

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MELISSA OFFICINALIS* L. BİTKİSİNİN ETANOL EKSTRAKTININ
NANOLİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN ANTİMİKROBİYAL VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nagihan NİZAM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

HAZİRAN 2021

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MELISSA OFFICINALIS* L. BİTKİSİNİN ETANOL EKSTRAKTININ
NANOLİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN ANTİMİKROBİYAL VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Nagihan NİZAM
(181297056007)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER

HAZİRAN 2021

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 181297056007 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Nagihan NİZAM, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*MELISSA OFFICINALIS* L. BİTKİSİNİN ETANOL EKSTRAKTININ NANOLİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL**
Bursa Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER**
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan KAZAN**
Bursa Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Gülcengül DUMAN
Yeditepe Üniversitesi

Teslim Tarihi :
Savunma Tarihi : 10.06.21



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 190Y019 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 190Y019 numaralı Bursa Teknik Üniversitesi BAP projesi ile desteklenmiştir.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Nagihan Nizam



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında desteğini, bilgi birikimini benimle paylaşarak bana yol gösteren bakış açısını örnek aldığım çok değerli ve kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL'a ve çok değerli sevgili eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde katkılarından dolayı BTÜ Kimya bölümü ve BTÜ Gıda Mühendisliği bölümüne, Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Bölümüne, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Haziran 2021

Nagihan Nizam
(Moleküler Biyolog)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Lipozomların Yapısı ve Sınıflandırılması	2
1.1.1 Lipozomların yapısal bileşenleri	3
1.1.1.1 Fosfolipitler	3
1.1.1.2 Kolesterol	4
1.1.2 Lipozomların sınıflandırılması.....	4
1.2 Lipozomların Oluşum Mekanizması	6
1.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Lipozomlar ve Enkapsülasyon	7
1.4 Lipozom Hazırlama Yöntemleri.....	9
1.5 Lipozomların Karakterizasyon Yöntemleri.....	13
1.5.1 Boyut ve boyut dağılımı.....	13
1.5.2 Yüzey yükü	14
1.5.3 Enkapsülasyon etkinliği	15
1.5.4 Faz geçiş sıcaklığı (T _c).....	16
1.5.5 Membran akışkanlığı.....	16
1.5.6 Lamellarite	16
1.6 <i>Melissa officinalis</i> (Melisa Otu).....	16
1.7 Fitokimyasal Bileşiklerin Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları ve Antimikrobiyal Aktivite Belirleme Yöntemleri	18
1.7.1 Agar disk difüzyon yöntemi.....	19
1.7.2 Sıvı dilüsyon yöntemi	19
1.8 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	20
1.9 İn Vitro Yara İyileşmesi	21
1.10 Tezin Amacı	21
1.11 Literatür Araştırması	21
1.12 Hipotez	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
2.1 Materyal	23
2.2 Yöntem	23
2.2.1 İki aşamalı homojenizasyonla lipozom dispersiyonlarının hazırlanması .	23
2.2.2 <i>Melissa officinalis</i> bitkisinin yapraklarının etanol ile ekstraksiyonu.....	24
2.2.3 Ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun hazırlanması	25

2.2.4 Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile morfolojik karakterizasyonun yapılması	26
2.2.5 Ekstrakttaki total fenolik madde miktarının hesaplanması	26
2.2.6 Ekstrakt ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi	28
2.2.6.1 Disk difüzyon testi ile büyüme inhibisyonu zonlarının belirlenmesi..	28
2.2.6.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi	29
2.2.7 Hücre kültürü deneyleri	30
2.2.7.1 Ekstrakt ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	30
2.2.7.2 Ekstrakt ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun yara iyileştirici etkilerinin belirlenmesi.....	32
2.2.8 İstatistiksel analiz	33
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
3.1 Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Hazırlanması.....	34
3.2 Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Enkapsülasyon Etkinliği ve Ürün Veriminin Hesaplanması	34
3.3 Taramalı Elektron Mikroskopu ile Morfolojik Karakterizasyonun Yapılması	36
3.4 Ekstrakttaki Total Fenolik Madde İçeriğinin Hesaplanması.....	39
3.5 Ekstrakt ve Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi.....	40
3.5.1 Disk difüzyon testi ile büyüme inhibisyonu zonlarının belirlenmesi.....	40
3.5.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi	42
3.6 Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	48
3.7 Ekstrakt ve Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Yara İyileştirici Etkilerinin Belirlenmesi	50
3.8 İstatistiksel Analiz	53
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ.....	68

KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
CFDA-AM	: 5-karboksifloresein Diasetat, Asetoksimetil Ester
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fetal Sığır Serumı
GAE	: Gallik Asit Eş Değeri
GUV	: Dev Tek Katmanlı Veziküller
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS-MS	: Sıvı Kromatografisi- Kütle/Kütle Spektrometresi
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LUV	: Büyük Tek Katmanlı Veziküller
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MHA	: Müeller-Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MLV	: Çok Katmanlı (>5) Veziküller
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NRU	: Nötral Red Alımı
OLV	: Birkaç Katmanlı (2-5) Veziküller
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitüsü
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
SRB	: Sulforhodamine B
SUV	: Küçük Tek Katmanlı Veziküller
TPC	: Total Fenolik İçerik
TSB	: Triptik Soy Broth
UPLC	: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi

SEMBOLLER

CC50	: % 50 Sitotoksik Konsantrasyon
IC50	: Yarı-maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
ML	: Mililitre
N	: Örnek Sayısı
NM	: Nanometre
PPM	: Milyonda Parça
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1 : Yapı ve büyüklük bakımından lipozom sınıfları.....	5
Çizelge 3.1 : 24 saat sonra büyüme inhibisyonu zonu ölçümleri	41
Çizelge 3.2 : Ekstrakt ve formülasyonunun MİK ve MBK değerleri.....	46



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Lipozom yapısı	3
Şekil 1.2 : Lipozomların oluşum mekanizması	6
Şekil 1.3 : Lipozom temelli taşıyıcı sistemler	8
Şekil 1.4 : Prob sonikatör.....	13
Şekil 2.1 : Prob sonikatörde homojenizasyon.....	23
Şekil 2.2 : Bitki yapraklarından ekstrakt elde edilme aşamaları	24
Şekil 2.3 : Altın püskürtme sonrası numuneler	26
Şekil 2.4 : Gallik asit ve ekstrakt konsantrasyonlarının total fenolik madde tayini için hazırlanması	27
Şekil 2.5 : MİK deneyi için kullanılan mikrolaka düzeni.....	30
Şekil 2.6 : DMSO eklendikten sonra mikrolakalar.....	31
Şekil 3.1 : Birinci homojenizasyondan sonra elde edilen boş lipozomların 10 µm ölçekli SEM görüntüleri.....	36
Şekil 3.2 : İkinci homojenizasyondan sonra elde edilen boş lipozomların 10 µm ve 5 µm ölçekli SEM görüntüleri	36
Şekil 3.3 : Ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun 10 µm ölçekli SEM görüntüsü	37
Şekil 3.4 : Birinci homojenizasyondan sonra elde edilen boş lipozomların parçacık boyutu grafiği.....	37
Şekil 3.5 : Ekstrakt yüklü formülasyonun parçacık boyutu grafiği	38
Şekil 3.6 : İkinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozomların yoğunluğuna bağlı parçacık boyutu dağılımı.....	38
Şekil 3.7 : Gallik asit kalibrasyon grafiği	39
Şekil 3.8 : <i>E.coli</i> ATCC 25922'nin ve <i>S.aureus</i> ATCC 25923'ün 3 tekrarlı disk difüzyon sonuçları.....	41
Şekil 3.9 : Ekstrakt ve formülasyon için görünür bulanıklık üzerinden <i>S.aureus</i> ATCC 25923 için MİK değerlerinin belirlenmesi	43
Şekil 3.10 : <i>E.coli</i> ATCC 25922'ye karşı ekstrakt ve formülasyon için MİK değerlerinin belirlenmesi.....	44
Şekil 3.11 : <i>E.coli</i> ATCC 25922 MBK petrileri	45
Şekil 3.12 : <i>S.aureus</i> ATCC 25923 MBK petrileri	46
Şekil 3.13 : Formülasyonun A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini gösteren konsantrasyona bağlı %hücre canlılığı	49
Şekil 3.14 : Ekstraktın A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini gösteren konsantrasyona bağlı %hücre canlılığı	50
Şekil 3.15 : A549 hücrelerinin 20x objektifteki görüntüsü	51
Şekil 3.16 : 0.saatte ekstraktı, formülasyonu ve negatif kontrolü içeren kuyucukların 10x objektifteki mikroskop görüntüleri	51
Şekil 3.17 : 48.saatte 500 µg/mL ekstrakt, 500 µg/mL formülasyon ve negatif kontrolü içeren kuyucukların 10x objektifteki mikroskop görüntüleri.....	51

Şekil 3.18 : 48.saatte 1000 µg/mL ekstrakt, 1000 µg/mL formülasyon ve negatif kontrolü içeren kuyucukların 10x objektifteki mikroskop görüntüleri	52
Şekil 3.19 : Test maddelerinin bakterilerin büyüme inhibisyonu zon çapına etkisi ..	53



MELISSA OFFICINALIS L. BİTKİSİNİN ETANOL EKSTRAKTININ NANOLİPOZOMAL FORMÜLASYONUNUN ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Bu tez çalışmasının amacı *Melissa officinalis* L. bitkisinden elde edilen etanol ekstraktının stabilizasyon, emilim ve dağılım etkisini arttıracak lipozom yapılarıyla enkapsülasyonu sonucu oluşacak formülasyonun antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesidir.

Türkiye’de yaygın olarak yetişen *M. officinalis* çeşitli hastalıkların tedavisinde yaklaşık 2000 yıldır bitkisel ilaç olarak kullanılan çok yıllık bir Akdeniz bitkisidir. İçerisinde bir çok farklı sınıfa ait antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşik bulunmaktadır. Bu bileşikler doğrudan antimikrobiyal etkiyi sağlamakta ve farklı kanser hücre hatlarında proliferasyon ve migrasyonu azaltıcı etkiler göstermektedir. Geleneksel tıp, gıda endüstrisi ve aromaterapide geniş bir kullanımı vardır.

Lipozomlar ise toksik olmayan, biyobozunur, biyouyumlu bir fosfolipit vezikülü yapısı olup antikanser ilaç tasarımı, gen aktarımında, aşı formülasyonlarında, yara iyileşmesinde, dermatolojik hastalıklarda ilaç taşıyıcı sistem olarak fonksiyon görmesi sebebiyle kullanılmaktadır. Kompozisyonu, fiziksel özellikleri, hazırlama yöntemi farklı uygulama alanlarına göre değişebilmektedir. Lipozomlar fosfolipit yapıda olmalarından dolayı hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşikler enkapsüle edebilir. Belirli bir salınım profiline bağlı olarak kontrollü salınım yapabilir. Biyolojik çalışmalarda etken madde ve hedef hücre arasındaki entegrasyonu artırır.

Bu tez çalışmada; *M.officinalis* yapraklarından etanol ekstraksiyonu yapılmıştır. Ardından iki aşamalı homojenizasyonla hazırlanan lipozom ile ekstrakt formülasyonu hazırlanmıştır. Karakterizasyon için ekstrattaki total fenolik madde tayini, formülasyonun morfolojik karakterizasyonu, antimikrobiyal aktivite deneyleri ile sitotoksite deneyleri yapılmıştır. Enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olması için iki aşamalı homojenizasyon ile daha küçük boyutlu boş lipozom dispersiyonları hazırlanmıştır. Ekstrakt ile yüksek enkapsülasyon değeri sağlayan birleştirme oranının 1:1 (h/h) olduğu bulunmuştur. Bu oran üzerinden hazırlanan ekstrakt yüklü lipozom formülasyonu SEM ile karakterize edilmiştir. Formülasyonun antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi için gram negatif ve gram pozitif bakteri suşlarında disk difüzyon testi ve sıvı mikrodilüsyon testi gerçekleştirilmiştir.

Disk difüzyon testinde ekstrakt ve formülasyon arasında istatistiksel açıdan bir farklılık gözükmezken sıvı mikrodilüsyon testinde formülasyonun *S.aureus* ATCC 25923 suşuna karşı daha az konsantrasyonla daha etkili olduğu bulunmuştur. *E.coli* ATCC 25922 üzerinde formülasyon ve ekstraktın MİK değerlerinin istatistiksel açıdan aynı olduğu bulunmuştur. Ayrıca ekstrakt ve formülasyonun MTT testi ile BEAS-2B ve A549 hücre hatlarındaki doza bağlı sitotoksik etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar formülasyonun sağlıklı BEAS-2B hücrelerinde ve A549 kanser hücrelerinde

IC50 değerinin ekstrakta göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu BEAS-2B hücre hattında formülasyonun ekstrakta göre sitotoksitesinin daha az olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında belirlenen diğer bir nokta lipozomun tek başına antimikrobiyal etkisinin ve sitotoksik etkisinin bulunmamasıdır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; lipozomal formülasyon ile formüle edilecek az miktarda etken madde antimikrobiyal etki için yeterli olmaktadır. Aynı zamanda lipozomal formülasyonun sitotoksik olmadığı da ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: *Melissa officinalis*, lipozom, enkapsülasyon, sitotoksiste, antimikrobiyal aktivite



EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND CYTOTOXIC EFFECTS OF NANOLIPOSOMAL FORMULATION OF ETHANOL EXTRACT OF *MELISSA OFFICINALIS* L.

SUMMARY

The aim of this thesis study is to evaluate the antimicrobial effects and cytotoxic effects of the formulation resulting from the encapsulation of the ethanol extract obtained from the *Melissa officinalis* L. plant with liposome structures that will increase the stabilization, absorption and dispersion effect.

M. officinalis, which is widely grown in Turkey, is a perennial Mediterranean herb that has been used as an herbal medicine for about 2000 years in the treatment of various diseases. There are phenolic compounds with antioxidant properties belonging to many different classes in the leaves of the plant and these compounds provide direct antimicrobial effect and show proliferation-reducing and migration-reducing effects on different cancer cell lines. It is widely used in traditional medicine, food industry, and aromatherapy.

Liposomes, on the other hand, are non-toxic, biodegradable, biocompatible phospholipid vesicles and are used in anticancer drug design, gene transfer, vaccine formulations, wound healing, dermatological diseases because of their function as a drug carrier system. Composition, physical properties, preparation method of liposomes may vary in different application areas. Liposomes can make controlled drug release depending on a certain release profile. In biological studies, liposomes increase the integration between the active substance and the target cell.

In this thesis study; ethanol extraction was made from *M.officinalis* leaves. Subsequently, an extract formulation was created with liposome prepared by two-step homogenization. For characterization determination of total phenolic content in the extract, morphological characterization of the formulation, antimicrobial activity experiments, cytotoxicity experiments were performed. In order to have high encapsulation efficiency, smaller sized empty liposome dispersions were prepared by two-step homogenization. The ratio of incorporation the extract with liposomes providing high encapsulation efficiency was found to be 1: 1 (v/ v). The extract loaded liposome formulation prepared over this ratio was characterized by SEM. After characterization, disk diffusion and broth microdilution methods were performed against gram negative and gram positive bacterial strains to evaluate the antimicrobial activities of formulation.

In the disk diffusion test, there was no statistically significant difference between extract and formulation, while in the broth microdilution test, the formulation was found to be more effective with less concentration against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain. MIC values of formulation and extract were found to be statistically the same against *Escherichia coli* ATCC 25922. In addition, dose-related cytotoxic effects of the extract and formulation on BEAS-2B and A549 cell lines were investigated by MTT test. The results showed that the IC50 value of the formulation

was higher on healthy BEAS-2B cells and A549 cancer cells compared to that of the extract. This indicates that the formulation was less cytotoxic than the extract on the BEAS-2B cell line. Another point determined in the thesis study is that liposome alone has no antimicrobial and cytotoxic effects at all.

According to the results of this study; a small amount of active compound to be formulated with liposomal formulation is sufficient for antimicrobial effect. It has also been demonstrated that the liposomal formulation is not cytotoxic.

Keywords: *Melissa officinalis*, liposome, encapsulation, cytotoxicity, antimicrobial activity.



1. GİRİŞ

Lipozomlar sulu bir merkezi çevreleyen bir ya da daha fazla fosfolipit çift tabasından oluşan veziküler yapılardır (Vemuri ve Rhodes, 1995; Vuilleumard, 1991; Ulrich, 2002). İlk kez İngiliz hematolog Dr. Alec Bangham tarafından 1961’de tanımlanmıştır. Susuz fosfolipitlerin boyanmasıyla elektron mikroskopunda karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon, oluşan yapının hücre membranına benzediğinin ilk kanıtı olmuştur. Etimolojik olarak lipozom: Lipos (yağ) ve Soma (gövde) kelimelerinin birleşiminden meydana gelmektedir (Dua ve diğ., 2012). Lipozomlar yapısal özellikleri, kompozisyonları, çeşitleri ve hazırlama yöntemleri ile bir çok avantaja sahip olmaktadır. Günümüzde gıda, kozmetik, tıp, eczacılık, tekstil gibi bir çok farklı alanda kullanılabilmektedir (Cui ve diğ., 2015; Betz ve diğ., 2005; Banerjee, 2001; van Balen ve diğ., 2004; Martí ve diğ., 2012). Lipozomlar bu alanlarda ilaç taşıyıcı sistemler olarak işlev görmektedir. Lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak işlev görmesi; test edilecek maddenin lipozom içine enkapsüle olmasını ve hedef lokasyonda salınmasını sağlar (Martí ve diğ., 2012). Lipozomların bir enkapsülasyon aracı olarak kullanılması antimikrobiyal açıdan da önemlidir. Günümüzde sıklıkla antimikrobiyal açıdan test edilmek istenen ajanlar; peptitler, antibiyotikler, biyoaktif bileşikler, ekstraktlar, esansiyel yağlar ve metal iyonları lipozomlarda enkapsüle edilmektedir (Engel ve diğ., 2017; da Silva Malheiros ve diğ., 2010; Lagacé ve diğ., 1991; Cui ve diğ., 2015; Low ve diğ., 2013; Tometri ve diğ., 2020). Bu çalışmalardan biri olan Tometri ve diğerleri (2020) *Laurus nobilis* yaprak ekstraktının iki farklı konsantrasyonunun nanolipozomlu ve nanolipozomsuz antimikrobiyal etkisini zamana bağlı olarak *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*’ye karşı araştırmıştır. 1500 ppm ekstrakt içeren nanolipozomlu formülasyonun, 1500 ppm ekstraktan daha iyi sonuç verdiği ve bakteri kaynaklı gıda bozulmasını ve oksidasyon sürecini geciktirdiği sonucuna ulaşmıştır. Çalışmaya göre nanolipozomun boyut, salınım, enkapsülasyon etkinliği parametreleri aynı konsantrasyondaki ekstrakta kıyasla antimikrobiyal açıdan daha etkili olmasını sağlamıştır. Antimikrobiyal çalışmaların yanısıra sitotoksite çalışmalarında da lipozomal enkapsülasyon sistemlerin avantajı açıkça görülmektedir. Li ve diğerlerinin (2005) yaptığı çalışmada *Curcuma longa* bitkisine özgü bir bileşik olan kurkuminin

lipozomal enkapsülasyonunu farklı pankreatik karsinom hücre hatlarına karşı sitotoksik etki açısından değerlendirmiştir. Çalışmada lipozom enkapsüle kurkuminin ve serbest kurkuminin pankreatik hücre hatlarında bulunan NF-Kappa B üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Burada önemli olan nokta kurkumin hidrofobik olduğundan lipozom ile enkapsüle olduğunda hedef bölgeye ulaşılabilirliğinin artmış olmasıdır. Pankreatik hücre hatlarında yapılan çalışmada sitotoksisite MTT deneyi ile ölçülmüştür. Lipozom enkapsüle kurkuminin IC₅₀ ve IC₉₀ değerlerinin bazı hücre hatlarında serbest kurkumine göre apoptozisi daha fazla indüklediği belirtilmiştir.

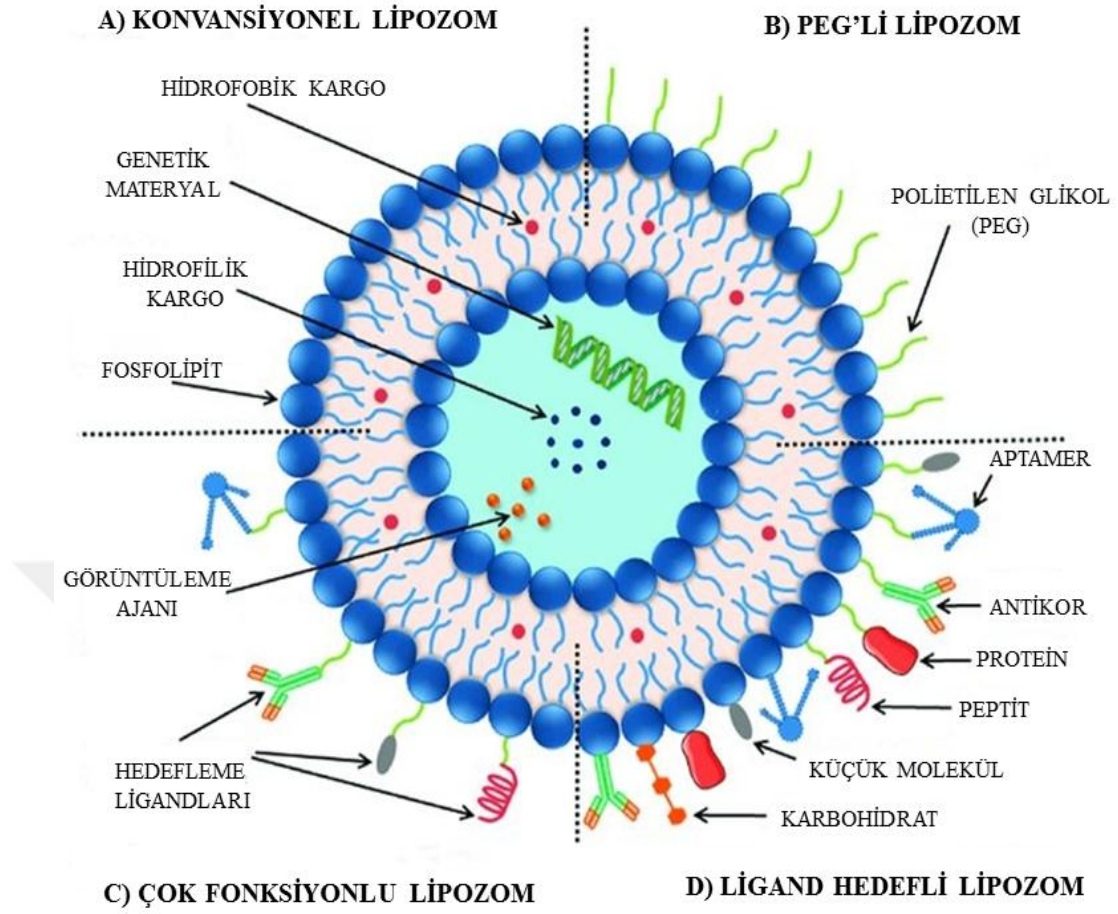
Melissa officinalis ise; çok yıllık, aromatik bir bitki olup, yapraklarında bulunan bir çok sınıfa ait biyoaktif bileşikler ile farklı kanser hücrelerinde düşük dozlarda bile sitotoksik etkiye sahiptir. Farklı bakteri, mantar suşlarında ve virüslerde antimikrobiyal etkisi kanıtlanmıştır. Yapraklarından esansiyel yağ elde edilebilmesinin yanında farklı çözücülerde ve koşullarda ekstraktları elde edilerek potansiyel antimikrobiyal ajan olarak kullanımı araştırılmıştır (Suschke ve diğ., 2007; Canadanovic-Brunet ve diğ., 2008).

Bu tez çalışmasında *M. officinalis* yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının lipozomal formülasyonunun antimikrobiyal aktivitesi, sitotoksik etkisi ve yara iyileştirme etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda lipozomal formülasyonun etkinliği ekstrakt ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca lipozomal formülasyonun karakterizasyonu yapılmış ve ekstrakttaki total fenolik madde belirlenmiştir.

1.1 Lipozomların Yapısı ve Sınıflandırılması

Lipozomlar parçacık boyutları 30 nm ile birkaç µm arasında değişebilen küresel lipit vezikülleridir. Kolesterol ve doğal toksik olmayan fosfolipitlerden oluşur. Fosfolipitlerin baş kısımlarının hidrofilik, kuyruk kısımlarının hidrofobik olmasından dolayı lipozomlarda da hem hidrofilik hem hidrofobik özellik taşır. Lipozomlardaki fosfolipitlerin polar baş grupları iç ve dış sulu fazlara doğru yönelir (Wagner ve Vorauer-Uhl, 2011).

Yapılarıyla ilişkili olarak sıklıkla büyüklük, kompozisyonu, çift takaba sayısı ve fosfolipit yükü bakımından sınıflandırılırlar (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Lipozom yapısı (Riaz ve diğ., 2018).

1.1.1 Lipozomların yapısal bileşenleri

1.1.1.1 Fosfolipitler

Fosfolipitler biyolojik membranların önemli bir yapısal bileşenidir. Yaşayan organizmaların hücre membranlarında iki fosfolipit sınıfı bulunur. Bunlar sfingolipitler ve fosfogliseritlerdir. En yaygın fosfolipit ise fosfatidilkolindir. Fosfatidilkolin molekülü suda ve sulu ortamda çözünür değildir. Yığın (bulk) sulu faz ve uzun hidrokarbon yağ zinciri arasındaki istenmeyen etkileşimleri en aza indirmek için bu moleküller kendilerini düzlemsel çift tabakalara yakından hizalarlar.

Gliserol içeren fosfolipitler, lipozom formülasyonunun en yaygın kullanılan bileşenidir. Biyolojik membranlardaki lipitin ağırlıkça %50'den fazlasını temsil ederler. Bu fosfolipitler fosfatidik asitten elde edilmektedir. Fosfolipitlere örnek olarak

fosfatidilkolin- lesitin (PC), fosfatidiletanolamin- sefalin (PE), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilgliserol (PG) verilebilir (Anwekar ve diğ., 2011).

Lipozom için kullanılan doğal fosfolipitler ayrıca soya fasulyesi, kolza (kanola) tohumu, buğday tohumu (ruşeymi), ayçiçeği, keten tohumu gibi bitkisel kaynaklardan ve yumurta sarısı, süt gibi hayvansal kaynaklardan elde edilebilmektedir (Van Hoogevest ve Wendel, 2014).

1.1.1.2 Kolesterol

Kolesterol lipozom membran akışkanlığını/rijitliğini belirleyen diğer bir bileşendir (Sulkowski ve diğ., 2005). Kolesterol tek başına iki tabakalı yapı oluşturmaz. Ancak çok yüksek konsantrasyonlarda fosfolipit membranların yapısına katılmaktadır. Bu oran kolesterolün fosfatidilkoline olan molar oranı olarak ifade edilmekte ve 1:1 hatta 2:1 molar konsantrasyonda da olabilmektedir. Kolesterol membrana sulu yüzeye hedeflenen hidroksil grubu ve çift katmanın merkezindeki açıl zincirine paralel alifatik zincir ile katılır. Fosfolipit temelli lipozomlarda kolesterolün yüksek çözünürlüğe sahip olması hem hidrofobik etkileşim hem de spesifik baş grup etkileşimine atfedilmiştir. Ancak yine de kolesterolün çift katmanda nasıl düzenlendiğine dair kesin bir kanıt yoktur (Patil ve diğ., 2005; Patel, 2006).

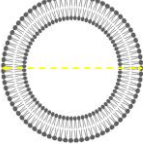
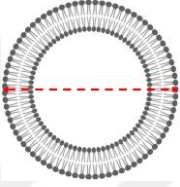
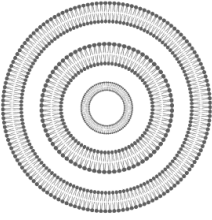
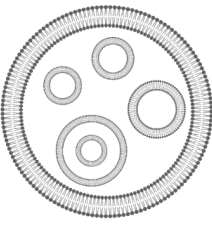
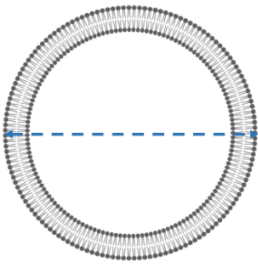
1.1.2 Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomlar yapı, büyüklük ve kompozisyon bakımından çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Yapı ve büyüklük bakımından lipozom sınıfları Çizelge 1.1’de verilmiştir. Kompozisyonlarına göre lipozomlar ise; geleneksel, PH-duyarlı, katyonik, füzojenik, immünolipozomlar ve uzun sirkülasyonlu lipozomlar olarak sınıflandırılmaktadır (Barba ve diğ., 2019).

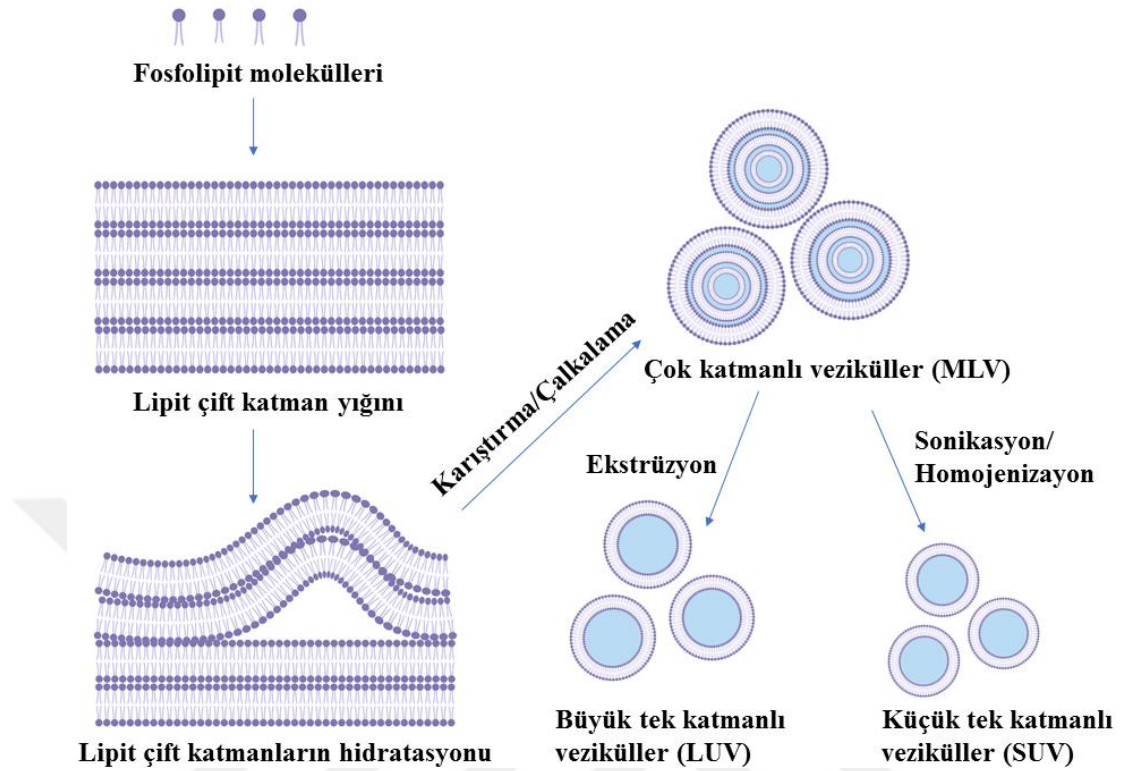
Lipozomların bir çok farklı alanda kullanılmasını sağlayan birden çok avantajı vardır. Lipozomlar, toksik ve immünojenik olmayan aynı zamanda esnek ve biyouyumlu olan, biyolojik olarak tamamen parçalanabilen veziküllerdir. Bunun yanında enkapsülasyon ile taşınan ilacın stabilitesini arttırması ve toksisitesini düşürmesi, aynı zamanda hassas dokuların toksik ilaçlara maruz kalmasını engellemesi, aktif hedefleme yapma yeteğinin olması, enkapsüle ilacın etkinliğini ve terapötik indeksini arttırması gibi ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımını destekleyen avantajları vardır. Avantajlarının yanında düşük çözünürlük ve kısa yarı ömre sahip olması, bazı

koşullarda fosfolipitin oksidasyon veya hidroliz benzeri reaksiyonlara maruz kalması, sızıntı olması ya da enkapsüle ilaç/molekülün füzyon yapması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Himanshu ve diğ., 2011).

Çizelge 1.1 : Yapı ve büyüklük bakımından lipozom sınıfları (Sforzi ve diğ., 2020).

Vezikül Türü	Görsel	Boyut	Katman sayısı
SUV		20-100 nm	Tek
LUV		100 nm-1µm	Tek
MLV		>500 nm	Çok, konsentrik
OLV		100 nm-1µm	Çok, konsentrik değil
GUV		>1µm	Tek

1.2 Lipozomların Oluşum Mekanizması



Şekil 1.2 : Lipozomların oluşum mekanizması (Patil ve Jadhav, 2014).

Fosfolipitler hidrofobik bir kuyruğa ve bir hidrofilik veya polar bir başa sahip oldukları için hem sulu hem de polar fonksiyonel gruba sahip moleküllere karşı afinitesi olan amfipatik lipit molekülleridir (Şekil 1.2). Hidrofobik kuyruk, her zincirde 10-24 karbon atomu ve 0-6 çift bağ içeren iki yağ asidi zincirinden oluşur. En sık makroskopik yapılar, kolloidal nano yapılar (yapay membranlar) olarak dağılan lamellar, altıgen veya kübik fazlar oluşmaktadır. Bu fazlar da sırasıyla lipozomlar, heksazomlar veya kübozomlar olarak adlandırılır. En yaygın doğal polar fosfolipitler fosfatidilkolinlerdir. Bu fosfolipitler bir gliserol köprüsünün bir hidrofilik polar baş grup olan fosfokolin ile bir çift hidrofobik açıl hidrokarbon zincirine bağlandığı amfipatik moleküllerdir. Fosfolipitlerin ve analoglarının amfipatik doğası onlara su varlığında kapalı eş merkezli çift katmanlar oluşturma yeteneği kazandırır. Bu aynı zamanda “kendiliğinden bir araya gelme” (self-assembly) olarak adlandırılmaktadır. Lipitlerin çözündüğü organik çözücünün vakum ya da azot gazıyla uzaklaştırılmasıyla elde edilen ince lipit filmlerin ya da çözücünün dondurularak vakumla kurutulmasından elde edilen lipit keklerin hidratlanmasıyla kristal lipit çift katman yığınları sıvı hale gelerek şişer ve lipozomları oluşturur. Hidratlanmış lipit tabakaları

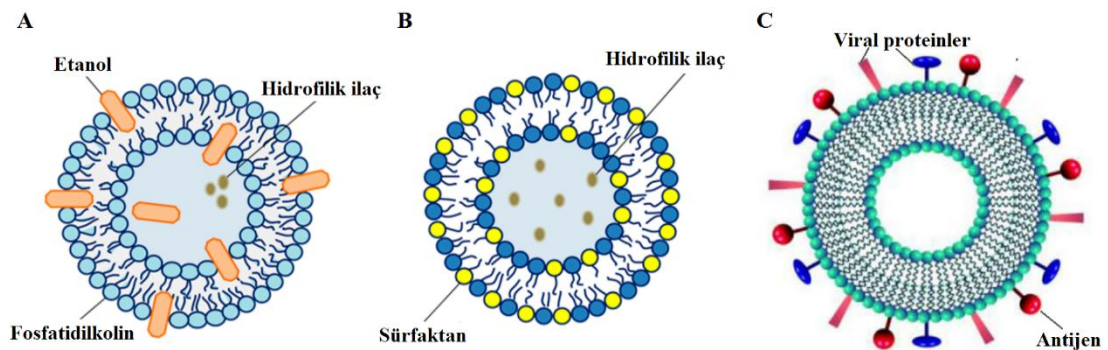
ise; çalkalama sırasında ayrılır ve büyük, çok katmanlı veziküller oluşturmak üzere kendiliğinden kapanır (Şekil 1.2). Bu sayede kenarlarda çift katmanın hidrokarbon çekirdeği ile suyun etkileşimi önlenir (Cullis ve diğ., 1989; Zhao ve diğ., 2012; Fournier ve diğ., 2004).

1.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Lipozomlar ve Enkapsülasyon

Lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımı ilk kez Gregoriadis ve arkadaşları tarafından 1972’de önerilmiştir. Boyutu 100 nm olan küçük lipozomlar organizmalarda iyi derecede dağılım gösterdiğinden sıklıkla ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır (Lasic, 1993b). Lipozom sentezlemek için geliştirilen yeni teknikler lipozomların çözünen maddeleri enkapsüle etme ve canlı organizmalarda hedef bölgeye taşınımı sağlama yeteneğiyle bağlantılıdır. Bu aynı zamanda taşınan maddelerin hızlı bir degregasyon ile sonuçlanacak istenmeyen yan reaksiyonlardan korunmasını sağlamaktadır. Hedef doku, hücre ya da organel tarafından lipozomların tanınması lipozom membran sentezlenmesi için kullanılan lipite bağlıdır. Farklı lipit çeşitlerinin farklı faz geçiş sıcaklıkları bulunur. Daha yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip olan lipitler daha geniş sıcaklık aralığında enkapsüle materyali tutar ve sızdırmaz ve yüksek stabilite gösterir. Bunun dışında lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasını farklı parametrelere uygun hazırlanabilme avantajının olmasını da sağlamaktadır. Bunlara örnek olarak; kolesterol ile lipozomdaki fosfolipitin stabilitesinin sağlanması, lipozomun kan dolaşımındaki tutulum süresini arttırmak için lipozom yüzeyinin hidrofilik polimerle kaplanması, lipozomların farklı PH'lara sahip hedef dokulara ulaşabilmesi için uygun PH'lardaki tampon çözeltilerin kullanılması lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılması verilebilir (Scherphof ve Damen, 1984; Sułkowski ve diğ., 2005).

Ayrıca; lipozomların partikül boyutu, lipit çift katman sayısı, yüzey yükü, çift katman rijitliği gibi fizikokimyasal özellikleri de ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımında önemlidir. Bu özellikler farklı lipozom tiplerinin hazırlanmasıyla elde edilmektedir. Fosfolipit polar baş grubunun yükü, fosfolipit açıl zincirinin doygunluğu ve uzunluğu, lipit yapısında olmayan moleküllerin lipozoma dahil edilmesi, lipit bileşenlerin oranı gibi yapısal modifikasyonlar da farklı özelliklerde lipozomların oluşumunu sağlamaktadırlar (Li ve Huang, 2006; Pastorino ve diğ., 2008). Bu yaklaşımların yanında farklı yapılarda lipozom temelli taşıyıcı sistemlerin (Şekil 1.3) geliştirilmesi

lipozomların ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılmasına katkı sağlamaktadır (Zylberberg ve Matosevic, 2016).



Şekil 1.3 : Lipozom temelli taşıyıcı sistemler. A: Etozom, B: Transferezom, C: Virozom (Chuang ve diğ., 2018; Yang ve diğ., 2019)

Farklı kompozisyonlarda ve farklı kullanım alanlarına sahip lipozom temelli ilaç taşıyıcı sistemler vardır. Bunlar da geleneksel lipozomlar gibi fosfolipit temellidir (Maherani ve diğ., 2011). Bu lipozom temelli taşıyıcı sistemlere; ısı, ışık, enzim, PH gibi uyaranlara duyarlı lipozomlar, vücutta uzun sirkülasyon özelliğine sahip stealth (gizli) lipozomlar, biyoaktif bileşiklerin vücut içerisinde hedeflenmesini sağlayan immünozomlar, yüksek elastisiteye sahip olduğu için topikal formülasyonlarda kullanılan transferezomlar ve etozomlar, virüs proteinlerini içeren ve aktif hedeflemede kullanılan virozomlar, arkelelerden elde edilen antioksidanları koruma amacıyla gıda sektöründe kullanılan arkeazomlar olarak örnek verilebilir (Mozafari, 2005; Zylberberg ve Matosevic, 2016; Lasic, 1993a; Krieg, 2001; Mozafari ve diğ., 2006).

Lipozomal enkapsülasyon, biyoaktif bileşiklerin hidrofilik, hidrofobik özellikte olmasına göre lipozomların membranındaki fosfolipit kısımlarına ya da sulu merkezine tutunarak lipozomların içerisine hapsolması anlamına gelmektedir. Lipozomal formülasyon bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılıyorsa enkapsülasyon canlı organizmadaki hedefe ulaşılan kadar devam eder. Enkapsülasyon farklı parametrelere bağlı olsa da (ilaç/lipit oranı, ilacın alıkonması, ilaç ve lipozomun stabilitesi vb.) temelde 2 farklı teknik ile biyoaktif bileşikler lipozomlar içerisine enkapsüle olabilmektedir (Mayer ve diğ., 1986). Bunlardan ilki ilaç enkapsülasyonunun vezikül oluşumu sürecinde gerçekleştiği pasif enkapsülasyon (pasif yükleme), diğeri ise oluşumu tamamlanmış veziküllere biyoaktif bileşiklerin yüklendiği aktif enkapsülasyondur (aktif yükleme) (Mozafari ve Mortazavi, 2005).

Hidrofobik bileşikler/ilaçlar (amfoterisin B takson, annamisin vb.) vezikül oluşumu sırasında doğrudan lipozomlar ile birleştirilebilir. Enkapsüle edilen ilaç miktarı ve ilaçların lipozomlardaki tutulumu, ilaç ve lipozomların etkileşimleri tarafından belirlenmektedir. Bu şekilde genellikle % 100'lük yakalama etkinliği elde edilebilir, ancak bu ilacın/bileşiğin lipozom membranındaki çözünürlüğüne bağlıdır. Hidrofilik ilaçların pasif enkapsülasyonu ise lipozomların vezikül oluşumu sırasında çözünmüş bir ilaç içeren sulu tamponu yakalama kabiliyetine bağlıdır (Akbarzadeh ve diğ., 2013). Aktif enkapsülasyon/yükleme teknikleri de “boş” lipozomların konsantre ilaç solüsyonu ile karıştırılmasına dayanmaktadır. Bu tekniğin bazı avantajları vardır. Bu teknikte boş lipozomlar makul bir süre içinde ilaçların çift katmanlarından difüze olabilmesine izin verecek kadar geçirgendir. İlaç böylece lipozom veziküllerini saran dış ortam ve veziküllerin iç kısmı arasındaki konsantrasyon denge haline gelinceye kadar veziküllere yüklenmeye devam eder. Ayrıca toksik olabilecek ilaçların enkapsülasyonunda da bu yöntem avantaj sağlamaktadır (Maherani ve diğ., 2011).

1.4 Lipozom Hazırlama Yöntemleri

Lipozom hazırlamak için doğru yöntemin seçimi bazı parametrelere bağlıdır. Bu parametreler enkapsüle edilecek malzemenin ve lipozomal bileşenlerin fizikokimyasal özellikleri, lipid veziküllerin dispersiyonunu içeren sıvı ortamın doğası, enkapsüle edilen maddenin etkili konsantrasyonu ve potansiyel toksisitesi, veziküllerin uygulaması ve iletimi sırasında dahil olan ek işlemler, veziküllerin optimum boyutu, polidispersitesi, raf ömrü, tekrar üretilebilirliği, güvenli ve verimli lipozomal ürünlerin büyük ölçekli üretim imkanı olarak sıralanabilmektedir (Gomez-Hens ve Fernandez-Romero, 2006; Reza Mozafari ve diğ., 2008).

Lipozom hazırlamak için kullanılan tüm teknikler 4 temel aşamaya dayanmaktadır. Bu aşamalar; organik çözücülerin kurutularak lipidlerden ayrılması, lipitin sulu ortamda dağılması (dispersiyonu), elde edilen lipozomun saflaştırılması ve nihai ürünün analizidir. Lipozoma madde enkapsüle etmek için kullanılan yöntemler ise pasif yüklem teknikleri ya da aktif yüklem tekniklerine dayanmaktadır. Bunlardan pasif yüklem teknikleri kendi içinde mekanik dispersiyon yöntemi, solvan (çözücü) dispersiyon yöntemi ve deterjan çözme yöntemi olarak sınıflara ayrılmaktadır (Riaz, 1996; Himanshu ve diğ., 2011).

Pasif yükleme teknikleri için farklı boyutlarda ve özelliklerde lipozomlar hazırlanabilmektedir.

SUV hazırlama yöntemleri: Sonikasyon, fransız basınç hücresi, mikroakışkanlaştırma (yüksek basınç homojenizasyon) gibi yöntemlerle sentezlenebilmektedir

Yöntemlerin avantajları ve dezavantajları: Sonikasyonla sentezlenen lipozomların avantajları sırasıyla; hazırlama kolaylığı, toksik olabilecek organik çözücülerin kullanılmaması, biyolojik olarak parçalanma yönünden avantajlı olmasıdır (Dua ve diğ., 2012; Naseri ve diğ., 2015). Dezavantajları ise hazırlanan lipozomların düşük iç hacimli olması, fosfolipit ve enkapsüle kargonun muhtemel hidrolizi, SUV'larla birlikte MLV'lerin varlığı, prob kaynaklı kontaminasyon ve büyük moleküllerin elimine edilmesidir (Riaz, 1996).

Fransız basınç hücresi yönteminin avantajları basit, hızlı ve tekrarlanabilir sentez yapılabilmesi ve sonikasyonla elde edilen SUV'lardan daha geniş SUV'ların elde edilmesidir (Barenholtz ve Amselem, 1979). Dezavantajları ise; yüksek sıcaklıklara çıkılma zorluğu ve çalışma hacimlerinin göreceli olarak küçük (maksimum 50 mL) olmasıdır (Akbarzadeh ve diğ., 2013).

Mikroakışkanlaştırma yönteminin avantajları devamlı üretimin sağlanması, yüksek enkapsülasyon etkinliği, büyük molekülleri enkapsüle edebilme ve uzun süreli stabilite iken (Kastner ve diğ., 2015; Carugo ve diğ., 2016; Yu ve diğ., 2009) dezavantajları ise; sentezlenen lipozomların küçük boyutlu ve dar boyut dağılımına sahip olması, kanal uzunluğu, lipit solüsyonunun konsantrasyonu, akış hızı ve akış oranı gibi bir çok parametreye bağlı olmasıdır. Bununla beraber; kanalın tıkanma ihtimali, ince lipit hidrasyonu gibi ön işlemler gerektirmesidir (Yu ve diğ., 2009; Yang ve diğ., 2012).

LUV hazırlama yöntemleri: Dondurup çözme, membran ekstrüzyon, etanol enjeksiyonu, eter enjeksiyonu, diyaliz ve dilüsyon gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Avantajları ve dezavantajları: Dondurup çözme yönteminin avantajları; yöntemin basit olması, döngü sayısı arttıkça parçacık çapının küçülmesi ve tekniğin yüklü lipitlerden etkilenmemesidir (Traïkia ve diğ., 2000). Dezavantajları ise; düşük enkapsülasyon etkinliği (%20-%30) elde edilmesi ve filtrasyon gibi ek aşamalar gerektirebilmesidir (Pick, 1981).

Membran ekstrüzyon yönteminin avantajları ise homojen yapıda lipozomlar üretilmesi ve fransız basınç hücresi yönteminde kullanılan daha düşük basınç kullanılmasıdır

(Morano ve diğ., 1990; Hunter ve Frisken, 1998). Dezavantajları sırasıyla; uzun hazırlama aşamasının olması ve hazırlanmasında ek tekniklere ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca ekstrüzyon yapılan membranların tıkanarak yüksek ürün kaybına sebep olması, geniş çaplı üretim için yüksek maliyet gerektirmesidir (Wagner ve Vorauer-Uhl, 2013).

Etanol enjeksiyonu yönteminin avantajları; basit bir yöntem olması, uygulamasının kolay olması, tekrarlanabilirlik, lipid degradasyonu ya da oksidatif değişikliklerle sonuçlanmamasıdır (Charcosset ve diğ., 2015). Dezavantajları ise; oluşan lipozomların boyutlarının heterojen (30-110 nm), seyreltik olması, etanolün tamamının çözültiden ayrıştırılmasının zor olmasıdır. Biyolojik olarak aktif makromoleküllerin düşük etanol varlığında bile inaktif edilme oranının yüksek olması da ayrıca sorun teşkil etmektedir (Batzri ve Korn, 1973; Lasic ve Barenholz, 1996).

Eter enjeksiyonu yönteminin avantajları; yüksek yakalama etkinliği, jel fitrasyona uygun olması, nispeten tek tip boyut elde edilmesi, çözünür maddelerin ve enzimlerin yakalanması ile uyumluluk göstermesi (Mathai ve Sitaraman, 1987) ve dezavantajları oluşan lipozomların boyutlarının heterojen olması (70-200 nm), enkapsüle edilecek materyalin yüksek sıcaklıklarda organik çözücülere ya da yüksek sıcaklıklara maruz kalmasıdır (Deamer ve Bangham, 1976; Schieren ve diğ., 1978; Pradhan ve diğ., 2015).

Diyaliz yönteminin avantajı hızlı ve basit bir yöntem olması, sentezlenen LUV'ların vezikül büyüklüğü bakımından birkaç haftaya kadar stabil kalması, numune kurtarma olanağı (Szoka ve Papahadjopoulos, 1980; Dipali ve diğ., 1996) ve dezavantajları lipozom hazırlama aşamasının sonunda deterjan kalıntılarının varlığı, suda çözünür küçük bileşiklerin etkili bir şekilde tutulamaması, düşük numune hacmidir (Mozafari, 2005; Szoka ve Papahadjopoulos, 1980; Woodle ve Papahadjopoulos, 1989; Dipali ve diğ., 1996). Dilüsyon yönteminin avantajları bazı durumlarda diyalize göre daha avantajlı olması, dilüsyon hızının fosfolipit yükünü etkileme oranının oldukça düşük olması (Jiskoot ve diğ., 1986) ve dezavantajları 100 nm altındaki lipozomların sentezi için uygun olmaması, homojen boyut dağılımı için ekstrüzyon, ultrafiltrasyon gibi ek tekniklere ihtiyaç duyulması, çok yüksek misel konsantrasyonunun protein denatürasyonu ile sonuçlanabilmesi, dilüsyon hızının düşmesi ile misellerin füzyon yapması artacağı için daha büyük veziküllerin oluşumudur (Jiskoot ve diğ., 1986; Kikuchi ve diğ., 1994).

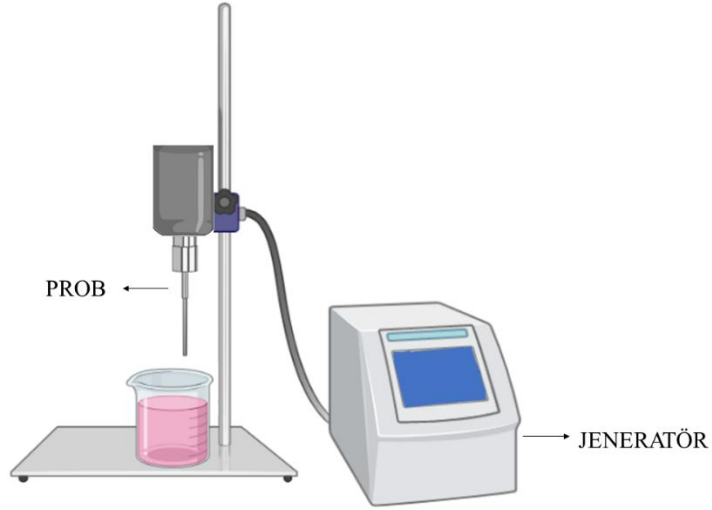
MLV ve OLV hazırlama yöntemleri: MLV ince lipid film hidrasyonu, diyaliz ve OLV diyaliz ve dilüsyon gibi yöntemlerle sentezlenebilmektedir. İnce lipid hidrasyonu yönteminin avantajları; kolay sentez ve kullanımının yaygın olması, dezavantajları organik çözücü kullanması büyüklük ve şekil bakımından heterojen MLV oluşması, SUV üretimi için sonikasyon ve LUV üretimi için ekstrüzyon adımları gerektirmesidir (Laouini ve diğ., 2012).

REV (Ters faz buharlaştırma vezikülleri) hazırlama yöntemi: Ters faz buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmektedir. Yöntemin avantajları lipidlerin sulu materyali yakalama kabiliyetini yüksek olması, suda çözünür moleküllerin enkapsülasyonu için uygun olması, düşük iyonik güce sahip çözücü ortamında yüksek enkapsülasyon, sayısız lipid formülasyonundan yapılabilmesidir. Dezavantajları; enkapsüle edilecek materyalin organik çözücülere ve kısa sonikasyon süresine maruz kalması, protein ve DNA gibi kargo moleküllerinin denatüre olabilmesidir (Himanshu ve diğ., 2011; Kataria ve diğ., 2011; Szoka ve Papahadjopoulos, 1978; Prathyusha ve diğ., 2013).

Sonikasyon

Sonikasyon küçük tek katmanlı veziküllerin (SUV) hazırlanmasında kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu yöntemde çok katmanlı veziküller (MLV) banyo tipi sonikatörde ya da prob sonikatörde pasif bir atmosfer altında homojenize edilir. Sonik enerji (sonikasyon) kullanılarak MLV süspansiyonlarının bozulması tipik olarak 15-50 nm aralığında çaplara sahip küçük, tek katmanlı veziküllerin üretimini sağlar. Bu yöntemin temel dezavantajları düşük iç hacim / enkapsülasyon etkinliği, enkapsüle edilen bileşiklerin ve fosfolipidlerin olası degradasyonu, büyük moleküllerin eliminasyonu, prob uç kaynaklı metal kirliliği ve SUV ile birlikte MLV'nin varlığıdır (Dua ve diğ., 2012; Riaz, 1996).

Prob sonikasyonda sonikatörün ucu, doğrudan lipozom dispersiyonuna batırılır. Bu metotta lipozom dispersiyonuna enerji girişi çok yüksektir (Şekil 1.4). Probun ucundaki enerji eşleşmesi lokal sıcaklıkla sonuçlanacağı için sonikasyon esnasında dispersiyon buz banyosuna daldırılmalıdır. Bunun dışında sonikasyon süresi de önemlidir. 1 saate kadar süren sonikasyonda lipidlerin% 5'inden fazlası de-esterifiye olabilmektedir (Kataria ve diğ., 2011).



Şekil 1.4: Prob sonikatör (Panahi ve diğ., 2017)

Banyo tipi sonikasyon yönteminde bir silindir içindeki lipozom dispersiyonu bir banyo sonikatörüne yerleştirilir. Bu yöntemde lipit dispersiyonunun sıcaklığının kontrol edilmesi, doğrudan uç kullanılarak yapılan sonikasyonlara göre daha kolaydır. Sonikasyonu yapılan malzeme steril bir kapta, prob ünitelerinden farklı olarak veya inert bir atmosfer altında korunabilir (Kataria ve diğ., 2011). Üretilen lipozomların ortalama boyut ve dağılımı; lipit kompozisyonu ve konsantrasyonu, sıcaklık, hacim, sonikasyon süresi ve gücü gibi faktörlerden etkilenir (Dua ve diğ., 2012; Riaz, 1996).

1.5 Lipozomların Karakterizasyon Yöntemleri

Lipozom üretiminden sonra yapılacak karakterizasyon çalışmaları temel olarak kimyasal, fiziksel ve biyolojik karakterizasyona dayanmaktadır. Fiziksel karakterizasyon boyut, vezikül şekli, yüzey morfolojisi ve yükü, elektriksel yüzey potansiyeli ve yüzey PH'ı, lamellarite (çoklu katman sayısı), faz davranışı, enkapsülasyon etkinliği gibi parametrelere bağlıyken, kimyasal karakterizasyon fosfolipit ya da kolesterol gibi yapısal bileşenlerin konsantrasyonuna ve biyolojik konsantrasyon sterilité, pirojenite ve hayvan toksisitesine bağlıdır (Dwivedi ve Verma, 2013).

1.5.1. Boyut ve boyut dağılımı

Lipozomların boyut dağılımı ve polidispersite ölçümü, fiziksel stabiliteleri hakkında bilgi sağlar (Kanásová ve Nesměrák, 2017). Lipozomların boyutlarının belirlenmesinde kullanılan en kesin yöntem elektron mikroskobu üzerinden yapılan

ölçümlerdir. Bunun sebebi elektron mikroskobunun lipozomların her birinin görüntülenmesine imkan vermesi ve farklı boyut aralığına göre lipozom profili hakkında kesin bilgi verebilmesidir (Dwivedi ve Verma, 2013). Elektron mikroskobu lipozomların boyutlarının yanında şekilleri hakkında da bilgi verir. Ayrıca füzyon ya da toplanma durumlarının da gözlenmesine, çift katman kalınlığı ve çift katmanlar arası uzaklık hakkında da bilgi vermektedir. Bu avantajlarının yanında elektron mikroskobu farklı ekipmanlar gerektiğinden ve ölçümlerin uzun sürede yapılmasından dolayı lipozomların boyut ölçümlerinde farklı yöntemler de kullanılmaktadır. Lipozomların sulu dispersiyonlarının ortalama boyutu dinamik ışık saçılımı (DLS) üzerinden de ölçülmektedir (Barnadas-Rodríguez ve diğ., 2001; Bergstrand ve diğ., 2003). DLS, nispeten homojen boyut dağılımına sahip lipozomlar için güvenilirdir ve elektron mikroskobu gibi şekil hakkında bilgi vermez (Reimer, 1998). Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) nanoparçacıkların boyut ölçümlerinde ideal ve yeni geliştirilen bir tekniktir. AFM, nanometre ve angström ölçeklerine kadar yüksek çözünürlük sağlayan 3 boyutlu mikrograflar oluşturan mikroskobik bir tekniktir (Spyratou ve diğ., 2009). AFM; lipozomların yapısal karakterizasyonu, morfoloji, rijitlik, boyut, boyut dağılımı, stabilite karakterizasyonu için idealdir (Luykx ve diğ., 2008; Edwards ve Baeumner, 2006; Kanásová ve Nesměrák, 2017). Bu yöntemin en önemli avantajı görüntülenmenin lipozomların doğal sulu ortamlarında gerçekleşmesidir. Bu yöntemin dezavantajları ise numunenin mika yüzeye eklendikten sonra deforme olabilmesi, tarama sırasında buharlaşma gerçekleşmesi ve maniveldan uygulanan kuvvetin tahrip edici olabilmesidir. Bu yüzden lipozomların yıkımını önlemek için iğne ucu ve numune arasındaki kuvvetleri kontrol etmek önemlidir (Kanásová ve Nesměrák, 2017). Bu yöntemler dışında lipozomların boyutları, boyut dağılımları ve homojenliği kromatografi ile de ölçülebilmektedir. Bu kromatografik yöntemler temelde lipozomların boyutlarına göre ayrılmasını sağlar. Bu tekniklerden jel geçirgenlik kromatografisi mobil faz ve durağan faz arasında çözünen moleküllerin tekrar tekrar değiştirilmesiyle gerçekleşir ve lipozomlar boyutlarına göre ayrılır (Mozafari, 2005; Williams, 1970; Grabielle-Madelmont ve diğ., 2003).

1.5.2 Yüzey yükü

Lipozomal yüzeylerin yük yoğunluğu ve çeşitli iyonların lipid veziküllere bağlanma afinitesi zeta potansiyeli olarak adlandırılan bir parametrenin ölçülmesiyle belirlenebilmektedir. Lipozomun zeta potansiyeli bir sıvı ortamında bulunan

lipozomdan elde edilen toplam yük olarak tanımlanır. Lipozom süspansiyonu partiküller ayrı kaldığında ve kümelenmediğinde stabildir. Parçacıklar yük taşırlarsa, itici kuvvetlerle sıvı ortamda birbirlerini iterler ve bu durumda süspansiyon stabil kalır. Stabil lipozom süspansiyonu hazırlanmak istendiğinde partikül yükü maksimize edilmelidir. 30 mV'den daha yüksek ya da -30 mV'den daha düşük zeta potansiyeline sahip lipozom süspansiyonları stabil olarak kabul edilmektedir. Lipozomların elektrostatik özellikleri çok çeşitli yöntemlerle ölçülebilmektedir. Lipozomların yüzey yükünün hızlı bir şekilde belirlenmesi için lazer Doppler hız ölçümü (Lazer doppler elektroforez) kullanılmaktadır. Bunun dışında ışık saçılması yöntemleri de lipozomların zeta potansiyeli ölçümü için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem için de Zetasizer kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde lipozomları içeren süspansiyona lipozomların hareketiyle sonuçlanan bir elektrik alanı uygulanır. Bu hareket yük ile doğru orantılıdır. Lipozomların hareketi, tespit edilen lazer ışığının frekansında bir Doppler kaymasına neden olur. Zeta potansiyeli daha sonra tespit edilen ışığın dalgalanma sıklığından hesaplanır (Maherani ve diğ., 2011; Kanásová ve Nesměrák, 2017).

1.5.3 Enkapsülasyon etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği lipozom içerisinde tutulan madde miktarını tanımlar. Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenme süreci önce lipozom süspansiyonundan enkapsüle olmamış serbest maddenin izole edilmesiyle başlar (Pattni ve diğ., 2015; Edwards ve Baeumner, 2006). Bu farklı tekniklerle yapılabilmektedir. Bu teknikler mini-kolon santrifüjü, diyaliz, ultrasantrifüj gibi yöntemlerdir (Berger ve diğ., 2001; Padamwar ve Pokharkar, 2006). Enkapsüle edilmemiş maddenin lipozom süspansiyonundan ayrılmasının ardından yapılacak ikinci aşama lipit çift tabakanın tahrip edilmesi ve açığa çıkan madde miktarının belirlenmesidir. Lipit çift tabaka lipozom süspansiyonundaki sıvı ortamın etanol, metanol, asetonitril gibi organik çözücülerle ya da Triton-X100 ile yer değiştirmesiyle tahrip edilebilir ve enkapsüle edilen madde miktarı spektroskopi, enzimatik testler, jel elektroforezi, alan akış fraksiyonu ve ya HPLC, UPLC, LC-MS-MS gibi kromatografik yöntemlerle belirlenebilir (Pattni ve diğ., 2015; Edwards ve Baeumner, 2006; Buboltz ve Feigenson, 1999; Kallinteri ve diğ., 2004; Kanásová ve Nesměrák, 2017).

1.5.4 Faz geçiş sıcaklığı (T_c)

Geçiş sıcaklığının lipozom özellikleri üzerinde önemli etkileri vardır. Düşük faz geçiş sıcaklığına sahip olan lipozomlar için ilaç taşıyıcı sistemler olarak avantajlıdır çünkü yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip lipozomlarda depolanan aktif maddeler genellikle daha düşük faz geçiş sıcaklığına sahip lipozomlarda enkapsllenmiş olan maddelere göre daha yavaş salınır. Sonuç olarak lipozomun geçiş sıcaklığının belirlenmesi çok önemlidir (Betz ve diğ., 2005). Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), fosfolipidlerin geçiş sıcaklıklarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Sot ve diğ., 2005; Saroglou ve diğ., 2006).

1.5.5 Membran Akışkanlığı

Lipozom ift tabakalarının sayısı, geçirgenliği ve akışkanlığı enkapsüle materyalin lipozomlardan salınımı ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin lipozom çift katmanına katılan bazı lipidler ya da hidrokarbon zincirler arasındaki bağları gszleştirilen kolesterol gibi moleküller faz geçiş sıcaklığının düşmesine ve akışkanlığın artmasına yol açar. Lipozom akışkanlığını değerlendirmek için elektron paramanyetik rezonans (EPR), H NMR spektroskopisi ve floresan depolarizasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır (Maherani ve diğ., 2011; Sulkowski ve diğ., 2005; Calvagno ve diğ., 2007).

1.5.6 Lamellarite

Lamellarite, lipozomların sulu i merkezini çevreleyen çift katman sayısıdır. Direkt mikroskopik gözlem, numunenin boyutu, homojenliği ve lipozomların katmanları hakkında bilgi verir. Lamellarite ³¹P-nükleer manyetik rezonans (NMR) ve elektron paramanyetik rezonans (EPR) ile belirlenebilmektedir (Hope ve diğ., 1985; Mayer ve diğ., 1986; Yamauchi ve diğ., 2007).

1.6 *Melissa officinalis* (Melisa Otu)

Melissa officinalis L. (Melisa otu), Akdeniz bölgesinde, batı Asya'da, güneybatı Sibirya'da ve kuzey Afrika'da yetişen çok yıllık ve aromatik bir bitkidir (Canadanović-Brunet ve dię., 2008). *M. officinalis* bitkisi anti-anjiyogenik, antimikrobiyal, antikanser, antienflamatuvar, antioksidan, antidepresan, hafıza arttırıcı özellikleriyle bilinmektedir (Miraj ve dię., 2016).

M.officinalis bitkisinin yaprakları flavonoidler (kuersitrin, ramnositrin, lüteolin), polifenolik bileşikler (rosmarinik asit, kafeik asit ve protokateşuik asit), monoterpenoid aldehit, monoterpen glikozitler, triterpenler (ursolik ve oleanolik asit), seskiterpenler, tanenler ve esansiyel yağlar (sital) içermektedir. *M.officinalis* bitkisinin yaprağında; sital, monoterpenler, geranial ve neral, flavonoidlerden lüteolin-7-glukozit gibi bileşikler bulunmaktadır. Kurutulmuş *M.officinalis* yapraklarında ise %0.13 sital, %11.3 oranında total hidroksisinamik bileşikler (% 4.1'ü rosmarinik asit) ve %0.5 oranında total flavonoid bileşikler içeren %11.8 oranında total polifenolik bileşikler bulunmaktadır (Miraj ve diğ., 2017). *M.officinalis* bitkisinin etanol ekstratında ise gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, rosmarinik asit, epikateşin, rutin, kuarsetin, kuarsitrin, izokuarsetin, elajik asit ve kaempferol gibi fenolik bileşikler ve flavonoidler bulunmaktadır (Cunha ve diğ., 2016).

M.officinalis bitkisinin esansiyel yağı ve farklı çözücüler kullanılarak elde edilmiş ekstraktlarının antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri kanıtlanmıştır. Bu etki ekstraktlarda ve esansiyel yağda bulunan biyoaktif bileşiklerce sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda antiviral etkinin çoğunlukla rosmarinik asitten olmak üzere kafeik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit gibi bileşiklerden sağlandığı belirtilmektedir (Schnitzler ve diğ., 2008; Wolbling ve Leonhardt, 1994; Astani ve diğ., 2012; Mazzanti ve diğ., 2008; Abdellatif ve diğ., 2014). Bitkinin esansiyel yağı çoklu ilaç dirençli bazı gram negatif patojen suşlara karşı farkedilir bir antimikrobiyal etki göstermezken bitkinin esansiyel yağında bulunan sital (geranial ve neral) ve sitronellal bileşikler başlıca antibakteriyel ve antifungal etkiden sorumludur (Mimica-Dukic ve diğ., 2004). Bunun dışında farklı polar çözücülerden elde edilen ekstraktlar gıda kaynaklı patojen suşlara karşı yüksek antimikrobiyal etki göstermektedir. Kloroform, petrol eter gibi polar olmayan çözücülerden elde edilen *M.officinalis* ekstraktlarında rosmarinik asit, kafeik asit, p-kumarik asit gibi fenolik asit oranı daha düşüktür. Bu bileşikler doğrudan antimikrobiyal etki ile ilişkilidir ve polar çözücülerden elde edilen *M.officinalis* ekstraktları antimikrobiyal açıdan avantajlıdır (Canadanovic-Brunet ve diğ., 2008). Bunun yanında *M.officinalis*'in hidroalkolik ekstraktlarında bulunan sülfatlı terpen bileşikler çeşitli *Candida* ve *Aspergillus* cinsi mantarlara ve *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Mycobacterium intracellulare bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal etki sağlamaktadır (Tantry ve diğ., 2014).

M.officinalis farklı tip kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (Javadi ve Emami, 2015). Esansiyel yağında bulunan sitral farklı insan kanser hücre hatlarında hücre canlılığını düşürmektedir (de Sousa ve diğ., 2004). Ayrıca yapılan çalışmalar *M.officinalis*'in hidroalkolik ekstraktı kolon karsinom hücrelerinde antiproliferatif etkiler sağladığını ve hücreler arası ROS üretimini sağlayarak apoptozu indüklediğini göstermiştir (Weidner ve diğ., 2015). Buna rağmen sitotoksik aktivite için bildirilen IC₅₀ değerleri 100 µg/mL'den büyüktür (Shakeri ve diğ., 2016). *M.officinalis* yapraklarında bulunan rosmarinik asitin de farklı insan kanser hücre hatlarında büyüme inhibisyonu aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. *M.officinalis*'in %50 etanol ile hazırlanmış ekstraktının da MTT ve NR test sonuçlarına göre insan kolon kanseri hücrelerinde sitotoksik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Encalada ve diğ., 2011; Fotakis ve diğ., 2006).

M.officinalis'in yapraklarında bulunan fenolik bileşikler antioksidan özelliktedir. Antioksidan aktivite de fenolik bileşiklerin indirgeyici ajanlar olarak davranmasını sağlayan redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu sayede antioksidanlar hücre içerisindeki serbest radikalleri nötralize ederek hem hücresel hasarı engeller hem de anti-genotoksik etki sağlar (Shakeri ve diğ., 2016).

1.7 Fitokimyasal Bileşiklerin Antimikrobiyal Etki Mekanizmaları ve Antimikrobiyal Aktivite Belirleme Yöntemleri

Bitkilerde bulunan fenolikler, fenolik asitler, kinonlar, flavonoidler / flavonlar / flavonoller, kumarinler ve tanenler gibi bir farklı fitokimyasal bileşikler birden fazla mekanizma üzerinden antimikrobiyal etki sağlamaktadır. Bu bileşiklerin antibakteriyel etki mekanizmaları sitoplazmik membran hasarı, tomoizomeraz inhibisyonu, NADH-sitokrom c redüktaz inhibisyonu ve ATP sentaz inhibisyonu üzerinden olmaktadır. Bunun dışında yapılan son çalışmalar antibakteriyel etkiyi sağlayan diğer bir mekanizmanın hücre membranları üzerinden de sağlandığını göstermektedir. Çoğu bitki fenolikleri hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde membran yıkımını tetikleyerek antibakteriyel aktivite sağlamaktadır. Bu etkiler bakteri yüzeyinin hidrofobikliği/hidrofilikliği ile ilişkili olarak fenolik maddelerin hücre membranı ile direkt temasını ya da hücre duvarı kimyasını

değiştiricek hücrelerarası bileşenlerle etkilişimi üzerinden olmaktadır. Örneğin eugenol, karvakrol ve timol bileşikleri gram pozitif ve gram negatif bakterilerde yağ asiti değişikliğini tetikleyerek membran yapısını bozmaktadır.

Antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi için yaygın olan kullanılan metotlar disk difüzyon, kuyu difüzyon, sıvı dilüsyon gibi yöntemlerdir. Çoğu yayınlanan çalışmada iki farklı antimikrobiyal test ile antimikrobiyal etki değerlendirilmektedir. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan disk difüzyon testi özellikle bitki ekstraktlarının fitokimyasal bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde tek başına yeterli olmamaktadır. Bunun sebebi disk difüzyon testinin polar özellikte olmayan maddelerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde uygun olmadığının belirtilmesidir (Balouiri ve diğ., 2016; Rempe ve diğ., 2017).

1.7.1 Agar disk difüzyon yöntemi

Bu yöntemde agar petrilere test mikroorganizmasının standart inokulumu ekilir. Ardından petrilere istenen konsantrasyonda test maddesi içeren 6 mm çapındaki filtre kağıdı disklerinden konulur ve petrilere uygun koşullarda inkübe edilir. Genel olarak bu yöntemde antimikrobiyal ajan agar içerisine yayılır ve test mikroorganizmasının büyümesini engeller ve ortaya çıkan büyüme inhibisyonu zonları ölçülür (Balouiri ve diğ., 2016).

Agar ortamına yayılan antimikrobiyal ajan miktarını ölçmek mümkün olmadığından agar disk difüzyon yöntemi minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesi için uygun bir yöntem değildir. Buna rağmen disk difüzyon yöntemi basit ve kolay ulaşılabilen bir yöntem olması sebebiyle bitki ekstraktları, esansiyel yağlar ve diğer ilaçların antimikrobiyal etkinliğinin ölçümü için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Balouiri ve diğ., 2016).

1.7.2 Sıvı dilüsyon yöntemleri

Sıvı mikro ve makro dilüsyon yöntemleri en temel antimikrobiyal duyarlılığı test etme metotlarındandır. CLSI tarafından aerobik büyüyen bakteri, maya ve filamentöz mantarları test etmek için standardize edilmiştir. Bu yöntem antimikrobiyal ajanın 2 kat dilüsyonlar halinde kullanılmasını, 0.5 McFarland ölçeğine ayarlanmış standart mikrobiyal süspansiyonun seyreltilmesini kapsamaktadır. Uygun koşullarda inkübasyonun ardından bu yöntem ile çıplak gözle tüplerde ya da kuyucuklarda

bulanıklık tayini yapılarak MİK değeri belirlenir. MİK değerlerinin belirlenmesinin ardından minimum bakteriyal (letal) konsantrasyonların (MBK) da belirlenmesi gereklidir. MBK final inokulumun 24 saatlik inkübasyonun ardından %99.9'unun ölmesi için gereken en az antimikrobiyal ajan konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Tüplerden ya da kuyucuklardan agar plakalar üzerine yapılan alt kültürleme sonucu 24 saatin ardından mikrobiyal gelişim görülmeyen en az etken madde konsantrasyonlu agar plakalarının değerlendirilmesi ile belirlenir (Balouiri ve diğ., 2016).

1.8 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Sitotoksite ve hücre canlılığının in vitro ölçümlerini sağlayan testler bir kimyasal ajanın hücrelere yaptığı etkiyi anlamak açısından önemlidir. Bu testler boya çıkarma testleri, kolorimetrik testler, florometrik testler ve luminometrik testler olmaktadır. Bu kimyasal ajanlar hücrelere karşı farklı mekanizmalar üzerinden toksik etki gösterebilmektedir. Bu mekanizmalar temel olarak hücre zarlarının yıkımı, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz olarak bağlanma, polideoksinükleotit uzamasının inhibisyonu ve enzimatik reaksiyonlardır. Boya çıkarma testleri olarak Tripan mavisi, eosin, kongro kırmızısı ve eritroz B testleri, kolorimetrik testler olarak MTT, MTS, XTT, WST-1, WST-8, LDH, SRB, NRU ve kristal viyole testleri, florometrik testler olarak alamar mavisi testi ve CFDA-AM testi ve lüminometrik testler olarak ATP ve gerçek zamanlı canlılık testleri in vitro sitotoksisite ve hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Aslantürk, 2018).

MTT testi

MTT testi sitotoksisite ve hücre canlılığını değerlendirmek için sıkça kullanılan bir kolorimetrik testtir. Bu test süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitelerini ölçerek, hücrelerin mitokondriyal fonksiyonu üzerinden hücre canlılığının değerlendirilmesi esasına dayanır. Bu testte MTT, NADH tarafından mor formazana indirgenir. Oluşan formazan da spesifik dalga boyundaki absorpsiyon değeri üzerinden belirlenir. MTT yönteminin avantajları kullanımının kolay ve güvenli olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması ve hem hücre canlılığının hem de sitotoksisitenin belirlenebilmesidir. Yöntemin dezavantajları ise MTT formazanının suda çözünmemesi ve mor iğne uçlu kristaller oluşturması bu yüzden DMSO gibi organik bir çözücünün

ya da izopropanolün kristalleri çözmek için kullanılması, MTT formazanın kuyulardan besiyeri ortamını uzaklaştırmayı zorlaştırmasıdır (Stone ve diğ., 2009; Mosmann, 1983, Aslantürk ve diğ., 2017; Bopp ve Letieri, 2008).

1.9 İn Vitro Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi dokunun normal fonksiyonlarını sağlaması açısından önemlidir. Yara iyileşme süreci hemostaz, inflamasyon, proliferasyon, migrasyon ve yeniden şekillenme olarak adlandırılan aşamalardan oluşur. Yara iyileşme sürecinde, yaranın olduğu bölgede hücrelerin çoğalması (proliferasyonu) ve göç etmesi (migrasyonu) gerekir. Hücre migrasyonunun değerlendirilmesini sağlayan testler in vitro yara iyileşmesi analizlerinde oldukça fayda sağlamaktadır. Bu amaçla kullanılan 2D yara iyileşmesi testinin temel prensibi, hücrelerin onarım ve göç aşamalarının izlenebilmesi için dokuda hücre içermeyen bir bölgenin oluşturulmasıdır. Bu hücreden yoksun bölge konfluent tek katman hücrelerin dokudan kaldırılmasıyla oluşturulmaktadır. Bu sebeple 2D yara iyileşmesi testi yara oluşturulması, yara iyileşmesi sürecinin izlenmesi ve elde edilen verilerin analiz edilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Martinotti ve Ranzato, 2019).

1.10 Tezin Amacı

M.officinalis bitkisinden elde edilen ekstraktın lipozomal formülasyonunun farklı bakteri suşlarındaki antimikrobiyal etkisinin, farklı hücre hatlarında oluşturduğu sitotoksik etkilerin ve hücre canlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışmasında ekstrakt ve lipozom birleşimini kullanmanın sadece ekstrakta kıyasla antimikrobiyal, sitotoksik etkiler üzerindeki avantajları belirlenmeye çalışılmıştır.

1.11 Literatür Araştırması

Bu tez çalışmasında *M.officinalis* bitkisinin etanol ekstraktı kullanılarak hazırlanan lipozomal formülasyonun antimikrobiyal aktivite ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun ekstrakta, pozitif ve negatif kontrollere kıyasla farklılığı ve muhtemel avantajları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Literatürde *M.officinalis* ekstraktı kullanılarak lipozomal formülasyon yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla *M.officinalis* ekstraktı ile lipozomal formülasyon ile antimikrobiyal aktivitelerin, sitotoksik etkilerin ve migrasyon/anti-migrasyon etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışma olacaktır. Buna karşılık *M.officinalis* yapraklarından elde edilen ekstrakt ve esansiyel yağın bir çok farklı mikroorganizmada antimikrobiyal etkileri ve farklı hücre hatlarında sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Suschke ve diğerlerinin (2007) yaptığı çalışmada *M.officinalis* esansiyel yağının *S.aureus* ATCC 25923'ye karşı MİK değerinin % 0.06 (v/v), MBK değerinin % 0.13 (v/v), *E.coli* ATCC 25922'ye karşı MİK ve MBK değerlerinin %0.5 (v/v) olduğu belirtilmiştir. Tümör özellikte olmayan HaCaT ve BEAS-2B hücrelerinde 24 saat sonraki CC50 değerleri sırasıyla %0.0023 ve %0.0030 olarak belirtilmiştir. Kamden ve diğerlerinin (2013) yaptığı çalışmada *M.officinalis* bitkisinin etanolik ekstraktının sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. 10-150 µg/mL doz aralığında sağlıklı lökosit hücrelerine karşı hücre canlılığını %90'ın altına düşürmediği belirtilmiştir. Literatürde aynı bitkilerden elde edilen ekstrakt ve esansiyel yağların sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında esansiyel yağların yüksek antioksidan madde içermesi sebebiyle yapılan sitotoksite çalışmalarında sağlıklı hücreleri de yüksek toksisiteye maruz bıraktığı belirtilmiştir (Soltanian ve diğ., 2019). Bütün bunlar *M.officinalis* gibi ekstrakt ve esansiyel yağ elde edilebilen bitkilerin ekstraktlarının sitotoksikite çalışmalarında daha avantajlı olabileceğini göstermektedir.

1.12 Hipotez

Formülasyonun ve ekstraktın negatif kontrole göre istatistiksel açıdan antimikrobiyal etkisinin olması beklenmektedir. Kanser hücrelerinde istatistiksel açıdan hücre canlılığını azaltıcı olması ve boş lipozomun antimikrobiyal ve sitotoksik etkisinin olmaması beklenmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

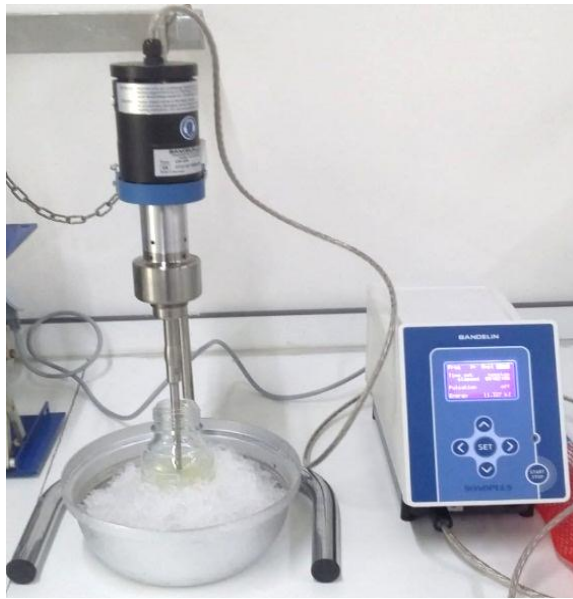
2.1 Materyal

Kimyasal malzemeler: Folin-Ciocalteu (2N, Merck), gallik asit monohidrat (ISOLAB), *Melissa officinalis* (Duraner A.Ş), sodyum karbonat (TEKKİM), L- α -fosfatidilkolin (soya fasulyesi kaynaklı %30, Sigma-Aldrich), DPBS (7.4 PH, Biowest), etanol (%99.9, ISOLAB), MTT (Thermofisher), tripsin (%0.25, Multicell), RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), Fetal sığır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich), penisilin-streptomisin (Capricorn), DMSO (Sigma).

2.2 Yöntem

2.2.1 İki aşamalı homojenizasyonla lipozom dispersiyonlarının hazırlanması

Nanolipozomlar prob sonikatörde (Bandelin/GM 4200) yapılan 2 aşamalı homojenizasyon ile hazırlanmıştır. İki aşamalı homojenizasyon yapılmasının nedeni küçük boyutlu (nm) yüksek stabiliteye sahip lipozom dispersiyonlarını elde edebilmektir.



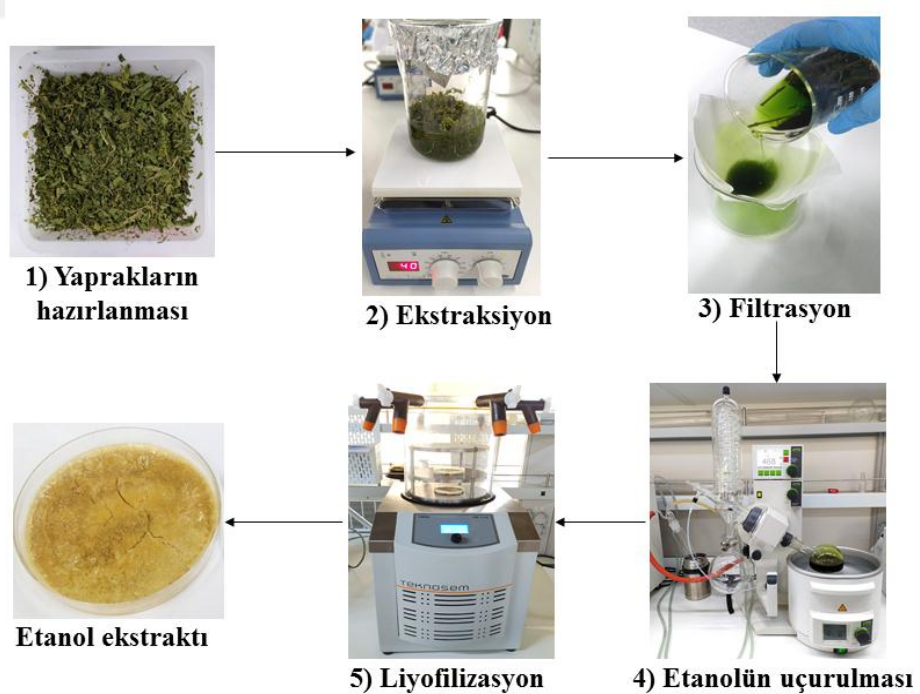
Şekil 2.1 : Prob sonikatörde homojenizasyon

İlk olarak L- α -fosfatidilkolin (S30) materyalinden 2 gr tartılarak 200 mL otoklavlanmış saf suya eklenmiştir. Sonikatörde direk uç prob kullanılmıştır. Steril prob, solüsyonun içerisine daldırılmıştır (Şekil 2.1).

Sonikasyon esnasında örnek buz banyosunda tutulmuştur. %65 genlikte 5 dakika boyunca homojenizasyon sağlanmıştır. Her bir dakikanın sonunda 5 saniye sonikatör durdurulmuştur. Süt köpüğü renginde lipozom solüsyonu elde edilmiştir ve ilk homojenizasyon aşaması tamamlanmıştır. İkinci homojenizasyon için hazırlanan lipozom dispersiyonları -80°C’de dondurulmuştur ve liyofilize edilmiştir. İkinci homojenizasyonda sonikasyondan kaynaklı oluşabilecek PH değişikliklerini engellemek amacıyla liyofilize lipozomlar %1 (a:h) oranında Dulbecco fosfat tamponlu tuz (7.4 PH) içerisinde hazırlanarak birinci homojenizasyonla aynı koşullarda sonikasyona maruz bırakılmıştır.

2.2.2 *Melissa officinalis* bitkisinin yapraklarının etanol ile ekstraksiyonu

Melissa officinalis bitkisinin yaprakları kurutulmuş ve paketlenmiş bir şekilde temin edilmiştir. Yapraklar önce ekstraksiyonun daha verimli olması için ufalanarak küçük parçalara ayrılmıştır.



Şekil 2.2 : Bitki yapraklarından ekstrakt elde edilme aşamaları.

Ufalanmış yapraklardan 25 gr tartılarak üzerine 200 mL %80’lik etanol çözeltisi eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan karışımlar ilk 4 saati 40°C’de olmak üzere oda

ısısında 24 saat boyunca karıştırma işlemine tabi tutulmuştur. 24 saatin sonunda ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır (Casillas ve diğ., 2015; Koksall ve diğ., 2011; Abu-Shanab ve diğ., 2007; Son ve diğ., 2021) (Şekil 2.2).

Çözünmemiş yaprak parçalarının ekstrakttan uzaklaştırılması için ekstrakt adi filtre kağıdından geçirilmiştir (Magalhães ve diğ., 2018). Ekstraktın stabilitesini arttırmak için ekstrattaki çözücünün uçurulması gerekmektedir. Bunun için önce ekstrakttan etanolün uçurulması işlemi gerçekleştirilmiştir. Su banyosu 40°C'ye ayarlanan rotary evaporatörde (Buchi/R-3) birkaç saat içinde etanolün uçma işlemi gerçekleşmiştir (Magalhães ve diğ., 2018). Numune kaybı olmaması için basınç yavaş yavaş düşürülmüştür. Etanolün uçma işlemi gerçekleştikten sonra elde edilen yoğun ekstrakttan suyun uçması için dondurarak kurutma (liyofilizasyon) işlemi yapılmıştır (Papoti ve diğ., 2019). Bunun için ekstrakt eşit hacimlerde petri kaplarına boşaltılarak -80°C'de birkaç saat boyunca donması sağlanmıştır. Donma gerçekleştikten sonra petri kapları açık bir şekilde liyofilizatöre (Toro/TRS 2/2V) konulmuştur ve 24 saat boyunca kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2).

2.2.3 Ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun hazırlanması

Formülasyonu hazırlamak için önce 0.288 gr liyofilize ekstrakt tartılmıştır. 75 µL DPBS eklenmiştir. Karıştırıldıktan sonra üzerine 75 µL ikinci homojenizasyondan sonra elde edilen lipozom solüsyonu eklenmiştir. Hiç karıştırılmadan 1400 rpm'de vortekste 1 dk boyunca tutulmuştur. Karışım az hacimli olduğundan ve lipozomun zarar görmemesi için vortekste tutulan sürelerde 1 saniye vortekslenip 1 saniye vorteksten uzaklaştırılmıştır. 1 dakikanın ardından karışımında çözünmeyen partiküller varsa yavaşça çözdürülmesi sağlanmıştır. Aynı şekilde 30 saniye 1400 rpm'de vortekslenmiştir.

Formülasyonun enkapsülasyon etkinliği ve enkapsüle edilen ürün verimi hesaplanmıştır. Bu hesaplamaların yapılabilmesi için önce enkapsüle edilmeyen madde miktarı bulunmuştur. Bunun için formülasyon 3000 rpm 'de 1 s boyunca 4°C'de tüp santrifüj edilmiştir ve enkapsüle olmayan kısmın çökmesi sağlanmıştır (Ramana ve diğ., 2010; Trif ve diğ., 2008). Süpernatant atıldıktan sonra pelette kalmış olan sıvı kısmın kurutulması için pelet inkübatörde yüksek sıcaklıkta kurutulmuştur ve normal ısıya gelince tartılarak enkapsüle edilmeyen kısmın ağırlığı bulunmuştur.

2.2.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfolojik karakterizasyonun yapılması

SEM analizinde boş lipozom ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır. Görüntü alınmadan önce tüm numuneler 24 saatlik bir periyotla liyofilize edilmiştir (Dave ve diğ., 2019). SEM için kullanılan cihaz Tescan Vega3 SBU ve kullanılan yazılım SB-EasyProbe'dur. Her bir liyofilize numune ilk önce iki tarafı yapışkanlı ve bir alüminyum tutucu (stub) üzerine yerleştirilmiş karbon bantın bir yüzüne çok küçük bir miktarda eklenmiştir. Ekleme sırasında numunelerin zarar görmemesi ve kontamine olmamasına dikkat edilmiştir. Numuneler, karbon bantlara eklendikten sonra görüntü kalitesinin artmasını sağlamak amacıyla argon vakum koşullarında altın ile kaplanmıştır (Şekil 2.3). Altın kaplama kalınlığı 3.6 nm'dir. Kaplama süresi ise 50 saniyedir.



Şekil 2.3 : Altın püskürtme sırasında numuneler.

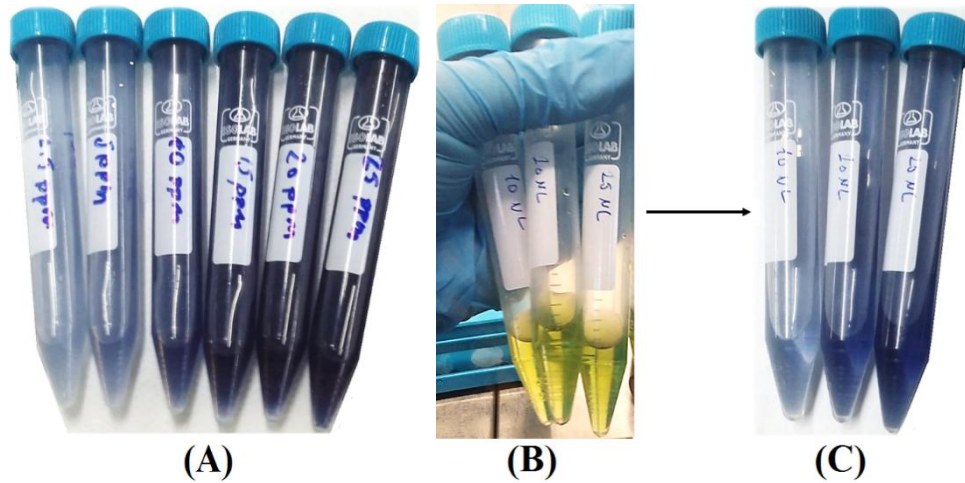
İkinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozom örneklerinin boyut ölçümü, 90° saçılma açısına sahip zeta-sizer cihazı (Malvern Zeta-Sizer) ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde numuneler cihazın ölçüm küvetine alınmıştır ve dinamik ışık saçılımı ile boyut ölçümü yapılmıştır.

2.2.5 Ekstrakttaki total fenolik madde miktarının hesaplanması

Total fenolik madde gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Bu değer gallik asit kalibrasyon eğrisi üzerinden elde edilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisini çizmek

için önce 125 ppm gallik asit stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için 12.5 mg gallik asit tartılmıştır ve 100 mL %80 etanol çözeltisine eklenmiştir. Bu stok çözeltiden final konsantrasyonları 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm ve 25 ppm olan gallik asit solüsyonları hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonları elde etmek için stok solüsyondan alınan miktarların üzerine 0.2 N Folin-Ciocalteu belirtecinden 2.5 mL eklenmiştir. 10 dakika bu şekilde bekletildikten sonra konsantrasyonlara %20'lik sodyum karbonattan 5 mL eklenmiştir. Tüm konsantrasyonlar otoklavlanmış ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Meryemoğlu ve diğ., 2020). Konsantrasyonlar hazırlandıktan sonra karanlık bir ortamda 2 saat boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda her bir konsantrasyondan 2'şer mL alınarak Uv-vis spektrofotometrede (VWR/UV-1600PC) 765 nm'de okutulmuştur ve absorbans değerleri elde edilmiştir. Blank olarak otoklavlanmış saf su kullanılmıştır. Elde edilen konsantrasyonlarla ve konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleriyle gallik asit kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Liyofilize ekstrakt 0.02 gr/mL konsantrasyonda %80 etanol içerisinde hazırlanmıştır ve bu stoktan farklı hacimler alınarak (10 µL, 20 µL, 25 µL) aynı şekilde 0.2 N Folin-Ciocalteu belirtecinden 2.5 mL eklenip 10 dk bekletildikten sonra %20'lik sodyum karbonattan 5 mL eklenerek tüm konsantrasyonlar otoklavlanmış ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 : Gallik asit ve ekstrakt konsantrasyonlarının total fenolik madde tayini için hazırlanması. Sodyum karbonat eklendikten sonra gallik asit konsantrasyonları (A), folin sonrası ekstrakt konsantrasyonları (B), sodyum karbonat sonrası ekstrakt konsantrasyonları (C).

2 saat karanlık bir ortamda tutulduktan sonra 765 nm'de blank suya karşı okutulmuştur ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bu absorbans değerleri kullanılarak gallik asit

kalibrasyon eğrisinde elde edilen lineer denklemden ekstraktta bulunan fenolik madde miktarı mg GAE (gallik asit eşdeğeri) / g olarak hesaplanmıştır.

2.2.6 Ekstrakt ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi

Çalışmada antimikrobiyal etkinliğin karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi için gram pozitif bakteri modeli olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve gram negatif bakteri modeli olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 seçilmiştir. Antimikrobiyal testlerde kullanılmak üzere seçilen bakterilerin sıvı besiyeri içerisindeki kültür ortamları hazırlanmıştır. Bunun için agar besiyerlerine ekilen taze kültürlerdeki tek koloniler steril öze yardımıyla alınarak 10 mL triptik soy broth besiyeri içerisine karıştırılmıştır ve sıvı besiyeri içinde çözünmesi sağlanmıştır. Her iki bakteriden ayrı ayrı hazırlanan inokulumlar 24 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.6.1 Disk difüzyon testi ile büyüme inhibisyonu zonlarının belirlenmesi

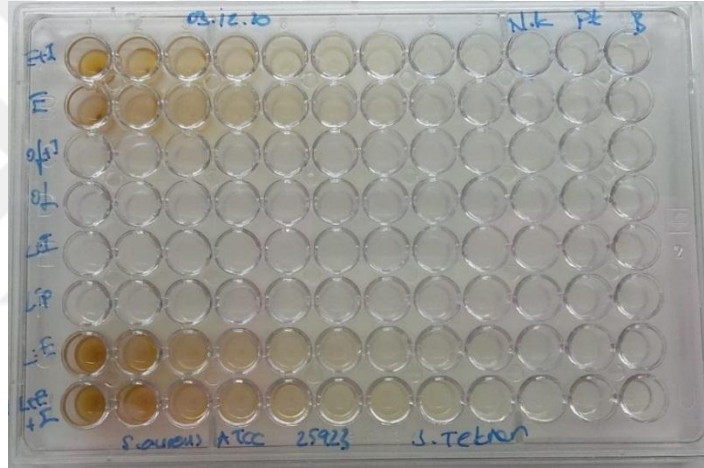
Disk difüzyon testi Kirby-Bauer (1966) yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre ilk önce 24 saatlik bakteri kültürleri Mcfarland densitometre cihazında (Biosan/Denib) %0.85’lik steril tuz çözeltisi kullanılarak 0.5 Mcfarland değerine seyreltilmiştir. Seyreltilen her bir bakteri kültürlerine steril bir eküvyon çubuk daldırılarak müeller hinton agar (MHA) petrilere bakteri ekimi yapılmıştır. Her bir petride bakterinin agar yüzeyine ekimi 3 farklı noktadan yapılmış ve bu sayede agarın tüm yüzeyine bakteri ekimi sağlanmıştır. Ekim yapıldıktan sonra 15 dakika içerisinde pens ile petrilereki agar yüzeyine eşit mesafelerde 4 adet blank ve 1 adet ofloksasin diski olmak üzere 5 adet antimikrobiyal duyarlılık testi disklerinden yerleştirilmiştir. 4 adet blank diske formülasyondan (0.288 gr/150 µL, 1:1 lipozom:DPBS), formülasyonla aynı konsantasyonda ekstraktan (0.288 gr/ 150 µL DPBS), 2.homojenizasyondan elde edilen lipozom solüsyonundan ve negatif kontrol olarak %0.85’lik steril tuz çözeltisinden 18 µL yüklenmiştir. Yüklemeler tamamlandıktan sonra MHA petrilere parafilm ile sarılarak 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda test maddelerinin inhibisyon zonları ölçülmüştür. Disk difüzyon testi her bir bakteri ve test maddesi için 3 tekrarlı yapılmıştır.

2.2.6.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi

Minimum inhibisyon konsantrasyonu bir antimikrobiyal test ajanının görünür bakteri büyümesini engellediği en düşük konsantrasyon olduğu için öncelikle ekstrakt yüklü lipozom formülasyonu hazırlanmış ve 1 mL'ye seyreltilmiştir. Hazırlanan 0.288 gr/mL stok formülasyondan 1000 mg/mL, 750 mg/mL, 500 mg/mL, 250 mg/mL, 200 mg/mL, 150 mg/mL, 100 mg/mL, 40 mg/mL, 30 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL ve 5 mg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlardan *S.aureus* ATCC 25923'e ve *E.coli* ATCC 25922'ye karşı disk difüzyon testleri yapılmıştır. Hem *S.aureus* ATCC 25923 hem de *E.coli* ATCC 25922 için en az zon veren konsantrasyonlar bulunmuştur. Her iki bakteri için en az zon veren konsantrasyonların sıvı mikrodilüsyon testinde kullanılmak üzere formülasyon ve ekstrakt stok solüsyonları hazırlanmıştır. Stok solüsyonlar, seçilen konsantrasyonların 10 katı olacak şekilde hazırlanmıştır. MİK deneyi için ekstrakt ve formülasyon dışında ofloksasin solüsyonu ve boş lipozom solüsyonu da test edilmiştir. 2 bakteri için ofloksasin stok solüsyonları literatürdeki MİK değerleri baz alınarak hazırlanmıştır. *E.coli* ATCC 25922 için 2 µg/mL ve *S.aureus* ATCC 25923 3.9 µg/mL stok ofloksasin solüsyonu hazırlanmıştır. Boş lipozom solüsyonu ikinci homojenizasyonda elde edildiği gibi doğrudan kullanılmıştır.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi CLSI M7-A7 (2006) protokolüne göre yapılmıştır. İlk olarak 96 kuyucuklu mikropalakadaki tüm kuyucuklara 100'er µL müeller hinton broth besiyeri eklenmiştir. Mikropalakadaki her iki sıranın ilk kuyucuklarına 100'er µL hazırlanan ekstrakt (A ve B sırası), formülasyon (G ve H sırası), ofloksasin (C ve D sırası) ve lipozom stok solüsyonlarından (E ve F sırası) eklenmiştir ve pipetaj yapılarak 1.kuyucuklardan 100'er µL alınarak 2.kuyucuğa aktarılmıştır bu işlem 9.kuyucuğa kadar devam ettirilmiştir ve 9.kuyucuktan 100 µL dışarıya atılmıştır. Bu şekilde 1.kuyucuktan itibaren test maddelerinin konsantrasyonlu 2 kat dilüsyonlar ile azaltılmıştır. Bu aşamadan sonra mikropalakalara inokulum eklenmiştir. İnokulum, 0.5 Mcfarland değerindeki (1.5×10^8 kob/mL) hücrelerin 10^7 kob/mL'ye seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Kuyucuklardaki final bakteri konsantrasyonunun 5.10^5 kob/mL olması için her bir test maddesinin bir sırasına (A, C, E ve H sıraları) hazırlanan 10^7 kob/mL bakteri solüsyonlarından 5'er µL eklenmiştir. 10.kuyucuklar büyüme kontrolü olarak kullanıldığı için 10.kuyucuklara da 5 µL bakteri solüsyonundan eklenmiştir. Sadece

besiyeri içeren 11.kuyucuklar sterilite kontrolü olarak ve 12.kuyucuklar blank olarak kullanılmıştır. Kalan kuyucuklar (11. ve 12.sütunlar ve B, D, F, G sıraları besiyeri ile 105 µL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan mikropalakalar 300 rpm'de 20 saniye ortibal çalkalayıcıda (Mipro/MSL3535) tutulmuştur ve 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda bulanıklık görülmeyen en az konsantrasyonlu kuyucuklar MİK değerleri olarak belirlenmiştir. Büyüme inhibisyonu kontrolü için de mikropalakalar 600 nm'de mikropalaka okuyucuda (EPOCH) okutulmuştur ve büyüme kontrolüne karşı absorbans değerleri kaydedilmiştir. MİK değerinin üzerinde test maddesi konsantrasyonu içeren kuyucuklar MBK değerlerinin belirlenmesi için MHA petrilere dragaski özesi ile ekilmiştir. 24 saat sonra petrillerdeki koloni miktarları kontrol edilmiştir. Her bir bakteri ve test maddesi için MİK ve MBK testi 3 tekrarlı olarak yapılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 : MİK deneyi için kullanılan mikropalaka düzeni.

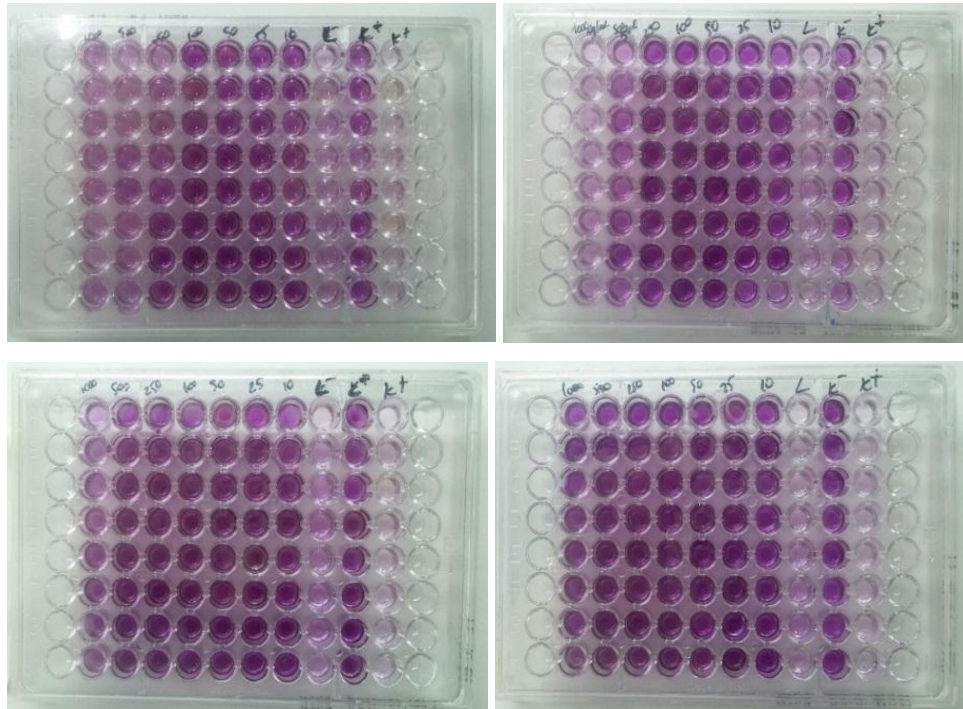
2.2.7 Hücre kültürü deneyleri

Hücre kültürü çalışmaları için insan alveolar adenokarsinoma hücre hattı olan A549 ve insan bronş epitel hücre hattı olan BEAS-2B kullanılmıştır. Bu hücreler %1 penisilin-streptomisin antibiyotik ve %10 fetal sığır serumu içeren Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) hücre ortamında ve 37°C, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarında büyütülüp çoğaltılmıştır.

2.2.7.1 Ekstrakt ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Ekstraktın, ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun ve boş lipozomun sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla A549 ve BEAS-2B hücre hatları 24 saat maddelerle

muamele edildikten sonra MTT testi uygulanmıştır. Hücreler steril şartlarda çoğaltıldıktan sonra 96 kuyucuklu mikrolakalara kuyucuk başına 10^4 hücre ekilmiştir. Hücrelerin mikrolakalara tutunması için mikrolakalar 37°C , %95 nem, %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin ardından kuyucuklardaki hücre tutunmasını ve hücre yoğunluğunu (konfluentlik) kontrol etmek için plakalar inverted mikroskopta (OLYMPUS) incelenmiştir. Hücrelerin kuyucuklara tutunduğundan emin olunduktan sonra kuyucuklardaki besiyeri ortamı atılarak, besiyeri ortamında olacak şekilde madde uygulaması yapılmıştır. Ekstrakt ve formülasyon için 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ ve 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar formülasyon ve ekstraktın stok solüsyonlarından elde edilmiştir. Stok solüsyonlar 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Formülasyonun stok solüsyonunun hazırlanması için 0.288 gr liyofilize ekstrakt tartılıp 75 μL PBS'te çözündürülmüştür ardından 75 μL lipozom solüsyonu eklendikten sonra vorteks karıştırıcıda önce 1 dk 1400 rpm'de karışması sağlanmıştır. Çözünmeyen parçacıkların kalmadığına emin olunduktan sonra formülasyon tekrar 30 sn 1400 rpm'de vorteks karıştırıcıda tutularak hazırlanmıştır. Bu karışımdan 5 μL alınarak 9.6 mL'ye full besiyeri (antibiyotik ve FBS'li) ile tamamlanmıştır.



Şekil 2.6 : DMSO eklendikten sonra mikrolakalar. Sol üst: BEAS-2B ekstrakt, Sağ üst: BEAS2B formülasyon, Sol alt: A549 ekstrakt, Sağ alt: A549 formülasyon.

Ekstraktın stok solüsyonu ise 10 mg liyofilize ekstraktın 10 mL full besiyeri ile dilüsyonu ile hazırlanmıştır. Stok solüsyonlarından full besiyeri ile seyrelterek formülasyon ve ekstraktın diğer 6 konsantrasyonu hazırlanmıştır. Boş lipozom solüsyonu da sitotoksik etkisi test edilmek üzere kuyucuklara eklenmiştir. Tüm test maddeleri kuyucuklara 180 µL olarak eklenmiştir. Bu şekilde ekstrakt ve formülasyonun 7 farklı dozu ve boş lipozom, A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında 8 tekrarlı çalışılmıştır (Şekil 2.6). Pozitif kontrol olarak %0.1 Triton X-100, negatif kontrol olarak full besiyeri kullanılmıştır. Doz uygulamalarının ardından mikrolakalar 24 saat inkübasyona maruz bırakılmıştır. 24 saatin ardından hücre canlılığının belirlenmesi için MTT testi yapılmıştır. Önce MTT solüsyonu hazırlanmıştır bunun için 0.02 gr MTT tartılarak 4 mL PBS'te çözündürülmüş ve antibiyotiksiz ve FBS'siz besiyerinde 40 mL'ye tamamlanmıştır. MTT solüsyonunun hazırlanmasının ardından mikrolakalardaki hacimler boşaltılmıştır. Her bir kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 100 µL eklenmiştir. Mikrolakalar alüminyum folyoya sarılarak 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından karanlık bir ortamda plakaların içlerindeki hacimler alınarak kuyucukların her birine 100 µL DMSO eklenmiştir ve 10 dk çalkalayıcıda tutulmuştur. Son aşama olarak mikrolakalar kapaksız bir şekilde 570 nm'de mikrolaka okuyucuda okutularak absorbans değerleri alınmıştır. Ekstrakt ve formülasyonun A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki IC50 değerleri, doz konsantrasyonuna bağlı % hücre canlılığı grafiğinden elde edilen denklem üzerinden belirlenmiştir.

2.2.7.2 Ekstrakt ve ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun yara iyileştirici etkilerinin belirlenmesi

A549 hücreleri 12 kuyucuklu plakalara kuyu başına 10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. En az 24 saat 37°C, %5 CO₂ koşullarında inkübasyon süresinin geçmesinin ardından plakalar inverted mikroskopta (OLMYPUS) incelenmiştir. Hücreler 48 saat inkübasyonun ardından >90 konfluent hale geldiğinde her bir kuyucuğa steril 10 µL pipet ucuyla dik açıyla ve merkezden çizik atılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 1 mL DPBS ile yıkama yapılarak kuyucuklardan kazılan hücrelerin giderilmesi sağlanmıştır. A549 hattında ekstrakt ve formülasyonun 1000 µg/mL ve 500 µg/mL olmak üzere 2 farklı konsantrasyonu ve negatif kontrol olarak test maddesi eklenmemiş besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %0.1 Triton-X100 kullanmıştır. Ekstrakt ve formülasyonun dozları ve pozitif ve negatif kontroller yara iyileşmesindeki

net etkinin gözlemlenebilmesi için % 5 FBS içeren besiyeri ortamında hazırlanmıştır. DPBS ile yıkamanın ardından her bir test maddesi 3 tekrarlı olmak üzere tüm kuyucuklara 1 mL hacimde eklenmiştir. Test maddelerinin eklenmesinin hemen ardından (0.saat) inverted mikroskopta kuyucuklara atılan çizikler kontrol edilip fotoğraflanmıştır. 24. saatte ve 48.saatte hücrelerin migrasyon/anti-migrasyon etkileri negatif kontrolle kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

2.2.8 İstatiksel analiz

Deneylerdeki veri gruplarının istatiksel analizi R programla dili ile oluşturulmuş Rstudio programı üzerinden yapılmıştır. Normal dağılan veriler için parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılmayan veri setleri için ise non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Hazırlanması

Yapılan ön çalışmalarda ekstrakt yüklü lipozom formülasyonları hazırlamak için farklı formülasyonlar ve teknikler denenmiştir. Bu formülasyonlar lipozom:ekstrakt oranı ve hazırlama tekniği değiştirilerek yapılmıştır. Buna göre, 15 saniye gibi kısa bir süre sonikatörde hazırlanan ekstrakt yüklü lipozom formülasyonlarının vorteks karıştırıcıda hazırlanan formülasyonlara göre çok daha düşük enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu, aynı şekilde vortekste yüksek rpm’lerde ya da uzun sürelerde hazırlanan formülasyonlarda da ekstrakt ve lipozom yapılarının zarara uğradığı, formülasyonun PH’ının değişebildiği ve enkapsülasyonunun azaldığı görülmüştür. Bu sebeplerle bu tez çalışmasındaki antimikrobiyal deneylerde ve hücre deneylerinde kullanılan ekstrakt yüklü lipozom formülasyonu 1400 rpm’de toplam bir buçuk dakika ve aralıklarla vorteks karıştırıcıda tutularak hazırlanmıştır. Nitekim Silva ve diğerlerinin (2010) ultrasonik sonikasyon ile lipozom üretme parametrelerini incelediği çalışmada sonikasyon gücü, süre, prob derinliği gibi parametrelerin lipozom üretiminde fosfolipit oksidasyonu ve hidrolizini sağlayarak, buradan radikallerin üretimi gerçekleştirdiğini ve PH’ın değişebildiği ve zeta potansiyelinin etkilenebildiğini belirtilmiştir.

3.2 Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Enkapsülasyon Etkinliği ve Ürün Veriminin Hesaplanması

% Enkapsülasyon etkinliği ve % ürün verimi, enkapsüle olmayan kısmın 3000 rpm 4°C’de 1 saat boyunca santrifüjde çöktürülüp kurutulduktan sonra tartılmasıyla bulunmuştur ve hesaplamalar için Denklem 3.1a ve 3.1b’de belirtilen formüller kullanılmıştır.

% Enkapsülasyon Etkinliği (Baranauskaite ve diğ., 2018):

$$(M_1 - M_2 / M_1) \times 100 \quad (3.1a)$$

M₁: Formülasyona başlangıçta konulan ekstrakt miktarı, M₂ : Enkapsüle edilmeyen ekstrakt miktarı.

M₁ yani formülasyon için kullanılan ekstrakt miktarı 0.288 gr'dır. Enkapsüle edilmeyen kısmın ağırlığı 0.0561 gr olarak bulunmuştur. Formülasyonun enkapsülasyon etkinliği %80.5 olarak hesaplanmıştır.

% Ürün verimi (Baranauskaite ve diğ., 2018):

$$M_3 / M_4 \times 100 \quad (3.1b)$$

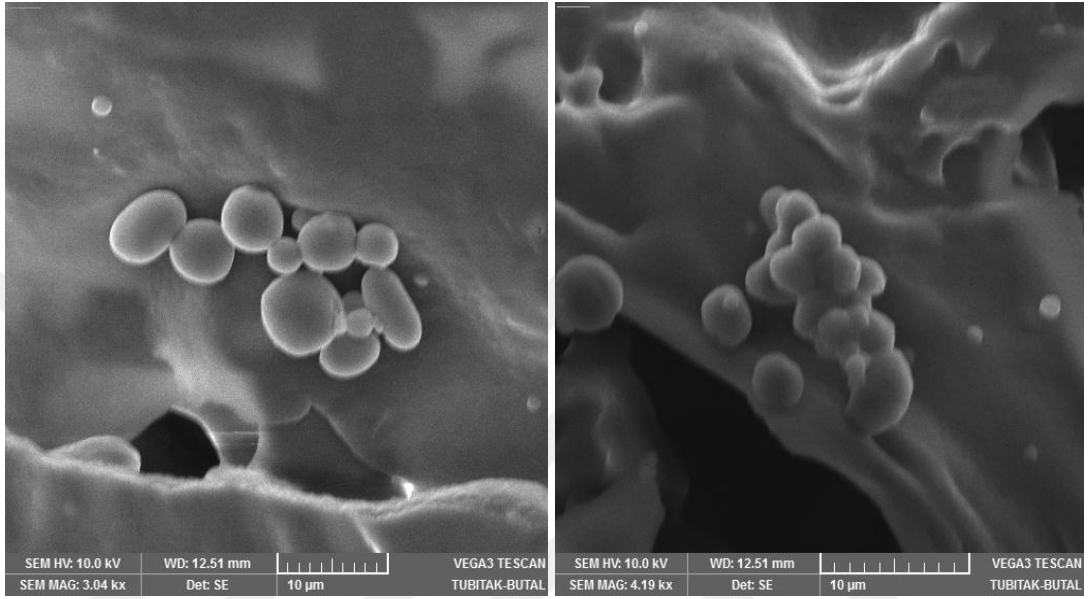
M₃: Enkapsülasyondan sonra ekstrakt yüklü lipozomların kuru ağırlığı, M₄: Enkapsülasyondan önce eklenen boş lipozomun ve ekstraktın kuru ağırlığının toplamı.

Enkapsülasyondan önce eklenen lipozomun kuru ağırlığı 0.00075 gr ve ekstraktın kuru ağırlığı 0.288 gr'dır. Enkapsüle olan kısmın ağırlığı toplam konulan madde miktarından enkapsüle olmayan kısmın ağırlığı çıkartılarak bulunmuştur ve enkapsüle edilen kısmın ağırlığı 0.2319 gr'dır. % Ürün verimi, %80.3 olarak hesaplanmıştır.

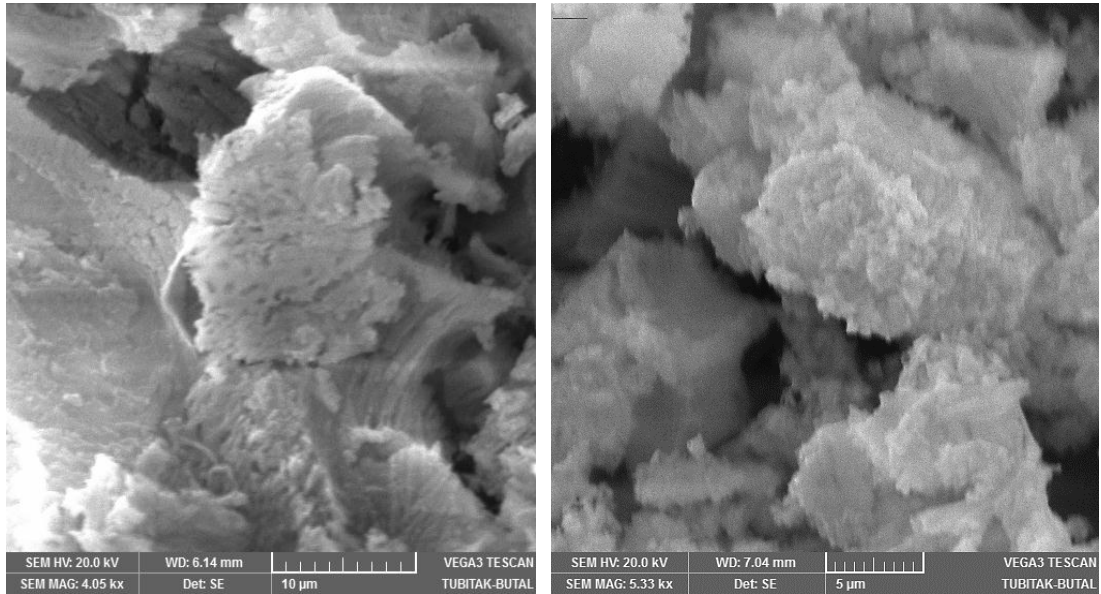
Enkapsülasyon etkinliği bu tez çalışmasında kullanılan yöntem dışında kargo materyalini enkapsüle etmiş lipozomun çöktürölüp tartılması ya da Triton-X100 ile lipozomun parçalanıp içindeki enkapsüle edilmiş materyalin UV-vis ile karakterizasyonu ya da jel fitrasyon ile enkapsüle olmamış materyalin ayrılması gibi yöntemlerle de belirlenebilmektedir. Tez çalışmasında enkapsülasyon etkinliğinin Denklem 3.1a'de belirtildiği şekilde yapılmasının sebebi yöntemin basit olması, enkapsüle lipozom formülasyonlarında lipozomu parçalamak için kullanılan Triton-X100 maddesinin lipozomun tamamını parçalamaya yetmeyen çok düşük konsantrasyonunun bile (%0.25) ekstraktın absorbans değerini etkilediğinin görülmesidir. Lipozomun sıcaklık ile parçalanıp enkapsüle ekstraktın absorbans ile karakterize edildiği yöntemde de aynı şekilde ekstraktın absorbans değerlerinin normalden daha az çıkmasıdır. Enkapsüle olmayan materyalin çöktürölüp UV-vis'te maksimum absorbans üzerinden karakterizasyonun yapıldığı yöntemde de boş lipozomların ilk santrifüjde çökme ihtimali olduğundan 200-800 nm dalga boyunda girişim yapabilmesidir. Buna karşılık ilk santrifüjde çöken boş lipozomların kuru ağırlığı ihmal edilebilecek kadar küçüktür.

3.3 Taramalı Elektron Mikroskobu ile Morfolojik Karakterizasyonun Yapılması

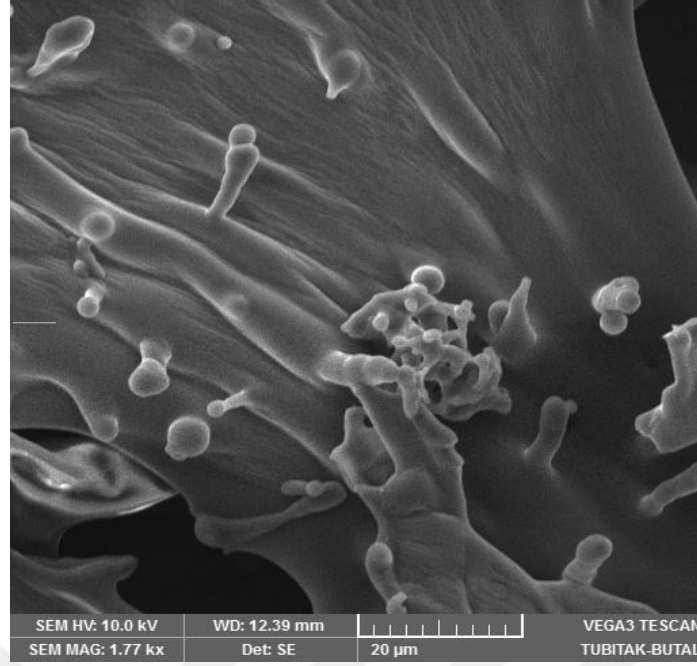
Taramalı elektron mikroskobu ile birinci (Şekil 3.1) ve ikinci homojenizasyondan (Şekil 3.2) elde edilen boş lipozom örneklerinin ve formülasyonun (Şekil 3.3) morfolojik karakterizasyonları ve parçacık boyutları incelenmiştir.



Şekil 3.1: Birinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozomların 10 µm ölçekli SEM görüntüleri.

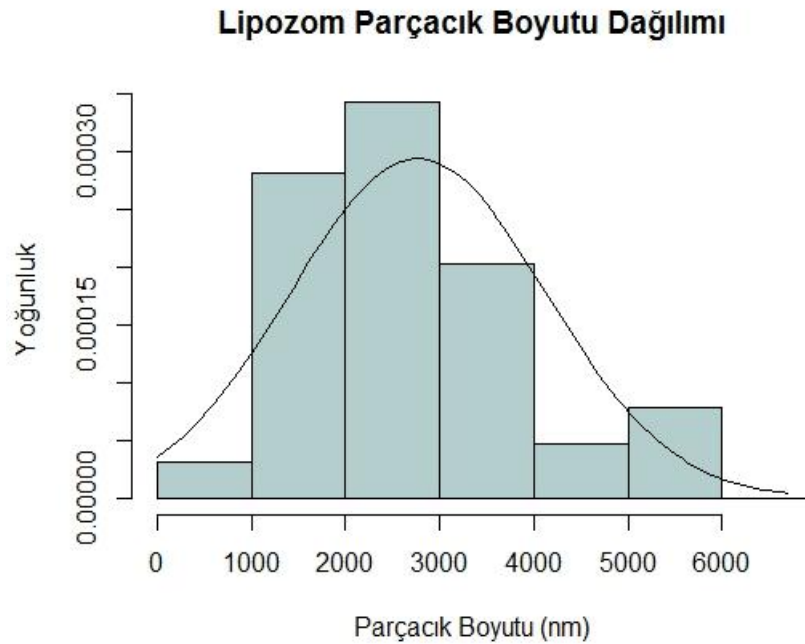


Şekil 3.2: İkinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozomların 10 µm (sol) ve 5 µm (sağ) ölçekli SEM görüntüleri.



Şekil 3.3: Ekstrakt yüklü lipozom formülasyonunun 10 µm ölçekli SEM görüntüsü.

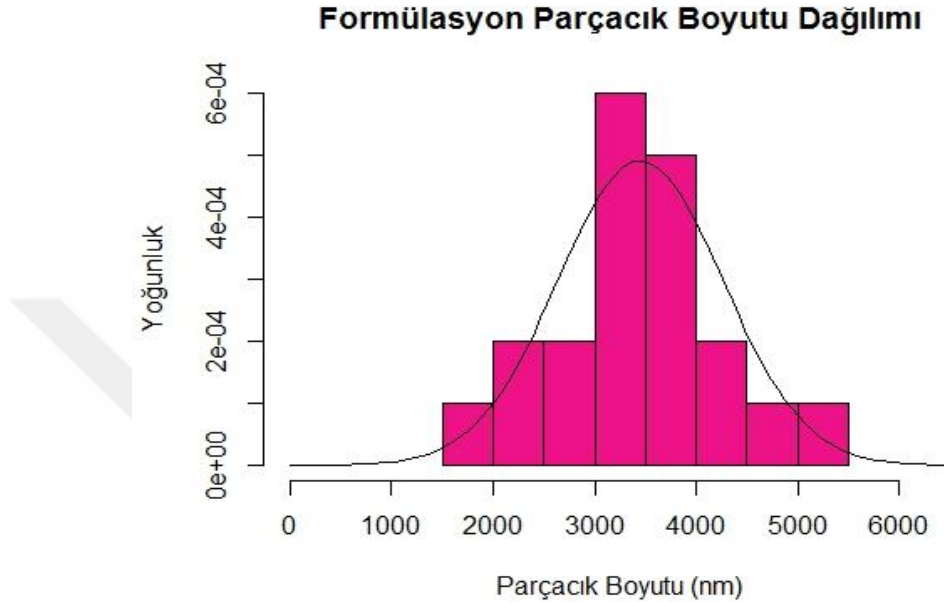
Birinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozomlar ve formülasyondaki ekstrakt enkapsüle lipozomların parçacık boyutları ImageJ programı ile ölçek üzerinden ölçülmüştür. Birinci homojenizasyondan elde edilen lipozomların boyutları numunenin farklı konumlarından alınmış SEM fotoğraflarındaki 64 veri üzerinden ölçülmüştür ve ortalama 2768.8 nm boyuta sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.4: Birinci homojenizasyondan sonra elde edilen boş lipozomların parçacık boyutu grafiği

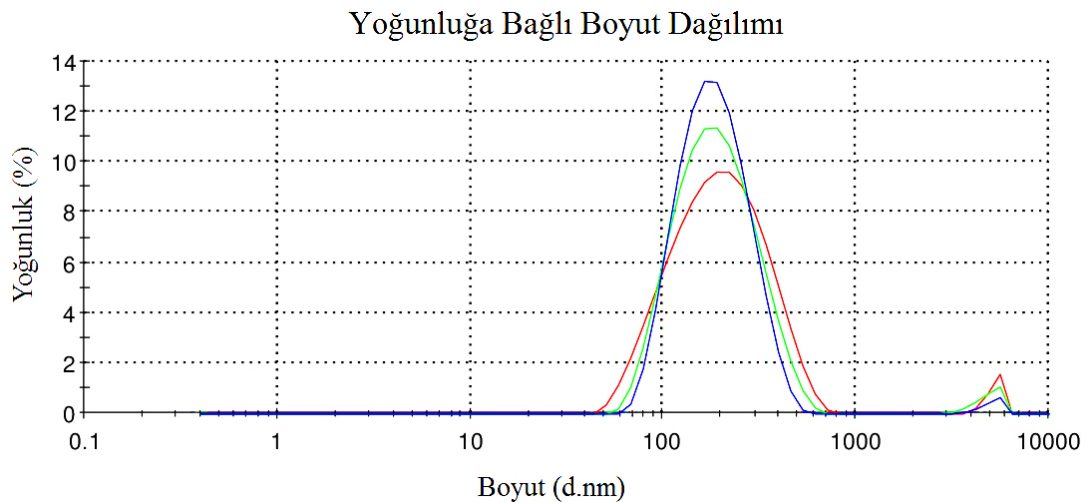
Formülasyonun ise SEM fotoğrafından elde edilen 21 farklı parçacık boyutu verisiyle ortalama 3450.6 nm parçacık boyutuna sahip olduğu bulunmuştur.

Bu verilerle Rstudio programı üzerinden normal dağılım eğrili histogram grafiği çizilmiştir (Şekil 3.4) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Ekstrakt yüklü formülasyonun parçacık boyutu grafiği

İkinci homojenizasyondan sonra elde edilen lipozomların boyut analizi Malvern Zeta-Sizer cihazı ile yapılmıştır. Ölçümler 3 kayıt şeklinde alınmıştır (Şekil 3.6).

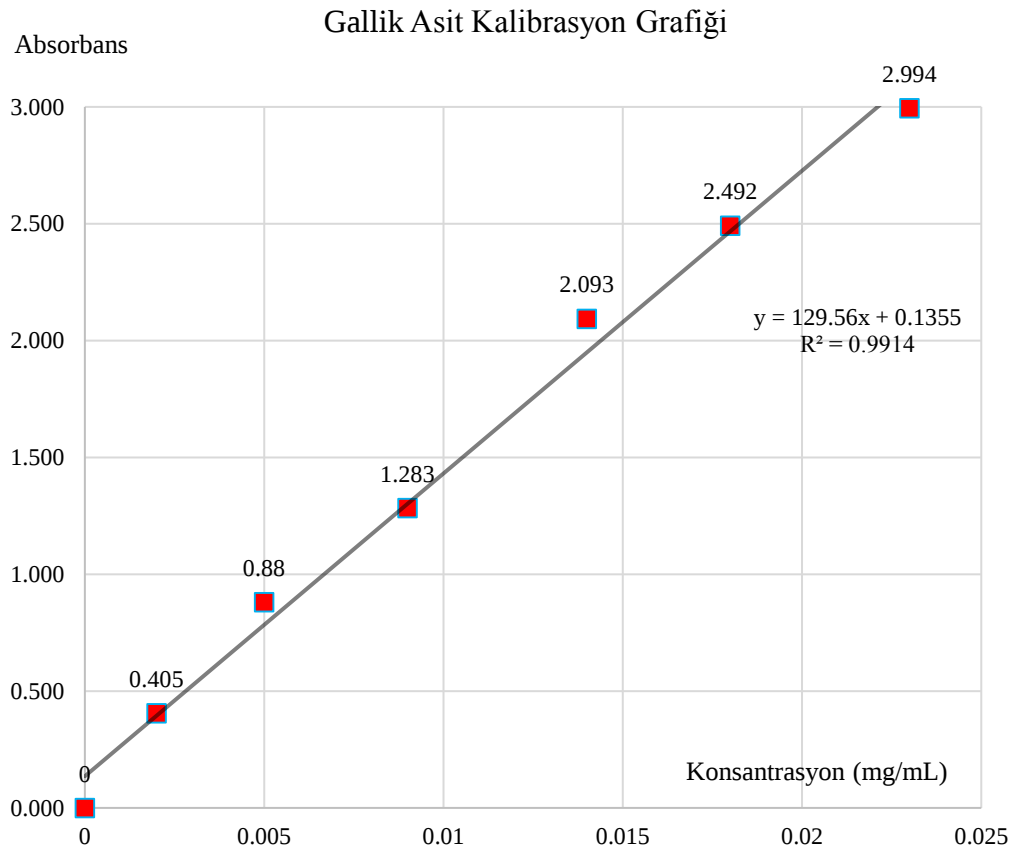


Şekil 3.6: İkinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozomların yoğunluğa bağlı parçacık boyutu dağılımı

Zetasizer analizine göre, ikinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozomların ortalama parçacık boyutunun 184.4 nm olduğu bulunmuştur. Polidispersite (heterojenlik) indeksi (PDI) 0.343 olarak belirlenmiştir. İkinci homojenizasyondan sonra elde edilen boş lipozomların parçacık boyutları (çapları), birinci homojenizasyondan sonra elde edilen lipozomların parçacık boyutlarına göre %93.3 oranında küçülmüştür. PDI'nın 0.5'ten küçük olması sentezlenen lipozomların dar bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir (Mohammadpour ve diğ., 2012).

3.4 Ekstrakttaki Total Fenolik Madde İçeriğinin Hesaplanması

Ekstraktta bulunan fenolik madde miktarının mg GAE (gallik asit eşdeğeri) / g olarak hesaplanabilmesi için önce farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlanıp 765 nm'de UV-vis spektrofotometrede okutulmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ve absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar ile gallik asit kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Gallik asit kalibrasyon grafiği

Gallik asit kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem $y=129.56x + 0.1355$ ve R^2 değeri 0.9914'dür. Bu eğri denklemini kullanılarak ekstrakttaki toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. 0.02 gr/mL ekstraktan hazırlanan 3 farklı konsantrasyonun absorbans değerleri 3 tekrarlı olarak 765 nm'de okutulmuştur ve her bir absorbans değeri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde y yerine yazılarak her bir x (konsantrasyon) değeri bulunmuştur. Bu x değerleri Denklem 3.2'de paylaşılan formül içerisine yerleştirilerek ekstraktın 1 gramında bulunan toplam fenolik madde miktarı mg GAE cinsinden hesaplanmıştır.

Total fenolik madde (Onivogui ve diğ., 2014):

$$\text{TPC (mg GAE / g)} = \text{GAE (mg/mL)} \times V \text{ (mL)} \times \text{DF} / M \text{ (g)} \quad (3.2)$$

GAE (mg/mL): Standart eğri denkleminde çekilen x konsantrasyon değeri, V: Etanol ekstraktının total hacmi, DF: Dilüsyon faktörü, M: Etanol ekstraktının ağırlığı.

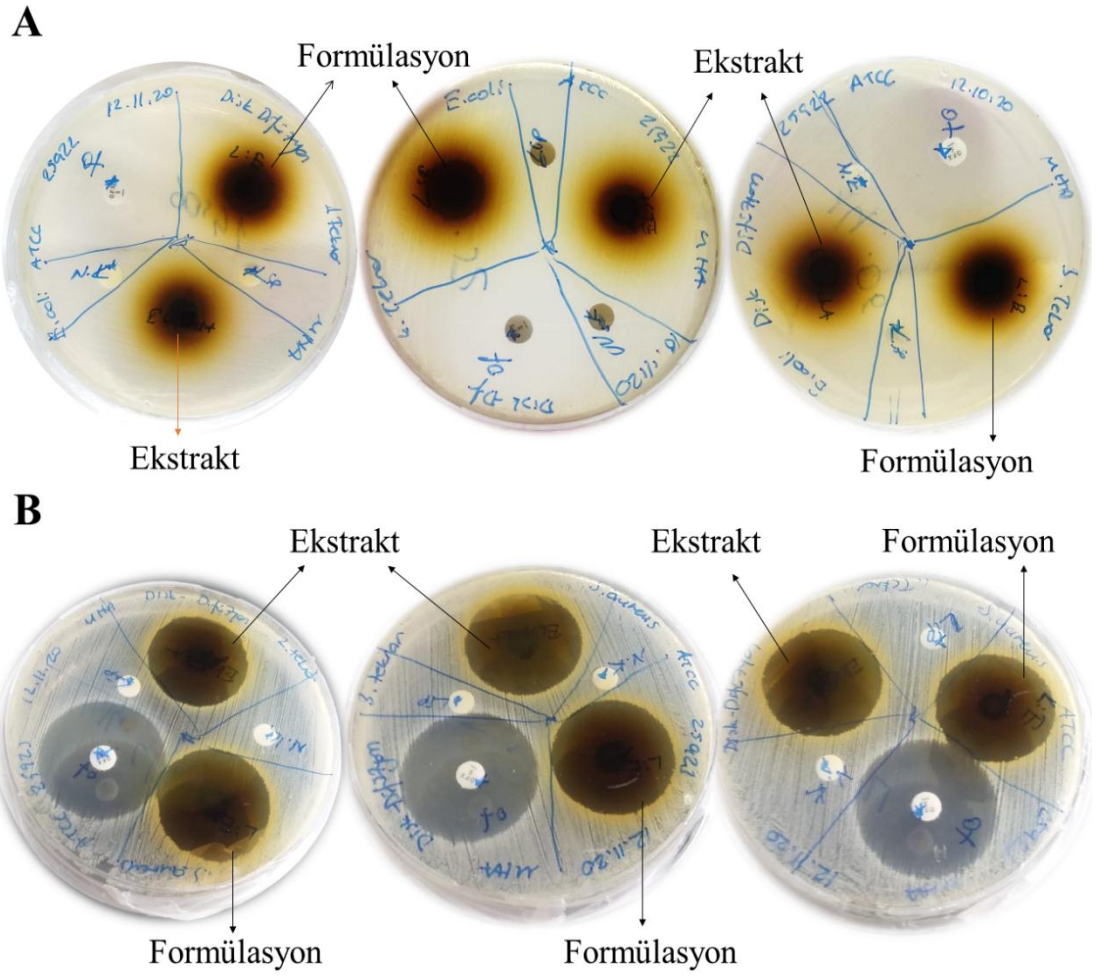
Ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve verilerin R studio programındaki Shapiro-Wilk normality testi ile normal dağıldığı belirlenmiştir. Bu yüzden verileri temsil etmek için ortalama ve standart sapma kullanılmıştır. Buna göre ekstraktın 1 gramındaki total fenolik madde miktarı ortalama 100.13 mg GAE +/-0.55 olarak bulunmuştur.

3.5 Ekstrakt ve Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

3.5.1 Disk difüzyon testi ile büyüme inhibisyonu zonlarının belirlenmesi

Disk difüzyon testinde 0.5 Mcfarland standartından eküvyon çubuk ile MHA petrilere ekilen *S.aureus* ATCC 25923 ve *E.coli* ATCC 25922 suşlarına karşı formülasyon, formülasyonla aynı miktarda ekstrakt içeren ekstrakt örneği (1.92 gr/mL), boş lipozom, pozitif kontrol ofloksasin disk (5 µg) ve negatif kontrol olarak %0.85 steril tuz çözeltisi test edilmiştir (Şekil 3.8).

Test maddelerinin uygulanmasından 24 saat sonra büyüme inhibisyonları zonları ölçülmüştür (Çizelge 3.1).



Şekil 3.8: *E.coli* ATCC 25922'nin (A) ve *S.aureus* ATCC 25923'ün (B) 3 tekrarlı disk difüzyon sonuçları.

Çizelge 3.1 : 24 saat sonra büyüme inhibisyonu zonu ölçümleri

Bakteri Türü	Büyüme İnhibisyonu Zonları (mm) (Ortalama +/- standart sapma)				
	Formülasyon	Ekstrakt	Boş lipozom	P.K	N.K
<i>E.coli</i> ATCC 22592	11.7 +/- 0.96	11 +/- 0.82	ZY	30 +/- 0.82	ZY
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	28.6 +/- 0.48	28.4 +/- 0.48	ZY	30.4 +/- 0.48	ZY

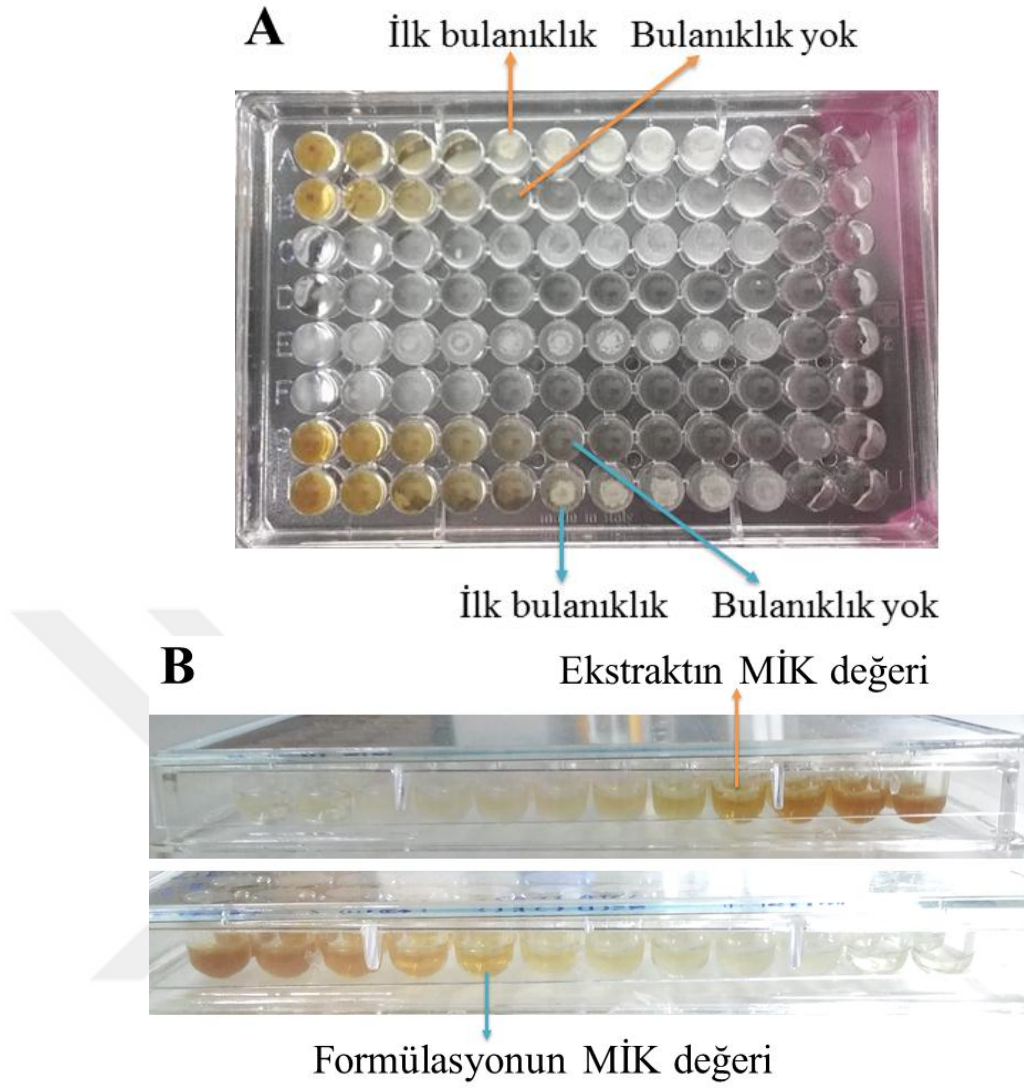
ZY: Test edilen bakterilere karşı zon oluşturmadığını ifade etmektedir. Veriler en az 3 tekrarlı olarak alınmıştır ve normal dağılmaktadır.

3.5.2 Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde formülasyon, ekstrakt, boş lipozom ve ofloksasin test maddelerinin *E.coli* ATCC 25922 ve *S.aureus* ATCC 25923 suşlarına karşı minimum inhibe edici konsantrasyon değerleri araştırılmıştır. 1000 mg/mL – 5 mg/mL arası disk difüzyon testi yapılan konsantrasyonlardan *S.aureus* ATCC 25923'e karşı en az zon veren konsantrasyon 15 mg/mL ve büyüme inhibisyonu zonu ortalama 10 mm, *E.coli* ATCC 25922'ye karşı en az zon veren konsantrasyon 150 mg/mL ve büyüme inhibisyonu zonu ortalama 8.3 mm olarak ölçülmüştür. *E.coli* ATCC 25922 için 150 mg/mL'ye en yakın denenen konsantrasyon 100 mg/mL'de ve *S.aureus* ATCC 25923 için 15 mg/mL'ye en yakın denenen konsantrasyon 10 mg/mL'de büyüme inhibisyonu zonu görülmemiştir. MİK belirlenmesi için yapılan sıvı mikrodilüsyon testinde kullanılmak üzere hazırlanan ekstrakt ve formülasyon stok solüsyonları *E.coli* ATCC 25922 için 1500 mg/mL ve *S.aureus* ATCC 25923 için 150 mg/mL olarak hazırlanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon testinde her bir bakteri için 9 farklı konsantrasyon denenmiştir. Bu 9 farklı konsantrasyon da ekstrakt ve formülasyon stok solüsyonlarının iki kat halinde azaltılan konsantrasyonlarından elde edilmiştir. Dolayısıyla ekstrakt ve formülasyonun MİK değeri için denenen konsantrasyon aralığı *S.aureus* ATCC 25923'e karşı 75 mg/mL (1.kuyucuk) – 293 µg/mL (9.kuyucuk), *E.coli* ATCC 25922'e karşı 750 mg/mL (1.kuyucuk) – 2930 µg/mL (9.kuyucuk)'dir.

İkinci homojenizasyondan elde edilen boş lipozom doğrudan kullanılarak mikropalaklarda 2 kat seyreltilmiştir. *E.coli* ATCC 25922 için 2 µg/mL ve *S.aureus* ATCC 25923 3.9 µg/mL stok ofloksasin hazırlanarak 2 kat seyreltilmiştir. 24 saat sonra çıplak gözle bulanıklık (görünür büyüme) olmayan en az konsantrasyonlu kuyucuklar belirlenmiştir.

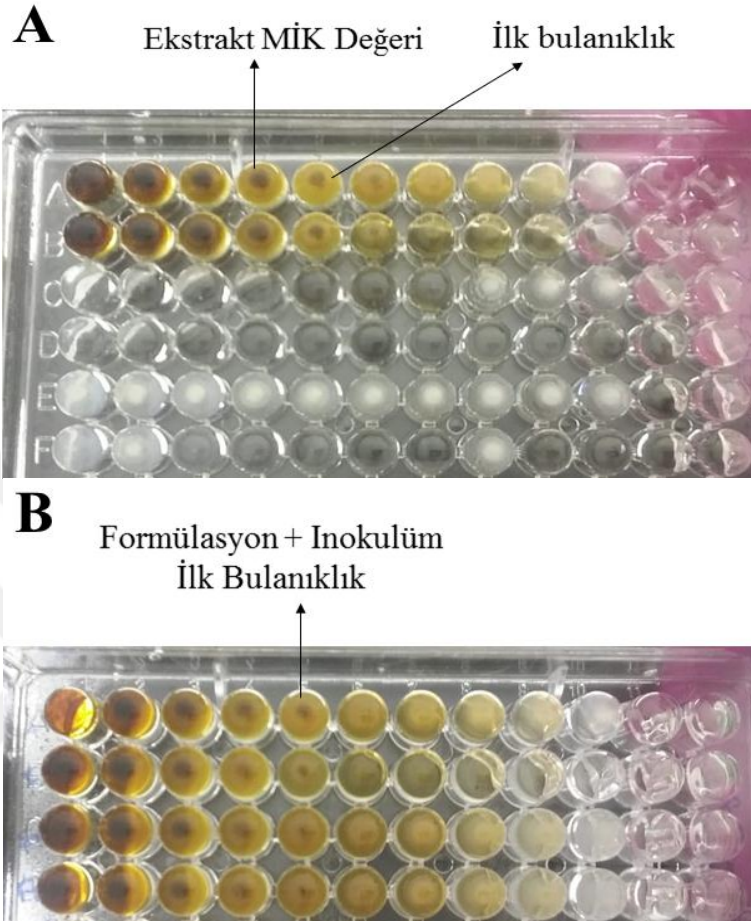
Buna göre *S.aureus* ATCC 25923 için yapılan 3 tekrarda da ekstrakt için MİK değeri 4.kuyucuktaki konsantrasyon, formülasyon için MİK değeri 5.kuyucuktaki konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9). Ofloksasinde *S.aureus* ATCC 25923 için bulanıklığın olmadığı en az konsantrasyonlu kuyucuk 3 tekrarda da 4.kuyucuktur ve ofloksasinin *S.aureus* MİK değeri 0.24 µg/mL'dir.



Şekil 3.9 : Ekstrakt ve formülasyon için görünür bulanıklık üzerinden (A) *S.aureus* ATCC 25923 için MİK değerlerinin (B) belirlenmesi. Turuncu oklar ekstraktı mavi oklar formülasyonu belirtmektedir.

E.coli ATCC 25922 için ise yapılan 3 tekrarda ekstrakt için MİK değeri 4.kuyucuktaki konsantrasyon ve formülasyon için MİK değeri 2 tekrarda 4.kuyucuk ve 1 tekrarda 3.kuyucuk olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10). Ofloksasinin *E.coli* ATCC 25922 için MİK değeri ise ortalama 0.21 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. MİK için seçilen kuyucukların tüm test maddeleri için 600 nm'de ölçülen absorbans değerleri ile korele olduğu görülmüştür. 600 nm'deki karşılaştırmalar da büyüme kontrolü ve inokulumsuz test maddesi içeren konsantrasyonların absorbans değerleri ile inokulumlu test maddelerinin absorbans değerleri üzerinden yapılmıştır. Bu verilerin dışında önemli olan diğer bir nokta hem disk difüzyon testlerinde hem de MİK için yapılan testlerde seçilen bakterilere karşı boş lipozomların kullanılan hiçbir konsantrasyonunun antimikrobiyal etkisinin olmamasıdır. Bu lipozomların kontrollü salınım, enkapsüle materyali dış etkenlerden

koruma gibi bir çok avantajını kullanarak antimikrobiyal etkinliği test edilecek maddelerin ölçümlerinin daha hassas olmasını ve daha etkili olmasını sağlamaktadır.

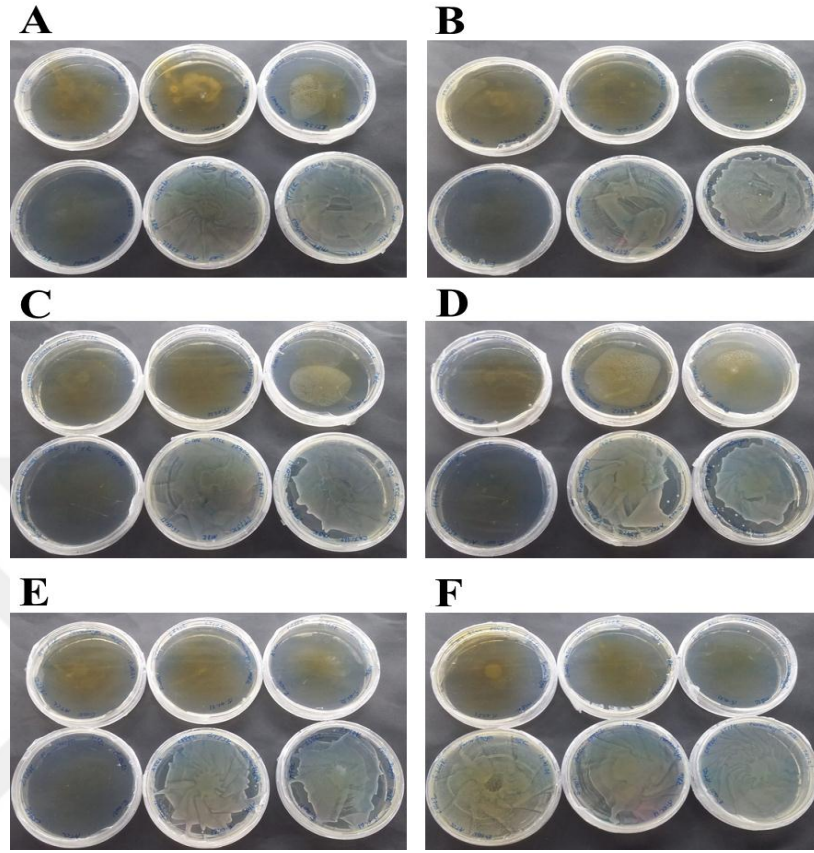


Şekil 3.10 : *E.coli* ATCC 25922'e karşı ekstrakt (A) ve formülasyon (B) için MİK değerlerinin belirlenmesi.

Test maddelerinin bakterilerin gelişimini engellediği (>%90) MİK değerlerinin belirlenmesinin ardından minimum bakterisal (öldürücü) etki (>%99.9) sağlayan konsantrasyonlar bulunmuştur. Bunun için seçilen MİK değerlerinin üzerinde olan konsantrasyonlar 3 tekrarlı olarak MHA plakalara yayma ekim yöntemi ile ekilmiştir. Ekimin ardından 24 saat sonra MHA plakalarda koloni oluşup oluşmadığı belirlenmiştir. Buna göre *E.coli* ATCC 25922 için ekstrakt ve formülasyondan MİK üzeri kuyucuklar ve bulanıklığı doğrulamak amacıyla MİK değerinin altındaki 2 kuyucuktan da ekim yapılmıştır.

Bu sonuçlara göre seçilen MİK değerlerinde hiç koloni üremesi olmadığı için *E.coli* ATCC 25922'ye karşı ekstrakt ve formülasyonların MİK değerleri MBK değerlerine eşittir. Formülasyon için 2 tekrarda 4.kuyucuklardan ve 1 tekrarda da 3.kuyucuktan

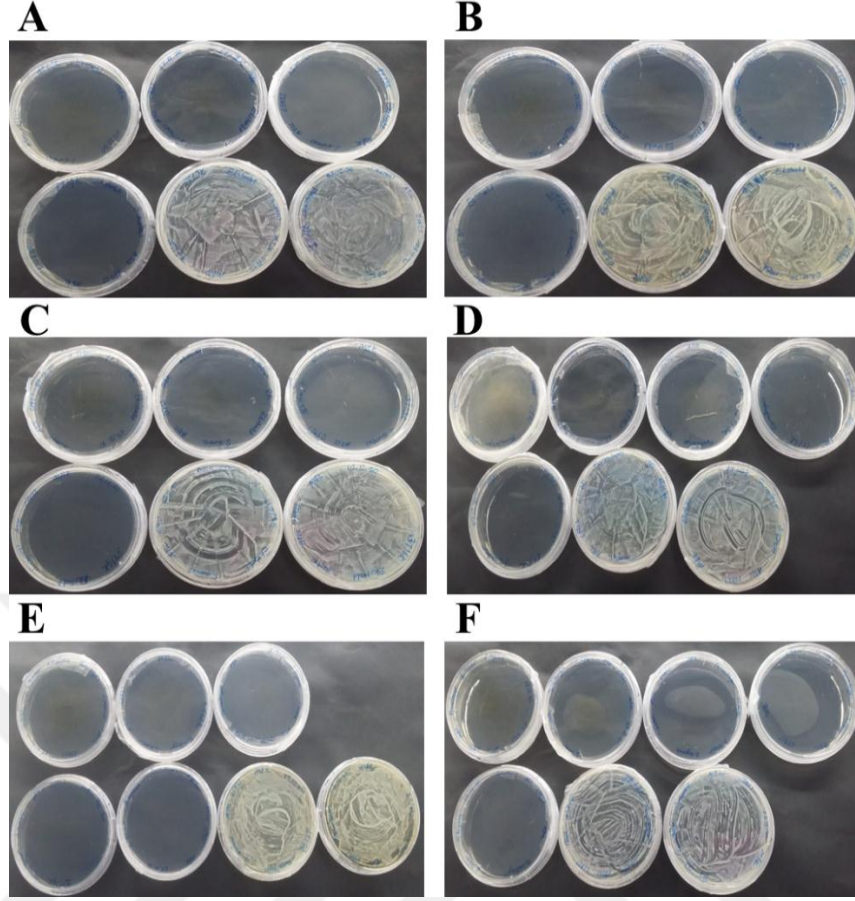
yapılan ekimlerde hiç koloni olmadığı için MBK değeri bu kuyucuklardaki konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 : *E.coli* ATCC 25922 MBK petrileri. A, B, C sırayla ekstraktın ilk 3 tekrarı ve D, E, F sırayla formülasyonun ilk 3 tekrarıdır.

Ekstrakt için 3 tekrarda da 4.kuyucuklardan yapılan ekimlerde hiç koloni bulunmadığı tespit edilmiştir ve 4.kuyucuktaki konsantrasyonun *E.coli* ATCC 25922'ye karşı hem MİK hem de MBK değeri olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.11). Kontrol amaçlı MİK belirlenirken bulanıklık görülen MİK değeri altındaki kuyucuklardan ekilen petrilere üreme tespit edilmiştir ve seçilen MİK değerinin doğrulanması sağlanmıştır.

S.aureus ATCC 25923'e karşı ekstraktın MBK değeri 3 tekrarda da 4.kuyucuktan yapılan ekimlerdir. 4.kuyucuk aynı zamanda görünür bulanıklığın olmadığı en az konsantrasyonlu kuyucuktur. Formülasyon için MİK deneyinde görünür bulanıklığın olmadığı en az konsantrasyonlu kuyucuk olan 5.kuyucuklardan yapılan ekimlerde 1. ve 3.tekrarlarda hiç koloni gözlenmezken 2.tekrarda 2 koloni olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla *S.aureus* ATCC 25923'e karşı formülasyonun MBK değeri 1.ve 3.tekrarlarda MİK değeri ile eşittir ve 2.tekrarda da 4.kuyucuklarda bulunan konsantrasyondur (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 : *S.aureus* ATCC 25923 MBK petrileri. A, B, C sırayla ekstraktın ilk 3 tekrarı ve D, E, F sırayla formülasyonun ilk 3 tekrarıdır.

Her iki bakteri için ekstrakt ve formülasyonun MİK ve MBK değerleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : Ekstrakt ve formülasyonun MİK ve MBK değerleri

Bakteri Türü	MİK ve MBK Değerleri (mg/mL) (Medyan)			
	Formülasyon MİK Değeri	Ekstrakt MİK Değeri	Formülasyon MBK Değeri	Ekstrakt MBK Değeri
<i>E.coli</i> ATCC 22592	93.75 (93.75-187.5) ^b	93.75 ^a	93.75 (93.75-187.5) ^b	93.75 ^a
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	4.687 ^a	9.375 ^a	4.687 (4.687-9.375) ^b	9.375 ^a

Veriler 3 tekrarlıdır, “a” ile belirtilenlerde medyan ve ortalama aynıdır, “b” veri setindeki en büyük ve en küçük değeri belirtir.

Disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon testlerine göre ekstrakt ve formülasyonun *S.aureus* ATCC 25923'te daha etkili olduğu net bir şekilde görülmüştür. Formülasyonun *S.aureus* ATCC 25923'ye karşı ekstrakta kıyasla 2 kat daha az konsantrasyonunun daha yüksek antimikrobiyal etkinlik sağladığı görülmüştür. 5 mg/mL- 1000 mg/mL arası konsantrasyonlarda yapılan disk difüzyon testlerinde ayrıca belli bir konsantrasyondan sonra disk difüzyon sonuçlarının çok fazla değişmediği görülmüştür. Bu sebeple düşük konsantrasyonlar kullanıldığında formülasyonun ekstrakta kıyasla 2 kat daha az konsantrasyonla *S.aureus* ATCC 25923'ye karşı daha yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğu açıkça belirlenebilmiştir. Buna karşılık *E.coli* ATCC 25922'de 1 tekrarda daha az bir konsantrasyon farkıyla ekstraktın antimikrobiyal etkisi formülasyona göre daha az konsantrasyonda sağlanmıştır. Cui ve diğerlerinin (2015) yaptığı çalışmada karanfil yağı içeren lipozomların antimikrobiyal etkisi *S.aureus* ATCC 25923 ve *E.coli* ATCC 25922'ye karşı test edilmiştir. Bunun sonucunda yapılan formülasyonun *S.aureus* ATCC 25923'da antimikrobiyal etkisinin olduğu, *E.coli* ATCC 25922'de hiç antimikrobiyal etkisi olmadığı belirtilmiştir. Çalışmada bunun sebebi olarak *S.aureus* ATCC 25923'ün por oluşturan toksinleri olması sebebiyle lipozomlarda porlar oluşturup madde salınımı arttırabildiği ve etken maddelerle daha kolay etkileşebildiği, *E.coli* ATCC 25922'nin ise por oluşturan toksinleri olmadığı için yağın lipozomların içinde kaldığı ve bakteriye ulaşmadığı gösterilmiştir.

Melissa officinalis bitkisi antimikrobiyal etkisi farklı bakteriler üzerinde kanıtlanmış bir bitkidir. Farklı teknikler ya da farklı polariteye sahip çözücüler kullanılarak yapılan ekstraksiyonlardan elde edilen ekstraktların farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği olduğu literatürde mevcuttur (Hassan ve diğ., 2019; Rabbani ve diğ., 2016; Mabrouki ve diğ., 2017). Mabrouki ve diğerlerinin (2017) yaptığı çalışmada *M. officinalis* bitkisinin etanol, hekzan ve aseton ekstraktlarının *S.aureus* ve *E.coli* suşlarını da içeren farklı mantar ve bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. En yüksek büyüme inhibisyonu zonları test edilen tüm bakterilerde etanol ekstraktında sağlanmıştır. Aynı çalışmada *M.officinalis* bitkisinin etanol ekstraktının en yüksek antimikrobiyal etki sağlaması etanolün çalışmadaki diğer polar çözücülere kıyasla daha yüksek fenolik madde içeriğine sahip olmasıyla ilişkilendirilmiştir ve etanol fenolik madde ekstraksiyonu için en iyi çözücü olarak gösterilmiştir. Rabbani ve diğerlerinin (2016) yaptığı çalışmada *M.officinalis*'in

hidroalkolik ekstraktının patojen *S.aureus* suşuna karşı mik değerinin 20 mg/mL olduğu belirtilmiştir. Tez çalışmasında ise *M. officinalis* ekstraktının lipozomal formülasyonunun ekstrakta kıyasla daha az daha düşük konsantrasyonda inhibe edici etkisi olduğu göz önünde bulundurulduğunda daha az konsantrasyon kullanılarak daha fazla antimikrobiyal etkinlik elde edilmesinin hücresel dokularda uygulanacak formülasyonlarda daha düşük sitotoksik etki elde edilmesini sağlayacağı düşünülmektedir.

3.6 Ekstrakt ve Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

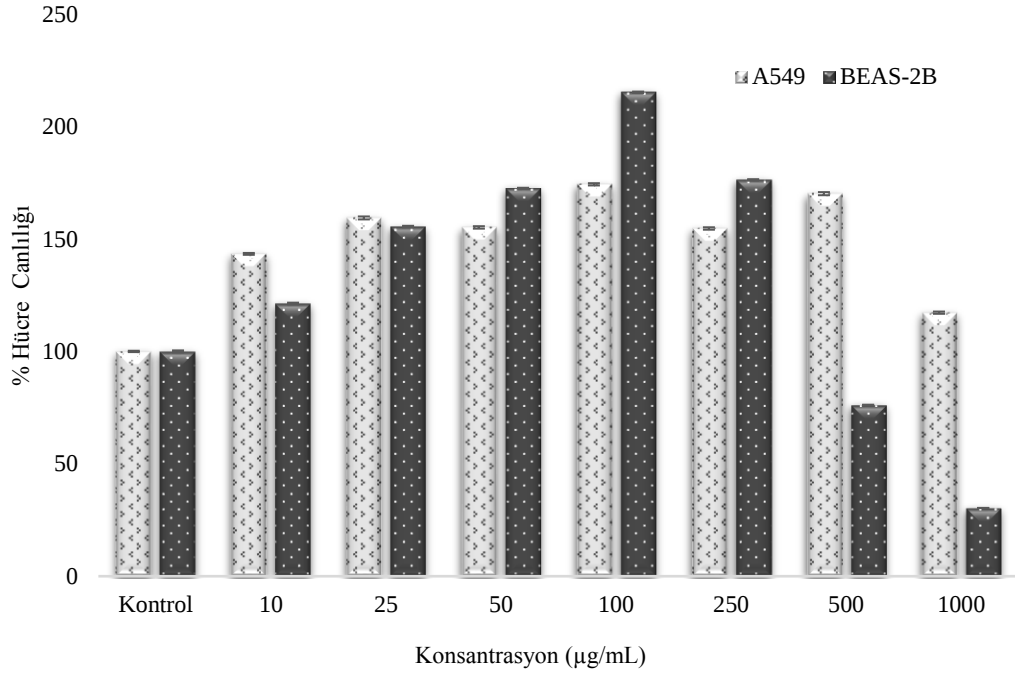
Test maddelerinin sitotoksik etkilerin belirlenmesi için canlı hücrelerin %50'sini öldüren dozlar yani IC50 değerleri bulunmuştur. 1000 µg/mL-10 µg/mL konsantrasyon aralığında besiyerinde hazırlanan ekstrakt ve formülasyonun A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki IC50 değerlerinin belirlenmesi için önce her bir hücre hattında en az 3 tekrarlı olarak çalışılan her bir dozun absorbans değerlerinin ortalaması alınmıştır ve kullanılan her bir mikropalakada en az 3 tekrarlı olarak ekilip sadece canlı hücre içeren kuyucuklardan alınan absorbans değerlerinin de ortalaması alınmıştır. Bu değerler Denklem 3.3'de belirtilen formüle yerleştirilerek her bir dozun iki hücre hattındaki % hücre canlılıkları hesaplanmıştır.

$$OA_{\text{örnek}}/OA_{\text{kontrol}} * 100 \quad (3.3)$$

$OA_{\text{örnek}}$: Test maddesinin ortalama absorbans değeri, OA_{kontrol} : Test maddesi içermeyen sadece hücre içeren negatif kontrolün ortalama absorbans değeri (Baskararaj ve diğ., 2020).

Yüzde hücre canlılığı ve konsantrasyona bağlı dağılım grafiğinin denklemi üzerinden IC50 değerleri hesaplanmıştır. Buna göre ekstraktın A549 hücre hattındaki IC50 değeri 1.13 mg/mL, BEAS-2B hücre hattındaki IC50 değeri 0.806 mg/mL olarak bulunmuştur. Formülasyonun A549 hücre hattındaki IC50 değeri 3.5 mg/mL ve BEAS-2B hücre hattındaki IC50 değeri 868.05 µg/mL olarak bulunmuştur. Ekstrakt 1 mg/mL konsantrasyonda A549 hücre hattındaki hücre canlılığını % 42.5'e düşürmüştür ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda BEAS-2B hücre hattındaki hücre

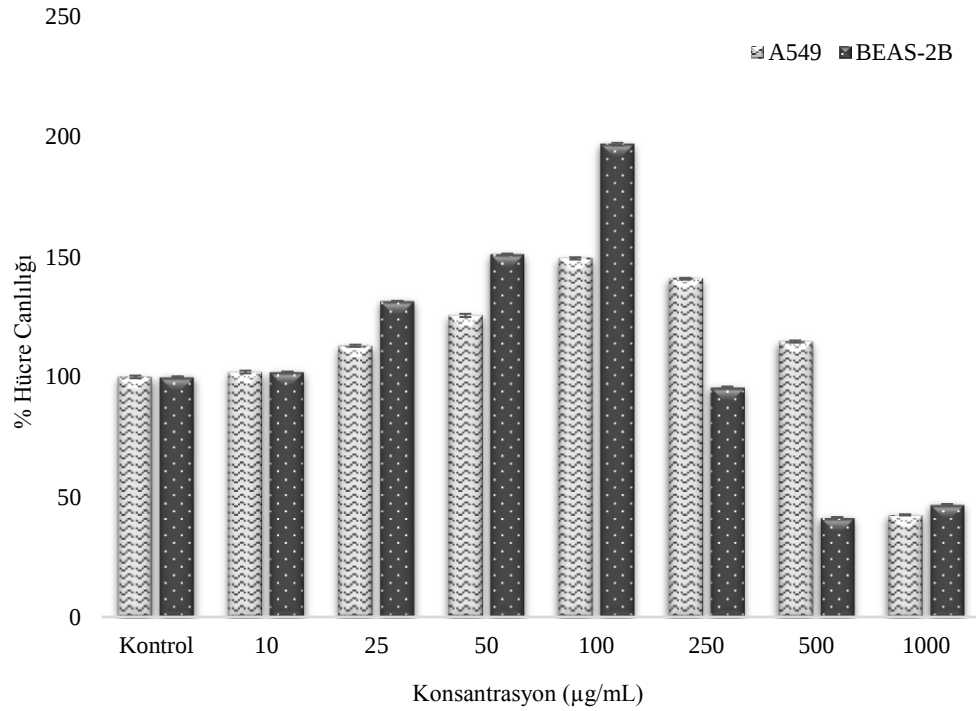
canlılığını %41.5'a düşürmüştür. Formülasyon tüm dozlarda A549 hücre hattındaki proliferasyonu arttırırken, 0.5 mg/mL konsantrasyonda BEAS-2B hücre hattındaki hücre canlılığını %76'ya ve 1 mg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını %30.7'ye düşürmüştür. %0.1 Triton-X100 uygulanan pozitif kontrol hücrelerde hücre canlılığı A549 hücre hattında %6.7-7.4 ve BEAS-2B hücre hattında %12-13 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 : Formülasyonun A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini gösteren konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı (n=8). Standart hata çubukları grafiğe eklenmiştir.

Ekstraktın IC₅₀ değeri hem A549 hem de BEAS-2B hücre hatlarında formülasyon değerlerine göre daha düşüktür. Bu durum formülasyonun 2 hücre hattında ekstrakta göre daha düşük toksisiteye sahip olduğunu gösterir. Bu yüzden A549'da ekstrakt formülasyona kıyasla daha sitotoksik iken, formülasyonun sağlıklı akciğer epitel hücrelerindeki (BEAS-2B) toksisitesi ekstraktkine kıyasla daha düşüktür ve bu yüzden formülasyonun kullanımı BEAS-2B hücrelerinde ekstrakta göre daha avantajlıdır (Şekil 3.14).

Boş lipozomun negatif kontrole kıyasla hücre canlılığını BEAS-2B ve A549 hücrelerinde azaltmadığı, boş lipozomun iki hücre hattında sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

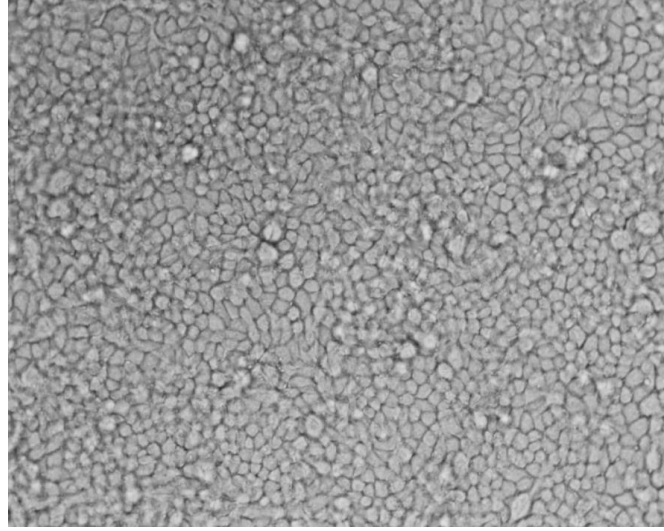


Şekil 3.14 : Ekstraktın A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki sitotoksik etkisini gösteren konsantrasyona bağlı % hücre canlılığı (n=8). Standart hata çubukları grafiğe eklenmiştir.

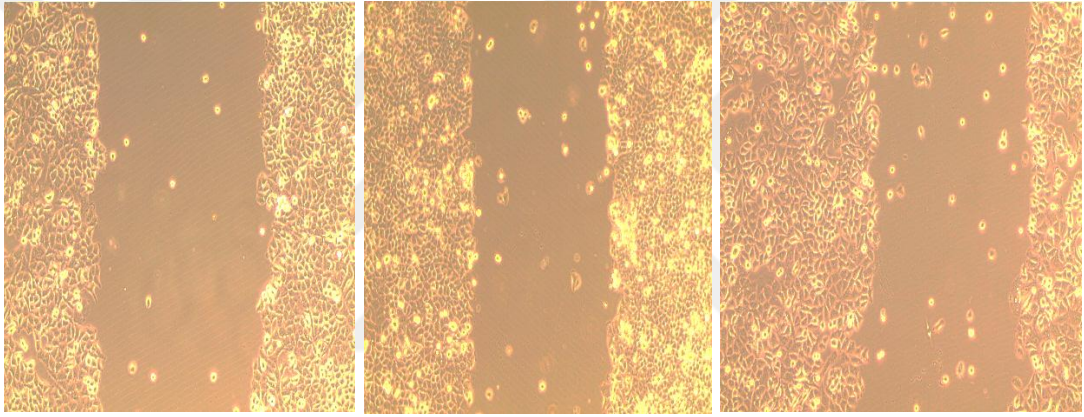
Jahanban-Esfahlan ve diğerlerinin (2015) yaptığı çalışmada *Melissa officinalis* bitkisinin maserasyonla elde edilmiş hidroetanolik ekstraktının farklı dozlarının A549 hücreleri ile 72 saat muamelesi sonunda en yüksek %81.25 büyüme inhibisyonu kaydedildiği belirtilmiştir. Yine bir çalışmada *Melissa officinalis* bitkisinde de bulunan bir fenolik bir bileşik olan rosmarinik asitin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi incelenmiştir ve bu bileşiğin 12.5 – 400 µM konsantrasyonda tek başına kullanımının hem A549 hem de BEAS-2B hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir (Vatan, 2019). Encalada ve diğerlerinin (2011) yaptığı çalışmada *Melissa officinalis* bitkisinin %50 etanol ekstraktının insan kolon kanseri hücre hattında (HCT-116) hücre canlılığının en düşük 72.saatte gözlemlendiği belirtilmiştir ve çalışmada sitotoksik etkinin bitkideki fenolik madde ve antioksidan içeriği ile korele olduğu belirtilmiştir.

3.7 Ekstrakt ve Ekstrakt Yüklü Lipozom Formülasyonunun Yara İyileştirici Etkilerinin Belirlenmesi

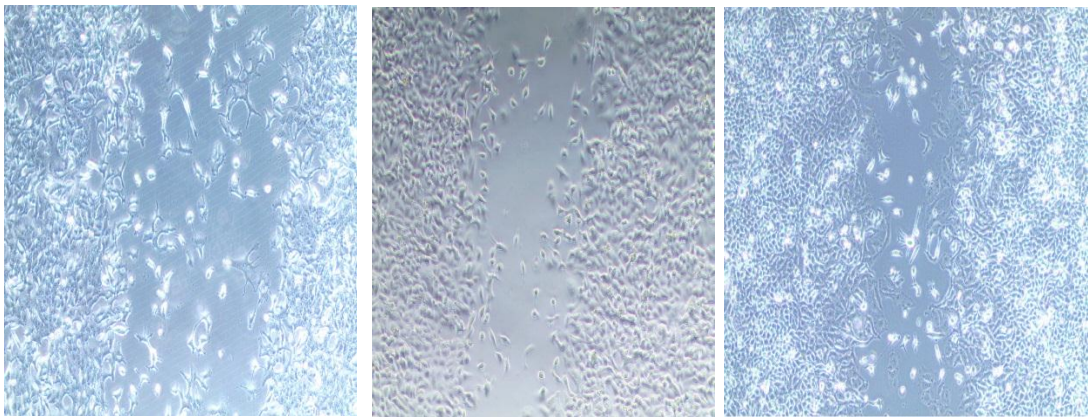
Yara iyileşmesi testi yapılmadan önce A549 hücrelerinin 12 kuyulu plakalarda >90 konfluent hale gelmesi sağlanmıştır (Şekil 3.15)



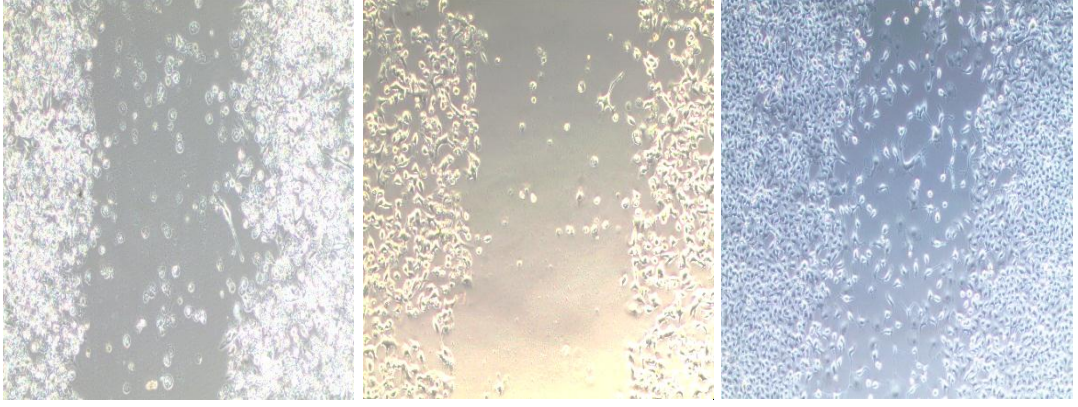
Şekil 3.15: A549 hücrelerinin 20x objektifteki görüntüsü.



Şekil 3.16 : 0.saatte ekstraktı içeren (sol), formülasyonu içeren (orta), negatif kontrolü içeren (sağ) kuyucuların 10x objektifteki mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.17 : 48.saatte 500 $\mu\text{g/mL}$ ekstraktı içeren (sol), 500 $\mu\text{g/mL}$ formülasyonu içeren (orta), negatif kontrolü (sağ) içeren kuyucuların 10x objektifteki mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.18 : 48.saatte 1000 µg/mL ekstraktı içeren (sol), 1000 µg/mL formülasyonu içeren (orta), negatif kontrolü (sağ) içeren kuyucuların 10x objektifteki mikroskop görüntüleri.

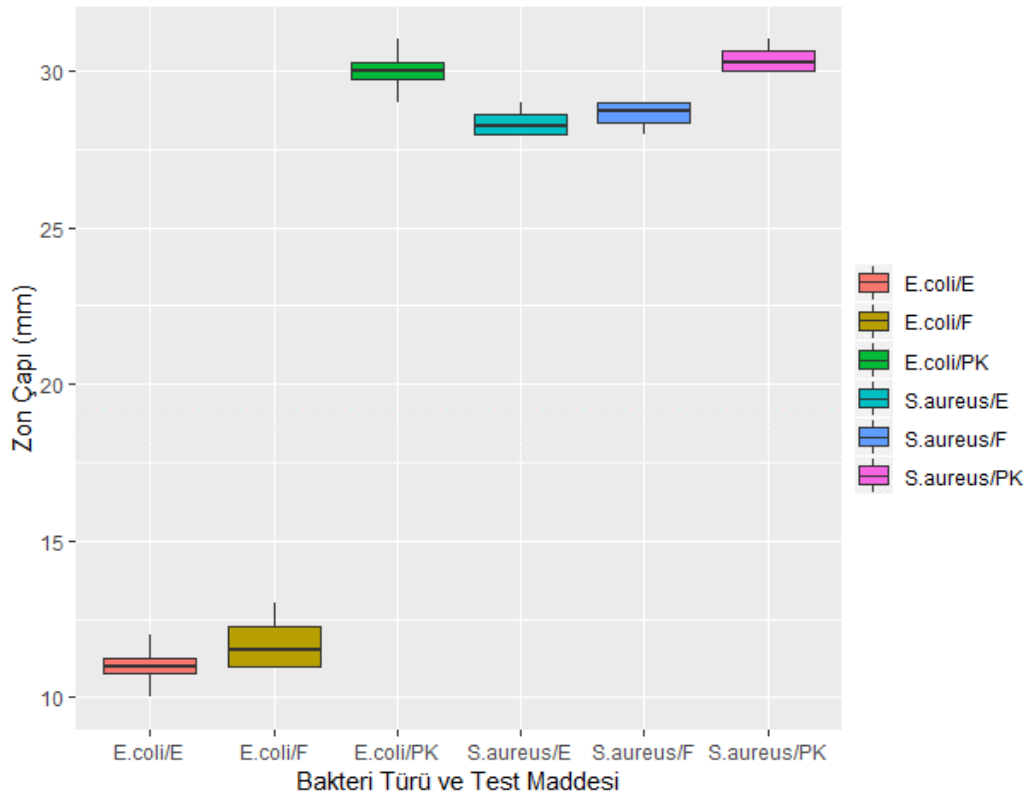
Şekil 3.17 ve Şekil 3.18'deki negatif kontrollerde 0.saate kıyasla (Şekil 3.16) 48.saatte hücrelerin migrasyon yaptığı açıkça görülmektedir. Hem 500 µg/mL hem de 1000 µg/mL dozlarda ekstrakt ve formülasyonun negatif kontrollere göre A549 hücrelerinin migrasyon yapmasını azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca açık yaranın büyüklüğünün negatif kontrollere göre daha geniş olduğu böylece proliferasyonun ve migrasyonun baskılandığı ve yaraların 0.saate göre hücre proliferasyonu sayesinde genişliğinin azaldığı gözlenmiştir. 24. saatte yaraların genişliğinin 48.saatlerdeki genişliklerden daha büyük olduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol içeren kuyucuklarda da hücreler küçülerek miktarları azalmıştır. 1000 µg/mL konsantrasyonun 500 µg/mL konsantrasyona göre A549 hücrelerinin çoğalarak yara dokusuna hareket etmesini (migrasyonunu) daha çok engellediği tespit edilmiştir.

Moacă ve diğerlerinin (2018) yaptığı çalışmada *M.officinalis*'in etanol ekstraktının MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon ve proliferasyonu inhibe edici etkisinin olduğu bildirilmiştir. Kullanılan dozlardan 20 µg/mL ve 100 µg/mL migrasyon ve proliferasyona karşı inhibe edici bir etki göstermezken 250 µg/mL konsantrasyonda yüzen hücreler tespit edilmiştir. Ayrıca hücre şekilleri ve morfolojileri değişmiştir. Bu durum, ekstraktın bu dozlarda hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermesi ile açıklanmıştır. Tez çalışmasında ise ekstrakt ve formülasyonun yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında A549 kanser hücrelerindeki proliferasyonu ve migrasyon azaltıcı etkisi açıkça görülmüştür ve bu 48.saate kadar sağlanmıştır. Bu sebeplerden sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkisi daha düşük olan ekstrakt ve formülasyonun anti-kanser çalışmalarında destekleyici bir rol oynayabileceği ön görülmektedir.

3.8 İstatiksel Analiz

Disk difüzyon testinde *E.coli* ATCC 25922 ve *S.aureus* ATCC 25923'e karşı farklı test maddelerinin oluşturduğu büyüme inhibisyonu zonları test gruplarındaki veriler normal dağıldığından tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

Buna göre *S.aureus* ATCC 25923'e karşı pozitif kontrol, negatif kontrol, ekstrakt ve formülasyonun antimikrobiyal etkisi farklıdır (P value < 0.05) (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 : Test maddelerinin bakterilerin büyüme inhibisyonu zon çapına etkisi.
PK: Pozitif kontrol, E: Ekstrakt ve F: Formülasyon.

Gruplar arası istatiksel analiz ise HSD test ve Duncan Test kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre formülasyon ve ekstraktın *S.aureus* ATCC 25923'e karşı büyüme inhibisyonu etkisi aynıdır (P value > 0.05) ve bu etki pozitif kontrol ve negatif kontrolden istatiksel olarak farklıdır (P value < 0.05). *E.coli* ATCC 25922'ye karşı pozitif kontrol, negatif kontrol, ekstrakt ve formülasyonun antimikrobiyal etkisi farklıdır (P value < 0.05). Formülasyon ve ekstraktın büyüme etkisi birbirleriyle aynı (P value > 0.05) ve pozitif kontrol ile negatif kontrolden istatiksel olarak farklıdır. Ekstrakt ve formülasyonun oluşturduğu büyüme inhibisyonu *E.coli* ATCC 25922 ve *S.aureus* ATCC 25923 bakterilerine karşı istatiksel olarak farklıdır (P value < 0.05).

Minimum inhibisyon konsantrasyonu ve minimum bakterisidal konsantrasyonlara ait istatistiksel analiz grup verileri normal dağılmadığından istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizinin parametrik olmayan test karşılığı olan Kruskal-Wallis test ile yapılmıştır. Buna göre *S.aureus* ATCC 25923'e karşı ekstrakt ve formülasyonun boş lipozoma göre antimikrobiyal etkisinin olduğu ve ofloksasinin MİK değerinin ekstrakt ve formülasyonun MİK değerinden istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur (P value < 0.05). *S.aureus* ATCC 25923'e karşı formülasyonun MİK değerinin ekstraktın MİK değerinden istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur (P value <0.05) bu da formülasyonun ekstrakta kıyasla daha az konsantrasyonla daha yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğunu kanıtlamaktadır.

Ekstrakt ve formülasyonun *E.coli* ATCC 25922'ye karşı boş lipozomdan farklı olduğu ve antimikrobiyal etkisi olduğu bulunmuştur (P value <0.05). Ekstrakt ve formülasyonun MİK değerlerinin ofloksisinin MİK değerinden istatistiksel olarak farklı olduğu (P value <0.05), ekstrakt ve formülasyonun MİK değerlerinin istatistiksel olarak aynı grupta olduğu bulunmuştur (P value > 0.05). Bu da ekstrakt ve formülasyonun *E.coli* ATCC 25922'ye karşı MİK değerlerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olmadığını göstermektedir.

Her iki bakterinin ekstrakt MBK değerleri istatistiksel olarak farklıdır. Aynı şekilde her iki bakterinin formülasyon MBK değerleri de istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P value <0.05). *S.aureus* ATCC 25923'e karşı ekstrakt ve formülasyon MBK değerleri aynı gruptadır. MİK değerleri MBK değerlerinden istatistiksel açıdan farklı değildir. *E.coli* ATCC 25922'ye karşı ekstrakt ve formülasyon MBK değerleri aynı gruptadır. MİK değerlerinden istatistiksel açıdan farklı değildir (P value > 0.05).

Ekstrakt ve formülasyonun A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki IC50 değerleri negatif kontrole göre tek yönlü varyans analizi ve HSD test ile değerlendirilmiştir ve IC50 değerlerinin birbirlerinden ve negatif kontrolden istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur (P value < 0.05).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Formülasyonun SEM görüntülerinde ikinci homojenizasyondan elde edilen lipozomların ölçek ve yakınlaştırma oranına bakıldığında ilk homojenizasyondan elde edilen lipozomlara göre daha küçük olduğu gözlenmiştir.

Ekstrakt ve formülasyonun antimikrobiyal etkileri karşılaştırıldığında, formülasyon MİK değerinin ekstrakt MİK değerine göre *S.aureus* ATCC 25923’de 2 kat daha az konsantrasyonda bakteri gelişimini >90 inhibe ettiği bulunmuştur. Diğer yandan *E.coli* ATCC 25922’ye karşı ekstrakt ve formülasyon MİK değerlerinin MBK değerleriyle aynı olması (MİK = MBK = 93.75 mg/mL) ekstrakt ve formülasyonun etki gücünün *S.aureus* ATCC 25923’e göre *E.coli* ATCC 25922’de daha yüksek olduğunu göstermektedir. Antimikrobiyal etki açısından lipozomal formülasyonun diğer bakteri ve mantar suşlarına karşı etkisi denenerek mikroorganizma türüne göre antimikrobiyal etki profili çıkartılabileceği öngörülmektedir.

Sitotoksosite açısından A549’da ekstraktın daha etkili olduğu, sağlıklı BEAS-2B hücrelerinde ekstrakta göre yüksek IC50 değeri ile formülasyonun ekstrakta kıyasla sitotoksitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum hücresel çalışmalarda kullanılan etken maddelerin yüksek toksisiteleri ile hedef olmayan sağlıklı hücreleri hasara uğratıp apoptoza gitmesini ya da genetik hasarla sonuçlanmasını engelleyeceği için lipozomal formülasyonların bu çalışmalarda kullanımının avantajlı olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., & Hassani, A.** (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L, *EXCLI journal*, 13, 772.
- Abu-Shanab, B., Adwan, G. M., Jarrar, N., Abu-Hijleh, A. & Adwan, K.** (2007). Antibacterial activity of four plant extracts used in Palestine in folkloric medicine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Turkish Journal of Biology*, 30(4), 195-198.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei M., Kouhi, M. & Nejati-Koshki, K.** (2013). Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale research letters*, 8(1), 1-9.
- Anwekar, H., Patel, S. & Singhai, A. K.** (2011). Liposome-as drug carriers, *International journal of pharmacy & life sciences*, 2(7), 945-951.
- Aslantürk, Ö. S.** (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *InTech* (Vol. 2, p. 64). Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages>.
- Astani, A., Reichling, J. & Schnitzler, P.** (2012). *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro, *Chemotherapy*, 58(1), 70-77.
- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibensouda, S. K.** (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Banerjee, R.** (2001). Liposomes: applications in medicine. *Journal of Biomaterials applications*, 16(1), 3-21.
- Bangham, A. D.** (1961). A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids, *Nature*, 192(4808), 1197-1198.
- Baranauskaite, J., Duman, G., Corapcioğlu, G., Baranauskas, A., Taralp, A., Ivanauskas, L. & Bernatoniene, J.** (2018). Liposomal incorporation to improve dissolution and stability of rosmarinic acid and carvacrol extracted from *Oregano* (*O. onites* L.), *BioMed research international*, 2018, 1-10.
- Barba, A. A., Bochicchio, S., Dalmoro, A. & Lamberti, G.** (2019). Lipid delivery systems for nucleic-acid-based-drugs: From production to clinical applications, *Pharmaceutics*, 11(8), 360.
- Barenholz, Y. & Amselem, S.** (1979). A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes)-french press, *FEBS letters*, 99(1), 210-214.

- Barnadas-Rodríguez, R. & Sabés, M.** (2001). Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer, *International journal of pharmaceutics*, 213(1-2), 175-186.
- Baskararaj, S., Panneerselvam, T., Govindaraj, S., Arunachalam, S., ... & Kunjiappan, S.** (2020). Formulation and characterization of folate receptor-targeted PEGylated liposome encapsulating bioactive compounds from *Kappaphycus alvarezii* for cancer therapy, *3 Biotech*, 10(3), 1-18.
- Batzri, S. & Korn, E. D.** (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 298(4), 1015-1019.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M.** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R. & Brandl, M.** (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics, *International journal of pharmaceutics*, 223(1-2), 55-68.
- Bergstrand, N., Arfvidsson, M. C., Kim, J. M., Thompson, D. H. & Edwards, K.** (2003). Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes, *Biophysical chemistry*, 104(1), 361-379.
- Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N. & Leuenberger, H.** (2005). In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application, *International journal of pharmaceutics*, 296(1-2), 44-54.
- Bopp, S. K. & Lettieri, T.** (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line, *BMC pharmacology*, 8(1), 1-11.
- Buboltz, J. T. & Feigenson, G. W.** (1999). A novel strategy for the preparation of liposomes: rapid solvent exchange, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1417(2), 232-245.
- Grazia Calvagno, M., Celia, C., Paolino, D., Cosco, D., Iannone, M., Castelli, F., Patrizia, D. & Fresta, M.** (2007). Effects of lipid composition and preparation conditions on physical-chemical properties, technological parameters and in vitro biological activity of gemcitabine-loaded liposomes, *Current drug delivery*, 4(1), 89-101.
- Canadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., ... & Čanadanović, V.** (2008). Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts, *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 133-143.
- Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E. & Nastruzzi, C.** (2016). Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors, *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
- Casillas, Y., Avelar, V., Urias-Cordero, A., Fuentes, M. & Skouta, R.** (2015). Evaluating the Antioxidant Activity of *Melissa Officinalis* Via Colorimetric Assays to Assess in vitro studies of Neuroblastoma, *Work*

With A Scientist Program Final Presentation, El Paso, Texas, USA : July 25.

- Charcosset, C., Juban, A., Valour, J. P., Urbaniak, S. & Fessi, H.** (2015). Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices, *Chemical engineering research and design*, 94, 508-515.
- Chuang, S. Y., Lin, C. H., Huang, T. H. & Fang, J. Y.** (2018). Lipid-based nanoparticles as a potential delivery approach in the treatment of rheumatoid arthritis, *Nanomaterials*, 8(1), 42.
- CLSI clinical and laboratory standards institute methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** (2006) PA, USA: CLSI (M7-A7).
- Cui, H., Zhao, C. & Lin, L.** (2015). The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu, *Food Control*, 56 (2015), 128-134.
- Cullis, P. R., Mayer, L. D., Bally, M. B., Madden, T. D. & Hope, M. J.** (1989). Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications, *Advanced drug delivery reviews*, 3(3), 267-282.
- Cunha, F., Tintino, S. R., Figueredo, F., Barros, L., Duarte, A. E., Vega Gomez, M. C., ... & Franco, J.** (2016). HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*, *Pharmaceutical biology*, 54(9), 1664-1670.
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J. & Brandelli, A.** (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides, *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), 284-292.
- Dave, V., Gupta, A., Singh, P., Gupta, C., Sadhu, V. & Reddy, K. R.** (2019). Synthesis and characterization of celecoxib loaded PEGylated liposome nanoparticles for biomedical applications, *Nano-Structures & Nano-Objects*, 18, 100288.
- De Ciriano, M. G. I., Rehecho, S., Calvo, M. I., Caverio, R. Y., ... & Ansorena, D.** (2010). Effect of lyophilized water extracts of *Melissa officinalis* on the stability of algae and linseed oil-in-water emulsion to be used as a functional ingredient in meat products, *Meat Science*, 85(2), 373-377.
- De Sousa, A. C., Gattass, C. R., Alviano, D. S., ... & Alves, P. B.** (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(5), 677-681.
- Deamer, D. & Bangham, A. D.** (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 443(3), 629-634.
- Dipali, S. R., Kulkarni, S. B. & Betageri, G. V.** (1996). Comparative study of separation of non-encapsulated drug from unilamellar liposomes by various methods, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 48(11), 1112-1115.

- Dua, J. S., Rana, A. C. & Bhandari, A. K.** (2012). Liposome: methods of preparation and applications, *International Journal of Pharmaceutical Studies and Researchs*, 3(2), 14-20.
- Dwivedi, C. & Verma, S.** (2013). Review on preparation and characterization of liposomes with application, *Int. J. Sci. Innov. Res*, 2, 486-508.
- Edwards, K. A. & Baeumner, A. J.** (2006). Analysis of liposomes, *Talanta*, 68(5), 1432-1441.
- Encalada, M. A., Hoyos, K. M., Rehecho, S., Berasategi, I., ... & Calvo, M. I.** (2011). Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line, *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 328-334.
- Engel, J. B., Heckler, C., Tondo, E. C., Daroit, D. J. & da Silva Malheiros, P.** (2017). Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. *International journal of food microbiology*, 252, 18-23.
- Fotakis, G. & Timbrell, J. A.** (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology letters*, 160(2), 171-177.
- Fournier, E., Dufresne, M. H., Smith, D. C., Ranger, M. & Leroux, J. C.** (2004). A novel one-step drug-loading procedure for water-soluble amphiphilic nanocarriers, *Pharmaceutical research*, 21(6), 962-968.
- Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S. & Ollivon, M.** (2003). Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, *Journal of biochemical and biophysical methods*, 56(1-3), 189-217.
- Gregoriadis, G. & Ryman, B. E.** (1972). Fate of protein-containing liposomes injected into rats: An approach to the treatment of storage diseases, *European journal of biochemistry*, 24(3), 485-491.
- Gomez-Hens, A. & Fernandez-Romero, J. M.** (2006). Analytical methods for the control of liposomal delivery systems, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(2), 167-178.
- Hassan, R. A., Abotaleb, S. T., Hamed, H. B. & Eldeen, M. S.** (2019). Antioxidant and antimicrobial activities of *Melissa officinalis* L.(lemon balm) extracts, *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 10(9), 183-187.
- Himanshu, A., Sitasharan, P. & Singhai, A. K.** (2011). Liposomes as drug carriers, *IJPLS*, 2(7), 945-951.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G. & Cullis, P. R.** (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 812(1), 55-65.
- Hunter, D. G. & Frisken, B. J.** (1998). Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles, *Biophysical journal*, 74(6), 2996-3002.

- Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M. M. & Jahanban-Esfahlan, R.** (2015). Anti proliferative properties of *Melissa officinalis* in different human cancer cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(14), 5703-5707.
- Javadi, B. & Emami, S. A.** (2015). Avicenna's contribution to mechanisms of cardiovascular drugs, *Iranian journal of basic medical sciences*, 18(8), 721.
- Jiskoot, W., Teerlink, T., Beuvery, E. C. & Crommelin, D. J.** (1986). Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. *Pharmaceutisch Weekblad*, 8(5), 259-265.
- Kallinteri, P., Fatouros, D., Klepetsanis, P. & Antimisiaris, S. G.** (2004). Arsenic trioxide liposomes: encapsulation efficiency and in vitro stability, *Journal of liposome research*, 14(1-2), 27-38.
- Kamdem, J. P., Adeniran, A., Boligon, A. A., Klimaczewski, C. V., ... & Athayde, M. L.** (2013). Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection, *Industrial Crops and Products*, 51, 26-34.
- Kanášová, M. & Nesměrák, K.** (2017). Systematic review of liposomes' characterization methods, *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 148(9), 1581-1593.
- Kataria, S., Sandhu, P., Bilandi, A., Akanksha, M. & Kapoor, B.** (2011). Stealth liposomes: a review, *International journal of research in ayurveda & pharmacy*, 2(5), 1534-1538.
- Kastner, E., Kaur, R., Lowry, D., Moghaddam, B., Wilkinson, A. & Perrie, Y.** (2014). High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization, *International journal of pharmaceuticals*, 477(1-2), 361-368.
- Kikuchi, H., Yamauchi, H. & Hirota, S.** (1994). A polyol dilution method for mass production of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 4(1), 71-91.
- Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F. & Gulcin, I.** (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), 217-222.
- Krieg, A. M.** (2001). From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 11(3), 181-188.
- Kurzrock, R. & Li, L.** (2005). Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis, *Journal of Clinical Oncology*, 23(16_suppl), 4091-4091.
- Lagacé, J., Dubreuil, M. & Montplaisir, S.** (1991). Liposome-encapsulated antibiotics: preparation, drug release and antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of microencapsulation*, 8(1), 53-61.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C. & Fessi, H.** (2012). Preparation, characterization and applications of

- liposomes: state of the art, *Journal of colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147-168.
- Lasic, D. D.** (1993a). Kinetic and thermodynamic effects in the formation of amphiphilic colloidal particles, *Journal of Liposome Research*, 3(2), 257-273.
- Lasic, D. D.** (1993b). *Liposomes: from physics to applications*. Oxford, UK: Elsevier.
- Lasic, D. & Barenholz, Y.** (1996). *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*. New York, USA: CRC Press.
- Li, L., Braiteh, F. S. & Kurzrock, R.** (2005). Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis, *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(6), 1322-1331.
- Li, S. D. & Huang, L.** (2006). Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide and small interference RNA into lung cancer cells, *Molecular pharmaceutics*, 3(5), 579-588.
- Low, W. L., Martin, C., Hill, D. J. & Kenward, M. A.** (2013). Antimicrobial efficacy of liposome-encapsulated silver ions and tea tree oil against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, *Letters in applied microbiology*, 57(1), 33-39.
- Luykx, D. M., Peters, R. J., van Ruth, S. M. & Bouwmeester, H.** (2008). A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8231-8247.
- Mabrouki, H., Duarte, C. M. M. & Akretche, D. E.** (2018). Estimation of Total Phenolic Contents and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of *Melissa officinalis* L., *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7), 3349-3357.
- Magalhães, D. B., Castro, I., Lopes-Rodrigues, V., Pereira, J. M., Barros, L., ... & Vasconcelos, M. H.** (2018). *Melissa officinalis* L. ethanolic extract inhibits the growth of a lung cancer cell line by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis, *Food & function*, 9(6), 3134-3142.
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Mozafari, M. R., Gaiani, C. & Linder, M.** (2011). Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies, *Current Nanoscience*, 7(3), 436-452.
- Martí, M., Rodríguez, R., Carreras, N., Lis, M., Valldeperas, J., Coderch, L. & Parra, J. L.** (2012). Monitoring of the microcapsule/liposome application on textile fabrics, *Journal of the Textile Institute*, 103(1), 19-27.
- Martinotti, S. & Ranzato, E.** (2019). Scratch wound healing assay. New York, USA: Springer.
- Mathai, J. C. & Sitaraman, V.** (1987). Preparation of large uni-lamellar liposomes by the ether injection method and evaluation of the physical integrity by osmometry, *Biochemical education*, 15(3), 147-149.

- Mayer, L. D., Bally, M. B., Hope, M. J. & Cullis, P. R.** (1986). Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes, *Chemistry and physics of lipids*, 40(2-4), 333-345.
- Mayer, L. D., Hope, M. J. & Cullis, P. R.** (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 858(1), 161-168.
- Mazzanti, G., Battinelli, L., Pompeo, C., Serrilli, A. M., Rossi, R., Sauzullo, I., Mengoni, F. & Vullo, V.** (2008). Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on Herpes simplex virus type 2 replication, *Natural product research*, 22(16), 1433-1440.
- Meryemoğlu, B., Özsel, B. K. & Niş, Berna.** (2020) A research on antioxidant activity evaluation of waste lignocellulosic biomass: optimization using response surface methodology, *Cumhuriyet Science Journal*, 41(3), 594-601.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M. & Simin, N.** (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L.(Lamiaceae) essential oil, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(9), 2485-2489.
- Miraj, S., Azizi, N. & Kiani, S.** (2016). A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L, *Der Pharmacia Lettre*, 8(6), 229-237.
- Miraj, S., Kopaei, R. & Kiani, S.** (2017). *Melissa officinalis* L: A Review study with an antioxidant prospective, *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(3), 385-394.
- Moacă, E. A., Farcaş, C., Ghiţă, A., Coricovac, D., Popovici, R., ... & Avram, Ş.** (2018). A comparative study of *Melissa officinalis* leaves and stems ethanolic extracts in terms of antioxidant, cytotoxic, and antiproliferative potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Mohammadpour Dounighi, N., Eskandari, R., Avadi, M. R., Zolfagharian, H., Mir Mohammad Sadeghi, A., & Rezayat, M.** (2012). Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system, *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 18(1), 44-52.
- Morano, J. K., Martin, F. J. & Woodle, M.** (1990). *U.S. Patent No. 4,927,637*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mozafari, M. R.** (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711.
- Mozafari, M. R. & Mortazavi, S. M.** (2005). *Nanoliposomes: from fundamentals to recent developments*. In S. M. Mortazavi (Ed.), Oxford (pp.79-87). UK: Trafford Publishing Ltd.

- Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E. & Singh, H.** (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.
- Naseri, N., Valizadeh, H. & Zakeri-Milani, P.** (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 305.
- Onivogui, G., Zhang, H., Mlyuka, E., Diaby, M. & Song, Y.** (2014). Chemical composition, nutritional properties and antioxidant activity of monkey apple (*Anisophyllea laurina* R. Br. ex Sabine), *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(6), 281-287.
- Padamwar, M. N. & Pokharkar, V. B.** (2006). Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability, *International journal of pharmaceutics*, 320(1-2), 37-44.
- Panahi, Y., Farshbaf, M., Mohammadhosseini, M., Mirahadi, M., Khalilov, R., Saghfi, S. & Akbarzadeh, A.** (2017). Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(4), 788-799.
- Papoti, V. T., Totomis, N., Atmatzidou, A., Zinoviadou, K., Androulaki, A., Petridis, D. & Ritzoulis, C.** (2019). Phytochemical content of *Melissa officinalis* L. herbal preparations appropriate for consumption, *Processes*, 7(2), 88.
- Pastorino, F., Mumbengegwi, D. R., Ribatti, D., Ponzoni, M. & Allen, T. M.** (2008). Increase of therapeutic effects by treating melanoma with targeted combinations of c-myc antisense and doxorubicin, *Journal of controlled release*, 126(1), 85-94.
- Patel, S. S.** (2006). Liposome: A versatile platform for targeted delivery of drugs, *Pharmainfo. net*, 4(5), 1-5.
- Patil S. G., Gattani S. G., Gaud R. S., Surana S. J., Dewani S. P. & Mahajan H. S.** (2005). *The Pharma Review*, 18(3), 53-58
- Patil, Y. P. & Jadhav, S.** (2014). Novel methods for liposome preparation, *Chemistry and physics of lipids*, 177, 8-18.
- Pattni, B. S., Chupin, V. V. & Torchilin, V. P.** (2015). New developments in liposomal drug delivery, *Chemical reviews*, 115(19), 10938-10966.
- Pick, U.** (1981). Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures, *Archives of biochemistry and biophysics*, 212(1), 186-194.
- Pradhan, B., Kumar, N., Saha, S. & Roy, A.** (2015). Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application, *Journal of Applied Pharmaceutical Research*, 3(3), 01-08.
- Prathyusha, K., Muthukumaran, M. & Krishnamoorthy, B.** (2013). Liposomes as targetted drug delivery systems present and future prospectives: A review, *Journal of drug delivery and therapeutics*, 3(4), 195-201.

- Rabbani, M., Etemadifar, Z., Karamifard, F. & Borhani, M. S.** (2016). Assessment of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and *Lawsonia inermis* extracts against some bacterial pathogens, *Comparative Clinical Pathology*, 25(1), 59-65.
- Ramana, L. N., Sethuraman, S., Ranga, U. & Krishnan, U. M.** (2010). Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine, *Journal of biomedical science*, 17(1), 1-9.
- Rempe, C. S., Burris, K. P., Lenaghan, S. C. & Stewart Jr, C. N.** (2017). The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics, *Frontiers in microbiology*, 8, 422.
- Reza Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C.** (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology, *Journal of liposome research*, 18(4), 309-327.
- Riaz, M.** (1996). Liposome preparation method, *Pak J Pharm Sci*, 9(1):65–77.
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., ...& Yang, Z.** (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review, *International journal of molecular sciences*, 19(1), 195.
- Reimer, L.** (1998). *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. New York, USA: Springer Publishing.
- Saroglou, V., Hatziantoniou, S., Smyrniotakis, M., Kyrikou, I., ... & Demetzos, C.** (2006). Synthesis, liposomal formulation and thermal effects on phospholipid bilayers of leuprolide, *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 12(1), 43-50.
- Scherphof, G. & Damen, J.** (1984). Interactions of liposomes with plasma proteins. In G. Gregoriadis (Ed.), *Liposome Technology* (Vol. 3, pp. 205-224). Florida : CRC Press
- Schieren, H., Rudolph, S., Finkelstein, M., Coleman, P. & Weissmann, G.** (1978). Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 542(1), 137-153.
- Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A. & Reichling, J.** (2008). *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses, *Phytomedicine*, 15(9), 734-740.
- Sforzi, J., Palagi, L. & Aime, S.** (2020). Liposome-Based Bioassays, *Biology*, 9(8), 202.
- Shakeri, A., Sahebkar, A. & Javadi, B.** (2016). *Melissa officinalis* L.–A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Journal of ethnopharmacology*, 188, 204-228.
- Silva, R., Ferreira, H., Little, C. & Cavaco-Paulo, A.** (2010). Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation, *Ultrasonics sonochemistry*, 17(3), 628-632.

- Soltanian, S., Mohamadi, N., Rajaei, P., Khodami, M. & Mohammadi, M.** (2019). Phytochemical composition, and cytotoxic, antioxidant, and antibacterial activity of the essential oil and methanol extract of *Semenovia suffruticosa*, *Avicenna journal of phytomedicine*, 9(2), 143.
- Son, Y. J., Park, J. E., Kim, J., Yoo, G. & Nho, C. W.** (2021). The changes in growth parameters, qualities, and chemical constituents of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) cultivated in three different hydroponic systems, *Industrial Crops and Products*, 163(2021), 113313.
- Sot, J., Aranda, F. J., Collado, M. I., Goni, F. M. & Alonso, A.** (2005). Different effects of long-and short-chain ceramides on the gel-fluid and lamellar-hexagonal transitions of phospholipids: a calorimetric, NMR, and x-ray diffraction study, *Biophysical journal*, 88(5), 3368-3380.
- Spyratou, E., Mourelatou, E. A., Makropoulou, M. & Demetzos, C.** (2009). Atomic force microscopy: a tool to study the structure, dynamics and stability of liposomal drug delivery systems, *Expert opinion on drug delivery*, 6(3), 305-317.
- Stone, V., Johnston, H. & Schins, R. P.** (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations, *Critical reviews in toxicology*, 39(7), 613-626.
- Sulkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K. & Sulkowska, A.** (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability, *Journal of molecular structure*, 744, 737-747.
- Suschke, U., Sporer, F., Schnee, J., Geiss, H. K. & Reichling, J.** (2007). Antibacterial and cytotoxic activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citriodora* (Beck.) Balb. and *Melissa officinalis* L. essential oils, *Natural Product Communications*, 2(12), 1277-1286.
- Szoka, F. & Papahadjopoulos, D.** (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proceedings of the national academy of sciences*, 75(9), 4194-4198.
- Szoka Jr, F. & Papahadjopoulos, D.** (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Annual review of biophysics and bioengineering*, 9(1), 467-508.
- Tantry, M. A., Bhat, G. A., Idris, A., Dar, J. A., Yousef Al Omar, S., ... & Shawl, A. S.** (2014). Sulfated triterpenes from Lemon balm, *Helvetica Chimica Acta*, 97(11), 1497-1506.
- Traïkia, M., Warschawski, D. E., Recouvreux, M., Cartaud, J. & Devaux, P. F.** (2000). Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance, *European Biophysics Journal*, 29(3), 184-195.
- Trif, M., Moldovan, L., Moisei, M., Craciunescu, O. & Zarnescu, O.** (2008). Liposomes-entrapped chondroitin sulphate: ultrastructural characterization and in vitro biocompatibility. *Micron*, 39(7), 1042-1045.

- Tometri, S. S., Ahmady, M., Ariaii, P. & Soltani, M. S.** (2020). Extraction and encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nano-liposome and its effect on oxidative, microbial, bacterial and sensory properties of minced beef, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3333-3344.
- Ulrich, A. S.** (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles, *Bioscience reports*, 22(2), 129-150.
- van Balen, G. P., Martinet, C. A. M., Caron, G., Bouchard, G., Reist, M., Carrupt, P. A., Fruttero, R., Gasco, A. & Testa, B.** (2004). Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications, *Medicinal research reviews*, 24(3), 299-324.
- Van Hoogevest, P. & Wendel, A.** (2014). The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients, *European journal of lipid science and technology*, 116(9), 1088-1107.
- Vatan, Ö.** (2019). Rosmarinik Asidin Cisplatine Karşı Antisitetoksik ve Antigenotoksik Etkisinin A549 ve Beas-2B Hücre Hatlarında Araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 45(3), 263-270.
- Vemuri, S. & Rhodes, C. T.** (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70(2), 95-111.
- Vuillemard, J. C.** (1991). Recent advances in the large-scale production of lipid vesicles for use in food products: microfluidization, *Journal of microencapsulation*, 8(4), 547-562.
- Wagner, A. & Vorauer-Uhl, K.** (2011). Liposome technology for industrial purposes, *Journal of drug delivery*, 2011, 1-9.
- Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S. J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H. & Sauer, S.** (2015). Melissa officinalis extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species, *Phytomedicine*, 22(2), 262-270.
- Williams, T.** (1970). Gel permeation chromatography: A review, *Journal of Materials Science*, 5(9), 811-820.
- Woodle, M. C. & Papahadjopoulos, D.** (1989). Liposome preparation and size characterization, *Methods in enzymology*, 171, 193-217.
- Wölbling, R. H. & Leonhardt, K.** (1994). Local therapy of herpes simplex with dried extract from *Melissa officinalis*, *Phytomedicine*, 1(1), 25-31.
- Yang, G., Chen, S. & Zhang, J.** (2019). Bioinspired and biomimetic nanotherapies for the treatment of infectious diseases, *Frontiers in pharmacology*, 10 (2019), 751.
- Yang, S., Liu, W., Liu, C., Liu, W., Tong, G., Zheng, H. & Zhou, W.** (2012). Characterization and bioavailability of vitamin C nanoliposomes prepared by film evaporation-dynamic high pressure microfluidization, *Journal of dispersion science and technology*, 33(11), 1608-1614.

- Yamauchi, M., Tsutsumi, K., Abe, M., Uosaki, Y., Nakakura, M. & Aoki, N.** (2007). Release of drugs from liposomes varies with particle size, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(5), 963-966.
- Yu, B., Lee, R. J. & Lee, L. J.** (2009). Microfluidic methods for production of liposomes, *Methods in enzymology*, 465, 129-141.
- Zhao, L., Du, J., Duan, Y., Zhang, H., Yang, C., Cao, F. & Zhai, G.** (2012). Curcumin loaded mixed micelles composed of Pluronic P123 and F68: preparation, optimization and in vitro characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 97, 101-108.
- Zylberberg, C. & Matosevic, S.** (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape, *Drug Delivery*, 23(9), 3319-3329.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Nagihan Nizam

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2016, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- **Yüksek Lisans** : 2021, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **The Antimicrobial Activity of *Melissa officinalis* L. Encapsulated in Liposomes**
Nagihan Nizam, Münevver Müge Çağal (SÖZLÜ SUNUM)- International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry, 16-18 Aralık 2020, Ankara.

DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **The Antimicrobial Activity of Extract of *Pistacia Terebinthus* Incorporated with Nanoliposome Prepared by Dynamic High-Pressure Microfluidization**
Ali Yılmaz, Nagihan Nizam, Gülelgül Duman, Fikrettin Şahin, Münevver Müge Çağal (POSTER SUNUMU), 2nd Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (2. EBAT) Congress, 26-29 Ekim 2019, Antalya.
- **Eroglu, O., Kaya, H., Celik, E. G., Celen, M., Korkut, E. & Nizam, N. (2019).** Triple Effect of Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Propranolol on Cell Survival on MCF-7 Breast Cancer Cell Line, *Journal of Biosciences and Medicines*, 7(2), 74-85.
- **Investigation of Cytotoxic Effect of Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Propranolol and Triple Combined Treatment in MCF-7 Breast Cancer Cell Line.**
Onur Eroğlu, Esin Güvenir Çelik, Merve Çelen, Hacer Kaya, M. Ali Nalbant, Elif

Korkut, Nagihan Nizam (POSTER SUNUMU), 4th International BAU Drug Design Congress, 13-15 Ekim 2016, İstanbul.

