

**ANTİMİKROBİYAL PEPTİT VE ANTİBİYOTİK
KOMBİNASYONU İÇEREN LİPOZOM
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF LIPOSOME FORMULATIONS
CONTAINING COMBINATION OF ANTIMICROBIAL
PEPTIDE AND ANTIBIOTIC**

DİLEK GÜNGÖR

PROF. DR. İPEK EROĞLU

Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

ÖZET

ANTİMİKROBİYAL PEPTİT VE ANTİBİYOTİK KOMBİNASYONU İÇEREN LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Dilek GÜNGÖR

Doktora, NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. İpek EROĞLU

2024, 154 sayfa

Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan etkin maddeler, antimikrobiyal terapötikler olarak adlandırılırlar. Son yıllarda antimikrobiyal terapötiklere karşı gelişen direnç nedeniyle, alternatif olarak antimikrobiyal peptit (AMP)'ler kullanılmaya başlanmıştır. AMP'ler hücre membranı ile etkileşerek, hızlı bir şekilde bakteri ölümüne neden olmaktadır. Lipozom formülasyonları hücre membranına benzer yapıları nedeniyle dermal penetrasyonu artırırlar. Bu amaçla, AMP yüklü lipozom formülasyonları ile penetrasyonun artırılması ve etkin maddenin çevresel faktörlerden korunması hedeflenmiştir. Nisin, Gram pozitif ve Gram negatif patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip bir peptittir. Özellikle dermal enfeksiyonların en yaygın patojeni olan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)'un inhibisyonunda oldukça etkilidir.

Antimikrobiyal ilaçlar tek başına kullanıldığında direnç gelişimine neden olmakta ve uzun süren tedavi boyunca etkinlik bakımından yetersiz kalmaktadır. AMP ve ilaç kombinasyon yaklaşımları ile direnç gelişimi olasılığının azaldığı ve klinik sonuçların anlamlı bir şekilde iyileştiği gözlenmiştir. Azitromisin (AZM), geniş spektrumlu makrolid grubu bir antibiyotik olup, düşük çözünürlük özelliklerine sahiptir. Ayrıca, *S. aureus*'un en fazla direnç geliştirdiği

antibiyotik olmasının yanısıra, oral yolla alındığında pek çok istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, enfeksiyon tedavisinde topikal uygulamasının bir avantaj olabileceği düşünülmüştür.

Tez çalışması kapsamında, ilk aşamada; Nisin ve AZM içeren lipozomlar farklı lipitler (Egg PC, Soy PC, Lipoid S100, Fosfolipon 90G, DPPC ve Lipoid S75) kullanılarak hazırlanmış ve karakterizasyon (partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri, morfolojik özellikler, enkapsülasyon etkinliği ve stabilite) çalışmaları yürütülmüştür. Optimize edilen formülasyon ile *in vitro* salım (IVRT), *ex vivo* permeasyon (IVPT) ve floresan mikroskop görüntüleme çalışmalarına geçilmiştir. Egg PC ve Lipoid S75 ile hazırlanan AZM yüklü lipozom formülasyonlarının (sırasıyla 127.5 ± 10.22 nm ve 88.13 ± 1.82 nm) homojen dağılım gösterdiği (PDI \sim 0.2) ve 1 ay boyunca stabil (\sim -30 mV) kaldığı belirlenmiştir. IVRT çalışmalarında 24. saatin sonunda Egg PC lipozomları için yaklaşık $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve Lipoid S75 lipozomları için $250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ AZM'nin salıverildiği gözlenmiştir. İkinci aşamada; optimize edilen lipozomların dermal hücre hatında (Epidermal Keratinosit-HaCat ve Human Dermal Fibroblast-HDF) biyoyumluluk analizleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda, kombine lipozomlarda biyoyumluluk artışı, formülasyonda yer alan nisin varlığına dayandırılmıştır. Üçüncü aşamada; lipozom formülasyonlarının deri ile etkileşimleri, insan kadavra derisinden izole edilen Stratum Corneum (SC), kullanılarak Kuartz Kristal Mikrobalans-Dissipasyon (QCM-D) tekniği ile değerlendirilmiştir. İlaç yüklü lipozomlarda, boş formülasyonlara kıyasla anlamlı bir kütle artışı (Δf) tespit edilmiştir. Nisin yüklü lipozomların, SC etkileşimi sonucunda yüzey viskoelastik (ΔD) özelliklerini arttırdığı saptanmıştır. Son aşamada ise; *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite ve biyofilm eradikasyon değerlendirmeleri yapılmıştır. Kombine lipozom formülasyonunun, serbest nisin ve AZM içeren kontrol çözeltisine kıyasla mikrobiyal inhibisyon zonunu arttırdığı belirlenmiştir. AZM içeren lipozom formülasyonları, serbest etkin madde içeren kontrollere kıyasla antibiyofilm etkiyi iyileştirmiştir.

Sonuç olarak, antimikrobiyal etkinlik ve güvenilirlik çalışmaları ile değerlendirilmiş nisin ve AZM yüklü kombine lipozom formülasyonları ile, sinerjik etkili ve yenilikçi bir

formülasyon geliştirilmiştir. Topikal formülasyonların insan kadavra derisi ile etkileşim mekanizmaları hakkında bilgi sağlayacak QCM-D analizi, yeni bir yöntem olarak ilk defa literatüre kazandırılmıştır. Bu teknik, özellikle nanoformülasyonların dermal etkileşim performanslarının, klinik öncesi ex-vivo çalışmalar ile değerlendirilmesinde önemli bir teknik olarak sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Nisin, Azitromisin, Lipozom, QCM-D, Antimikrobiyal aktivite.



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF LIPOSOME FORMULATIONS CONTAINING COMBINATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE AND ANTIBIOTIC

Dilek GÜNGÖR

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. İpek EROĞLU

2024, 154 pages

In the treatment of infections caused by microorganisms, active substances are referred to as antimicrobial therapeutics. Due to the increasing resistance to antimicrobial therapeutics in recent years, AMPs have emerged as an alternative. AMPs interact with the cell membrane, causing rapid bacterial death. Liposomal formulations, due to their structural similarity to cell membranes, enhance dermal penetration. Therefore, AMP-loaded liposomal formulations aim to increase penetration and protect the active substance from environmental factors. Nisin is a peptide with antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative pathogens. It is particularly effective in inhibiting *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), the most common pathogen in dermal infections. When used alone, antimicrobial drugs often lead to resistance development and show limited efficacy during prolonged treatments. Combination approaches involving AMPs and drugs have been shown to reduce the likelihood of resistance development and significantly improve clinical outcomes. AZM, a broad-spectrum macrolide antibiotic, has low solubility and is one of the antibiotics with the highest resistance rates developed by *S. aureus*. Additionally, oral administration of AZM often results in undesirable side effects, making its topical application advantageous in infection treatment.

In the first stage of this thesis study, liposomal formulations containing nisin and AZM were prepared using different lipids (Egg PC, Soy PC, Lipoid S100, Phospholipon 90G, DPPC and Lipoid S75). Characterization studies, including PS, PDI, ZP, morphological properties, encapsulation efficiency, and stability, were performed. With the optimized formulation, studies on *in vitro* release, *ex vivo* permeation, and fluorescence microscopy imaging were conducted. It was determined that AZM-loaded liposomes prepared with Egg PC and Lipoid S75 showed homogeneous distribution (127.5 ± 10.22 nm and 88.13 ± 1.82 nm, respectively, with $PDI \sim 0.2$) and remained stable (~ -30 mV) for 1 month. IVRT studies revealed that approximately $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ AZM was released from Egg PC liposomes, and $250 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ from Lipoid S75 liposomes after 24 hours. In the second stage, the biocompatibility of optimized liposomal formulations was analyzed using dermal cell lines (HaCat and HDF). Results indicated that the high biocompatibility of the combined liposomes was attributed to the presence of nisin. In the third stage, the interaction of liposomal formulations with the skin was evaluated using QCM-D technology, with the SC isolated from human cadaver skin. Drug-loaded liposomes showed a significant mass increase (Δf) compared to empty formulations. Nisin-loaded liposomes demonstrated increased surface viscoelastic properties (ΔD) upon interaction with the SC. Finally, antimicrobial activity and biofilm eradication against *S. aureus* were evaluated. The combined liposomal formulation showed increased microbial inhibition zones compared to control solutions containing free nisin and AZM. Additionally, AZM-loaded liposomal formulations demonstrated enhanced antibiofilm effects compared to controls containing free active substances.

In conclusion, synergistic and innovative nisin- and AZM-loaded liposomal formulations were developed, validated by antimicrobial efficacy and safety studies. QCM-D analysis, introduced for the first time, offers insight into the interaction of topical formulations with human cadaver skin. This technique is a key tool for assessing nanoformulations' dermal interactions in preclinical *ex vivo* studies.

Keywords: Nisin, Azithromycin, Liposome, QCM-D, Antimicrobial activity.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinin hazırlanmasında emeği geçen ve bana destek olan birçok kişi ve kuruma teşekkür etmek isterim.

Öncelikle, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İpek EROĞLU'na, tez sürecindeki rehberliği, bilgi ve tecrübelerini benimle cömertçe paylaştığı için en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi, akademik ve kişisel gelişimimde önemli bir rol oynamıştır.

TÜBİTAK 2219-A projesi kapsamında bir yıl boyunca Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunduğum Rutgers New Jersey Eyalet Üniversitesi Ernest Mario Eczacılık Fakültesi / Center for Dermal Research (CDR) / Laboratory for Drug Delivery (LDD) laboratuvarları yöneticisi Sayın Prof. Dr. Bozena Michniak-Kohn'a değerli desteğinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi, araştırmamın yönünü belirlememde ve çalışmalarımı derinleştirmemde önemli katkılar sağlamıştır.

Bu çalışmanın birçok bölümünün gerçekleşmesini mümkün kılan, TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (1059B142100498 numaralı proje) kapsamında sağlanan mali destek için TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Bu destek, araştırmamın kapsamlı bir şekilde yapılması, akademik gelişimime önemli katkılar sağlaması ve kültürler arası akademik iletişimimi arttırması noktasında önemli bir rol oynamıştır.

Çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Doç. Dr. Sakine TUNCAY TANRIVERDİ'ye ve Sayın Doç. Dr. Cem BAYRAM'a teşekkür ederim. Onların değerli geri bildirimleri ve önerileri, tezimin kalitesinin artmasında büyük katkı sağlamıştır.

Israrlarıma dayanamayıp tüm bilgi birikimini benimle paylaşan ve Rutgers Üniversitesi Laboratory for Biomaterials Research'de QCM-D ile çalışma fırsatı sunan Sayın Dr. Sanjeeva MURTHY'ye teşekkürlerimi sunarım. Onun katkıları, hazırlamış olduğumuz formülasyonların Stratum Corneum ile etkileşimini QCM-D ile belirleyebilecek güncel bir yöntemin oluşturulmasında büyük rol oynamıştır.

Rutgers Üniversitesi Laboratory for Biomaterials Science'da bana mikrobiyoloji ve floresan görüntüleme laboratuvarının kapılarını açan ve kendi laboratuvar üyelerinden ayırmayan Sayın Dr. Yong MAO'ya teşekkür ederim. Kendisi, laboratuvar çalışmalarımda gerekli olanakları sağlayarak araştırmamın ilerlemesine büyük destek olmuştur.

Tez çalışmamın mikrobiyoloji bölümünde sağladıkları değerli katkılar ve rehberlikleri için Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Ceren ÖZKUL KOÇAK'a ve Sayın Uzm Bio. Şeyma NİGİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım sırasında bilgisine ihtiyaç duyduğum her zaman, hem Türkiye'de yüzyüze hem de yurt dışında çevrimiçi olarak desteğini hiç esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya teşekkür ederim.

Rutgers Üniversitesi Center for Dermal Research laboratuvarı'na Poznan Üniversitesinden misafir araştırmacı olarak gelen ve tüm alçak gönüllülükleri ile benimle laboratuvar çalışmalarına katılan Sayın Prof. Dr. Jan MATYSIAK ve Sayın Prof. Hanna PIOTROWSKA-KEMPISTY'ya en içten teşekkürlerimi iletmek isterim. Onların iş birliği ve desteği, araştırmamın zenginleşmesine ve yeni öğrendiğim yöntemlerin pekişmesine büyük katkı sağlamıştır.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarım sırasında değerli deneyimlerini ve bilgilerini paylaşan Rutgers Üniversitesi Center for Dermal Research laboratuvarı üyelerine ve Rutgers Üniversitesi doktora öğrencileri Sayın Hana MOHD ve Sayın Nubul ALBAYATI'ye de teşekkür ederim. Onların yardımları ve destekleri, laboratuvara adaptasyonumu kolaylaştırmış ve tez çalışmalarımın başarılı bir şekilde ilerlemesine yardımcı olmuştur.

Araştırmamın Türkiye'de yapılan bölümünde, bana gerekli materyalleri ve olanakları sağlayan Sayın Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Ana Bilim Dalı çalışanlarına ve laboratuvar üyelerine teşekkür ederim.

Tezimin farklı aşamalarında bana yardımcı olan, fikirlerini ve eleştirilerini paylaşan tüm arkadaşlarıma ve meslektaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım. Özellikle doktora sürecine birlikte başladığımız değerli arkadaşım Gamze Kılıçerkan BAŞLAR'a, her zaman desteğini hissettirdiği, motive eden yaklaşımı ve bu süreçte yanımda olduğu için teşekkür ederim.

Son olarak,

Eğitim öğretim sürecimde desteklerini hiç esirgemeyen, sevgi dolu geniş aileme ve özel olarak da onların çocukları olmaktan hep onur duyduğum annem ve babama teşekkür ederim.

Hayatımın her sürecinde olduğu gibi tez sürecinde de destek olan, yurt dışında dahi beni yalnız bırakmayarak her zaman yanımda olduğunu hissettiren sevgili eşime en derin teşekkürlerimi sunarım.

Ve sevgili kızıma, varlığıyla bana büyük bir motivasyon kaynağı olduğu, şen kahkahaları ve sevgi dolu kucaklamalarıyla bana hayat enerjisi verdiği için teşekkür ederim.

Teşekkürlerimle,

Dilek GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER

	<u>Page</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Araştırmanın Amacı ve Kapsamı	6
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Deri ve Yapısı	8
2.2. Lipozomlar	9
2.3. Antimikrobiyal Peptitler	10
2.3.1. Nisin	11
2.4. Antibiyotikler	13
2.4.1. Azitromisin	14
2.5. Topikal Uygulama ve Kombine Tedavi Yaklaşımı	15
2.6. QCM-D	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	21
3.1. Materyaller.....	21
3.2. Yöntemler.....	24
3.2.1. Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	24
3.2.1.1. Çözünürlük Çalışmaları	24
3.2.1.2. Lipid-Su Dağılım Katsayısının Belirlenmesi (logP)	24
3.2.2. Miktar Tayini Çalışmaları ve Analitik Yöntem Validasyonu	25
3.2.2.1. Azitromisin için HPLC Yöntem Validasyonu.....	25

3.2.2.2. Nisin'in Spektrofotometrik Analizleri	28
3.2.2.3. Nisin'in HPLC yöntemi ile Analizi.....	29
3.2.3. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması	29
3.2.3.1. İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemi.....	30
3.2.3.2. Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi	32
3.2.4. Lipozom Formülasyonlarının Karakterizasyonu	34
3.2.4.1. Lipozomal Formülasyonların Morfolojik Karakterizasyonu	34
3.2.5. Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi.....	35
3.2.6. Lipozom Formülasyonlarının Stabilité Çalışmaları	36
3.2.7. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları (IVRT) ve Kinetik Değerlendirmeler	36
3.2.8. <i>İn Vitro</i> Permeasyon Çalışmaları (IVPT)	38
3.2.9. <i>Ex Vivo</i> Penetrasyon ve Floresan Mikroskop Görüntüleme Çalışmaları	39
3.2.10. Formülasyonların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi	41
3.2.11. Kuartz Kristal Mikrobals - Dissipasyon (QCM-D) Çalışmaları.....	41
3.2.12. Mikrobiyoloji Çalışmaları	44
3.2.12.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	44
3.2.12.2. Anti-biyofilm Aktivite Testi.....	45
3.2.13. İstatistiksel Analiz	46
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri ve Miktar Tayini için Analitik Yöntem Validasyonu	47
4.1.1. Azitromisin'in Çözünürlük ve Lipid-Su Dağılım Katsayısının Belirlenmesi	47
4.2. Azitromisin Miktar Tayini için HPLC Yöntem Validasyonu	48
4.2.1. Nisin Miktar Tayini için Yöntem Belirleme Çalışmaları.....	54
4.2.1.1. Bikinkoninik Asit Protein Analiz (BCA) Kiti	54
4.2.1.2. CBQCA Protein Miktar Tayin Kiti	56
4.2.1.3. Nisin Miktar Tayini için HPLC Yöntemi	57
4.3. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması.....	59
4.3.1. Lipozom Hazırlama Parametrelerinin Formülasyon Özellikleri Üzerine Etkisi.....	59

4.4. Lipozom Formülasyonlarının Karakterizasyonu	62
4.4.1. Lipozom Formülasyonlarının Morfolojik Karakterizasyonu.....	65
4.5. Lipozom Formülasyonlarının Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	68
4.6. Lipozom Formülasyonlarının Stabilitesi	70
4.7. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları (IVRT)	74
4.8. <i>İn Vitro</i> Permeasyon Çalışmaları (IVPT)	82
4.9. <i>Ex Vivo</i> Penetrasyon ve Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi.....	83
4.10.Lipozomların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi	90
4.11.Formülasyonlar ile SC etkileşiminin QCM-D ile incelenmesi	94
4.11.1. Yapıştırıcı Kalınlığının Optimizasyonu	95
4.11.2. SC'nin QCM-D sensörüne yapıştırılması	96
4.11.3. Altın Sensör ve Lipozom Formülasyonları ile Yapılan Ölçümler	97
4.11.4. SC ve Lipozom Formülasyonları ile Yapılan Ölçümler	102
4.12.Mikrobiyoloji Çalışmaları	105
5. YORUM	110
6. KAYNAKLAR	116

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Page</u>
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan malzemeler ve kimyasallar. 22
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan malzemeler ve kimyasallar. 23
Çizelge 3.3	AZM analizinde kullanılan cihaz ve kromatografik koşulları. 25
Çizelge 3.4	Nisinin HPLC analizi için sağlanan kromatografik koşullar 29
Çizelge 3.5	İnce tabaka hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozom formülasyonlarının bileşimi..... 32
Çizelge 3.6	Modifiye edilmiş, etanol enjeksiyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonların terkibi 33
Çizelge 4.1	AZM geri kazanım değerleri..... 50
Çizelge 4.2	AZM ölçümünün gün içi tekrarlanabilirlik verileri 51
Çizelge 4.3	AZM ölçümünün günler arası tekrarlanabilirlik verileri..... 52
Çizelge 4.4	Belirli zaman aralıklarında ölçüm yapılan AZM çözeltisinin stabilitesi 54
Çizelge 4.5	Lipozom Formülasyonlarında BCA kiti ile nisin analizi 55
Çizelge 4.6	Lipozom Formülasyonlarında CBQCA kiti ile nisin analizi 57
Çizelge 4.7	Nisin yüklü lipozom formülasyonlarının özellikleri üzerinde pH'nın etkileri(*n=3)..... 60
Çizelge 4.8	Farklı fosfolipidlerin AZM yüklü lipozom formülasyonlarının özellikleri üzerindeki etkileri (*n=3) 61
Çizelge 4.9	Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan Boş Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3)..... 63
Çizelge 4.10	Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan Nisin Yüklü Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3)..... 63

Çizelge 4.11	Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan AZM Yüklü Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3).....	64
Çizelge 4.12	Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan Kombine Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3).....	64
Çizelge 4.13	Nisin Yüklü Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliği.....	68
Çizelge 4.14	AZM Yüklü Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliği	69
Çizelge 4.15	Kombine Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliği	69
Çizelge 4.16	Lipozom Formülasyonlarının (Egg PC) +4°C’de karakterizasyon ve stabilite sonuçları.....	71
Çizelge 4.17	Lipozom Formülasyonlarının (Lipoid S75) +4°C’de karakterizasyon ve stabilite sonuçları	73
Çizelge 4.18	Formülasyonların salım kinetik modellerine ait veriler (salım hız sabiti (k) ve determinasyon katsayısı (r^2) değerleri)	81
Çizelge 4.19	Lipozom formülasyonlarının altın kuartz sensör ve SC kaplı altın kuartz sensör ile etkileşimi sonucu elde edilen Δf ve ΔD değerleri.	97
Çizelge 4.20	Agar kuyu difüzyon testi sonuçları	106
Çizelge 4.21	Kontroller ve lipozom formülasyonları için minimum inhibisyon konsantrasyonları	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Page</u>
Şekil 2.1 Nisin peptit yapısı	12
Şekil 2.2 AZM yapısı	15
Şekil 2.3 QCM-D çalışma prensibi	18
Şekil 3.1 İnce tabaka hidrasyon yöntemi dizayn ve uygulaması; a)Rotavapor b)İnce tabaka yapısı	30
Şekil 3.2 Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yönteminin Deney Düzenegi (a); Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ile Hazırlanan Örnekler (b)	34
Şekil 3.3 <i>In vitro</i> salım çalışmaları deney dizaynı	38
Şekil 3.4 Floresan mikroskop görüntüleme çalışmaları için numune hazırlığı(a); ECHO Revolve Mikroskop (b)	40
Şekil 3.5 Kadavra derisinden Stratum Corneum tabakasının izolasyonu	42
Şekil 3.6 SC ile modifiye edilmiş kuartz kristalin hazırlık adımları.....	42
Şekil 3.7 Kuartz sensör üzerine yapıştırılan SC tabakasının stabilitesi ve özellikleri	43
Şekil 4.1 AZM'nin 200-400 nm aralığındaki absorbansı	48
Şekil 4.2 AZM'ye ait kalibrasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.3 AZM standart çözelti (50 µg/mL) kromatogramı	52
Şekil 4.4 Hareketli faz kromatogramı	53
Şekil 4.5 Nisin yüklü lipozom formülasyonunun kromatogramı	53
Şekil 4.6 Nisinin BCA kiti ile yapılan analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi	55
Şekil 4.7 Nisinin CBQCA kiti ile yapılan analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi ...	56
Şekil 4.8 HPLC gradient yöntem ile elde edilen nisin çözeltisine ait kromatogram.....	58
Şekil 4.9 Boş lipozom formülasyonunun gradient HPLC ile elde edilen kromatogramı.....	58

Şekil 4.10	Lipozom Formülasyonlarına (Egg PC ile hazırlanan) ait TEM görüntüleri: a, boş lipozom formülasyonu; b, nisin yüklü lipozom formülasyonu; c, AZM yüklü lipozom formülasyonu; d, kombine lipozom formülasyonu	66
Şekil 4.11	Lipozom Formülasyonlarına (Lipoid S75 ile hazırlanan) ait TEM görüntüleri: a, boş lipozom formülasyonu; b, nisin yüklü lipozom formülasyonu; c, AZM yüklü lipozom formülasyonu; d, kombine lipozom formülasyonu	67
Şekil 4.12	Egg PC ile hazırlanan lipozomal formülasyonların <i>in vitro</i> ; a, nisin salım profili; b, nisin salım oranı (n=3)	75
Şekil 4.13	Egg PC ile hazırlanan lipozomal formülasyonların <i>in vitro</i> ; a, AZM salım profili; b, AZM salım oranı (n=3)	77
Şekil 4.14	Lipoid S75 ile hazırlanan lipozomal formülasyonların <i>in vitro</i> nisinin salım profili (n=6)	78
Şekil 4.15	Lipoid S75 ile hazırlanan lipozomal formülasyonların <i>in vitro</i> AZM salım profili (n=6)	79
Şekil 4.16	Lipoid S75-jel ile hazırlanan lipozomal formülasyonların <i>in vitro</i> AZM salım profili (n=6)	80
Şekil 4.17	Lipoid S75 ile hazırlanan formülasyonların kadavra derisinden <i>in vitro</i> AZM permeasyon profili (n=4)	82
Şekil 4.18	Lipoid S75 ile hazırlanan formülasyonlar ile IVPT sonunda AZM'nin kadavra derisinde birikimi (n=4)	83
Şekil 4.19	Formülasyon uygulanmayan ve floresan boyalar ile işaretli formülasyon uygulanan kadavra deri kesitinin floresan mikroskop görüntüsü	84
Şekil 4.20	Kontrol numunesi olarak kadavra derisinin floresan mikroskop ile elde edilen kesit görüntüsü ve kesit boyunca floresan şiddetinin yoğunluk profili	85

Şekil 4.21	İşaretli formülasyon uygulanan kadavra deri kesitinin floresan mikroskop görüntüsü ve deri kesit boyunca floresan şiddetinin yoğunluk profili	85
Şekil 4.22	İşaretli formülasyon uygulanmış ve uygulanmamış kadavra derisinin Z-Stack görüntüleme modunda elde edilen 3D görüntüleri	86
Şekil 4.23	İşaretli formülasyon uygulanmış ve uygulanmamış kadavra derisinden elde edilen 3D görüntünün merkez kesiti	86
Şekil 4.24	Projeksiyon yöntemiyle işlenen kontrol ve işaretli formülasyon uygulanan kadavra derisinin 3D görüntüsü	87
Şekil 4.25	Z eksenini boyunca SC'den dermis tabakasına doğru yeşil floresan şiddetinin: a,kontrol; b,formülasyon uygulanmış deri tabakası boyunca değişimi.....	88
Şekil 4.26	Z eksenini boyunca SC'den dermis tabakasına doğru kırmızı floresan şiddetinin: a,kontrol; b,formülasyon uygulanmış deri tabakası boyunca değişimi.....	89
Şekil 4.27	Boş lipozom formülasyonlarının HaCAT ve HDF hücre hatlarındaki biyoyumluluğu	90
Şekil 4.28	Lipozom formülasyonlarının HaCat hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi a) Nisin içeren formülasyonların ve nisin çözeltisinin b) AZM içeren formülasyonların ve AZM çözeltisinin * P<0.05.	91
Şekil 4.29	Lipozom formülasyonlarının insan dermal fibroblast hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi a) Nisin içeren formülasyonların ve nisin çözeltisinin b) AZM içeren formülasyonların ve AZM çözeltisinin *P<0.05.	93
Şekil 4.30	QCM-D ile elde edilen f (mavi) ve D (kırmızı) verilerinin zamana karşı değişimi.....	96
Şekil 4.31	QCM-D ile ölçülen boş lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi	99

Şekil 4.32	QCM-D ile ölçülen nisin yüklü lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi.....	100
Şekil 4.33	QCM-D ile ölçülen AZM yüklü lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi	101
Şekil 4.34	QCM-D ile ölçülen kombine lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi.....	102
Şekil 4.35	Kontroller ve lipozom formülasyonları için inhibisyon zonu. A) AZM kontrol ve AZM yüklü lipozom formülasyonu, B) Nisin kontrol ve Nisin yüklü lipozom formülasyonu, C) AZM-nisin kontrolü ve Kombine Lipozom Formülasyonu, D) Boş lipozom formülasyonu	105
Şekil 4.36	Antibiyofilm aktivitesi (<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ile önceden oluşturulmuş biyofilme karşı). (**** $p < 0.0001$, ** = $p < 0.01$, * $p < 0.05$).	108

SİMGELER VE KISALTMALAR

SC	: Stratum Corneum
AMP	: Antimikrobiyal Peptit
AZM	: Azitromisin
QCM-D	: Kuartz Kristal Mikrobalans-Dissipasyon
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	: Genel olarak Güvenli Kabul Edilen
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ECM	: Ekstraselüler Matriks
BHI	: Brain Heart Infüzyon
SLBs	: Desteklenmiş Lipid Çift Tabakalar
<i>f</i>	: Rezonans Frekansı
<i>D</i>	: Enerji Dağılımı
Δf	: Rezonans Frekans Değişimi
ΔD	: Enerji Dağılım Değişimi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RSD	: Göreceli Standart Sapma
STD	: Standart Sapma
AVG	: Ortalama
BCA	: Bikinkoninik Asit
Egg PC	: L- α -Fosfatidilkolin (%99, Egg)
Soy PC	: L- α -Fosfatidilkolin (%95 soybean)
Lipoid S100	: Fosfatidilkolin, (%94 soybean)

Fosfolipon 90G	: Fosfotidilkolin, (granül haline getirilmiş, %94, soybean)
Lipoid S75	: fosfotidilkolin (%70) içeren fosfolipid karışımı (soybean)
DPPC	: 1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glisero-3-fosfotidilkolin
PS	: Partikül Büyüklüğü
PDI	: Polidispersite İndeksi
ZP	: Zeta Potansiyel
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
IVPT	: <i>İn Vitro</i> Permeasyon Testi
IVRT	: <i>İn Vitro</i> Salım Testi
FITC	: Fluorescein İzotiyosiyanat
DiIC18	: Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
THF	: Tetrahidrofuran
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
MBEC	: Minimum Biyofilm Eredikasyon Konsantrasyonu
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
OD	: Optik Yoğunluk
HaCaT	: İnsan Keratinosit Hücre Hattı
HDF	: İnsan Dermal Fibroblast Hücre Hattı
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
EAA	: Eğri Altı Alan
GK	: Geri Kazanım
GD	: Gerçek Değer
BSA	: Sığır Serum Albumini
UPW	: Ultra Saf Su
<i>Staphylococcus aureus</i>	: <i>S. aureus</i>

LC-MS/MS

: *Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi*



1. GİRİŞ

Enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı mikroorganizmalar tarafından geliştirilen antibiyotik direnciyle mücadele etmek için bakteriyel direnç geliştiren mekanizmaların üstesinden gelen antimikrobiyal etkinliği arttırılmış formülasyonlara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Enfeksiyonlarla mücadelede en önemli silahlardan olan antibiyotiklerin bilinçsiz kullanıma bağlı olarak direnç geliştiren türlerin artmasına ve bu türlerin neden olduğu hastalıklarla mücadelenin zorlaşmasına neden olmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2018 yılında yayınladığı rapora göre; Avrupa bölgesindeki 45 ülke arasında Türkiye, %38.18 (1000 kişiye düşen tanımlanan günlük doz) ile en yüksek antibiyotik tüketimine sahip ülke konumundadır [1].

Deri vücudumuzu enfeksiyondan, dehidrasyondan, harici kimyasallardan ve fiziksel hasarlardan korumak için güçlü bir bariyer görevi sağlamaktadır [2, 3]. Ancak, virüs, bakteri ve mantar kaynaklı cilt enfeksiyonları her gün milyonlarca insanı etkilemektedir. Özellikle yara, yanık, cerrahi operasyon gibi durumlar sonrasında deri, enfeksiyonlara karşı duyarlı hale gelmekte ve oluşan dermatolojik problemler için klasik topikal yaklaşımlar (krem, merhem, jel vb.) yetersiz kalmaktadır. Sistemik tedavi ile etkin bir tedavi sağlansa da uzun süren tedavi sonrası görülen yan etkiler nedeniyle hasta uyuncu azalmaktadır. Son yıllarda topikal uygulamaya yönelik yenilikçi yaklaşımlara duyulan ilgi giderek artmaktadır [4, 5].

Derinin en üst katmanı olan SC; seramid, yağ asitleri ve kolesterol içeren interselüler lipid tabakası ve keratinositlerden oluşmaktadır [2, 4]. Bu bariyer tabakadan, lipofilik ve küçük moleküllü ilaçların penetrasyonu daha kolay olsa da hidrofilik moleküller ve proteinler gibi bileşikler için geçiş oldukça kısıtlıdır [2, 6]. Son yıllarda nanotaşıyıcı sistemler ile bu sorunun üstesinden gelmek ve SC tabakasından permeasyonu/penetrasyonu arttırarak ilacın etkinliğini arttırmak yönünde pek çok çalışma yapılmıştır. Nano taşıyıcılar ile, özellikle yarılanma ömrü kısa ilaçların kontrollü salımı sağlanmış ve stabilitesi arttırılmıştır [4, 7].

Lipozomlar, biyoparçalanabilir, biyoyumlu ve biyolojik membranlara benzer yapıları, penetrasyon artırma ve hedefleme özellikleri nedeniyle, etkili nano-taşıyıcı sistemler olarak

dikkat çekmektedirler. Lipozomların temel yapılarını fosfolipitler oluşturmaktadır ve kendiliğinden oluşan, lipit moleküllerinden meydana gelen, disperse edildikleri sulu fazda ilacı hapseden, lipit çifte tabakadan oluşmuş kolloidal partiküllerdir [8]. Genellikle lipozomlar; fosfolipidler (doğal, sentetik, yarı sentetik kaynaklı) yanında, yük vericiler (pozitif, negatif) ve kolesterol gibi kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır[9]. Lipozomlar tabaka oluşturma, ekstrüzyon, ters faz buharlaştırma, emülsiyon oluşturma, enjeksiyon, süperkritik çözeltisi ve diyaliz yöntemi gibi pek çok yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Sonikasyon yöntemi ile büyük tek tabakalı veya küçük tek tabakalı veziküllere küçültülebilmektedirler [10–12].

Son yıllarda cilt enfeksiyonlarının tedavisinde, antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeniyle, alternatif olarak AMP'ler kullanılmaya başlanmıştır [13, 14]. AMP'ler, bakteri türlerince ribozomlarda sentezlenen, genellikle 12 ve 50 aminoasit dizisi arasındaki peptid yapılar olup amfoterik veya katyonik karakterli kısa zincirli bileşiklerden oluşmaktadır. AMP; aminoasit dizilişleri, uzunluğu, salgılanma ve oluşum mekanizmaları, translasyon sonrası modifikasyonların varlığı ve antimikrobiyal aktivitelerine göre farklılık göstermektedirler. Bu peptitler, geleneksel antibiyotik tedavisini tamamlamakta ve direnç gelişimini önlemektedirler. Etki süresi hızlı olduğundan topikal deri enfeksiyonları, oral mukositis, akciğer enfeksiyonları ve kanser tedavisinde yenilikçi tedaviler olarak geliştirilmişlerdir.

AMP'lerin bakterisidal etkisi, temel olarak elektrostatik kuvvetlerin önemli bir rol oynadığı bakteriyel membran ile etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. Spesifik olarak, AMP üzerindeki pozitif yük, bakteri membranındaki negatif yüklü lipit bileşenleri ile güçlü bir şekilde etkileşerek AMP'in membrana girmesine izin vermektedirler. Böylece membrandaki lipitlerin yeniden düzenlenmesine neden olur, bakteriyel zarın morfolojisindeki değişikliklerden sonra, zarın gözeneklerinin oluşumu görülmektedir. Ayrıca, membran yapısında lokal bozulmalar/kopmalar görülmektedir. AMP'in bakterisidal mekanizması sadece bakteriyel zarın geçirgenliği ile ilişkili değildir. Aynı zamanda AMP membran lipit çift tabakasına yerleşebilmekte, sitoplazmaya girebilmekte ve hücre içi hedeflerle etkileşebilmektedir. Bu etkileşim metabolizmayı düzenleyen proteinlerin işlevini değiştirerek bakterisidal etkiye neden olmaktadır. AMP'in bakterisidal mekanizması

spesifik olmayan etkileşimler içerdiğinden, direnç gelişimi görülmemektedir [15, 16]. Ancak intravenöz olarak uygulandığında AMP'lerin nefrotoksisite ve nörotoksisiteye neden olduğu ve konvansiyonel antibiyotiklere kıyasla kısa bir yarı ömre sahip olduğu gösterilmiştir [17]. Bu nedenle çalışmamızda, AMP'nin lipozom formülasyonları içinde enkapsüle edilerek, topikal olarak uygulanması amaçlanmıştır.

Nisin, *Lactococcus* ve *Streptococcus* türlerine ait bir grup Gram pozitif bakteri tarafından üretilen antimikrobiyal peptittir [18–20]. Nisin, 5 lantionin halkası ve 34 amino asit kalıntısı içeren lantibiotiklerin termostabil peptit grubunda yer almaktadır [21]. Nisin, mRNA'dan sentezlenen Tip A (I) lantibiyotik olarak sınıflandırılır ve translate olmuş peptit, translasyon sonrası modifikasyonlar nedeniyle birkaç olağandışı amino asit içermektedir [19].

Nisin, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ve klinik kullanım için tanınmış potansiyele sahip Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (GRAS) listesinde yer almış, sertifikalı peptittir. Nisinin hastalıkla ilişkili hem Gram pozitif hem de Gram negatif patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [19]. Farklı çalışmalara göre, nisin moleküllerinin bakteri yüzeyine adsorpsiyonu ve membran yapısını bozması nisinin antimikrobiyal aktivitesinin ana mekanizmasıdır. Nisin molekülünün bakteriyel duvar biosentezinin öncü molekülü olan lipid II'ye bağlanması hem nisinin bakteriyel zar boyunca sızmasını sağlamakta hem de bakteriyel duvar sentezini inhibe etmektedir. Ayrıca nisin-lipid II kompleksi bakteriyel zarıda gözenek oluşturan bir mekanizmayı başlatmaktadır [20]. Ayrıca, nisinin antibiyofilm özelliklerine sahip olduğu ve geleneksel terapötik ilaçlarla kombinasyon halinde sinerjik olarak çalışabildiği bildirilmiştir [19].

Her ne kadar nisin ticari olarak gıda koruyucu olarak uygulanmış ve klinik ortamda topikal uygulama potansiyeli gösterilmiş olsa da fizyolojik pH'da (pH=7.4) düşük çözünürlüğü ve stabilitesi nedeniyle kullanımı sınırlanmıştır. Diğer taraftan; nisin yüklü nanoformülasyonlar serbest nisin ile karşılaştırıldığında, nisinin Brain Heart Infusion agarındaki antimikrobiyal aktivitesinin ve stabilitesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir [22–25]. Bu bilgiler ışığında, tez kapsamında nisin'in nanotaşıyıcı sistemler olan lipozomlar içerisinde enkapsüle edilerek,

antimikrobiyal etkinliğinin ve stabilitesinin (sıcaklık, pH, oksijen, ışık, karıştırma, enzimler ve metalik iyonlara karşı dayanıklılık) artırılması hedeflenmiştir [20, 26].

Farklı ilaçların bir arada verilmesi sinerjizm veya antagonizmaya yol açmaktadır. Sinerjik bir yanıtta, kombinasyon, tek bir ilaca göre önemli ölçüde daha güçlü bir etkiye sahiptir. Bir patojenin aynı anda birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirmesi olası olmadığından, klinik sonuçları anlamlı bir şekilde iyileştirmekte ve direnç gelişimi olasılığını azaltmaktadır. Kombinasyon karışımını doğru bir şekilde seçmek çok önemli bir adımdır ve AMP'ler çeşitli enfeksiyonların tedavisi için klasik antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılacak umut verici bir bileşik sınıfı olarak giderek dikkat çekmektedir. Son yıllarda, birçok çalışma, kombine AMP-antibiyotik tedavisinin yararlarını, çoklu ilaca dirençli ve biyofilm oluşturan organizmaların başarılı bir şekilde ortadan kaldırılmasına, direnç gelişiminin önemli ölçüde azaltılmasına bağlamıştır. Mikrobiyal hücre zarının antibiyotik geçirgenliğinin düşük olması yanında, pek çok AMP zarlar üzerine etki ederek zarların yapılarını bozmaktadır ve böylece kombine AMP-antibiyotik tedavisiyle, antibiyotiğin biyoyararlanımı artırılmaktadır [27, 28].

Tez çalışması kapsamında antibiyotik olarak AZM ile çalışılmıştır. AZM, eritromisinden türetilen, 15 üyeli akton halkasıyla sonuçlanan yarı sentetik bir makrolid antibiyotiktir ve azalid antibiyotik sınıfının ilk üyesi olarak sınıflandırılır. AZM, rRNA'ya bağlanır ve bakteriyel protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik/bakterisidal etki gösterir. Ayrıca ribozomal protein sentezinin inhibisyonu ile biyofilm oluşumunu önler. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu kanıtlanmıştır [29–31]. Geniş bir plazma dağılım hacmine ve düşük suda çözünürlük özelliğine sahiptir (2.37mg/L). Yaklaşık %30 oranında plazma proteinlerine bağlanır ve düşük oral biyoyararlanım (%17-37) gösterir. Oral kullanımı oldukça yaygın olsa da ilaca karşı gelişen antimikrobiyal direnç yanında, kardiyovasküler ve gastrointestinal yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlıdır [32]. Bu nedenle topikal uygulanmasına yönelik yapılan çalışmalar dikkat çekmekte olup, AZM yüklü lipozom formülasyonun serbest AZM'ye kıyasla *Escherichia coli* suşlarına karşı bakteriyosidal aktivitede artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, biyofilm oluşumunu azalttığı ancak serbest AZM kadar etkili olmadığı gösterilmiştir [27, 31].

Bütün bu bilgiler ışığında tez kapsamında; nisin ve AZM içeren lipozom formülasyonları tasarlanmış ve enfeksiyon tedavisine yönelik, sinerjik etkili bir formülasyon geliştirilmiştir. Bu nisin/AZM kombine lipozom formülasyonu ilk defa geliştirilmiş olup, tez çalışmasının özgün değerini oluşturmaktadır.

Enfeksiyon tedavisinde, oral yaklaşımlar kullanılan antibiyotiğe bağlı ciddi yan etkiler ve direnç gelişimi oluşturması nedeniyle, konvansiyonel yaklaşımlar ise tek bir etkin madde ile etkin olmayan tedavi ve hücrelere düşük penetrasyon gibi nedenlerle yetersiz kalmaktadırlar. Ayrıca sık kullanım ve uzun süren tedavi boyunca hasta uyuncunda yaşanan problemler de önemli yer teşkil etmektedir. Bu nedenlerle; tez çalışmamızda geliştirilen lipozomlar ile hem penetrasyon/permeasyonun artırılması sonucunda uygulama sıklığının azaltılarak hastanın tedavi uyuncunun artırılması ve doza bağlı yan etki görülme sıklığının azaltılması, hem de AMP ve antibiyotik kombinasyonu nedeniyle ilaca bağlı direnç gelişiminin önlenmesi daha etkin bir tedavi seçeneği sunması bakımından yenilikçi bir yaklaşım olmaktadır.

Hazırlanan lipozomların özellikle SC bariyerini aşarak derinin istenen tabakalarına geçebilmesi tedavi etkinliklerinin belirlenmesi açısından çok önemlidir. Bu nedenle çalışmalarımız sırasında Franz difüzyon hücreleri kullanılarak formülasyonların salım ve permeasyon özellikleri incelenmiş ayrıca permeasyon/penetrasyon özellikleri floresan mikroskop görüntüleme çalışmaları ile birlikte değerlendirilmiştir.

SC, formülasyonların uygulandığı ilk tabaka olması ve bariyer fonksiyonu gözönüne alındığında; formülasyon etkinliğinin değerlendirilebilmesi açısından, formülasyonların SC ile etkileşimini aydınlatmak önem taşımaktadır. Bu amaçla QCM-D tekniği ilk kez kullanılarak formülasyonların SC tabakası ile etkileşimleri incelenmiştir. Formülasyonlar, kadavra derisinden izole edilen SC tabakasıyla modifiye edilmiş kuartz kristal yüzeyine uygulanmış, SC-formülasyon etkileşimi QCM-D tekniği ile izlenmiştir.

1.1. Araştırmanın Amacı ve Kapsamı

Araştırma Sorusu

“Lipozomların yapısal üstünlükleri ve avantajları göz önüne alındığında, geliştirilmesi planlanan nisin ve AZM yüklü kombine formülasyonların enfeksiyon tedavisindeki rolü nedir?” sorusu projenin ana araştırma sorusudur. Ayrıca QCM-D tekniği, lipozomların etkinliklerinin değerlendirilmesi için yeni bir araç olarak kullanılabilir mi?” sorusu projemizin bir diğer araştırma sorusudur.

Hipotez

Antimikrobiyal tedavilerde; AMP/ilaç kombinasyonunun kullanılması ilaç direnç gelişimi olasılığını düşürür. Topikal uygulamalar için tasarlanmış, AMP/ilaç kombinasyonunun nanotaşıyıcı (lipozomal) sistem ile uygulanması, etkin maddelerin derinin hedef tedavi katmanına ulaşması için SC bariyerini geçmesini sağlar.

Araştırmanın Amacı

AMP (nisin) ve ilaç (AZM) içeren kombine etkili lipozomal formülasyonların tasarlanması ve bu taşıyıcı sistemin penetrasyon/permeasyon özelliklerinin detaylı olarak incelenerek (Franz difüzyon, konfokal mikroskop ve QCM-D teknikleri kullanılarak) etkinliklerinin belirlenmesidir. Böylece, etkinlik ve güvenilirlik değerlendirmeleri tamamlanan lipozom formülasyonlarının topikal uygulanmasıyla sinerjik etkili, enfeksiyon riskini ortadan kaldıracak bir tedavi yaklaşımı geliştirilmesidir. Peptit yüklü lipozom formülasyonları ile hücre içerisine penetrasyonun artırılması, muhtemel toksik etkilerin önlenmesi ve peptitin çevresel faktörlerden korunması amaçlanmıştır.

Araştırmanın Hedefleri

- Peptit yapısında olan antimikrobiyal etkili nisin’in lipozom yapısına yüklenmesi ile hücre içine penetrasyonun artırılması,
- Nisin’in lipozom yapısına yüklenmesi ile olası toksik etkilerinin önlenmesi,

- Nisin'in lipozom yapısına yüklenmesi ile proteolizden korunması,
- Yüksek dozda ve tekrarlayan nisin uygulamasının önüne geçilerek, AMP yapısına bağlı oluşabilecek immün yanıtın azaltılması,
- AMP/ilaç kombinasyonları ile direnç oluşma riski bulunan antibiyotik kullanımına alternatif geliştirilmesi
- Sinerjik etkili formülasyonlar ile mikrobiyal biyofilm oluşumunun önlenmesi
- Konvansiyonel formülasyon ile kıyaslanarak hazırlanan lipozom formülasyonlarının etkinliklerinin karşılaştırılması

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere bağlı gelişen enfeksiyonların tedavisinde etkili, antibiyotik direnci oluşturmayan alternatif bir formülasyon geliştirilmiş olacaktır. Geliştirilmesi planlanan bu formülasyon ile, sistemik etkili antibiyotik kullanımına gerek duyulmaksızın, lokal etkili, yan etki görülme olasılığını azaltan, enfeksiyon tedavisinde kullanılabilir yenilikçi bir sistem önerilecektir. Çalışmamız, gerek dozaj formu gerek öğrenilen ve geliştirilen QCM-D yöntemi açısından bilimsel ve teknolojik anlamda yenilik içermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri ve Yapısı

Deri, vücudumuzu enfeksiyondan, nem kaybından, kimyasallardan ve fiziksel hasarlardan koruyan güçlü bir bariyer fonksiyonu üstlenmektedir[2, 3]. Deri, embriyonik katmanlardan türeyen hücrelerin ve ekstraselüler matriksin etkileşimiyle oluşan, vücut bölgelerine özgü farklılaşmış yapıya sahip karmaşık bir organdır[33]. Farklı hücre tiplerinden oluşan bu çok katmanlı yapı, her biri belirli fonksiyonları yerine getirmek için özelleşmiş hücre tiplerinden oluşmaktadır. Genel olarak kategorize edildiğinde, bu katmanlar dıştan içe doğru sırasıyla epidermis, dermis ve hipoderm olmak üzere üç ana bölümden oluşmaktadır. İlaçların deriye geçişi ve deri tabakalarındaki dağılımı, hem derinin yapısal özellikleri hem de ilacın fizikokimyasal özellikleri tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir[34].

SC, vücudun organlarını ve dokularını dış ortamdan ayıran ve böylece olası tehlikelere karşı hayati bir bariyer fonksiyonu üstlenen karmaşık bir yapıdır[35]. Derinin en üst katmanı olan bu tabaka, temel olarak lifsi proteinler, seramidler, kolesterol ve yağ asitlerinden oluşan lipit matrikse gömülmüş keratinositlerden oluşmaktadır[4, 36–38]. SC'nin bütünlüğü, komşu korneositlerin yanı sıra SC tabakası düzlemindeki yapıları da kilitleyen birçok özelleşmiş hücre arası protein olan korneodesmozomlar aracılığıyla sağlanmaktadır[39]. SC yapısının bariyer fonksiyonunda, yapısında yer alan lipidler rol oynamaktadır[40].

SC'nin bu yapısı, ilaçların dermal emilimi için birincil yol olarak hizmet etmektedir. Böylece ilaçların hedef bölgeye ulaşması, potansiyel intradermal etkileşimi veya sistemik dolaşıma katılabilmesi için aşılması gereken ilk engel görevi görmektedir[36, 37]. Lipofilik ve küçük molekül yapıları ilaçların SC tabakası üzerinden geçişi daha kolay olmakla birlikte, proteinler gibi hidrofilik moleküllerin geçişi çok sınırlıdır[2, 6]. İlaçlar, SC üzerinden geçerken farklı yollar izleyebilse de moleküler ağırlık, çözünürlük ve moleküler yapıların penetrasyon / permeasyon oranlarını önemli ölçüde etkilediği açıktır ve farklı ajanların farklı yolları benimseyebileceği muhtemeldir[35]. SC sahip olduğu benzersiz özellikleri sayesinde, küçük molekül ağırlıklarındaki ($MmW \leq 500$ Da) ve ılımlı lipofilik özellikler ($\log P=1-3$)

gösteren aktif maddelerin etkili emilimini gerçekleştirmektedir. Biyomakromoleküllerin dermal penetrasyonu, yüksek moleküler ağırlıkları (300- 1.000.000 Da arasında değişen) ve amfilik özellikleri nedeniyle neredeyse tamamen sınırlıdır.

2.2. Lipozomlar

Kontrollü salım teknolojilerine olan talep arttıkça, hassas dağılım özelliklerine sahip nano yapılar oluşturmak için belirli özelliklere sahip yeni malzemelere olan ihtiyaç da artmaktadır[41].

Lipozomlar, hücre zarlarını andıran ve hem lipid hem de sulu fazları içeren ilaç taşıma sistemleridir. Yapılarından dolayı, suyla çözünebilir, lipidle çözünebilir ve amfilik malzemelerin kapsülleme, taşıma ve salımında kullanılırlar[41]. Farklı hidrofilik özelliklere (hidrofilik, amfilik veya hidrofobik maddeler) sahip bileşikler kapsüle etme yeteneği; küçük ve basit kimyasallardan proteinler gibi büyük ve kompleks moleküllere kadar çeşitli, biyolojik olarak etkin bileşikler kapsüle etme yeteneği; aynı anda birden fazla etkin bileşik yükleyebilme kapasitesi; bileşenleri çeşitlendirerek esnek ve rijit yapıya sahip keseler oluşturma; yüzey modifikasyonu ile akıllı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi; biyolojik uyumluluk, biyolojik parçalanabilirlik, düşük toksisite, artmış çözünürlük, artmış biyoyararlanım ve kapsüllemiş aktif farmasötik bileşenlerin stabilitesinin artırılması gibi bir dizi avantaja sahiptirler. Lipozomlar tüm bu avantajlarıyla ilgi çekici taşıyıcılar yapmaktadır[42].

Lipozomlar, terapötik ajanların deriye taşınması için etkili taşıyıcılar olarak bilinmektedirler. Lipozomların bileşenleri ile deri lipidleri arasındaki benzerlik, lipozomların epidermis tarafından kolayca emilmesini ve derin deri katmanlarına nüfuz etmesini sağlamaktadır. Ayrıca, lipozom yapısındaki lipidlerin SC'deki hücreli lipidlerle moleküler karışımı, deri nemlendirme etkisini artırmaktadır. Lipozomların topikal uygulanması nemlendirme, geliştirilmiş lokal etkiler, istenmeyen sistemik yan etkilerin azaltılması, biyodegradasyon ve biyoyumluluk gibi birçok avantaj sunmaktadır[6].

Fosfolipidler, lipozomların temel yapılarını oluşturmaktadır. İlacı kapsüllemiş halde bulunan lipid molekülleri, sulu faz içerisinde dağıldıklarında, lipit çift tabakadan oluşan kolloidal parçacıklar oluşturmaktadır[8]. Fosfolipidler, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol, fosfatidik asit gibi bileşenlerden oluşabilmektedir. Genellikle lipozomlar; doğal, sentetik, yarı-sentetik kökenli fosfolipidlerin yanı sıra yük taşıyıcılar (pozitif, negatif) ve kolesterol gibi kimyasal bileşenler içerebilmektedir[9]. Lipozomlar, ince tabaka oluşturma, ekstrüzyon, ters faz buharlaşma, emülsifikasyon, enjeksiyon, süperkritik çözelti ve diyaliz yöntemi gibi birçok farklı yöntemle hazırlanabilmektedir.

Sonikasyon ile büyük unilaminal veziküller (LUV) veya küçük unilaminal veziküller (SUV) haline getirilebilmektedirler[10–12].

2.3. Antimikrobiyal Peptitler

AMP'ler, canlı organizmaların çoğunda bulunan ve doğal bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenini oluşturmaktadırlar. AMP'lerin antimikrobiyal etkinliği; bakteriler, virüsler, parazitler ve mantarlar dahil olmak üzere geniş yelpazede bir çok canlıya karşı savunma yeteneği sağlamaktadır[43].

Son yıllarda AMP'ler, antibiyotiklere karşı direnç nedeniyle deri enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif olarak kullanılmaktadır[14, 44]. AMP'ler, genellikle 12 ila 50 amino asit dizisi arasında değişen sayıda aminoasit içeren amfoterik veya katyonik karaktere sahip peptit yapıları olup ribozomlarda sentezlenen kısa zincirli bileşiklerdir. Amino asit dizisi, uzunluk, salgılama ve oluşum mekanizmaları, post-translasyonel modifikasyonlar ve antimikrobiyal aktivitelerine göre farklılık göstermektedir. AMP'lerin sınıflandırılmasında etki mekanizması, ısıya ve enzimlere direnç, moleküler kütle ve post-translasyonel olarak modifiye edilmiş amino asitlerin varlığı temel faktörleri oluşturmaktadır. AMP'ler temel olarak; sınıf I (lanthionine gibi sıradışı bir amino asit içerdikleri için lantibiyotikler olarak adlandırılan ve 5 kDa'nın altında olan), sınıf II (lanthionine içermedikleri için lantibiyotikler olarak adlandırılmayan ve 10 kDa'nın altında olan ısıya dayanıklı olanlar), sınıf III (10

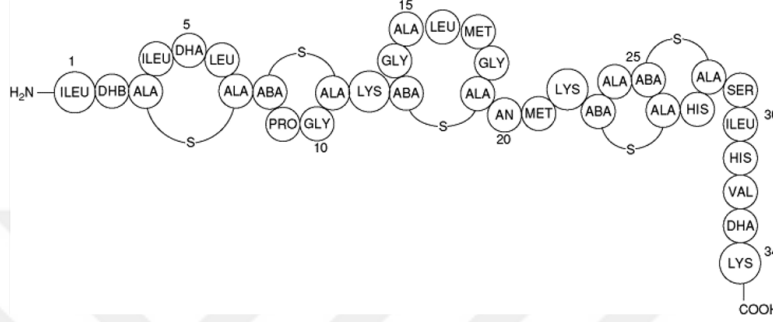
kDa'dan büyük olan ısıya duyarlı olanlar, bakteriyolizinler ve bakteriosinler), sınıf IV (farklı bileşikler içerenler) olarak sınıflandırılmaktadır[20]. Bu peptitler konvansiyonel antibiyotik tedavisini tamamlar ve direnç gelişimini önleme yeteneğine sahiptirler. Hızlı etki sürelerine sahip olmaları nedeniyle, bu tür peptitler, topikal deri enfeksiyonları, oral mukozit, akciğer enfeksiyonları ve kanser gibi yenilikçi tedaviler olarak geliştirilmiştir.

AMP'lerin bakterisidal etkisi, temel olarak bakteriyel zar ile etkileşimlerinden kaynaklanır ve bu etkileşimde elektrostatik kuvvetler önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, AMP'lerdeki pozitif yük, bakteriyel zarın negatif yüklü lipid bileşenleri ile güçlü etkileşime girmekte ve böylece AMP'lerin hedef zara girmesine olanak tanımaktadır. Bu sayede, zar içindeki lipidlerin yeniden düzenlenmesine yol açarak bakteriyel zarın morfolojisinde değişikliklerin meydana gelmesinin ardından zar içinde gözenek oluşumuna yol açmaktadır. Ayrıca, zar yapısında yerel bozulmalar/kırılmalar gözlemlenmektedir. AMP'lerin bakterisidal mekanizması, sadece bakteriyel zarın geçirgenliği ile ilgili değil, aynı zamanda, AMP'ler zar lipid çift tabakasına yerleşebilmekte, sitoplazmaya girebilmekte ve hücre hedeflerle etkileşime geçebilmektedir. Bu etkileşim, metabolizmayı düzenleyen proteinlerin işlevini değiştirebilir ve bakterisidal bir etkiye neden olabilmektedir. AMP'lerin bakterisidal mekanizması, spesifik olmayan etkileşimleri içerdiği için direnç gelişim mekanizmasını etkilemez ve AMP'lere karşı direnç gelişimi gözlemlenmez[15, 16]. Ancak, intravenöz olarak uygulandığında AMP'lerin nefrotoksisite ve nörotoksisiteye neden olduğu ve geleneksel antibiyotiklere kıyasla kısa bir yarı ömre sahip olduğu gösterilmiştir[17].

2.3.1. Nisin

Nisin, 1920'lerde keşfedilmiş ve günümüzde elliden fazla ülkede biyokoruyucu olarak onaylanmış antimikrobiyal etkili bir peptittir(Şekil 2.1). Nisin, Gram-pozitif bakterilere, özellikle de *Listeria* ve *Staphylococcus*'a karşı geniş bir inhibitör spektrumu göstermekte, aynı zamanda *Bacillus* ve *Clostridium* sporları üzerinde etkili kontrol sağlamaktadır[45]. Gram-negatif bakterilere karşı nisin kullanımı sınırlı olmakla birlikte, Gram-negatif bakterilere yönelik aktivitenin, Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) kullanılarak

arttırıldığı gösterilmiştir. Doğal olarak oluşan nisin varyantları arasında nisin A ve nisin Z bulunmaktadır. Bu iki varyant, yapısal olarak benzer olmalarına rağmen, 27. pozisyondaki tek bir amino asit ile farklılık göstermektedir. Histidin; nisin A'da bulunurken, nisin Z'de bu amino asitin yerini asparagin almaktadır. Her ikisinin de benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir[46].



Şekil 2.1 Nisin peptit yapısı

Kaynak: [47]

Nisin, FDA tarafından onaylanmış ve klinik kullanım potansiyeli tanınmış olan GRAS kategorisinde değerlendirilen, güvenli kabul edilen bir peptittir. Nisinin hastalıkla ilişkilendirilen hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir[19, 46]. Bir çok çalışmaya göre nisin'in antimikrobiyal aktivitesinin ana mekanizması, nisin moleküllerinin bakteriyel yüzeye adsorpsiyonu ve zar yapısının bozulmasıdır. Bu mekanizmaya göre nisin moleküllerinin lipid II'ye bağlanması, nisinin bakteriyel zarı geçişi kolaylaştıran bir yol oluşturmaktadır. Lipid II, bakteriyel duvar biosentezi için zorunlu öncü bir moleküldür. Nisin, lipid II'ye bağlanarak peptidoglikan ağının büyümesini engellemektedir. Ayrıca, nisinin N-terminal kısmı, lipid II'nin karbonhidrat-pirofosfat kısmı ile bağlanmakta, bu da nisinin C-terminal kısmının bakteriyel zarı geçmesine izin vermektedir. Bu mekanizmaların ardından, nisin-lipid II kompleksleri zar bütünlüğünü bozmakta ve zar içinde gözenekler oluşturmaktadır[20]. Başka bir çalışmada[19], nisinin anti-biyofilm özelliklere sahip olduğu ve geleneksel terapötik ilaçlarla sinerjik olarak çalışabileceği bildirilmiştir. Ayrıca nisinin, konak savunma peptitleri gibi adaptif bağışıklık yanıtını aktive edebileceği ve immün düzenleyici bir rol oynayabileceği rapor edilmiştir. Çalışmalar, nisinin tümör büyümesinde etkili ve kanser hücrelerine karşı

seçici sitotoksik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Nisin, diğer AMP'lerin bir çoğu gibi, insanlarda ve hayvanlarda bağışıklık düzenleme fonksiyonuna sahiptir. Nisinin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, bağışıklık sisteminde yer alan çeşitli hücre popülasyonlarını etkilediği ve geniş bir etki mekanizmasına sahip olduğu bildirilmiştir[21].

Nisinin, ticari gıda koruyucu olarak kullanılmasına ve klinik ortamda topikal uygulama potansiyeli gösterilmesine rağmen, fizyolojik pH'da (pH=7.4) düşük çözünürlüğü ve stabilitesi nedeniyle kullanımı sınırlı kalmıştır. Son çalışmalar, nisinin çözünürlüğü ve stabilitesinin, nano yapıli lipid taşıyıcılar ile formüle edilmesiyle artırıldığı bildirilmiştir[46].

Yanık yaralarının iyileşme sürecinde hasardan 3 gün sonra oluşan inflamatuvar fazda, deri hücreleri tarafından, aktif inflamatuvar cevap olan nötrofillerin ürettiği tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6)'nın aktive olduğu ve bunların vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve interlökin-8 (IL-8)'i uyararak kan damarlarının iyileşmesini sağladığı, hücre büyüme ve göçüne neden olduğu, ekstraselüler matriks (ECM) moleküllerinin üretimini arttırdığı bilinmektedir[48]. Nisinin bu interlökinler ve TNF- α üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, yara iyileşme sürecinde, antimikrobiyal etkisinin yanında immün yanıt düzenleyici olarak etkinlik gösterebileceği düşünülmektedir.

Diğer yandan; nisin yüklü nanoformülasyonlar serbest nisin ile karşılaştırıldığında, nisinin antimikrobiyal aktivitesi ve beyin kalp infüzyon (BHI) agarında stabilitesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir[20, 22–26]. Nisinin antimikrobiyal aktivitesini ve kararlılığını (sıcaklık, pH, oksijen, ışık, karıştırma, enzimler ve metal iyonlarına direnç) artırabilecek avantajları nedeniyle lipozomlar nano taşıyıcı sistemler olarak tercih edilmiştir.

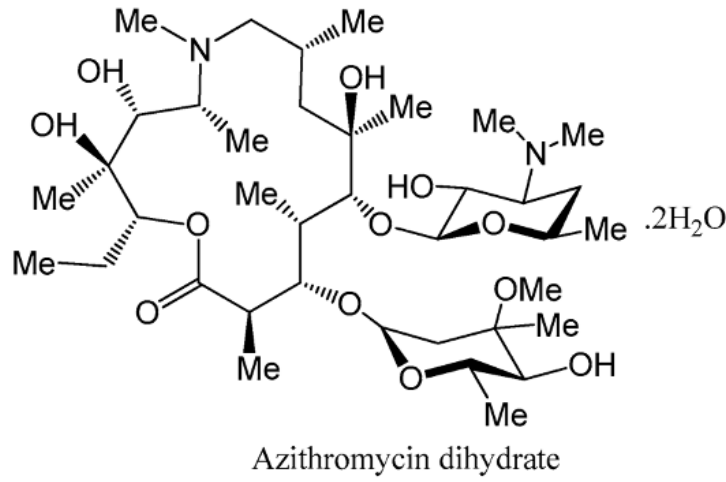
2.4. Antibiyotikler

Antimikrobiyal direnç, dünya genelinde birçok bölgede alarm verici seviyelere ulaşmış olup özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde antibiyotik tüketiminde artışa neden olmuştur[49, 50]. Hastalık yapma potansiyeli yüksek önemli patojenlerin sahip olduğu artan antimikrobiyal direnç, neden olduğu hastalıklarla mücadelede önemli

bir zorluk oluşturmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonların yayılmasına katkıda bulunan önemli faktörlerden biri, bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasıdır. Her yeni antibiyotiğin keşfi ile birlikte, bakterilerin dirençli suşları hızla ortaya çıkmış ve bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini karmaşık hale getirmiştir. Diğer yandan, antibiyotik direncinde önemli bir faktör bakterilerin biyofilm oluşturma potansiyelidir. Biyofilm, antibiyotiğin bakteri hücrelerine ulaşmasını engelleyerek antibiyotik etkinliğini sınırlandırabilmektedir. *S. aureus*, bir çok hastalığın yaygın patojeni olarak ön plana çıkmakta ve oluşturduğu biyofilm tabakası ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Biyofilm, bakterilerin kendileri tarafından üretilen, hidratlanmış bir matriks içinde yaşayan bakteri topluluğudur ve biyofilm yapısı bakterilerin biyolojik ve biyolojik olmayan yüzeylere yapışmasına olanak sağlar. Biyofilm, antibiyotik penetrasyonunu kısıtlayarak antibiyotik etkinliğini azaltmaktadır[51].

2.4.1. Azitromisin

AZM, eritromisinden türetilen, eritromisinin uzun etkili bir türevidir olan yarı sentetik bir makrolid antibiyotiktir(Şekil 2.2). AZM, rRNA'ya bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe etmekte, böylece bakteriyostatik/bakterisidal etki göstermektedir. Ayrıca, ribozomal protein sentezinin inhibisyonu biyofilm oluşumunu da önlemektedir. AZM'nin hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif mikroorganizmalara karşı etki gösterdiği kanıtlanmıştır[29–31].



Şekil 2.2 AZM yapısı

Kaynak: [52]

Oral yolla, parenteral yolla veya oftalmik olarak uygulanabilen güçlü, geniş spektrumlu bir antibiyotik olarak uzun süredir ve yaygın olarak kullanılmaktadır[27, 53]. AZM büyük bir plazma dağılım hacmine ve düşük su çözünürlüğüne (2.37mg/L) sahiptir. Plazma proteinlerine yaklaşık olarak %30 oranında bağlanmakta ve düşük oral biyoyararlanım (%17-37) göstermektedir. Ayrıca, *S. aureus*'a karşı en dirençli antibiyotik olup oral yolla alındığında bir çok istenmeyen yan etkiye de neden olmaktadır[29]. Oral yolla kullanımı oldukça yaygın olmasına rağmen, kardiyovasküler ve gastrointestinal yan etkileri yanı sıra ilaca karşı antimikrobiyal direnç gelişmesi kullanımını sınırlandırmaktadır[32, 54].

Bu nedenle, AZM'in topikal uygulaması üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir ve AZM yüklü lipozom formülasyonunun, serbest AZM'ye kıyasla *Escherichia coli* suşlarına karşı bakterisidal aktivitede bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, biyofilm oluşumunu azalttığı ancak serbest AZM kadar etkili olmadığı gösterilmiştir[27, 31].

2.5. Topikal Uygulama ve Kombine Tedavi Yaklaşımı

Farklı ilaçların bir arada uygulanması, sinerjizm veya antagonizm ile sonuçlanabilmektedir. Sinerjistik bir yanıtta, kombinasyon tek bir ilaçtan önemli ölçüde daha güçlü bir etkiye

sahiptir. Bir patojenin aynı anda birden fazla antibiyotiğe direnç geliştirme olası olmadığından, bu durum klinik sonuçları önemli ölçüde iyileştirmekte ve patojenlerin direnç gelişme olasılığını azaltmaktadır. Kombine tedavi yaklaşımında, doğru kombinasyonun belirlenmesi kritik bir adımdır ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde AMP'ler geleneksel antibiyotiklerle birlikte kullanılmak üzere umut vadeden bileşikler olarak giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Son yıllarda, birçok çalışma, kombinasyon halindeki AMP-antibiyotik kombine tedavisinin başarısını, çoklu ilaç dirençli ve biyofilm oluşturan organizmaların başarılı bir şekilde eliminasyonuna ve böylece direnç gelişimini önemli ölçüde azalttığına bağlamıştır. Bir çok AMP'nin sahip olduğu zarları etkileyerek zar yapıları bozmaları, mikrobiyal hücre zarının antibiyotik geçirgenliğininin arttırmasına ve böylece antibiyotiğin biyoyararlanımının artmasına neden olmaktadır. AMP'lerin sahip olduğu bu özellik, AMP-antibiyotik kombine tedavisini konvensiyonel tedaviye kıyasla avantajlı hale getirmektedir[27, 28].

Antibiyotik direncinin yol açabileceği klinik krizi önlemek ve hafifletmek için çeşitli stratejiler sunulmuştur. Bunlar arasında antibiyotiklerin birbirleriyle veya diğer antimikrobiyal ajanlarla birleştirilmesi ve eski ilaçların yeni mekanizmalarla sinerjik uygulanması da yer almaktadır. Bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak için umut vaadedici diğer yaklaşım ise nanoteknolojinin veya nanoteknolojik yöntemlerin antibiyotiklerle birleştirilmesidir[50].

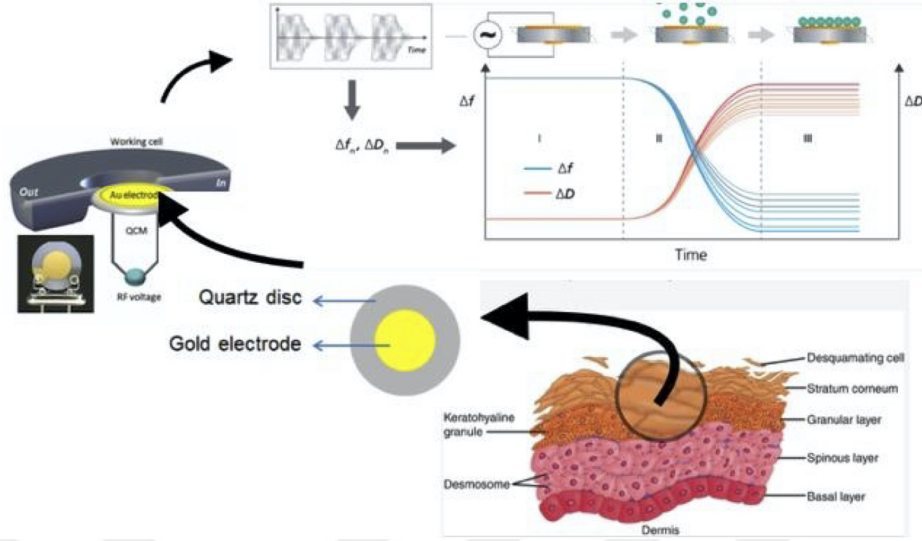
Topikal veya intradermal amaçlarla deri yüzeyine uygulanan ürünler, etkilerini çeşitli doku ve organlarda göstermek üzere tasarlanmışlardır. Bir ilacın belirli bir işlevi yerine getirme olasılığı, potansiyel içsel etkinliğine ve hedef bölgeye ulaştığındaki derişimine dayanmaktadır[55]. Topikal antibiyotik uygulaması, deri enfeksiyonlarının tedavisinde hayati öneme sahiptir. Ancak antibiyotiklerin etkinliği; tekrarlı yetersiz lokal ilaç derişimi, antibiyotiklere dirençli suşların artmasına, biyofilm oluşumuna veya hedef bölgeye antibiyotiğin ulaşmaması/yeterli dozda ulaşmaması gibi nedenlerle azalmaktadır[27]. Antibiyotiklerin genellikle düşük ve değişken biyoyararlanımı nedeniyle, hidrofobik antibiyotiklerin taşınma ve salımında lipozomlar tercih edilmektedir[56].

Literatürde AZM ve nisin içeren kombine lipozomal formülasyonlar üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. AZM ve nisin içeren lipozomal taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesiyle konvansiyonel dozaj formlarının sahip olduğu yan etkinin azaltılması ve etkili lokal ilaç dozaj formülasyonu hazırlanması amaçlanmıştır.

2.6. QCM-D

QCM-D tekniği, lipozomların biraraya gelme, dizilim davranışını araştırmak için yaygın olarak kullanılan çok yönlü analitik bir yöntemdir[57, 58]. QCM-D, rezonans frekansı (f) ve enerji dağılımını (D) gerçek zamanlı olarak izleyen, böylece adsorbe olan veziküllerin kütesini ve viskoelastik özelliklerini belirlemek için kullanılan yeni bir yöntemdir. Yöntemin temelinde, titreşen kuartz kristal üzerine lipozomların çökmesi durumunda salınım frekansındaki değişim (Δf) ve enerji dağılımındaki değişim (ΔD) ölçülmektedir. Kuartz sensör yüzeye çöken lipozomların bilayer tabaka oluşturmak üzere patlaması büyük Δf ve ΔD değişiklikleri meydana getirmektedir(Şekil2.3). Böylece kuartz kristal üzerine adsorbe olan tabakanın kütle ve viskoelastik özelliklerinde ölçülebilir parametrelere dönüşmektedir[58, 59].

Frekansta ve enerji dağılımında meydana gelen değişimler; vezikülün yapısını koruyup korumadığını, bir tabakası oluşturmak için bir araya gelmesi durumunu ve lipozomal yapının patlaması durumlarının belirlenmesini sağlamaktadır. Bir vezikül, içinde kapsüllenmiş su nedeniyle yumuşak ve viskoelastik bir yapıya sahipken, bu veziküllerin bir arada paketlenmesi ile oluşan film yapısı, lipidlerin tabaka oluşturması nedeniyle rijit bir yapı sergilemektedir. Dolayısıyla veziküller bir tabakaya dönüştüğünde, adsorbe olan tabakanın kütesinde ve viskoelastik özelliklerinde değişiklikler meydana gelmektedir[58, 59].



Şekil 2.3 QCM-D çalışma prensibi

Desteklenmiş lipid çift tabakalar (SLBs), doğal hücre membran yapısını taklit etmeleri ve çeşitli biyokimyasal süreçlerin araştırması için kontrollü bir ortam sağlamalarıyla yüzey biyokimyası araştırmalarının vazgeçilmez araçlarıdır[60]. SLBs'i doğrudan incelemek ve oluşan bu SLBs ile ilaç ve/veya diğer madde ve sistemlerin etkileşimlerini incelemek için kullanılan teknikler arasında, QCM-D biyomakromoleküler etkileşimleri anlamak ve ilaç-membran etkileşimlerini gerçek zamanlı kinetik izleme yeteneğiyle öne çıkmaktadır[61].

QCM-D kullanılarak yapılan pek çok çalışmada, lipozomlar substratlar üzerinde SLBs oluşturmak için kullanılmıştır[62]. QCM-D tekniğinin, kuarz kristal (substrat) üzerinde oluşturulan SLBs membran modelini incelemek ve ilaç-membran etkileşimlerini keşfetmek için kullanmanın yanı sıra son araştırma bulguları bu tekniğin peptid-membran etkileşimlerini açıklamak için parmak izi niteliğinde bilgiler sağlayabildiğini rapor etmişlerdir[57]. QCM-D, proteinlerin veya proteolipid komplekslerin model membranlar ile etkileşimini araştırmak için özellikle uygun bir yöntemdir. Garnier ve arkadaşları tarafından protein ile kovalent olarak modifiye edilmiş lipozomal yapılar ile kuarz kristal üzerinde oluşturulan model membran arasındaki etkileşim incelenmiştir[63].

QCM-D; SLBs yardımıyla mimik membran yapısı oluşturulması ve substratlar üzerindeki SLBs oluşum kinetiğinin incelemesinin ötesinde; aktif bileşiklerin veya biyomoleküllerin SLBs ile etkileşimlerini araştırmak için kullanılmıştır. QCM-D, lipid-polimer hibrit nanopartiküllerin SLBs ile etkileşimlerini[64], ilaç yüklü lipozomal yapıların SLBs ile etkileşimlerini[65] ve nanokapsül formülasyonların SLBs ile etkileşimlerini[66] keşfetmek için kullanılmıştır.

Literatürde model SC ile yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Lee ve ark. tarafından yapılan çalışmada; farklı türlerde serbest yağ asitleri (zincir uzunluğu ve doymuşluk açısından farklılık gösterenler), seramidler, kolesterol ve stearik asit kullanılarak model SC membran yapıları oluşturulmuş ve membran kompozisyonunun model SC'nin su geçirgenliği ve mekanik özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir[67]. Diğer yandan Lee ve ark tarafından yapılan başka bir çalışmada, model SC membran yapısı oluşturulmuş ve bu model membran, yüzey aktif maddelerin SC tabakasına etkisini araştırmak için kullanılmıştır[68]. Strati ve ark. tarafından yapılan çalışmada Langmuir monolayer yöntemi ile model SC oluşturulmuş, SC lipidleri içeren lipozom formülasyonunun (serozomlar, SC lipozomlar) oluşturulan model SC ile güçlü etkileşim gösterdiği bildirilmiştir[69].

SC'nin karmaşık yapısı göz önüne alındığında bu çalışmalardan elde edilen sonuçların doğrudan model SC yapısından etkilendiği, böylece model SC ile etkileşimleri inceleyen çalışmaların sınırlılığını oluşturduğu görülmüştür. Murthy ve arkadaşları, ilk kez insan kadavra SC'sini, altın kaplı kuartz kristal sensöre yerleştirerek karakterize etmiş ve gerçek SC'nin özelliklerini incelemiştir[70]. Bu tez araştırması kapsamında, Murthy ve arkadaşları tarafından yapılan QCM-D çalışması, lipozomların ve farklı etkin maddeler (AZM ve nisin) içeren lipozom formülasyonlarının insan kadavra derisi ile etkileşimlerini incelemek üzere genişletilmiştir. Bu çalışmanın benzersiz değeri iki temel noktadan gelmektedir: birincisi, insan SC tabakasıyla etkileşim gösteren nanotaşıyıcı olarak tasarlanmış lipozomal yapının incelenmesi; ikincisi, lipozomal yapıya yüklenmiş ilaç aktif bileşenlerinin lipozomların, SC ile etkileşimi üzerindeki etkilerin araştırılmasıdır. Bu amaçla kuartz kristal, Murthy ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem kullanılarak insan kadavra SC tabakasıyla modifiye edilmiştir.

Antimikrobiyal etkinliği artırmak ve ilaç direncini azaltmak amacıyla tasarlanan ve karakterize edilen lipozomal formülasyonların SC tabakası ile etkileşimleri QCM-D tekniğiyle incelenmiştir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyaller

Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de, araştırma sırasında kullanılan ekipman ve kimyasallar sunulmuştur. İnsan kadavra derisi The New York Firefighters Deri Bankası’ndan (ABD) satın alınmıştır. Deri örnekleri, posterior torso bölgesinden (65-69 yaş arası erkek) elde edilmiştir. SC ile yapılan çalışma, Rutgers Üniversitesi Kurumsal İnceleme Kurulu (Rutgers University Institutional Review Board: IRB) tarafından insan denek içermeyen araştırma olarak onaylanmıştır. İlgili dokümanlar Ek-1 ve Ek-2’de sunulmuştur.

Madde Adı	Marka/Kaynak
Nisin (%2.5 toz)	Sigma Aldrich N5764
Azitromisin Dihidrat (Saflık \geq %98)	Selleck Chemicals
L- α -fosfotidilkolin (%95) (yumurta)	Avanti Polar Lipids 131601P
Nisin (kullanıma hazır çözelti)	Sigma SBR00021
fosfolipon 90G	Lipoid GmbH
1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3- fosfotidilkolin (DPPC)	Lipoid
Tuzlu fosfat tamponu (tablet) (pH:7.4)	Sigma Aldrich
Kolesterol	Sigma C8667
Lipoid S100	Lipoid GmbH
Kloroform	Merck
L- α -fosfotidilkolin (%95) (Soya fasülyesi)	Avanti Polar Lipids
Asetonitril	Merck
Dipotasyum hidrojen fosfat	MilliporeSigma Supelco
Etanol (\geq %99.5)	Koptec
Ultra saf su (HPLC seviyesinde)	Merck Millipore
DURO-TAK 87-900A	Henkel Corporation (USA)
Tripsin (% 0.25)	Gibco (Canada)
Tetrahidrofuran (HPLC saflıkta)	EMD Millipore Corporation (USA)

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan malzemeler ve kimyasallar.

Tüm kimyasallar analitik safliktadır.

Adı	Marka/Kaynak
Prop Sonikatör	Branson SFX 150
CBQCA protein miktar belirleme kiti)	Invitrogen™
QuantiPro BCA protein analiz kiti	ASigma-Aldrich
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter Optima L-90K
Ultrasantrifüj Rotor	70.1Ti
HPLC için kolon	Waters, XBridge BEH C18 SKU:186003116
Ultrasantrifüj tüpleri	Beckman Coulter Quick-Seal (Polypropylene)
2 mL rotorlu midi santrifüj	IKA G-L
Santrifüj filtresi	Millipore Microcon-10kDa (MRCPRT010)
2 mL'lik HPLC vial ve kapakları	Agilent
400 µL'lik cam insert HPLC için	Agilent
Homojenizasyon tüpleri	Benchmark
Rotavapor	IKA RV 10 digital
Zetasizer	Malvern Zetasizer Nano ZS
Şırınga pompası	Chemyx Fusion 100 Infusion Pump
küvet okuyuculu spektrofotometre (UV)	SpectraMax M3
plate okuyuculu spektrofotometre (UV and Fluorescence)	Tecan Spark 10M
HPLC	Agilent 1100, UV dedektör ve Chemstation yazılım ile
İnsan kadavra derisi	The New York Firefighters Skin Bank (USA)
Altın kaplı kuartz sensör	Nanoscience Instruments (QSX 327, Q-Sense)
Spin kaplama cihazı	Headway Research, Inc., Garland, Texas
QCM-D ve yazılımı	Q-Sense Omega instrument (Biolin Scientific), Q Tools yazılım

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan malzemeler ve kimyasallar.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Çözünürlük Çalışmaları

Deneysel çalışmalar sırasında kullanılması planlanan %1 Tween 20 içeren PBS, su ve etanolde AZM'nin doymuş çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, çözünme deneyleri için tasarlanmış yüksek yatay çalkalama hızına sahip çalkalayıcı ile 24 saat boyunca çalkalanmıştır. 24 saatin sonunda, çözelti içinde çözünmeyen, askıda kalan AZM'nin çöktürülmesi için 25°C'de 15 dakika boyunca 10000 g kuvvetinde santrifüj uygulanmıştır. Çözeltiden alınan örnekler 0.45 µm gözenek çapına sahip filtre ile süzülmuş ve gerekli ise hareketli faz ile seyreltme yapıldıktan sonra HPLC ile analizi gerçekleştirilmiştir. Her ortam için üç paralel çalışma yapılmıştır.

3.2.1.2. Lipid-Su Dağılım Katsayısının Belirlenmesi (logP)

Lipid/su dağılım katsayısını belirlemek için yağ fazı olarak oktanol, sulu faz olarak su kullanılmıştır. Deneye başlamadan önce oktanolün suya doyurulması için bir miktar HPLC saflığında su ile 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Ekstraksiyon hunisi kullanılarak tam faz ayrımı gerçekleştikten sonra suya doyurulmuş oktanol ayrılmıştır. 15 mL'lik bir deney tüpüne 4 mL suya doymuş oktanol, 4 mL su ve 10 mg AZM eklenerek örnek, yatay bir çalkalayıcıda 24 saat boyunca çalkalanmıştır. Daha sonra, 3500 devir/dakikalık hızda 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sulu fazdan alınan örnek, 0.2 µm gözenek çapına sahip filtrelerden geçirilerek HPLC ile AZM analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma üç tekrarlı yapılmıştır. Dağılım katsayısı aşağıdaki Denklem 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\log P = \frac{C_{oktanol}}{C_{su}} \quad (1)$$

3.2.2. Miktar Tayini Çalışmaları ve Analitik Yöntem Validasyonu

3.2.2.1. Azitromisin için HPLC Yöntem Validasyonu

AZM analizi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, Avrupa Farmakopesi yöntemi modifiye edilmiş ve doğrulanmıştır[71, 72]. Hareketli faz, Avrupa Farmakopesi'nde açıklandığı gibi dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4): Asetonitril olarak seçilmiştir, hareketli fazda yer alan fosfat tamponu konsantrasyonu, pH'sı değiştirilmiştir.

AZM, bir miktar asetonitril içinde çözülmüş ve kalan hacim hareketli faz ile tamamlanarak son derişimi 1000 $\mu\text{g/mL}$ olan bir stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltisinden 5 - 200 $\mu\text{g/mL}$ aralığında içeren sekiz farklı AZM standart çözeltisi ICH Topic Q1A (R2): "yeni ilaç etkin maddeleri ve ürünlerinin stabilite testi" kılavuzunda[73] bildirdiği üzere reseptör ortam olan %1 Tween 20 içeren PBS kullanılarak hazırlanmıştır. Örneklerin analizleri, HPLC (Agilent 1100 serisi, UV dedektör ve Chemstation yazılımı) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC ve kromatografik koşullar Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Cihaz	Agilent 1100 serisi cihaz, UV dedektör ve Chemstation yazılımı ile birlikte
Kolon	Waters XBridge BEH C18, 130Å, 5 μm , 4.6 mm X 150 mm
Hareketli Faz	Asetonitril:Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4)(20mM; pH 9.0) (60:40)
Enjeksiyon Hacmi	50 μL
Akış Hızı	1.5 mL/dakika
Fırın Sıcaklığı	40 °C
Dedektör Dalga Boyu	200 nm
Analiz Süresi	10 dakika
Alıkonma zamanı	\simeq 4-5 dakika

Çizelge 3.3 AZM analizinde kullanılan cihaz ve kromatografik koşulları.

AZM miktar tayinlerinde kullanılacak HPLC yönteminin güvenilirliğini göstermek için analitik yöntem validasyon çalışmaları ICH:Q2(R2) kılavuzu doğrultusunda yapılmıştır[74]. Analitik yöntem validasyonu aşağıdaki parametrelere dayanarak gerçekleştirilmiştir:

- Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı
- Doğruluk ve Geri Kazanım
- Kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik)
- Spesifiklik
- Kararlılık
- Tespit ve Tayin Sınırı

Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı

Doğrusallık için, 5-200 µg/mL aralığında 8 farklı AZM derişimlerinde çözeltiler 3 tekrarlı hazırlanmış ve kromatogramda AZM pikinin eğri altı alanı ile standart kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. AZM'nin standart derişimleri, stok çözeltiden doğrudan seyreltme yoluyla hazırlanmıştır. Pik alanı ile ilaç derişimi arasındaki doğrusallık en küçük kareler regresyon analizi ile yapılmıştır.

Doğruluk ve Geri Kazanım

Doğruluk, deneysel prosedürde ölçülen değerlerin gerçek/teorik değerlere ne kadar yakın olduğunun belirlenmesidir. Yöntemin doğruluğı, yüzde geri kazanım (%) hesaplanarak belirlenir. Düşük, orta ve yüksek seviyelerde (2 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL) üç ayrı derişim HPLC ile analiz edilmiş ve her örnek için teorik değer, analiz değeri ve yüzde geri kazanım değerleri rapor edilmiştir. Doğruluk; ortalama (AVG), standart sapma (STD) ve göreceli standart sapma (%RSD) ile temsil edilir. Geri kazanım için kabul kriteri, teorik değerin %90 ila %110 arasında olmasıdır[75].

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{C_{\text{pratik}}}{C_{\text{teorik}}} \times 100 \quad (2)$$

C_{pratik} : Aktif maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen derişim değerleri.

C_{teorik} : Aktif maddelerin hazırlanan derişim değerleri.

Kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik)

Belirli bir yöntem koşulları altında, aynı derişimdeki ardışık ölçümlerinin yakınlığının bir ölçüsüdür. Ortalama (AVG), standart sapma (STD) ve göreceli standart sapma (RSD) hesaplanarak belirlenir. Kesinlik tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik açısından da değerlendirilmiştir. Ölçümlerin RSD değerinin $\leq \%2$ olduğu durumda yöntem kabul kriterlerini sağlar.

Tekrarlanabilirlik (gün içi tekrarlanabilirlik), AZM'nin $10 \mu\text{g/mL}$ derişimdeki çözeltisi ile ardışık olarak altı farklı ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Tekrar üretilebilirlik (günler arası tekrarlanabilirlik), AZM'in standart derişimleri ($10 \mu\text{g/mL}$) stok AZM çözeltisi kullanılarak hazırlanmış ve analizler iki farklı günde gerçekleştirilmiştir.

Kromatogramdaki pik alanı AZM derişiminin hesaplanmasında kullanılmış ve daha sonra ortalama, STD ve RSD belirlenmesi için kullanılmıştır. $\%2$ 'den az olan RSD değeri kabul kriteri olarak belirlenmiştir.

Spesifiklik

Yöntemin spesifikliğini belirlemek için formülasyon hazırlığında kullanılan maddelerin kromatogramda pik varlığı ve pik oluşturmuş ise, AZM pikinin alıkonma zamanı ile pikler arası ayırıcılığın (R_s) > 2 olması kabul değeri olarak belirlenmiş ve sağlanmıştır.

Kararlılık

Belirli bir derişimde hazırlanan AZM çözeltisi deneysel koşullar altında 0.5, 4, 8, 10 ve 24 saatlerde, farklı zaman aralıklarında analiz edilmiş ve sonuçlar yöntemin kararlılığı açısından değerlendirilmiştir.

Tespit ve Tayin Sınırı

Tespit ve tayin sınırları, sinyal-gürültü oranı, görsel inceleme ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak 3 farklı yöntemle hesaplanabilmektedir. Bu çalışmada tespit ve ölçüm sınırları,

kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan Denklem 3 ve Denklem 4 şu şekildedir:

$$\text{Tespit Sınırı (LoD)} = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (3)$$

$$\text{Tespit Sınırı (LoQ)} = \frac{10 \sigma}{S} \quad (4)$$

σ : Ölçümlerin standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.2.2. Nisin'in Spektrofotometrik Analizleri

Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Miktar Tayin Kiti

Nisin içeren lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliğinin Colas ve ark. tarafından BCA kiti ile belirlendiğinden ilk olarak nisin analizi için BCA kiti tercih edilmiştir[22].

BCA yöntemi iki ardışık reaksiyon adımından oluşmaktadır. İlk adımda, alkali koşullar altında, Cu^{2+} iyonları sistein, sistin, triptofan, tirozin ve peptid bağı ile reaksiyona girerek Cu^{1+} iyonlarına indirgenir. İkinci adımda, bikinkoninik asit ortama eklenir ve bikinkoninik asidin Cu^{1+} iyonları ile oluşturduğu renkli kompleks, 562 nm'de maksimum absorbans gösterir[76]. Nisin analizi için QuantiPro BCA Assay Kiti kullanılmıştır.

CBQCA Protein Miktar Tayin Kiti

ATTO-TAG CBQCA reaktifi, sulu çözeltide neredeyse hiç floresan göstermeyen, siyanür varlığında primer aminlerle reaksiyona girerek floresan türevlerine dönüşen bir reaktiftir. CBQCA Protein Miktar Tayin Kitinin prensibi; protein yapısındaki primer aminlerin siyanür varlığında ATTO-TAG ile reaksiyona girerek oluşturduğu floresanın ölçülmesine dayanır ve bu ölçüm Abs/Em: 465/550 nm dalga boylarında gerçekleştirilir. CBQCA reaktifi,

diğer birçok protein belirleme yönteminde girişim yapan lipid gibi maddelerin varlığında da çalışır[77]. CBQCA kitinin çalışma prensibi, protein bileşimine güçlü derecede bağımlılık gösterir[78].

3.2.2.3. Nisin'in HPLC yöntemi ile Analizi

Nisin, literatürde bildirilen HPLC yöntemi doğrultusunda, gradient yöntem kullanılarak Çizelge 3.4'de belirtilen kromatografik koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir[24, 79, 80].

Cihaz	Agilent 1100 serisi cihaz ve UV dedektörü, Chemstation yazılımı
Kolon	Waters XBridge BEH C18, 130Å, 5 µm, 4.6 mm X 150 mm
Hareketli Faz	A: %0.1 Trifloroasetik asit v/v Su B: %0.1 Trifloroasetik asit v/v Asetonitril
Enjeksiyon Hacmi	100 µL
Gradient Programı	%100 A 5 dakika; linear gradient 0-50 %B 45 dakika; linear gradient 50-100 %B 5 dakika; %100 B 7 dakika
Akış Hızı	1 mL/dakika
Fırın Sıcaklığı	35 °C
Dedektör Dalga Boyu	215 nm
Analiz Süresi	60 dakika

Çizelge 3.4 Nisinin HPLC analizi için sağlanan kromatografik koşullar

3.2.3. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Ön çalışmalar, Fosfatidilkolin, (%94 soybean)(Lipoid S100), Fosfatidilkolin, (granül haline getirilmiş, %94, soybean) (Phospholipon 90G), L-α-Fosfatidilkolin (%95 soybean) (Soy PC),

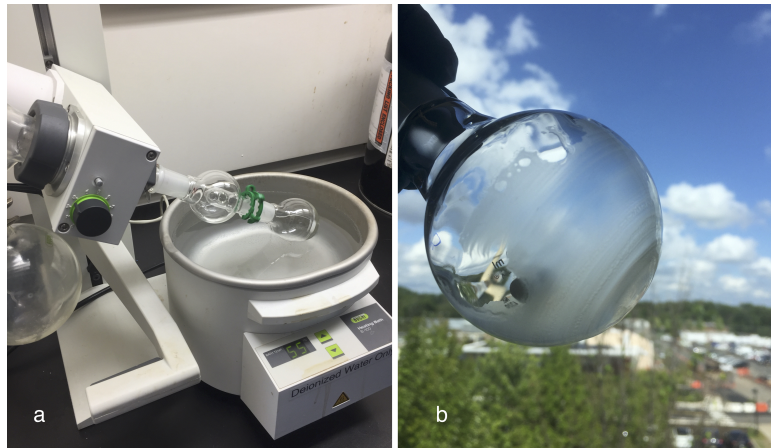
1,2-Dipalmitoil-*sn*-glisero-3-fosfatidilkolin (DPPC), L- α -Fosfatidilkolin (%95 egg/chicken) (Egg PC) ile gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonlar öncelikle ince tabaka hidrasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Formülasyonlar karakterizasyon parametreleri açısından değerlendirilmiş ve ilerleyen çalışmalara Egg PC ile devam edilmiştir. Bu fosfolipid kullanılarak diğer lipozom hazırlama yöntemi olan modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yöntemi ile aynı formülasyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra Rutgers Üniversitesinde temin edilen fosfatidilkolin (%70) içeren fosfolipid karışımı (soya fasülyesi) (Lipoid S75) ile hazırlanan formülasyonlar alternatif bir formülasyon olarak çalışmalara dahil edilmiştir.

3.2.3.1. İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemi

Lipozom formülasyonları, organik çözücü (etanol) içerisinde fosfolipid ve kolesterol çözüldükten sonra düşük basınç altında rotavaporda buharlaştırılmış ve ince tabaka yapısı oluşturulmuştur. İnce tabaka hidrasyon yöntemine ait bazı adımlar Şekil 3.1’de sunulmuştur. Oluşan ince tabaka yapısına su fazı eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla ince tabaka yapısının hidrate olması sağlanmıştır. Son adım olarak boyut ve yapı optimizasyonu için hazırlanan formülasyona sonikasyon işlemi uygulanmıştır.

Lipozom formülasyonları, Lipoid S100, Phospholipon 90G, Soy PC, DPPC, Egg PC ve Lipoid S75 gibi farklı fosfolipid türleri ve kolesterol kullanılarak hazırlanmıştır.



Şekil 3.1 İnce tabaka hidrasyon yöntemi dizayn ve uygulaması; a) Rotavapor b) İnce tabaka yapısı

Optimizasyon çalışmaları sırasında, etkin madde (AZM, nisin) yüklenmeyen boş lipozomlar ince tabaka hidrasyon yöntemi ile farklı hacimlerde cam balonlar kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Balon hacminin lipozom özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve 100 mL'lik yuvarlak tabanlı balonlarda hazırlanan lipozomların daha iyi özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, ince tabaka hidrasyon yöntemiyle formülasyonların hazırlığında, 100 mL'lik cam balonlar kullanılmıştır. Sonikasyon işleminde farklı sonikasyon süreleri (3, 5 ve 10 dakika) denenmiş ve boş lipozom formülasyonu kullanılarak optimizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

Lipozom formülasyonlarının terkinde fosfolipid:kolesterol oranı 80:20(% mol) kullanılmıştır. Lipozom formülasyonlarının bileşimi Çizelge 3.5'de özetlenmiştir. İnce tabaka hidrasyon yöntemiyle hazırlanan lipozom formülasyonları "lipozom" olarak ifade edilecektir. Formülasyon bileşiminde stabilite arttırıcı olarak kolesterol kullanılmıştır. İlk olarak, fosfolipid ve kolesterol 6 mL organik çözücüde çözülmüştür. Rotavapor yardımıyla, çözücü yaklaşık 220 mmHg vakum ve 45°C sıcaklıkta 100 rpm hızda 30 dakika boyunca buharlaştırılmış ve ince tabaka yapısı elde edilmiştir. Hidrasyon adımında, ince tabaka 10 mL sulu ortam kullanılarak oda sıcaklığında 100 rpm hızında 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. Nihai formülasyonda lipid derişimi 5mg/mL'dir. Son adımda lipozom büyüklüğü, %50 güç ve dakikada 2 döngü parametreleri ile 5 dakika sonikasyon uygulanarak optimize edilmiştir.

FORMÜLASYON	Organik faz			Sulu faz
	Fosfolipid	Kolesterol	AZM (10mg)	Nisin(50 µg/mL)
Boş Lipozom	+	+	-	-
AZM Yüklü Lipozom	+	+	+	-
Nisin Yüklü Lipozom	+	+	-	+
Kombine Lipozom	+	+	+	+

Çizelge 3.5 İnce tabaka hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozom formülasyonlarının bileşimi

Organik çözücü türü ve sulu ortamın pH değerinin lipozom yapısına etkileri farklı lipit türleri kullanılarak araştırılmıştır.

Organik çözücü türünün lipozom özellikleri üzerindeki etkisi, AZM yüklü lipozomlarda incelenmiştir. Fosfolipit, kolesterol ve AZM (10 mg) içeren lipozomlar, farklı organik çözücüler (kloroform; Metanol:Etanol(2:1); Etanol) içinde çözüldükten sonra ince tabaka hidrasyon yönteminin diğer adımları tam olarak uygulanmıştır.

Organik çözücünün belirlenmesinin ardından, sulu fazın pH'sının etkisi nisin yüklü lipozom formülasyonunda incelenmiştir. Bu amaçla, rehidrasyon adımı fosfat tamponu (pH: 5.4), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (pH: 7.4) ve ultra saf su (pH: 6.1) kullanılarak hazırlanan formülasyonların özellikleri değerlendirilmiştir.

3.2.3.2. Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi

Bu yöntemde fosfolipid, kolesterol ve AZM; etanol ve propilen glikol içeren çözelti içerisinde çözülmüştür. Bu çözelti manyetik karıştırıcı ile karıştırırken, sulu faz olarak hazırlanan nisin çözeltisi, mikro enjeksiyon pompası yardımıyla organik çözelti üzerine enjekte (hız: 0,2 ml/dakika) edilmiştir. Formülasyonlar, %30-40 etanol çözeltisi ile

nihai hacme (10 mL) tamamlanmıştır. İnce tabaka hidrasyon yönteminde optimize edilen parametreler ile sonikasyon uygulanmıştır[81]. Modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yöntemi, farklı etanol ve propilen glikol oranları uygulanarak optimize edilmiştir. Modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonların bileşimleri Çizelge 3.6'da sunulmuştur. Bu terkibe uygun etkin maddeler kullanılarak, tüm lipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar "Etozom" olarak ifade edilecektir.

FORMÜLASYON	L- α -Fosfotidilkolin (egg) (mg)	Kolesterol (mg)	Etanol (mL)	Propilenglikol (mL)
Etozom 1	50	6.2	1.4	0.1
Etozom 2	50	6.2	1.4	0.2
Etozom 3	50	6.2	1.8	0.1
Etozom 4	50	6.2	1.8	0.2

Çizelge 3.6 Modifiye edilmiş, etanol enjeksiyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonların terkibi

Etozomların hazırlanmasında, lipozomlar hazırlanırken optimize edilen koşullar (lipid türü, organik faz ve sulu faz) tercih edilmiş ve formülasyonların hazırlığı aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Nisin ve AZM derişimleri, her iki hazırlama metodunda da nihai formülasyonda sabit tutulmuştur. Şekil 3.2'da modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yönteminin uygulanması ve formülasyonlara ait görseller sunulmuştur.



Şekil 3.2 Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yönteminin Deney Düzenegi (a); Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ile Hazırlanan Örnekler (b)

3.2.4. Lipozom Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Lipozomal formülasyonların partikül büyüklüğü (PS), zeta potansiyeli (ZP) ve polidispersite indeksi (PDI) lazer ışık saçılımı prensibi ile çalışan Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile belirlenmiştir (Malvern Instruments, Malvern UK). Ölçümler üç tekrarlı ve 10 ölçüm olarak gerçekleştirilmiş, $AVG \pm STD$ olarak sunulmuştur.

3.2.4.1. Lipozomal Formülasyonların Morfolojik Karakterizasyonu

Lipozom formülasyonlarının morfolojik karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak yapılmıştır. Lipozom formülasyonundan $10 \mu L$ 'lik numune, bakır grid üzerine damlatılmış ve yaklaşık 1 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda yüzeyde kalan fazla numune filtre kağıdı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ardından %1 'lik fosfotungstik asit damlatılarak kontrast artırıcı boyama yapılmıştır [82]. 1 dakikanın sonunda fazla boya kalıntısı filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve örnekler kurumaya bırakılmıştır. Örnekler kuruduktan sonra TEM (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM) ile görüntülenmiştir.

3.2.5. Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Lipozomların AZM ve nisin yükleme kapasitesini belirlemek için öncelikle ultrasantrifüj yöntemi uygulanmıştır. AZM yüklü lipozom formülasyonu için literatürde uygulanan santrifüj parametreleri, hız ve süre açısından birbirinden farklılık göstermektedir[27, 53]. Nisin için santrifüj koşulları, literatürde 20.000 g'de 10 dakika olarak rapor edilmiştir[83]. Bu literatür verileri gözönüne alınarak, 120.000 g'de, 2 farklı sürede santrifüj uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu amaçla; tüm formülasyonlara 20000 rpm ve 42000 rpm hız(rötar ve ultrasantrifüj kullanım klavuzuna göre 42000 rpm yaklaşık 120000 g); 30 dakika ve 1 saat süre kombinasyonlarında ultrasantrifüj uygulanmıştır. Ancak kombine lipozom formülasyonunun bu santrifüj hızlarında çökmediği belirlenmiştir. Bu nedenle yükleme kapasitesini belirlemek için ultrasantrifüj yönteminden vazgeçilerek, literatürde hem AZM hem de nisin için kullanılan ultrafiltrasyon yöntemi tercih edilmiş ve tüm formülasyonlara uygulanmıştır[24, 45, 53].

Literatürde, hem nisinin ve hem de AZM'in yükleme kapasitesini belirlemek için 10.000 Dalton cut-off değerine sahip santrifüj filtrelerinin kullanıldığı belirlenmiştir [45, 53]. Kombine lipozom formülasyonunun yükleme kapasitesini belirlemek için aynı filtre ve santrifüj koşulları altında her iki aktif maddeyi belirlemek önem taşımaktadır. Bu amaçla lipozom formülasyonları, Microcon-10kDa santrifüj filtresi kullanılarak 13.900 g'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş, nisin ve AZM analizi, filtreden geçen örneklerde madde miktarı belirlenerek gerçekleştirilmiştir. Lipozomların enkapsülasyon etkinliği indirekt yöntem ile belirlenmiştir.

$$EE(\%) = \frac{\omega_i - \omega_f}{\omega_i} \times 100 \quad (5)$$

EE: Enkapsülasyon etkinliği

ω_i : Toplam etkin madde miktarı

ω_f : Sulu fazda filtreden geçen (serbest) etkin madde miktarı

3.2.6. Lipozom Formülasyonlarının Stabilité Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlar +4°C'de 3 ay boyunca saklanmış ve belirli aralıklarla (1. gün, 1. hafta, 1. ay, 3. ay) PS, ZP ve PDI ölçümleri yapılmış, stabiliteleri ICH-Q1 stabilite kılavuzuna göre değerlendirilmiştir[84].

PDI değeri, formülasyonun homojenliği hakkında bilgi sağlarken, ZP değeri ise formülasyonun stabilitesi hakkında bilgi vermektedir[85].

3.2.7. *In Vitro* Salım Çalışmaları (IVRT) ve Kinetik Değerlendirmeler

In vitro salım çalışmaları Manian ve ark. uyguladığı gibi 5 mL donör faz hacmine sahip Franz Difüzyon hücrelerinde[86] rejenere edilmiş selüloz membran (SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO, 16 mm I.D.) kullanılarak +32°C'de, donör bölmeye 500µL örnek eklenmiş; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24. saatlerde 300µL numune alınmış ve yerine hemen aynı miktarda taze reseptör ortamı eklenerek 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

IVRT ve IVPT deneylerinde sink koşul, reseptör sıvısındaki çözünürlüğün, son örnekleme zamanında alınan örnekteki ilaç konsantrasyonundan en az 5 ila 10 kat daha yüksek olması gerektiği anlamına gelir[87]. Bu sayede, aktif bileşenin salım hızı, ilaç çözünürlüğü tarafından sınırlanmaz. Genel uygulama, deney boyunca sink koşullarının sağlanması için ilacı yüksek kapasitede çözebilen bir çözücü veya çözücü karışımı seçmektir. Lipofilik ilaçların salım ve permeasyon deneylerinde sink koşulun sağlanabilmesi için reseptör faza etanol eklemek bir yöntem olmakla birlikte, etanolün IVPT testlerinde deri geçirgenliğini arttırdığı bilindiğinden, diğer yöntem olan reseptör faza sürfaktan ekleme yöntemi tercih edilmiştir. Bu amaçla Bose ve ark. tarafında lipofilik ilaçların salımında kullanılan %1 oranında Tween 20 içeren PBS (pH: 7.4), reseptör faz olarak tercih edilmiştir[88]. Şekil 3.3'de Franz difüzyon hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmaları deney dizaynı yer almaktadır.

Lipozomal formülasyonlar ve AZM kontrol, kütlece %1 oranında AZM içerecek şekilde hazırlanmış, ardından liyofilize edilerek Carbopol jel matrisine yüklenmiştir. Jel formülasyon bileşimi şu oranlarda oluşturulmuştur: %1 AZM, %10 Carbopol, %4 etanol, %10 gliserol ve %1.5 Triisopropanolamin. Geri kalan oran, saf su ile tamamlanmıştır. Aşağıda yöntemin detayları verilmiştir:

Karıştırma Aşaması: Su, gliserol ve Carbopol, manyetik karıştırıcı kullanılarak 20 dakika boyunca yavaş hızda karıştırılmıştır.

Liyofilize Lipozom Eklenmesi: Eğer jel, lipozomal formülasyonlar ile hazırlanacaksa, liyofilize edilmiş lipozomlar uygun miktarda suda çözülerek karışıma eklenmiştir. Bu aşamanın ardından etanol ilave edilmiş ve işlem 10 dakika daha karıştırılarak devam ettirilmiştir.

AZM Çözeltisi Eklenmesi: Jel, doğrudan AZM ile hazırlanacak ise, AZM'nin etanol çözeltisi karışıma eklenmiş ve işlem 10 dakika daha karıştırılarak devam ettirilmiştir.

Jel Oluşumu ve pH Ayarı: Zayıf jel yapısında olan karışım Triisopropanolamin çözeltisi eklenerek hem karışımın pH'sı ayarlanmış hem de polimerizasyon ile istenen jel yapısı elde edilmiştir.

Bu yöntem, lipozomların kontrollü salım sistemlerinde etkin bir taşıyıcı olarak kullanılmasına olanak tanır ve AZM'nin etkili bir şekilde dermal veya lokal uygulanması için optimize edilmiştir.



Şekil 3.3 *In vitro* salım çalışmaları deney dizaynı

Salım testlerine başlamadan önce, belirli miktarda nisin, su ve %1 Tween 20 içeren PBS çözeltilerinde çözülmüş ve CBQCA testi ile nisinin standart grafiği oluşturulmuş ve madde miktarı analiz edilmiştir. Salım ortamı CBQCA testini etkilemediği belirlenmiştir. Ayrıca AZM miktar tayin yöntemi olan HPLC koşullarında salım ortamının yöntem girişim yapmadığı deneysel olarak incelenmiştir.

Kinetik değerlendirmeler kapsamında, formülasyonlardan etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla, salım verilerine dört farklı kinetik model (Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell) uygulanmış ve her bir model için salım hız sabiti değerleri (k) ve determinasyon katsayıları (r^2) hesaplanmıştır (Çizelge 4.18). 1'e en yakın r^2 değerlerine göre salım kinetiği modeline karar verilmiştir.

3.2.8. *In Vitro* Permeasyon Çalışmaları (IVPT)

IVPT çalışmaları, Franz Difüzyon hücrelerinde insan kadavrası porterior torso bölgesinden elde edilen deri (The New York Firefighters Skin Bank (USA)) kullanılarak Puri ve ark. bildirildiği koşullarda gerçekleştirilmiştir[89]. Salım ortamında AZM'nin tam çözünürlüğünü sağlamak için reseptör bölmesi %1 Tween 20 (V/V) içeren 5 mL PBS

(pH 7.4) ile doldurulmuştur; donör bölmesine ise 0.5 mL formülasyon eklenmiştir. Salım çalışması +32°C’de, 24 saat süreyle gerçekleştirilmiş ve belirli zaman aralıklarında 300 µL numune alınmış ve yerine hemen aynı miktarda taze reseptör ortamı eklenmiştir. Alınan numunelerin AZM ve/veya nisin miktarı uygun yöntem ile tayin edilmiştir.

3.2.9. *Ex Vivo* Penetrasyon ve Floresan Mikroskop Görüntüleme Çalışmaları

Ex vivo penetrasyon görüntüleme çalışmaları, IVPT koşullarında CBQCA testinin nisine spesifik olmamasından dolayı, nisinin deri permeasyon davranışını belirlemek için alternatif bir yöntem olarak uygulanmıştır. IVRT’de kullanılan reseptör ortam koşullarında Franz hücreleri ve kadavra derisi kullanılarak IVPT deney koşulları oluşturulmuştur.

Floresan mikroskop yöntemi, lipozom formülasyonunun deri tabakalarındaki penetrasyon/permeasyon profili hakkında bilgi edinmek için alternatif bir yöntem olarak uygulanmaktadır[90]. Daha önce yapılan iki floresan boya ile işaretli peptid yüklü lipozom formülasyonunun lazer irritasyonuna maruz kalan derideki penetrasyonu incelenmiştir[91]. Bu çalışmadan yola çıkarak nisin fluorescein izotiyosiyanat (FITC) kullanılarak işaretlenmiştir. Lipozom yapısına katılan lipidleri işaretlemek için lipofilik boya olan tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI18) kullanılmıştır.

FITC ile peptid yapısındaki nisin EZLabel Protein FITC Labeling Kit kullanılarak lipozom hazırlama prosedüründen önce işaretlenmiştir.

Lipofilik DiI18 fosfolipid ve kolesterolün bulunduğu organik faz içinde çözülmüş ve rotavapor ile ince tabaka yapısı oluşturulmuştur. FITC ile işaretlenmiş nisin, sulu fazda çözülerek ince tabaka hidrate edilmiştir. Sonikasyon yapıldıktan sonra, formülasyona bağlanmamış serbest boyalar, Microcon-10kDa santrifüj filtre kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Filtre daha sonra ters çevrilmiş ve yeni bir santrifüj tüpüne filtredeki formülasyon toplanmıştır. İki farklı boyayla işaretlenmiş lipozom formülasyonu, IVPT koşullarında hazırlanan Franz difüzyon hücrelerindeki deriye uygulanmıştır.

Franz difüzyon hücreleri hazırlığında, çözünmüş kadavra derisi Franz difüzyon hücresine yerleştirilmiş, reseptör ortam olarak %1 Tween 20 içeren PBS kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak, deri yapısından kaynaklı otofloresansı belirlemek için Franz hücresinin donör bölmesine sadece su eklenerek kontrol numunesi hazırlanmıştır. İşaretli formülasyon, aynı koşullarda hazırlanan Franz hücresinin donör bölmesine eklenmiştir. Sıcaklık ve ışık boyların floresans özelliğini etkilediğinden, IVPT işlemi 4 saat boyunca devam etmiştir.

Bu sürenin sonunda Franz difüzyon hücresindeki deri, PBS çözeltisi ile yıkanmış, deri üzerindeki fazla formülasyon uzaklaştırılmıştır.

İşaretli formülasyonun ve nisinin deri tabakalarında dağılımı için 2 farklı görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Z-Stack görüntüleme için deri tabakası lam üzerine SC tabakası üstte kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Görüntüleme boya stabilitesi gözetilerek hemen alınmıştır. Görüntüleme, yeşil ve kırmızı dalga boylarında floresan için uygun filtrelere sahip floresan mikroskobu ile alınmıştır.

Deri kesit görüntüleme çalışmaları için numune hazırlığında mikrotom kullanılmıştır. Mikrotom ile kesit alabilmek için deri örnekleri, kriyo kesim için kullanılan jel yapısındaki özel maddeye (Tissue-Tek O.C.T) uygun pozisyonda gömülmüş ve hızlı bir şekilde -80°C 'de dondurulmuştur. En az 24 saat -80°C 'de dondurulan numunelerden, mikrotom yardımıyla $10\ \mu\text{m}$ kalınlığında kesitler alınmıştır. Hem kırmızı hem de yeşil dalga boylarındaki görüntüleri işleyebilen dedektör donanımına sahip floresan mikroskop ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Tüm örnekler için floresan mikroskop ayarları sabit tutulmuş, analizler aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca analizler için aynı donöre ait kadavra derisi kullanılmıştır. Numune hazırlama adımlarının bazıları Şekil 3.4'de sunulmuştur.



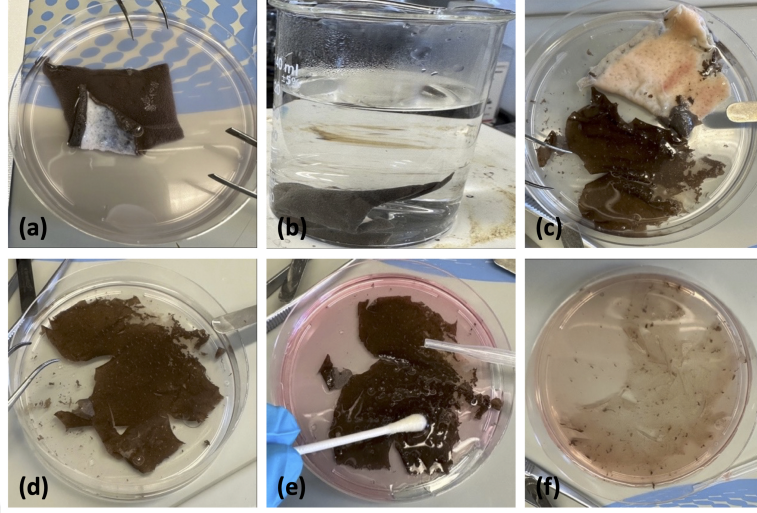
Şekil 3.4 Floresan mikroskop görüntüleme çalışmaları için numune hazırlığı(a); ECHO Revolve Mikroskop (b)

3.2.10. Formülasyonların Biyoyumluluğunun Değerlendirilmesi

Boş Lipozom, nisin yüklü, AZM yüklü ve kombine lipozomların biyoyumluluğu, AlamarBlue® testi kullanılarak HaCaT hücre hattı (İnsan Keratinositler, AddexBio) ve insan dermal fibroblast hücre hattında değerlendirilmiştir. Hücreler, 96 kuyucuklu düz tabanlı kültür plakalarına, yoğunluğu 10000 hücre/kuyu içeren konsantrasyonlarda, %1 FBS'li DMEM besi yeri içerisinde gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında, lipozom formülasyonları ve serbest ilaç çözeltileri ile %1 FBS'li DMEM ile seyreltilmiş ve 100 µL ilgili çözeltiler kuyucuklara eklenmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Formülasyon içermeyen sadece %1 FBS'li DMEM eklenen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Formülasyonlar ile inkübasyonun sonunda, 10 µL AlamarBlue® eklenmiş ve 3 saat inkübe edildikten sonra mikropate floresan ölçüm özellikli bir mikropata okuyucuyla (Tecan Spark 10M) 540/590 (uyarma/emisyon) dalga boyunda ölçülmüştür[92].

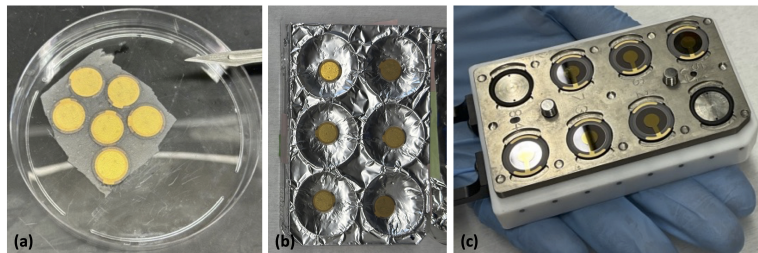
3.2.11. Kuartz Kristal Mikrobals - Dissipasyon (QCM-D) Çalışmaları

QCM-D deneylerinde kullanılmak üzere, öncelikle kadavra derisinden SC tabakası ayrılmıştır. Deriye sırayla Şekil 3.5'deki işlem basamakları uygulanmıştır. Bu amaçla öncelikle kadavra derisi PBS içerisinde çözdürülmüştür(Şekil 3.5a). Daha sonra 60 °C sıcaklıktaki distile suda 2 dakika boyunca bekletilmiştir(Şekil 3.5b). Petri kabı içine alınan deri, düz uçlu bir spatula kullanılarak dermis ve epidermis tabakalarına ayrılmıştır(Şekil 3.5c). Epidermis tabakasının SC yüzeyi petri kabına temas edecek şekilde petri kabına serilmiştir(Şekil 3.5d). Epidermis tabakasındaki SC dışındaki diğer katmanların uzaklaştırılması için tripsin uygulanmıştır(Şekil 3.5e). Tripsin damla damla eklenerek tüm tabakaya temas etmesi sağlanmış ve etki etmesi için 10 dakika beklenmiştir. Pamuklu çubuklar kullanılarak SC tabakasından ayrılan katmanlar, narince uzaklaştırılmıştır. Distile su ile tripsin ve diğer tabaka kalıntıları, SC'ye dokunmadan pipet ile uzaklaştırılmıştır. Tüm kalıntılar uzaklaşana kadar bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır(Şekil 3.5f). Tripsin eklenmesinden sonra, SC izolasyon işlemi en fazla 30 dakikada tamamlanmıştır.



Şekil 3.5 Kadavra derisinden Stratum Corneum tabakasının izolasyonu

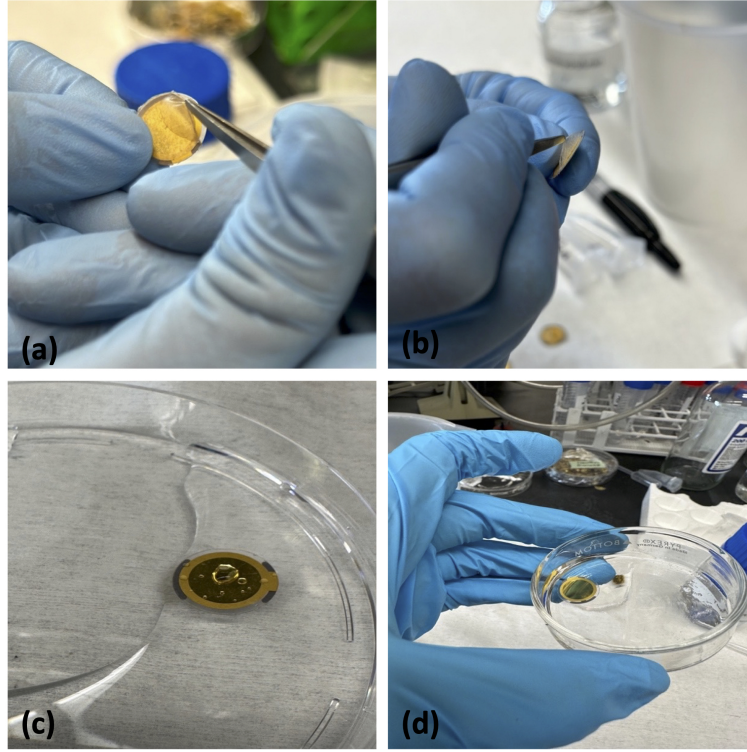
SC tabakası, QCM-D analiz aşamasında kristal yüzeyinden ayrılmaması için, akrilik yapıştırıcı ile kristal yüzeyine yapıştırılmıştır. Kristal üzerindeki artan kütle frekans değişimini belirlemeye engel olacağından, akrilik yapıştırıcı (DURO-TAK 87-900A; Henkel Corporation), tetrahidrofuran (THF) ile seyreltilmiş (Yapıştırıcı:THF; 1:16) ve kristal üzerine döndürerek kaplayan bir cihaz yardımıyla (3000 devir/dakika hızında 30 saniye) homojen ve ince bir film şeklinde kaplanmıştır. 50 μ L seyreltilmiş yapıştırıcı çözeltisinin, kuartz kristaline kaplamak için yeterli olduğu ön denemelerle belirlenmiştir. Yapıştırıcı ile kaplanmış kuartz kristal, oda sıcaklığında vakumlu inkübatörde bir gece boyunca bekletilmiştir. SC, bu kuvars kristal üzerine yapıştırılmış, kristal yüzeyinin dışına çıkan, SC tabakası kesilerek uzaklaştırılmıştır(Şekil 3.6). Bu aşamada, kuartz kristalini kaplayan SC tabakasının hasar görmemiş olması ve SC ile kuartz kristal arasında hava kabarcığı bulunmaması deney açısından önemli bir adımdır.



Şekil 3.6 SC ile modifiye edilmiş kuartz kristalin hazırlık adımları

Boş kuartz kristal, yapıştırıcı uygulanmış kuartz kristal ve SC yapıştırılmış kristallerin her adımda QCM-D ölçümü yapılarak kristal üzerindeki kütle değişimi belirlenmiştir. Ayrıca cihazın 5 overtona kadar (11 harmoniye kadar) sinyal üretebildiği görülmüş, tüm işlemlerden sonra kristalin QCM-D cihazı ile kütle ve enerji değişimini ölçebileceği aralıkta kaldığı belirlenmiştir. Lipozom formülasyonlarının oluşturacağı sinyali belirleyebilmek için bu aralıkta kalması önemlidir. Daha sonra, lipozom formülasyonları, bu kuartz kristallerinin SC'ye bağlı yüzeyine uygulanarak elde edilen sinyaller QCM-D yazılımı aracılığıyla işlenmiştir.

Lipozom formülasyonu ile QCM-D hücresinde ölçüm yapıldıktan sonra, SC tabakası, kristal üzerindeki SC'nin yapışmasını test etmek için cımbız kullanılarak kristalden ayrılmıştır Şekil 3.7(a,b). Optimize edilmiş yapıştırıcı derişiminde, SC'nin ölçüm boyunca QCM-D kristaline sıkı bir şekilde yapıştığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.7 Kuartz sensör üzerine yapıştırılan SC tabakasının stabilitesi ve özellikleri

Kristal yüzeyine yapıştırılan SC'nin, yüzeydeki suyun damlacıklar halinde toplanması

hidrofobik özellikler sergilediğini göstermektedir(Şekil 3.7(c)). Ayrıca, SC tabakası üzerine uygulanan organik bir çözücü olan THF, yüzeyi tamamen kaplamış ve böylece SC tabakasının hidrofobikliği doğrulanmıştır(Şekil 3.7(d)). SC'nin hidrofilik karakterinin, vücudun bulunduğu bölgeye bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir[93].

3.2.12. Mikrobiyoloji Çalışmaları

3.2.12.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Formülasyonların in vitro antimikrobiyal aktivitesi, agar kuyu difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon sıvı besi yeri duyarlılık testi kullanılarak *S. aureus* ATCC 29213'e karşı test edilmiştir.

Agar kuyu difüzyon deneyi, taze kültürlerden hücrelerin toplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Standart hücre süspansiyonu, bulanıklık 0.5 McFarland (1.5×10^8 cfu/mL)'a ayarlanarak hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonu, steril bir pamuklu çubukla Mueller Hinton Agar (MHA) içeren petri kabına inoküle edilmiş, petri kabındaki agarın merkezinde 6 mm'lik kuyular hazırlanmıştır. Bu kuyulara 50 μ L formülasyon eklenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından zon çapları ölçülmüştür.

Formülasyonların minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzlarına göre steril 96-kuyulu mikropaklar içerisinde steril besi yeriyle mikrodilüsyon yapılarak belirlenmiştir[94]. Kısaca, kontroller ve formülasyonlar seri seyreltme yöntemi ile iki kat seyreltilmiştir. AZM için 1000 μ g/mL ila 0.49 μ g/mL arasında; nisin için 50 μ g/mL ila 0.02 μ g/mL arasında etkin madde içeren formülasyonlar ve aynı etkin madde miktarlarındaki kontrolleri Mueller Hinton Broth (MHB) besi yeri ile 96-kuyulu polistiren plakalarda hazırlanmıştır.

Bakteri süspansiyonları, taze *S. aureus* ATCC 29213'ün gece boyu inkübe edilen kültürü kullanılarak, 0.5 McFarland bulanıklığına sahip standart süspansiyona ayarlanmıştır. Bu da son hücre yoğunluğunun 5×10^8 kob/mL olduğu anlamına gelmektedir. MIC sonuçları, 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından değerlendirilmiştir.

3.2.12.2. Anti-biyofilm Aktivite Testi

Formülasyonların MIC'ları yalnızca planktonik bakterileri kapsadığından ve biyofilm azaltmak veya yok etmek için gereken konsantrasyonlarla uyuşmadığından, formülasyonları *S. aureus* ATCC 29213'ün önceden oluşturulmuş biyofilmi üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEC) aktivite testi bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır[95, 96]. Kısaca, %1 glukoz ile zenginleştirilmiş besi yeri ile hazırlanan 100 µL (5x10⁶ cfu/mL) bakteri süspansiyonu her bir kuyuya eklenmiştir. Biyofilm gelişimine izin vermek için çok kuyulu plakalar, 37°C'de 100 rpm çalkalama hızında, 24 saat inkübe edilmiştir. Biyofilm eradikasyon deneyi için plakalardaki sıvı kültürler biyofilme zarar vermeden uzaklaştırılmış ve film tabakası 1 kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonraki adım için formülasyonların farklı konsantrasyonları seri seyreltme yöntemi ile hazırlanmış ve film oluşturulan plakadaki ilgili kuyulara transfer edilmiştir. Plakalar, 24 saat boyunca (37°C, 100 rpm) tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, biyofilm biyokütlesi kristal violet boyaması yöntemiyle belirlenmiştir. Formülasyonlar kuyulardan nazikçe dökülerek kağıt havluların üzerine yerleştirilmiş ve her kuyu, PBS ile üç kez nazikçe yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Her kuyuya %0.1 kristal violet boyası eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Kuruduktan sonra, her kuyuya 100 µL %30 glasiyel asetik asit eklenerek plakalar oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Plakaların her kuyusundaki içerik, yeni bir steril düz tabanlı mikroplakaya transfer edilmiş ve optik yoğunluğu (OD) 595 nm (OD595) dalga boyunda ölçülmüştür. Negatif OD elde edilirse, sıfır olarak sunulmuştur. Deneyler, üç tekrarla iki kez gerçekleştirilmiştir. Deney setlerine sterilite kontrolü ve negatif kontroller (yalnızca *S. aureus*) de dahil edilmiştir. Boş lipozomlar için de antimikrobiyal aktivite testleri uygulanmıştır.

Antibiyofilm aktivitesi, formülasyon uygulanmayan negatif kontrole göre aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$\text{Biyofilm Eradikasyonu (\%)} = \left(1 - \frac{OD595_{\text{örnek}}}{OD595_{\text{kontrol}}}\right) \times 100 \quad (6)$$

3.2.13. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı (10.2.3) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. Verileri analiz etmek için t-testi, tek-yönlü veya çift-yönlü ANOVA ile Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Yıldızlar, kontrollerle ilgili lipozom formülasyonları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklarını belirtmektedir (****p < 0.0001, ** = p < 0.01, *p < 0.05).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması altı temel başlıkta özetlemiştir. Bu kapsamda:

- AZM ve nisin yüklenmiş lipozom formülasyonlarının hazırlanması ve karakterizasyonu;
- Formülasyonların topikal/intra dermal uygulama potansiyelinin IVRT çalışmaları ile incelenmesi;
- Formülasyonların IVPT ve *ex vivo* deri görüntüleme çalışmaları ile deri permeabilite özellikleri ve deri katmanlarındaki lokalizasyonunun belirlenmesi;
- Dermal Fibroblast ve keratinosit hücre hatlarında formülasyonların biyouyumluluğunun belirlenmesi;
- Formülasyonların derinin en üst katmanı olan SC tabakası ile etkileşiminin QCM-D çalışmaları ile belirlenmesi;
- Formülasyonların antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi;

ile elde edilen bulgular bu bölümde sunulmuş ve daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla birlikte karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri ve Miktar Tayini için Analitik Yöntem Validasyonu

4.1.1. Azitromisin'in Çözünürlük ve Lipid-Su Dağılım Katsayısının Belirlenmesi

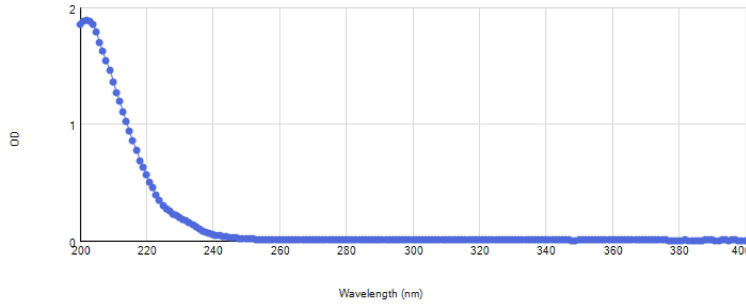
Çözünürlük çalışmaları için AZM çözünürlüğü dört farklı çözücü ortamında incelenmiş ve bu ortamlar için; AZM'nin çözünürlüğü etanolde > 141.213 mg/mL, suda 0.524 mg/mL, PBS'de 0.495 mg/mL ve %1 Tween 20 içeren PBS ortamında 0.798 mg/mL

olarak belirlenmiştir. AZM'nin suda düşük çözünürlük göstermesi literatür ile uyumluluk göstermektedir[97]. PBS'in nötral pH'daki iyonik yapısı değerlendirildiğinde PBS içerisindeki çözünürlüğü sudaki çözünürlüğe yakın belirlenmesi beklenen bir sonuçtur. AZM'nin 556 mg/mL çözünürlüğe sahip olduğu ve etanol içerisinde oldukça iyi çözündüğü bildirilmiştir[98].

Bu çözünürlük verileri, permeasyon ve salım çalışmalarında (IVPT ve IVRT) sink koşulu sağlamak için dikkate alınmıştır. AZM lipid-su partiyon katsayısı oktanol:su ortamı için: 3152 (LogP=3.50); oktanol:PBS ortamı için 43.55 (LogD=1.64) olarak belirlenmiştir. Literatürde, AZM için logP değeri farklı ham maddelere ait olarak 2.4 ve 3.03 olarak bildirilmektedir[97]. Elde edilen logP değeri AZM'nin lipofilik karakterini doğrulamakta ve ham madde kaynağına bağlı olarak logP değerindeki bu değişim literatür verileri ile uyumluluk göstermektedir. LogD değeri LogP analizi ile aynı koşullarda gerçekleştirilmiş ancak su yerine PBS kullanılmıştır. PBS kullanılması, ortamın pH'sının AZM'nin lipid-su faz dağılımını değiştirdiğini göstermektedir.

4.2. Azitromisin Miktar Tayini için HPLC Yöntem Validasyonu

AZM'nin belirlenmesinde kullanılacak dalga boyunu belirlemek için, mobil faz içerisinde hazırlanmış AZM numunesinin absorbanansı, 200 ile 400 nm aralığında taranmış ve 4.1'de sunulmuştur.

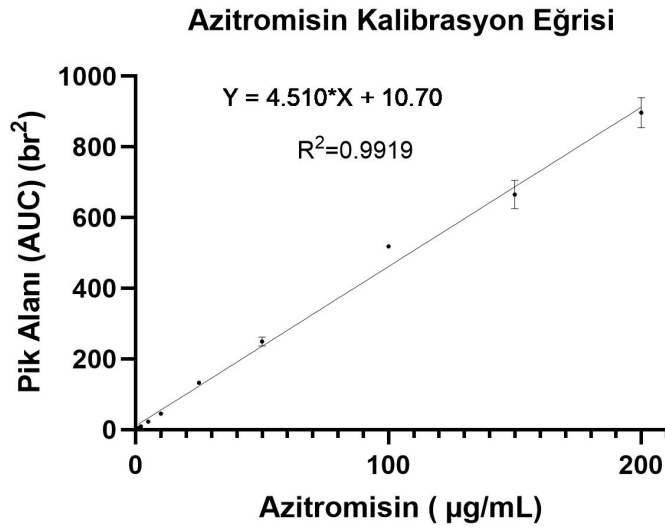


Şekil 4.1 AZM'nin 200-400 nm aralığındaki absorbanansı

AZM'nin en yüksek 203 nm dalga boyunda absorbans gösterdiği belirlenmiştir ve HPLC validasyon çalışmaları için 200 nm dalga boyu tercih edilmiştir.

Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı

Doğrusallığın belirlenmesi için 5-200 $\mu\text{g/mL}$ aralığında sekiz farklı konsantrasyonda ve üç tekrarlı hazırlanan numunelerin analizlerinden elde edilen eğri altı alan kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir, elde edilen standart grafiğin Şekil 4.2'te doğrusal ($R^2 = 0.9919$) olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.2 AZM'ye ait kalibrasyon eğrisi

Doğruluk ve Geri Kazanım

Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için 10, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde geri kazanım deneyleri yapılmıştır. Her derişimde elde edilen eğri altı alan (EAA) için, gerçek değer (GD) ve % geri kazanım (GK(%))'lar Çizelge 4.1'de sunulmuştur ve kabul kriterlerindeki gibi GK(%), $\pm\%10$ aralığında bulunmuştur.

	10 µg/mL			50 µg/mL			100 µg/mL		
	EAA	GD	GK(%)	EAA	GD	GK(%)	EAA	GD	GK(%)
1	61.02	10.63	106.32	271.10	50.01	100.02	545.30	101.41	101.41
2	61.07	10.64	106.42	269.60	49.73	99.46	545.20	101.39	101.39
3	61.49	10.72	107.21	272.80	50.33	100.66	545.40	101.43	101.43
4	60.98	10.62	106.25	271.90	50.16	100.32	545.50	101.45	101.45
5	60.80	10.59	105.91	271.30	50.05	100.10	546.40	101.61	101.61
6	60.84	10.60	105.99	271.10	50.18	100.15	545.80	101.50	101.50
AVG	61.03	10.63	106.35	271.45	50.08	100.15	545.80	101.50	101.50
RSD	0.40	0.44	0.44	0.40	0.41	0.41	0.13	0.13	0.13

Çizelge 4.1 AZM geri kazanım değerleri

Kesinlik

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik ölçümlerine ait veriler sırasıyla Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de sunulmuştur. Her derişim seviyesi için RSD sonuçları %2 den az değişim gösterdiğinden, yöntem kesinlik kriterini sağlamıştır.

Örnek Numarası	EAA	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)
1	534.2	99.3
2	531.8	98.9
3	527.1	98.0
4	528.5	98.3
5	528.3	98.2
6	526.2	97.8

STD: 0.57 RSD: 0.58

Çizelge 4.2 AZM ölçümünün gün içi tekrarlanabilirlik verileri

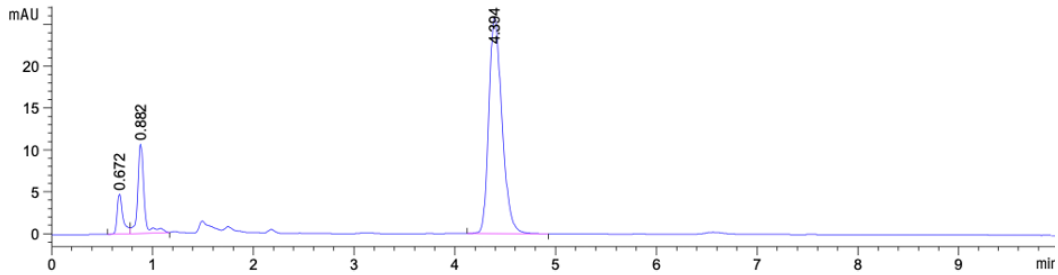
	1. Gün		2. Gün	
		100 µg/mL	EAA	GD
	EAA	GD	EAA	GD
1	534.2	99.3	526.2	97.8
2	531.8	98.9	526.7	97.9
3	527.1	98.0	526.8	97.9
4	528.5	98.3	525.9	97.8
5	528.3	98.2	526.2	97.8
6	526.2	97.8	526.9	98.0

STD: 0.38 RSD: 0.39

Çizelge 4.3 AZM ölçümünün günler arası tekrarlanabilirlik verileri

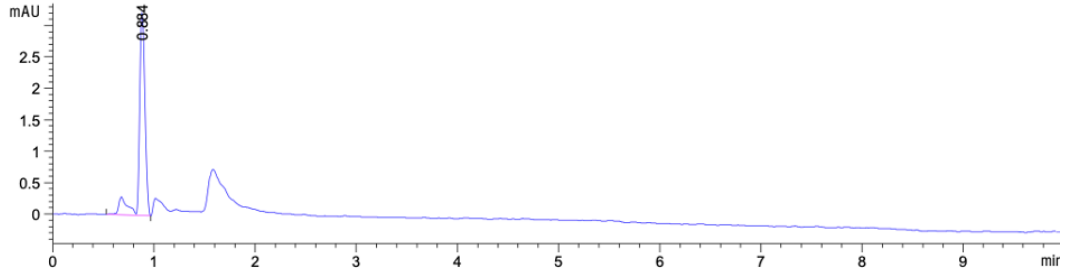
Spesifiklik

HPLC analiz yönteminin, AZM'ye spesifikliğini belirlemek için öncelikle AZM standart çözeltisinin kromatogramdaki alıkonma zamanı belirlenmiş ve Şekil4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.3 AZM standart çözeltisi (50 µg/mL) kromatogramı

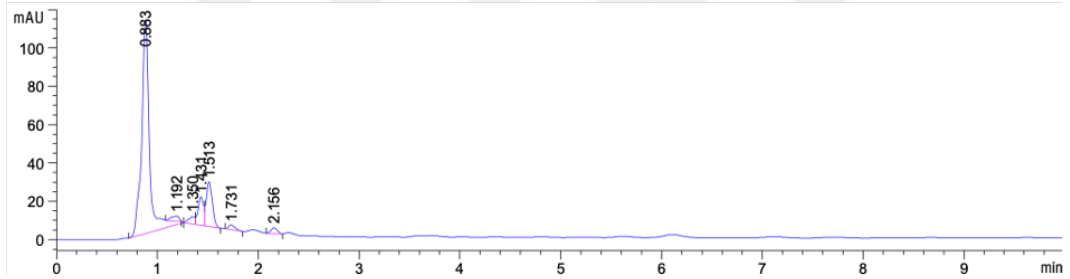
Hareketli faz analizi aynı koşullarda gerçekleştirilmiş ve kromatogramı Şekil 4.4'de sunulmuştur.



Şekil 4.4 Hareketli faz kromatogramı

Hareketli fazın AZM'ye ait alıkonma zamanında ve yakınında herhangi bir pike sahip olmadığı belirlenmiştir.

HPLC koşullarında analiz edilecek numunelerin, AZM alıkonma zamanına yakın pike sahip olup olmadığı, AZM dışında bileşenlere sahip olan nisin yüklü lipozom formülasyonunun analizi ile belirlenmiştir. Bu analize ilişkin kromatogram Şekil 4.5'da sunulmuştur.



Şekil 4.5 Nisin yüklü lipozom formülasyonunun kromatogramı

Nisin yüklü lipozom formülasyonunun HPLC analizine ilişkin kromatogramın, AZM alıkonma zamanında ve yakınında herhangi bir pike sahip olmadığı belirlenmiştir.

Aynı HPLC koşullarında elde edilen bu kromatogramlar değerlendirildiğinde, HPLC yönteminin AZM analizine spesifik olduğu görülmektedir.

Kararlılık

Belirli derişimdeki numune, 24 saat boyunca düzenli aralıklarla analiz edilmiştir. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.4'de sunulmuş, numuneye ait eğri altı alan (EAA) ve derişimde anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.

Zaman	EAA	Değişim (24 µg/mL)
0.5	130.0	23.6
3	133.3	24.2
5	132.4	24.0
10	134.1	24.3
14	131.5	23.8
18	136.1	24.7
23	136.2	24.7

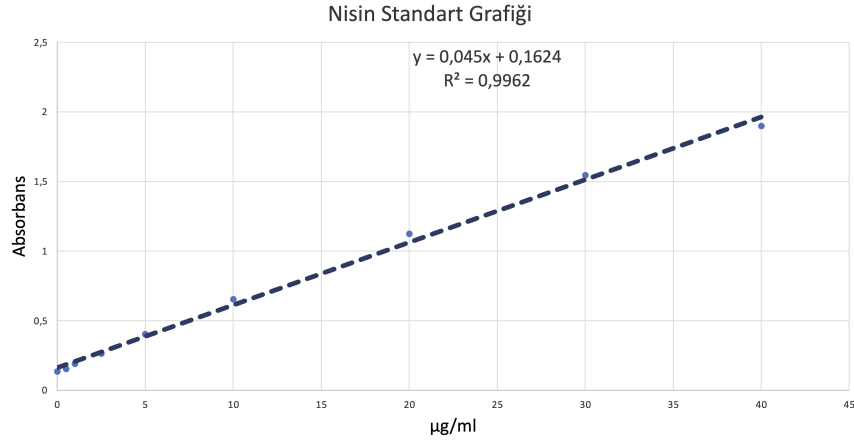
STD: 0.4 RSD: 1.66

Çizelge 4.4 Belirli zaman aralıklarında ölçüm yapılan AZM çözeltisinin stabilitesi

4.2.1. Nisin Miktar Tayini için Yöntem Belirleme Çalışmaları

4.2.1.1. Bikinkoninik Asit Protein Analiz (BCA) Kiti

Nisinin su ile hazırlanan çözeltilerinin BCA kiti ile analizi, sulu ortamda testin nisine seçicilik gösterdiği belirlenmiş ve kalibrasyon eğrisi Şekil 4.6'de sunulmuştur.



Şekil 4.6 Nisinin BCA kiti ile yapılan analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi

Nisin içeren lipozom formülasyonları, testin doğrusal çalışma aralığındaki derişimlere girecek şekilde su ile seyreltilmiştir. Formülasyon ortamında BCA testinin nisine spesifikliğini belirlemek için nisin içermeyen lipozom formülasyonları da analiz edilmiştir.

Formülasyon	Nisin GD (2.5µg/mL)	Absorbans	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
Boş Lipozom	–	3.0421	127
AZM Yüklü Lipozom	–	2.7928	116
Nisin Yüklü Lipozom	+	2.6977	112
Kombine Lipozom	+	2.8642	120

Çizelge 4.5 Lipozom Formülasyonlarında BCA kiti ile nisin analizi

Çizelge 4.5'te sunulan sonuçlar, lipozom formülasyonundaki bazı bileşenlerin kit reaktifi ile reaksiyona girdiğini göstermiştir. BCA analizi, nisin içermeyen formülasyonlar olan boş lipozom ve AZM yüklü lipozom formülasyonlarında yanlış pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca, BCA kiti nisin içeren lipozom formülasyonundaki gerçek değerden çok daha fazla nisin

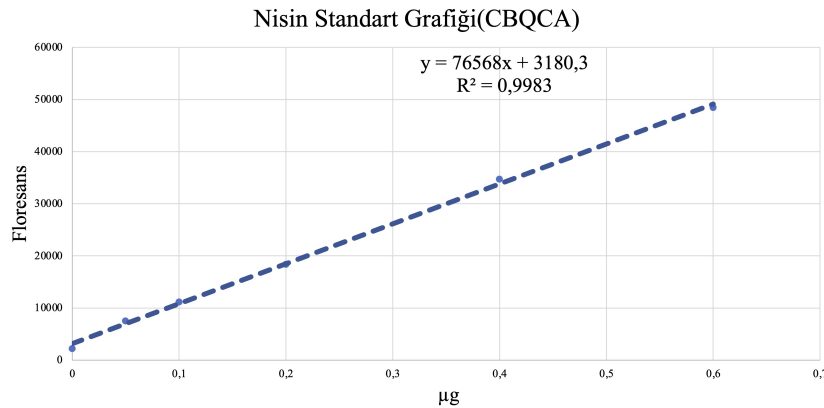
miktarı belirlemiştir. BCA kitinin lipozom formülasyonundaki nisin miktarını belirlemek için uygun bir yöntem olmadığına karar verilmiştir.

4.2.1.2. CBQCA Protein Miktar Tayin Kiti

CBQCA kitinin çalışma prensibi, protein bileşimine güçlü derdece bağımlılık gösterir. Proteinlerin birim kütle başına sahip olduğu primer amin konsantrasyonundan da bağımsız olarak proteinin üç boyutlu yapısı ele alındığında, bazı aminlerin yüzeyde yer almaması protein yapısındaki tüm aminler eşit derecede reaktif olmamasına neden olur[78]. Floresan spektroskopi temeline dayanan protein analiz yöntemlerinde protein katlanması ve florofor özellik gösteren reaktifin proteine bağlanması analizi etkileyen önemli adımlardan biridir[99]. CBQCA kit içeriğinde standart olarak sunulan sığır serum albumi (BSA) tercih edilmemiş CBQCA analizi proteinlerin doğal yapısındaki koşullarda gerçekleştirildiğinden, analiz standartı olarak nisin tercih edilmiştir.

CBQCA kitinin su ile hazırlanan nisin çözeltilerini analiz edebildiği belirlenmiş ve kalibrasyon eğrisi Şekil 4.7’de sunulmuştur.

CBQCA yöntemi nisin standardı ile validasyon yapılmış ve elde edilen standart grafiğinin tespit aralığında doğrusal olduğu belirlenmiş ve her analizden önce test koşullarında hazırlanan standart grafiğin R^2 değerinin 0.99 dan yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Nisinin CBQCA kiti ile yapılan analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi

Nisin içeren lipozom formülasyonları, testin doğrusal çalışma aralığındaki derişimlere girecek şekilde su ile seyreltilmiştir. Formülasyon ortamında CBQCA testinin nisine spesifikliğini belirlemek için nisin içermeyen lipozom formülasyonları da analiz edilmiştir. Bu analize ilişkin veriler Çizelge 4.6’da sunulmuştur. Nisin içeren formülasyonlar için testin güven aralığında çalıştığı belirlenmiştir.

Formülasyon	Nisin	Floresan	Hesaplanan Derişim ($\mu\text{g/mL}$)
Boş Lipozom	—	2384	0
AZM Yüklü Lipozom	—	2784	0

Çizelge 4.6 Lipozom Formülasyonlarında CBQCA kiti ile nisin analizi

Analiz sonuçları, CBQCA test kiti bileşenlerinin lipozom formülasyon bileşenleri ile reaksiyona girmediği belirlenmiş, CBQCA kitinin lipozom bileşenleri varlığında nisini tespit ettiği görülmüştür.

CBQCA analiz kitinin nisine spesifikliğı, IVPT çalışmalarındaki reseptör ortamları olan PBS ve %1 Tween 20 içeren PBS koşullarında da değerlendirilmiştir. Nisin, reseptör faz ile seyreltilerek standart kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve bu koşullarda derişimi bilinen nisin ve nisin içeren formülasyon analiz edilmiştir. Deney koşullarında değerlendirilen CBQCA testinin nisin analizi için uygun olduğu belirlenmiştir.

IVPT çalışmalarında CBQCA testi, kadavra derisinden gelen protein içeriğinin girişim yapması nedeniyle çalışmamıştır. IVPT çalışmalarında nisin tespiti için diğer proteinlerin varlığında nisini belirleyebilmek için literatürde bildirilen koşullarda HPLC gradient yöntemi geliştirme çalışmaları yapılmıştır[79, 80].

4.2.1.3. Nisin Miktar Tayini için HPLC Yöntemi

50 $\mu\text{g/mL}$ nisin çözeltilisinin gradient HPLC analizine ait kromatogramda Şekil 4.8’da

temel amacı olan IVPT reseptör faz koşullarındaki düşük nisin derişimini belirlemek için yetersiz kalmıştır. Analitik saflıkta nisin temin edilse dahi, çalışma koşullarda, nisin analizi için uygun bir yöntem olmadığına karar verilmiştir.

Nisin tespiti için, literatürde ve ISO/TS 27106:2009'da kullanılan LC-MS/MS (Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) yönteminin uygulanabilirliği, IVPT koşullarında incelenmiştir[100–102]. Ancak yöntem geliştirme çalışmaları başarısız olmuştur.

4.3. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

4.3.1. Lipozom Hazırlama Parametrelerinin Formülasyon Özellikleri Üzerine Etkisi

Ortam pH'sinin nisin çözünürlüğü ve stabilitesini etkilediği bildirilmiştir[103]. Formülasyon, farklı pH'lerde sulu faz kullanılarak hazırlanmış ve pH'lerin formülasyon özellikleri üzerindeki etkisi Çizelge 4.7'da sunulmuştur.

Formülasyon	pH	PS(nm)	ZP(mV)	PDI
(Lipit:Kolesterol–8:2)		AVG±STD*	AVG±STD*	AVG±STD*
L-α-Fosfotidilkolin(soybean)	7 (PBS)	195.7±2.329	0.482±0.144	0.468±0.019
	5.4 (PS)	237.0±3.349	1.07±0.474	0.664±0.06
Fosfolipon 90G	7 (PBS)	159.8±2.950	-14.6±0.306	0.454±0.023
	6.2 (UPW)	151.5±1.900	-20.6±0.231	0.465±0.019
	5.4 (PS)	189.3±15.69	2.03±1.06	0.730±0.045
L-α-Fosfotidilkolin(egg)	7 (PBS)	226.8±3.509	-0.450±0.786	0.641±0.037
	6.2 (UPW)	175.7±0.5859	-9.06±0.445	0.538±0.007
	5.4 (PS)	279.4±11.48	-0.648±1.33	0.825±0.057
Lipoid S100	7 (PBS)	5525±773.2	-0.150±0.636	0.840±0.040
	5.4 (PS)	184.4±9.304	1.16±0.388	0.515±0.107
DPPC	7 (PBS)	231.4±4.335 -	0.479±0.532	0.629±0.013
	5.4 (PS)	9328±1840	1.36±0.930	0.741±0.221

Çizelge 4.7 Nisin yüklü lipozom formülasyonlarının özellikleri üzerinde pH'nın etkileri(*n=3)

Uygun organik çözücünün belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, lipozom hazırlama prosedüründe organik çözücü olarak yaygın kullanılan kloroform ile başlanmıştır. Kloroformun lipozom hazırlanırken organik çözücü olarak kullanıldığı durumda, AZM kloroform içinde kolayca çözülmüş ve ince tabaka oluşturulmuştur. Ancak, ince tabaka yapısının üzerine nisin içeren sulu fazın eklenmesinden sonra, formülasyonda agregat yapıları gözlenmiştir. Bu yapılar, sonikasyon sonrası dağılmasına rağmen, ertesi gün

formülasyonda faz ayrımı belirlenmiş ve stabil bir yapı oluşmadığı görülmüştür. Bu nedenle, organik faz olarak kloroform yerine alternatif organik çözücüler araştırılmış ve test edilmiştir.

AZM yüklü lipozom formülasyonu, literatürde bildirilen etanol ve metanol:etanol (2:1) organik fazlar kullanılarak hazırlanmıştır[27, 31]. Etanol ve metanol:etanol (2:1) organik fazları ile hazırlanan formülasyonların PS ve PDI özellikleri karşılaştırıldığında; etanol ile hazırlanan formülasyonun PS'sinin daha büyük olduğu belirlenmiştir. Hazırlanması planlanan formülasyon için, belirlenen bu PS farkının önemli düzeyde olmadığı belirlenmiştir. Etanol, metanolden (ICH sınıfı, kalıntı çözücü) daha güvenli bir çözücü olması, büyük ölçekli üretime uygun olması ve daha güvenli bir çözücü olması nedeniyle organik çözücü olarak tercih edilmiştir[104].

Fosfolipitler ile birlikte AZM de organik fazda çözüldüğünden, uygun fosfolipid türünün belirlenmesi için AZM yüklü lipozom formülasyonu tercih edilmiştir. Fosfolipitlerin lipozom formülasyonunun özellikleri üzerindeki etkisi Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Formülasyon	PS(nm)	ZP(mV)	PDI
(Lipit:Kolesterol–8:2)	AVG±STD*	AVG±STD*	AVG±STD*
L-α-Fosfotidilkolin(soybean)	278.3±13.11	1.02±0.067	0.770±0.26
Fosfolipon 90G	297.9±12.31	-7.16±0.403	0.894±0.042
L-α-Fosfotidilkolin(egg)	121.2±1.997	-27.4±0.603	0.380±0.015
Lipoid S100	173.6±2.235	10.1±0.289	0.472±0.010
DPPC	631.3±9.708	-13.0±0.265	0.581±0.018

Çizelge 4.8 Farklı fosfolipidlerin AZM yüklü lipozom formülasyonlarının özellikleri üzerindeki etkileri (*n=3)

En yüksek zeta potansiyel değeri (-27.4 ± 0.603 mV) Egg PC ile hazırlanan lipozomlarda ölçülmüş ve PS ve PDI değerleri sırasıyla 121.2 ± 1.997 nm ve 0.380 ± 0.015 olarak bulunmuştur.

Farklı sulu fazların nisın yüklü lipozom formülasyonlarının özelliklerine etkisi değerlendirildiğinde Fosfolipon 90G (Çizelge 4.7) ile hazırlanan formülasyonların daha iyi özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. AZM yüklü lipozomlar da ise en iyi sonuçlarını veren lipid Egg PC olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Tüm formülasyonlar fosfolipon 90G ve Egg PC ile tekrar hazırlanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm formülasyonlar karakterizasyon parametreleri açısından değerlendirildiğinde Egg PC uygun fosfolipid olarak tercih edilmiştir.

4.4. Lipozom Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Farklı hacimlerde etanol ve propilen glikol kullanılarak, modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanan ve farklı yöntemlerin formülasyonlar üzerindeki etkisini karşılaştırmak için ince tabaka hidrasyon yöntemiyle hazırlanan boş formülasyonların özellikleri Çizelge 4.9'da, Nisın yüklü formülasyonların özellikleri Çizelge 4.10'da, AZM yüklü formülasyonların özellikleri Çizelge 4.11'de, kombine formülasyonların özellikleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Boş Formülasyonlar	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Etozom Formülasyonu 1	143.8 ± 2.31	0.179 ± 0.044	-0.28 ± 0.44
Etozom Formülasyonu 2	179.7 ± 4.18	0.258 ± 0.011	0.17 ± 0.67
Etozom Formülasyonu 3	555.5 ± 13.11	0.619 ± 0.039	-0.47 ± 1.31
Etozom Formülasyonu 4	504.5 ± 43.24	0.575 ± 0.063	-0.17 ± 0.366
Lipozom Formülasyonu (Egg PC)	85.12 ± 1.42	0.25 ± 0.008	-60.97 ± 0.78
Lipozom Formülasyonu (Lipoid S75)	90.23 ± 1.44	0.24 ± 0.007	-60.97 ± 0.05

Çizelge 4.9 Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan Boş Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3)

Nisin Yüklü Formülasyonlar	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Etozom Formülasyonu 1	116.7 ± 1.1	0.084 ± 0.017	-0.53 ± 0.81
Etozom Formülasyonu 2	171.3 ± 4.352	0.28 ± 0.021	-455 ± 1.32
Etozom Formülasyonu 3	544.2 ± 11.83	0.61 ± 0.031	1.6 ± 0.42
Etozom Formülasyonu 4	548.5 ± 5.65	0.616 ± 0.066	-0.74 ± 0.260
Lipozom Formülasyonu (Egg PC)	100.81 ± 2.48	0.28 ± 0.026	-28.1 ± 0.7
Lipozom Formülasyonu (Lipoid S75)	104.9 ± 1.65	0.24 ± 0.01	-28.7 ± 0.7

Çizelge 4.10 Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan Nisin Yüklü Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3)

AZM Yüklü Formülasyonlar	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Etozom Formülasyonu 1	144.9 ± 3.037	0.058 ± 0.066	0.19 ± 0.65
Etozom Formülasyonu 2	138.6 ± 4.744	0.048 ± 0.012	0.03 ± 0.69
Etozom Formülasyonu 3	302.5 ± 3.301	0.137 ± 0.001	0.01 ± 0.151
Etozom Formülasyonu 4	275.1 ± 11.19	0.06 ± 0.037	-0.30 ± 0.644
Lipozom Formülasyonu (Egg PC)	127.5 ± 10.22	0.22 ± 0.027	-29.17 ± 0.23
Lipozom Formülasyonu (Lipoid S75)	83.13 ± 1.82	0.23 ± 0.012	-30.73 ± 0.35

Çizelge 4.11 Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan AZM Yüklü Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3)

Kombine Formülasyonlar	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
Etozom Formülasyonu 1	153.9 ± 2.639	0.049 ± 0.038	0.27 ± 1.63
Etozom Formülasyonu 2	152.6 ± 0.6658	0.019 ± 0.015	0.95 ± 0.58
Etozom Formülasyonu 3	278.7 ± 8.724	0.067 ± 0.044	-0.46 ± 0.636
Etozom Formülasyonu 4	337.9 ± 2.155	0.084 ± 0.044	0.13 ± 0.452
Lipozom Formülasyonu (Egg PC)	82.06 ± 2.31	0.26 ± 0.001	-56.83 ± 2.04
Lipozom Formülasyonu (Lipoid S75)	110.0 ± 1.2	0.26 ± 0.007	-31.9 ± 0.69

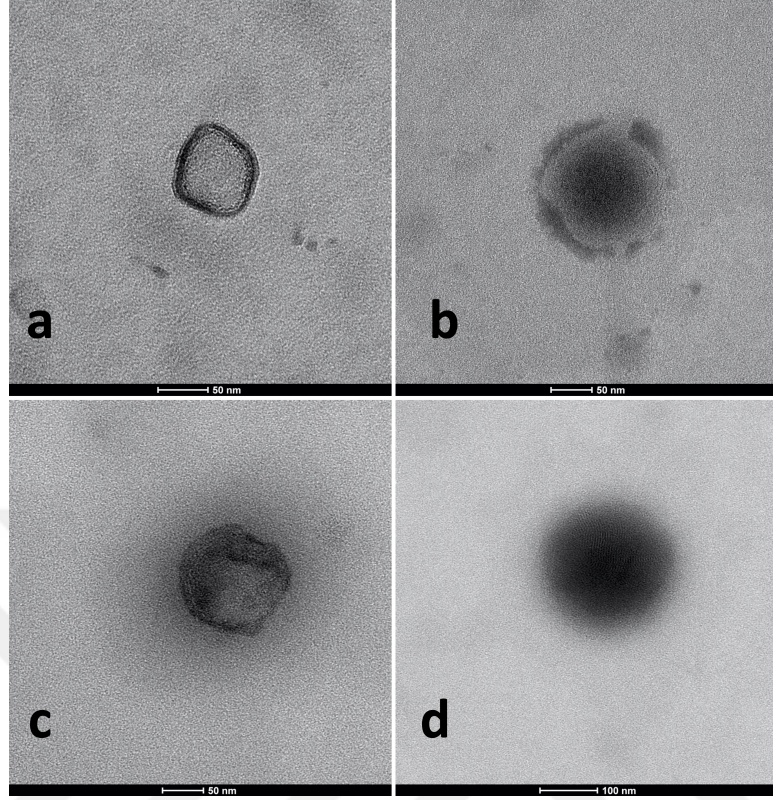
Çizelge 4.12 Modifiye Edilmiş Etanol Enjeksiyon Yöntemi ve İnce Tabaka Hidrasyon Yöntemiyle Hazırlanan Kombine Lipozom Formülasyonlarının Özellikleri (*n=3)

Araştırmanın amaçları doğrultusunda, kombine lipozom formülasyonunun özellikleri karakterizasyon parametreleri doğrultusunda değerlendirilerek, modifiye edilmiş etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanan 1. ve 2. formülasyonlar daha ileri araştırmalar için seçilmiş ve bu formülasyonların yükleme kapasitesi santrifüj filtre yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmalarımıza başlarken AZM'nin enjeksiyon yöntemi ile hazırlanan herhangi bir formülasyonu literatürde bulunmamaktaydı. Son literatür incelemesinde Abruzzo ve arkadaşlarının, AZM yüklü lipozom formülasyonlarını ince tabaka hidrasyon ve etanol enjeksiyon yöntemleri ile hazırladıkları görülmüştür. Bu çalışmada uygulanan etanol enjeksiyon yöntemi, bizim uyguladığımız modifiye etanol enjeksiyon yöntemine benzerlik göstermekle birlikte, fazların enjeksiyon yönlerinin farklı olması ve hazırladıkları formülasyonlardan etanolün uzaklaştırıldığı ek bir adım bulunması yönünden farklılık göstermektedir[105].

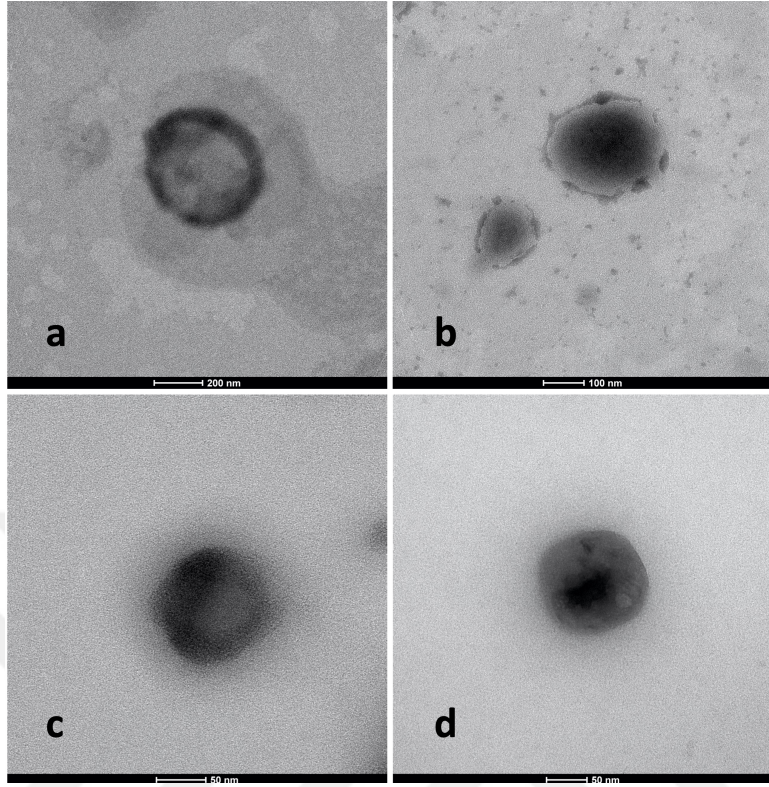
4.4.1. Lipozom Formülasyonlarının Morfolojik Karakterizasyonu

İnce tabaka hidrasyon yöntemi ile Egg PC fosfolipidi ile hazırlanan formülasyonlara ait TEM görüntüleri Şekil 4.10'de sunulmuştur. Boş lipozom formülasyonu Şekil 4.10a'da; nislin yüklü lipozom formülasyonu 4.10b'de; AZM yüklü lipozom formülasyonu 4.10c'de ve kombine yüklü lipozom formülasyonu 4.10d'de sunulmuştur.



Şekil 4.10 Lipozom Formülasyonlarına (Egg PC ile hazırlanan) ait TEM görüntüleri: a, boş lipozom formülasyonu; b, nisin yüklü lipozom formülasyonu; c, AZM yüklü lipozom formülasyonu; d, kombine lipozom formülasyonu

İnce tabaka hidrasyon yöntemi ile Lipoid S75 fosfolipidi ile hazırlanan formülasyonlara ait TEM görüntüleri Şekil 4.11'de sunulmuştur. Boş lipozom formülasyonu Şekil 4.11a'da; nisin yüklü lipozom formülasyonu 4.11b'de; AZM yüklü lipozom formülasyonu 4.11c'de ve kombine yüklü lipozom formülasyonu 4.11d'de sunulmuştur.



Şekil 4.11 Lipozom Formülasyonlarına (Lipoid S75 ile hazırlanan) ait TEM görüntüleri: a, boş lipozom formülasyonu; b, nisin yüklü lipozom formülasyonu; c, AZM yüklü lipozom formülasyonu; d, kombine lipozom formülasyonu

Bazı lipozom yapılarının yüzeyde patlamış olarak görülmesinin kontrast artırıcı boyamadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nisin yüklü lipozom formülasyonların TEM görüntülemesinde, lipozom dışında kalan alanlarda kristal yapılarına benzer kirlilik görülmüştür. Bu kirliliğin nedeni nisin stok çözeltisinde yüksek miktarda bulunan tuz olabilir. Formülasyona ve TEM numune hazırlama prosedürüne bağlı olabileceği değerlendirilen kriterler dahilinde lipozom formülasyonlarına ait TEM görüntüleri, lipozomların PS parametreleri ile uyumlu bulunmuştur.

4.5. Lipozom Formülasyonlarının Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Nisin yüklü Etozom 1, Etozom 2 ve lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği (% EE) Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Nisin Yüklü Formülasyonlar	PS(nm)	ZP(mV)	PDI	%EE
	(AVG±STD*)	(AVG±STD*)	(AVG±STD*)	Nisin
Etozom 1	116.7 ± 1.1	-0.5	0.084	96.7
Etozom 2	171.3 ± 4.352	-0.5	0.28	98.3
Lipozom Egg PC	140.81 ± 2.48	-28.1 ± 0.70	0.24 ± 0.026	95.5 ± 5.1
Lipozom Lipoid S75	112.9 ± 1.65	-28.1 ± 0.7	0.24 ± 0.001	94.2 ± 7.3

Çizelge 4.13 Nisin Yüklü Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliği

AZM yüklü Etozom 1, Etozom 2 ve lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği (% EE) Çizelge 4.14'te verilmiştir.

AZM Yüklü Formülasyonlar	PS(nm)	ZP(mV)	PDI	%EE
	(AVG±STD*)	(AVG±STD*)	(AVG±STD*)	Nisin
Etozom 1	144.9±3.037	0.2	0.058	89.9
Etozom 2	138.6±4.744	0.03	0.048	90.8
Lipozom Egg PC	127.5 ± 10.22	-29.17 ± 0.23	0.22 ± 0.0276	85.8 ± 3.1
Lipozom Lipoid S75	83.13 ± 1.82	-30.73 ± 0.35	0.25 ± 0.012	86.4 ± 0.5

Çizelge 4.14 AZM Yüklü Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliği

Kombine Etozom 1, Etozom 2 ve lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği (% EE) Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Kombine Formülasyonlar	PS(nm)	ZP(mV)	PDI	%EE	%EE
	(AVG±STD*)	(AVG±STD*)	(AVG±STD*)	Nisin	AZM
Etozom 1	153.9±2.639	0.3	0.049	100	90.8
Etozom 2	152.6±0.6658	0.9	0.019	100	90.5
Lipozom Egg PC	82.06 ± 2.31	-36.83 ± 2.04	0.26 ± 0.001	93.1 ± 6.8	91.1 ± 1.6
Lipozom Lipoid S75	110.0 ± 1.2	-31.9 ± 0.69	0.26 ± 0.007	92.1 ± 4.1	91.5± 6.2

Çizelge 4.15 Kombine Formülasyonların Enkapsülasyon Etkinliği

Egg PC ve Lipoid S75 ile hazırlanan AZM ve nisin içeren lipozom formülasyonları iki farklı hazırlama yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. İnce tabaka hidrasyon ve modifiye etanol enjeksiyon yöntemleri ile hazırlanan tüm formülasyonların +4°C'de bir ay stabilitesini

koruduğu, etken maddeleri %80'in üzerinde enkapşüle ettiği belirlenmiştir (Çizelge(4.13, 4.14, 4.15.

Abruzzo ve arkadaşlarının çalışmasında AZM lipozom formülasyonun EE %68, Rukavina ve arkadaşlarının çalışmasında ise konvansiyonel lipozomlarda EE %50 olarak bildirilmiştir[27, 105]. Tez alışması kapsamında hazırlanan AZM yüklü lipozomlarda EE (%83) bulunmuştur. Öncelikle EE'ndeki bu artışın EE metodu kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Abruzzo ve arkadaşları; diyaliz membran yöntemi ve santrfj ve filtre yöntemi kullanarak AZM lipozom formülasyonlarının EE karşılaştırdıkları çalışmada her iki yöntemde benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen yüksek EE'nin, EE belirleme yönteminden bağımsız olarak lipozomal formülasyonun kompozisyonundan kaynaklandığı değerlendirilmektedir[105].

Nisin yüklü lipozom formülasyonları ile yapılan çalışmada, formülasyonun %94.12 enkapşlasyon etkinliğine sahip olduğu bildirilmiştir[106]. Çalışmamızda, nisin yüklü lipozom formülasyonunun enkapşlasyon etkinliği %89.8'dir ve sonuç literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Etozom formülasyonları lipozom formülasyonlarına benzer yüksek %EE'ye sahip olsada, formülasyonlar diğer karakterizasyon parametreleri açısından da değerlendirilmiştir. Etozom formülasyonlarının sıfıra yakın ZP değerleri gözönüne alındığında, formülasyon stabil kalamayacağı değerlendirilmiştir. Sonraki çalışmalara ince tabaka hidrasyon yöntemi ile hazırlanan lipozom formülasyonları ile devam edilmiştir.

4.6. Lipozom Formülasyonlarının Stabilitesi

Egg PC fosfolipidi kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonlarının +4°C'de stabilite sonuçları Çizelge 4.16'da sunulmuştur.

Formülasyon	Ölçüm Zamanı	PS (nm) (AVG±STD*)	ZP (mV) (AVG±STD*)	PDI (AVG±STD*)
Boş Lipozom	1. Gün	105.12 ± 1.42	-30.97 ± 0.78	0.25 ± 0.008
	1. Hafta	117.50 ± 12.48	-30.53 ± 0.50	0.23 ± 0.011
	1. Ay	116.7 ± 0.6	-28.03 ± 0.85	0.28 ± 0.007
	3. Ay	144.06 ± 2.6	-18.93 ± 0.78	0.42 ± 0.03
Nisin Yüklü Lipozom	1. Gün	140.81 ± 2.48	-28.1 ± 0.7	0.24 ± 0.026
	1. Hafta	144.73 ± 4.64	-25.37 ± 1.41	0.28 ± 0.021
	1. Ay	150.43 ± 3.80	-25.7 ± 0.96	0.27 ± 0.017
	3. Ay	225.63 ± 4.59	-20.71 ± 0.19	0.37 ± 0.051
AZM Yüklü Lipozom	1. Gün	127.5 ± 10.22	-29.17 ± 0.23	0.22 ± 0.027
	1. Hafta	128.1 ± 3.95	-29.33 ± 0.46	0.25 ± 0.013
	1. Ay	131.5 ± 19.25	-25.5 ± 1.83	0.25 ± 0.083
	3. Ay	188.8 ± 5.11	-13.7 ± 0.87	0.31 ± 0.070
Kombine Lipozom	1. Gün	82.06 ± 2.31	-36.83 ± 2.04	0.26 ± 0.001
	1. Hafta	91.87 ± 0.47	-34.23 ± 0.98	0.27 ± 0.008
	1. Ay	99.31 ± 0.79	-32.93 ± 0.55	0.29 ± 0.011
	3. Ay	174.27 ± 9.76	-16.27 ± 0.21	0.23 ± 0.015

Çizelge 4.16 Lipozom Formülasyonlarının (Egg PC) +4°C’de karakterizasyon ve stabilite sonuçları

Lipoid S75 fosfolipidi kullanılarak hazırlanan lipozom formülasyonlarının +4°C’de stabilite sonuçları Çizelge 4.17’da sunulmuştur.



Formülasyon	Ölçüm Zamanı	PS (nm) (AVG±STD*)	ZP (mV) (AVG±STD*)	PDI (AVG±STD*)
Boş Lipozom	1. Gün	108.23 ± 1.44	-48.97 ± 0.05	0.24 ± 0.001
	1. Hafta	110.7 ± 2.23	-49.7 ± 0.46	0.25 ± 0.001
	1. Ay	112.0 ± 11.8	-46.5 ± 0.5	0.27 ± 0.06
	3. Ay	132.7± 13.8	-37.17 ± 1.33	0.35 ± 0.05
Nisin Yüklü Lipozom	1. Gün	112.9 ± 1.65	-28.1 ± 0.7	0.24 ± 0.001
	1. Hafta	114.3 ± 3.82	-26.03 ± 0.45	0.25 ± 0.001
	1. Ay	122.5 ± 9.46	-27.5 ± 0.57	0.26 ± 0.015
	3. Ay	135.67 ± 5.79	-13.97 ± 0.35	0.26 ± 0.010
AZM Yüklü Lipozom	1. Gün	88.13 ± 1.82	-30.73 ± 0.35	0.25 ± 0.012
	1. Hafta	87.77 ± 3.26	-29.93 ± 3.33	0.26 ± 0.005
	1. Ay	90.81 ± 5.21	-28.17 ± 1.08	0.27± 0.010
	3. Ay	103.97 ± 8.99	-27.17 ± 1.097	0.31 ± 0.015
Kombine Lipozom	1. Gün	110.0 ± 1.2	-31.9 ± 0.69	0.26 ± 0.007
	1. Hafta	117.5 ± 2.46	-30.73 ± 0.25	0.27 ± 0.01
	1. Ay	122.17 ± 11.22	-28.57 ± 0.47	0.27 ± 0.005
	3. Ay	173.9 ± 4.97	-28.43 ± 0.49	0.34 ± 0.028

Çizelge 4.17 Lipozom Formülasyonlarının (Lipoid S75) +4°C’de karakterizasyon ve stabilite sonuçları

da Silva ve ark., nisin yüklü lipozom formülasyonları ile yaptığı çalışmada, nisin lipozom formülasyonunun 24 gün stabil kaldığını belirlemiştir[106]. Literatür verilerine benzer şekilde hazırladığımız nisin yüklü lipozomlar 1 ay stabilitesini korumuştur.

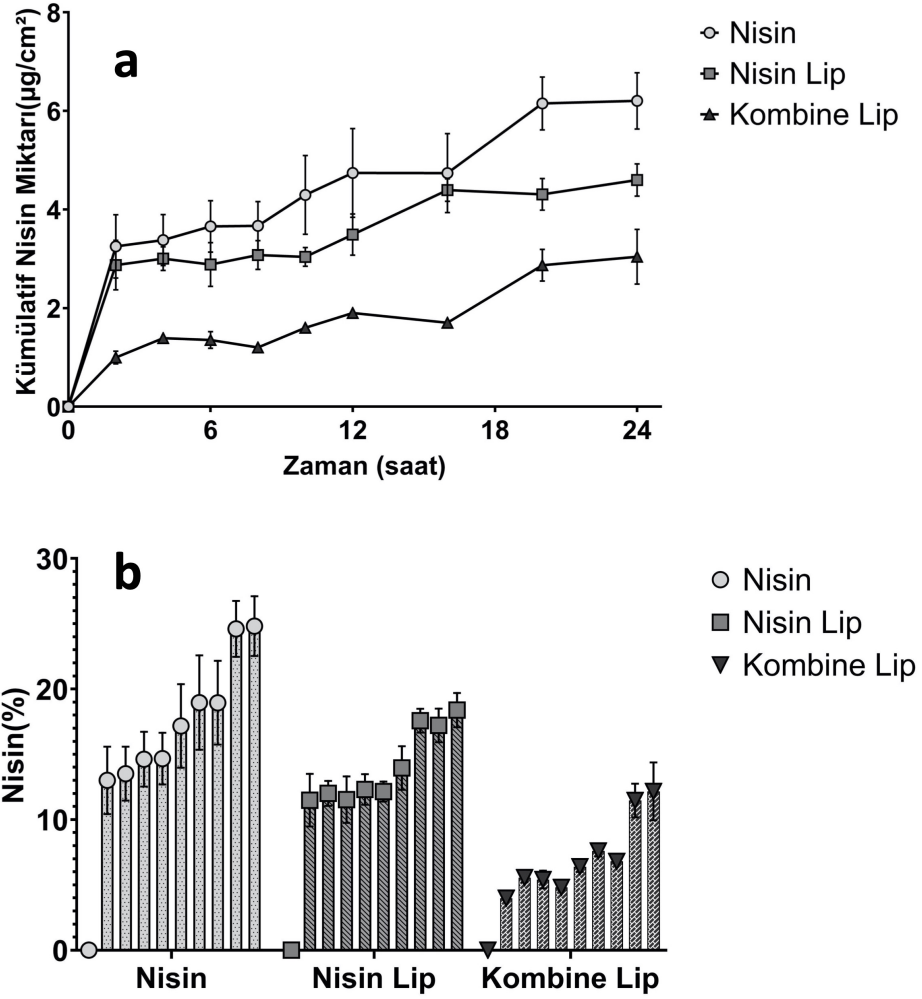
Hazırlamış olduğumuz AZM yüklü formülasyonlar 1 ay stabil kalmışlardır. Rukavina ve ark.'nın hazırladığı AZM yüklü lipozomal formülasyonların 180 güne kadar stabilitesini koruduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada çeşitli lipid:kolesterol oranları ve fosfolipitler ile hazırlanan AZM lipozom formülasyonlarının stabilitesi incelenmiş ve stabilitenin formülasyon içeriğine bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir[27]. Hazırladığımız AZM formülasyonu bu veriler ışığında değerlendirildiğinde stabilite farklılığının beklenen bir sonuç olduğu söylenebilir.

Lipozomal formülasyonların jel içerisine yüklendiğinde depolama stabilitesinin arttığı bildiren çalışma verilerinden yola çıkarak[107], hem stabiliteyi arttıracak hem de topikal/transdermal uygulamada lipozomları taşıyıcı rol üstlenecek jel formülasyonlar, gelecekte planlanan araştırmalar için avantajlı görünmektedir.

4.7. *In Vitro* Salım Çalışmaları (IVRT)

Salım çalışmaları kapsamında, Egg PC ve Lipoid S75 fosfolipidi kullanılarak ince tabaka hidrasyon yöntemiyle hazırlanan formülasyonların salım profilleri Franz difüzyon hücrelerinde incelenmiştir. Egg PC ile hazırlanan lipozomlardan, reseptör faza geçen kümülatif nisin miktarına ait profil Şekil 4.12a'da sunulmuştur. Tek yönlü ANOVA ve Tukey testi, nisin-nisin Lip; nisin-Kombine Lip; nisin Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir($p < 0.05$). Nisin'in lipozomal formülasyonlardan salım oranı serbest nisinden daha düşük bulunmuş ve lipozomal formülasyonların 24 saat boyunca daha kontrollü salım sağladığı gösterilmiştir.

Martin ve ark. amfipatik ve yüklü hidrofilik karakterdeki ilaçların elektrostatik etkileşimler ile vezikül çift tabakasıyla etkileşime girebileceğini bildirmiştir[108]. Nisin moleküllerinin ilk 2-4 saat aralığındaki hızlı difüzyonu, peptit yapısındaki nisinin membran ile etkileşerek lipozomun yüzeyinde lokalizasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.12 Egg PC ile hazırlanan lipozomal formülasyonların *in vitro*; a, nisin salım profili; b, nisin salım oranı (n=3)

Salım çalışmalarında 24 saatin sonunda reseptör fazda biriken kümülatif nisin miktarının başlangıçta donör bölmeğe eklenen nisin miktarına oranı % olarak Şekil 4.12b'de sunulmuştur.

Serbest nisin, 24 saatin sonunda %27 salım oranına ulaşmıcağa kadar, azalan ivmede doğrusal salım profili sergilemektedir.

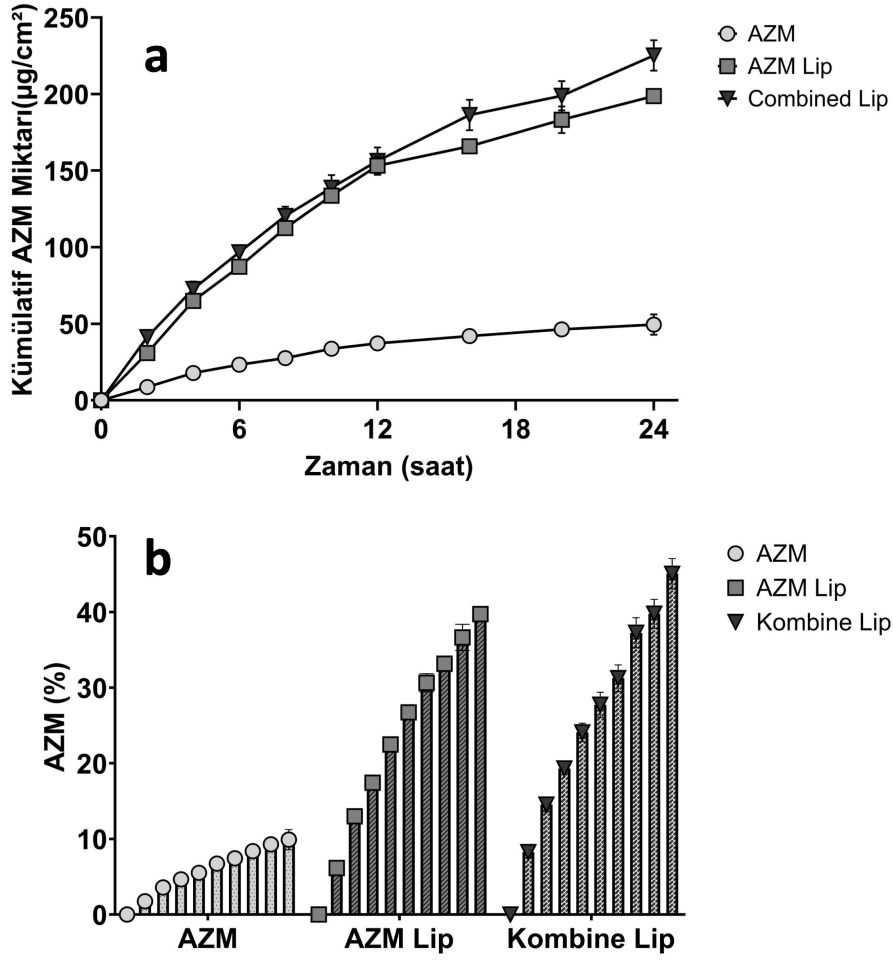
Nisinin nisin yüklü lipozom formülasyonundan salım hızındaki ivme, 4 saatin sonunda belirgin şekilde azalmaktadır ve 24 saatin sonunda %18 salım oranına ulaşmaktadır.

Nisinin kombine lipozomal formülasyondan salım oranı ise 2. saatin sonunda sabit salım hızı göstermiş ve 12 saatten sonra salım oranında hafif bir artış gözlenmiştir. 24 saatin sonunda kombine lipozom formülasyonundan %7 kümülatif nisin salımına ulaşılmıştır.

Bu veriler, lipozomların nisinin kontrollü salımı için kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca kombine lipozom formülasyonundan nisin salım profili incelendiğinde lipofilik karakterdeki AZM'nin lipozomun hidrofobik karakterdeki bilayer tabakada lokalize olduğu öngörüldüğünden, hidrofilik bölgede lokalize olan nisinin, lipozomdan salımını etkilediği düşünülmektedir.

Tukey testi, nisin-nisin Lip; nisin-kombine Lip; nisin Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$).

AZM'ye ait kümülatif salım profili Şekil 4.13a'da sunulmuştur. Tukey testi, AZM-AZM Lip; AZM-Kombine Lip; AZM Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). Sonuçlar, AZM'nin AZM yüklü ve kombine yüklü lipozomal formülasyonlardan kontrol grubuna kıyasla salımını göstermektedir. Kontrol grubu olarak sulu fazda süspansiyon edilen AZM ile çalışılmıştır. IVRT ve IVPT çalışmalarında, organik çözücülerin etkin madde çözünürlüğüne ve membran bütünlüğüne zarar vererek permeasyonu artırabileceği öngörülerek, AZM kontrolü, formülasyon ile aynı çevresel koşullar altında (sulu ortamda) hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Rukavina ve ark. IVRT kontrol örneği olarak AZM çözeltisini %60 etanol içerisinde hazırlamış ve reseptör fazdaki AZM derişiminin 6 saatte %80'e ulaştığını bildirmişlerdir[27].

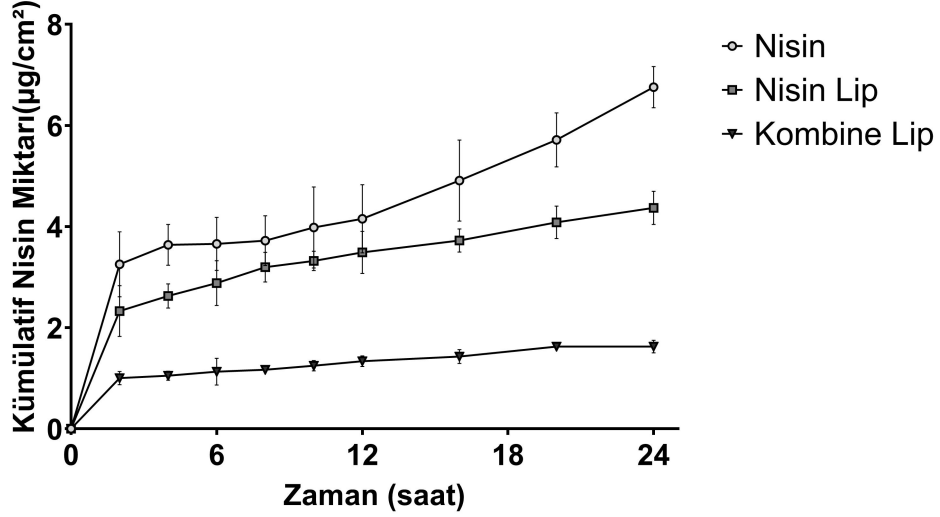


Şekil 4.13 Egg PC ile hazırlanan lipozomal formülasyonların *in vitro*; a, AZM salım profili; b, AZM salım oranı (n=3)

AZM'nin kombine lipozom formülasyonundan kümülatif salımının AZM yüklü lipozom formülasyonundan salımına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13). Wallace ve ark. çalışmalarında kolistin ve AZM içeren lipozom formülasyonundan AZM'nin IVRT profilini incelemiş ve kolistin AZM salımını artırdığını belirlemişlerdir. Kolistin, kombine lipozomda birlikte formüle edildiği ilaçların salımını değiştirme potansiyeli vurgulanmıştır. Bulgular kolistin, fosfolipid çift katmanının viskoelastik özelliklerinde değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir [109]. Nisin'in; kolistine benzer şekilde, bakteri zar yapısına bağlanarak zar geçirgenliğini artırabileceği ve nisin molekülünün katyonik doğası nedeniyle fosfolipid çift katmanla etkileşime girebileceği, böylece birlikte formüle

edildiği kombine lipozom formülasyonundan AZM'nin salım profilini değiştirebileceği öngörülmektedir.

Lipoid S75 ile hazırlan formülasyonlar ile elde edilen nisin salım profili Şekil 4.14a'da sunulmuştur.



Şekil 4.14 Lipoid S75 ile hazırlanan lipozomal formülasyonların *in vitro* nisin salım profili (n=6)

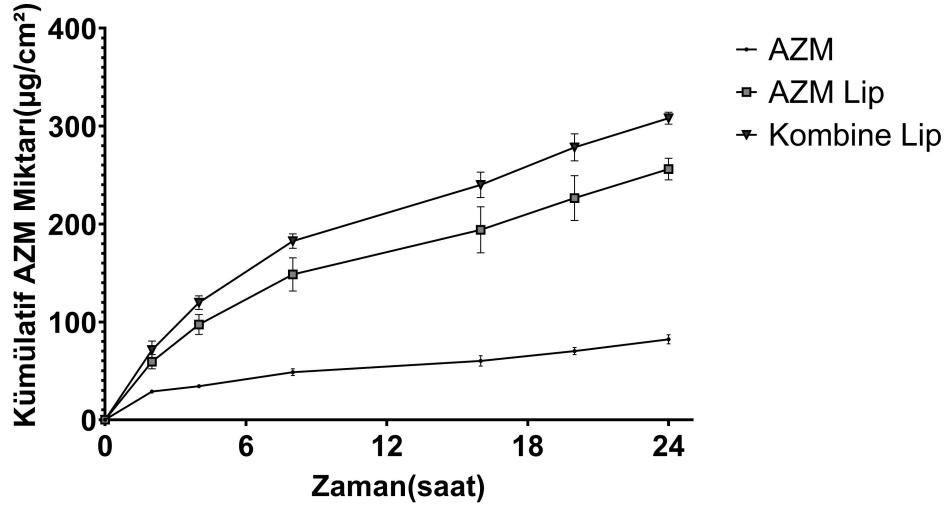
Nisinin salım profilindeki dalgalanma, tayin ve tespit sınırı çok düşük olan CBQCA testinde elde edilen sonucun daha yüksek hacimlerdeki derişimi belirlemek için kullanılmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Nisin ile hazırlanan formülasyonların kontrole göre artmış kümülatif salım gösterdiği veriler, hem Lipoid S75 hem Egg PC ile hazırlanan formülasyonlarda benzer özellikler sergilemektedir.

Tukey testi, nisin-nisin Lip; nisin-kombine Lip; nisin Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$).

Lipoid S75 ile hazırlanan lipozom formülasyonlarının ve suda süspanse edilerek hazırlanan AZM kontrol ile birlikte salım profili Şekil 4.15'de sunulmuştur. AZM kontrol numunesinin EggPC'ye benzer salım sergilediği ve AZM'nin suda çözünürlüğüne bağlı olarak reseptör

faza salımının azaldığı veya membran üzerinde çökmesiyle por geçirgenliğini etkilediği değerlendirilmiştir.

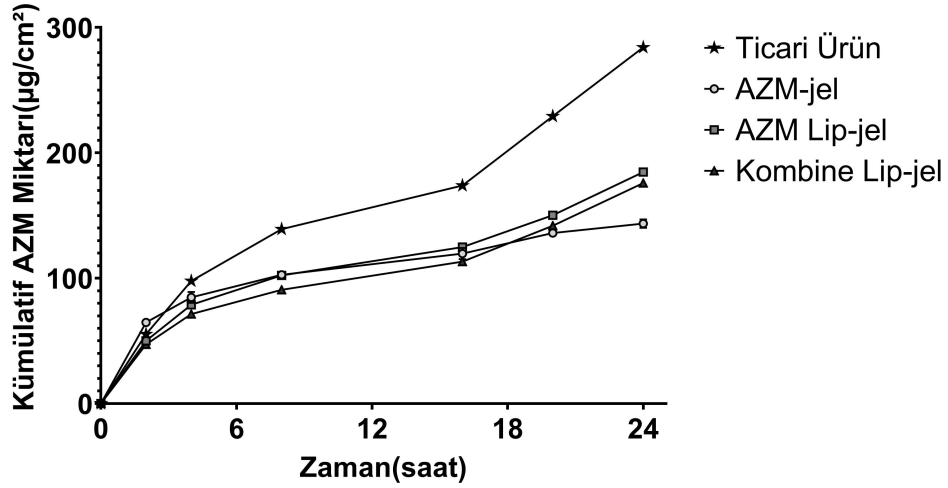


Şekil 4.15 Lipoid S75 ile hazırlanan lipozomal formülasyonların *in vitro* AZM salım profili (n=6)

Lipozomal formülasyonları ile yürütülen salım sonuçlarına uygulanan Tukey testiyle, AZM-AZM Lip; AZM-Kombine Lip; AZM Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Karbopol jel ile hazırlanmış ticari ürün ile formülasyonların salım özelliklerini karşılaştırmak amacıyla; AZM, AZM Lip ve Kombine Lip formülasyonları karbopol jel'e yüklenmiştir. Carbopol®EZ-3 ile hazırlanan formülasyon triizopropanolamin ile nötralize edilmiş ve pH' değeri 5.7'ye ayarlanmıştır [110].

AZM içeren jel formülasyonu, lipozomal jel formülasyonları ve ticari ürünün salım bulguları Şekil4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4.16 Lipoid S75-jel ile hazırlanan lipozomal formülasyonların *in vitro* AZM salım profili (n=6)

Karbopol ile hazırlanan formülasyonlar ve ticari ürün (Azifast Gel 2%) ile elde edilen AZM'nin salım profili, Tukey testi ile değerlendirildiğinde AZM Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$), ancak Ticari ürün-AZM; Ticari ürün-AZM Lip, Ticari ürün-kombine Lip; AZM-AZM Lip; AZM-kombine Lip arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

Lipozomal jel formülasyonundan gerçekleşen salım, lipozom formülasyonuna kıyasla daha düşük hızda bulunmuştur (Şekil 4.16). İlacın salım profiline bakıldığında, AZM yüklü lipozomlarla ilk 8 saat içinde ilacın yaklaşık %30'unun salımı gerçekleşmiştir. Buna karşın, AZM içeren jel formülasyonlarında daha yavaş bir salım gözlenmiş ve 8 saat sonunda yaklaşık %20 oranında salım gerçekleşmiştir. Jel formülasyonunda kullanılan hidrofilik polimer olan karbopol, sıvı ortamda şişerek çözünme ortamının formülasyona nüfuz etmesini azaltır ve bu durum salım hızını düşürür. Etkin maddenin difüzyon yolunun uzaması da salım hızının yavaşlamasına neden olmaktadır.

Yapılan kinetik değerlendirmeler sonucunda optimum lipozom, lipozomal jel ve etkin madde içeren jel formülasyonları için salım mekanizmalarının, diğer kinetik modellere kıyasla, Higuchi kinetik modeline uygun olduğu bulunmuştur ($r^2 \sim 1$) (4.18).

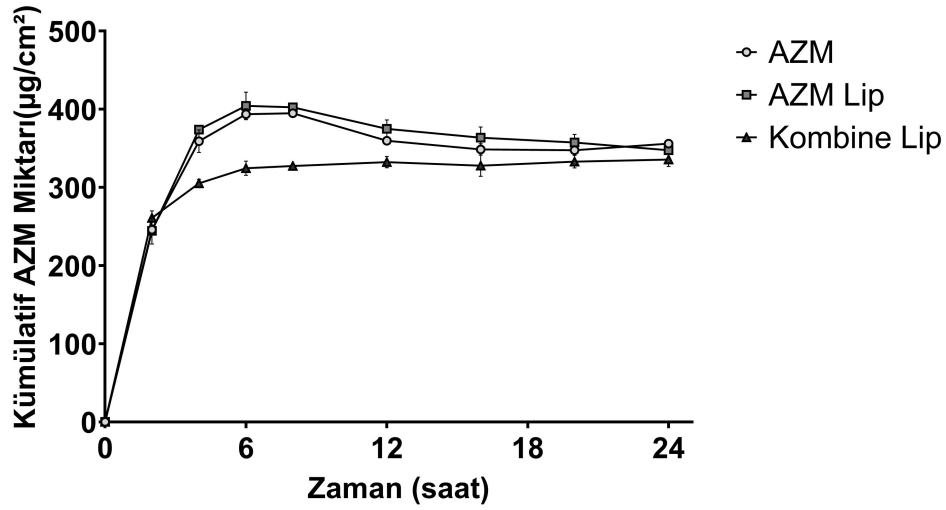
Formülasyon		Zero order	First order	Higuchi	Hixson Crowell
AZM-Lip	k	12.1183	4.4982	-2.5415	0.1755
	r^2	0.9721	0.9869	0.9930	0.9835
Komb-Lip	k	15.0760	4.4799	-2.7700	0.2128
	r^2	0.9664	0.9895	0.9941	0.9844
AZM-Gel	k	13.5402	4.4621	7.6638	0.2174
	r^2	0.9574	0.9662	0.9861	0.9634
AZM-Lip-Gel	k	9.8954	4.5097	0.8533	0.1502
	r^2	0.9616	0.9587	0.9664	0.9604
Komb-Lip-Gel	k	8.6367	4.5234	0.0481	0.1295
	r^2	0.9646	0.9592	0.9666	0.9596
Commercial	k	9.9031	4.5371	-5.5839	0.1259
	r^2	0.9643	0.9445	0.9701	0.9539

Çizelge 4.18 Formülasyonların salım kinetik modellerine ait veriler (salım hız sabiti (k) ve determinasyon katsayısı (r^2) değerleri)

Higuchi kinetik model ile AZM'nin önce lipit matrisin yüzey tabakasından zamana bağlı olarak serbest bırakıldığı, ardından difüzyon mekanizması ile ortama salıverildiği düşünülmüştür. Bu modelde, ilaç salımının temel mekanizması difüzyon olup, AZM salımı zamana bağlı olarak kontrollü bir şekilde gerçekleşmiştir. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda da lipozom formülasyonlarının salım profillerinin Higuchi kinetik modeline uyum gösterdiği gözlenmiştir [111–114]. Lipozom içindeki ilaç, matriks erozyonu ve zamanla hidrate olan polimerden difüzyon mekanizmaları ile salıverilmiştir.

4.8. *In Vitro* Permeasyon Çalışmaları (IVPT)

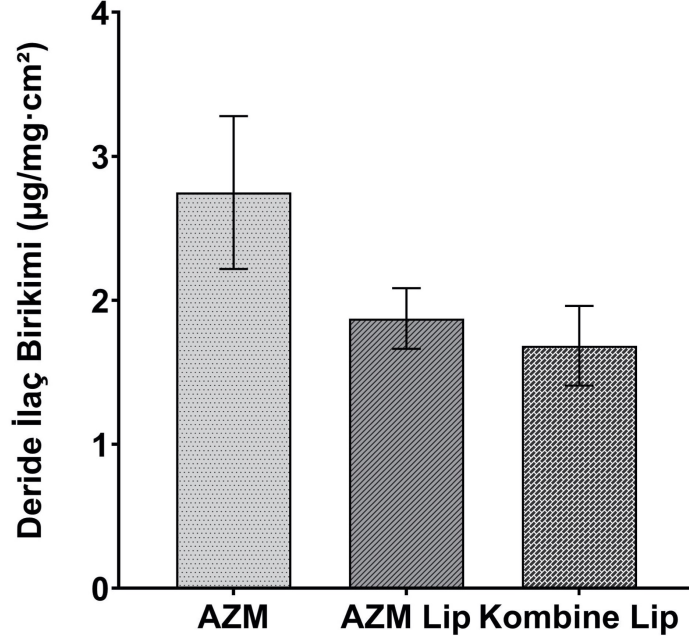
Topikal farmasötik ürün olarak güvenli kabul edilen Carbopol®EZ-3 ile %1 AZM içerecek şekilde liyofilize edilmiş lipozomal formülasyonlar ve AZM ile hazırlanan formülasyonlar IVPT yönteminde açıklandığı gibi Franz difüzyon sisteminde kadavra derisine uygulanmıştır. AZM'nin permeasyon profili Şekil 4.17a'da sunulmuştur.



Şekil 4.17 Lipoid S75 ile hazırlanan formülasyonların kadavra derisinden *in vitro* AZM permeasyon profili (n=4)

Gruplar arası farklılık düzeyi Tukey testi ile değerlendirildiğinde, AZM-kombine Lip; AZM Lip-Kombine Lip arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu belirlenmiştir ($p < 0.05$), ancak AZM-AZM Lip arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ticari ürün permeasyon testi ile değerlendirilmiş olmasına karşın reseptör fazda ve deri katmanlarında tespit edilememiştir.

IVPT testinde son numune alındıktan sonra, Franz difüzyon sistemindeki donör bölmede kalan formülasyon uzaklaştırılmış ve kadavra derisi yüzeyi PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra dermis ve epidermis tabakaları ayrılmış, ve Asetonitril: Su (60:40) çözücü ortamında homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Dermis tabakasındaki AZM derişimi HPLC tayin sınırının altında kaldığından, derideki AZM birikimi Şekil 4.18'da toplam birikim olarak sunulmuştur.



Şekil 4.18 Lipoid S75 ile hazırlanan formülasyonlar ile IVPT sonunda AZM'nin kadavra derisinde birikimi (n=4)

Lipozom yüklü jel formülasyonlarının IVRT ve IVPT bulguları değerlendirildiğinde, AZM lipozom jel ve Kombine Lipozom jel formülasyonlarının salım profilleri benzerlik göstermekle birlikte bu iki formülasyon her iki testte de istatistiksel olarak anlamlı farklılık sergilemiştir. Bunun yanı sıra IVPT'de 24 saatin sonunda AZM kümülatif salım miktarı IVRT salım miktarından fazladır. AZM permeasyonundaki artış lipozom formülasyonlarının deri ile benzer lipidik karakterine dayandırılmıştır.

4.9. *Ex Vivo* Penetrasyon ve Floresan Mikroskop ile Görüntülenmesi

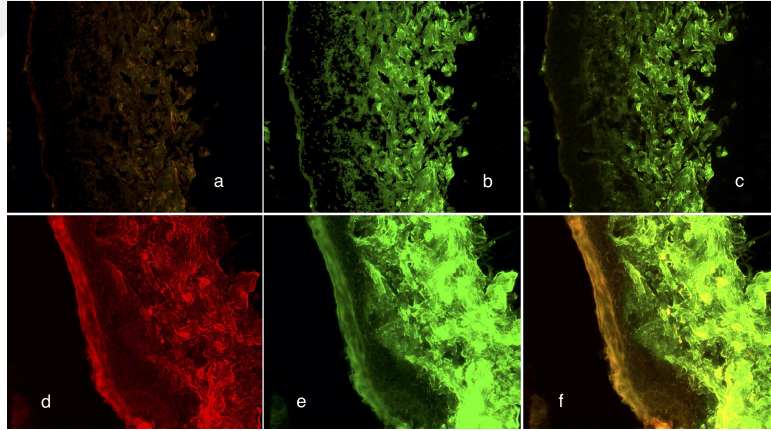
Kadavra derisinden gelen proteinlerin CBQCA testinde girişim yapmasından dolayı IVPT testinde nisin analizi gerçekleştirilmemiştir.

Nisinin deri tabakasında lokalizasyonunu gösterebilmek amacıyla floresan boya ile işaretleme ve *ex vivo* görüntüleme çalışmaları yapılmıştır.

FITC işaretli nisin çözeltisinin yeşil dalga boyunda floresanları incelenmiş, her ne kadar serbest nisinin floresansa sahip olmadığı bilinse de[108], nisin çözeltisinin safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülen düşük de olsa floresana sahip olduğu, FITC işaretli nisin çözeltisinin ise yüksek şiddette floresan özellik gösterdiği belirlenmiştir. Lipozom formülasyonuna santrifügal filtrasyon uygulanmadığı ön çalışmalarda, tüm deri bölgelerinde floresan şiddetinin çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

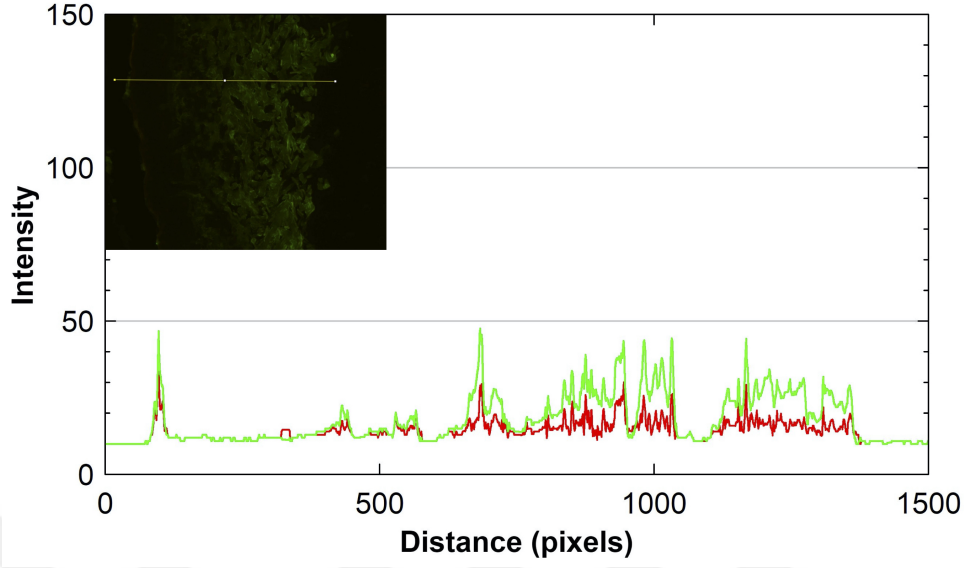
Ön deneylerde kadavra derisinin otofloresansa sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol numunesi olarak, aynı donörden alınan kadavra derisine, formülasyon yerine saf su kullanılarak aynı deney prosedürü uygulanmış ve mikrotom ile deri kesitleri alındıktan sonra floresan mikroskop ile alınan görüntüler Şekil 4.19 (a,b,c) sunulmuştur.

Nisin ve fosfolipidlerin farklı renklerde boya ile işaretlenmesiyle oluşturulan lipozom formülasyonu IVPT koşullarında kadavra derisine uygulandıktan sonra mikrotom ile alınan kesitlerin floresan mikroskobu ile alınan görüntüleri Şekil 4.19 (d,e,f)'de sunulmuştur.

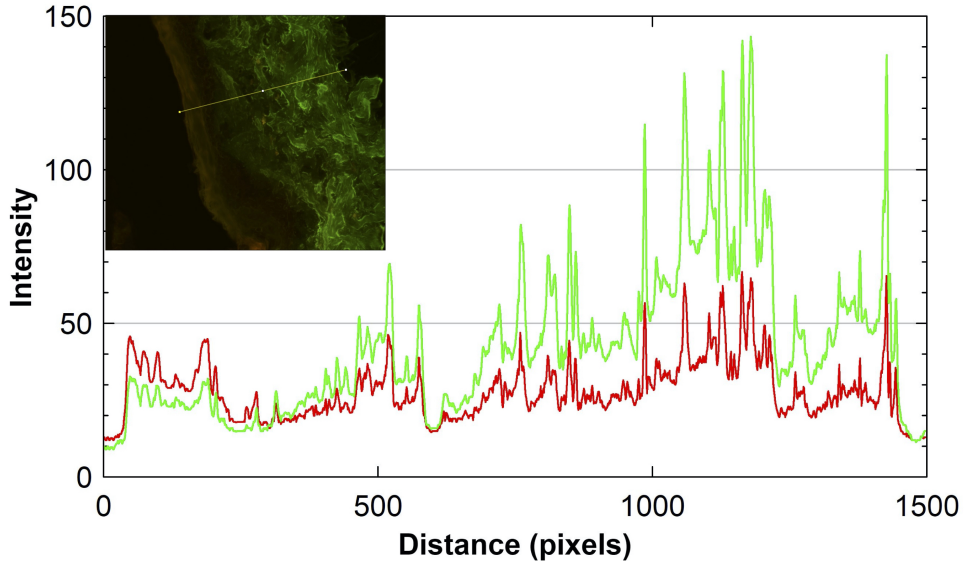


Şekil 4.19 Formülasyon uygulanmayan ve floresan boyalar ile işaretli formülasyon uygulanan kadavra deri kesitinin floresan mikroskop görüntüsü

Deri kesitinden alınan mikroskop görüntüleri Fiji ImageJ programıyla işlenmiştir. Kırmızı ve yeşil filtrelerden elde edilen floresan şiddeti, yoğunluk profil grafiğine dönüştürülmüştür. Kontrol örneğine ait floresan şiddeti Şekil 4.20'te işaretli formülasyon uygulanmış örneğe ait olan ise Şekil 4.21'da sunulmuştur.



Şekil 4.20 Kontrol numunesi olarak kadavra derisinin floresan mikroskop ile elde edilen kesit görüntüsü ve kesit boyunca floresan şiddetinin yoğunluk profili

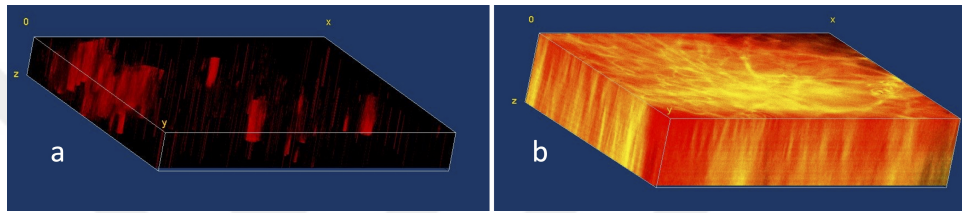


Şekil 4.21 İşaretli formülasyon uygulanan kadavra deri kesitinin floresan mikroskop görüntüsü ve deri kesit boyunca floresan şiddetinin yoğunluk profili

Literatürde ise deri tabaklarında iki floresan boya ile işaretli formülasyon uygulandığında, deri tabakalarındaki floresan şiddeti puanlanmış ve uygulanan lipozom boyutu küçüldükçe SC'den dermis tabakasına doğru işaretli formülasyonun kümülatif birikim yüzdesi artmıştır.

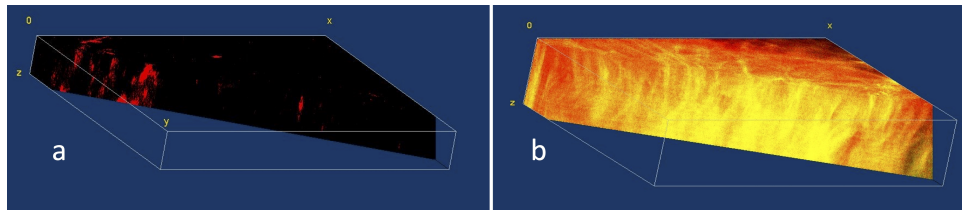
Lipozom büyüklüğü küçüldükçe formülasyonun daha derin deri tabakasına doğru ilerlediği gösterilmiştir [115].

Ayrıca floresan mikroskop ile Z eksenindeki floresan dağılımı Z-stack modunda görüntülenmiştir. Hazırlanan örneklerin hemen görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle Z ekseninde alınan görüntüler Fiji imageJ programı ile işlenmiş ve 3 boyutlu kontrol numunesinin görüntüsü Şekil 4.22a'da ve formülasyon uygulanan numunenin görüntüsü Şekil 4.22b'de sunulmuştur.



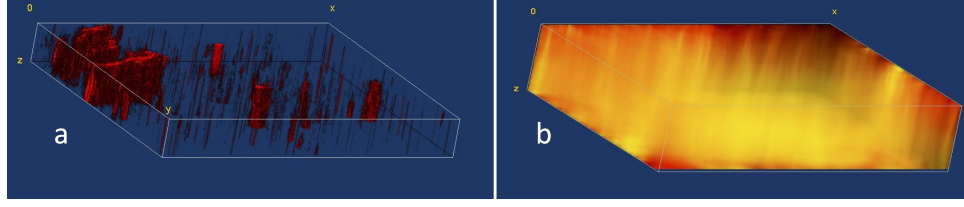
Şekil 4.22 İşaretle formülasyon uygulanmış ve uygulanmamış kadavra derisinin Z-Stack görüntüleme modunda elde edilen 3D görüntüleri

Bu 3 boyutlu görsellerin merkez kesiti kontrol numunesi için Şekil 4.23a'da, formülasyon uygulanan numune için Şekil 4.23b'de sunulmuştur.



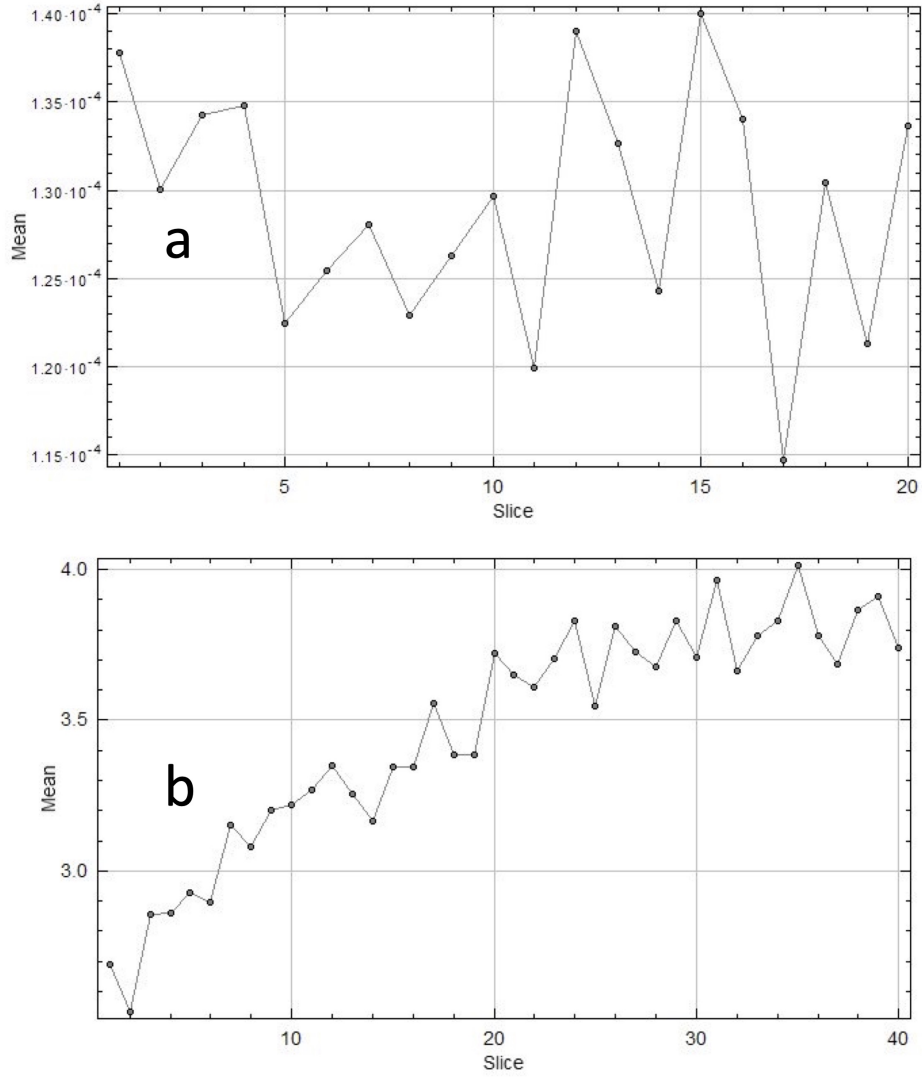
Şekil 4.23 İşaretle formülasyon uygulanmış ve uygulanmamış kadavra derisinden elde edilen 3D görüntünün merkez kesiti

Görseldeki sadece yeşil ve kırmızı floresan dağılımını 3D projeksiyon işlem yöntemi ile işlendiğinde kontrol numunesinin Şekil 4.24a görüldüğü gibi kırmızı otofloresansa sahip olduğu ve işaretle formülasyon uygulanan numunenin ise hem kırmızı hem de yeşil floresansa sahip olduğu 4.24b'de görülmektedir. Özellikle projeksiyon yöntemiyle elde edilen görselde işaretle formülasyonun deri tabakasında izlediği yol belirgin şekilde görülmektedir.



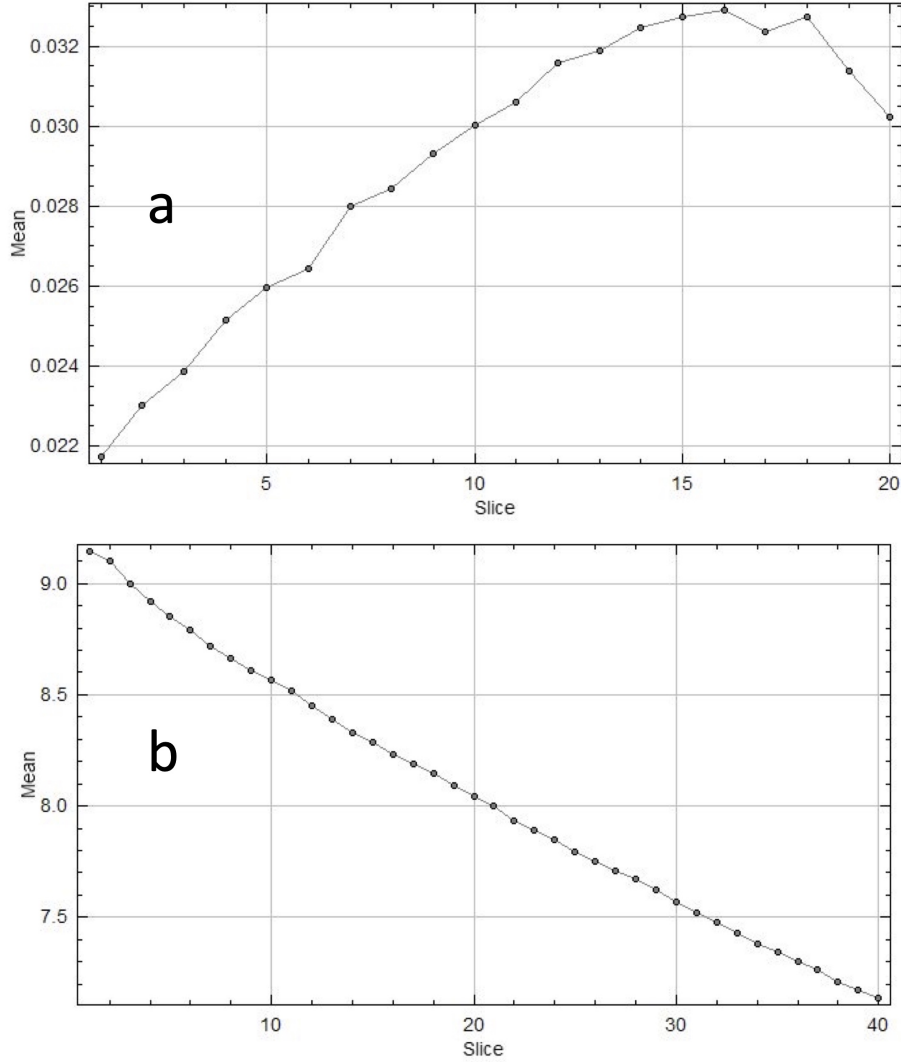
Şekil 4.24 Projeksiyon yöntemiyle işlenen kontrol ve işaretli formülasyon uygulanan kadavra derisinin 3D görüntüsü

Z eksenini boyunca SC'den dermis tabakasına doğru alınan görüntülerdeki yeşil floresan şiddetindeki değişim kontrol numunesi için Şekil 4.25a'da işaretli formülasyon uygulanan deri numunesi için Şekil 4.25b'de sunulmuştur.



Şekil 4.25 Z eksenı boyunca SC'den dermis tabakasına doğru yeşil floresan şiddetinin: a,kontrol; b,formülasyon uygulanmış deri tabakası boyunca değişimi

Z eksenı boyunca SC'den dermis tabakasına doğru alınan görüntülerdeki kırmızı floresan şiddetindeki değişim kontrol numunesi için Şekil 4.26a'da işaretli formülasyon uygulanan deri numunesi için Şekil 4.26b'de sunulmuştur.



Şekil 4.26 Z eksenı boyunca SC'den dermis tabakasına doğru kırmızı floresan şiddetinin: a,kontrol; b,formülasyon uygulanmış deri tabakası boyunca değışimi

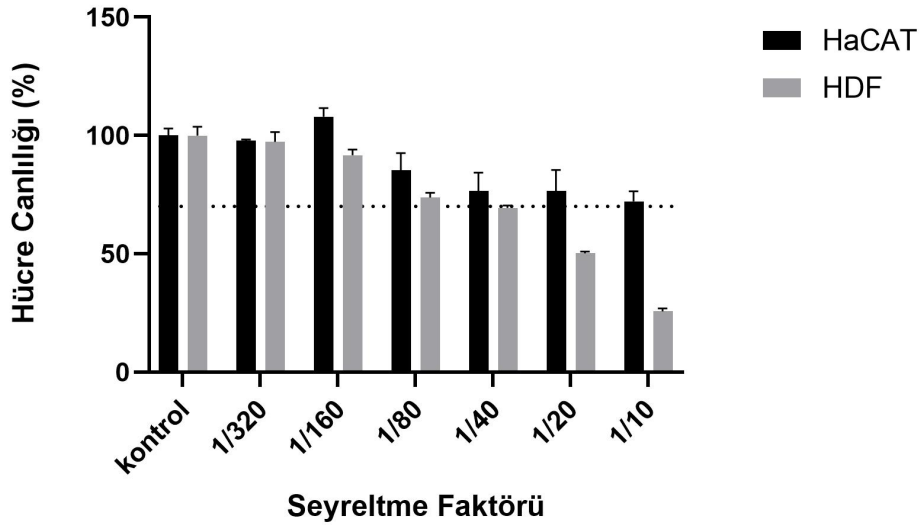
Farklı donörlerden alınan kadavra derisinin; kesit analizi ile elde edilen floresan mikroskop görüntüsü (Şekil4.19a,b) ile Z-ekseninde elde edilen floresan mikroskop görüntüsünün (Şekil 4.22a) sahip oldukları floresan özelliklerin donöre bağılı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılığın bireysel biyomolekül kompozisyonu ve bunların floresan özelliklerinin etkili olabileceği deriden gelen otofloresanı etkilediği açıktır.

Her iki görüntüleme yönteminde işaretli formülasyon uygulanan örneklerin SC'dan dermise doğru hem kırmızı hem yeşil floresanda artış gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle FITC ile

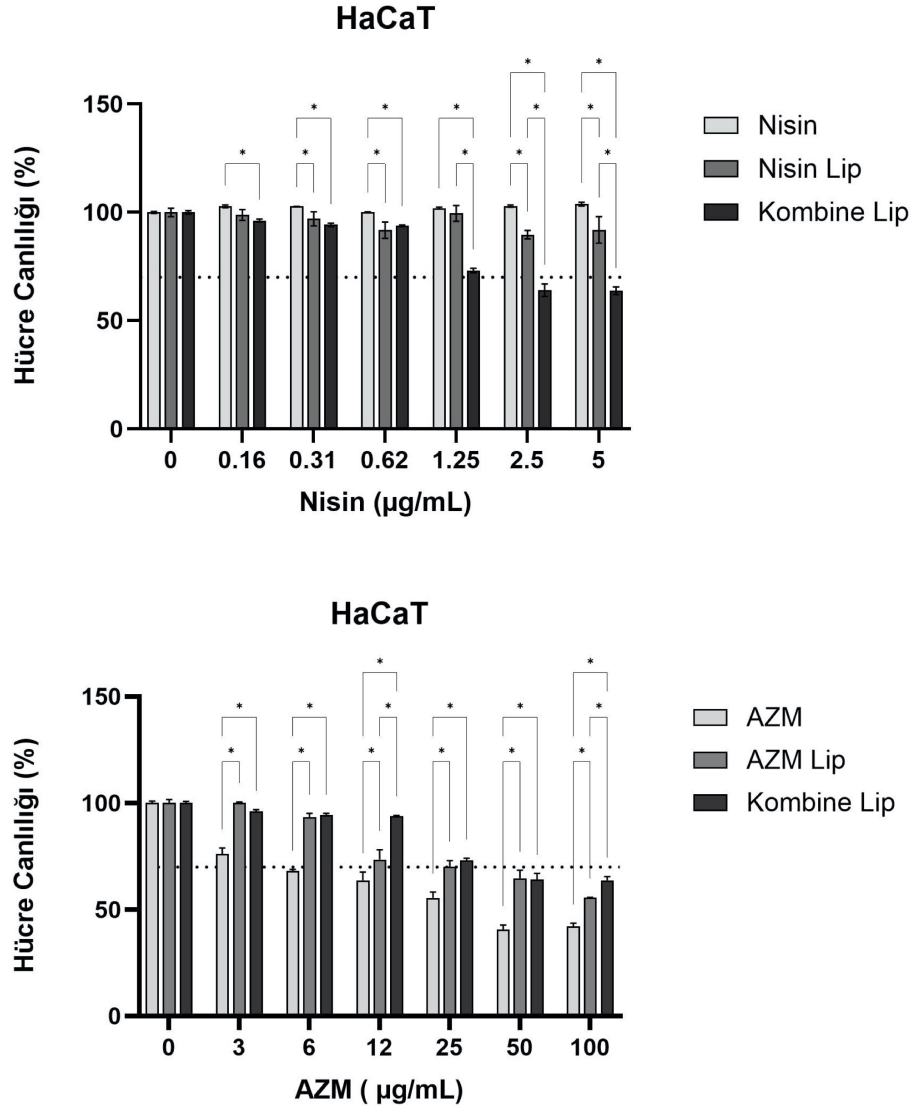
yeşil işaretli formülasyonun dermis tabakasında yoğunlaştığı ve yeşil floresan şiddetinde artışa yol açtığı belirlenmiştir. DilC18 ile kırmızı işaretli lipidlerin, SC'dan epidermise doğru azalan bir floresan gösterdiği belirlenmiştir. Farklı yöntemler ile gerçekleştirilen görüntüleme çalışmaları, lipozom formülasyonu uygulanan deri yapısında işaretli nisin moleküllerinin, dermis tabakasında lokalize olduğunu göstermektedir. Birbirinden bağımsız gerçekleştirilen deney süreçlerinde, nisin işaretleme adımı da dahil olmak üzere yeni hazırlanan işaretli formülasyon ve farklı donörlerden elde edilen deri kullanıldığı deneylerden, birbirine paralel sonuçlar elde edilmesi, yöntemin doğruluğu ve tekrar edilebilirliğini desteklemektedir.

4.10. Lipozomların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi

Lipozom formülasyonlarının biyouyumluluklarını değerlendirmek için insan dermal fibroblast hücre hattı (HDF) ve insan keratinosit hücre hattı (HaCat) kullanılmıştır. Boş lipozom formülasyonlarının her iki hücre hattına da uygulanmış ve sitotoksik özellik Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.27 Boş lipozom formülasyonlarının HaCAT ve HDF hücre hatlarındaki biyouyumluluğu



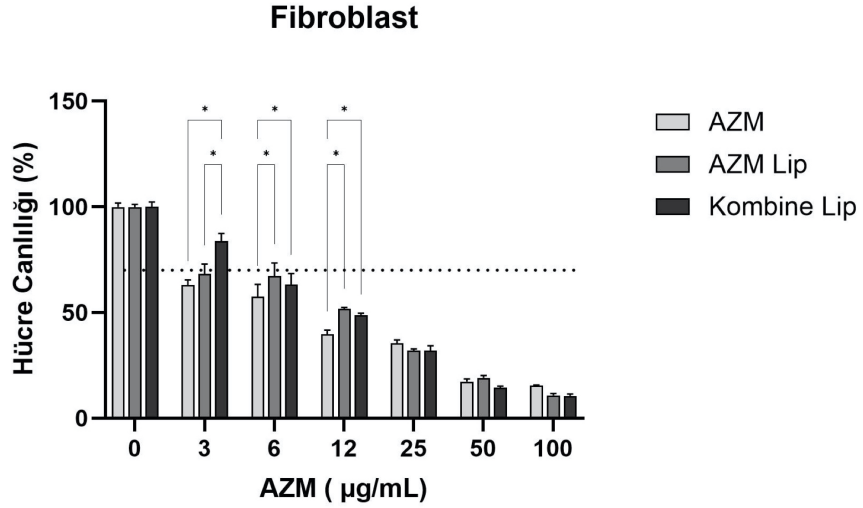
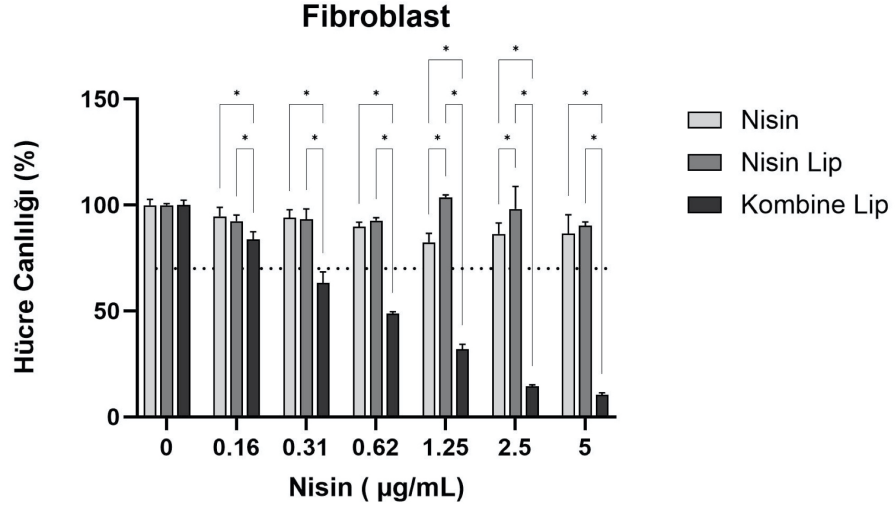
Şekil 4.28 Lipozom formülasyonlarının HaCaT hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi a) Nisin içeren formülasyonların ve nisin çözeltisinin b) AZM içeren formülasyonların ve AZM çözeltisinin * P<0.05.

Formülasyonların HDF ve HaCaT hücre hatlarındaki biyoyumluluk verileri incelendiğinde; nisin yüklü lipozomal formülasyonlar, hem HDF hem de HaCaT hücre hatlarında %70 üstünde hücre canlılığı göstermiştir. HaCaT hücre hattında serbest nisin, lipozomal nisine göre daha iyi biyoyumluluk gösterirken, HDF hücre hattında lipozomal formülasyonun biyoyumluluğu daha yüksek belirlenmiştir. Tayeferad ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 1 mg/mL derişimdeki serbest nisin, pozitif yüzey yükünün etkisinden dolayı

formülasyon yapısındaki nisine göre fibroblast hücre hattında biyoyumluluğunun düşük olduğunu bildirmişlerdir[116].

HaCat hücre hattındaki verilere göre serbest nisin derişimi arttıkça, sitotoksik etkinin aksine hücre canlılığı artış göstermiştir. Mouritzen ve arkadaşları, serbest nisin HaCat hücre hattında, 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 'den 50 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar artan derişimlerde hücre canlılığını pozitif yönde etkilediğini, 200 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar tüm derişimlerde hücre canlılığını %70 üzerinde belirlemişlerdir[117]. Nisin içeren formülasyonların HaCat ve HDF biyoyumlulukları literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur.





Şekil 4.29 Lipozom formülasyonlarının insan dermal fibroblast hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkisi a) Nisin içeren formülasyonların ve nisin çözeltisinin b) AZM içeren formülasyonların ve AZM çözeltisinin *P<0.05.

HaCat hücre hattında AZM içeren lipozomal formülasyonun biyoyumluluğu, serbest AZM'ye göre anlamlı derecede yüksek belirlenmiştir. HDF hücre hattında, düşük AZM derişimlerinde lipozomal formülasyonun biyoyumluluğu anlamlı derecede yüksek bulunmuşken, yüksek derişimlerde serbest AZM ve lipozomal AZM hemen hemen aynı biyoyumluluğu sergilemektedir. Rukavina ve arkadaşlarının verilerine göre HaCat hücre hattında serbest AZM, 16 µg/mL derişimlerde yaklaşık %70 üzerinde hücre canlılığı

gösterirken, bizim çalışmamızda bu derişim 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ belirlenmiştir. Bu farklılığın hücre canlılığını belirlemede kullanılan yöntemden kaynaklandığı düşünülmektedir.

HDF hücre hattında AZM'nin biyoyumluluğunu bildiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Rukavina ve arkadaşları insan diploid fibroblast hücre hattında (MJ90hTERT) serbest AZM'nin 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişime kadar biyoyumlu olduğunu göstermişlerdir[27]. Çalışmamızda AZM'nin HDF hücre hattında 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişime kadar biyoyumlu bulunmuştur. Bu durum, farklı fibroblast hücre hatlarının kullanılmasından kaynaklı olabileceği ve/veya yöntem kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Kombine lipozomların biyoyumluluğu HaCat hücre hattında AZM yüklü lipozomlara göre artış göstermiştir, bu durum nisinin biyoyumluluğu desteklediği yönünde değerlendirilmiştir. HDF hücre hattında ise 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AZM derişimine kadar kombine lipozom AZM yüklü lipozoma göre anlamlı derecede artan biyoyumluluk sergilerken, yüksek dozlarda bir farklılık belirlenememiştir.

Keratinositler, epiderminin en yaygın hücre tipidir. Stratum bazal'da lokalize olan keratinosit kök hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşur ve SC'ye doğru hareket ederken korneositlere farklılaşır. Keratinositler inflamasyon prosesinde, yara iyileşmesinde ve immün yanıtta aktif rol üstlenir. Fibroblastlar ise dermis tabakasında bulunurlar ve ana işlevleri, ekstraselüler matriksin makromoleküllerinin sürekli salgılanmasıyla yapısal bütünlüğü sağlamaktır[118]. Biyoyumluluk testleri değerlendirildiğinde HaCat hücre hattında lipozomal formülasyonların biyoyumluluğu HDF hücre hattına göre daha yüksektir. Deri penetrasyon adımları değerlendirildiğinde formülasyonun penetrasyonu sırasında, biyoyumluluğun daha yüksek olan keratinosit hücrelerinden biyoyumluluk daha az olan fibroblast hücrelerine doğru, etkin madde derişiminin düşeceği değerlendirildiğinde, derinin etkin maddelere toleransı sıralaması açısından avantajlı görünmektedir.

4.11. Formülasyonlar ile SC etkileşiminin QCM-D ile incelenmesi

Nanopartiküllerin deri yoluyla vücuda girişinin hücre içi, hücreler arası (paracellular) ve saç folikülleri yollarıyla olabileceği önerilmektedir. Formülasyonların ilk karşılaştığı tabaka

olan SC üzerinden deri penetrasyonunda kullanılan nihai yol hakkında hâlâ spekülasyonlar bulunmaktadır[119]. Bu noktadan yola çıkarak formülasyon özelliklerinin SC davranışı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.11.1. Yapıştırıcı Kalınlığının Optimizasyonu

Akrilik yapıştırıcı (DURO-TAK 87-900A; Henkel Corporation), QCM-D kristalinedoğrudan uygulanamayacak kadar viskozdu. Yapıştırıcının altın sensör kaplama performansını değerlendirmek için THF ile seyreltilmiştir. Altın sensörün homojen bir şekilde kaplanabildiği en yüksek derişiminin Yapıştırıcı:THF, 1:4 (V/V) olduğu bulunmuştur. Ancak, bu derişimde yapıştırıcı çok ağırdı ve kristalde herhangi bir salınımı tetikleyemedi. Tetiklemeyi teşvik etmek için, Yapıştırıcı:THF oranı 1:8'e seyreltildi ve bu da kristallerde birkaç harmonik salınımın başarılı bir şekilde tetiklenmesiyle sonuçlanmıştır. Ancak, ölçümden sonra kuartz kristalinin QCM-D ölçüm hücresine yapıştığı, kristalin zarar görmesine ve hatta kırılmasına neden olduğu gözlemlendi.

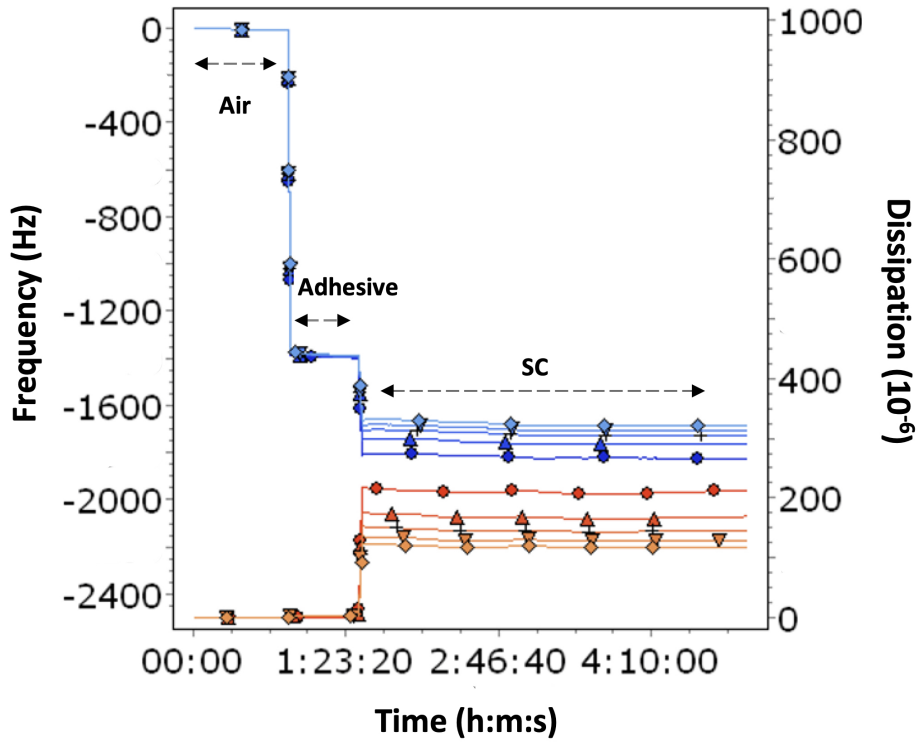
Yapıştırıcı:THF oranı 1:16 iken SC ve altın yüzey arasında iyi bir yapışma sağlanmış; kristalde 13. Overtona kadar tüm harmonikler uyarıldı. Daha düşük bir yapıştırıcı derişiminin avantajlı olup olmayacağını görmek için, daha da seyreltilmiş bir yapıştırıcı (yapıştırıcı:THF, 1:20) test edildi. Yapışmanın zayıf olduğu ve SC'nin kuartz sensörlerinden kolayca ayrıldığı gözlemlenmiştir Bu tür denemeler sonucunda, tüm harmoniklerin uyarılabildiği ve SC'nin sıkı bir şekilde yapıştığı en uygun yapıştırıcı:THF oranının 1:16 olduğu belirlenmiştir.

Kristalin f ve D yanıtı, yapıştırıcı uygulanmadan önce, yapıştırıcı uygulandıktan sonra ve yapıştırıcı kaplı kristalin SC katmanı ile kaplanmasından sonra ölçüldü. Test örneklerinden birinin tüm bu aşamalarda alınan ölçümleri Şekil 4.30'de gösterildiği gibi birleştirilmiştir.

Sadece yapıştırıcı ile, ΔD , Δf 'ye göre küçük olduğundan, yapıştırıcı tabakası QCM-D kristaline güçlü bir şekilde yapışmış sert bir tabaka olarak kabul edilebilir. Bu nedenle, kalınlığını hesaplamak için Sauerbrey eşitliği kullanılmıştır.

4.11.2. SC'nin QCM-D sensörüne yapıştırılması

SC'nin ortalama kalınlığı yaklaşık olarak 10-20 μm dir[120]. Kadavra derisinden SC tabakası izole edildikten sonra, tamamen nemli olan SC tabakasının çeşitli noktalarındaki kalınlığı dijital mikrometre ile ölçülmüş ve ortalama kalınlık $27.8 \pm 7.76 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Şekil 3'te gösterilen sonuçlara göre, SC'nin kalınlığı Denklem 1 kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Denklem 1'e dayalı hesaplamalar, yapıştırıcı için kristal yüzeyindeki kütle artışının $25.8 \pm 1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve SC için $9.5 \pm 2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.30 QCM-D ile elde edilen f (mavi) ve D (kırmızı) verilerinin zamana karşı değişimi

Nemli olan SC kristallere monte edildiğinde, 7. harmoniğe kadar yanıt alınmıştır.

SC'nin yapıştırıcı kullanılarak başarıyla QCM-D kristaline monte edilebileceği gösterildikten sonra, bu düzenek, farmasötik ve kozmetik alanlarda önemli sıvı formülasyonlar olan lipozomların adsorpsiyon ve desorpsiyon süreçlerini gerçek zamanlı olarak izlemek için kullanılmıştır.

4.11.3. Altın Sensör ve Lipozom Formülasyonları ile Yapılan Ölçümler

Lipozom formülasyonlarının uygulanmasından sonra SC ölçümlerinde gözlemlenen Δf ve ΔD değerleri Çizelge 4.19'de özetlenmiştir.

	Altın Sensor		SC-Kaplanmış Sensor	
	Δf	ΔD	Δf	ΔD
Boş Lipozom Formülasyonu	-21.2 ± 2.2	0.4 ± 0.2	-7.9 ± 5.2	0.07 ± 1.9
Nisin Yüklü Lipozom Formülasyonu	-23.5 ± 2.8	$\simeq 0$	-12.0 ± 3.3	1.6 ± 2.8
AZM Yüklü Lipozom Formülasyonu	-24.5 ± 7.0	$\simeq 0$	-13.4 ± 0.4	-1 ± 5.4
Kombine Lipozom Formülasyonu	-26.1 ± 2.9	0.5 ± 0.06	-19.5 ± 4.7	2.3 ± 4.4

Çizelge 4.19 Lipozom formülasyonlarının altın kuartz sensör ve SC kaplı altın kuartz sensör ile etkileşimi sonucu elde edilen Δf ve ΔD değerleri.

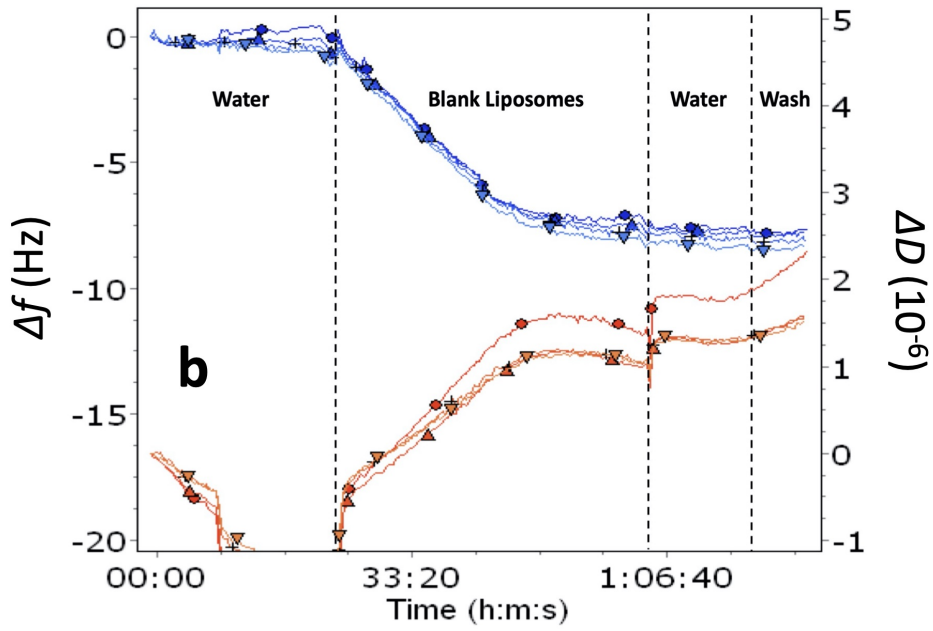
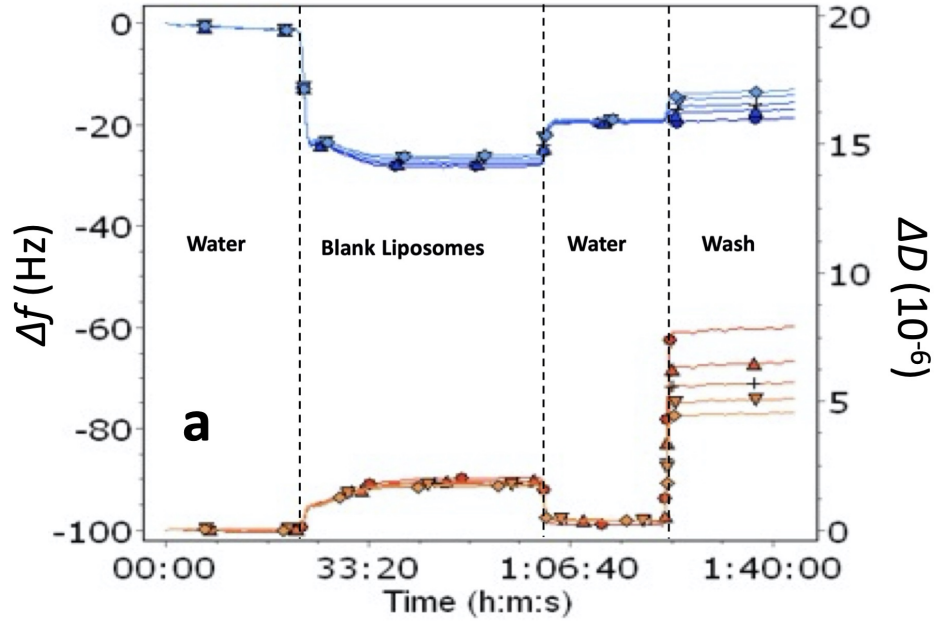
Lipozom formülasyonu ile altın kaplı kuvartz kristal arasındaki etkileşim sonucu f ve D değişimlerine dair örnekler Şekil 4.31a; 4.32a; 4.33a; 4.34a'da gösterilmiştir.

Lipozomların birikmesiyle frekans başlangıca (0 Hz) göre 34–100 Hz arasında azalmakta ve enerji kaybı başlangıca (0 birim) göre $5 - 30 \times 10^{-6}$ birim artmaktadır. f ve D 'deki bu büyük kaymalar, yumuşak ve dissipative özellikteki veziküller olan lipozomların birikimini göstermektedir. Bu gözlemler, daha önce bildirilen sonuçlarla benzerdir [121]; Ancak, Keller ve Kasemo'nun bu raporu, veziküllerin su yıkama adımındaki durumunu göstermemektedir. Çalışmamızda, veziküllerin adsorpsiyon sonrası sağlam olduğu, ancak suya maruz kaldıklarında hemen sonra çözülüp çift katmanlara dönüştüğü belirlenmiştir. Bu durum, Δf 'nin -20 Hz'ye artış göstermesiyle, çift katmanlara karşılık gelen bir değişimle açıklanır ve bu açıkça görülmektedir. Vesikülden çift katmana dönüşüm, özellikle ΔD kaymasındaki değişimlerle daha belirgin hale gelir; bu değer neredeyse sıfıra düşer. Bu, veziküllerin lipid çift katmanlarına altın yüzey üzerinde dönüştüğünün açık bir göstergesidir.

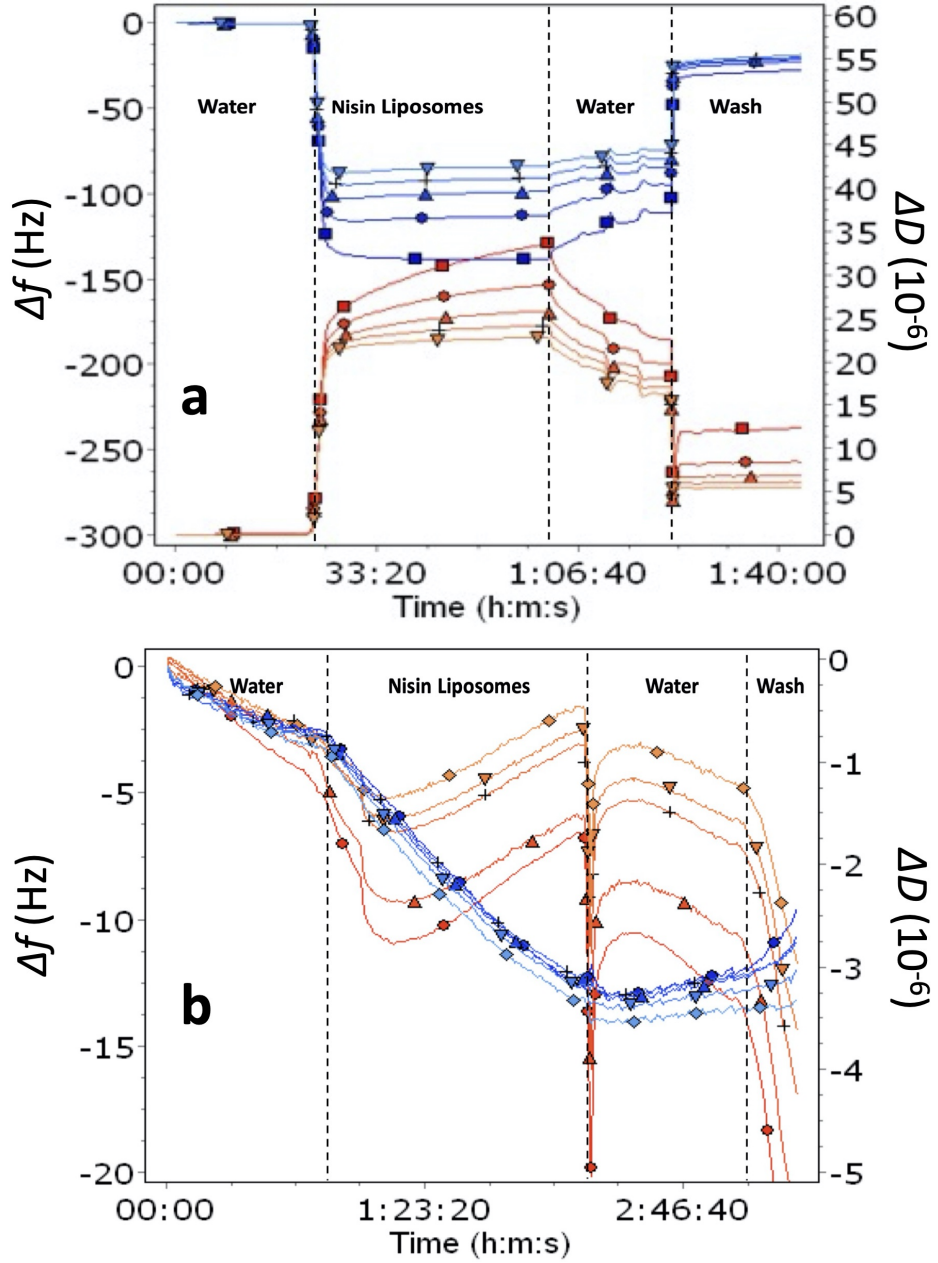
Bu değişimler, sıkı bir şekilde paketlenmiş sağlam lipid vesiküllerinin adsorpsiyonunu göstermektedir[122, 123]

İlaç yüklü lipozomlarla yapılan ölçümlerde frekansta 20-25 Hz kadar sistematik bir artış gözlenmiştir (Şekil4.32a; 4.33a; 4.34a) Bu durum, QCM-D tekniği ile boş ve ilaç yüklü lipozomlar arasında ayırım yapılabildiğini göstermektedir.

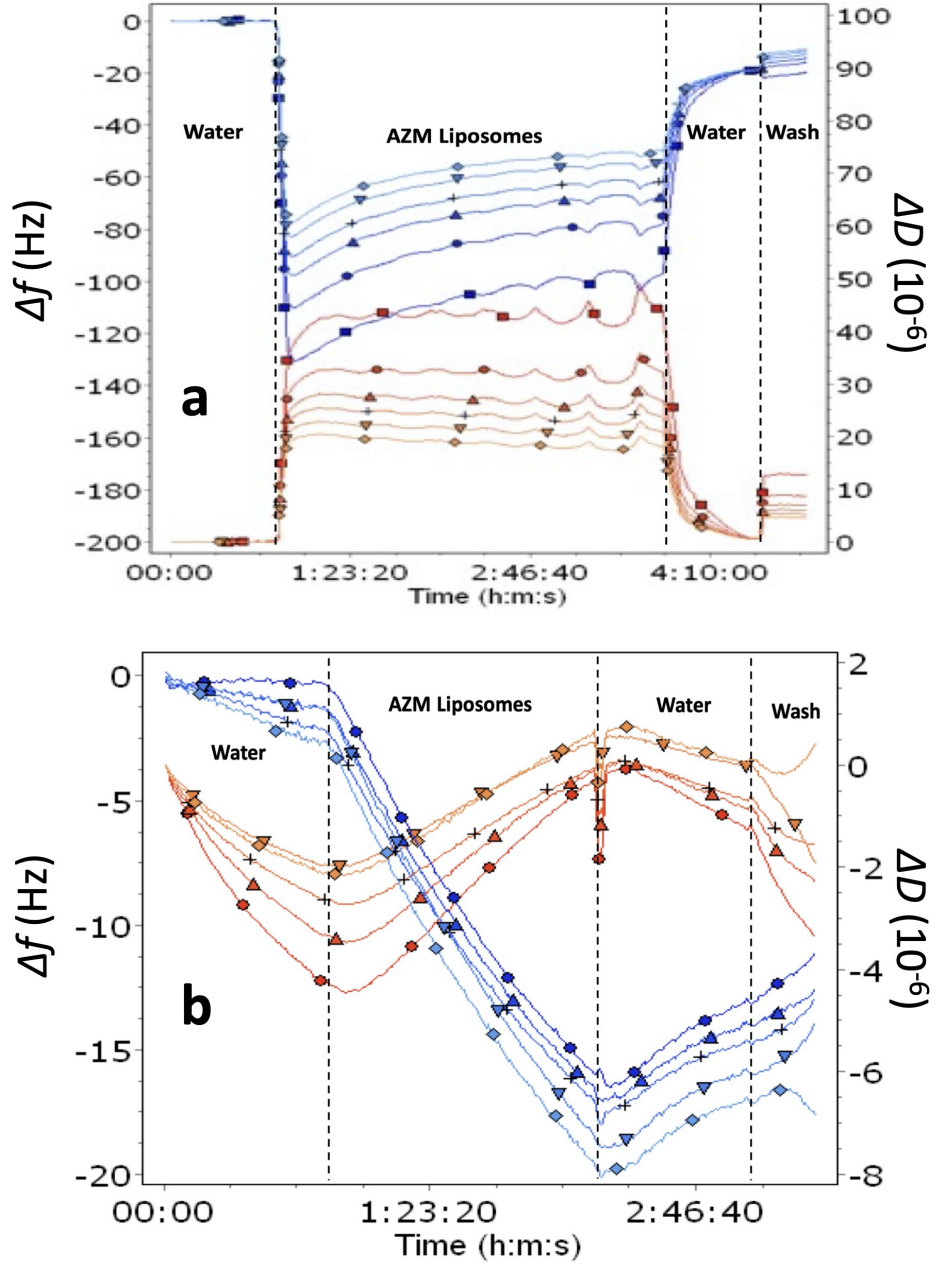




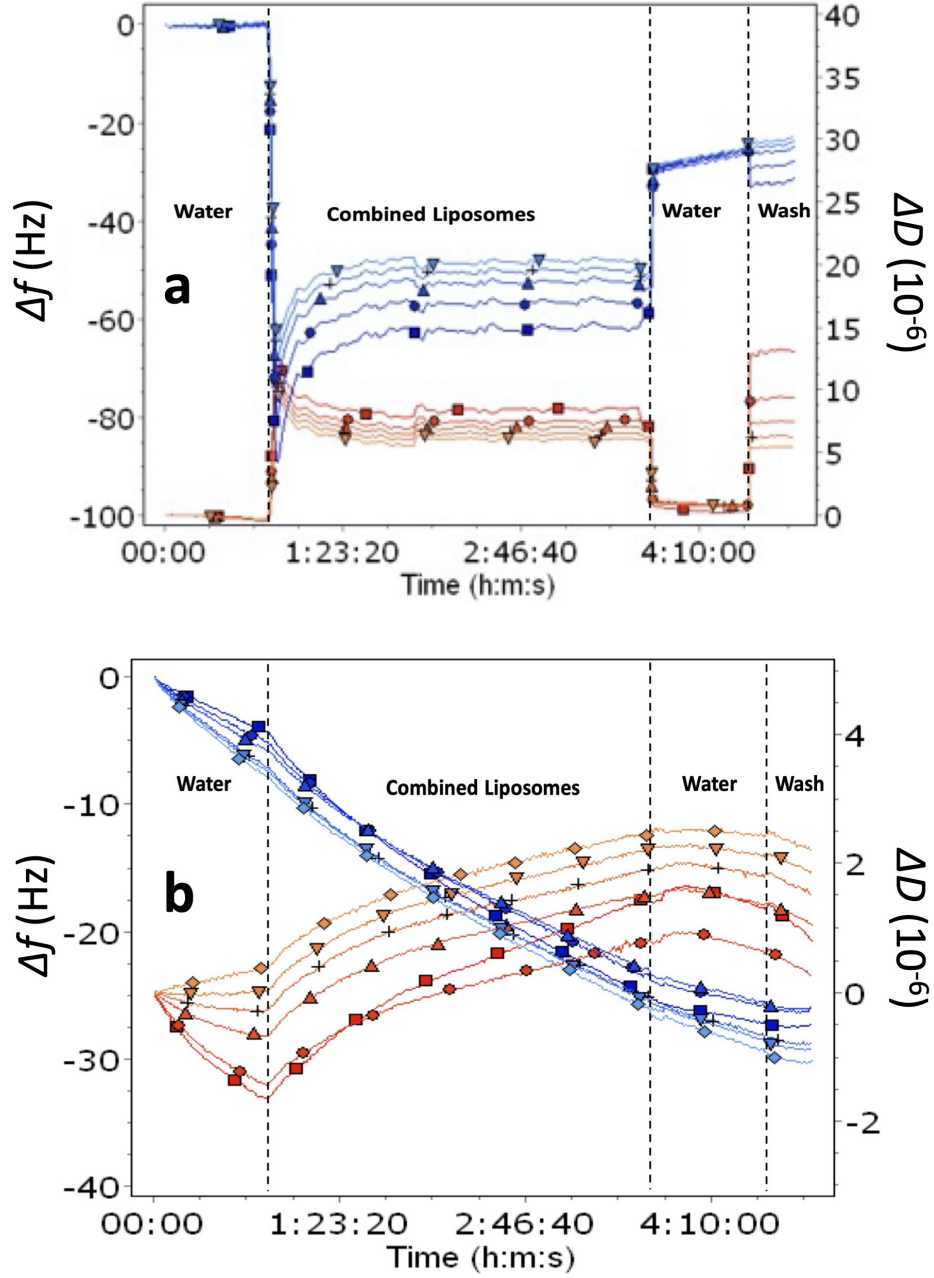
Şekil 4.31 QCM-D ile ölçülen boş lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi



Şekil 4.32 QCM-D ile ölçülen nisin yüklü lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi



Şekil 4.33 QCM-D ile ölçülen AZM yüklü lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi



Şekil 4.34 QCM-D ile ölçülen kombine lipozom formülasyonunun altın kaplı kuartz sensör (a) ve SC (b) ile etkileşimi: Δf (mavi) ve ΔD (kırmızı) değişimi

4.11.4. SC ve Lipozom Formülasyonları ile Yapılan Ölçümler

SC ile kaplı altın kuvars sensörü ve lipozom formülasyonları arasındaki etkileşimler Şekil 4.31b; 4.32b; 4.33b; 4.34b'de sunulmuş ve Çizelge 4.19'de özetlenmiştir.

Altın sensöre doğrudan uygulandığı durumunda olduğu gibi, boş ve ilaç yüklü lipozomların frekansındaki farklar, QCM-D'nin lipozomlardaki ilacın varlığını tanıyabilme yeteneğini göstermektedir. Ancak, beklenildiği gibi, lipozomların SC üzerindeki etkileşimleri farklıdır.

İlk olarak, frekans kaymaları, lipozomların sıkıca paketlenmiş lipid tabakası olarak biriktirildiğini gösterir; bu altın üzerindeki, önce vezikül birikimi ardından çift tabaka oluşturulmasıyla gerçekleşen 2 adımlı bir süreçten farklıdır.

İkinci olarak, SC üzerindeki adsorpsiyon sürecinin kinetiği, altın yüzeyindeki sürece göre belirgin şekilde daha yavaştır. Altın yüzeyde, veziküllerin birikimi ve çift katmanlara dönüşümü oldukça hızlı gerçekleşirken, SC üzerinde bu süreç daha karmaşık etkileşimler sergiler. Lipozomlar, tek bir adımda SLBs olarak birikmek üzere parçalanır. SC üzerindeki vezikül parçalanması, ilaç salımı açısından önemli sonuçlar doğurur. Nanopartiküllerin yüzeylere adsorpsiyon davranışını inceleyen bir çalışmada, nanopartiküllerin hidrofobik yüzeylere sağlam olarak adsorbe olduğu, hafif polar yüzeylerde ise parçalandığı gösterilmiştir[124]. Bu parçalanmanın, nanopartiküllere dahil edilen ilaçların salımını kolaylaştırdığı ileri sürülmüştür. Biz de çalışmamızda veziküllere dahil edilen ilaçların salımı için benzer bir senaryo önermekteyiz. Veziküllerin çift katmanlara dönüşümü, bu dönüşüm altın benzeri yüzeylerde iki aşamalı bir süreç ya da SC üzerinde tek aşamalı bir süreç olsun, veziküllerden ilaç salımını kolaylaştırmaktadır.

Üçüncü olarak, SC üzerindeki Δf ilk etapta hafifçe azalırken, bu azalma deri hidrasyonu sırasında gerçekleşir. Buna karşılık, altın yüzeyde veziküllerin adsorpsiyonu sırasında Δf sürekli ve belirgin bir şekilde azalır. D ise daha karmaşık bir şekilde değişim gösterir. Suya maruz kalındığında D başlangıçta azalır, ardından lipozomal adsorpsiyon sırasında ya artar ya da sabit kalır. Görünüşe göre SC, lipozomlarla etkileşirken karmaşık bir yapısal değişim geçirmektedir. Daha da önemlisi, bu sonuçlar SC'nin sertliğinin suya maruz kaldığında arttığını, ardından lipozomlarla etkileşim sonucunda SC'nin daha yumuşak hale geldiğini göstermektedir. Bu, muhtemelen lipozomların SC üzerinde birikmesiyle ilişkilidir.

Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Çizelge 4.19'deki veriler, nisin ve AZM'nin altın ve SC kaplı sensörlerde kütle (Δf) açısından benzer adsorpsiyon davranışları sergilediğini

göstermektedir.

Altın sensör üzerinde, her iki lipozom da katı ve kompakt katmanlar oluşturur ($\Delta D \approx 0$). SC kaplı sensörde ise nisin daha viskoelastik ve yumuşak bir katman oluştururken ($\Delta D = 1.6$), AZM nispeten daha sert bir katman oluşturur ($\Delta D = -1$). Martin ve arkadaşlarının raporuna göre, hidrofilik ilaçlar vezikülün sulu çekirdeğinde kapsüllenebilirken, amfifilik, lipofilik ve yüklü hidrofilik ilaçlar, hidrofobik ve/veya elektrostatik etkileşimler yoluyla vezikül çift tabakasıyla etkileşime girebilir [108]. Nisinin katyonik ve amfipatik yapısı göz önüne alındığında, lipozomal yapı içerisindeki lokalizasyonunu etkileyebileceği ve çift tabaka içinde yer almasına da olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, vezikül kompozisyonunun boyut, yük, termodinamik faz, lamelli yapı ve çift tabaka yapısının elastikiyeti gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri etkilediği bilinmektedir [125].

Zhang ve arkadaşları, AZM çözeltisinin yükünün, çevresel ortamın iyonik gücü ve pH değerine bağlı olduğunu bildirmiştir [126]. Lipozomal formülasyonların hazırlanmasında kullanılan HPLC kalitesinde saflaştırılmış su (pH:6–7) ortamında, AZM protonlanmış formunda bulunmaktadır. Nisinin amfipatik yapısı ve katyonik yükü, daha viskoelastik ve yumuşak bir katman oluşumuna neden olurken, AZM'nin hidrofobik doğası ve daha yüksek zeta potansiyeli, daha sert bir katman oluşumuna yol açmaktadır. Daha az negatif zeta potansiyeline (-11.4) sahip nisin yüklü lipozomlar, SC'nin negatif yüklü bileşenleri ile daha az itici etkileşime girebilir ve böylece daha gevşek bağlanmış, viskoelastik bir katman oluşumuna yol açabilir. Daha büyük negatif zeta potansiyeline (-30.2) sahip AZM, daha güçlü itici etkileşimler oluşturarak böylece daha sıkı ve sert paketlenmiş yapı ile sonuçlanabilir.

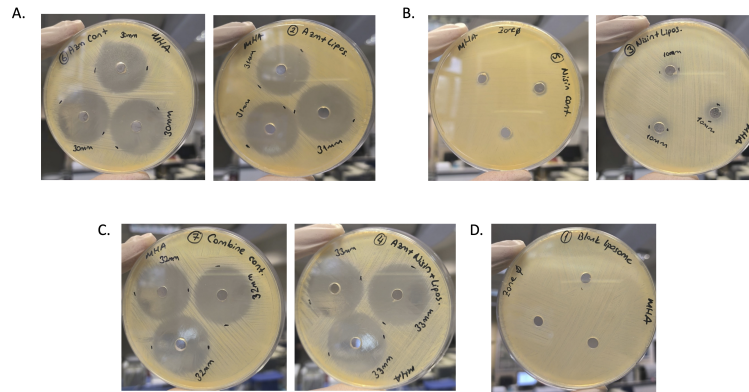
SC sensör üzerindeki ΔD 'deki farklılıklar, ilaç kapsülleme ve lipozom kompozisyonu gibi faktörlerin, yüzey etkileşim dinamiklerini etkilediğini ve adsorbe olmuş katmanlarda farklı viskoelastik özelliklere yol açtığını göstermektedir [121].

Küçük veziküllerin yüzeyde lipid çift tabaka oluşturmak için bir araya gelmesi süreçleri hala tam aydınlatılmış değildir. Bu süreçlerin anlaşılması, temel hücresel süreçlerin de aydınlatılmasını sağlar, lipid vezikülleri ile yüzeyler arasındaki etkileşimin anlaşılmasına

katkıda bulunur. Keller ve arkadaşları yüzey özelliklerinin veziküllerin adsorpsiyon davranışını ve çift tabaka oluşumunun kinetiğini etkilediğini bildirmişlerdir[121]. Bu mekanizma, lipozom formülasyonlarının altın kristal yüzeylerde ve SC yüzeylerinde sergilediği farklı adsorpsiyon davranışları için kanıt sağlar. Salafsky ve arkadaşları tarafından, protein içeren veziküllerden çift tabakaların oluşumu üzerine yaptığı deneysel bir çalışmada, proteinlerin vezikülün dış yüzeyinden uzaklaştığı gösterilmiştir [127]. Destekli bir membranın önemli yapısal ve işlevsel özelliklerinin, protein içeren veziküllerden nasıl oluşturulduğuna bağlı olduğunu vurgulamak önemlidir. Çalışmamız, QCM-D tekniğinin SC ve lipozomlar arasındaki etkileşimleri anlamaya dair değerli veriler sunabileceğini göstermektedir.

4.12. Mikrobiyoloji Çalışmaları

Agar kuyu difüzyon testi sonuçları Çizelge 4.20’de sunulmuştur. Boş lipozom formülasyonu için herhangi bir görünür inhibisyon zonu tespit edilmemiştir. AZM, nisin ve kombine lipozom formülasyonları, aynı etkin maddeleri içeren kontrol çözeltilerine kıyasla inhibisyon zonunda artış sergilemiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 Kontroller ve lipozom formülasyonları için inhibisyon zonu. A) AZM kontrol ve AZM yüklü lipozom formülasyonu, B) Nisin kontrol ve Nisin yüklü lipozom formülasyonu, C) AZM-nisin kontrolü ve Kombine Lipozom Formülasyonu, D) Boş lipozom formülasyonu

Formülasyon	İnhibisyon Zonu ³
AZM Kontrol ¹	30
AZM yüklü Lipozom ¹	31
Nisin Kontrol ²	Zon yok
Nisin yüklü Lipozom ²	10
AZM-Nisin Kontrol ^{1,2}	32
Kombine Lipozom ^{1,2}	33

¹:AZM derişimi 1000 µg/mL

²:Nisin derişimi 50 µg/mL

³:inhibisyon zonunun çapını mm olarak ifade eder

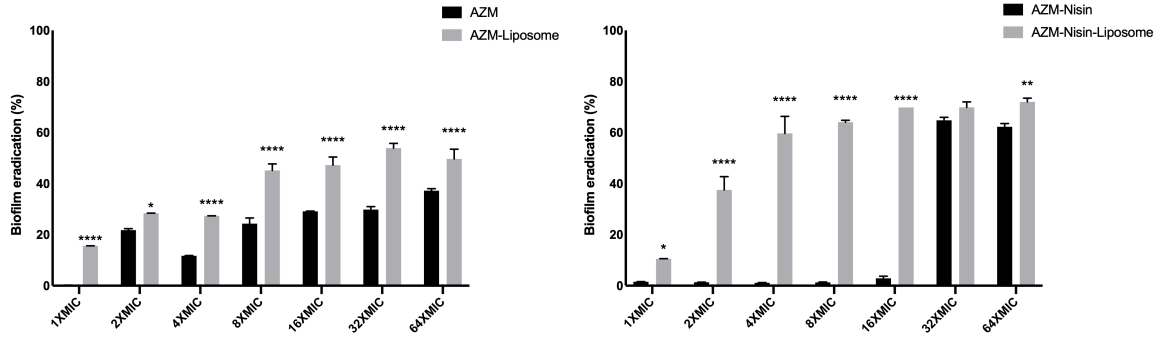
Çizelge 4.20 Agar kuyu difüzyon testi sonuçları

Broth mikrodilüsyon testi sonuçları Çizelge 4.21’da sunulmuştur. Beklenildiği gibi, boş lipozomlar için herhangi bir antimikrobiyal aktivite tespit edilmemiştir. Lipozom formülasyonları, test edilen tüm etkin maddeler için MIC değerlerinde iyileştirme göstermemiştir.

Formülasyon	MIC $\mu\text{g/mL}$
AZM Kontrol	7.8
AZM yüklü Lipozom	7.8
Nisin kontrol	25
Nisin yüklü Lipozom	50
AZM-Nisin kontrol	AZM: 7.8 Nisin: 0.39
Kombine Lipozom	AZM:7.8 Nisin:0.39

Çizelge 4.21 Kontroller ve lipozom formülasyonları için minimum inhibisyon konsantrasyonları

Bir sonraki araştırma sorusu olarak, lipozom formülasyonlarının biyofilm eradikasyonu üzerinde bir etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla, kontrollerin ve lipozom formülasyonlarının, önceden oluşturulmuş biyofilmleri inhibe etme yeteneği incelenmiştir(Şekil 4.36).



Şekil 4.36 Antibiyofilm aktivitesi (*S. aureus* ATCC 29213 ile önceden oluşturulmuş biyofilme karşı). (**** $p < 0.0001$, ** = $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEC), kontrole kıyasla biyofilmi %99.9'a kadar eradikasyona uğratan konsantrasyondur. Test edilen formülasyon ve kontrol numunelerinde MBEC elde edilememiştir. Ancak, AZM-lipozom için görece yüksek derişimlerde (500 ve 250 $\mu\text{g/ml}$) %50 veya daha fazla biyofilm eradikasyonu gözlemlenmiştir. Kombine lipozom formülasyonları 32-500 $\mu\text{g/mL}$ derişim aralığında, *S. Aureus* ile önceden oluşturulmuş biyofilmin %50'sini inhibe etmiştir. Ortalama biyofilm eradikasyonu, test edilen en yüksek derişim olan 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde, nisin için %59.38 ve nisin yüklü lipozom formülasyonu için %40.18'e ulaşmıştır. Diğer daha düşük nisin derişimlerinin biyofilm eradikasyonunda etkisi olmağı belirlenmiştir.

Bakteriyel biyofilmlerin, ilaçların biyofilm matrisine nüfuz etme zorluğundan dolayı planktonik bakterilere kıyasla daha dirençli olduğu gösterilmiştir[128]. Genel olarak, AZM içeren lipozom formülasyonları, serbest etkin madde içeren kontrollere kıyasla antibiyofilm etkiyi iyileştirmiştir.

Mouritzen ve arkadaşlarının nisinin yara iyileşme sürecinde immunomodülatör etkisi ve biyouyumluluğunun bir arada değerlendirildiği çalışma verilerinden[117] yola çıkarak hazırlamış olduğumuz kombine lipozom formülasyonunun artmış antimikrobiyal aktivitesinin yanısıra, yara iyileşme sürecindeki enfeksiyonların tedavisinde avantaj sağlayacağı değerlendirilmektedir. Kombine lipozom formülasyonunun antimikrobiyal aktivitesi, serbest etkin maddeler içeren kontrol çözeltilisine göre nispeten artış göstermiştir.

Biyofilm oluşturan bakterilerin, planktonik olanlara karşı daha fazla direnç gösterdiği bilinirken, deri enfeksiyonlarının yaygın patojeni olan *S. Aureus* tarafından oluşturulan biyofilm eradikasyonu formülasyon ve kontrol muamelesi sonrası değerlendirilmiştir. Boş lipozom formülasyonu tek başına bakteriyel zone inhibisyonu ve antibiyofilm etkinlik göstermez iken, kombine lipozom formülasyonu, serbest nisin ve AZM içeren kontrol zeltisine kıyasla anlamlı derecede antibiyofilm etkinlik göstermektedir.

Nisin ve AZM içeren kombine lipozom formülasyonu antimikrobiyal ve antifiyofilm etkinliği değerlendirildiğinde, yeni bir transdermal formülasyon olmayı vaadetmektedir.



5. YORUM

Tez çalışması kapsamında, antimikrobiyal terapötik ve antimikrobiyal peptit (AMP) kombinasyonu içeren sinerjik etkili lipozom formülasyonu geliştirilmesi ve *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Nisin, Gram pozitif ve Gram negatif patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip bir peptittir. Özellikle dermal enfeksiyonların en yaygın patojeni olan *S. aureus*'un inhibisyonunda oldukça etkilidir.

Nisin analizi için literatürde kullanılan yöntemlerden öncelikle BCA kit analizi tercih edilmiştir[22, 23, 129]. Ancak, hazırlanmış olduğumuz nisin içermeyen lipozomal formülasyonların, BCA kit analiz sonuçlarında yanlış pozitif sonuç verdiği ve çok yüksek protein varlığı tespit ettiği belirlenmiştir. BCA yöntemi, bizim çalışma koşullarımızda spesifiklik kriterini sağlamadığından nisin tespitinde kullanılmak üzere CBQCA yöntemine geçilmiştir. CBQCA yönteminin belirlenmesinde etkili olan parametreler, yöntemin çalışma aralığının, tayin sınırının ng düzeyinde protein tespitine olanak sağlaması olması ve lipozom bileşenlerini içeren koşullarda nisine spesifiklik göstermesidir. Formülasyonlara ait EE ve IVRT çalışmalarında CBQCA yöntemi tercih edilmiş ve başarıyla kullanılmıştır.

IVPT çalışmalarına başlandığında, kadavra derisinden gelen yüksek protein girişimi nedeniyle CBQCA yöntemi kullanılamamıştır. Bu sınırlılığın üstesinden gelmek için literatürde kullanılan HPLC yöntemi ön çalışmaları yapılmıştır. HPLC yönteminin tayin sınırının IVPT koşullarında beklenen derişimleri belirlemek için yetersiz olduğu görülmüştür. Ayrıca stok nisinin yüksek saflıkta olmayışı, nisin kromatogramı, diğer proteinlere ait olduğu düşünülen bir çok pike sahiptir. Nisinin alıkonma zamanına ilişkin literatürlerde iki farklı zamanı olduğu görüşmüştür. Bu farklı verilerin kolon seçimlerinden kaynaklandığı düşünülmele birlikte, bizim elde ettiğimiz kromatogramda, literatürde bildirilen her iki alıkonma zamanlarında pik belirlenmiştir. Nisin tespitine yönelik olarak HPLC yönteminin hem spesifiklik hem de tayin sınırları bakımından bizim çalışma koşullarımıza uygun olmadığına karar verilmiştir.

Gıda koruyucusu olarak yaygın olarak kullanılan nisin gıda matris koşullarında LC-MS/MS analizine yönelik bir çok çalışma[100, 101] bulunmakla birlikte, peynirde nisin analizine yönelik ISO standardı da vardır[102]. Çalışmamızdaki diğer etkin madde olan AZM'nin sink koşulu sağladığı IVPT reseptör ortamında, nisin analizi için LC-MS/MS yönteminin validasyonunu yapmak ve düşük derişimlerde nisin analiz edebilmek için tercih edilmiştir. Ancak LC-MS/MS yöntemi nisin içeren reseptör faz içerisinde çalışmamıştır.

Sümfaktanların yüzey aktif özellikleri nedeniyle proteinlerin özelliklerini değiştirebileceği bilinmektedir[130]. Bu özelliklerinden dolayı sümfaktanlar, kütle spektroskopisinde iyon baskılanmasına veya artışına yol açarak sinyali etkileyebilir. Bu bilgiler ışığında reseptör ortamda kullanılan noniyonik sümfaktan olan Tween 20'nin LC-MS/MS analizinde nisin sinyalini etkilediği düşünölmektedir.

Nisin analiz metodunun deneysel parametrelerden etkilenmesi, çalışmanın sınırlayıcı ve en zorlayıcı adımını oluşturmuştur.

AZM, geniş spektrumlu makrolid grubu bir antibiyotik olup, düşük çözünürlük özellikleri nedeniyle biyoyararlanımı düşüktür. Ayrıca, *S. aureus*'un en fazla direnç geliştirdiği antibiyotiktir ve oral yolla alındığında pek çok istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, enfeksiyon tedavisinde topikal uygulamasının bir avantaj olabileceği düşünölmüştür.

Son yıllarda antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeniyle, AMP ile kombinasyon yaklaşımları klinikte başarılı sonuçlar vermiştir. AMP'ler hücre membranı ile etkileşerek, hızlı bir şekilde hücre ölümüne neden olmaktadır. Ancak, bu peptitlerin penetrasyonları, hücre duvarının lipopolisakkarit yapısı nedeniyle kısıtlıdır. Ayrıca, AMP'ler kısa yarılanma ömrüne sahip olup, toksik etki gösterme potansiyeline sahiptirler. Lipozom formülasyonları hücre membranına benzer yapıları nedeniyle AMP'lerin penetrasyonunu arttırabilecek formülasyonlardır. Bu kapsamda çalışmamızda, AMP'lerin lipozomlar içine enkapsüle edilerek olası toksik etkilerinin önlenmesi ve çevresel faktörlerden korunması planlanmıştır.

Tez çalışmaları kapsamında öncelikle lipozomların yapısal üstünlükleri ve avantajları göz önüne alınarak, nisin ve AZM yüklü kombine lipozom formülasyonlarının enfeksiyon tedavisindeki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla, farklı lipit türevlerinin formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkilerini incelemek için etkin madde içeren lipozomlar, farklı lipitler ve yöntemler kullanılarak hazırlanmış, optimizasyon ve karakterizasyon (partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri, morfolojik özellikler, enkapsülasyon etkinliği ve stabilite) çalışmaları yürütülmüştür.

Formülasyonlardaki nisin %EE, hidrofilik maddeler için beklenenden yüksek tespit edilmiştir. Nisinin nötral pH'da hidrofilik karakter gösterdiği bilinmektedir. Ancak peptid yapısındaki bu molekül amfipatik karaktere sahiptir ve lipozom yapısında, sadece lipozomal yapının çekirdek bölümündeki sulu faz içerisinde değil aynı zamanda lipid membran yapısıyla da etkileşimde bulunarak lipozom yüzeyinde veya lipid yapıya gömülerek yerleşebilir. Artmış %EE nisinin fosfolipid membran yapısı ile etkileşiminden kaynaklanabilir.

Lipozomal formülasyona yüklenen nisin derişimi arttırılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Ancak hazırlanan formülasyonların stabil kalmadığı ve birinci gün lipozomal yapıdan ayrılarak çökeldiği görülmüştür. Temin edilen nisin stoğunun %2 derişime sahip olması ve peptit stabilitesinin korunması için diğer bileşimin tuzdan oluştuğu bilinmektedir. Nisin yüklü lipozom formülasyonları hazırlarken sulu fazın lipozom yapısı üzerine etkisi incelenmişti. Bu çalışmalarda tuz içeren sulu fazların lipozom oluşumunu ve stabilitesini olumsuz yönde etkilediğini belirlemiştik. Nisin konsantrasyonunu arttırarak yaptığımız denemelerin stok nisin içerisinde bulunan tuz konsantrasyonundan kaynaklı olarak lipozom stabilitesini olumsuz etkilediğini düşünüyoruz. Bu gerekçelerle topikal uygulanan formülasyondaki nisin konsantrasyonu, *S. aureus*'un MIC'nunun altındadır. Ancak hazırladığımız formülasyonda bulunan nisinin, bakteriyel membran yapısını etkileyerek AZM'nin etkinliğini arttırabileceğini öngörmüştük. Elde ettiğimiz antimikrobiyal aktivite ve antibiyofilm sonuçları bu savımızı destekler niteliktedir.

AZM içeren formülasyonların IVRT ve IVPT sonuçları değerlendirildiğinde salım ortamındaki AZM derişimi, hedef patojen olan *S. aureus*'un MIC'nunun üzerindedir.

Ayrıca kombine lipozomlar, AZM lipozomlara göre artmış antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite göstermişlerdir. Formülasyondaki nisin konsantrasyonu tek başına etkin bir antimikrobiyal etkiye sahip olmasa da kombine lipozom formülasyonu ile AZM'nin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğini arttırmıştır.

Nisin, kombine lipozom formülasyonunun biyoyumluluğunu arttırmıştır. Formülasyondaki nisin derişimi dermal HaCat ve HDF hücre hatlarında sitotoksik etki göstermemekle birlikte, sitotoksik etki gösteren AZM'nin biyoyumluluğunu kombine lipozom formülasyonunda birlikte uygulanmasıyla desteklediği belirlenmiştir.

Ex vivo penetrasyon ve görüntüleme çalışmalarında, hem işaretli lipidlerin hem de işaretli nisinin SC bariyerini aşarak dermis tabakasına doğru penetre olduğu hem deri kesit hem de Z Stack görüntülerde belirlenmiştir. İşaretli nisinin dermiş tabakasında diğer deri katmanlarına göre daha fazla lokalize olduğu, diğer yandan işaretli lipidlerinde dermis tabakasına doğru ilerlediği ancak en yüksek SC tabakasında lokalizasyonu görüntülenmiştir. Nisinin SC tabakasından daha hızlı penetrasyonu, nisinin bakteriyel membran yapısını etkilediği mekanizmaya benzer şekilde lipidik yapıdaki deri katmanlarını aşmasını sağlayan bir etkileşim göstermiş olabileceğini destekler niteliktedir.

IVPT sonuçları değerlendirildiğinde, AZM'nin reseptör tespit edilmesi formülasyonun intradermal etki gösterdiği ve sistemik dolaşıma katılabileceğini göstermektedir. Bu durum her ne kadar AZM'nin neden olduğu sistemik yan etkilere hazırlamış olduğumuz formülasyonun da sahip olabileceğini gösterse de; AZM'nin epitel hücrelerdeki yüksek tutulumu değerlendirildiğinde pek mümkün görünmemektedir. Oral yolla alınan AZM öncelikle dolaşıma katıldığı için, kalp epitellerinde yüksek düzeyde tutulum gösterir ve en yaygın görülen yan etkilerinden olan kardiyoskler sistemi etkiler. Ancak dermal yolla uygulanan formülasyon, ilk etkileştiği doku olan derinin epitel hücre yoğunluğu değerlendirildiğinde, etkin dozda AZM'nin hedeflenen bölge olan deride birikeceği

değerlendirilmektedir. Böylece sistemik yan etki azaltılırken, hedef doku ola derideki antimikrobiyal etki arttırılacaktır.

Optimize edilen lipozomların IVRT, IVPT, görüntüleme, hücre kültürü ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarıyla etkinlik ve güvenilirlikleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, piyasada bulunan konvansiyonel preparatlara alternatif olabilecek nanoformülasyonlar geliştirilmiş ve bu formülasyonların etkinliği in vitro şartlarda kanıtlanmıştır.

İkinci bir yaklaşım olarak da, QCM-D tekniğinin lipozomların etkinliklerinin değerlendirilmesinde yeni bir araç olarak kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu kapsamda, tez çalışmalarının bir bölümü Rutgers Üniversitesi Ernest Mario Eczacılık Fakültesi / Center for Dermal Research (CDR) / Laboratory for Drug Delivery (LDD)'nda yürütülmüştür. Özellikle dermal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler alanında pek çok çalışmanın yürütüldüğü araştırma laboratuvarında, lipozom formülasyonları hazırlanmış, Franz difüzyon hücreleri ve QCM-D tekniği kullanılarak etkinlikleri değerlendirilmiştir. Formülasyonlar insan kadavra derisi üzerine uygulanmış ve SC etkileşimi sonucunda kütle artışı (Δf) ve yüzey viskoelastik (ΔD) özellik değişim parametreleri incelenmiştir.

Lipozom formülasyonların uygulandığı SC ve altın sensör etkileşimleri kütle artışı bakımından ele alındığında, ilaç yüklü lipozom formülasyonlarının boş lipozomlara kıyasla artan kütleyle sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum etkin maddelerin lipozomal yapıya yüklendiğini desteklemektedir. Farklı lipozomal formülasyonlar altın sensör ile benzer yüzey etkileşimleri gösterirken; SC ile etkileşimleri incelendiğinde, hem altın sensör ile olan etkileşim mekanizmasından farklı davranış sergiledikleri hem de her bir formülasyonun SC ile etkileşimlerinin benzersiz olduğu görülmüştür. Bu durum SC'nin kompleks yapısının formülasyondaki etkin maddeye de duyarlı olarak etkileşim sergilediği belirlenmiştir. Nisin yüklü formülasyon viskoelastik özellik gösterirken, AZM yüklü formülasyon daha rijit SLB oluşturmuştur. Bu etkileşim maddelerin sahip olduğu hidrofobik veya hidrofilik doğasına bağlı olabilir ve/veya daha kompleks etkileşimlerden kaynaklanabilir.

QCM-D tekniğinin ilk defa bu alanda kullanılması literatüre yenilik getirmiştir. Bu teknik ile yapılan çalışmalar, farmasötik veya kozmetik etkili nanoformülasyonların özellikle dermal

etkileşim performanslarının klinik öncesi ex-vivo çalışmalar ile değerlendirilmesinde önemli bir teknik olarak sunulmuştur. Gerçekleştirilen tüm çalışmalar, dermal alanda uygulanan yeni tekniklerin ülkemizde de uygulanabilmesine olanak sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- [1] World Health Organization et al. Who report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation, **2018**.
- [2] Indhu A Chacko, Vivek M Ghate, Leonna Dsouza, and Shaila A Lewis. Lipid vesicles: A versatile drug delivery platform for dermal and transdermal applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 195:111262, **2020**. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111262.
- [3] Lin-yu Long, Jieyu Zhang, Zeyu Yang, Yi Guo, Xuefeng Hu, and Yunbing Wang. Transdermal delivery of peptide and protein drugs: Strategies, advantages and disadvantages. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60:102007, **2020**.
- [4] Mara Ferreira, Elisabete Silva, Luisa Barreiros, Marcela A Segundo, Sofia A Costa Lima, and Salette Reis. Methotrexate loaded lipid nanoparticles for topical management of skin-related diseases: Design, characterization and skin permeation potential. *International journal of pharmaceutics*, 512(1):14–21, **2016**.
- [5] Satoshi Uchiyama, Samira Dahesh, Victor Nizet, and Jack Kessler. Enhanced topical delivery of non-complexed molecular iodine for methicillin-resistant staphylococcus aureus decolonization. *International journal of pharmaceutics*, 554:81–86, **2019**.
- [6] Rajiv Bajracharya, Jae Geun Song, Seung Yun Back, and Hyo-Kyung Han. Recent advancements in non-invasive formulations for protein drug delivery. *Computational and structural biotechnology journal*, 17:1290–1308, **2019**.
- [7] Xingli Zhou, Ying Hao, Liping Yuan, Sushmita Pradhan, Krista Shrestha, Ojaswi Pradhan, Hongjie Liu, and Wei Li. Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. *Chinese Chemical Letters*, 29(12):1713–1724, **2018**.

- [8] Hans Schreier and Joke Bouwstra. Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *Journal of controlled release*, 30(1):1–15, **1994**.
- [9] Shoko Yokoyama, Akiko Inagaki, Koji Tsuchiya, Hideki Sakai, Tomohiro Imura, Takahiro Ohkubo, Nobuyuki Tsubaki, and Masahiko Abe. Stearylamine changes the liposomal shape from mlvs to luvs. *Journal of oleo science*, 54(4):251–254, **2005**.
- [10] MOHAMED MAHMOUD Nounou, Labiba Khalil El-Khordagui, and NAWAL Khalafallah. Release stability of 5-fluorouracil liposomal concentrates, gels and lyophilized powder. *Acta Pol Pharm*, 62(5):381–91, **2005**.
- [11] Soracha Thamphiwatana, Victoria Fu, Jingying Zhu, Diannan Lu, Weiwei Gao, and Liangfang Zhang. Nanoparticle-stabilized liposomes for ph-responsive gastric drug delivery. *Langmuir*, 29(39):12228–12233, **2013**.
- [12] İpek Eroğlu and Mamudu Ibrahim. Liposome–ligand conjugates: a review on the current state of art. *Journal of drug targeting*, 28(3):225–244, **2020**.
- [13] Jun Lei, Lichun Sun, Siyu Huang, Chenhong Zhu, Ping Li, Jun He, Vienna Mackey, David H Coy, and Quanyong He. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7):3919–3931, **2019**.
- [14] Anja Pfalzgraff, Klaus Brandenburg, and Günther Weindl. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in pharmacology*, 9:352601, **2018**.
- [15] Alexander Dart, Mrinal Bhawe, and Peter Kingshott. Antimicrobial peptide-based electrospun fibers for wound healing applications. *Macromolecular bioscience*, 19(9):1800488, **2019**.

- [16] Minqi Wang and Tingting Tang. Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *Journal of orthopaedic translation*, 17:42–54, **2019**.
- [17] Weike Chen, Su Yang, Shuxin Li, John C Lang, Chuanbin Mao, Peter Kroll, Liping Tang, and He Dong. Self-assembled peptide nanofibers display natural antimicrobial peptides to selectively kill bacteria without compromising cytocompatibility. *ACS applied materials & interfaces*, 11(32):28681–28689, **2019**.
- [18] Letícia Coli Louvise de Abreu, Valerio Todaro, Plinio Cunha Sathler, Luiz Cláudio Rodrigues Pereira da Silva, Flávia Almada do Carmo, Cleonice Marques Costa, Helena Keiko Toma, Helena Carla Castro, Carlos Rangel Rodrigues, Valeria Pereira de Sousa, et al. Development and characterization of nisin nanoparticles as potential alternative for the recurrent vaginal candidiasis treatment. *Aaps Pharmscitech*, 17:1421–1427, **2016**.
- [19] Jae M Shin, Ji Won Gwak, Pachiyappan Kamarajan, J Christopher Fenno, Alexander H Rickard, and Yvonne L Kapila. Biomedical applications of nisin. *Journal of applied microbiology*, 120(6):1449–1465, **2016**.
- [20] Akbar Bahrami, Rana Delshadi, Seid Mahdi Jafari, and Leonard Williams. Nanoencapsulated nisin: An engineered natural antimicrobial system for the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 94:20–31, **2019**.
- [21] Joanna Małaczewska, Edyta Kaczorek-Łukowska, Roman Wójcik, Wojciech Rekawek, and Andrzej K Siwicki. In vitro immunomodulatory effect of nisin on porcine leucocytes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(3):882–893, **2019**.
- [22] Jean-Christophe Colas, Wanlong Shi, VSN Malleswara Rao, Abdelwahab Omri, M Reza Mozafari, and Harjinder Singh. Microscopical investigations of

- nisin-loaded nanoliposomes prepared by mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8):841–847, **2007**.
- [23] Yunyun Zou, Hyeon-Yong Lee, Yong-Chang Seo, and Juhee Ahn. Enhanced antimicrobial activity of nisin-loaded liposomal nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of food science*, 77(3):M165–M170, **2012**.
- [24] Nathalie Almeida Lopes, Cristian Mauricio Barreto Pinilla, and Adriano Brandelli. Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 93:1–9, **2019**.
- [25] Taskeen Niaz, Saima Shabbir, Tayyaba Noor, Abdur Rahman, Habib Bokhari, and Muhammad Imran. Potential of polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin z against foodborne pathogens. *Lwt*, 96:98–110, **2018**.
- [26] HY Cui, J Wu, CZ Li, and L Lin. Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on cheddar cheese. *Journal of dairy science*, 99(11):8598–8606, **2016**.
- [27] Zora Rukavina, Maja Šegvić Klarić, Jelena Filipović-Grčić, Jasmina Lovrić, and Željka Vanić. Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa) infections. *International journal of pharmaceutics*, 553(1-2):109–119, **2018**.
- [28] Luis R Pizzolato-Cezar, Nancy M Okuda-Shinagawa, and M Teresa Machini. Combinatory therapy antimicrobial peptide-antibiotic to minimize the ongoing rise of resistance. *Frontiers in microbiology*, 10:419605, **2019**.
- [29] Michael J Parnham, Vesna Erakovic Haber, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, Gianpaolo Perletti, Geert M Verleden, and Robin Vos. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*, 143(2):225–245, **2014**.

- [30] Marique Aucamp, Roelf Odendaal, Wilna Liebenberg, and Josias Hamman. Amorphous azithromycin with improved aqueous solubility and intestinal membrane permeability. *Drug development and industrial pharmacy*, 41(7):1100–1108, **2015**.
- [31] Shokran A Aljihani, Zeyad Alehaideb, Reem E Alarfaj, Majed F Algoribi, Maaged A Akiel, Thamer H Alenazi, Ahmed J Al-Fahad, Saad M Al Tamimi, Turki M Albakr, Abdulrahman Alshehri, et al. Enhancing azithromycin antibacterial activity by encapsulation in liposomes/liposomal-n-acetylcysteine formulations against resistant clinical strains of escherichia coli. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11):3065–3071, **2020**.
- [32] Anton Firth and Praveen Prathapan. Azithromycin: the first broad-spectrum therapeutic. *European journal of medicinal chemistry*, 207:112739, **2020**.
- [33] Fiona M Wood. Skin regeneration: the complexities of translation into clinical practise. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 56:133–140, **2014**.
- [34] Keng Wooi Ng and Wing Man Lau. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: drug manipulation strategies and vehicle effects*, pages 3–11, **2015**.
- [35] R. Marks. The stratum corneum barrier: The final frontier. *The Journal of Nutrition*, 134(8):2017S–2021S, **2004**. ISSN 0022-3166. doi:<https://doi.org/10.1093/jn/134.8.2017S>.
- [36] Madeleine Witting, Katja Obst, Wolfgang Friess, and Sarah Hedtrich. Recent advances in topical delivery of proteins and peptides mediated by soft matter nanocarriers. *Biotechnology Advances*, 33(6):1355–1369, **2015**.

- [37] Junye Liu, Anjie Zheng, Baowei Peng, Yuhong Xu, and Ning Zhang. Size-dependent absorption through stratum corneum by drug-loaded liposomes. *Pharmaceutical Research*, 38:1429–1437, **2021**.
- [38] A Quatela, A Tfayli, and A Baillet-Guffroy. Examination of the effect of stratum corneum isolation process on the integrity of the barrier function: a confocal raman spectroscopy study. *Skin Research and Technology*, 22(1):75–80, **2016**.
- [39] GA Turner, M Hoptroff, and CR Harding. Stratum corneum dysfunction in dandruff. *International journal of cosmetic science*, 34(4):298–306, **2012**.
- [40] C.R. Harding. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatologic Therapy*, 17:6–15, **2004**.
- [41] Adriano Brandelli. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8):731–741, **2012**.
- [42] Aline C. Apolinario, Lucas Hauschke, Juliana R. Nunes, and Luciana B. Lopes. Lipid nanovesicles for biomedical applications: ‘what is in a name’? *Progress in Lipid Research*, 82:101096, **2021**.
- [43] Reza Seyfi, Fatemeh Asadi Kahaki, Tahereh Ebrahimi, Soheila Montazersaheb, Sajjad Eyvazi, Valiollah Babaeipour, and Vahideh Tarhriz. Antimicrobial peptides (amps): roles, functions and mechanism of action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26:1451–1463, **2020**.
- [44] Jun Lei, Lichun Sun, Siyu Huang, Chenhong Zhu, Ping Li, Jun He, Vienna Mackey, David H Coy, and Quanyong He. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American journal of translational research*, 11(7):3919, **2019**.
- [45] Julia F. Boelter and Adriano Brandelli. Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145:740–747, **2016**.

- [46] Angélique Lewies, Johannes F. Wentzel, Andries Jordaan, Charl Bezuidenhout, and Lissinda H. Du Plessis. Interactions of the antimicrobial peptide nisin z with conventional antibiotics and the use of nanostructured lipid carriers to enhance antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 526(1-2):244–253, **2017**.
- [47] G.C. Williams and J. Delves-Broughton. Nisin. In Benjamin Caballero, editor, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, pages 4128–4135. Academic Press, Oxford, second edition edition, **2003**. ISBN 978-0-12-227055-0. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00829-4>.
- [48] Mahboobe Asadi Mobarakeh Jahromi, Parisa Sistani Zangabad, Shirin Mahboobeh Moghadam Basri, Katayoon Sistani Zangabad, Ali Ghamarypour, Ali Reza Aref, and Michael R. Hamblin. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 123:33–64, **2018**.
- [49] Eili Y. Klein, Thomas P. Van Boeckel, Elizabeth M. Martinez, Suraj Pant, Sumanth Gandra, Simon A. Levin, and Ramanan Laxminarayan. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15):E3463–E3470, **2018**.
- [50] Xiaowei Liu, Zhan Li, Xiaodong Wang, Yujuan Chen, Fengbo Wu, Ke Men, Ting Xu, Yan Luo, and Li Yang. Novel antimicrobial peptide–modified azithromycin-loaded liposomes against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *International Journal of Nanomedicine*, pages 6781–6794, **2016**.
- [51] Mohammad Taheri, Mohammad Reza Arabestani, Setareh Sefid Asl, Farzaneh Kalhori, Mahsa Asgari, and Seyed Mohammad Hosseini. Co-delivery of vancomycin, ampicillin nano-antibiotics by solid lipid nanoparticles on wound infection caused by staphylococcus aureus: in vitro and in vivo study. [*Journal Name - to be updated*], **2023**.

- [52] Noor Ul Islam, Ezzat Khan, Muhammad Naveed Umar, Attaullah Shah, Muhammad Zahoor, Riaz Ullah, and Ahmed Bari. Enhancing dissolution rate and antibacterial efficiency of azithromycin through drug-drug cocrystals with paracetamol. *Antibiotics*, 10(8):939, **2021**.
- [53] Tianyang Ren, Xiaoyang Lin, Qianying Zhang, Dongmei You, Xiaoyu Liu, Xiaoguang Tao, Jingxin Gou, Yu Zhang, Tian Yin, Haibing He, et al. Encapsulation of azithromycin ion pair in liposome for enhancing ocular delivery and therapeutic efficacy on dry eye. *Molecular pharmaceutics*, 15(11):4862–4871, **2018**.
- [54] S Wadhwa, S Singhl, and S Rawat. In vitro dissolution enhancement of azithromycin in solid dispersion with peg 6000 and β -cd. *J Pharm Biomed Sci*, 6(10):551–556, **2016**.
- [55] M Lodén. Interactions between the stratum corneum and topically applied products: regulatory, instrumental and formulation issues with focus on moisturizers. *British Journal of Dermatology*, 171(s3):38–44, **2014**.
- [56] Alain Murhimalika Bapolisi, Christian Isalomboto Nkanga, Roderick Bryan Walker, and Rui Werner Maçedo Krause. Simultaneous liposomal encapsulation of antibiotics and proteins: Co-loading and characterization of rifampicin and human serum albumin in soy-liposomes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58:101751, **2020**. ISSN 1773-2247. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101751>.
- [57] Nai-Yan Lu, Kai Yang, Jing-Liang Li, Bing Yuan, and Yu-Qiang Ma. Vesicle deposition and subsequent membrane–melittin interactions on different substrates: A qcm-d experiment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(8):1918–1925, **2013**.
- [58] Xuesong Li, Rong Wang, Filicia Wicaksana, Yang Zhao, Chuyang Tang, Jaime Torres, and Anthony Gordon Fane. Fusion behaviour of aquaporin z

incorporated proteoliposomes investigated by quartz crystal microbalance with dissipation (qcm-d). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111:446–452, **2013**.

- [59] AP Serro, A Carapeto, G Paiva, JPS Farinha, R Colaço, and B Saramago. Formation of an intact liposome layer adsorbed on oxidized gold confirmed by three complementary techniques: Qcm-d, afm and confocal fluorescence microscopy. *Surface and Interface Analysis*, 44(4):426–433, **2012**.
- [60] Hewen Li, Tao Zhao, and Zhihua Sun. Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Reviews in Analytical Chemistry*, 37(1):20170012, **2018**.
- [61] Nam-Joon Cho, Curtis W Frank, Bengt Kasemo, and Fredrik Höök. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nature protocols*, 5(6):1096–1106, **2010**.
- [62] José Gabriel Paiva, Patrizia Paradiso, Ana Paula Serro, Anabela Fernandes, and Benilde Saramago. Interaction of local and general anaesthetics with liposomal membrane models: a qcm-d and dsc study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95:65–74, **2012**.
- [63] Boris Garnier, Anthony Bouter, Céline Gounou, Klaus G Petry, and Alain R Brisson. Annexin a5-functionalized liposomes for targeting phosphatidylserine-exposing membranes. *Bioconjugate chemistry*, 20(11):2114–2122, **2009**.
- [64] Feng Wan, Tommy Nylander, Camilla Foged, Mingshi Yang, Stefania G Baldursdottir, and Hanne M Nielsen. Qualitative and quantitative analysis of the biophysical interaction of inhaled nanoparticles with pulmonary surfactant by using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Journal of colloid and interface science*, 545:162–171, **2019**.

- [65] Fern J Armistead, Damien VB Batchelor, Benjamin RG Johnson, and Stephen D Evans. Qcm-d investigations on cholesterol–dna tethering of liposomes to microbubbles for therapy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 127(11):2466–2474, **2023**.
- [66] Yijie Zhou, Yong Qian, Jingyu Wang, Xueqing Qiu, and Hongbo Zeng. Bioinspired lignin-polydopamine nanocapsules with strong bioadhesion for long-acting and high-performance natural sunscreens. *Biomacromolecules*, 21(8):3231–3241, **2020**.
- [67] Myung Han Lee, Bomyi Lim, Jin Woong Kim, Eun Jung An, and Daeyeon Lee. Effect of composition on water permeability of model stratum corneum lipid membranes. *Soft Matter*, 8(5):1539–1546, **2012**.
- [68] Sang-Wook Lee, Kwadwo E Tettey, Yury Yarovoy, and Daeyeon Lee. Effects of anionic surfactants on the water permeability of a model stratum corneum lipid membrane. *Langmuir*, 30(1):220–226, **2014**.
- [69] Fabio Strati, Tetiana Mukhina, Reinhard HH Neubert, Lukas Opalka, Gerd Hause, Christian EH Schmelzer, Matthias Menzel, and Gerald Brezesinski. Cerosomes as skin repairing agent: mode of action studies with a model stratum corneum layer at liquid/air and liquid/solid interfaces. *BBA advances*, 2:100039, **2022**.
- [70] N Sanjeeva Murthy, Fahmi Bedoui, Brian E Kilfoyle, Carmine Iovine, Bozena Michniak-Kohn, and Joachim Kohn. Monitoring the viscoelastic properties of skin in liquid environments using quartz crystal microbalance. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(2):530–535, **2011**.
- [71] European Pharmacopoeia Commission and European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. *European pharmacopoeia*, volume 1. Council of Europe, **2010**.

- [72] Tayebbeh Ghari, Farzad Kobarfard, and Seyed Alireza Mortazavi. Development of a simple rp-hplc-uv method for determination of azithromycin in bulk and pharmaceutical dosage forms as an alternative to the usp method. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 12(Suppl):57, **2013**.
- [73] European Medicines Agency. Ich topic q1a (r2) stability testing of new drug substances and products, **2003**.
- [74] European Medicines Agency (EMA). Ich guidelines q2 (r2) on validation of analytical procedures, **2022**.
- [75] Ghulam A Shabir. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the us food and drug administration, the us pharmacopeia and the international conference on harmonization. *Journal of chromatography A*, 987(1-2):57–66, **2003**.
- [76] John M Walker. The bicinchoninic acid (bca) assay for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, pages 11–15, **2009**.
- [77] Wendy W You, Rosaria P Haugland, Diane K Ryan, and Richard P Haugland. 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution. *Analytical biochemistry*, 244(2):277–282, **1997**.
- [78] JE Noble, AE Knight, AJ Reason, A Di Matola, and MJA Bailey. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Molecular biotechnology*, 37:99–111, **2007**.
- [79] Phikunthong Kopermsub, Varissaporn Mayen, and Choochart Warin. Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and edta and their antibacterial activity enhancement. *Food research international*, 44(2):605–612, **2011**.

- [80] Cristian Mauricio Barreto Pinilla and Adriano Brandelli. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against gram-positive and gram-negative bacteria in milk. *Innovative food science & emerging technologies*, 36:287–293, **2016**.
- [81] Hongmei Lin, Longfei Lin, Yoonsun Choi, and Bozena Michniak-Kohn. Development and in-vitro evaluation of co-loaded berberine chloride and evodiamine ethosomes for treatment of melanoma. *International journal of pharmaceutics*, 581:119278, **2020**.
- [82] Cuicui Su, Yuqiong Xia, Jianbo Sun, Nan Wang, Lin Zhu, Tao Chen, Yanyi Huang, and Dehai Liang. Liposomes physically coated with peptides: preparation and characterization. *Langmuir*, 30(21):6219–6227, **2014**.
- [83] Kazuo Yamakami, Hideaki Tsumori, Yutaka Sakurai, Yoshitaka Shimizu, Kohei Nagatoshi, and Kenji Sonomoto. Sustainable inhibition efficacy of liposome-encapsulated nisin on insoluble glucan-biofilm synthesis by streptococcus mutans. *Pharmaceutical biology*, 51(2):267–270, **2013**.
- [84] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, **2003**. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1A(R2).
- [85] Ayşegül Aylin AYTEKİN, Sakine Tuncay Tanrıverdi, Fadime Aydın Köse, Didem Kart, İpek Eroğlu, and Özgen Özer. Propolis loaded liposomes: evaluation of antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of liposome research*, 30(2):107–116, **2020**.
- [86] Mahima Manian, Piyush Jain, Deepal Vora, and Ajay K Banga. Formulation and evaluation of the in vitro performance of topical dermatological products containing diclofenac sodium. *Pharmaceutics*, 14(9):1892, **2022**.

- [87] Kailas Thakker and Ryan Klein. Drug release: Topical products. In *Specification of Drug Substances and Products*, pages 505–534. Elsevier, **2020**.
- [88] Sonali Bose, Yuechao Du, Paul Takhistov, and Bozena Michniak-Kohn. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *International journal of Pharmaceutics*, 441(1-2):56–66, **2013**.
- [89] Vinam Puri, Riya Savla, Kevin Chen, Keyaara Robinson, Amitkumar Virani, and Bozena Michniak-Kohn. Antifungal nail lacquer for enhanced transungual delivery of econazole nitrate. *Pharmaceutics*, 14(10):2204, **2022**.
- [90] Stella Zsikó, Erzsébet Csányi, Anita Kovács, Mária Budai-Szűcs, Attila Gácsi, and Szilvia Berkó. Methods to evaluate skin penetration in vitro. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3):19, **2019**.
- [91] Takahiro Fujimoto, Jian Wang, Kazuki Baba, Yuka Oki, Yuki Hiruta, Masayuki Ito, Shinobu Ito, and Hideko Kanazawa. Transcutaneous drug delivery by liposomes using fractional laser technology. *Lasers in Surgery and Medicine*, 49(5):525–532, **2017**.
- [92] H. Mohd, K. Dopierała, A. Zidar, A. Virani, and B. Michniak-Kohn. The effect of edge activator combinations using a langmuir technique in transethosomal formulations for skin delivery of thymoquinone. *Preprints*, 2023(100260), **2023**. doi:10.20944/preprints202310.0260.v1.
- [93] A Mavon, H Zahouani, D Redoules, P Agache, Y Gall, and Ph Humbert. Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: a study on two anatomical sites. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 8(3):147–155, **1997**.
- [94] Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 11th edition, **2018**.

- [95] Lisa Myrseth Hemmingsen, Barbara Giordani, Marianne H Paulsen, Željka Vanić, Gøril Eide Flaten, Beatrice Vitali, Purusotam Basnet, Annette Bayer, Morten B Strøm, and Nataša Škalko-Basnet. Tailored anti-biofilm activity–liposomal delivery for mimic of small antimicrobial peptide. *Biomaterials Advances*, 145:213238, **2023**.
- [96] Cristina D Cruz, Shreya Shah, and Päivi Tammela. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for gram-positive clinical reference strains. *BMC microbiology*, 18:1–9, **2018**.
- [97] DrugBank Online. Azithromycin dihydrate (dbsalt000882) - drugbank online, **2024**. Accessed on 2024-11-19.
- [98] Hamid Reza Pouretedal. Preparation and characterization of azithromycin nanodrug using solvent/antisolvent method. *International Nano Letters*, 4(1):103, **2014**.
- [99] Alexey S Ladokhin. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry*, pages 5762–5779, **2000**.
- [100] Ömer Şerif Aydın, Ayşe Binnur Karataş, and Pınar Manarga Birlik. Peynirde ve kaymakta nisin miktarının lc-ms/ms ile belirlenmesi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 1(29):31–37, **2023**.
- [101] N Schneider, K Werkmeister, and M Pischetsrieder. Analysis of nisin a, nisin z and their degradation products by lcms/ms. *Food chemistry*, 127(2):847–854, **2011**.
- [102] International Organization for Standardization. Cheese — determination of nisin a content by lc-ms and lc-ms-ms. Iso/ts 27106:2009 (idf/rm 217), ISO, Geneva, Switzerland, **2009**.
- [103] Harry S Rollema, Oscar P Kuipers, Paula Both, Willem M de Vos, and Roland J Siezen. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial

- peptide nisin by protein engineering. *Applied and environmental microbiology*, 61(8):2873–2878, **1995**.
- [104] Cameron Webb, Swapnil Khadke, Signe Tandrup Schmidt, Carla B Roces, Neil Forbes, Gillian Berrie, and Yvonne Perrie. The impact of solvent selection: Strategies to guide the manufacturing of liposomes using microfluidics. *Pharmaceutics*, 11(12):653, **2019**.
- [105] A Abruzzo, R Pucci, PM Abruzzo, S Canaider, C Parolin, B Vitali, F Valle, M Brucale, T Cerchiara, B Luppi, et al. Azithromycin-loaded liposomes and niosomes for the treatment of skin infections: Influence of excipients and preparative methods on the functional properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, page 114233, **2024**.
- [106] Patrícia da Silva Malheiros, Daniel Joner Daroit, and Adriano Brandelli. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6):284–292, **2010**.
- [107] Diana Pasarin, Andra-Ionela Ghizdareanu, Cristina Emanuela Enascuta, Catalin Bogdan Matei, Catalin Bilbie, Luciana Paraschiv-Palada, and Petronela-Andreea Veres. Coating materials to increase the stability of liposomes. *Polymers*, 15(3):782, **2023**.
- [108] Isabelle Martin, Jean-Marie Ruyschaerti, Dale Sanders, and Catriona J Giffard. Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *European journal of biochemistry*, 239(1):156–164, **1996**.
- [109] Stephanie J Wallace, Roger L Nation, Jian Li, and Ben J Boyd. Physicochemical aspects of the coformulation of colistin and azithromycin using liposomes for combination antibiotic therapies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(5):1578–1587, **2013**.

- [110] Filip Otto and Anna Froelich. Microemulsion-based polymer gels with ketoprofen and menthol: Physicochemical properties and drug release studies. *Gels*, 10(7):435, **2024**.
- [111] Sakine Tuncay Tanrıverdi, Süleyha Hilmioglu Polat, Dilek Yeşim Metin, Gülşen Kandiloğlu, and Özgen Özer. Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of liposome research*, 26(2):163–173, **2016**.
- [112] Ali Asram Sağıroğlu, Yıldız Özsoy, and Özgen Özer. Design, optimization and characterization of novel topical formulations containing triamcinolone acetoneide. *Journal of drug delivery science and technology*, 58:101594, **2020**.
- [113] Spyridon Mourtas, Styliani Fotopoulou, Stela Duraj, Vassiliki Sfika, Christos Tsakiroglou, and Sophia G Antimisiaris. Liposomal drugs dispersed in hydrogels: effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(2):212–221, **2007**.
- [114] Ankit Jain and Sanjay K Jain. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight. *Chemistry and physics of lipids*, 201:28–40, **2016**.
- [115] Dr D Verma, S Verma, G Blume, and A Fahr. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International journal of pharmaceutics*, 258(1-2):141–151, **2003**.
- [116] Mohsen Tayeferad, Soheil Boddohi, and Bitu Bakhshi. Dual-responsive nisin loaded chondroitin sulfate nanogel for treatment of bacterial infection in soft tissues. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193:166–172, **2021**.
- [117] Michelle V Mouritzen, Athina Andrea, Katrine Qvist, Steen S Poulsen, and Håvard Jenssen. Immunomodulatory potential of nisin a with application in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 27(6):650–660, **2019**.

- [118] C Wiegand and U-C Hipler. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures. *Skin pharmacology and physiology*, 22(2):74–82, **2009**.
- [119] Cedar HA Boakye, Ketan Patel, and Mandip Singh. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. *International journal of pharmaceutics*, 489(1-2):106–116, **2015**.
- [120] C Pailler-Mattei, S Pavan, R Vargiolu, F Pirot, F Falson, and H Zahouani. Contribution of stratum corneum in determining bio-tribological properties of the human skin. *Wear*, 263(7-12):1038–1043, **2007**.
- [121] CA Keller and B Kasemo. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophysical journal*, 75(3):1397–1402, **1998**.
- [122] Angelika Kunze, Michael Zäch, Sofia Svedhem, and Bengt Kasemo. Electrodeless qcm-d for lipid bilayer applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5):1833–1838, **2011**.
- [123] Naoto Asai, Naohiro Matsumoto, Ichiro Yamashita, Tomohiro Shimizu, Shoso Shingubara, and Takeshi Ito. Detailed analysis of liposome adsorption and its rupture on the liquid-solid interface monitored by lspr and qcm-d integrated sensor. *Sensing and bio-sensing research*, 32:100415, **2021**.
- [124] Amish Patel, Mariana RN Lima, Hyeon-Yeol Cho, Ki-Bum Lee, N Sanjeeva Murthy, and Joachim Kohn. Disassembly of nanospheres with a peg shell upon adsorption onto pegylated substrates. *Langmuir*, 36(1):232–241, **2019**.
- [125] P Loan Honeywell-Nguyen and Joke A Bouwstra. Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug discovery today: technologies*, 2(1):67–74, **2005**.

- [126] Yu Zhang, Xiaoliang Liu, Yue Cui, Huifeng Huang, Na Chi, and Xing Tang. Aspects of degradation kinetics of azithromycin in aqueous solution. *Chromatographia*, 70:67–73, **2009**.
- [127] Joshua Salafsky, Jay T Groves, and Steven G Boxer. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers: a study with photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 35(47):14773–14781, **1996**.
- [128] David Davies. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature reviews Drug discovery*, 2(2):114–122, **2003**.
- [129] Muhammad Imran, Anne-Marie Revol-Junelles, Cedric Paris, Emmanuel Guedon, Michel Linder, and Stéphane Desobry. Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1):341–349, **2015**.
- [130] Daniel Otzen. Protein–surfactant interactions: a tale of many states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(5):562–591, **2011**.