ortaya çıkardı (Şekil 3.19).

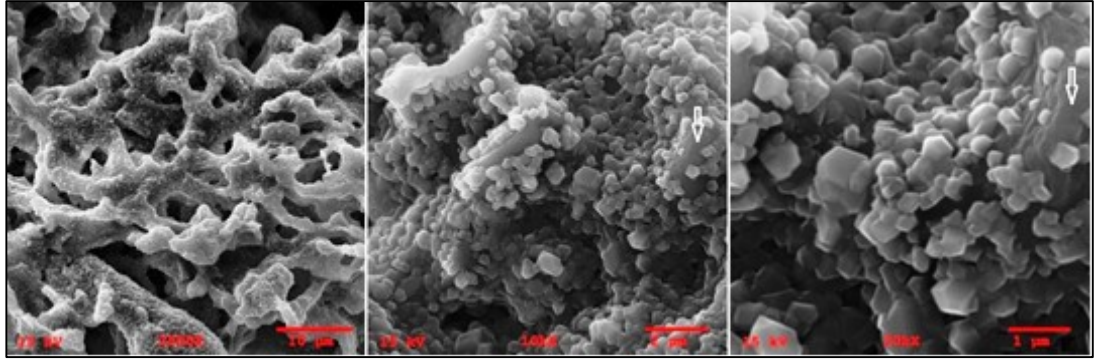
Bazı çalışmalar, ilaçların mikropartiküllere yüklenerek antimikrobiyal etkinliğinde bir artış olduğunu bildirmiştir. Bir ilacın kapsüllenmesi daha yüksek stabilite sağlayabilir ve bakteriyel hücrelere nüfuz etmesini kolaylaştırabilir (Topal ve diğ., 2018). Kong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi, Gram-pozitif bakterilere kıyasla hücre duvarlarındaki yüksek negatif yük nedeniyle Gram-negatif bakteriler üzerinde daha fazla kitosan adsorpsiyonu ve daha yüksek bir inhibitör etki gözlemlendi (Kong ve diğ., 2010).



Şekil 3.17. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin minimum bakterisidal konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan bakteri inoküle edilmiş agar plakaları. A, B) 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiş *E. coli*’nin EMB agar plakaları: A- Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile inoküle edildi (serbest bırakılmış siprofloksasin konsantrasyonu: 0,093 µg/mL, büyüme gözlenmedi), B- herhangi bir tedavi olmadan. C, D) 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiş *P. aeruginosa*’nın EMB agar plakaları: C- Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile inoküle edildi (serbest siprofloksasin konsantrasyonu: 17,08 µg/mL, büyüme gözlenmedi), D- herhangi bir tedavi olmadan. E, F) 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiş *S. aureus*’un koyun kanlı agar plakaları: E- Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile inoküle edildi (serbest siprofloksasin konsantrasyonu: 34,16 µg /mL), F- herhangi bir tedavi olmadan. G, H) 37 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiş *S. pneumoniae*’nin koyun kanlı agar plakaları: G- Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile inoküle edildi (serbest siprofloksasin konsantrasyonu: 34,16 µg /mL), H- herhangi bir tedavi olmadan



Şekil 3.18. AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin minimum fungisidal konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılan maya inoküle edilmiş agar plakaları. A, B) 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiş *C. albicans*’ın SDA agar plakaları: A- AmB yüklü kitosan mikropartikülleri ile inoküle edildi (serbest bırakılmış amfoterisin b konsantrasyonu: 0,06 µg/mL, büyüme gözlenmedi), B- herhangi bir tedavi olmadan



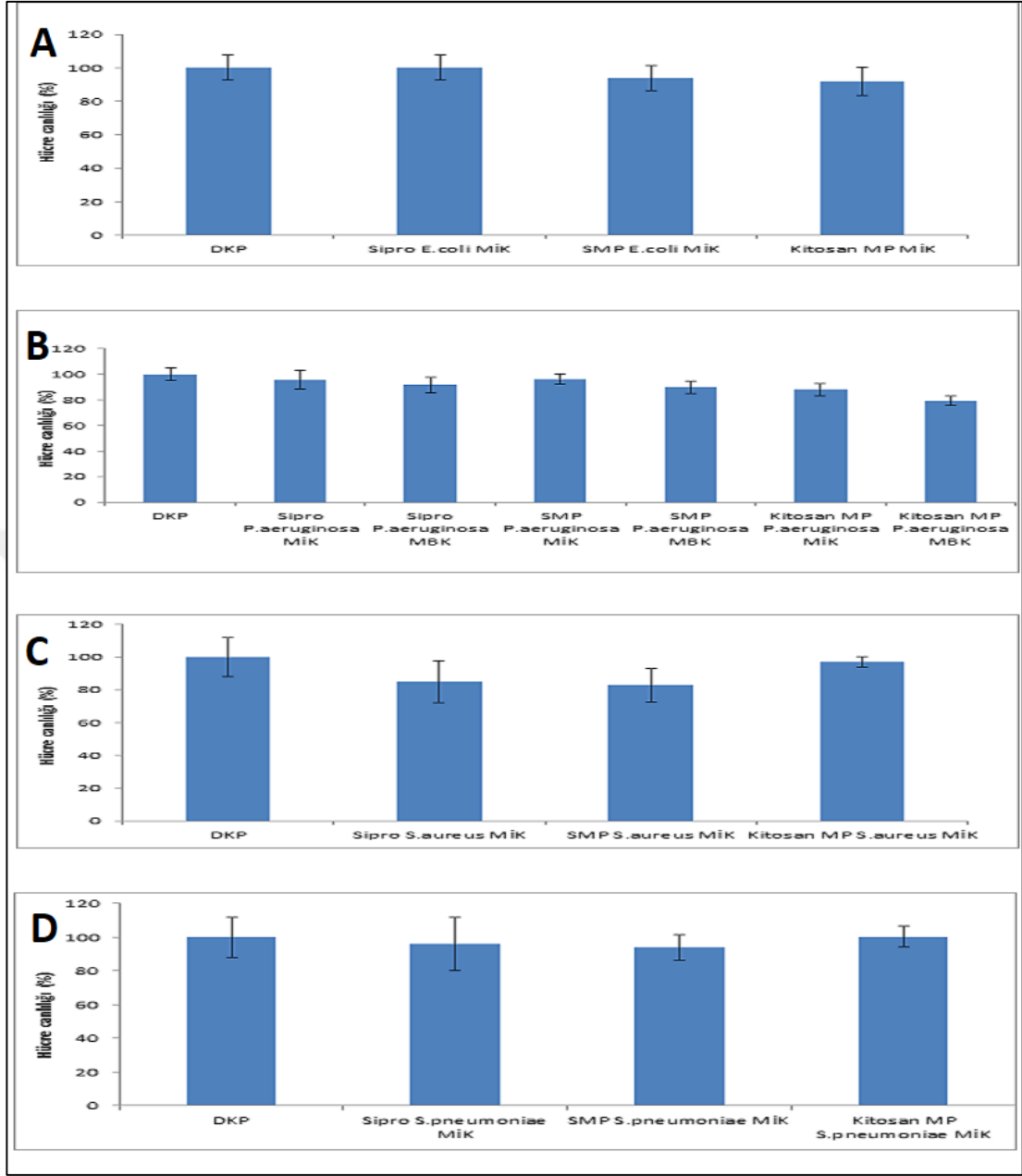
Şekil 3.19. 37 °C’de 24 saat boyunca siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller (salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 0,093 µg/mL) ile inkübe edilmiş *E. coli*’nin taramalı elektron mikrografları. Tüm bakterilerin mikropartiküller tarafından neredeyse tamamen kaplandığı görülmüştür. Beyaz oklar bir bakterinin kaplanmamış yüzeyine işaret etmektedir. Ölçek çubukları: 10-5 ve 1 µm

Çalışmamızda, ilaç yüklü mikropartiküller bakteriyel hücre duvarına adsorbe edilebildi ve *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* ve *C. albicans*’a karşı etkili olduğu bulundu. Bir antimikrobiyal maddenin kitosan içinde kapsüllenmesi veya kitosan ile konjugasyonu, biyofilm oluşumunu önleme kabiliyeti gibi başka bazı avantajlar sağlayabilir (Omwenga ve diğ., 2018). Ya da önceden oluşmuş olan biyofilmleri (Zhang ve diğ., 2013, Li ve diğ., 2019) bozma yeteneği, yani zaten var olan, sistemik antibiyotik uygulaması ile elimine edilemeyen bakteriyel biyofilmlere nüfuz etme yoluyla biyofilmleri parçalama yeteneği gibi avantajlar sağlayabilir.

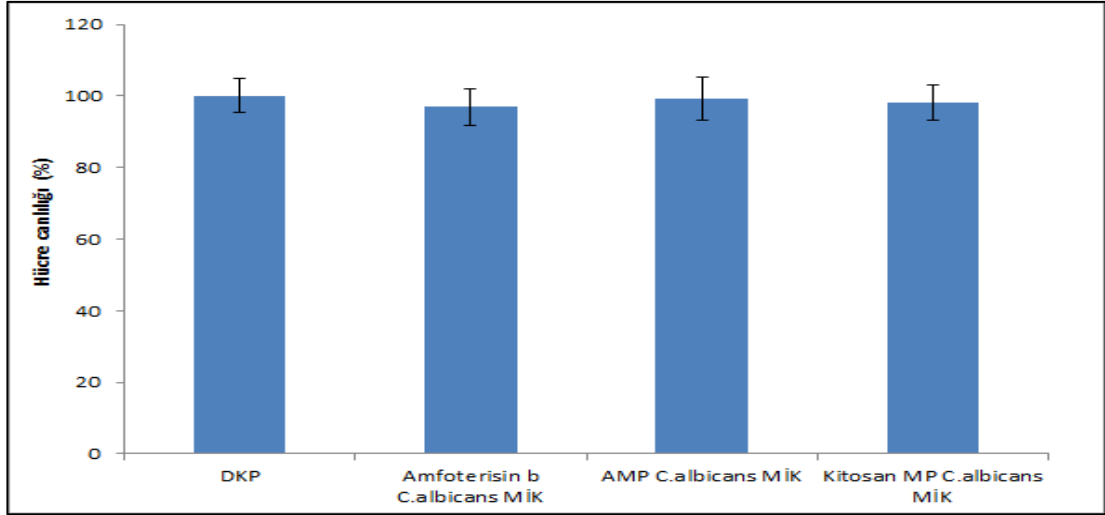
3.7. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Çalışmamızın MTT sonuçları, hücrelerin saf siprofloksasin veya siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllere maruz kalmasının BEAS-2B hücrelerinde önemli sitotoksik yanıtı yol açmadığını göstermiştir. (Şekil 3.20. A-B-C-D). DKP’de (doku kültürü polistireninde büyütülmüş muamele görmemiş hücreler) hücre canlılığı %100 olarak kabul edilirse, test edilen tüm siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül konsantrasyonlarında ortalama %90 hücre canlılığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.20. A-B-C-D). Çalışmamızın MTT sonuçları, yine aynı şekilde hücrelerin saf AmB veya AmB yüklü kitosan mikropartiküllere maruz kalmasının BEAS-2B hücrelerinde önemli sitotoksik yanıt oluşturmadığını göstermiştir. (Şekil 3.21.). DKP’de hücre canlılığı %100 olarak kabul edilirse, test edilen tüm siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül konsantrasyonlarında ortalama %99 hücre canlılığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.21).

Çalışmamızda incelenen mikroorganizmaların MİK ve MBK değerlerine karşılık gelen siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin uygulanan konsantrasyonlarında BEAS-2B hücrelerinin çoğalmaya devam ettiği görülmüştür. MTT sonuçlarının istatistiksel analizinden elde edilen BEAS-2B hücre frekansları Tablo 3.4 ve 3.5’te özetlenmiştir. Dunnett’in çoklu karşılaştırma testine göre *E. coli* ve *P. aeruginosa*’nın MİK ve MBK değerlerine maruz kalan hücrelerin kontrol grubu (DKP, 24 saat) ve tedavi grupları (Sipro MİK, Sipro MBK, SMP MİK, SMP MBK, 24 saat) arasında hücre çoğalması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, Kruskal Wallis Tek yönlü varyans analizi sonucuna göre *S. aureus* ve *S. pneumoniae*’nin MİK değerlerine maruz kalan hücrelerin kontrol grubu (DKP, 24 saat) ve tedavi grupları (Sipro MİK, SMP MİK, 24 saat) arasında hücre çoğalması açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Yine Dunnett’in çoklu karşılaştırma testine göre *C. albicans*’ın MİK ve MFK değerlerine maruz kalan hücrelerin kontrol grubu (DKP, 24 saat) ve tedavi grupları (AmB MİK, AmB MFK, AMP MİK, AMP MFK, 24 saat) arasında hücre çoğalması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.



Şekil 3.20. Saf siprofloksasin, kitosan mikropartikül yada siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri ile 24 saat muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinin MTT testi ile belirlenen hücre canlılığı sonuçları; (A) *E. coli*'nin MİK değerine karşılık gelen konsantrasyonlar (salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 0,093 $\mu\text{g/mL}$), (B) *P. aeruginosa*'nın MİK ve MBK değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar (sırasıyla salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 4,27 $\mu\text{g/mL}$ ve 17,08 $\mu\text{g/mL}$), (C) *S. aureus*'un MİK değerine karşılık gelen konsantrasyon (salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 17,08 $\mu\text{g/mL}$) ve (D) *S. pneumoniae*'nin MİK değerine karşılık gelen konsantrasyon (salınan siprofloksasin konsantrasyonu: 1,06 $\mu\text{g/mL}$) (MP: Mikropartikül, SMP: Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikül, DKP: doku kültürü polistireninde büyütülmüş muamele görmemiş hücreler). DKP' deki hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve diğer gruptaki hücre canlılığı bu değere normalleştirildi



Şekil 3.21. *C. albicans*'ın MİK değerine karşılık gelen konsantrasyonda (salınan AmB konsantrasyonu: 0,06 µg/mL) saf AmB'nin, kitosan mikropartikül ya da AmB yüklü kitosan mikropartikülleri ile 24 saat muamele edilmiş BEAS-2B hücrelerinin MTT testi ile belirlenen hücre canlılığı sonuçları (MP: Mikropartikül, AMP: AmB yüklü kitosan mikropartikül, DKP: doku kültürü polistireninde büyütülmüş muamele görmemiş hücreler). DKP' deki hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve diğer gruplardaki hücre canlılığı bu değere normalleştirildi

24 saat sonra tüm gruplarda elde edilen hücre sayıları, 0. Gündeki başlangıç hücre sayısından her zaman daha yüksekti (Tablo 3.4 ve 3.5). Bu sonuçlar, belirli konsantrasyonlarda kullanılan siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmadığını göstermektedir.

Solunum yolunda nanopartiküllerin birikmesi pulmoner toksisite ile sonuçlanır (Oberdörster ve diğ., 2005). Doku ve hücre kültürü analizi sonuçları da bu verileri desteklemektedir (Cui ve diğ., 2005; Hetland ve diğ., 2004). Partikül büyüklüğü ne kadar düşük olursa, sitotoksik cevabın o kadar büyük olması beklenmektedir (Amarnath ve diğ., 2017). Çalışmamızda hazırlanan partiküllerin yüzde doksanının 200 nm'den daha büyük bir boyutu vardı. Akciğer epitel hücrelerinde 200 nm'den büyük mikropartiküllere rastlanmadı ve literatürle desteklendiği gibi 1 µm'den küçük olanların makrofaj temizlenmesinden kaçmaları beklenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda hazırlanan mikropartiküllerin uzun süreli lokal terapötik bir etkiye sahip olması ve sistemik dolaşıma girebilecek ve vücut hücrelerinde birikebilecek nanopartiküller kadar sitotoksik olmaması beklenmektedir. Kitosan mukoadheziv bir polimer olduğundan (Batista ve diğ., 2019), inhalasyondan sonra, siprofloksasin ve

AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin akciğerlerde mukoza tabakasına yapışması ve solunmaması beklenmektedir.

Tablo 3.4. Serbest siprofloksasin ve siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinin frekansları üzerine etkisi

Gruplar	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
0. gün	0,72±0,010	0,72±0,010	1,57(1,56-1,61)	1,57(1,56-1,61)
DKP (kontrol) 24 saat	0,93±0,077	0,81±0,048	2,30(2,00-2,52)	2,30(2,00-2,52)
Siprofloksasin MİK 24 saat	0,97±0,075	0,78±0,063	1,98(1,63-2,19)	2,04(1,94-2,55)
Siprofloksasin MBK 24 saat	0,97±0,075	0,75±0,054	-	-
SMP MİK 24 saat	0,87±0,070	0,78±0,033	1,86(1,69-2,06)	2,30(2,14-2,40)
SMP MBK 24 saat	0,87±0,070	0,73±0,045	-	-
P	p<0,001 ^{A,B,C,D}	0,013 ^{A,D}	0,012 ^{A,D}	0,008 ^{A,D}

A: 0.gün ile DKP (kontrol) 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

B: 0.gün ile Siprofloksasin MİK 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

C: 0.gün ile Siprofloksasin MBK 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

D: 0.gün ile SMP MİK 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

(SMP = Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri, DKP: doku kültürü polistireninde büyütülmüş muamele görmemiş hücreler)

Tablo 3.5. Serbest AmB ve AmB yüklü kitosan mikropartiküllerinin BEAS-2B hücrelerinin frekansları üzerine etkisi

Gruplar	<i>C. albicans</i>
0. gün	0,92±0,038
DKP (kontrol) 24 saat	1,27±0,060
AmB MİK 24 saat	1,23±0,066
AmB MFK 24 saat	1,23±0,066
AMP MİK 24 saat	1,26±0,075
AMP MFK 24 saat	1,26±0,075
P	p<0001 ^{A,B,C,D}

A: 0.gün ile DKP (kontrol) 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

B: 0.gün ile AmB MİK 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

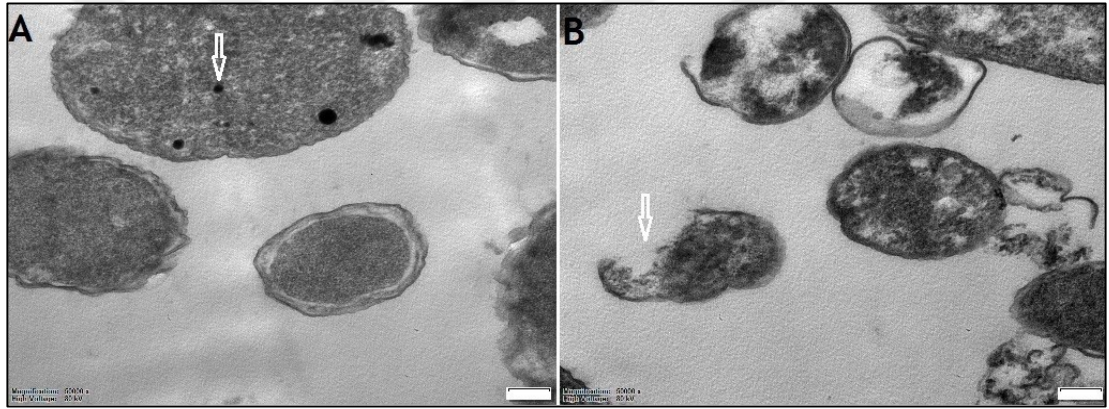
C: 0.gün ile AmB MBK 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

D: 0.gün ile AMP MİK 24 saat karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan istatistiksel fark.

(AMP = AmB yüklü kitosan mikropartikülleri, DKP: doku kültürü polistireninde büyütülmüş muamele görmemiş hücreler)

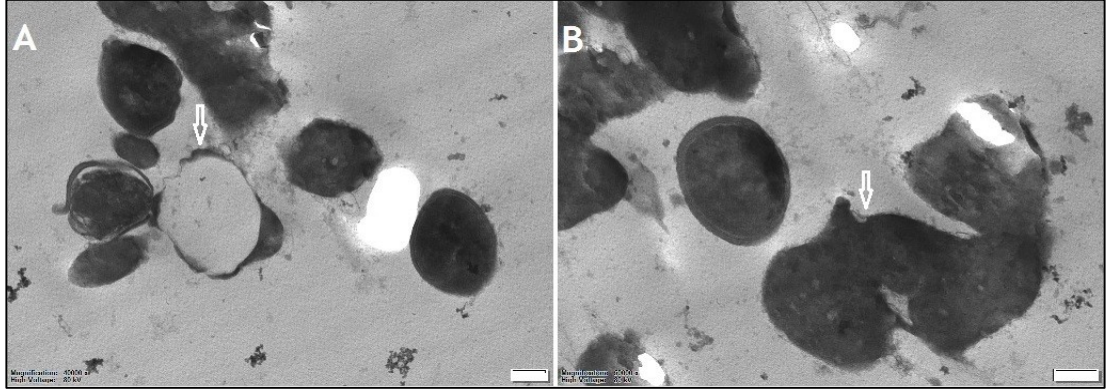
3.8. Siprofloksasin Yüklü Kitosan Mikropartikülleri İle Muamele Edilen *E. coli*, *S. aureus* ve BEAS-2B Hücrelerinin TEM Analizi

MİK ve MBK değerinde siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz kalmış *E. coli*'nin TEM değerlendirmesi, mikropartiküllerin bakteriler tarafından içselleştirildiğini gösterdi. Ek olarak, mikropartikül büyüklüğü ortalama 720,9 nm olarak ölçülmesine rağmen, bakterilerde sadece 200 nm'den küçük partiküller gözlemlendi (Şekil 3.22). *E. coli* hücrelerinin çoğunda hücre duvar ve zar yapılarında harabiyet görüldü. Çoğu hücrede hücre duvar ve zarında ondülasyonlar şeklinde kıvrılmalar ve çoğu kez stoplazma erimeleri gözlemlendi. Bazı hücrelerde ise duvar ve zar yırtılmalarına bağlı olarak hücre içeriğinin boşaldığı ve yer yer hayalet hücrelerin oluştuğu gözlemlendi.



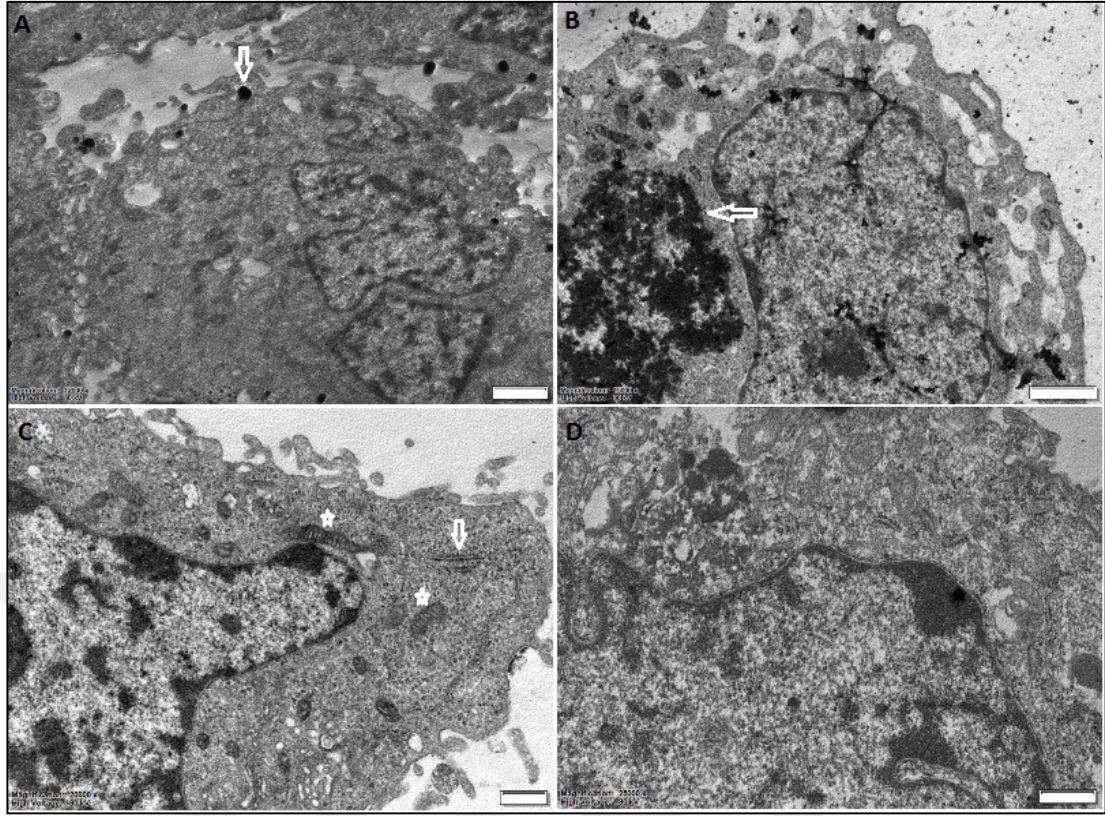
Şekil 3.22. *E. coli*'nin elektron mikrografları, 24 saat boyunca MİK değerlerine karşılık gelen konsantrasyonda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz bırakıldıktan sonra. Beyaz oklar sitoplazmadaki mikropartikülleri (A), sitoplazmadaki erimeyi ve hücre duvar ve zar yırtılmalarını (B) gösterir. Ölçek çubukları: 200 nm

Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz kalan *S. aureus*'un TEM görüntüleri, Şekil 3.23'de gösterilmektedir. Bu gruptaki bakteri hücrelerinin hemen hemen tümü parçalandı, fragmente oldu ve birbirine kaynaştı. Hücrelerin çoğu elektriksel olarak konsantre edildi. Nano/mikropartiküller genellikle kümelerdeki hücrelerle etkileşime girdi. Bazıları hücre duvarına bağlı, bazıları sitoplazmada görüldü. Nadiren hayalet hücre ve sitoplazmada yırtılma izleri gözlemlendi.



Şekil 3.23. *S. aureus*'un elektron mikrografları, 24 saat boyunca MİK değerlerine karşılık gelen konsantrasyonda siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz bırakıldıktan sonra. Beyaz oklar bir hayalet hücre (A) ve kaynaşmış hücreleri (B) göstermektedir. Ölçek çubukları: 200 nm

E.coli'nin MİK değerinde siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllere maruz kalan BEAS-2B hücrelerinin TEM görüntüleri, ≤ 200 nm boyutunda nano/mikropartiküllerin hücre içine alındığını gösterdi. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin, BEAS-2B hücrelerinin içinde tekli mikropartiküller halinde veya kümeleşerek dağıldığı görüldü (Şekil 3.24-A-B). Bu gruptaki hücre çekirdeklerinin genellikle kenara itildiği, hücre zarına yakın yerleştiği, atipikleştiği ve hacminin önemli ölçüde küçüldüğü görüldü. BEAS-2B sitoplazmasında vakuolizasyon artmış, mitokondri ve endoplazmik retikulum miktarı azalmıştır. Nano/mikropartiküller ayrıca hücre zarı ile ve çekirdek içinde de görüldü. BEAS-2B hücrelerinde mitokondriler genel olarak sağlıklı bir görünümdeydi, ancak bazılarının sisternaları şişmişti ve biraz şişmiş ribozomlu endoplazmik retikulumlar da gözlendi (Şekil 3.24-C). Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinde, genel olarak çekirdek hacmi büyüktü ve çekirdek aktif sağlıklı görünümdeydi (Şekil 3.24-D). Çekirdek merkezi yerleşimliydi ancak bazı hücrelerde kenara itilmişti. Kromatin, nükleer membrana doğru daha fazla yoğunlaşmış ve heterokromatik bir yapıya sahipti. Endoplazmik retikulum ve mitokondriler net olarak ayırt edildi ve genel olarak düzenliydi.

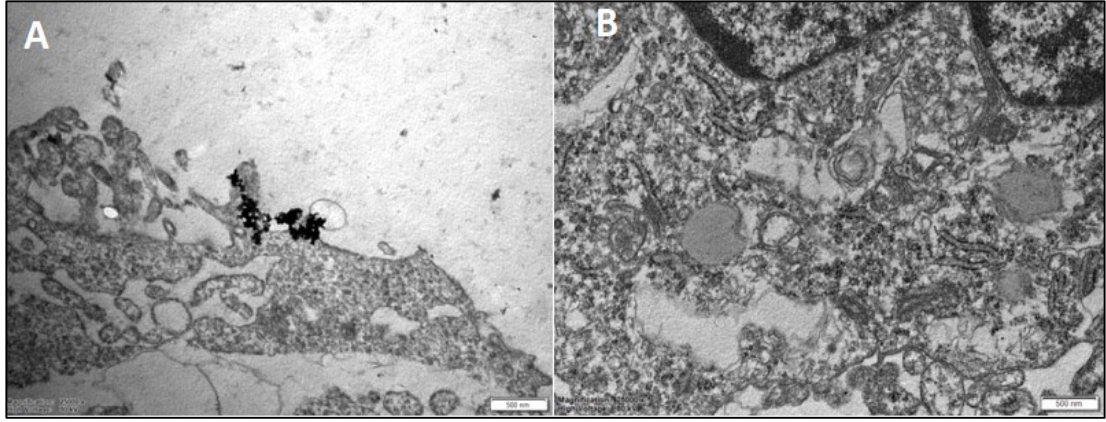


Şekil 3.24. Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinin ve 24 saat boyunca *E. coli*'nin (serbest kalan siprofloksasin: 0,093 µg/mL) MİK değerine maruz kalan BEAS-2B hücrelerinin geçirimli elektron mikrografları. (A) ve (B) 'deki beyaz oklar sırasıyla mikropartiküllerin ve mikropartikül agregatlarının hücre içindeki içselleşmesini gösterir. Mikropartiküllerle muamele edilen hücrelerde (C), normal morfolojide olanların dışında şişmiş sisternaları olan (biraz uzamış) mitokondri (beyaz yıldızlar), ve biraz şişmiş ribozomlu endoplazmik retikulum (beyaz ok) gözlemlendi. Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinin mikrografi karşılaştırma (D) için verilmiştir. Ölçek çubukları: (A, B): 1 µm, (C, D): 500 nm

3.9. Amfoterisin B Yüklü Kitosan Mikropartikülleri İle Muamele Edilen BEAS-2B Hücrelerinin ve Muamele Edilmemiş Hücrelerin TEM Analizi

AmB yüklü kitosan mikropartiküllerle muamele edilen BEAS-2B hücrelerinde apoptotik cisimcikler, çekirdek fragmentasyonu ve küçülmesi izlendi. Hücrelerin çoğunda organellerde silikleşme ya da sayıca azalma olduğu görüldü. Yer yer sitoplazma ya da çekirdek zarında nano/mikropartiküller izlendi. Bazı hücrelerde ise çekirdek normal boyutlarda ve görünümde izlendi. Bazı hücrelerde hücrenin her yerinde sitoplazmik erimeler olduğu görüldü. Mikropartiküllerle muamele edilmemiş hücrelerde endoplazmik retikulum ve mitokondriler net olarak ayırt edildi hatta

endoplazmik retikulum üzerindeki ribozomların dahi net bir şekilde gözüktüğü görüldü (Şekil 3.25 A-B).



Şekil 3.25. Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinin ve 24 saat boyunca *C. albicans*'ın (serbest kalan AmB: 0,06 µg/mL) MİK değerine maruz kalan BEAS-2B hücrelerinin geçirimli elektron mikrografları. (A) Sitoplazma zarındaki nano/mikropartiküller (B) Muamele edilmemiş BEAS-2B hücrelerinin mikrografi karşılaştırma için verilmiştir. Ölçek çubukları: A, B: 500 µm

Önceki çalışmalarda, hücre kültüründe kitosan nanopartikülleri birkaç dakikadan 24 saate kadar izlenmiş ve hücrelere endositoz yoluyla girdikleri gözlemlenmiştir. 24 saatin sonunda birçok parçanın endozomlardan kaçtığı ve sitozolde serbest olduğu bulundu (Malatesta ve diğ., 2012; Malatesta ve diğ., 2014). Çalışmamızda, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin *E. coli* ve *S. aureus*'un hücre duvarına ve membran yapılarına zarar verdiği ve 24 saat içinde bakteri sitoplazmasına girdiği görülmüştür. Ayrıca, siprofloksasin yüklü kitosan mikropartikülleri BEAS-2B hücrelerinde çekirdek içine girmek için veya hücre membranı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmanın TEM analiz verilerine göre, kitosan nanopartiküllerine maruz kaldıktan sonra, HeLa hücrelerinde 14 güne kadar yapısal hasar ve ölüm gözlenmedi (Malatesta ve diğ., 2015). Çalışmamızda, BEAS-2B hücrelerinin 24 saat boyunca siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerine maruz kalmasından sonra anlamlı bir yapısal hasar görülmedi. Siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküller BEAS-2B hücrelerinin çekirdeğine girmesine ve mitokondri ve endoplazmik retikulum miktarında bir azalmaya neden olmasına rağmen, çoğunlukla mitokondriyal kristallerin sağlıklı izlenmesi hücre organel yapılarının 24 saat içinde zarar görmediğini gösterir. AmB yüklü kitosan mikropartiküllerle muamele edilen BEAS-2B hücrelerinin siprofloksasin yüklü

kitosan mikropartiküller ile muamele edilenlere kıyasla biraz daha fazla zarar gördüğü gözlemlendi. Yine de zarar gören hücreler yanında sağlıklı görünümde olan hücrelerinde varlığı AmB'nin kullanılabilir olduğunun bir göstergesi olabilir. Ayrıca, mikropartiküllerin hücre içine alınması partiküllerin büyüklüğüne bağlıydı ve sadece 200 nm'den küçük boyuttaki mikropartiküller hücrelere girebildi. 200 nm'den daha az büyüklükte olan kitosan nanopartiküllerinin hücresel alımı diğer iki çalışmada da gösterilmiştir (Malatesta ve diğ., 2012; Malatesta ve diğ., 2015).

Şimdiye kadar, gümüş nanopartiküllerin uzun vadeli ve subtoksik doz maruziyetleri üzerindeki etkilerini tespit etmeyi amaçlayan az sayıda çalışma yapılmıştır. Gümüş nanopartiküller pg/mL konsantrasyonlarında sitotoksik bir etkiye sahip olmamakla birlikte, uzun süre maruz kalmanın tüm hücre tiplerinin proliferatif kapasitesini tehlikeye attığı gösterilmiştir (Vila ve diğ., 2017). İlaç taşıyıcı sistemlerin, örneğin nanopartiküllerin, in vivo uzun vadeli etkileriyle ilgili çalışmalar önemli ilgi uyandırır da, çoğunlukla nanopartiküllere maruz kalan hayvanların verimliliğine veya uzun ömürlülüğüne odaklanılmıştır, ancak altta yatan mekanizmalar daha az anlaşılmıştır. İlaç taşıyıcı nanopartiküllerin biyogüvenliğini tam olarak araştırmak için gelecekteki çalışmalarda protein, glukoz ve lipid metabolizması üzerindeki uzun vadeli etkilerini incelemek ve altta yatan mekanizmaları keşfetmek önemlidir (Chen ve diğ., 2014).

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Pnömoni antimikrobiyal tedavi, destek tedavileri ve korunma yöntemlerindeki yeniliklere rağmen sık görülmesi ve bazı gruplarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmesi nedeniyle önemlidir. Her yıl yaklaşık 450 milyon kişiyi etkilemekte ve yaklaşık 4 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Özellikle beş yaşının altındaki çocuklar, 65 yaş üstü erişkinler ve altta yatan bir hastalığı bulunanlar artmış risk gruplarıdır. Pnömoniye neden olan etkenler sıklıkla bakteri, mantar ve virüslerdir. Enfeksiyon dışında yakıcı madde inhalasyonu, radyasyon gibi fiziksel nedenler ve aşırı duyarlılık reaksiyonları da akciğer parankim dokusunun enflamasyonu nedeni olabilirler ve pnömonitis olarak adlandırılırlar.

Ne yazık ki, ileri tanısal incelemelere rağmen, hastaların önemli bir kısmında ya pnömoniye neden olan etken saptanamamakta ya da geç saptanmaktadır. Pnömonide erken ve uygun antibiyotik tedavisi mortaliteyi azaltmaktadır. Hastalığın erken tanınması, mikrobiyolojik örnekler alındıktan sonra erken ve uygun tedavisi hastalığın sonuçlarını iyileştirmek açısından önem taşır. Bu nedenle pnömoni hastalarının çoğunun başlangıç tedavisi ampirik olarak düzenlenmektedir. Pnömonili hastaların tedavisi konusunda ortak bir yaklaşım için pek çok ülkede ulusal veriler ve sağlık politikaları gözönünde bulundurularak tanı ve tedavi rehberleri hazırlanmaktadır. Çeşitli kuruluş ve dernekler son 10-20 yıl içinde pnömoni tanı ve özellikle tedavisi konusunda birçok rehber yayınlamıştır (Akçay ve diğ., 2017).

Geçtiğimiz son 30 yıl boyunca, etkili ilaç, peptid, protein ve DNA dağıtımı için biyobozunur nano/mikro partiküllerin gelişimine artan bir ilgi olmuştur. Tüm yapılan çalışmalardan anlaşılacağı üzere bir ilacın biyobozunur polimerlerden yapılmış nano/mikro partiküllerden salınması, farklı parametrelerin salım profilini önemli ölçüde etkileyebildiği oldukça karmaşık bir işlemdir. Sonuç olarak, birçok farklı faktör bazen çelişkili bir rol oynayabilir. Bu faktörler, polimer bozunma hızı, moleküler ağırlık, kristallik, polimer ve ilaç arasındaki bağlanma afinitesi, ilaç

yükleme kapasitesi, nano/mikro partikül büyüklüğü, ilacın hidrofilikliği veya hidrofobikliği gibi özelliklerdir.

İlaç dağıtım sistemlerinde sıklıkla karşımıza çıkan kitosan ise biyobozunur, biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan bir biyopolimerdir. Mukus, akciğer hava yollarını koruyan viskoelastik ve yapışkan bir jeldir. Kitosan tüm özelliklerinin yanında mukus penetran özelliği sayesinde pnömoni hastalığı tedavisinde nano/mikro taşıyıcı olarak birçok çalışmada yer almıştır. Kitosan gibi biyobozunur polimerlere bağlanmış veya bu tür makromoleküllerin polimerik matrisinde dağılmış ilaçlar, polimerin erozyonu/bozunması ile salınabilir (Kumar, 2000). Mukus tabakasına nüfuz edebilen ve mukus temizleme mekanizmalarından kaçabilen, mukozal dokularda lokalize tedaviler için sürekli ilaç dağıtımı sağlayabilen makrotaşıyıcıların tasarımı ve gelişimi önemlidir.

Bu veriler ışığında bakıldığında pnömoni hastalığının dünyada önemli ve yaşamı tehdit edici olması hala önemli bir sorundur. İnhaler olarak akciğerlere ilaç verilmesi solunum yolu hastalıkları için hedefe yönelik bir ilaç tedavisi sunmasının yanında düşük doz avantajını da sağlamaktadır. Bu yüzden sistemik dolaşıma girmeden lokal etki gösterebilen, insan sağlığı için çok önemli bir konu olan nanotoksikoloji sorununun dışında olan ve uzun süreli ilaç salımı sağlayarak etki gösterebilen antibiyotik yüklü mikropartiküllerin hazırlanması bu konunun araştırılması ve üzerinde çalışılması gerekliliği görülmektedir.

Bu çalışmada iyonik jelleşme tekniği kullanılarak iyi yükleme verimliliğine sahip fakat in vitro salım hızı düşük olan siprofloksasin ve AmB yüklü kitosan mikropartiküller hazırlandı. Sistemik sirkülasyona ilerlemeden uygulanmak istenen bölgede lokal etki gösterebilen aynı zamanda vücudun lokal savunma sisteminden kaçabilen uygun boyutta mikropartiküller elde edildi. Siprofloksasin yüklü olan kitosan mikropartiküller pnömoni hastalığı etkenlerinden olan *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* gibi fırsatçı patojenik bakterilere ve hala dünyada pnömoni etkeni olarak en sık karşılaşılan *S. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyel etkinlik gösterdi. AmB yüklü kitosan mikropartiküller de yine pnömoni hastalığında fırsatçı patojenlerden biri olan *C. albicans*'a karşı antifungitik etki gösterdi. Antimikrobiyal olarak etkinlik gösterdikleri dozlarda hem siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerin hem de

AmB yüklü olan kitosan mikropartiküllerin sağlıklı insan akciğer epitel hücrelerine sitotoksik olmadığı belirlendi.

Bildiğimiz kadarıyla yaptığımız çalışma, literatürde siprofloksasin yüklü kitosan mikropartiküllerinin in vitro sitotoksitesisi üzerine yapılan ilk çalışmadır. AmB yüklü kitosan nanopartiküllerin sitotoksitesisini çalışan ise sadece tek bir çalışma vardır. Bizim çalışmamızda elde edilen veriler, akciğerlerdeki fırsatçı patojenik bakterilere karşı lokal savunmada kullanılması amaçlanan bu mikro taşıyıcıların güvenliği hakkında daha doğru bilgi verecek daha uzun sitotoksiste çalışmaları ve in vivo çalışmalar için referans teşkil edebilir. Bu çalışmada elde ettiğimiz deney sonuçları doğrultusunda mikropartiküllerin güvenli ve etkin kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için gelecekte yapılması önerilen çalışmalar; kombine halde antibiyotik yüklenmiş kitosan mikropartiküllerin hazırlanması ve karakterize edilmesi, daha uzun süreli in vitro sitotoksik çalışmalar ve in vivo çalışmalar yapılması, hatta bu mikropartiküllerin genotoksitesisine bakılmasıdır. Tüm bu çalışmalarla desteklenen veriler ışığında mikropartiküllerin lokal pulmoner uygulamalar için güvenli kullanılabilecekleri desteklenirse ticari olarak üretimleri yapılabilir.

Sonuç olarak yaptığımız deneysel çalışmalarda amaç; toplumsal olarak hala çok önemli bir hastalık olan pnömoni için lokal olarak uygulanabilecek, yeni, insan sağlığı için tehdit oluşturmayan, güvenilir, maliyeti yüksek olmayan, üretim yapılabilecek mikrotasıyıcılar için bir temel oluşturmaktır. Amacımız doğrultusunda kolay uygulanabilir, ekonomik ve güvenilir sonuç veren deney yöntemleri tespit edilip çalışılmıştır. Gelecekte yapılması önerilen çalışmalar doğrultusunda da pnömoni tedavisinde güvenle kullanılabilecek, yüksek doğruluk ve etkinliğe sahip mikropartiküllerin üretiminin yapılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Akçay Ş., Alizoroğlu D., Aydemir Y., Bakan D., Cenger D., Çağatay T., Çilli A., Ertürk A., Küpeli E., Özhan MH., Öztürk Ö., Sevinç C., Şen N., Taşbakan S., *Pnömoni*, Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği, ISBN: 978-605-4899-58-6, 2017.

Aldred KJ., Kerns RJ., Osherof N., Mechanism of Quinolone Action and Resistance, *Biochemistry*, 2014, **53**(10), 1565–1574.

Ali A., Ahmed S., A Review on Chitosan and Its Nanocomposites in Drug Delivery, *Int J Biol Macromol.*, 2018, (109), 273-286.

Allen TM., Cullis PR., Liposomal Drug Delivery Systems: from Concept to Clinical Applications, *Adv Drug Deliv Rev.*, 2013, **65**(1), 36-48.

Amarnath K., Dhanabal J., Agarwal I., Seshadry S., Cytotoxicity Induction by Ethanolic Extract of Acalypha Indica Loaded Casein-Chitosan Microparticles in Human Prostate Cancer Cell Line In vitro, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014, (4), 445–450.

Arora S., Rajwade JM., Paknikar KM., Nanotoxicology and In vitro Studies: The Need of the Hour, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, (258), 151–165.

Bajaj SK., Tombach B., Respiratory Infections in Immunocompromised Patients: Lung Findings Using Chest Computed Tomography, *Radiology of Infectious Diseases*, 2017, **4**(1), 29-37.

Batista P., Castro P., Madureira AR., Sarmento B., Pintado M., Development and Characterization of Chitosan Microparticles-in-Films for Buccal Delivery of Bioactive Peptides, *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, **12**(1), pii: E32, DOI: 10.3390/ph12010032.

Ben-Jebria A., Chen D., Eskew ML., Vanbever R., Langer R., Edwards DA., Large Porous Particles for Sustained Protection from Carbachol-Induced Bronchoconstriction in Guinea Pigs, *Pharm Res*, 1999, **16**(4), 555-561.

Brar NK., Niederman MS., Management of Community-Acquired Pneumonia: A Review and Update, *Ther Adv Respir Dis*, 2011, **5**(1), 61-78.

Calvo P., Remuñan-López C., Vila-Jato JL., Alonso MJ., Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines, *Pharm Res*, 1997, **14**(10), 1431-1436.

Camps Serra M., Cervera C., Pumarola T., Moreno A., Perelló R., Torres A., Jiménez de Anta MT., Marcos MA., Virological Diagnosis in Community-acquired Pneumonia in Immunocompromised Patients, *Eur Respir J*, 2008, **31**(3), 618-624.

Chastre J., Fagon JY., Ventilator- Associated Pneumonia, *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, (165), 867-903.

Chen N., Wang H., Huang Q., Li J., Yan J., He D., Fan C., Song H., Long-term Effects of Nanoparticles on Nutrition and Metabolism, *Small*, 2014, **10**(18), 3603-3611.

Cui D., Tian F., Ozkan CS., Wang M., Gao H., Effect of Single Wall Carbon Nanotubes on Human HEK293 Cells, *Toxicol Lett*, 2005, **155**(1), 73-85.

Di Franco M., Lucchino B., Spaziante M., Lannuccelli C., Valesini G., Laiani G., Lung Infections in Systemic Rheumatic Disease: Focus on Opportunistic Infections, *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(2), 293.

Du WL., Xu YL., Xu ZR., Fan CL., Preparation, Characterization and Antibacterial Properties Against *E. coli* K88 of Chitosan Nanoparticle Loaded Copper Ions, *Nanotechnology*, 2008, (19), 085707 (5pp).

Edwards DA., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew ML., Mintzes J., Deaver D., Lotan N., Langer R., Large porous particles for pulmonary drug delivery, *Science*, 1997, **276** (5320), 1868-1871.

Elbi S., Nimal TR., Rajan VK., Baranwal G., Biswas R., Jayakumar R., Sathianarayanan S., Fucoidan Coated Ciprofloxacin Loaded Chitosan Nanoparticles for the Treatment of Intracellular and Biofilm Infections of Salmonella, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, (160), 40-47.

File TM., Community-Acquired Pneumonia, *Lancet*, 2003, **362**(9400), 1991-2001.

Geiser M., Casaulta M., Kupferschmid B., Schulz H., Semmler-Behnke M., Kreyling W., The Role of Macrophages in the Clearance of Inhaled Ultrafine Titanium Dioxide Particles, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, **38**(3), 371-376.

Gleeson K., Reynolds HY., Life-threatening Pneumonia, *Clinics In Chest Medicine*, 1994, **15**(3), 581-602.

Goycoolea FM., Brunel F., Gueddari NE., Coggiola A., Lollo G., Moerschbacher BM., Remuñán-López C., Delair T., Domard A., Alonso MJ., Physical Properties and Stability of Soft Gelled Chitosan-Based Nanoparticles, *Macromol Biosci*, 2016, **16**(12), 1873-1882.

Gökçe Y., Kitosan Nanoparçacıkların Sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2008, 233421.

Grenha A., Chitosan Nanoparticles: A Survey of Preparation Methods, *Journal of Drug Targeting*, 2012, **20**(4), 291-300.

Grief SN., Loza JK., Guidelines for the Evaluation and Treatment of Pneumonia, *Prim Care*, 2018, **45**(3), 485-503.

Hirano S, Tsuchida H, Nagao N., N-acetylation in Chitosan and The Rate of Its Enzymic Hydrolysis, *Biomaterials*, 1989, **10**(8), 574-576.

Hetland RB., Cassee FR., Refsnes M., Schwarze PE., Låg M., Boere AJ., Dybing E., Release of Inflammatory Cytokines, Cell Toxicity and Apoptosis in Epithelial Lung Cells After Exposure to Ambient Air Particles of Different Size Fractions, *Toxicol In Vitro*, 2004, **18**(2), 203-212.

Jain S., Reddy CSK., Swami R., Kushwah V., Amphotericin B Loaded Chitosan Nanoparticles: Implication of Bile Salt Stabilization on Gastrointestinal Stability, Permeability and Oral Bioavailability, *AAPS PharmSciTech*, 2018, **19**(7), 3152-3164.

Jameela SR., Jayakrishnan A., Glutaraldehyde Cross-linked Chitosan Microspheres as a Long Acting Biodegradable Drug Delivery Vehicle: Studies on the *In vitro* Release of Mitoxantrone and *In vivo* Degradation of Microspheres in Rat Muscle, *Biomaterials*, 1995, **16**(10), 769-775.

Kallander K., Burgess DH., Shamim A Qazi SA., Early Identification and Treatment of Pneumonia: A Call to Action, *Lancet Glob Health*, 2016, **4**(1), e12–e13.

Kaş HS., Chitosan: Properties, Preparations and Application to Microparticulate Systems, *J Microencapsul*, 1997, **14**(6), 689-711.

Kean T., Thanou M., Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, (62), 3-11.

Kim BS., Kim CS., Lee KM., The Intracellular Uptake Ability of Chitosan-Coated Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles, *Arch Pharm Res*, 2008, **31**(8), 1050-1054.

Ko JA., Park HJ., Hwang SJ., Park JB., Lee JS., Preparation and Characterization of Chitosan Microparticles Intended for Controlled Drug Delivery, *Int J Pharm*, 2002, **249** (1-2), 165-174.

Kong M., Chen XG., Xing K., Park HJ., Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review, *Int J Food Microbiol*, 2010, **144**(1), 51-63.

Kumar MNVR., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, (46), 1–27.

Kumar M., Muzzarelli RAA., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb AJ., Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *Chem Rev*, 2004, (104), 6017-6084.

Kumbıçak U., Cavas T., Cinkılıç N., Kumbıçak Z., Vatan O., Yılmaz D., Evaluation of In vitro Cytotoxicity and Genotoxicity of Copper–Zinc Alloy Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells, *Food and Chemical Toxicology*, 2014, (73), 105-112.

Kunda NK., Alfagih IM., Dennison SR., Tawfeek HM., Somavarapu S., Hutcheon GA., Saleem IY., Bovine Serum Albumin Adsorbed PGA-co-PDL Nanocarriers for Vaccine Delivery via Dry Powder Inhalation, *Pharm Res*, 2015, **32**(4), 1341-1353.

Lehr CM., Bouwstra JA., Schacht EH., Junginger HE., In vitro Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan and Some Other Natural Polymers, *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, **78**(1-3), 43-48.

Li R., Yuan X., Wei J., Zhang X., Cheng G., Wang ZA., Du Y., Synthesis and Evaluation of a Chitosan Oligosaccharide-Streptomycin Conjugate against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, *Mar Drugs*, 2019, **17**(1), pii: E43.

Liu H., Gao C., Preparation and Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Nanoparticles, *Polymers Advanced Technologies*, 2009, (20), 613-619.

Lynch JP., Hospital-Acquired Pneumonia: Risk Factors, Microbiology, and Treatment, *Chest*, 2001, (119), 373-384.

Maertens J., Meersseman W., Van Bleyenbergh P., New Therapies for Fungal Pneumonia, *Curr Opin Infect Dis*, 2009, **22**(2), 183-190.

Mackenzie G., The Definition and Classification of Pneumonia, *Pneumonia (Nathan)*, 2016, 8,14.

Malatesta M., Giagnacovo M., Costanzo M., Conti B., Genta I., Dorati R., Galimberti V., Biggiogera M., Zancanaro C., Diaminobenzidine Photoconversion is a Suitable Tool for Tracking the Intracellular Location of Fluorescently Labelled Nanoparticles at Transmission Electron Microscopy, *European Journal of Histochemistry*, 2012, 56, e20.

Malatesta M., Galimberti V., Cisterna B., Costanzo M., Biggiogera M., Zancanaro C., Chitosan Nanoparticles are Efficient Carriers for Delivering Biodegradable Drugs to Neuronal Cells, *Histochem Cell Biol*, 2014, (141), 551-558.

Malatesta M., Grecchi S., Chiesa E., Cisterna B., Costanzo M., Zancanaro C., Internalized Chitosan Nanoparticles Persist for Long Time in Cultured Cells, *European Journal of Histochemistry*, 2015, (59), 2492.

Mao HQ., Roy K., Troung-Le VL., Janes KA., Lin KY., Wang Y., August JT., Leong KW., Chitosan-DNA Nanoparticles as Gene Carriers: Synthesis, Characterization and Transfection Efficiency, *Journal of Control Release*, 2001, (70), 399-421.

Marei N., Elwahy AHM., Salah TA., Sherif YE., El-Samie EA., Enhanced Antibacterial Activity of Egyptian Local Insects Chitosan-Based Nanoparticles Loaded with Ciprofloxacin-HCl, *Int J Biol Macromol*, 2019, (126), 262-272.

Meersseman W., Lagrou K., Spriet I., Maertens J., Verbeken E., Peetermans W.E., Van Wijngaerden E., Significance of the Isolation of Candida Species from Airway Samples in Critically Ill Patients: A Prospective, Autopsy Study, *Intensive Care Medicine*, 2009, **35**(9), 1526-1531.

Moller W., Felten K., Sommerer K., Scheuch G., Meyer G., Meyer P., Haussinger K., Kreyling W.G., Deposition, Retention, and Translocation of Ultrafine Particles from the Central Airways and Lung Periphery, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2008, (177), 426–432.

Mu L., Feng SS., Fabrication, Characterization and In vitro Release of Paclitaxel (Taxol) Loaded Poly (lactic-co-glycolic acid) Microspheres Prepared by Spray Drying Technique with Lipid/Cholesterol Emulsifiers, *J Control Release*, 2001, **76**(3), 239-254.

Muzzarelli R., Biagini G., Pugnaroni A., Filippini O., Baldassarre V., Castaldini C., Rizzoli C., Reconstruction of Parodontal Tissue with Chitosan, *Biomaterials*, 1989, **10**(9), 598-603.

Niederman MS., Bass JB., Campbell GD., Fein AM., Grossman RF., Mandell LA., Marrie TJ., Sarosi GA., Torres A., Yu VL., American Thoracic Society: Guidelines for the Initial Management of Adults with Community Acquired Pneumonia: Diagnosis, Assessment of Severity, and Initial Antimicrobial Therapy, *The American Review of Respiratory Disease*, 1993, **148**(5), 1418-26.

No HK., Meyers SP., Prinyawiwatkul W., Xu Z., Applications of Chitosan for Improvement of Quality and Shelf Life of Foods: A Review, *J Food Sci*, 2007, **72**(5), R87-100.

Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H., Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy, *Particle and Fibre Toxicology*, 2005, (2), 8.

Omwenga EO., Hensel A., Shitandi A., Goycoolea FM., Chitosan Nanoencapsulation of Flavonoids Enhances Their Quorum Sensing and Biofilm Formation Inhibitory Activities Against an *E. coli* Top 10 Biosensor, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, (164), 125-133.

Ozeki T., Tagami T., Drug/Polymer Nanoparticles Prepared Using Unique Spray Nozzles and Recent Progress of Inhaled Formulation, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, **9**(5), 236 -243

Özlü T., Bülbül Y., Özsu S., Ulusal Verilerle Toplum Kökenli Pnömoniler, *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 2007, (55), 191-212.

Park JH., Saravanakumar G., Kim K., Kwon IC., Targeted Delivery of Low Molecular Drugs Using Chitosan and Its Derivatives, *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62**(1), 28-41.

Pássaro L., Harbarth S., Landelle C., Prevention of Hospital-Acquired Pneumonia in Non-ventilated Adult Patients: A Narrative Review, *Antimicrob Resist Infect Control*, 2016, 5,43, DOI: 10.1186/s13756-016-0150-3.

Pastoriza CL., Todoroff J., Vanbever R., Delivery Strategies for Sustained Drug Release in the Lungs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, (75), 81-91.

Patel KK., Tripathi M., Pandey N., Agrawal AK., Gade S., Anjum MM., Tilak R., Singh S., Alginate Lyase Immobilized Chitosan Nanoparticles of Ciprofloxacin for the Improved Antimicrobial Activity Against the Biofilm Associated Mucoïd *P. aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis, *Int J Pharm*, 2019, (563), 30-42.

Radwan MA., AlQuadeib BT., Šiller L., Wright MC., Horrocks B., Oral Administration of Amphotericin B Nanoparticles: Antifungal Activity, Bioavailability and Toxicity in Rats, *Drug Deliv*, 2017, 24(1), 40-50.

Rajan M., Raj V., Encapsulation, Characterisation and In-vitro Release of Anti-Tuberculosis Drug Using Chitosan-Polyethyleneglycol Nanoparticles, *Int J Pharm Sci*, 2012, 4(4), 255-259.

Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesaro A., Chitosan Nanoparticles: Preparation, Size Evolution and Stability, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 455(1-2), 219-228.

Sattar SBA., Sharma S., Bacterial Pneumonia, 2019, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513321/>, Ziyaret tarihi: 06 Ağustos 2019).

Scholte JBJ., Duong HL., Linssen C., Van Dessel H., Bergmans D., Van der Horst R., Savelkoul P., Roekaerts P., Van Mook W., Empirical Antibiotic Therapy for Pneumonia in Intensive Care Units: A Multicentre, Retrospective Analysis of Potentially Pathogenic Microorganisms Identified by Endotracheal Aspirates Cultures, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, (34), 2295-2305.

Semmler-Behnke M., Takenaka S., Fertsch S., Wenk A., Seitz J., Mayer P., Oberdörster G., Kreyling WG., Efficient Elimination of Inhaled Nanoparticles from the Alveolar Region: Evidence for Interstitial Uptake and Subsequent Reentrainment Onto Airways Epithelium, *Environ Health Perspect.*, 2007, 115(5), 728-733.

Sinha VR., Singla S., Wadhawan R., Kaushik R., Kumria K., Dhawan S., Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, (274), 1-33.

Sevinç C., Uçan ES., Yaşamı Tehdit Eden Pnömoniler, *Toraks Dergisi*, 2000, 1(2), 50-57.

Sezer AD., Cevher E., Topical Drug Delivery Using Chitosan Nano and Microparticles, *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(9), 1129-1146.

Singh K., Mishra A., Singh A., Preparation and In Vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Amphotericin B as a Drug Delivery System, *Advanced Science Letters*, 2015, **21**(8), 2606-2608.

Sobhani Z., Samani SM., Montaseri H., Khezri E., Nanoparticles of Chitosan Loaded Ciprofloxacin: Fabrication and Antimicrobial Activity, *Adv Pharm Bull*, 2017, **7**(3), 427-432.

Sousa-Batista AJ., Pacienza-Lima W., Ré MI., Rossi-Bergmann B., Novel and Safe Single-Dose Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Implantable Amphotericin B-Loaded Microparticles, *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.06.001>.

Sousa D., Justo I., Domínguez A., Manzur A., Izquierdo C., Ruiz L., Nebot M., Bayas JM., Celorrio JM., Varona W., Llinares P., Miguez E., Sánchez E., Carratalá J., Community-Acquired Pneumonia in Immunocompromised Older Patients: Incidence, Causative Organisms and Outcome, *Clin Microbiol Infect*, 2013, **19**(2), 187-192.

Souza LCD., Mota VBRD., Carvalho AVDSZ., Corrêa RDGCF., Libério SA., Lopes FF., Association Between Pathogens from Tracheal Aspirate and Oral Biofilm of Patients on Mechanical Ventilation, *Braz Oral Res*, 2017, 31:e38.

Talha KA., Hasan Z., Selina F., Palash MI., Organisms Associated with Ventilator Associated Pneumonia in Intensive Care Unit, *Mymensingh Medical Journal*, 2009, **18**(1 Suppl), S93-97.

Tan X., Chen R., Zhu S., Wang H., Yan D., Zhang X., Farmakiotis D., Mylonakis E., *Candida albicans* Airway Colonization Facilitates Subsequent *Acinetobacter baumannii* Pneumonia in a Rat Model, *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, **60**(6), 3348-3354.

Topal GR, Devrim B., Eryilmaz M., Bozkır A., Design of Ciprofloxacin-Loaded Nano-and Microcomposite Particles for Dry Powder Inhaler Formulations: Preparation, Invitro Characterization and Antimicrobial Efficacy, *J Microencapsul*, 2018, (14), 1-41.

Uçan ES., Sayiner A., Akan H., Arseven O., Yüce A., Açikel Ü., Akova M., Gülay Z., Kargı A., Özcan M., Özdemir Ö., Selçuk T., Tabak L., Alataş F., Silitreli E., Üstün C., Zeytinoğlu A., Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Hastalarda Pnömoni Tani ve Tedavi Rehberi, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1998, (4), 158-172.

Ulozas E., Amphotericin B-Induced Nephrotoxicity, *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*, 2010, **7**(14), 347-357.

Vallés J., Mariscal D., Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2005, 23 Suppl 3, 30-6.

Vardakas KZ., Siempos II., Grammatikos A., Athanassa Z., Korbila IP., Falagas ME., Respiratory Fluoroquinolones for the Treatment of Community-Acquired Pneumonia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *CMAJ*, 2008, **179**(12), 1269-1277.

Vila L., Marcos R., Hernández A., Long-term Effects of Silver Nanoparticles in Caco-2 Cells, *Nanotoxicology*, 2017, **11**(6), 771-780.

Villafuerte D., Aliberti S., Soni NJ., Faverio P., Marcos PJ., Wunderink RG., Rodriguez A., Sibila O., Sanz F., Martin-Loeches I., Menzella F., Reyes LF., Jankovic M., Spielmanns M., Restrepo MI, Prevalence and Risk Factors for Enterobacteriaceae in Patients Hospitalized with Community-Acquired Pneumonia, *Respirology*, 2019, DOI: 10.1111/resp.13663.

Wijnant GJ., Van Bocxlaer K., Yardley V., Harris A., Alavijeh M., Silva-Pedrosa R., Antunes S., Mauricio I., Murdan S., Croft SL., Comparative Efficacy, Toxicity and Biodistribution of the Liposomal Amphotericin B Formulations Fungisome® and AmBisome® in Murine Cutaneous Leishmaniasis, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2018, **8**(2), 223-228.

Zhang A., Mu H., Zhang W., Cui G., Zhu J., Duan J., Chitosan Coupling Makes Microbial Biofilms Susceptible to Antibiotics, *Sci Rep*, Scientific Reports 3, 3364, 2013.

Zhang J., Wu L., Chan HK., Watanabe W., Formation, Characterization, and Fate of Inhaled Drug Nanoparticles, *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, **63**(6), 441-455.

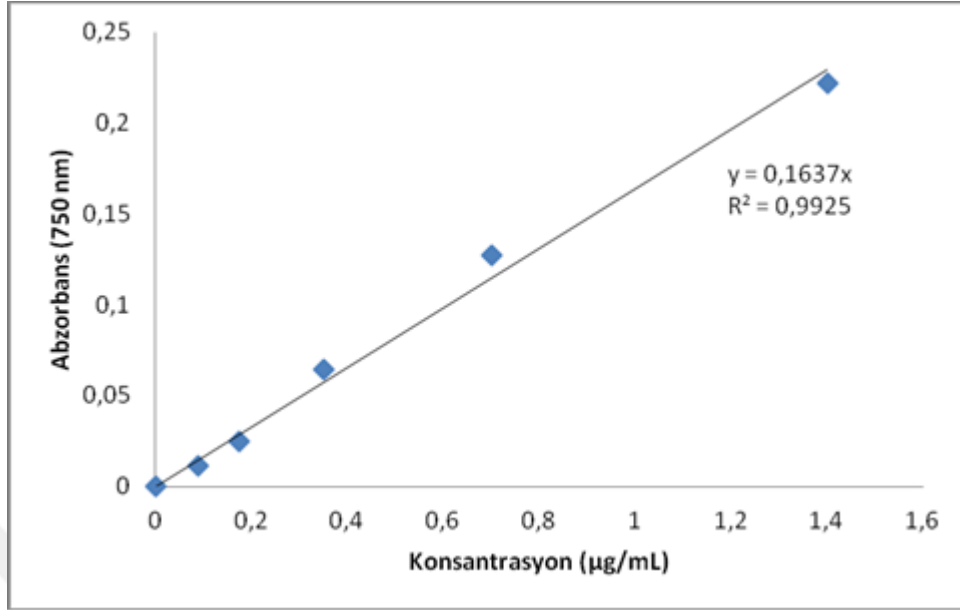
Zhou QT., Leung SS., Tang P., Parumasivam T., Loh ZH., Chan HK., Inhaled Formulations and Pulmonary Drug Delivery Systems for Respiratory Infections, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, (85), 83-99.

Zinner SH., Firsov AA., Gilbert D., Simmons K, Lubenko IY., The Pharmacodynamics of Gatifloxacin and Ciprofloxacin for Pneumococci in an In vitro Dynamic Model: Prediction of Equiefficient Doses, *J Antimicrob Chemother*, 2001, **48**(6), 821-826.



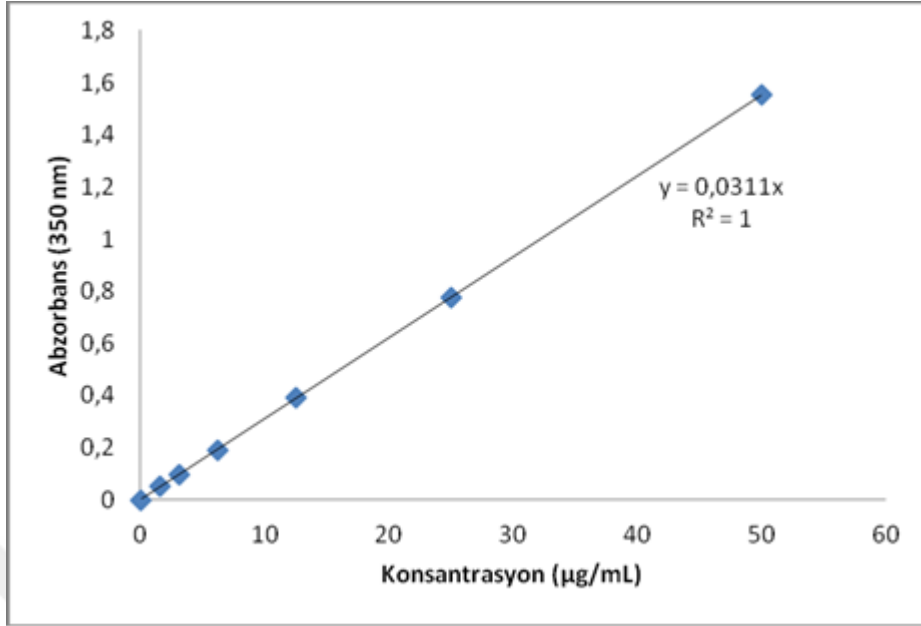
EKLER

Ek-A



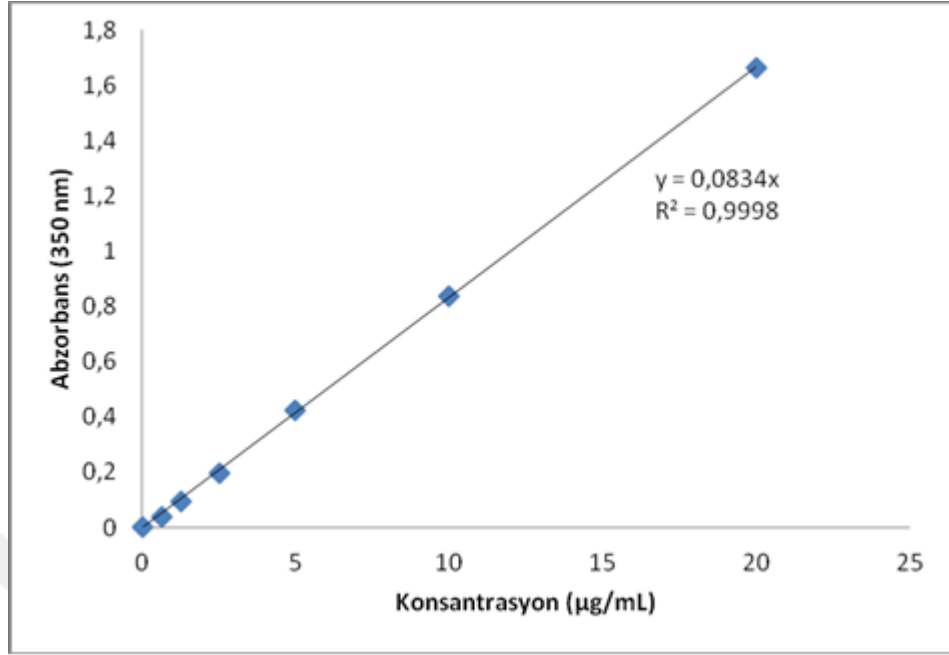
Şekil A.1. BSA standart eğrisi

Ek-B



Şekil B.1. Siprofloksasin standart eğrisi

Ek-C



Şekil C.1. Amfoterisin B standart eğrisi

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

- [1] Olgun U., Tunç K., **Özaslan V.**, Preparation of Self-Cleaning Polycaprolactone-Silica Composite Films with Nanosilver Particles and Their Antibacterial Activity Against *E. coli* and *S. aureus*, *Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı*, İstanbul, 12 Haziran 2008.
- [2] Olgun U., Tunç K., **Özaslan V.**, Preparation of antimicrobial polycaprolactone-silica composite films with nanosilver rods and triclosan using roll-milling method, *Polymers Advanced Technologies*, 2011, **22**(2), 232-236.
- [3] Kasap M., Akpınar G., Semiz C., **Özaslan V.**, Golgi ayrışımının HeLa Hücre Proteomu Üzerine Etkisi, *Genel Biyoloji Kongresi*, 2013.
- [4] Wulamujiang A., Doger E., Kara G., Yılmaz C., **Özaslan V.**, Muezzinoglu B., Ozbek B., Canturk Z., Cetinarslan B., Tarkun I., Kenar H., Vascular complications associated with gestational diabetic mothers and their newborn, 2016.
- [5] **Özaslan V.**, Uzuner H., Karadenizli A., Özdoğan C. Y., Kenar H., Antibacterial activity of ciprofloxacin loaded chitosan microparticles against *E.coli* and *P. aeruginosa* and their cytotoxic effect on human lung epithelial cells, *BIOMED 2017, 22 International Biomedical Science& Technology Symposium*, P106, 12-14 May, Ankara, 2017.
- [6] **Kucukoglu V.**, Uzuner H., Kenar H., Karadenizli A., In vitro antibacterial activity of ciprofloxacin loaded chitosan microparticles and their effects on human lung epithelial cells, *International Journal of Pharmaceutics*, 27.07.2019, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118578>

ÖZGEÇMİŞ

Vildan Küçüköğlu 1981 yılında İzmit'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmit'te tamamladı. 2003 yılında girdiği Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2006-2009 yılları arasında, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2012 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora programına kabul edildi ve 2012-2019 yılları arasında doktora eğitimi aldı. Lisans eğitiminin tamamlanmasını müteakip 2007-2009 yılları arasında Florence Nightingale Hastanesi'nde klinik mikrobiyoloji laboratuvarında biyolog olarak çalıştı. 2009-2012 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Köseköy Meslek Yüksek Okulu'nda 31. Madde öğretim görevlisi olarak gıda teknolojisi, biyomedikal cihaz teknolojisi bölümlerinde derslere girdi. 2013 yılından itibaren Atlas Medikal'de saha koordinatörü olarak görev yapmaktadır.