

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOÇÖKTÜRME YÖNTEMİ İLE BİYOAKTİF  
POLİETİLEN GLİKOL-*b*-POLİKAPROLAKTON  
NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ

**Melis IŞIK TOKSOY**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Serap DERMAN

Ocak, 2022

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOÇÖKTÜRME YÖNTEMİ İLE BİYOAKTİF  
POLİETİLEN GLİKOL-*b*-POLİKAPROLAKTON  
NANOPARTİKÜLLERİNİN ÜRETİMİ

Melis IŞIK TOKSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 10.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serap DERMAN  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Serap DERMAN, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÇAKIR HATIR, Üye

Arel Üniversitesi

---

---

---

Danışmanım Doç. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Nanoçöktürme Yöntemi ile Biyoaktif Polietilen Glikol-*b*-Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Üretimi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Melis IŞIK TOKSOY

İmza



Bu tez çalışması, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2019-3752 numaralı projesi ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu programıyla desteklenmiştir.



*Canım aileme  
ve  
sevdiklerime*

## TEŞEKKÜR

---

Yıldız Teknik Üniversitesinde Yüksek Lisans sürecimin başladığı ilk gün tanıştığım ve yol boyunca bilgi, sevgi ve desteğiyle ilerlediğim danışman hocam Doç. Dr. Serap DERMAN'a, tezimin ilk aşamasında olan yardımları ve yol göstericiliği için sayın hocam Doç. Dr. Murat Topuzoğulları'na, laboratuvarında ve dışarıda her zaman yanımda ve bana destek olan canım arkadaşlarım İrem Çoksu, İmren Ergün, Nilbeste Bekiroğlu, Seçil Kaya ve Ekin Bahar Aytuğlu'ya, çalışma arkadaşlarım olan tüm Derman'S Lab ekibine ve YTÜ 306-307 Polimer ve Aşı Laboratuvarının tüm üyelerine, antifungal çalışmaları gerçekleştirmem için bana laboratuvarının kapılarını açan Doç. Dr. Tülin Özbek ve çalışmaları gerçekleştirmemde yardımcı olan öğrencisi sevgili Çilem Özdemir'e, en büyük destekçilerim canım annem Fethiye Işık, babam Hamit Işık ve kardeşim Efe Enes Işık'a ve bu süreçte tüm sabrı, desteği ve sevgisi ile her zaman yanımda olan eşim Oğuzhan Toksoy'a, 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamındaki desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a ve FYL-2019-3752 nolu proje kapsamındaki desteklerinden dolayı Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Melis IŞIK TOKSOY

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>17</b>
1.1 Literatür Özeti.....	17
1.2 Tezin Amacı .....	19
1.3 Hipotez .....	20
<b>2 GENEL BİLGİLER</b>	<b>21</b>
2.1 Fungal Enfeksiyonlar.....	21
2.2 Tedavide Kullanılan İlaçlar.....	23
2.2.1 Azoller .....	23
2.2.2 Ekinokandinler.....	24
2.2.3 Polienler.....	25
2.2.4 Nükleozid analogları .....	25
2.3 Fungal Enfeksiyonların Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar .....	26
2.4 Nanoteknoloji.....	27
2.5 İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	27
2.6 Polimerik Nanopartiküller .....	29
2.6.1 Nanoküreler ve Nanokapsüller .....	32
2.6.2 Dendrimerler.....	32
2.6.3 Miseller .....	33
2.7 Polimerik Nanotaşıyıcıların Sentez Yöntemleri.....	35
2.7.1 Emülsifikasyon Yöntemleri .....	36
2.7.2 Diyaliz.....	38
2.7.3 Salting-out Yöntemi .....	39
2.7.4 Süperkritik Sıvı Teknolojisi .....	40
2.7.5 Nanoçöktürme .....	40
2.8 PEG ve PCL Polimerlerinin Nanotaşıyıcı Sistemlerde Kullanımı.....	42

2.9 Juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon) .....	44
<b>3 MATERYAL METOT</b>	<b>46</b>
3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	46
3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar.....	47
3.3 Deneysel Yöntemler .....	48
3.3.1 mPEG- <i>b</i> -PCL Diblok Kopolimerinin Sentezlenmesi .....	48
3.3.2 Polimer Sentezi için Reaksiyon Veriminin Hesaplanması.....	50
3.3.3 Polimerin FT-IR Spektroskopisi ile Analizi.....	50
3.3.4 Polimerin <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopisi ile Analizi .....	50
3.3.5 Polimerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Analizi .....	50
3.3.6 Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC) Tayini .....	50
3.3.7 Nanoçöktürme Yöntemi ile Misel Sentezi .....	51
3.3.8 Nanoçöktürme ile Misel Sentezi için Sentez Parametrelerinin Optimizasyonu.....	53
3.3.9 Nanoçöktürme için Reaksiyon Veriminin Hesaplanması .....	55
3.3.10 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması.....	55
3.3.11 Etkin Madde Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması .....	55
3.3.12 Boyut ve Polidispersite İndeksi (PDI) .....	56
3.3.13 Yüzey Yüğü ve Potansiyeli.....	56
3.3.14 FT-IR Spektroskopisi ile Analiz.....	56
3.3.15 X-Işınları Difraktometresi (XRD) ile Analiz.....	57
3.3.16 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi .....	57
3.3.17 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi .....	57
3.3.18 <i>In-vitro</i> Salım Çalışması .....	57
3.3.19 Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi.....	58
<b>4 SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>61</b>
4.1 Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu.....	61
4.1.1 Polimer Sentezi .....	61
4.1.2 Polimerin FT-IR Analizi .....	61
4.1.3 Polimerin <sup>1</sup> H-NMR Analizi.....	62
4.1.4 Polimerin GPC Analizi .....	64
4.1.5 Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC) Tayini .....	66
4.2 Misel Sentezi ve Karakterizasyonu .....	67
4.2.1 Sentez Parametrelerinin Optimizasyonu ve Nanoçöktürme ile Misel Sentezi.....	67

4.2.2 Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi .....	71
4.2.3 Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI), Zeta Potansiyel .....	72
4.2.4 FT-IR Analizi .....	74
4.2.5 XRD Analizi.....	75
4.2.6 AFM Analizi .....	76
4.2.7 SEM Analizi.....	78
4.2.8 <i>In-vitro</i> Salım Çalışması .....	80
4.3 Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi.....	81
4.4 Bulgular ve Öneriler.....	88
<b>KAYNAKÇA</b>	<b>93</b>
<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>106</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

A	Absorbans
$M_w$	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
Da	Dalton
dk	Dakika
°C	Derece santrigrat
T	Geçirgenlik
$T_c$	Kritik sıcaklık
$P_c$	Kritik basınç
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
mV	Milivolt
M	Molarite
n	Mol
nm	Nanometre
$M_n$	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
W	Watt
d	Yoğunluk
$I_{333}$	333 nm'deki floresans şiddeti
$I_{338}$	338 nm'deki floresans şiddeti

## KISALTMA LİSTESİ

ABPA	Alerjik Bronkopulmoner Aspergillozis
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
CA	Selüloz Asetat
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
CDCl <sub>3</sub>	Döterokloroform
DCM	Diklorometan
DLS	Dinamik Işık Saçılması
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC	Boyut Eleme Kromatografisi
<sup>1</sup> H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
İFE	İnvasiv Fungal Enfeksiyon
KPA	Kronik Pulmoner Aspergilloz
mPEG	Metoksi Polietilen Glikol
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyonu
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDA	Potato Destroz Agar
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Polietilen Glikol
PEO	Polietilen Oksit
PGA	Poliglikolik Asit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil Alkol
RID	Refraktif İndeks Dedektörü
RV	Reaksiyon Verimi
SDA	Sabouraud Destroz Agar
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Sn(Oct) <sub>2</sub>	Kalay Oktoat
THF	Tetrahidrofuran
XRD	X-Işınları Difraksiyonu
YK	Yükleme Kapasitesi
5-FU	5-Florourasil

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Polimerik nanopartikül çeşitleri [68] .....	31
Şekil 2.2	Normal misel (A) ve ters misel (B) .....	33
Şekil 2.3	Emülsiyon-çözücü difüzyon (A) ve emülsiyon-koaservasyon (B) yöntemleri ile nanopartikül sentezi [95] .....	37
Şekil 2.4	İkili emülsiyon(w/o/w)-çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül sentezi [95] .....	38
Şekil 2.5	Diyaliz ile nanopartikül sentezi [99] .....	39
Şekil 2.6	Salting-out yöntemi ile nanopartikül sentezi [100] .....	39
Şekil 2.7	Nanoçöktürme yöntemi ile polimerik nanopartikül sentezi [4] .....	41
Şekil 2.8	Polietilen glikol (A) ve metoksi polietilen glikol (B) .....	43
Şekil 2.9	Polikaprolakton .....	43
Şekil 2.10	mPEG- <i>b</i> -PCL diblok kopolimeri .....	44
Şekil 2.11	Juglon (5-hidroksi-1,4 naftokinon) .....	45
Şekil 3.1	Halka açılması polimerizasyonu ile mPEG- <i>b</i> -PCL sentezi şematik gösterimi .....	49
Şekil 3.2	Nanoçöktürme yöntemi ile juglon yüklü PEG- <i>b</i> -PCL misellerinin sentezinin şematik gösterimi .....	52
Şekil 4.1	mPEG ve mPEG- <i>b</i> -PCL polimerlerine ait FT-IR spektrumları .....	62
Şekil 4.2	mPEG polimerine ait <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	63
Şekil 4.3	mPEG- <i>b</i> -PCL polimerine ait <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	63
Şekil 4.4	mPEG ve mPEG- <i>b</i> -PCL polimerlerine ait karşılaştırmalı <sup>1</sup> H-NMR spektrumları .....	64
Şekil 4.5	mPEG ve mPEG- <i>b</i> -PCL polimerlerine ait GPC kromatogramları .....	65
Şekil 4.6	Pirenin PEG- <i>b</i> -PCL konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen floresans spektrumları .....	66
Şekil 4.7	$6 \times 10^{-7}$ M pirenin floresans şiddet oranlarının ( $I_{338}/I_{333}$ ) polimer konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi .....	67
Şekil 4.8	Juglon kalibrasyon eğrisi .....	72
Şekil 4.9	Misellerin boyut dağılımı grafiği .....	73
Şekil 4.10	Misellerin zeta potansiyel grafiği .....	74
Şekil 4.11	Juglon, boş misel ve juglon yüklü misele ait FT-IR spektrumları .....	75
Şekil 4.12	Juglon, polimer ve juglon yüklü misele ait XRD spektrumları .....	76
Şekil 4.13	Misellerin 2D AFM görüntüsü ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ lik alan) .....	77
Şekil 4.14	Misellerin 2D AFM görüntüsü ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ lik alan) .....	77
Şekil 4.15	Misellerin 3D AFM görüntüsü ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ lik alan) .....	77
Şekil 4.16	Misellerin 60.000 x büyütmede SEM görüntüsü .....	78
Şekil 4.17	Misellerin 60.000 x büyütmede boyutlandırılmış SEM görüntüsü .....	78
Şekil 4.18	Misellerin 120.000 x büyütmede SEM görüntüsü .....	79
Şekil 4.19	Misellerin 120.000 x büyütmede boyutlandırılmış SEM görüntüsü .....	79
Şekil 4.20	Misellerin 48.000 x büyütmede SEM görüntüsü .....	80
Şekil 4.21	Juglon yüklü misellerin salım grafiği .....	81

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1</b>	Kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları .....	46
<b>Tablo 3.2</b>	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları .....	47
<b>Tablo 3.3</b>	Etkin madde/kopolimer oranının optimize edilmesinde kullanılan madde miktarları .....	53
<b>Tablo 3.4</b>	Homopolimer/kopolimer oranının optimize edilmesinde kullanılan madde miktarları .....	54
<b>Tablo 3.5</b>	Etkin madde/polimer karışım oranının optimize edilmesinde kullanılan madde miktarları .....	54
<b>Tablo 3.6</b>	Besi yerlerindeki polimer konsantrasyonları .....	58
<b>Tablo 3.7</b>	Besi yerlerindeki misel ve içeriğindeki juglon konsantrasyonları.....	59
<b>Tablo 3.8</b>	Besi yerlerindeki serbest juglon konsantrasyonları.....	59
<b>Tablo 4.1</b>	Polimer sentezinde reaksiyon verimi.....	61
<b>Tablo 4.2</b>	<sup>1</sup> H-NMR analizi sonucunda hesaplanan M <sub>n</sub> değerleri .....	64
<b>Tablo 4.3</b>	GPC analizi sonucu elde edilen M <sub>w</sub> , M <sub>n</sub> ve M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> değerleri.....	65
<b>Tablo 4.4</b>	Etkin madde/kopolimer oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri .....	68
<b>Tablo 4.5</b>	Homopolimer/kopolimer oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri .....	69
<b>Tablo 4.6</b>	Etkin madde/polimer karışım oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri .....	70
<b>Tablo 4.7</b>	Etkin madde/polimer karışım optimizasyonu için reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi değerleri .....	70
<b>Tablo 4.8</b>	Ölçek büyütme ile değişen boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri ....	71
<b>Tablo 4.9</b>	Reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi	72
<b>Tablo 4.10</b>	Sentezlerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	73
<b>Tablo 4.11</b>	<i>C. albicans</i> için agar dilüsyon petri görüntüleri .....	82
<b>Tablo 4.12</b>	<i>A. flavus</i> agar dilüsyon petri görüntüleri .....	83
<b>Tablo 4.13</b>	<i>Fusarium spp.</i> agar dilüsyon petri görüntüleri .....	85
<b>Tablo 4.14</b>	MFK değerleri .....	87
<b>Tablo 4.15</b>	MİK değerleri .....	88

## Nanoçöktürme Yöntemi ile Biyoaktif Polietilen Glikol-*b*-Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Üretimi

Melis IŞIK TOKSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serap DERMAN

Nanotaşıyıcılar etkin maddenin çözünürlüğünü iyileştirme, enzimatik degradasyonu engelleyerek etki bölgesine ulaşan konsantrasyonunu artırma, yan etkilerini azaltma, kontrollü salım ve hedefleyici tedaviye olanak sağlama gibi önemli özelliklere sahiplerdir. Polimerlerin istenilen formda, fiziksel ve kimyasal özelliklerde sentezlenebilmeleri ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulamalarında sıklıkla tercih edilmelerini sağlamaktadır. Polimerik miseller amfifilik blok kopolimerlerin oluşturduğu çekirdek/kabuk yapıda nanotaşıyıcılardır. Hidrofobik etkin maddelerin misellere enkapsüle edilmesi ile çözünürlükleri arttırılmaktadır. Polietilen glikol (PEG) ve polikaprolakton (PCL) ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoyumlu polimerlerdir. Juglon (5-hidroksi-1,4 naftokinon) ceviz ağacı tarafından üretilen sekonder bir metabolittir. Antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser özelliklere sahiptir ancak hidrofobik karakterine bağlı olarak suda çözünürlüğünün düşük olması biyoyararlanımını azaltarak kullanımını kısıtlamaktadır. Tez çalışmasında juglon molekülünün PEG-*b*-PCL misellerine enkapsüle edilerek çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının arttırılması

hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda PEG-*b*-PCL diblok kopolimeri  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile mikrodalga destekli olarak sentezlenmiştir. Polimerin kimyasal yapısının tayini için  $^1\text{H-NMR}$  ve FT-IR analizleri, molekül ağırlığı tayini için GPC analizi gerçekleştirilmiştir. Kritik misel konsantrasyonu (CMC) pirenin prob olarak kullanıldığı floresans spektroskopisi ile belirlenmiştir. Juglon yüklü PEG-*b*-PCL miselleri nanoçöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Misellerin boyut ve polidispersite indeksi (PDI) dinamik ışık saçılması (DLS), zeta potansiyel değeri ise elektroforetik ışık saçılması yöntemlerinin (ELS) kullanılması ile analiz edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi UV-Vis Spektrofotometre kullanılması ile hesaplanmıştır. Juglonun enkapsülasyonunu doğrulamak için FT-IR ve XRD analizleri gerçekleştirilmiştir. Misellerin morfolojik karakterizasyonu için AFM ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Juglonun salım profilinin belirlenmesi için in-vitro salım çalışması yapılmış ve son olarak misellerin antifungal etkinliği *C.albicans*, *A.flavus* ve *Fusarium spp.* suşları üzerinde agar dilüsyon metodu ile değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanoçöktürme, polimerik nanotaşıyıcı, misel, PEG-*b*-PCL, juglon

# Synthesis of Bioactive Polyethylene Glycol-*b*-Polycaprolactone Nanoparticles by Nanoprecipitation Method

Melis IŞIK TOKSOY

Department of Bioengineering

Master Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Serap DERMAN

Nanocarriers have important properties such as enhance the solubility of active ingredient, increase amount of drug reaching the site of action by protecting against enzymatic degradation, decreasing side effect, controlled release and active targeting. Polymers are easy to produce in desired form, physical and chemical properties that makes them desirable for drug delivery application. Polymeric micelles have core/shell structures that are composed of amphiphilic block copolymers. They are mostly used for encapsulation of hydrophobic active ingredient to increase its solubility. Polyethylene glycol (PEG) and polycaprolactone (PCL) are biocompatible polymers that used in drug delivery system. Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthaquinone) is secondary metabolite synthesized by walnut tree. Juglone has antimicrobial, antioxidant and anticancer properties. However, low solubility due to its hydrophobic character restricts its use by reducing bioavailability. In this thesis a nanocarrier system is designed by encapsulating juglone into the PEG-*b*-PCL micelles to improve bioavailability of juglone by increasing its solubility. To do this; PEG-*b*-PCL diblock copolymer was synthesized by the ring opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone using

microwave irradiation. <sup>1</sup>H-NMR and FT-IR analyzes were performed to determine chemical structure and GPC analysis was performed to determine average molecular weight of copolymer. Critical micelle concentration (CMC) of the copolymer was determined by fluorescence spectroscopy using pyrene as a fluorescence probe. Juglone loaded PEG-*b*-PCL micelles was synthesized using nanoprecipitation method. Size and polydispersity index (PDI) of micelles were determined by dynamic light scattering (DLS) and surface charge of micelles was determined electrophoretic light scattering technique (ELS). Encapsulation efficiency and drug loading were calculated using UV-Vis Spectrophotometer. FT-IR and XRD analysis were performed to confirm encapsulation of juglone. Morphological characteristic of micelles was analyzed using AFM and SEM. In-vitro release study was performed to determine juglone release profile. Antifungal activity of micelles was evaluated on the *C.albicans*, *A.flavus* and *Fusairum spp.* strains by performing agar dilution method.

**Keywords:** Nanoprecipitation, polymeric nanocarrier, micelle, PEG-*b*-PCL, juglone

### 1.1 Literatür Özeti

Mantarlar yaşadığımız iç ve dış ortamda bulunan insanlara ihtiyaç duymaksızın yayılan mikroorganizmalardır. Birçok türü zararsız olmakla birlikte, fungal patojenler yüzeysel, deri altı ya da sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedirler [1]. Yüzeysel mantar enfeksiyonları hafif seyreden türdür ancak oldukça bulaşıcı oldukları için hızlı ve etkili tedavileri gerektirirler. İnvaziv enfeksiyonlar mantarların organlara yerleşmesi ve yayılması sonucu ortaya çıkar ve asemptomik olabileceği gibi hayatı tehdit edici bir boyutta da seyredebilmektedirler. Özellikle çeşitli hastalık ve immünsupresif ilaç tedavileri sonucu bağışıkları düşük olan hastalar ve yoğun bakım hastaları risk grubundadır [2]. İnvaziv enfeksiyonların morbidite ve mortalitesi yüksek olduğu için etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hali hazırda kullanılan antifungal ilaçlara karşı giderek artan ilaç direnciyle karşılaşmakta bu da tedavi sürecini ve maliyetini arttırarak ciddi sağlık problemi haline gelmektedir. Hastalara verilen ilaçların kontrolsüzce kullanımı bu dirence neden olan en büyük etmenlerdendir [3]. Aynı zamanda hali hazırda kullanılan antifungal ilaçların insan hücreleri için de toksik özellik göstermesi kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu yüzden yeni, güvenli ve etkili antifungal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki kaynaklı doğal maddeler sahip oldukları çok yönlü etkileri ve kullanımlarının güvenli olması sebebi ile araştırmaların ilgi odağı olmaktadır. Ancak genellikle suda çözünürlüklerinin ve stabilitelerinin düşük olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemlerle birlikte kullanılmalarıyla farmakokinetik özellikleri iyileştirilerek teröpatik amaçlarla kullanımlarının önü açılmaktadır.

Nanotaşıyıcı sistemler ilacın etki bölgesine ulaşana kadar biyolojik sistemde degradasyonunu engelleme, suda çözünürlüğünü arttırma ve agregasyonunu engelleme, kontrollü salımını sağlama, ilacın yan etkilerini azaltma ve hedefleyici

tedaviye olanak sağlama gibi özelliklere sahiptirler. [4]. Bu özellikler sayesinde teröpatik etkinliğin ve güvenliğin geliştirilmesini sağlamakta ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde ümit vaat etmektedirler. Polimerler istenilen mekanik ve kimyasal özelliklerde sentezlerinin ve modifikasyonlarının kolay olması, biyobozunur ve biyouyumlu olmaları nedeniyle nanotaşıyıcı sistemlerde tercih edilen malzemelerdir. Miseller genellikle boyutları 100 nm'nin altında olan amfifilik diblok ya da triblok kopolimerlerden oluşturulan çekirdek-kabuk yapısında nanotaşıyıcı sistemlerdir. Çekirdek yapı hidrofobik bloklardan, kabuk yapı ise hidrofilik bloklardan meydana gelmektedir. Çekirdeğinde hidrofobik etkin maddenin enkapsülasyonuna olanak sağlamakta, hidrofilik kabuk yapı sayesinde ise stabilite ve çözünürlüğün artmasını sağlamaktadırlar [5]. Misel yapıyı oluşturan amfifilik kopolimerlerin kolaylıkla sentezlenebilmesi, bu amfifilik kopolimerlerin sulu çözeltide kendiliğinden misel yapıyı oluşturma eğiliminde olmaları, sentez yöntemlerinin kolay olması, boyutlarının küçük olması ve hidrofobik etkin maddelerin taşınmasına olanak sağlamaları misellerin nanotaşıyıcı sistemlerde tercih edilmesini sağlamaktadır.

Polietilen glikol (PEG) ve polikaprolakton (PCL), FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylı biyouyumlu polimerler olup farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. PEG sudaki yüksek çözünürlüğü dolayısıyla nanotaşıyıcı sistemlerde doğrudan kullanılmakta ya da yüzey modifikasyonları ile nanopartikülün özelliklerinin iyileştirilmesi için sıklıkla tercih edilmektedir [6]. PEG'in kullanılması ile nanopartikülün bağışıklık sistemi tarafından tanınıp etki göstermeden vücuttan atılması engellenebilir, vücutta etki göstermesi gereken bölge dışında istenmeyen etkileşimlerin önüne geçilebilir ve etkin maddenin suda çözünürlüğü artırılabilir [7]. PCL ise hidrofobik bir polimer olup hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlamaktadır. Hidrofobisitesi nedeniyle degradasyonunun yavaş olması etkin maddenin yavaş ve kontrollü salımına imkan sağlamaktadır [8]. PEG ve PCL polimerlerinin birlikte kullanılmasıyla tek başlarına sahip oldukları bu özelliklerin birleştirilmesi ve iyileştirilmesiyle etkili nanotaşıyıcı sistemler tasarlanabilmektedir. Amfifilik özellikteki PEG-*b*-PCL diblok kopolimeriyle misel yapıda polimerik nanotaşıyıcılar sentezlenmesiyle hidrofobik

etkin maddenin enkapsülasyonu ve suda çözünürlüğünün artırılması sağlanabilmektedir.

Bu amaç doğrultusunda ceviz ağacı tarafından sentezlenen sekonder bir metabolit olan antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal özellikleri olduğu bilenen ancak hidrofobisitesi nedeni ile biyoyararlanımı düşük olan juglonun (5-hidroksi-1,4-naftokinon) ilk defa PEG-*b*-PCL misellerine enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezde basit, genellikle stabilizatör gerektirmeyen, amfifilik polimerlerin sulu ortamda çökmesiyle, hidrofobik bloğun etkin maddeyi enkapsüle ederek çekirdeği oluşturması, hidrofilik bloğun ise çekirdeğin etrafını sararak kabuk yapıyı oluşturması sonucu misel oluşumunun gerçekleştiği nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır.

## 1.2 Tezin Amacı

Tez çalışmasının amacı; ceviz ağacı tarafından sekonder metabolit olarak sentezlenen ve hidrofobik özellik gösteren juglonun (5-hidroksi-1,4-naftokinon), antifungal ajan olarak kullanılabilmesi için PEG-*b*-PCL misellerine enkapsüle edilmesi ile biyoaktivitesinin artırılmasıdır. Juglon doğal bir etken olması ve antioksidan, antikanser, antiviral, antibakteriyel ve antifungal özellik göstermesi sebebi ile sentetik kimyasal ajanlara alternatif olabilecek potansiyele sahiptir. Ancak hidrofobisitesi kullanım potansiyelini kısıtlamaktadır. Nanotaşıyıcı sistemler ile kullanılmasıyla juglonun sulu ortamdaki çözünürlüğünün, stabilitesinin ve biyoyararlanımının artırılması hedeflenmiştir.

Bu doğrultuda;

- $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile mikro dalga destekli PEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin sentezlenmesi,
- Nanoçöktürme yöntemiyle amfifilik PEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin kullanılması ile juglon yüklü PEG-*b*-PCL misellerin sentezlenmesi,
- Sentezlenen misellerin karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi,
- *C.albicans*, *A. flavus* ve *Fusarium spp.* suşları üzerinde antifungal aktivitenin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### 1.3 Hipotez

Bu tez çalışması ile antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinen doğal bir molekül olan juglonun (5-hidroksi-1,4-naftokinon) biyouyumlu ve biyobozunur PEG-*b*-PCL polimeri ile oluşturulan nanotaşıyıcı sisteme enkapsülasyonu sonucunda biyoyararlanımının ve biyolojik aktivitesinin iyileştirilebileceği hipotezlenmiştir.



## 2.1 Fungal Enfeksiyonlar

Mantarlar ökaryotik mikroorganizmalardır. Ergosterol ve zosterolden oluşan hücre zarı ve onu çevreleyen mannoptein, kitin ve beta-glukan yapıdaki hücre duvarından meydana gelirler [9]. Bu bileşenler hücre duvarına sağlamlık kazandırmanın yanı sıra hasta bağışıklığını değiştirerek hastalık yapıcı etkilere de sahiptir [10], [11].

Mantarlar (funguslar) maya ve küf olmak üzere temel iki gruba ayrılırlar. Mayalar tek hücreli, küfler ise çok hücrelidir. Küf hücreleri uç uca gelerek hif adı verilen ince, uzun ve dallanmış hücre iplikçiklerini oluştururlar. Hiflerin bir araya gelmesi ile oluşan yapıya ise miselyum denir [12]. Fungal patojenlerin bitki ve hayvanlar üzerinde önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Mantarların çoğunluğu her ortamda bulunur ve insan ya da hayvanlara ihtiyaç duymaksızın yayılırlar. Gıda güvenliği için de büyük tehdit oluşturmaktadır [13]. Bazı mantar türleri insanlarda yüzeysel, deri altı ya da sistemik olmak üzere farklı enfeksiyonlara neden olurlar [1]. Yüzeysel enfeksiyonlar hafif seyrederek ancak vücudun diğer bölümlerine yayılma potansiyeli yüksek olduğu gibi aynı ortamda yaşayan ve ortak eşya kullanan bireylere de bulaşma olasılığı yüksektir [14]. Sistemik enfeksiyonlar asemptomatik olabileceği gibi hayatı tehdit edebilen bir ciddiyette de seyredebilir. Sistemik enfeksiyonlar genellikle mantarların akciğere doğrudan solunması ya da bir yara bölgesine istilası sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar fungal enfeksiyonlardan ciddi derecede zarar görmektedirler. Günümüzde fungal enfeksiyonların insidansı giderek endişe verici bir şekilde artmaktadır [12]. Kemoterapi alan kanser hastaları, immüno-supresif ilaç kullanan otoimmün hastaları ile organ transplantasyonu sürecindeki hastalar ve AIDS hastalığına sahip kişiler immün sistemleri baskılandığı için invaziv fungal enfeksiyonlar için risk gruplarıdır [2][15]. İnvaziv fungal enfeksiyonları mantarların kan dolaşımına geçmesi ve diğer organlara yayılması sonucu ortaya

çıkan ciddi bir sistemik enfeksiyon türüdür. İnsidansı düşüktür ancak mortalitesinin yüksek olması ciddiye alınmaları gerektiğinin göstergesidir. İnvaziv fungal enfeksiyonlara neden olarak yılda yaklaşık 1,5 milyon insanın sebebiyet veren birçok farklı mantar türü bulunmaktadır. Fungal enfeksiyona bağlı ölümlerin % 90'ından fazlasının *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* ve *Pneumocystis* kaynaklı olduğu bilinmektedir [13]. *C.albicans* ve *Aspergillus spp.* sistemik enfeksiyonlarda en yaygın patojenlerdir [16].

Küflere bağlı sistemik enfeksiyonlar mayalara göre daha az görülmektedir. Küfler her yerde bulunan fırsatçı iplikli yapıda mantar türleridir. Türlerinin çoğu sağlıklı konakçıda patojenik değildir. *Aspergillus sp.*, *Acremonium sp.*, *Fusarium sp.*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scopulariopsis brevicaulis* ve *Scytilidium hyalinum* insanlarda enfeksiyona neden olan küf türlerindedir [14]. *Aspergillus'un* 900'den fazla türü bulunmakta olup bunların çoğu enfeksiyona sebep olmamaktadır. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* insanlarda patojenik olan *Aspergillus* türleridir [17]. *Aspergillus* türlerinin bağışıklık sistemi zayıf ya da akciğer hastalıklarına sahip kişiler üzerinde hastalık yapıcı etkileri ve mortalitesi oldukça yüksektir.

Kandidaz, *Candida* türlerin bağlı olarak gelişen mantar enfeksiyonlarına verilen genel bir addır. Enfeksiyon genellikle bölgesel olarak ağız, boğaz, cilt, vajina, parmaklar, tırnaklar, akciğer ve gastrointestinal sistemle sınırlı olsa da bağışıklık sisteminin zarar gördüğü durumlarda *Candida'nın* kan dolaşımına geçmesi ve organlara taşınmasıyla invaziv kandida enfeksiyonları olan kandidemi ve derin yerleşimli enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır [18][19]. *C. albicans* vakaların yarısından fazlasını oluşturarak kandidemiye neden olan *Candida* türlerinin başında gelmektedir [20]. İnvaziv kandida enfeksiyonları özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar için büyük tehdit oluşturmaktadır. Bunun sebebi hastaların bağışıklık sisteminin zayıflığından kaynaklanmaktadır. Uzun süreli yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastaların %80'inde ilk hafta *Candida* kolonizasyonu ile başlayan durum ciddi enfeksiyonlarla sonuçlanabilmektedir [21].

Fungal patojenler menenjit ve zatürre gibi hayatı tehdit eden invaziv hastalıklara, kronik pulmoner aspergilloz (KPA) ve alerjik bronkopulmoner aspergillozis (ABPA) gibi kronik hastalıklara ve astım gibi kronik solunum yolu rahatsızlıklarına da yol açabilmektedirler. İnvaziv fungal enfeksiyonların (İFE) çoğunluğu altta yatan hastalıkların sonucu bağışıklığın düşmesi ile ilişkili şekilde ortaya çıkmaktadırlar. İnvaziv enfeksiyonların mortalitesi yüksektir. Başarılı klinik sonuçların alınabilmesi için erken tanı ve etkili antifungal terapilere ihtiyaç duyulmaktadır [22]. Mantar enfeksiyonları her yıl milyonlarca kişiyi etkilemektedir ve bunların 1,5 milyondan fazlasının invaziv enfeksiyon olduğu bilinmektedir [2]. Tespit ve tedavi edilmesi zordur. Morbidite ve mortalitesi de oldukça yüksektir [13]. Bu nedenle etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

## **2.2 Tedavide Kullanılan İlaçlar**

1980'lerin sonuna kadar amfoterisin B deride yüzeysel olarak görülen sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan tek ilaçtı. Bu tarihten itibaren amfoterisin B'nin lipozomal formülasyonları, flukanazol ve itrakonazol ile tedavi mümkün oldu. Son yıllarda ise vorikonazol ve posakonazol gibi genişletilmiş spektrumlu triazol grubu ilaçlar ile kaspofungi, mikafungin ve anidulafungin gibi ekinokandin grubu ilaçlar kullanılmaktadır [23]. Azoller, ekinokandinler ve polienler etki mekanizmalarına göre invaziv enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçların ana gruplarını oluşturmaktadırlar [24], [25]. Etki mekanizmaları; mantarların hücre zarının ana bileşeni olan ergosterol sentezinin inhibisyonu, beta-glukan sentezinin inhibisyonu, membran fonksiyonunun değişmesi ve DNA veya RNA sentezinin inhibisyonu olmak üzere dört farklı temele dayanmaktadır [26].

### **2.2.1 Azoller**

Yapılarında azol halkası bulunur ve azol halkasında bulunan nitrojen sayısına göre imidazol ve triazol olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. Ketokonazol, klotrimazol ve mikonazol yapısında iki nitrojen bulunan imidazol grubuna ait azollerdir. Flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol ve isavukanazol ise yapısında üç nitrojen içeren triazol grubu aittirler [27]. Azoller sitokrom p450 sisteminden

bir enzim olan lanosterol dimetilazı inhibe ederek mantarların hücre zarının yapısında bulunan ve ana bileşenlerden olan ergosterol sentezini engeller ve bunun sonucunda membranın yapısı ile işlevinin bozulmasıyla fungal büyümeyi inhibe ederler [28]. Ancak memeli hücrelerinde de sitokrom p450 enzim sisteminin bulunması sonucu memeli hücresiyle de etkileşime giren azol grubu ilaçları yan etkiye sebep olabilmektedirler. Triazol grubunun fungal sitokrom p450 sistemine olan affinitesi memeli sitokrom p450 sistemine olan affinitesinden daha yüksek olması imidazol grubuna göre kullanımının daha güvenli kılmaktadır. Aynı zamanda triazol grubundaki üç nitrojenli azol halkası sayesinde polarite ile çözünürlük artmış, plazma proteinlerine bağlanma eğilimi azalmış, fungal enzimlere karşı artan spesifite ve bağlanma eğilimi sonucunda ise azol grubu ilaçların etkinliği güçlenmiştir [29]. Ancak toksisitelerinin yüksek olması, dar spektrumlu olmaları ve mantarlar tarafından geliştirilen direnç mekanizmaları tedaviyi zorlaştırmaktadır [30]. Bunun yanı sıra hidrofobik yapıları sebebiyle sudaki çözünürlüklerinin düşük olması ile mantar ve insan hücresi arasındaki benzerlikten kaynaklanan seçicilik problemi kullanımlarını kısıtlamaktadır [15], [31]. İlaçların etkinliğini azaltarak mantar enfeksiyonlarında kullanımını kısıtlayan bu nedenler yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulduğunun göstergesidir.

### 2.2.2 Ekinokandinler

Ekinokandinler 1-3-beta-glukan sentazı inhibe ederek etkinlik göstermektedirler. 1-3-beta-glukan çoğu mantarın hücre duvarını oluşturan ana bileşendir ve bu bileşenin sentezinin inhibe edilmesi mantarların büyümesini engellemektedir. 1-3-beta-glukan sentaz memeli hücrelerinde bulunmadığı için insan hücrelerine karşı toksik değildir. Ekinokandinler mantar enfeksiyonlarının özellikle kandidiyaz tedavisinde yüksek potansiyele sahiplerdir [32]. Kaspofungin, micafungin ve anidulafungin ekinokandin grubu antifungal ilaçlardır. Yapılan araştırmalar *C.parapsilosis* ve *C.guilliermondi* gibi türlerin ekinokandin grubu ilaçlara karşı hassasiyetinin azaldığını göstermektedir [33].

### 2.2.3 Polienler

Polien grubu antifungaller sayıca fazla olmalarına rağmen çözünürlükleri, stabiliteleri ve toksisiteleri nedeni ile yalnızca birkaç tanesi kullanılabilir. Amfoterisin B bu türe ait klinikte kullanılan bir antifungal ilaçtır. Mantar hücre zarının ana bileşenlerinden ergosterole bağlanarak hücre içerisine girer, hücre zarında porlar oluşturur, iyon dengesinin bozulmasına, hücre bileşenlerinin sızmasına ve sonucunda hücre ölümüne neden olur [34]. *C.lusitaniae* ve *C.glabrata* Amfoterisin B'ye direnç geliştiren türlerdir [35], [36]. Konvansiyonel amfoterisin B'nin hastalarda yan etki oluşturması ve invaziv fungal enfeksiyonların tedavisinde böbrek fonksiyonunda bozukluk olan hastalarda nefrotoksik etki göstermesi nedeni ile kullanımının kısıtlanması sonucunda lipozomal amfoterisin B'nin geliştirilmesi ve kullanılmaktadır [37].

### 2.2.4 Nükleozid analogları

Flusitozin bu gruba ait bir antifungal ilaçtır. DNA ve RNA'nın yapısında bulunan azotlu bazlardan olan sitozinin florlu sentetik bir analogudur [38]. Flusitozinin doğrudan antifungal etkinliği yoktur. Mantar hücrelerinde bulunan sitozin permeaz enzimi flusitozinin hücre içine almasını sağlar ve sitozin deaminaz enzimi flusitozini 5-florourasile (5-FU) dönüştürür [39]. 5-FU RNA'nın yanlış kodlanmasına ve DNA sentezinde iki farklı yoldan inhibasyona neden olarak antifungal etkinlik gösteren bir antimetabolittir [40]. İnsan hücresi sitozin deaminaz enzimine sahip olmadığı için flusitozin - 5-FU dönüşümü gerçekleşmediğinden flusitozin mantar hücrelerinin nükleik asit fonksiyonunu bozarak antifungal etkinlik gösteren ideal bir ilaç olarak görünmektedir [41]. Ancak serumdaki flusitozin konsantrasyonu 100 mg/L'yi aştığında hastalar hematolojik ve gastrointestinal toksisite semptomları yaşarlar. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar insan bağırsak mikroflorasında flusitozin - 5-FU dönüşümünün gerçekleştiğini ve sonucunda hepatoksisite ve gastrointestinal rahatsızlıklara neden olduğunu göstermiştir [42], [43].

### 2.3 Fungal Enfeksiyonların Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar

Son zamanlarda mantarlar birçok geleneksel ve sentetik modern ilaçlara karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları nedeniyle sağlık sektöründe ciddi problemlere yol açmaktadır. İlaçların efluks pompalar ile hücre dışına atılması ve biyofilm oluşumu direnç mekanizmalarından bazılarıdır [44].

Yüzeysel mantar enfeksiyonların tedavisi enfeksiyonun şiddetine, bölgesine, derinliğine, enfeksiyona neden olan mikroorganizmaya ve bulaşıcılığına, hastanın yaşı ve var ise diğer hastalıklarına göre lokal (topikal) veya sistemik olarak gerçekleştirilmektedir. Genel olarak ele alındığında tedavilerin çoğunluğu topikaldir [14]. Ancak tedavide kullanılan antifungal ilaçlara karşı giderek artan ilaç direnci tedaviyi zorlaştırmaktadır. Hastalara verilen ilaçların yetersiz, düzensiz, kontrolsüz ya da aşırı bir şekilde kullanımı ilaç direncine neden olan başlıca etmenlerdendir. Bu da geleneksel ilaçların tedavide başarısızlığı ile sonuçlanmaktadır [3]. Bunun yanı sıra hali hazırda kullanılan ilaçların insan hücreleri için de toksik özellik göstermesi bu ilaçların yeni formülasyonlar ile kullanılmasını gerektirmektedir. Günümüzde nanoteknolojinin giderek önem kazanması ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile var olan antifungal ilaçların özellikleri iyileştirilebilir ve etkinlikleri arttırılabilir.

Bitki kaynaklı doğal etkin maddeler antifungal tedavilerde ümit vaatmektedir. Ancak sudaki düşük çözünürlükleri ve buna bağlı olarak hücreye alımlarının zor olması ve kimyasal stabilitelerinin düşük olması kullanımlarını kısıtlamaktadır [45]. Düşük çözünürlük ve beraberinde gelen düşük geçirgenlik etkin maddenin biyoyararlanımı sınırlandırır ve teröpatik etkinliğini azaltan başlıca özelliklerdir. Stabilitelerinin düşük olması nedeniyle kan dolaşımına girmeden önce sindirim sistemi pH'ında ve enzimlerince degrades olabilmekte ve bunun sonucunda toksik yan ürünler oluşturabilmektedirler. Üretim ve depolama süreçlerinde başlıca stabilize problemleri ise oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve fotodegradasyondur [46]. Doğal kaynaklardan elde edilen etkin maddelerin bu özelliklerinin iyileştirilerek kullanımlarının yaygınlaştırılması için nanotaşıyıcı sistemlerle birlikte kullanılmaları gerekmektedir. Biyoaktif polimerik nanopartiküller, yüksek etkinlik ve düşük üretim maliyetleri sayesinde etkili ve çevre dostu yeni

antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde umut vaat etmektedir. İlk FDA onaylı nanoilaç olan Doxil'in 1995 yılında onaylanması ile nanoteknoloji ilaç geliştirmede giderek önem kazanmıştır [47].

## 2.4 Nanoteknoloji

Nanobilim ve nanoteknoloji bilimin farklı alanlarınca farklı tanımlarla ifade edilmektedir. Bunun sebebi çok geniş bir uygulama alanına hitap ediyor olmasıdır. Genel olarak bakıldığında nanobilim, nano boyutta doğal kanunları anlamak amacı ile yapılan aktiviteler olarak tanımlanabilirken, nanoteknoloji ise nanobilim sayesinde elde edilen bu bilgiler doğrultusunda yeni ve pratik uygulamalar gerçekleştirilmesini sağlamak olarak tanımlanabilir [48]. Nanoteknoloji, boyutu 1 nm ile 100 nm arasında değişen maddeleri anlama, tasarlama, üretme, modife etme ve kullanma imkanı sunan ve bu süreçte fizik, kimya ve biyoloji gibi temel bilimlerin bilgilerinden faydalanan bir araştırma alanıdır. Malzemelerin boyutu nano ölçeğe indiğinde klasik fizik kuralları yerine kuantum fiziği kuralları devreye girmekte ve bunun sonucunda malzemeler farklı ve yeni özellikler kazanmaktadırlar [49]. Nanoteknoloji sayesinde üstün özellikte nanoyapılar tasarlanıp sentezlenerek tıp, farmakoloji, çevre, yeşil teknoloji ve elektronik gibi farklı alanlarda kullanım imkanı bulabilmektedirler. Nanopartiküllerin sahip oldukları bu üstün özellikler sayesinde özellikle nanotıpta hastalıkların tanısı, önlenmesi ve tedavisi için kullanımı üzerine yapılan yapılan araştırmalar giderek artmaktadır. Nanoteknolojinin yeni bir alanı olan nanobiyoteknolojide ise temel biyolojik prensiplerle fiziksel ve kimyasal prosedürleri birleştirilerek spesifik yapı ve fonksiyonlara sahip nano boyutta parçacıklar üzerine araştırmalar yürütülmektedirler. Tez kapsamında nanobiyoteknolojinin tıp ve farmakolojideki uygulama alanı olan ilaç taşıyıcı sistemler hakkında bilgi verilecektir.

## 2.5 İlaç Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda kombinatorial (bütünleştirici) kimya ve yüksek hızda aktivite tarama (high throughput screening) uygulamalarının ortaya çıkışı ve yaygınlaşması ile ilaç geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Ancak bu araştırmalar sonucu ortaya çıkan ilaçlar geleneksel kimyasal metotlar ile geliştirilen ilaçlara göre daha düşük çözünürlük ve daha yüksek toksisite göstermektedirler [50]. Günümüzde sentetik

ilaç moleküllerinin yanı sıra bitkisel kaynaklı doğal moleküllerin de terapötik amaçlar için kullanımı üzerine araştırmalar yaygınlaşmakta ancak genellikle suda düşük çözünürlük göstermeleri kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu sentetik ve doğal ilaçların vücutta etki göstereceği bölgeye ulaştırılabilmesi için yeni yollara ihtiyaç vardır. İlaç taşıyıcı sistemler ilaçların farmakolojik ve terapötik özelliklerini iyileştirmek için tasarlanan sistemlerdir. İlaç taşıyıcı sistemler ile ilaçlar etki gösterecekleri bölgeye belirli konsantrasyonlarda iletilebilmekte ve tedavi sürecinde kontrollü salım özellikleri sayesinde etki bölgesinde bu konsantrasyonu sürdürmeleri sağlanabilmektedir.

Nanotaşıyıcılar, biyolojik sistemde ilacın degradasyonunu minimize ederek etki bölgesine ulaşan miktarını artırma, hidrofobitesini azaltarak çözünürlüğünü artırma, kontrollü salım ve spesifik hedefleme gibi önemli özelliklere sahiptirler. Sağladıkları bu özellikler sebebi ile teröpatik etkinliğin ve güvenliğin geliştirilmesi bakımından ümit vaat etmektedirler [51]. Bu özellikler taşıyıcı sisteme göre değişkenlik göstermekte olup; boyut, şekil ve yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ile geliştirip iyileştirilebilmektedir [52]. İlaçlar, proteinler ve polinükleotidler gibi terapötik ajanlar biyoyararlanımı iyileştirmek, sulu ortamdaki çözünürlüğü ve stabilizeyi arttırmak ve bunun sonucunda salınan ilaç miktarı ve hızını kontrol etmek amacıyla nanotaşıyıcı sistemlere yüklenerek kullanılabilirler.

Nanopartiküller boyutlarının küçük olması, yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları, bir veya birden fazla etkin maddenin enkapsüle edilebilmesine ve yüzey modifikasyonları ile hedefleyici tedaviye olanak sağlamaları gibi özellikleri ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımlarında büyük avantaj sağlamaktadır [53]. Hedefleyici ligandlar ile vücutta hastalık bölgesine yönlendirilmeleri sayesinde sağlıklı doku ve hücreler için yan etki göstermeyerek, ilacın etki göstereceği bölgeye yüksek konsantrasyonda ulaşmasını sağlamaktadırlar. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılması ile geleneksel ilaçlardan kaynaklı farmakokinetik limitler aşılarak daha etkili tedavi imkanları sunulabilmektedir.

Nanopartiküller kompozisyonlarına göre çeşitlilik göstermektedirler. Lipid, dekstran ve kitosan gibi biyolojik orjinli olabilecekleri gibi, metal, karbon, silika ve çeşitli sentetik polimerlerden oluşarak daha kimyasal bir karakteristiğe sahip

olabilmektedirler. Genel olarak nanopartiküller inorganik ve organik olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Metalik nanopartiküller, karbon nanotüpler ve silika nanopartiküller inorganik nanopartiküllere, lipozomlar, katı lipid nanopartiküller (SNP) ve polimerik nanopartiküller ise organik nanopartiküllere örnek olarak verilebilir. Polimerik nanopartiküller homopolimer ya da kopolimerden oluşmasına bağlı olarak farklı nanopartiküler yapıları meydana getirmektedir. Nanokapsüller, nanoküreler ve dendrimerler homopolimerlerden, polimerzom ve miseller ise kopolimerlerden oluşmaktadır [54].

## 2.6 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanotaşıyıcılar, genellikle 1-300 nm arasında değişen boyutlara sahip, biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerden oluşan ve terapötik olarak aktif bir ajanla yüklü sistemlerdir [55]. Polimerler çeşitliliği çok geniş malzemelerdir ve istenilen formda, istenilen mekanik ve kimyasal özellikler kazandırılarak üretilmeleri kolaydır. Bu da polimerlerin ilaç taşıyıcı sistemlerde tercih edilmesinin en önemli sebeplerinden biridir. Nanopartikül hazırlamak için uygun polimerin seçilmesi etkin maddenin enkapsülasyon etkinliğinin ve biyoyararlanımının artırılması için önemlidir. Polimerlerin fiziksel özelliği olan boyut, yüzey yükü ve kristalinitesi ile kimyasal özellikleri olan hidrofilitate ve moleküler ağırlıkları nanotaşıyıcı sistemin özelliklerini şekillendirmektedir [4]. İlacın polimerik nanotaşıyıcıdan kontrollü salımı, polimerin biyobozunma hızı ve ilacın polimerden difüzyon hızına bağlıdır. Polimerin kimyasal özellikleri modifiye edilerek bozunma hızı değiştirilebilir ve bu sayede ilacın istenildiği gibi yavaş ya da hızlı olarak salımı gerçekleştirilebilir. Hedeflenen özellikler nanopartikülün boyutu, yüzey yükü, hidrofobisitesi ve nanopartikülün yüzeyinde bulunan ya da yüzey modifikasyonları sayesinde yüzeye eklenen moleküller/ligandlar sayesinde değiştirilebilirler [56].

Polimerik nanopartiküller doğal ya da sentetik polimerlerle oluşturulabilirler. Kitosan, alginat, jelatin ve albümin nanotaşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan doğal polimerlerdir. Hidrojel oluşturma eğiliminde olan bu doğal polimerler oligonükleotitler, peptitler, proteinler ve hidrofilik etkin maddelerin taşınması için tercih edilmektedir [57]. Ancak doğal polimerler doğal kaynaklardan

ekstraksiyon ve saflaştırma adımları sonucu elde edildikleri için saflıkları değişebilmekte, üretim de tekrarlanabilirlikleri de düşük olmaktadır. Buna karşın sentetik polimerler istenilen saflıkta ve özelliklerde tekrar tekrar üretilebilmeleri, hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlamaları gibi özellikleri ile polimerik nanopartiküllerin sentezinde sıklıkla kullanılmaktadırlar [58]. Polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poli glikolik asit (PGA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan sentetik polimerlerdir.

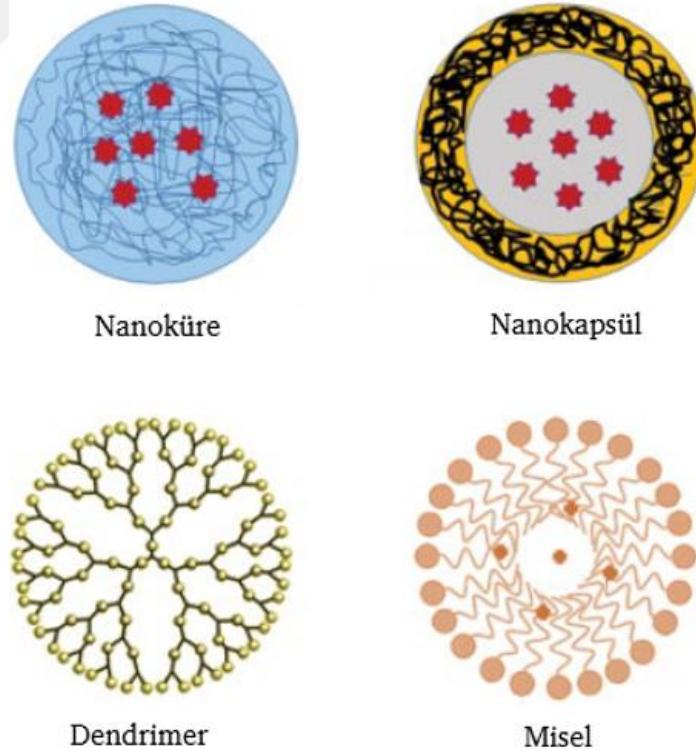
PLA, PGA ve PLGA biyouyumlu, biyobozunur ve biyolojik sıvılarda yüksek stabiliteye sahip polyesterlerdir. FDA tarafından ilaç taşıyıcı olarak kullanımları onaylanmıştır. Vücutta enzimatik olmayan yollar ile hidrolize uğramaları sonucu ortaya çıkan laktik asit ve glikolik asit krebs döngüsüne katılarak metabolize edilirler [59]. Polimerik nanotaşıyıcılar degrede olarak vücuttan atılmaları sayesinde uzun dönemli toksik etkiye neden olmazlar. Polimerler, kimyasının çeşitliliği nedeni ile istenilen özelliklerde ve biçimlerde sentezleme ve yüzey modifikasyonları ile hedefleyici tedavi imkanı sunarlar. Ligand olarak oligopeptitlerin polimerik nanotaşıyıcıların yüzeylerine konjuge edilebilmesi ile kanser ya da çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde avantaj sağlayabilmektedirler [60]. PLGA nanokapsül formunda kullanılarak antikanser ilaçları [61], antibiyotikler [62], peptit ve protein kaynaklı ilaçlar [63], sığır serum albümin [64] ve insülinin [65] kontrollü salımı ve hedefleyici salımı üzerine araştırmalar gerçekleştirilmiş ve bu konuda farklı etkin maddeler ile daha birçok çalışma devam etmektedir.

PEG ilaçların ve ilaç taşıyıcı sistemlerin farmakokinetik özelliklerini değiştirerek iyileştirmek amacı ile sıklıkla kullanılan suda yüksek çözünürlüğe sahip sentetik bir polimerdir. PEGilasyon özellikle peptit ve proteinlerin, ilaçların ya da ilaç taşıyıcı sistemlerin PEG ile konjuge edilerek modifiye edilmesi işlemidir. Bu modifikasyon sayesinde etkin maddenin suda çözünürlüğü artırılarak agregasyonu engellenir, dolaşımda kalma süresi uzar, etki bölgesine ulaşmadan enzimler tarafından metabolize olması engellenir ve protein yapılı ilaçların immunojenitesi azaltılır [6]. PEG'in sağladığı bu özellikler PEG içeren blok

kopolimerler ile amfifilik özellikle nanotaşıyıcı sistemlerin tasarlanmasına olanak sağlamıştır.

PCL biyoyumluluğu, biyobozunur olması ve sahip olduğu mekanik özellikler sebebi ile nanopartikül sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yarı kristalin yapısından dolayı bozunma hızı amorf poliesterlere göre daha yavaştır [57]. Bu sebeple genellikle modifiye edilerek kullanılmaktadırlar. PEG ile PCL'nin kopolimer oluşturmasıyla sentezlenen misel yapıda nanopartiküller PCL blok sayesinde hidrofobik etkin maddenin enkapsülasyonuna olanak sağlanmakta, PEG blok ise taşıyıcının stabilitesini ve degradasyon hızını arttırmaktadır [66]. PEG-PCL nanopartikülleri ile ilgili detaylı bilgi Bölüm 2.8' de verilmiştir.

Polimerik nanotaşıyıcılar; küresel, dallanmış ya da çekirdek-kabuk (misel) yapısında olabilirler. Nanoküre ve nanokapsüller küresel nanotaşıyıcılara, dendirimerler dallanmış nanotaşıyıcılara, polimerzomlar ve miseller ise çekirdek-kabuk yapısındaki nanotaşıyıcılara örnek olarak verilebilirler [67].



**Şekil 2.1** Polimerik nanopartikül çeşitleri [68]

### 2.6.1 Nanoküreler ve Nanokapsüller

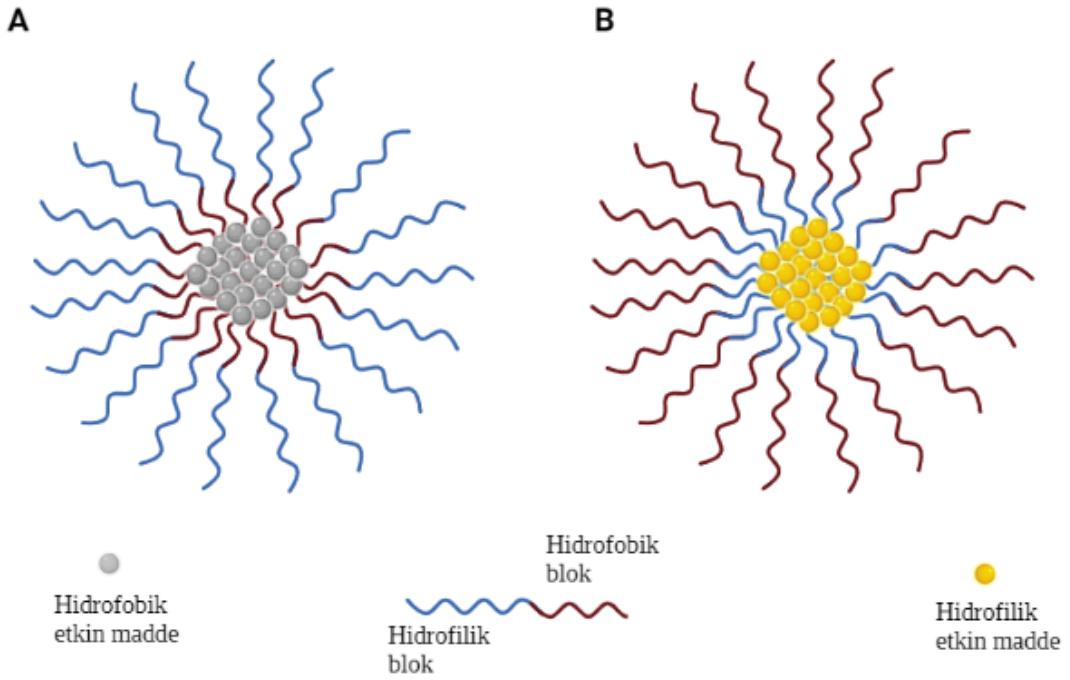
Polimerler ile sentez yöntemine bağlı olarak morfolojik olarak farklı olan nanoküre ya da nanokapsül yapılar oluşturabilmektedir. Nanoküreler etkin maddenin matris yapı içerisinde uniform olarak disperse edilmesi ile oluşmuş nanotaşıyıcılardır [69]. Tamamen katı yapıdadırlar. Etkin madde nanoküre içerisine enkapsüle edilebileceği gibi istenildiğinde taşıyıcı yüzeyine adsorbe edilmesi ile de sistem tasarlanabilmektedir. Nanokapsüller ise veziküler sistemlerdir. Etkin madde genellikle içi yağ ya da su olan çekirdekte çözünmüş olarak bulunur ve salım profilini kontrol etmeyi sağlayan polimerik bir kabuk tarafından çevrilir. Nanoküreler gibi nanokapsüllerin yüzeyine de istenildiğinde etkin madde ya da ligandlar adsorbe edilebilmektedir [70][4].

### 2.6.2 Dendrimerler

Dendrimerler düzenli ve yoğun bir şekilde dallanmış küresel polimerik nanopartiküllerdir. Çekirdek, etrafını saran dallanmış yapı ve dış kabuğunda yer alan ve dendrimerin fonksiyonunu belirlemede rol oynayan terminal gruplar olmak üzere üç ana bölümden oluşurlar [71]. Misel benzeri bir yapı sergiledikleri için hidrofobik etkin maddenin enkapsülasyonuna olanak sağlarlar. Dendrimerlerde sentez dışarıdan başlayıp içeriye doğru dallanan ve çekirdekte birleşen convergent ya da çekirdekten başlayarak dışarı doğru dallanıp büyüme şeklinde gerçekleşen divergent methodla gerçekleştirilebilmektedir. Aşamalı sentezleri nedeniyle polidispersitesi oldukça düşüktür [72]. Dendrimerler boyut, şekil, dallanma uzunluğu ve yoğunluğunun değiştirilmesi ve fonksiyonlarını belirleyen yüzeydeki terminal grupların hedeflenen özelliklere göre belirlenebilmeleri sayesinde istenildiği gibi modifiye edilerek kullanım imkanı sunmaktadırlar. Etkin madde çekirdeğe enkapsüle edilebileceği gibi fiziksel ya da kimyasal olarak yüzeye adsorbe edilebilmektedir. Yüzeyde yoğun olarak bulunan terminal gruplar hedefleyici ligandların ya da dendrimerlerin davranışlarını belirleyen fonksiyonel grupların yüzeye adsorpsiyonuna olanak sağlarlar [73].

### 2.6.3 Miseller

Polar ya da hidrofilik ve apolar ya da hidrofobik olmak üzere iki kısımdan oluşan moleküllere amfifilik moleküller denilmektedir. Bu tür moleküller bir çözücüye maruz kaldıklarında kendi kendine bir araya gelirler. Hidrofilik bir çözücüde hidrofilik kısımlar çözücü ile temas edecek şekilde sıralanırken, hidrofobik kısımlar çözücünden kaçarak çekirdekte kümelenirler. Amfifilik moleküllerin bu şekildeki oluşumuna normal misel adı verilmektedir. Amfifilik moleküller hidrofobik bir çözücüye maruz kaldıklarında ise hidrofobik kısmın dışarıda hidrofilik kısmın ise içeride kalması ile ters misel adı verilen yapı oluşmaktadır. Normal miseller hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlayarak çözünürlük ve biyoyararlanımlarının artmasını sağlarken, ters miseller hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlamaktadırlar [74].



**Şekil 2.2** Normal misel (A) ve ters misel (B)

Polimerik miseller amfifilik blok kopolimerlerden oluşan, etkin maddenin çözünürlüğünün ve stabilitesinin artırılmasını sağlayan çekirdek-kabuk yapısında polimerik nanotaşıyıcıdır. Sağladığı bu avantajlar nedeniyle düşük çözünürlüğü ve stabilitesi kullarımlarını kısıtlayan terapötik maddelerin tedavide kullanımının sağlanması üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda ilgi odağı olmaktadır [75].

Boyutları genellikle 100 nm'nin altındadır, boyutlarının bu kadar küçük olması retiküloendotelial sistem hücreleri tarafından fagositoza uğramalarını engellemektedir [5]. Lineer diblok ve triblok kopolimerler misel sentezinde sıklıkla kullanılan amfifilik polimerlerdir. Amfifilik yapıya sahip olmaları sayesinde sulu ortamda kendiliğinden misel formu oluşturmaktadırlar. Bu özellikleri sentezlerinin kolay olmasını sağlamaktadır. Sulu ortamda hidrofobik blokların bir araya gelerek yoğun bir şekilde oluşturduğu çekirdek ve etrafını saran hidrofilik bloklardan meydana gelen çekirdek-kabuk yapısından oluşmaktadırlar. Hidrofobik çekirdek kısmı etkin maddenin enkapsülasyonunu sağlarken hidrofilik kabuk miselin stabilitesini sağlamaktadır. Etkin maddenin misellere enkapsüle edilmesi sonucu artan çözünürlük ve stabilitesi sayesinde agregasyonu önlenmekte, dolaşımda kalma süresi uzamakta ve sonucunda terapötik etkinliği artmaktadır. Stabilitesi yüksek bir misel yapı oluşumunun sağlanması için kabuk kısmı oluşturan hidrofilik bloğun moleküler ağırlığının çekirdeği oluşturan hidrofobik kısmın moleküler ağırlığını geçmemesi gerekmektedir [76]. Moleküler organizasyonları nedeni ile boyutları ve polidispersiteleri düşüktür. Boyut, şekil ve kritik misel konsantrasyonu (CMC) misellerin tanımlayıcı özelliklerindedir. Kritik misel konsantrasyonu amfifilik polimerin misel oluşturduğu en düşük konsantrasyondur ve misellerin stabilitesinin bir göstergesidir. CMC ilaç salım profilini etkilemektedir. Kritik misel konsantrasyonu ne kadar düşük ise misellerin stabilitesi o kadar yüksek olmaktadır [77]. Yüksek CMC değerine sahip miseller vücuda alındığında kanda ya da diğer biyolojik sıvılarda dilüsyona uğrayarak dağılabilmektedirler. Bu sebeple misellerin stabilitesinin sağlanması için düşük CMC değerine sahip olmaları gerekmektedir. Hidrofobik bloğun moleküler ağırlığının arttırılması ile kritik misel konsantrasyonu düşürülerek daha stabil miseller elde edilebilmektedir [78]. Miseller hidrofobik çekirdek kısmına yüksek yükleme kapasitesi ile etkin madde enkapsüle edilebilmesi ve bu sayede çözünürlüğünün arttırılması ve toksisitesinin azaltılması, düşük kritik misel konsantrasyonuna sahip olmaları sayesinde fizyolojik koşullarda artan fiziksel ve kimyasal stabilitesi ve kanda dolaşım süreleri, oluşturuldukları polimerlere ve çekirdek yapının büyüklüğüne bağlı olarak yavaşlatılmış bozunma hızları, çeşitli ligandların yüzeye adsorbe edilmesi ile hedefleyici tedaviye olanak sağlamaları ve

amfilik kopolimerler suda kendiliğinden misel yapıyı oluşturduğundan sentez yöntemlerinin kolay olması gibi özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak ümit vaat etmektedirler [79], [80]. Ancak bunun yanında misellerin uzun süre boyunca stabil kalamaması, ilaç salımının kısa sürede gerçekleşmesi, hidrofilik etkin maddeler için uygun olmaması ve her etkin madde için sistem optimizasyonunu gerektirmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu özellikler misel sentezinde kullanılan malzemenin özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir [81]. Bu kapsamda misellerden ilaç salımını kontrollü ve sürekli hale getirmek için ön ilaçlı sentezler [82], [83], triblok kopolimerlerin kullanılması ile daha stabil ve ilaç yükleme kapasitesi yüksek çiçek benzeri yapıda misel sentezi [84], hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlayan ters misel sentezi [85] ve *in vivo* ortamda misel oluşturan polimer filmler [86] üzerine araştırmalar yapılmaktadır.

## **2.7 Polimerik Nanotaşıyıcıların Sentez Yöntemleri**

Polimeri nanotaşıyıcıların sentezlenmesinde iki temel yaklaşım bulunmaktadır. Bunlardan birincisi monomerlerin kullanılmasıyla gerçekleşen emülsiyon ya da mini-emülsiyon polimerizasyonuna dayalı yöntemler, ikinci yaklaşım ise polimer zincirlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen sıklıkla nanoçöktürme, diyaliz ve emülsifikasyona dayalı yöntemlerdir [87]. Monomerlerin kullanılmasıyla hem polimerleşme hem de nanopartikül oluşumunun birlikte gerçekleştiği yöntemlerde monomer, başlatıcı ve yüzey aktif maddeden oluşan sulu fazın polimerleşme reaksiyonunun gerçekleşmesi için yüksek sıcaklıkta tutulması sonucu monodispers polimerik nanopartikül oluşumu gerçekleşir. Ancak bu yaklaşımın en büyük dezavantajları oluşan polimerlerin moleküler ağırlığının ve nanopartikül boyutunun kontrol edilememesidir. Diğer bir sorun ise polimerleşmeden kalan monomerlerin, oligomerlerin ve katalizörlerin sentezlenen nanopartikül içerisine enkapsüle olması sonucu uzaklaştırılmalarının zorlaşmasıdır [88]. Bu sebeple polimerik nanopartiküllerin sentezinde genellikle daha önceden sentezlenmiş polimer zincirlerinin kullanıldığı yöntemler tercih edilmekte olup bu tez kapsamında alt başlıklar halinde bu yöntemler açıklanacaktır.

### **2.7.1 Emülsifikasyon Yöntemleri**

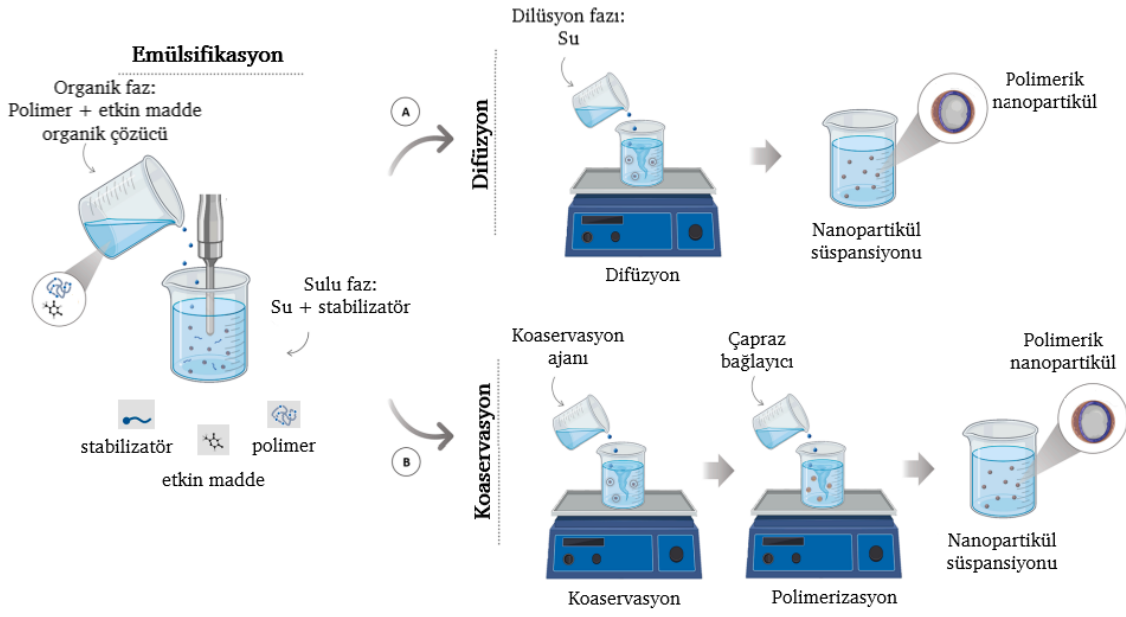
Emülsiyona dayalı yöntemler yüksek enkapsülasyon etkinliği ve yüksek stabilite ile sonuçlanan, nanopartikül sentezinde sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir [89]. Emülsiyon-çözücü difüzyon, emülsiyon-çözücü buharlaştırma, emülsiyon-koaservasyon ve ikili emülsiyon-çözücü buharlaştırma olarak farklılaşmaktadırlar [90].

#### **2.7.1.1 Emülsiyon-Çözücü Difüzyon Yöntemi**

Emülsiyon-çözücü difüzyon yöntemi organik, su ve dilüsyon fazı olmak üç ayrı bileşenden oluşmaktadır. Organik çözücü etkin madde ve polimeri çözmeli ve suyla kısmen karışabilmelidir. DCM, benzil alkol, etil asetat ve kloroform sıklıkla kullanılan organik çözücülerdir. Sulu faz stabilizatör olarak sıklıkla PVA bazen de poloksomer ya da iyonik yüzey aktif maddeler içermekte ve dilüsyon için su kullanılmaktadır [91] [90]. Sentezde etkin madde ve polimer organik çözücüde çözülür ve bu organik faz stabilizatör içeren sulu fazla yüksek enerji uygulanarak homojenizasyon ya da ultrasonikasyon kullanılmasıyla eklenir ve tekli emülsiyon oluşturulur. Emülsiyon su ile dilüe edilir ve organik çözücünün sulu faza difüzyonu sonucu nanopartikül oluşumuyla sonuçlanır [90]. Karıştırma hızı, organik faz içerisindeki polimer konsantrasyonu ve çözücünün kimyasal yapısı partikül boyutunu etkileyen parametrelerdir [92].

#### **2.7.1.2 Emülsiyon-Koaservasyon Yöntemi**

Emülsiyon-koaservasyon yöntemi jelatin ve sodyum aljinat gibi doğal polimerler ve karboksimetil selüloz ve polistiren türevleri gibi sentetik polimerler için kullanılmaktadır [93]. Yöntem emülsiyon oluşumunu takip eden koaservasyon sonrasında polimerin çökmesi ve ince tabaka şeklinde nanopartiküllerin oluşumu ile tamamlanmaktadır. Emülsiyonda iç faz çözücü ve etkin maddeyi içermekte dış faz ise su ve polimerden oluşmaktadır. Koaservasyon sisteme elektrolit, dehidrasyon ajanı ekleme ve sıcaklık değişikliği ile indüklenir. Son olarak eklenen çapraz bağlayıcı ile stabil nanopartiküllerin oluşması sağlanır [94].



**Şekil 2.3** Emülsiyon-çözücü difüzyon (A) ve emülsiyon-koaservasyon (B) yöntemleri ile nanopartikül sentezi [95]

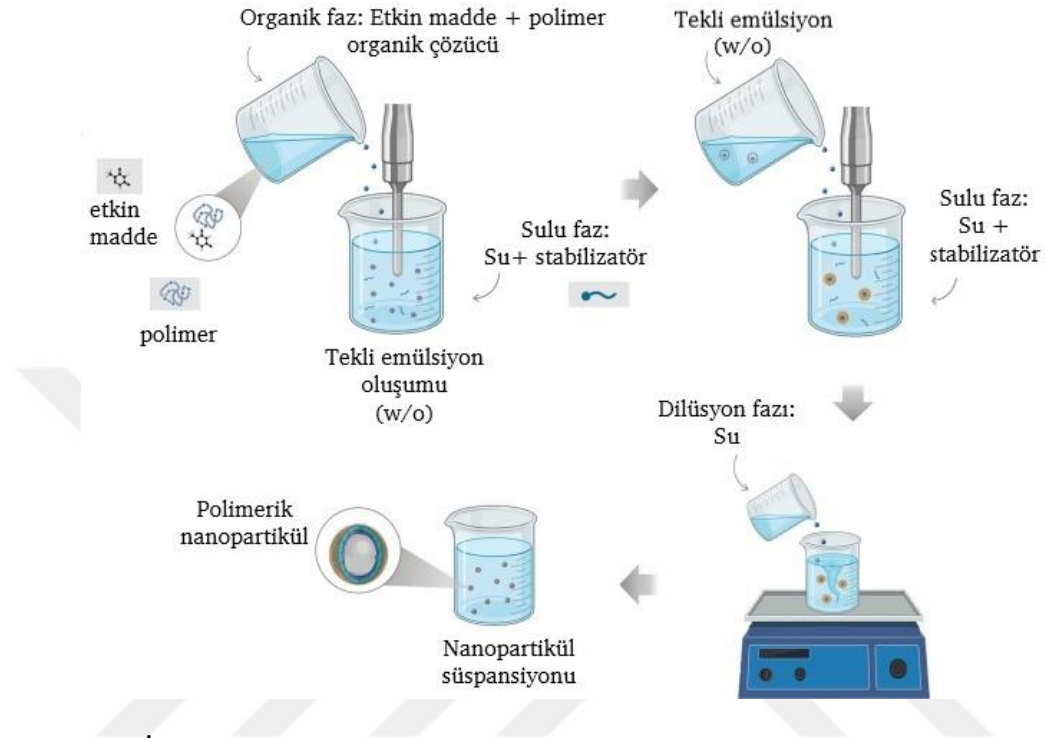
### 2.7.1.3 Tekli Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi çözücü uçurma yöntemi olarak da bilinmektedir. Etkin madde, polimer ve organik çözücünden oluşan organik fazın stabilizatör içeren sulu faz ile yüksek enerji uygulayarak karıştırılması sonucu nanoemülsiyon oluşturulur. Nanoemülsiyon oluşumunu organik çözücünün oda sıcaklığında karıştırma esnasında ya da basıncın düşürülmesi ile uçurulması adımı takip eder. Polimer ve etkin maddenin çözünürlükleri azalarak çöker ve sulu fazla disperse olarak nanopartikül oluştururlar. Emülsiyon oluşturma esnasındaki karıştırma hızı ve süresi ve stabilizatör türü ve konsantrasyonu nanopartikül boyutunu etkileyen sentez parametreleridir [96].

### 2.7.1.4 İkili Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

İkili emülsiyon (w/o/w)- çözücü buharlaştırma yöntemi hidrofilik etkin maddenin enkapsülasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İlk olarak etkin madde ve polimer içeren organik faz stabilizatör içeren sulu faz ile karıştırılarak ilk emülsiyon olan w/o emülsiyonu oluşturulur. Bu emülsiyon stabilizatör içeren sulu faz ile yeniden emülsifiye edilerek ikili emülsiyon (w/o/w) oluşturulur ve son olarak organik çözücünün uçurulması ile nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Ancak bu yöntemin dezavantajı sentezin enkapsülasyon etkinliği düşük ve boyutu

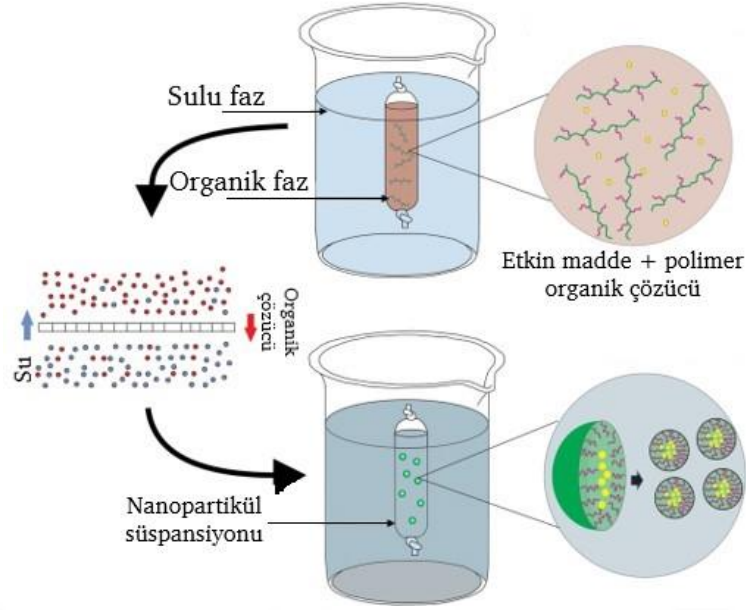
büyük nanopartiküller ile sonuçlanabilmesidir. Bu kısıtlamaların üstesinden gelebilmek sentezde için yüksek moleküler ağırlıklı polimerler yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilmekte, içteki sulu fazın viskozitesi ve stabilizatörün moleküler ağırlığı arttırılabilmektedir [97].



**Şekil 2.4** İkili emülsiyon(w/o/w)-çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül sentezi [95]

### 2.7.2 Diyaliz

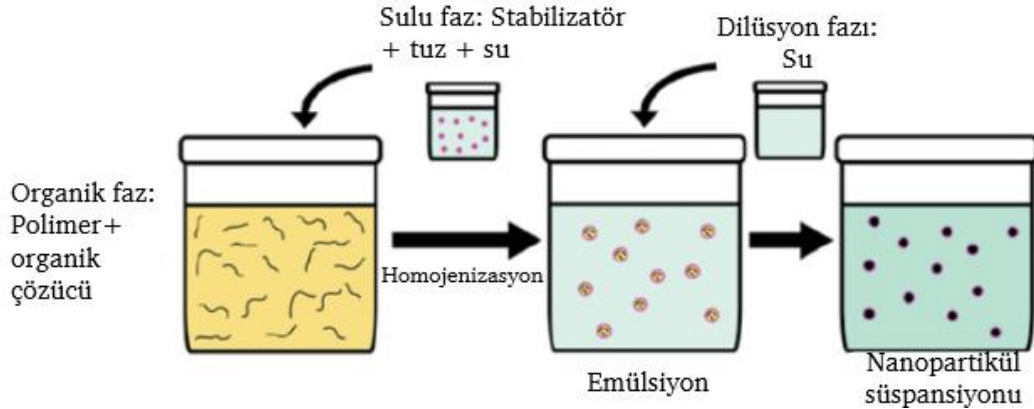
Diyaliz yöntemi boyutları küçük ve düşük polidispersiteye sahip nanopartiküllerin sentezlenmesine imkan sağlamaktadır. Polimer ve etkin madde su ile karışabilen bir organik çözücüde çözülerek uygun moleküler ağırlıktaki diyaliz membranına yerleştirilir ve suya karşı diyaliz edilir. Diyaliz membranına suyun difüze olması ve içeriden organik çözücünün çıkmasıyla ile çözünürlüğü azalan polimerin çökmesi ve hidrofobik etkin maddenin enkapsülasyonu sonucu nanopartikülü oluşur [98].



Şekil 2.5 Diyaliz ile nanopartikül sentezi [99]

### 2.7.3 Salting-out Yöntemi

Salting-out yönteminde polimerin aseton ve THF gibi su ile karışabilen organik çözücünde çözünmesiyle organik faz elde edilir. Sulu faz stabilizatör ve yüksek konsantrasyonda ve organik faz içerisinde çözünmeyen bir salting-out ajanı içermektedir. Sıklıkla kullanılan ajanlar magnezyum klorür, kalsiyum klorür, magnezyum asetat ve süktrozdur. Organik faz ve sulu fazın yüksek enerji uygulanarak karıştırılmasıyla emülsiyon oluşturulur. Oluşan emülsiyon su ilave edilmesi ile dilüe edilir ve iyonik gücün azalması sonucu organik çözücü difüze olarak nanopartikülleri oluşturur. Salting-out ajanının uzaklaştırılması için çapraz akışlı filtrasyon ya da santrifüj ile saflaştırma adımı gerekmektedir [4].



Şekil 2.6 Salting-out yöntemi ile nanopartikül sentezi [100]

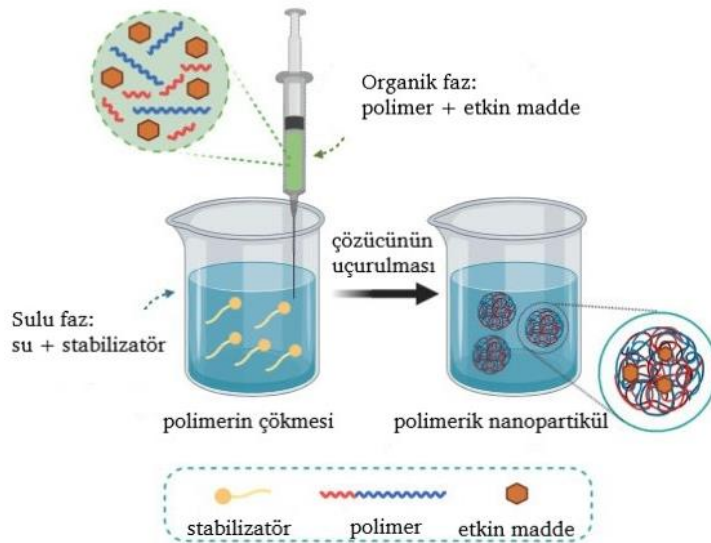
#### 2.7.4 Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Nanopartikül sentezindeki diğer metodlarda kullanılan solventler olmaksızın, çevre dostu solventler olarak bilinen süperkritik sıvıları kullanarak yüksek saflıkta nanopartikül sentezlemeye olanak sağlayan bir yeni ve teknolojik yöntemdir [101]. Süperkritik akışkanlar kritik noktanın üzerindeki basınç ve sıcaklıkta bulunan ve fizikokimyasal özellikleri genellikle sıvılar ve gazların özellikleri arasında yer alan maddelerdir. Gazlar gibi yayılır ve sıvılar gibi maddeleri çözer. Karbondioksit kritik nokta koşullarının uygun olması ( $T_c = 31.1$  °C,  $P_c = 73.8$  bar), toksik özellik göstermemesi ve maliyetinin uygun olması nedeni ile sıklıkla kullanılan süperkritik akışkandır [102]. Nanopartikül sentezi süperkritik akışkanların ani genişmesi (RESS) ve süperkritik akışkanların sıvı çözücü içerisinde ani genişmesi (RESOLV) temel yöntemlerinde dayanmaktadır. Geleneksel yöntemlerde çözücü uzaklaştırma gereksinimine bu teknolojiye ihtiyaç duyulmaması ve büyük ölçekte nanopartikül sentezine olanak sağlaması diğer yöntemlere kıyasla en büyük avantajlarıdır ancak özel olarak tasarlanmış teknolojik ekipman kullanımını gerektiren maliyetli bir yöntemdir [76].

#### 2.7.5 Nanoçöktürme

Nanoçöktürme yöntemi diğer adı ile çözücü yer değiştirme yöntemi olarak bilinmektedir. 1989 yılında Fessi ve arkadaşları tarafından keşfedilmiş ve patentlenmiştir [103]. Polimer ve etkin maddenin çözüldüğü organik faz ve çözünmediği sulu faz olmak üzere iki faza ihtiyaç duyulmaktadır. Sulu faz olarak yalnızca su, su ve stabilizatör ya da tampon çözeltiler kullanılabilirler. Stabilizatör kullanımı nanopartikül oluşumu için gerekli değildir, ancak istenildiğinde agregasyonu önlemek için kullanılabilir [104]. Organik faz tek bir çözücünden oluşabileceği gibi eğer etkin madde ve polimerin çözücüsü farklı ise birden fazla çözücünden de meydana gelebilir. Organik fazın ana özelliği suyla karışabilen aseton, etanol, asetonitril, tetrahidrafuran gibi çözücülerden oluşmasıdır [90]. Organik faz birden fazla çözücünden meydana geldiğinde çözücülerin de birbirine karışabiliyor olması gerekmektedir. Organik faz içerisinde çözünen polimer ve etkin maddenin karıştırma işlemi esnasında yavaşça sulu faza ilave edilmesiyle organik faz sulu faz ile karışır ve polimerle etkin maddenin sulu

faza difüzyonu sonucunda çökmeleriyle etkin maddenin enkapsülasyonu ile sonuçlanan nanotaşıyıcı sistem oluşur [105]. Polimer ve etkin maddenin organik çözücünden suya geçişi Marangoni etkisi olarak bilinen fazlar arasındaki yüzey gerilimi gradyanı sonucu kütle aktarımı gerçekleşmesinin bir sonucudur. Nanoçöktürme yönteminde yüzey gerilimi gradyanı çözünen madde konsantrasyonu ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır [106]. Çözücünün uçurulması karıştırma esnasında oda sıcaklığında ya da rotary evaporatör kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Sulu fazın içerisinde süspansiyon halinde bulunan nanopartiküller liyofilize edilerek ya da ultrasantrifüj ile sulu fazdan arındırılmaktadır [107]. Nanoçöktürme yönteminde sentezi etkileyen parametreler karıştırma hızı, organik fazın sulu faza ilave edilme hızı, organik fazın sulu faza oranı ve etkin maddenin polimere oranıdır. [108]. Bu parametreler nanopartiküllerin boyut, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi gibi fizikokimyasal özelliklerini belirlemede önemli rol oynamaktadırlar. Bunun yanında etkin maddenin doğası ve konsantrasyonu da oluşan nanopartiküllerin özelliklerini belirleyen en önemli etmenlerdendir [109]. Nanoçöktürme yöntemi homojenizasyon ve ultrasonikasyon uygulamalarını gerektirmez, gerçekleştirilmesi kolay ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Blok kopolimerlerin kullanılmasıyla oluşturulan ve hidrofobik etkin maddenin enkapsülasyonuna olanak sağlayan misel yapıda nanotaşıyıcıların sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır [105].



**Şekil 2.7** Nanoçöktürme yöntemi ile polimerik nanopartikül sentezi [4]

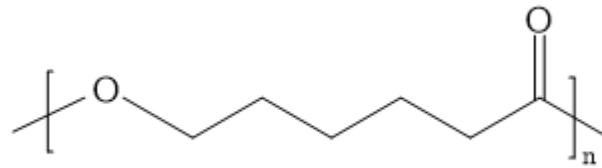
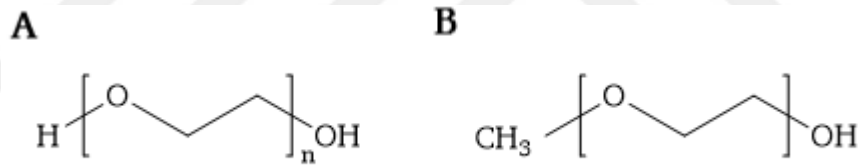
## 2.8 PEG ve PCL Polimerlerinin Nanotaşıyıcı Sistemlerde Kullanımı

Polikaprolakton (PCL) düşük degradasyon hızı sebebiyle uzun süreli ilaç salımında tercih edilen bir polimerik taşıyıcıdır. PCL'nin diğer avantajı ise birçok ilaçla uyumluluk göstermesi, özellikle hidrofobik yapısından dolayı lipofilik ilaçlar için taşıyıcı matriksinde homojen bir dağılım sağlamasıdır [8]. Bu özellikleri sebebiyle birçok farklı ilacın taşınmasında kullanılmıştır; (a) hidrofilik ilaçlar olan vankomisin [110], doksisisiklin [111], tekrasiklin [112] ve karboplatin [113]; (b) hidrofobik ilaçlar olan kurkumin [114], ibuprofen ve indometazin [115], deksametazon [116], paklitaksel [117] ve kannabinoid [118] ile (c) amfifilik ilaç olan amiodaron [119] bunlardan bazılarıdır. Ancak PCL farmasötik ve tıp alanlarında sıklıkla araştırma konusu olmakla birlikte, yüksek kristalinite ve hidrofobisiteye sahip olması, düşük degradasyon hızı ve bazı ilaç uygulamalarındaki düşük salım profili kullanımını kısıtlanmaktadır [120]. Bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için kopolimer, kompozit ya da yüzey modifikasyonları uygulanmış formlarda kullanılmaktadır. PCL'nin hidrofilik polimerlerle birlikte amfifilik kopolimer şeklinde kullanılarak nanotaşıyıcı sistemlerin elde edilmesi ile vücut sıvısındaki stabilitesi ve degradasyon hızı artmakta bunun sonucunda salım profili ve biyoyumluluk özellikleri iyileşmektedir. İbuprofen yüklü PLA-PCL [121], losartan yüklü PEO-PCL [122], paklitaksel yüklü PEO-PCL [123], paklitaksel yüklü PEG-PCL [124] ve chrysin yüklü PCL-PEG-PCL [125] bu çalışmalara örnek gösterilebilir.

Polietilen glikol (PEG), sıklıkla kullanılan iyonik olmayan hidrofilik özellikle bir polimerdir [7]. Protein yüzeyine PEG bağlanması ile gerçekleştirilen ilk araştırmalar 1977 yılına aittir. Bu araştırmalar PEGlenmiş albumin ve katalaz enzimi üzerine yapılmış olup albuminin immünojenik özellik göstermediği ve katalaz enziminin aktivitesini koruyarak kanda dolaşım süresinin 12 saatten 48 saate kadar çıkmış olduğunu göstermektedir [126], [127]. İlaç taşıyıcının bağışıklık sistemi tarafından hızlı bir şekilde tanınmasının ve vücuttan atılmasının engellenmesi, vücutta etki göstermesi gereken bölge dışında istenmeyen etkileşimlerin engellenmesi ve suda çözünürlüğünün artırılması için PEG sıklıkla kullanılmaktadır [7]. Hidrofilik özelliği sayesinde retiküloendotelial sistemin (RES) fagositozundan kaçınabilmektedir. Nanopartikülün dış yüzeyini oluşturarak

kabuk görevi görmekte ve proteinlerinin yüzeye adsorpsiyonunu azaltarak etkin maddenin zarar görmeden etki alanına ulaşmasına ve kontrollü salımına yardımcı olmaktadır [128]. Bu doğrultuda PCL nanopartiküllerine PEG ile yüzey modifikasyonu yapıldığında veya doğrudan PEG-PCL kopolimeri ile nanopartiküller sentezlendiğinde daha biyouyumlu özellikte nanotaşıyıcı sistemler elde edilebilmektedir. Polietilen glikol (PEG) ve Polikaprolakton (PCL) biyouyumlu ve biyobozunur özellikte polimerler olup ilaç taşıma sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Miseller diblok ya da triblok kopolimerlerden sentezlenebilmektedirler. Triblok kopolimer sentezlenirken PEG kullanılmakta olup diblok kopolimer sentezlenirken ise PCL'nin yalnızca bir uçtan bağlanarak diblok yapıyı oluşturması için PEG'in bir ucunda OH yerine metil grubu bulunan metoksi polietilen glikol (mPEG) kullanılmaktadır. mPEG, PEG ve PCL'nin kimyasal yapıları Şekil 2.8 ve 2.9'da verilmiştir. Tez kapsamında mPEG kullanılması ile diblok kopolimer sentezlenmiştir.

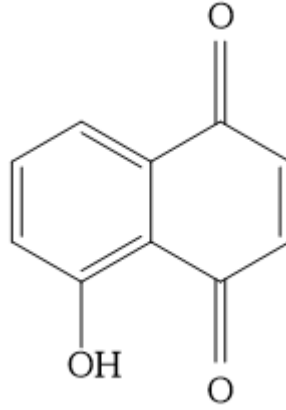


mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri hidrofobik PCL blokları ve hidrofilik PEG bloklarından oluşan amfifilik bir polimerdir. Amfifilik polimerler sulu ortamda kendiliğinden misel yapıyı oluştururlar. Hidrofobik PCL bloğu sudaki çözünürlüğü düşük olan etkin maddeyi enkapsüle ederek çekirdek kısmı oluşturken, hidrofilik



üzerinde de etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Bu etkilerin anlaşılmasıyla ve juglonun teröpatik amaçla kullanım imkanı bulunabilmesi için çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda juglonun; antioksidan [136], [137], antikanser [138]–[141], antiviral [142], antibakteriyel [143], [144] ve antifungal [145], [146] etkinliği olduğu bilinmektedir.

Juglonun doğal kaynaklı bir bileşen olması teröpatik amaçlı kullanımında tercih sebebidir ancak hidrofobik karakteri sebebiyle çözünürlüğünün az olması biyoyararlanımını azaltarak kullanımını kısıtlamaktadır. Nanotaşıyıcı sistemlerle birlikte kullanılması ile bu kısıtların önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Tez kapsamında juglonun PEG-*b*-PCL misellerine enkapsüle edilerek suda çözünürlüğünün iyileştirilerek biyoyararlanımının artırılması hedeflenmiştir.



**Şekil 2.11** Juglon (5-hidroksi-1,4 naftokinon)

### 3.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1** Kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
$\epsilon$ -kaprolakton	Polimer sentezi
Poli(etilen glikol) metil eter (Mn 5.000 Da)	Polimer sentezi
Kalay oktoat (Sn(Oct <sub>2</sub> ))	Polimer sentezi
Kloroform	Polimer saflaştırma
Dietil eter	Polimer saflaştırma
Piren	Kritik misel konsantrasyonu tayini
Juglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon)	Nanopartikül sentezi
Polikaprolakton (Mn 80.000 Da)	Nanopartikül sentezi
Aseton	Nanopartikül sentezi
Tetrahidrafuran (THF)	Nanopartikül sentezi
Sodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Fosfat tamponu hazırlanması
Sodyum hidrojen fosfat heptahidrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Fosfat tamponu hazırlanması
Sodyum klorür (NaCl)	Fosfat tamponu hazırlanması
Potato dekstroz agar (PDA)	Antifungal çalışmalarda besi yeri
Sabouraud dekstroz agar (SDA)	Antifungal çalışmalarda besi yeri

### 3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar kullanım amaçları ile Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.2** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz/ Ekipman	Kullanım Amacı
Hassas Terazi (Sartorius CP22D)	Gerekli kimyasalların, sentezlenen polimer ve nanopartiküllerin tartılması
Mikrodalga Sentez Cihazı (MicroSYNTH Milestone)	Polimer sentezi
Vakum Etüvü (Binder)	Polimerin kurutulması
Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) (Viskotek GPCmax)	Polimerin karakterizasyonu
Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) (Mercury- VX 400 BB)	Polimerin karakterizasyonu
Floresans Spektrofotometre (QuantaMaster)	Polimerin karakterizasyonu
Vorteks (Heidolph)	Örneklerin karıştırılması ve çözünmesi
Ultrasonik Su Banyosu (Bandelin sonorex)	Örneklerin karıştırılması ve çözünmesi
Ultra Saf Su Cihazı (Milipore-Q)	Çalışmalarda kullanılan saf suyun sağlanması
Çoklu Manyetik Karıştırıcı (IKA)	Nanopartiküllerin üretilmesi
Zetasizer NanoZS	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
Liyofilizatör (Heto Drywinner)	Nanopartiküllerin kurutulması
pH Metre (HANNA HI 2211)	Fosfat tamponu hazırlanması
Çalkalamalı Su Banyosu (N-Biotek)	Nanopartiküllerin salım çalışması

**Tablo 3.2** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devamı)

Santrifüj (Hettich EBA-20)	Nanopartiküllerin salım çalışması
UV-Vis Spektrofotometresi (Shimadzu UV-1700)	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
ATR Aparatlı FT-IR Spektrofotometresi (Shimadzu Prestige 2100)	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
Polikristal XRD Cihazı (PANalytical X'Pert PRO)	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
Atomik Kuvvet Mikroskobu (Shimadzu SPM 9600)	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
Taramalı Elektron Mikroskobu (FEI QUANTA 450 FEG)	Nanopartiküllerin karakterizasyonu
Steril Kabin (SafeFast Classic 212)	Antifungal aktivite çalışmalarının gerçekleştirilmesi
Otoklav (Hirayama HV50-L)	Besi yeri ve kullanılacak araç geçerlerin sterilizasyonu
Çalkalamalı İnkübatör (Biosan ES-20)	Kültürün hazırlanması

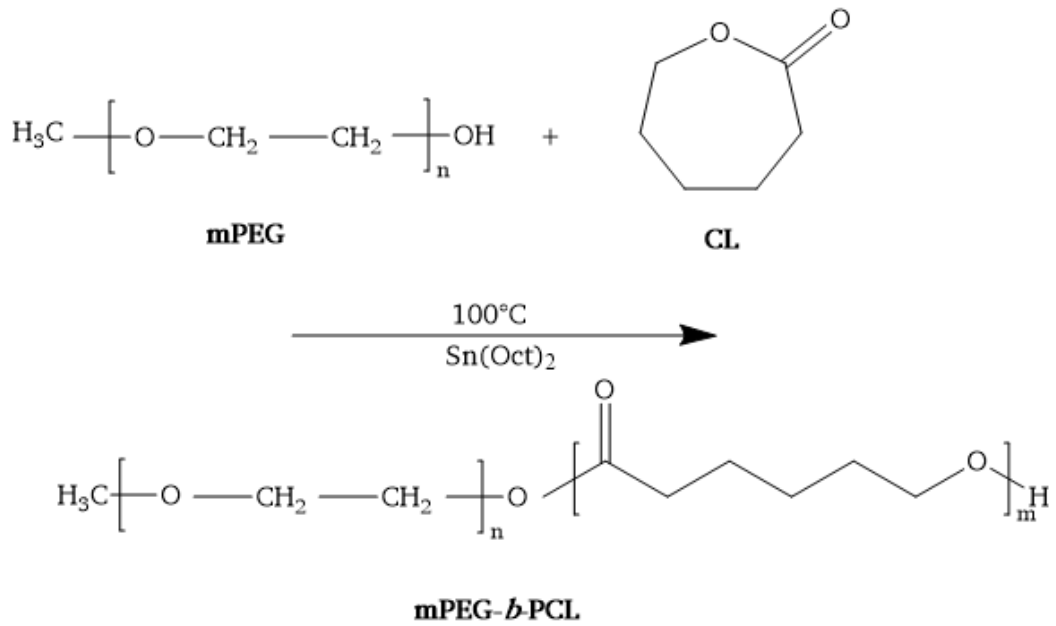
### 3.3 Deneysel Yöntemler

Deneysel yöntemler polimer sentezi ve karakterizasyonu, nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu ve antifungal aktiviteden oluşmaktadır. Tez kapsamında yürütülen deneysel çalışmalar detaylı olarak başlıklar halinde açıklanmıştır.

#### 3.3.1 mPEG-*b*-PCL Diblok Kopolimerinin Sentezlenmesi

PEG-*b*-PCL kopolimeri Milestone MicroSYNTH mikrodalga sentez ünitesinde, kalay oktoat ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) katalizörlüğünde  $\epsilon$ -kaprolaktonun başlatıcı olan mPEG'e halka açılması polimerizasyonu ile katılması sonucu elde edilmiştir [147]. Sentez için 2 gram mPEG tartılarak cam reaksiyon tüpüne alınmış üzerine 4 mL  $\epsilon$ -kaprolakton (d: 1,03 g/mL, %97) ve 177  $\mu\text{L}$   $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  ilave edilmiştir. Manyetik

karıştırıcı ile ilave edilen kimyasalların karışması sağlanırken aynı zamanda reaksiyon tüpünden azot gazı geçirilerek sentez için inert ortam oluşması sağlanmıştır. Sentez için uygun koşullar sağlandıktan sonra reaksiyon tüpü mikrodalga sentez ünitesine yerleştirilmiş ve cihaz maksimum 300 W'a ayarlanarak 100 °C'de 30 dakika boyunca sentez gerçekleştirilmiştir. Sentez tamamlandıktan sonra 10 dakikalık soğuma adımı gerçekleştirilerek reaksiyon tüpünün içinde katı halde polimer elde edilmiştir. Sonrasında tüpün üzerine 4 mL kloroform eklenerek polimerin tamamen çözünmesi sağlanmış, 50 mL'lik falkon tüplere aktarılarak çeker ocak altında üzerlerine 40-45 mL soğuk dietil eter eklenmiş ve polimer çöktürülmüştür. 5000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirilmiş üst faz dekante edilerek uzaklaştırılmıştır. Falkonda kalan pelletlerin üzerine yeniden 40-45 mL soğuk dietil eter eklenmiş ve vorteks ile pelletlerin dağılması sağlandıktan sonra tekrar aynı koşullar altında santrifüj gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmış ve böylece katalizör ve tepkimeye girmeden kalan monomerler uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi sonrası mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri saf olarak elde edilmiştir. Falkon tüplerin içinde pellet halinde bulunan polimerler, falkonların ağzı alüminyum folyo ile kapatılıp delikler açıldıktan sonra çeker ocak içerisinde 2 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır.



**Şekil 3.1** Halka açılması polimerizasyonu ile mPEG-*b*-PCL sentezi şematik gösterimi

### 3.3.2 Polimer Sentezi için Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Kurutma işlemi sonrasında sentezlenen polimerin ağırlığı hassas terazi ile ölçülerek kaydedilmiştir. Reaksiyon verimi (% RV) eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\% RV = \frac{\text{Sentezlenen polimer miktarı(mg)}}{\text{Başlangıçta eklenen mPEG(mg)+ε-kaprolakton miktarı(mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.3.3 Polimerin FT-IR Spektroskopisi ile Analizi

Polimerizasyonun gerçekleştiğini doğrulamak amacı ile başlatıcı olan mPEG ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL polimerinin kimyasal yapısı ATR aparatlı Shimadzu Prestige 2100 FT-IR spektrofotometresi ile analiz edilmiş. 600 cm<sup>-1</sup> ile 4000 cm<sup>-1</sup> aralığında FT-IR spektrumları alınmıştır [147].

### 3.3.4 Polimerin <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi ile Analizi

Polimerin kimyasal yapısı çözücü olarak döterokloroform (CDCl<sub>3</sub>) kullanılarak Mercury-VX 400 MHz BB proton NMR (<sup>1</sup>H-NMR) spektrofotometresi ile analiz edilmiştir [148].

### 3.3.5 Polimerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Analizi

Polimerin moleküler ağırlık tayini Malvern GPCMax jel geçirgenlik kromatografisinin kullanılması ile gerçekleştirilmiştir [147]. Çözücü olarak THF kullanılan analizde akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Refraktif indeks dedektöründen (RID) elde edilen analiz sonucunda polimerin sayıca ortalama molekül ağırlığı (M<sub>n</sub>), ağırlıkça ortalama moleküler ağırlığı (M<sub>w</sub>) ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri tespit edilmiştir.

### 3.3.6 Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC) Tayini

mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri ve PCL homopolimer karışımının misel oluşturabildiği en düşük konsantrasyon olan kritik misel konsantrasyonu hidrofobik ve floresans özellikte bir molekül olan pirenin prob olarak kullanılmasıyla belirlenmiştir [149]. 1x10<sup>-5</sup> g/L ile 1 g/L arasında değişen konsantrasyonlarda polimer çözeltileri hazırlanmış ve konsantrasyonu 6x10<sup>-7</sup> M

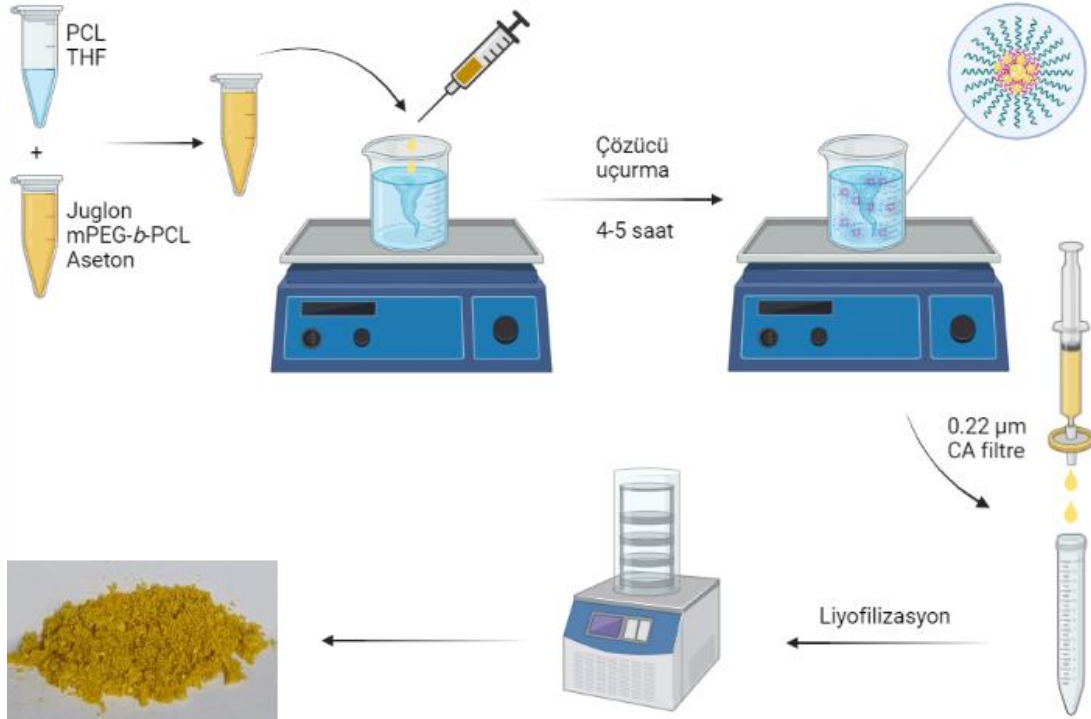
olarak sabit tutulan piren ile birlikte organik çözücü olan asetonda çözüldükten sonra sulu faz üzerine damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen sistemler manyetik karıştırıcı üzerinde gece boyu karışması ve dengeye gelmesi için bırakılmıştır. Pirenin etkilenmemesi için reaksiyonun gerçekleştirildiği cam şişeler alüminyum folyo ile sarılmıştır. 18 saat sonra örnekler uyarma (eksitasyon) dalga boyunun 300-360 nm ve soğurma (emisyon) dalga boyu 390 nm olacak şekilde floresans spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Pirenin 338 ve 333 nm'de floresans şiddetlerinin oranı ( $I_{338}/I_{333}$ ) belirlenmiştir. Bu oranlar polimer konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kritik misel konsantrasyonu (CMC) bulunmuştur.

### 3.3.7 Nanoçöktürme Yöntemi ile Misel Sentezi

Misel sentezi nanoçöktürme metodu ile gerçekleştirilmiştir [150]. Nanoçöktürme metodunda polimer ve etkin maddeyi çözebilen aynı zamanda su ile karışabilen organik çözücü ya da çözücülere ihtiyaç duyulmaktadır. Çözücü olarak hem polimeri hem de etkin madde olan juglonu çözebilmesi ve uçucu özelliği sayesinde oda sıcaklığında uçurma işlemi sonucunda kolaylıkla sentez ortamından uzaklaştırılabilmesi sebebiyle aseton seçilmiştir. Misel oluşumu organik faz içerisinde çözülmüş polimer ve etkin maddenin manyetik karıştırıcı üzerindeki sulu faza enjektör yardımı ile damla damla ilave edilmesi sonucu organik fazın (THF-aseton) suyla karışması sonucu etkin madde ve polimerin çökmeleri ve bu esnada hidrofobik etkin maddenin hidrofobik PCL bloklarından oluşan çekirdeğe enkapsülasyonu ve çekirdeğin etrafında hidrofilik PEG blokları tarafından kabuk kısmının oluşması ile kendiliğinden gerçekleşmektedir. Sulu faz yalnızca distile sudan meydana gelmiştir. Herhangi bir stabilizatör kullanılmamıştır.

Misel sentezi optimize edilen homopolimer/kopolimer ve etkin madde/polimer karışım oranlarının korunmasıyla 30 mL ölçeğinde 5 paralel sentez şeklinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle PCL (Mn 80.000 Da) pelleti THF içerisinde çözülerek 10 mg/mL'lik homopolimer stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 90 µL alınmasıyla 0,90 mg PCL, 2910 µL aseton içerisinde çözülmüş 29,10 mg mPEG-*b*-PCL ve 4,50 mg juglonun üzerine ilave edilmiştir. Karışım vortekslenerek homojen hale getirilmiş ve böylece homopolimer, kopolimer ve juglonun

çözünmesi sağlanmıştır. İçerisinde 30 mg polimer karışım ve 4,5 mg juglon olan bu 3 mL'lik organik faz manyetik karıştırıcı üzerindeki 30 mL'lik sulu faza enjektör yardımı ile damla damla ilave edilmiştir. Asetonun su ile karışması sonucunda juglon ve polimerin su fazına geçerek çökmesiyle polimerin kendiliğinden misel yapıyı oluşturması ve hidrofobik özellik gösteren juglonun misel çekirdeğine enkapsüle olması ile juglon yüklü PEG-*b*-PCL miselleri sentezlenmiştir. Sentezin tamamlanması ve organik fazın uçurulması için 4-5 saat oda sıcaklığında karışması sağlanmıştır. Sentez sonucunda elde edilen misel süspansiyonu 0.22 µm'lik selüloz asetat (CA) enjektör ucu filtreden geçirilerek enkapsüle olmayan juglon uzaklaştırılmış ve elde edilen misel süspansiyonu liyofilize edilerek -20° C'de saklanmıştır. Boş misel sentezinde ise etkin madde olmadan yalnızca mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri ve PCL homopolimeri kullanılarak sentez gerçekleştirilmiş, liyofilize edilerek -20 °C'de saklanmıştır.



**Şekil 3.2** Nanoçöktürme yöntemi ile juglon yüklü PEG-*b*-PCL misellerinin sentezinin şematik gösterimi

### 3.3.8 Nanoçöktürme ile Misel Sentezi için Sentez Parametrelerinin Optimizasyonu

Misel sentezi etkin madde ve polimerin su ile karışan bir organik çözücünde çözünmesi ve sulu faza damlatılması ile kendiliğinden misel yapıyı oluşturması sonucu gerçekleşmektedir. Sentezi etkileyen parametrelerden biri organik fazın sulu faza oranıdır. Organik faz sulu faz ile tamamen karışabiliyor olmalı, sentez sonrasında oda sıcaklığında uçurulacağı için yüksek hacimde olmamalı ancak polimer ve etkin maddeyi çözmek için yeterli miktarda olmalıdır. Yapılan literatür araştırmaları sonucu organik faz/sulu faz oranı hacimce 1:10, polimerin sulu faz içerisindeki konsantrasyonu ise 1 mg/mL olarak belirlenmiştir.

#### 3.3.8.1 Etkin Madde/Kopolimer Oranının Optimizasyonu

Tez çalışması kapsamında öncelikli olarak kopolimer ile sentez çalışmalarını gerçekleştirmek üzere etkin madde kopolimer oranı optimizasyon çalışması yapılmıştır. Sentezde kullanılacak etkin madde kopolimer oranının belirlenmesi için öncelikle kopolimer (mPEG-*b*-PCL) miktarı sabit tutularak, değişen juglon miktarları ile sentezler gerçekleştirilmiş, elde edilen misellerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri analiz edilmiştir. Optimizasyonda kullanılan etkin madde ve kopolimer miktarları Tablo 3.3'te verilmiştir.

**Tablo 3.3** Etkin madde/kopolimer oranının optimize edilmesinde kullanılan madde miktarları

Etkin madde (mg)	Kopolimer (mg)
0	5
1	5
1,25	5
1,75	5

Kopolimerle gerçekleştirilen boş ve juglon yüklü misel sentezlerinin boyut ve PDI değerlerinin istenilen aralıkta olmaması nedeni ile sentez modifiye edilmiş ve homopolimer (PCL (Mn 80.000 Da)) kullanılarak homopolimer-kopolimer karışım (blend) oluşturularak misel sentezi tekrar gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.8.2 Homopolimer/Kopolimer Oranının Optimizasyonu

Homopolimer/kopolimer oranının belirlenmesi için polimerler farklı oranlarda karıştırılarak boş miseller sentezlenmiş, boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri analiz edilerek en uygun polimer karışım oranı belirlenmiştir. Optimizasyonda kullanılan homopolimer ve kopolimer miktarları Tablo 3.4'te verilmiştir.

**Tablo 3.4** Homopolimer/kopolimer oranının optimize edilmesinde kullanılan madde miktarları

Homopolimer (mg)	Kopolimer (mg)
0	5
0,05	4,95
0,15	4,85
0,25	4,75
0,50	4,50
1	4
2	3

Boyut, PDI ve zeta potansiyel sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda optimum polimer karışım içeriği (homopolimer /kopolimer oranı) belirlenmiştir.

### 3.3.8.3 Etkin Madde/Polimer Karışım Oranının Optimizasyonu

Etkin madde/polimer karışım oranının belirlenmesi için seçilen homopolimer/kopolimer oranı ve farklı miktarlarda juglon kullanılarak juglon yüklü miseller sentezlenmiştir. Optimizasyonda kullanılan etkin madde polimer karışım miktarları Tablo 3.5'te verilmiştir.

**Tablo 3.5** Etkin madde/polimer karışım oranının optimize edilmesinde kullanılan madde miktarları

Etkin madde (mg)	Polimer karışım (mg)
0,5	5
0,75	5
0,85	5
1	5

Sentezlenen misellerin boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri, reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesinin hesaplanması ve sonuçlarının değerlendirilmesiyle optimum etkin madde-polimer karışım oranı belirlenmiştir.

### 3.3.8.4 Ölçek Büyütme

Optimize edilen homopolimer kopolimer oranı ve etkin madde polimer karışım oranını koruyarak 5, 10, 20, 30 ve 50 mL hacimlerde misel sentezi gerçekleştirilerek ölçek büyütme çalışması yapılmıştır.

### 3.3.9 Nanoçöktürme için Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Liyofilize edilen misellerin ağırlığı hassas terazi ile ölçülerek kaydedilmiş, reaksiyon verimi (% RV) eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır.

$$\%RV = \frac{\text{Üretilen misellerin miktarı(mg)}}{\text{Başlangıçta eklenen kopolimer(mg)+homopolimer(mg)+juglon miktarı(mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.3.10 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Juglon yüklü PEG-*b*-PCL misellerinin enkapsülasyon etkinliğini (% EE) direkt yöntem ile hesaplanmıştır [151]. Bu amaçla; liyofilize edilmiş misellerden 1 mg alınarak 1 mL aseton içinde çözülmüş ve misel yapının bozulması sağlanmıştır. Serbest hale geçen juglon moleküllerinin miktarı UV-Vis spektrofotometre ile 424 nm'de absorbans ölçülerek tayin edilmiştir [152]. Bilinen konsantrasyonlarda juglonun asetonda çözülmesi ve UV-Vis spektrofotometre ile 424 nm'de analiz edilmesiyle oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımı ile misellere enkapsüle edilen juglon miktarı hesaplandıktan sonra eşitlik 3.3 kullanılarak % EE hesaplanmıştır.

$$\% EE = \frac{\text{Misel içerisine enkapsüle edilmiş juglon miktarı(mg)}}{\text{Başlangıçta eklenen juglon miktarı(mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

### 3.3.11 Etkin Madde Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Etkin madde yükleme kapasitesi (%YK) enkapsülasyon etkinliğinde hesaplanan enkapsüle edilmiş etken madde miktarı ile liyofilize edilip kurutulan misellerin ağırlığı kullanılarak Eşitlik 3.4 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ YK} = \frac{\text{Misel içerisine enkapsüle edilmiş juglon miktarı(mg)}}{\text{Toplam misel miktarı(mg)}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.3.12 Boyut ve Polidispersite İndeksi (PDI)

Misellerin boyut ve polidispersite indeksi (PDI) değeri, dinamik ışık saçılımı metodunu (DLS) kullanan Zetasizer (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, UK) cihazıyla tespit edilmiştir [148]. DLS metodu seyreltik çözeltiler içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin değişiminin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Sentez tamamlandıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilen misel süspansiyonundan 1,5 mL alınarak plastik boyut ölçüm küvetine konulmuş ve 3 tekrarlı ölçüm gerçekleştirilmiştir. Sonuçların ortalaması alınarak boyut (nm) ve PDI değerleri standart sapmalarıyla belirlenmiştir.

### 3.3.13 Yüzey Yükü ve Potansiyeli

Misellerin zeta potansiyel değeri, Zetasizer (Zetasizer Nano ZS90, Malvern, UK) cihazında elektroforetik ışık saçılması metodu (ELS) ile gerçekleştirilmiştir [132]. ELS metodu değişen elektrik alan altında moleküllerin hareket etmesi temeline dayanmaktadır. Sentez tamamlandıktan sonra 0.22 µm'lik filtreden geçirilen misel süspansiyonundan 750 µL alınarak altın elektrodlu kapiler küvete konulmuş ve 3 tekrarlı ölçüm gerçekleştirilmiştir. Sonuçların ortalaması alınarak zeta potansiyel (mV) değeri standart sapmalarıyla belirlenmiştir.

### 3.3.14 FT-IR Spektroskopisi ile Analiz

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR), etkin madde ve nanotaşıyıcı arasında meydana gelen etkileşimleri tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Genellikle etkin madde ve polimer arasındaki etkileşim, fonksiyonel grupların sebep olduğu bant kaymaları ve IR spektrumlarında meydana gelen değişimler ile tespit edilmektedir [153]. Nanotaşıyıcı ve etkin madde arasında etkileşimin belirlenip, enkapsülasyonun gerçekleştiğinin doğrulanması amacıyla; liyofilizasyon sonrasında toz haldeki boş PEG-*b*-PCL miselleri, serbest juglon ve juglon yüklü PEG-*b*-PCL misellerinin FT-IR spekturumları ATR modunda Shimadzu Prestige 2100 spektrofotometre ile 600 cm<sup>-1</sup> ile 4000 cm<sup>-1</sup> aralığında alınmıştır.

### 3.3.15 X-Işınları Difraktometresi (XRD) ile Analiz

XRD analizi ile serbest juglon, boş PEG-*b*-PCL miselleri ve juglon yüklü PEG-*b*-PCL misellerinin kristal yapıları tayin edilmiştir [154]. Analiz toz haldeki numunelerin kullanılmasıyla 5° ile 60° (2θ) aralığında bakır anotlu X-ray Difraktometre (PANalytical X'Pert PRO) cihazı ile 45 kV, 40 mA'da gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.16 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Atomik kuvvet mikroskobu ile juglon yüklü misellerin yüzey morfolojisi incelenmiştir [155]. Analiz dinamik modda Shimadzu SPM 9600 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Toz haldeki juglon yüklü miseller suda disperse edildikten sonra enjektör yardımı ile mika diske bir damla damlatılmış, örnek açık havada kuruması için 1 saat bekletildikten sonra analiz gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.17 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile juglon yüklü miseller morfolojik olarak incelenmiş ve boyutları analiz edilmiştir. Farklı numune hazırlama teknikleri ile iki farklı SEM analizi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak Thermoscientific Quanta FEG 450 cihazının sulu numune karakterizasyonuna olanak sağlayan ESEM modunun kullanımıyla doğrudan suda süspansiyon edilen misellerin analizi yapılmıştır [156]. Diğer SEM analizi ise Thermoscientific Quattro S cihazı ile suda süspansiyon edilen misellerin örnek tutucuya yapıştırılan çift taraflı karbon bant üzerine damlatılması ve açık havada kurutulması sonrasında gerçekleştirilmiştir [157].

### 3.3.18 *In-vitro* Salım Çalışması

Juglon yüklü misellerin salım çalışması dissolüsyon metodu ile gerçekleştirilmiştir [158]. Juglonun miselden *in vitro* salımının incelenmesi amacıyla 2 mg liyofilize edilmiş juglon yüklü misel 2 mL pH 7.4 olan fosfat tamponunda (PBS) süspansiyon edilerek 37 °C'deki çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Salım başlatıldığı gün itibari ile 6 saat boyunca saatte bir, 1 hafta boyunca 24 saatte bir ve 1 ay boyunca haftada bir olmak üzere ölçüm alınmıştır. Örnek almak için 15 mL'lik falkonda salım ortamında bulunan miseller 6000 g'de 15 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve üst faz alınarak UV-Vis spektrofotometresi ile 424 nm'de analiz edilerek

belirlenen zaman aralıklarında salınan juglon miktarı önceden oluşturulan kalibrasyon eğrisi yardımı ile tayin edilmiştir. Salım ortamı her ölçümden sonra yenilenmiştir. Salım kümülatif olarak hesaplanmıştır.

### 3.3.19 Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Antifungal çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Doç. Dr. Tülin Özbek yürütücülüğünde gerçekleştirilmiştir. Juglon yüklü misellerin antifungal etkinliği agar dilüsyon metodu ile *C. albicans* (ATCC 10231), *A. flavus* (ATCC204304) ve *Fusarium spp.* (ATCC 20883) suşları üzerinde araştırılmıştır [159]. Katı besi yeri olarak 3 mikroorganizma için de Potato Dextrose Agar (PDA) kullanılmıştır. Serbest juglon, juglon yüklü misel ve polimer olmak üzere 3 ayrı örnek her mikroorganizma için iki tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. PEG-*b*-PCL polimeri mikroorganizmaların büyümesi üzerinde bir etkinliğinin olup olmadığının araştırılması için kontrol amaçlı kullanılmıştır. Öncelikli olarak misel ve polimerin en yüksek 2,5 mg/mL ve en düşük 0,078 mg/mL olacak şekilde 6 farklı konsantrasyondaki (M1-M6, P1-P6) sulu çözeltileri en yüksek konsantrasyondan başlayarak seri dilüsyon ile hazırlanmıştır. Sentezlenen misellerin ilaç yükleme kapasitesi %12,5 olduğundan ve 5. günün sonunda juglonun %67'si salındığından ilgili misel konsantrasyonlarına karşılık gelen serbest juglon çözeltileri en yüksek 0,209 mg/mL ve en düşük 0,0065 mg/mL olacak şekilde (J1-J6) seri dilüsyon ile hazırlanmıştır. Bu juglon, polimer ve misel çözeltileri otoklavlanmış 10 mL'lik sıvı PDA besi yerlerine ilave edildikten sonra vortekslenip homojen hale getirilmiş ve ilgili petrilere dökülmüştür. Stok çözeltilerin 10 mL'lik besiyerine ilavesi ile konsantrasyonların 10 kat düşmesi sonucu besi yerlerinde nihai polimer, misel ve juglon konsantrasyonları hesaplanmış ve ilgili konsantrasyonlar Tablo 3.6, 3.7 ve 3.8'de verilmiştir.

**Tablo 3.6** Besi yerlerindeki polimer konsantrasyonları

Örnek	Polimer konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )
P1	250
P2	125

**Tablo 3.6** Besi yerlerindeki polimer konsantrasyonları (devamı)

P3	62,5
P4	31,25
P5	15,63
P6	7,81

**Tablo 3.7** Besi yerlerindeki misel ve içeriğindeki juglon konsantrasyonları

Örnek	Misel konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )	Salınabilecek maksimum juglon konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )
M1	250	20,94
M2	125	10,47
M3	62,5	5,23
M4	31,25	2,62
M5	15,63	1,31
M6	7,81	0,65

**Tablo 3.8** Besi yerlerindeki serbest juglon konsantrasyonları

Örnek	Serbest juglon konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ )
J1	20,94
J2	10,47
J3	5,23
J4	2,62
J5	1,31
J6	0,65

Petriye dökülen agarlar katılaştıktan sonra mikroorganizmaların ekimi gerçekleştirilmiştir. Her mikroorganizma için 6 polimer, 6 misel ve 6 juglon için her biri 2 tekrarlı olmak üzere 36 petri ile çalışılmıştır.

*C.albicans* için gece boyu inkübe edilen sıvı ön kültürden 100'er  $\mu\text{L}$  alınarak ilgili petrilerin orta noktasına bırakılmış ve dragalski spatülüyle agar yüzeyine yayma

yapılmıştır. *A.flavus* ve *Fusarium spp.* için ise laboratuvarında bulunan mikroorganizmalara ait stok petrilerden 2x2 mm'lik agar blokları steril neşter ile kesilmiş ve polimer, misel ve juglon içeren ilgili PDA petrilerin orta noktasına bırakılmıştır. Tüm petriler 27 °C'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petriler incelenmiş antifungal ajanın fungal büyümeyi inhibe ettiği en düşük konsantrasyon olan minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve fungal büyümenin görülmediği en düşük konsantrasyon olan minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) hesaplanmıştır.



Tez çalışması polimer sentezi ve karakterizasyonu, misel sentezi ve karakterizasyonu ve antifungal aktivitenin belirlenmesi olmak üzere üç ana kısımdan oluştuğundan sonuçlar bu kapsamda başlıklara ayrılarak sunulmuştur.

## 4.1 Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu

### 4.1.1 Polimer Sentezi

mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile Sn(Oct)<sub>2</sub> katalizörlüğüne mPEG'e OH ucundan bağlanması sonucu tek yönde gerçekleşmiştir. mPEG kullanılmasının sebebi PEG'in bir ucunun metil (CH<sub>3</sub>) grubu bağlanması sonucu metoksi PEG'e dönüşmesi ve bu ucun reaksiyona kapalı olmasıdır. Bu sayede halka açılması polimerizasyonu hidroksi ucundan gerçekleşmiş ve diblok mPEG-*b*-PCL polimeri elde edilmiştir. Sentezin mikrodalga destekli gerçekleştirilmesi ile reaksiyon geleneksel yöntemlere kıyasla çok daha kısa sürede tamamlanmıştır. Reaksiyon verimi (%RV) (3.1) eşitliği kullanılarak %72 olarak hesaplanmış ve Tablo 4.1'de verilmiştir.

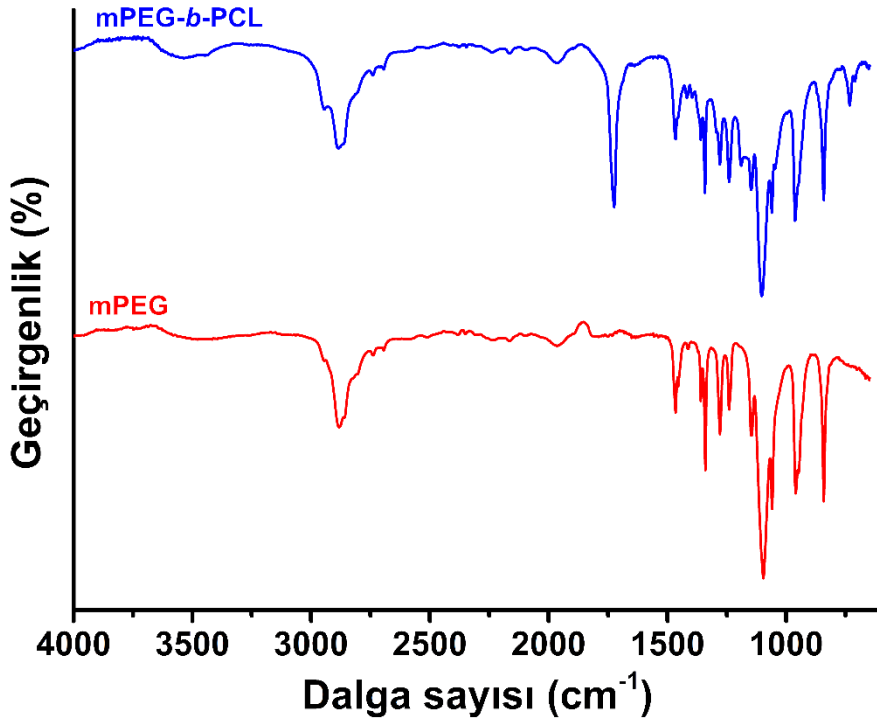
**Tablo 4.1** Polimer sentezinde reaksiyon verimi

Eklene mPEG ve $\epsilon$ -kaprolakton miktarı (mg)	Sentezlenen polimer miktarı (mg)	Reaksiyon Verimi (%)
4,054	2,920	72,03

### 4.1.2 Polimerin FT-IR Analizi

mPEG homopolimeri ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin FTIR spektroskopisi ile analizi sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin spektrumunda mPEG spektrumundan farklı olarak 1720 cm<sup>-1</sup>'de görülen şiddetli karbonil gerilmesi bandı (C=O) PCL bloğunun varlığının göstergesidir

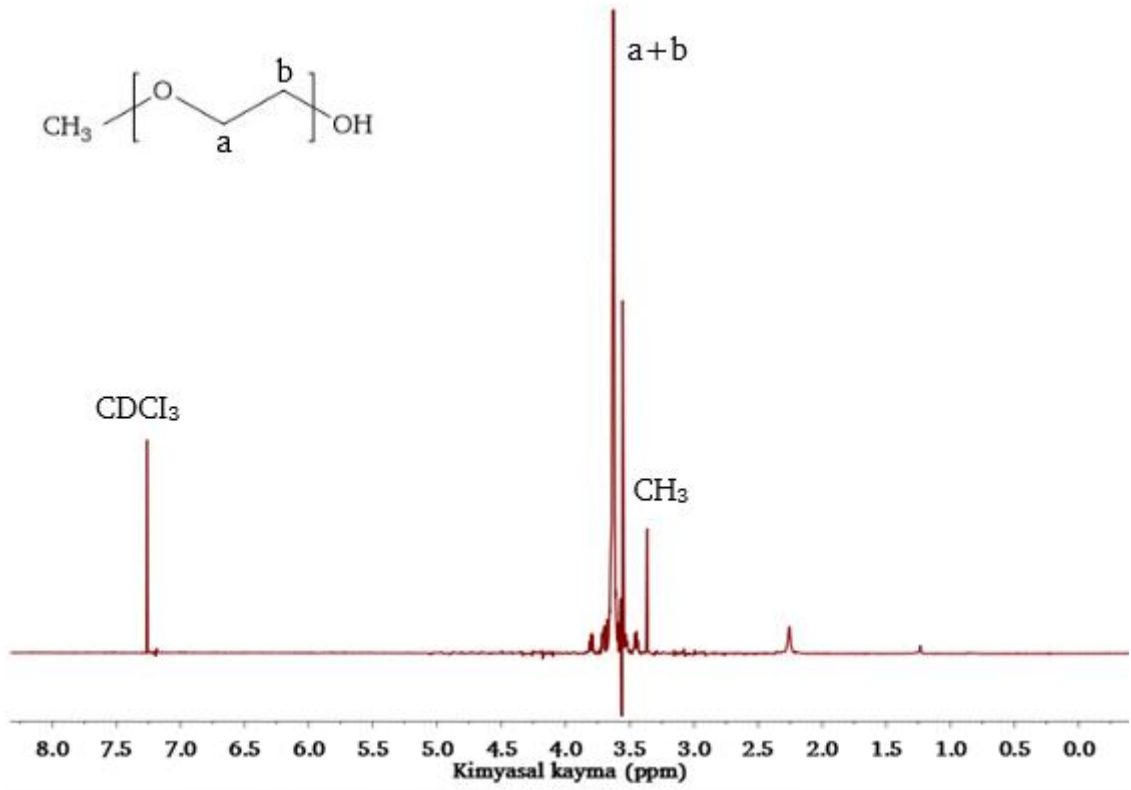
[160][147]. Bu sonuçlar mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



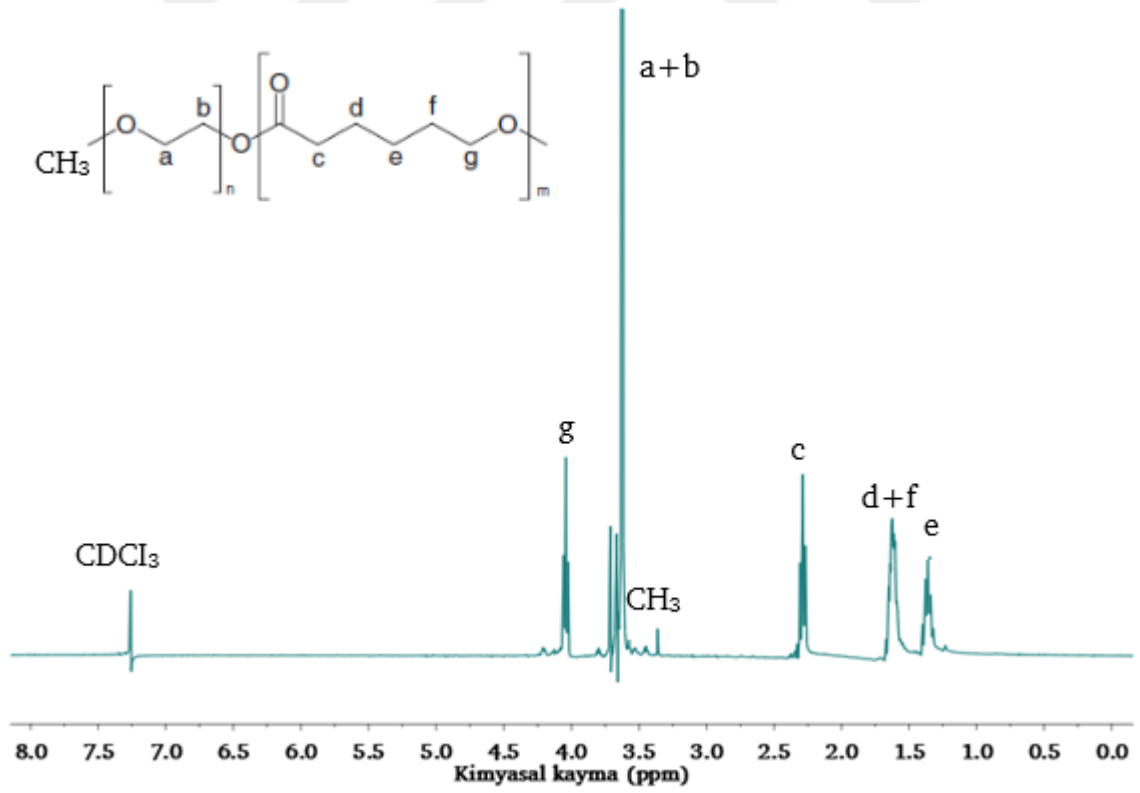
Şekil 4.1 mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerine ait FT-IR spektrumları

#### 4.1.3 Polimerin <sup>1</sup>H-NMR Analizi

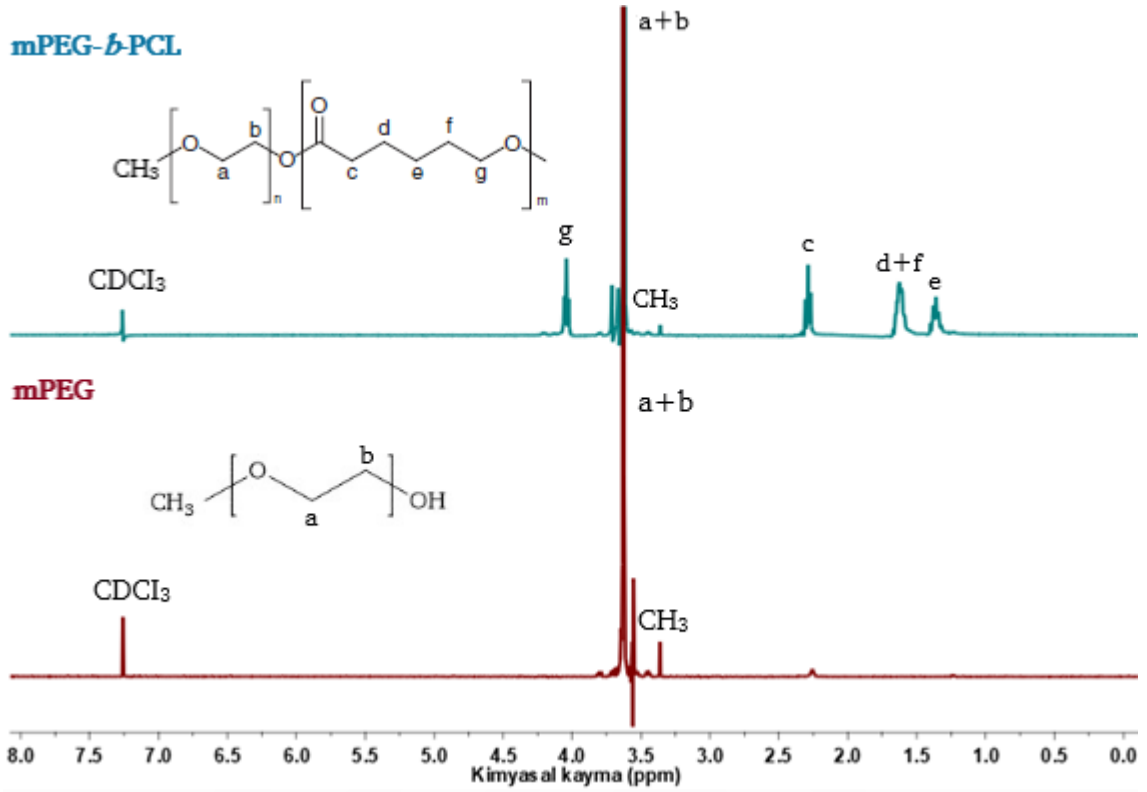
<sup>1</sup>H-NMR analizi sonucu elde edilen mPEG ve mPEG-*b*-PCL'nin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları Şekil 4.2 ve 4.3'te ayrı ayrı, Şekil 4.4'te ise karşılaştırmalı olarak verilmiştir. mPEG homopolimeri ve mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları incelendiğinde her iki spektrumda da 7.25 ppm'de çözücü CDCl<sub>3</sub> (döterokloroform) kaynaklı piklerin olduğu görülmektedir. İki spektrumda da 3,65 ppm'de görülen şiddetli pikin PEG bloktaki metilen (-CH<sub>2</sub>) protonlarına ait olduğu, mPEG homopolimerin spektrumunda görülmeyen ancak mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin spektrumunda 1,36, 1,62, 2,31 ve 4,02 ppm'de görülen piklerin ise PCL blokta bulunan metilen protonlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürde yer alan benzer kopolimer sentez çalışmaları ile benzer olup [148] [160] bu sonuç mPEG-*b*-PCL kopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.2 mPEG polimerine ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



Şekil 4.3 mPEG-*b*-PCL polimerine ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



**Şekil 4.4** mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerine ait karşılaştırmalı <sup>1</sup>H-NMR spektrumları

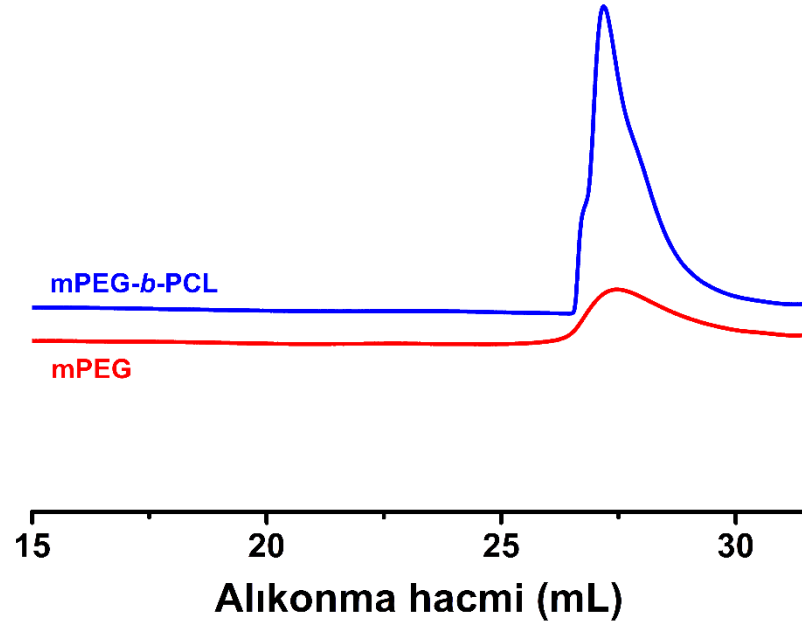
mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerinin sayıca ortalama molekül ağırlıkları ( $M_n$ ); mPEG için 3.30 ppm'deki CH<sub>3</sub> piki ile 3.65 ppm'deki pik (a+b) alanlarının oranlanması ile, mPEG-*b*-PCL için ise 4.05 ppm'de PCL bloklarına ait pik (g) ile 3.65 ppm'deki mPEG'e ait pik (a+b) alanlarının oranlanması ile hesaplanarak Tablo 4.2'de verilmiştir [161].

**Tablo 4.2** <sup>1</sup>H-NMR analizi sonucunda hesaplanan  $M_n$  değerleri

Örnek	$M_n$ (Da)
mPEG	6.358
mPEG- <i>b</i> -PCL	9.982

#### 4.1.4 Polimerin GPC Analizi

mPEG homopolimeri ve mPEG-*b*-PCL diblok kopolimerinin GPC kromatogramları Şekil 4.5'te verilmiştir.



**Şekil 4.5** mPEG ve mPEG-*b*-PCL polimerlerine ait GPC kromatogramları mPEG-*b*-PCL'ye ait kromatogram incelendiğinde tek pik görüldüğü, reaksiyona girmeyen mPEG, monomer ya da oligomere ait pik olmadığı bu da saflaştırma işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. GPC analizi sonucunda elde edilen  $M_w$ ,  $M_n$  ve  $M_w/M_n$  değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

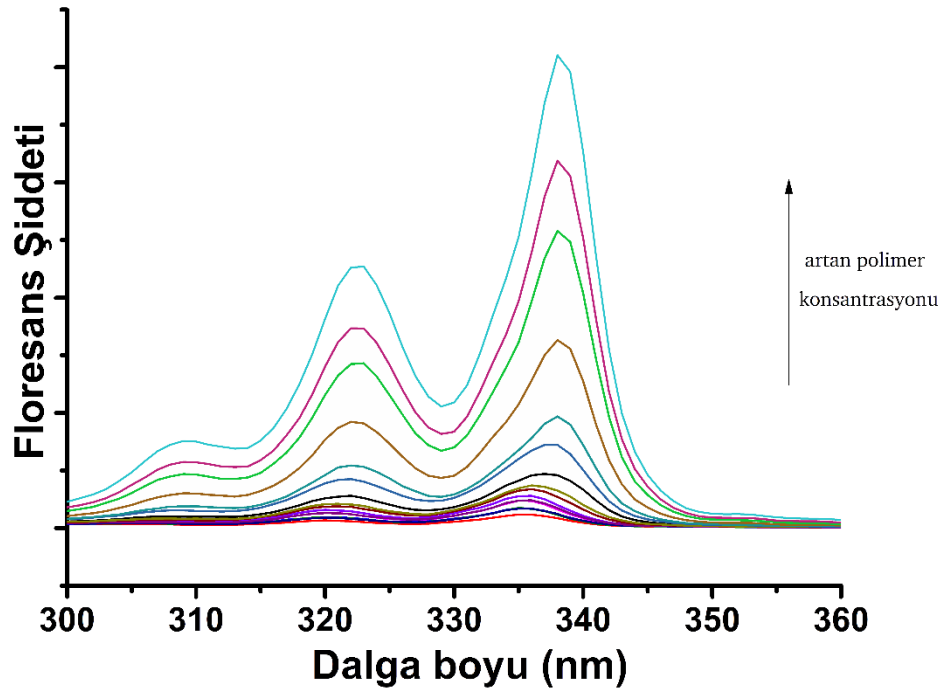
**Tablo 4.3** GPC analizi sonucu elde edilen  $M_w$ ,  $M_n$  ve  $M_w/M_n$  değerleri

Örnek	$M_w$ (Da)	$M_n$ (Da)	$M_w/M_n$
mPEG	7.395	5.308	1,393
mPEG- <i>b</i> -PCL	8.515	6.983	1,219

Tablo 4.3'e göre diblok kopolimerin  $M_n$  değeri 6.983 Da olduğu ve mPEG'in  $M_n$  değerinin 5.308 Da olduğu göz önüne alındığında sentezlenen polimerin mPEG<sub>5308</sub>-*b*-PCL<sub>1675</sub> olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen polimerin polidispersite indeksinin ( $PDI=M_w/M_n$ ) 1,219 olarak elde edilmesi zincir uzunlukları birbirine yakın olan monodispers özellikle diblok kopolimerlerin sentezlendiğini göstermektedir.

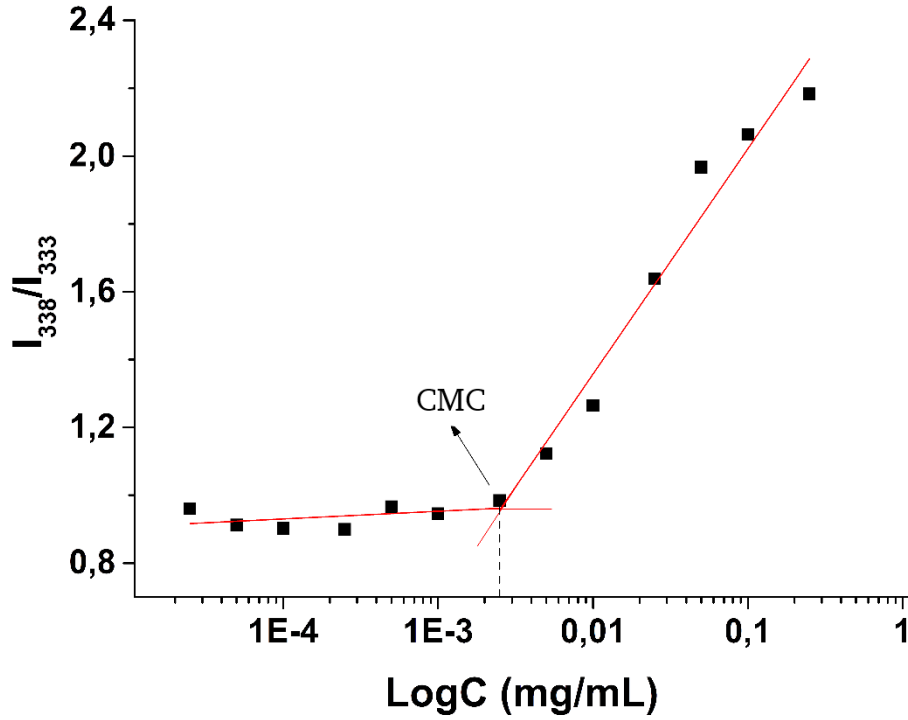
#### 4.1.5 Kritik Misel Konsantrasyonu (CMC) Tayini

Pirenin polimer konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen, 300-360 nm aralığındaki floresans spektrumları Şekil 4.6'da görülmektedir. Polimer konsantrasyonu arttıkça pirenin floresans şiddetinin de arttığı görülmektedir. Bu durum pirenin floresans özelliklerinin sulu ortamdan miselin hidrofobik çekirdeğine geçtiğinde değişmesi ile açıklanmaktadır [162]. Floresans şiddetlerindeki kaymalar yardımı ile CMC tayin edilmektedir.



Şekil 4.6 Pirenin PEG-*b*-PCL konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen floresans spektrumları

$6 \times 10^{-7}$  M konsantrasyonundaki piren ve  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL ile 1 mg/mL arasında değişen polimer çözeltisi karışımlarının 338 ve 333 nm'de verdiği floresans şiddetlerinin oranı ( $I_{338}/I_{333}$ ) hesaplanmış ve karşılık gelen polimer konsantrasyonları (mg/mL) ile logaritmik ölçekte grafik çizilmiştir (Şekil 4.7). Grafikte eğimin değiştiği nokta tespit edilmiş ve CMC  $2,5 \times 10^{-3}$  mg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu konsantrasyon polimerin misel yapıyı oluşturacağı en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir.



Şekil 4.7  $6 \times 10^{-7}$  M pirenin floresans şiddet oranlarının ( $I_{338}/I_{333}$ ) polimer konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi

## 4.2 Misel Sentezi ve Karakterizasyonu

### 4.2.1 Sentez Parametrelerinin Optimizasyonu ve Nanoçöktürme ile Misel Sentezi

Nanoçöktürme yöntemi ile misel sentezi gerçekleştirmek üzere öncelikle bölüm 3.3.8 Tablo 3.3, 3.4 ve 3.5'te verilen parametre değerleri ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. Boyut, PDI, zeta potansiyel sonuçları, % EE ve % YK değerleri analiz edilerek optimum oranlar belirlenmiş ve misel sentezi bu oranların kullanılması ile gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.1.1 Etkin Madde/Kopolimer Oranının Optimizasyonu

Etkin madde/kopolimer oranının optimizasyonu için bölüm 3.3.8.1 Tablo 3.3'te belirtilen miktarlarda mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri ve juglon kullanılarak boş ve juglon yüklü miseller sentezlenmiş olup sentezlenen misellerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.4** Etkin madde/kopolimer oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Etkin madde/ kopolimer oranı	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
0:5	212,60±47,56	0,315±0,078	-10,20±2,13
1:5	695,8±250,7	0,723±0,036	-20,60±1,99
1,25:5	691,1±133,6	0,767±0,148	-11,70±2,63
1,75:5	348,9±267,4	0,800±0,216	-21,20±1,31

Tez çalışmasında hedeflenen 150 nm'nin altında PDI değeri 0,3'ten küçük monodispers miseller sentezlemektir. Öncelikle etkin madde/kopolimer oranına göre optimizasyon sonuçları incelendiğinde boş misellerin boyutunun 212,6±47,56 nm ve PDI değerinin 0,315±0,078 olduğu ve etkin madde miktarı arttıkça boyut ve PDI değerlerin artarak nanopartikül boyut (<150 nm) ve PDI (<0,3) sınırlarını aştığı görülmektedir. Ölçümler 3 tekrarlı alınmış olup standart sapmaların da oldukça yüksek çıktığı görülmektedir. Bu durum sentezlenen polimerin hedeflenen PCL blok uzunluğuna sahip olmaması ile ilgilidir. mPEG5000-*b*-PCL5000 sentezlenmek üzere reaksiyon başlatılmış olup GPC sonuçlarına göre sentez mPEG5308-PCL1675 diblok kopolimerinin sentezlenmesi ile sonuçlanmıştır. Miselin hidrofobik çekirdek yapısını oluşturacak PCL bloğunun uzun olması miselin stabilitesi enkapsülasyon etkinliğini arttırmaktadır [64].

#### 4.2.1.2 Homopolimer/Kopolimer Oranının Optimizasyonu

Misellerin stabilitesini arttırmak, boyut ve PDI değerlerini hedeflenen aralığa indirmek amacı ile sentez modifiye edilmiştir. Homopolimer PCL (Mn 80.000 Da) eklenerek homopolimer-kopolimer karışımı oluşturulmuş ve eklenen PCL polimerinin hidrofobik çekirdeği güçlendirmesiyle, misel stabilitesinin ve juglonun enkapsülasyon etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir. Bölüm 3.3.8.2 Tablo 3.4'te belirtilen miktarlarda homopolimer ve kopolimer kullanılmasıyla boş miseller sentezlenmiş olup sentezlenen misellerin boyut, PDI ve zeta potansiyel sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir.

**Tablo 4.5** Homopolimer/kopolimer oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Homopolimer/kopolimer oranı	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
0:5	212,60±47,56	0,315±0,078	-10,20±2,13
0,05:4,95	165,50±1,026	0,225±0,015	-8,46±0,878
0,15:4,85	90,10±3,135	0,191±0,008	-7,26±0,475
0,25:4,75	94,92±0,015	0,191±0,005	-7,07±0,478
0,5:4,5	136,70±1,747	0,272±0,003	-9,08±1,15
1:4	148,40±0,451	0,111±0,006	-6,84±0,747
2:3	192,10±0,49	0,067±0,029	-7,13±0,819

Tablo 4.5 incelendiğinde polimer karışım ile gerçekleştirilen boş misel sentezlerinde boyut ve PDI değerlerinin sisteme homopolimer eklenmesi ile önce düştüğü ancak bir noktadan sonra artmaya başladığı görülmektedir. Eklenecek homopolimer miktarının stabil ve monodispers miseller sentezleyecek miktarda olması ancak boyutu istenilen aralığın dışına çıkarmaması gerekmektedir. Boyutun 90,10±3,135 nm ve PDI değerinin 0,191±0,008 olarak ölçüldüğü homopolimer/kopolimer oranı (0,15:4,85) tez çalışmasında hedeflenen boyut (<150 nm) ve PDI (<0,3) değerlerini sağladığı için optimum polimer karışım içeriği olarak belirlenmiştir. 3 tekrarlı gerçekleştirilen ölçümlerin standart sapmalarının da yalnızca kopolimer kullanılarak gerçekleştirilen senteze göre oldukça küçük olduğu görülmektedir. Zeta potansiyel değerlerinin yüzeydeki PEG bloklarından dolayı negatif olduğu ve -6 mV ile -10 mV arasında birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Bu durum örneklerin stabilitelelerinin birbirine yakın olduğunun göstergesidir.

#### 4.2.1.3 Etkin Madde/Polimer Karışım Oranının Optimizasyonu

Etkin madde/polimer karışım oranının belirlenmesi için bölüm 3.3.8.3 Tablo 3.5'te belirtilen miktarlarda optimum polimer karışım ile değişen miktarlarda juglonun kullanılmasıyla miseller sentezlenmiştir. Sentezlenen misellerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.6'da, % RV, % EE ve % YK sonuçları ise Tablo 4.7'de verilmiştir.

**Tablo 4.6** Etkin madde/polimer karışım oranına göre boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Etkin madde/polimer karışım oranı	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
0,5:5	110,50±2,22	0,251±0,021	-9,33±0,90
0,75:5	125,40±1,90	0,247±0,010	-6,66±0,58
0,85:5	294,30±89,94	0,435±0,074	-13,70±0,92
1:5	236,70±115,70	0,369±0,024	-11,30±2,26

Tablo 4.6 incelendiğinde boyut ve PDI değerlerinin 0,5:5 ve 0,75:5 oranları için hedeflenen (boyut<150 nm ve PDI<0,3) aralıkta ve birbirine yakın olduğu görülmektedir. Kurutulan miseller organik solventte dağıtılarak enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi hesaplanmıştır.

**Tablo 4.7** Etkin madde/polimer karışım optimizasyonu için reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi değerleri

Etkin madde/polimer karışım oranı	Reaksiyon verimi (%)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	İlaç Yükleme Kapasitesi (%)
0,5:5	79,45	58,64	6,71
0,75:5	70,26	78,09	14,49
0,85:5	68,88	68,74	14,45
1:5	70,83	46,26	10,88

Tablo 4.7'de verilen sonuçlara göre %78,09 enkapsülasyon verimi ve %14,49 ilaç yükleme kapasitesi ile optimum juglon/polimer karışım oranı 0,75:5 olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.1.4 Ölçek Büyütme

Belirlenen optimum oranlar (0,15 homopolimer:4,85 kopolimer ve 0,75 juglon:5 polimer karışım) korunarak ölçek büyütme çalışması yapılmış olup sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

**Tablo 4.8** Ölçek büyütme ile değişen boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Ölçek (mL)	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
5	125,40±1,90	0,247±0,010	-6,66±0,58
10	90,73±1,29	0,220±0,013	-11,20±1,16
20	84,55±0,64	0,245±0,006	-5,93±0,27
30	76,44±0,52	0,206±0,003	-6,89±0,54
50	123,70±38,78	0,241±0,016	-5,71±0,46

Tablo 4.8 incelendiğinde ölçek büyüdükçe boyut ve PDI değerlerinin 50 mL ölçeğine kadar küçüldüğü görülmektedir. Sentez ilk ölçek olan 5 mL’de cam flakonlarda, ölçek 10, 20, 30 ve 50 mL’ye çıktığında ise farklı boyuttaki beherlerde gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte yüzey alanının artmasıyla organik fazın sulu faza damla damla ilave edilmesi esnasında daha homojen karışmasının sağlanması ve organik çözününün artan yüzey alanı ile uçmasının daha hızlı gerçekleşmesiyle daha küçük ve monodispers misellerin oluştuğu düşünülmektedir. 30 mL’ de en küçük boyut ve PDI değerinin elde edildiği görülmektedir. Ölçek 50 mL’ye çıkarıldığında sıvının yüksekliği de arttığından manyetik karıştırıcı ile 30 mL ölçeğindeki etkili karıştırmanın gerçekleştirilemediği bu sebeple de boyut ve PDI değerlerinde artış olduğu düşünülmektedir. Bu doğrultuda nanoçöktürme yöntemi ile misel sentezi 30 mL ölçeğinde, 5 paralel sentez ile üretilmiştir. Sentez tamamlandığında misel süspansiyonları 0,22  $\mu\text{m}$ ’lik CA filtreden geçirilerek enkapsüle olmamış juglon uzaklaştırılmış [148], tüm sentezler birleştirilerek liyofilize edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.2 Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi

Liyofilize edilen misellerin tartılmasıyla reaksiyon verimi; (3.2) eşitliği kullanılarak %65 olarak hesaplanmıştır.

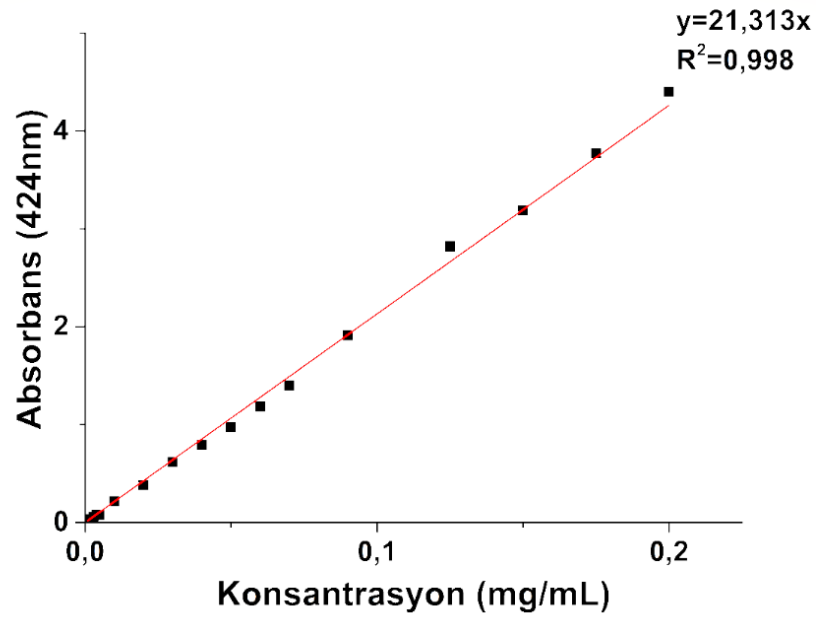
Enkapsülasyon etkinliği misellerin asetonda dağıtılması sonucu enkapsüle olmuş juglonun açığa çıkarılması ve UV-Vis spektrofotometrede 424 nm’de analiz edilmesiyle hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanmasında konsantrasyonu 0,001 ile 0,2 mg/mL arasında değişen juglonun aseton içerisinde

çözünmesi ile hazırlanan çözeltilerin absorbanlarının 424 nm'de okunmasıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.8) ve (3.3) eşitliği kullanılmış, enkapsülasyon etkinliği %62 olarak hesaplanmıştır.

Etkin madde yükleme kapasitesi (% YK); (3.4) eşitliğinin kullanılması ile %12,5 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 4.9** Reaksiyon verimi, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi

Reaksiyon verimi (%)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	İlaç Yükleme Kapasitesi (%)
65	62	12,5



**Şekil 4.8** Juglon kalibrasyon eğrisi

#### 4.2.3 Boyut, Polidispersite İndeksi (PDI), Zeta Potansiyel

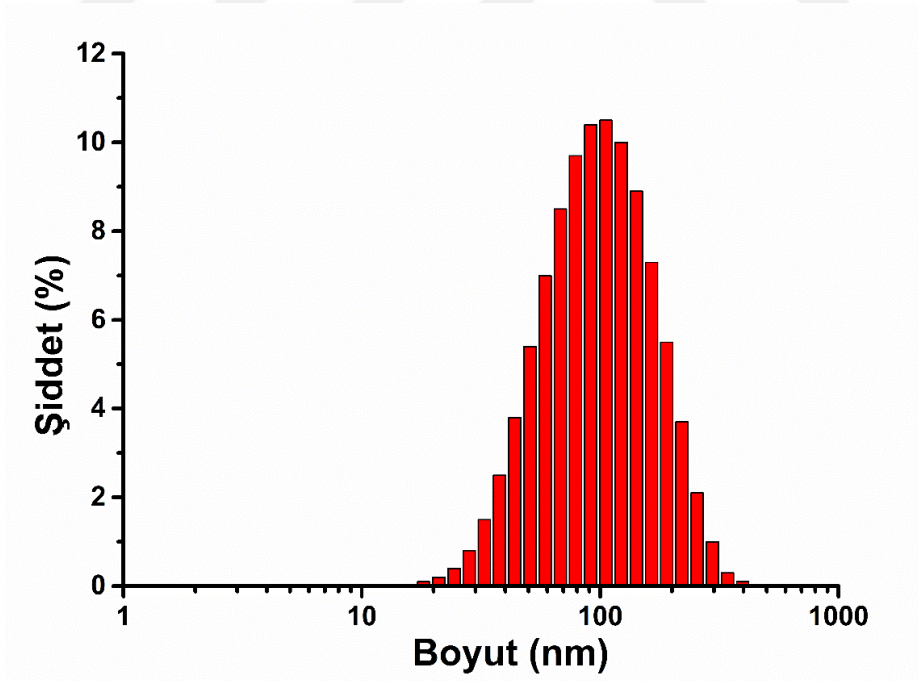
Misellerin boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri 5 paralel sentez tamamlandı, misel süspansiyonları filtreden geçirilerek enkapsüle olmamış juglon uzaklaştırıldıktan sonra her bir sentez (S1-S5) için ayrı ayrı analiz edilmiş ve sonuçların ortalaması alınarak ortalama boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

hesaplanmıştır. 5 senteze ait boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri ve ortalamaları Tablo 4.10'da verilmiştir.

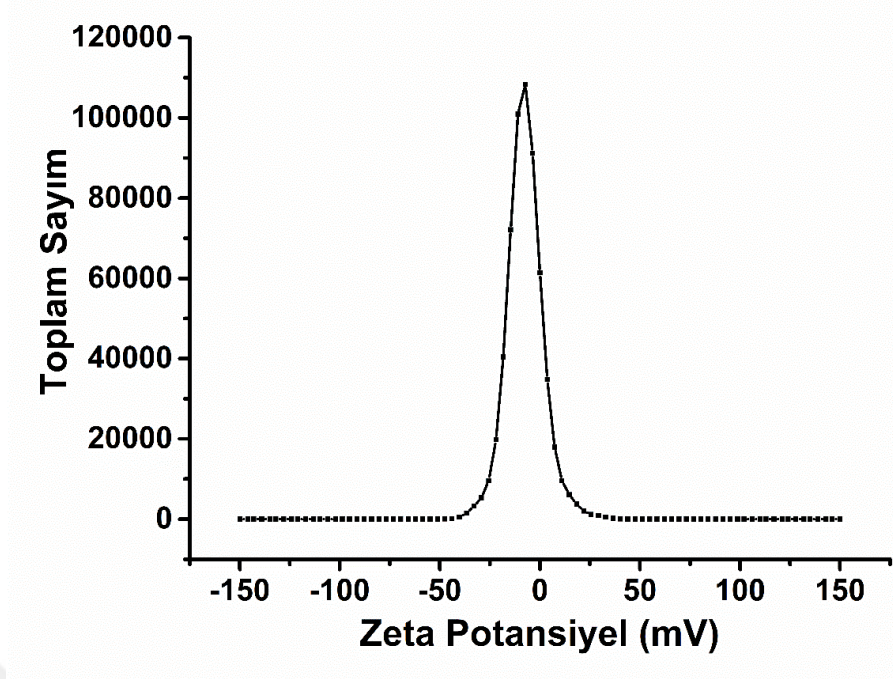
**Tablo 4.10** Sentezlerin boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Örnek	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
S1	83,79±1,11	0,194±0,006	-5,57±0,13
S2	87,38±0,97	0,208±0,006	-8,88±0,72
S3	83,83±1,79	0,239±0,009	-5,39±0,50
S4	91,52±0,26	0,218±0,013	-9,20±1,40
S5	83,96±0,51	0,203±0,006	-6,37±0,62
Ortalama	86,10±3,04	0,212±0,015	-7,08±1,49

Ortalama boyut  $86,10 \pm 3,04$  nm, PDI  $0,212 \pm 0,015$  ve zeta potansiyel değeri ise  $-7,08 \pm 1,49$  mV olarak bulunmuş ve Şekil 4.9'da ortalama boyut dağılımı ve Şekil 4.10'da ise ortalama zeta potansiyel dağılımı grafikleri verilmiştir.



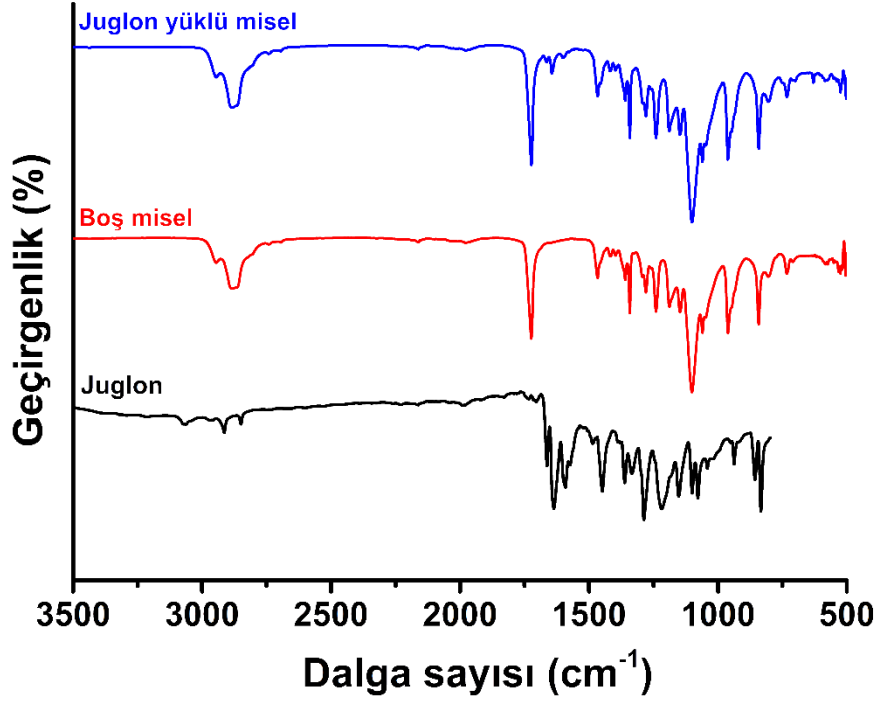
**Şekil 4.9** Misellerin boyut dağılımı grafiği



Şekil 4.10 Misellerin zeta potansiyel grafiği

#### 4.2.4 FT-IR Analizi

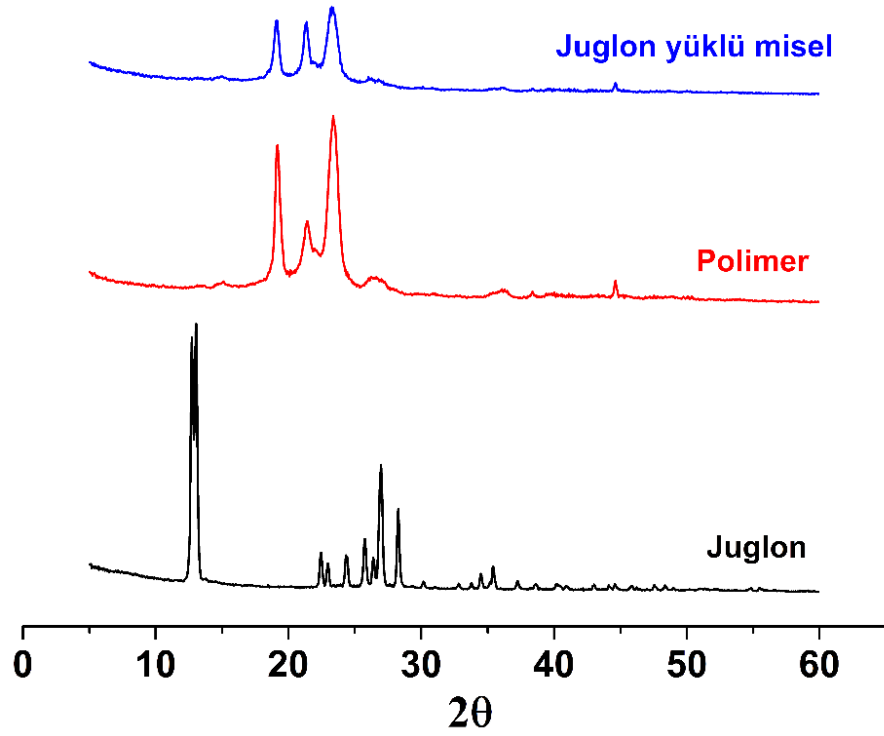
Juglon, boş misel ve juglon yüklü misel örneklerinin FTIR spektroskopik analizi sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.11’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Juglon spektrumunda  $1650\text{ cm}^{-1}$ ’de C=O gerilmesi,  $1590\text{ cm}^{-1}$ ’de C=C gerilmesi ve  $1280\text{ cm}^{-1}$ ’de C-O gerilmesi bantları görülmektedir. Boş ve juglon yüklü misellerde ise  $1720\text{ cm}^{-1}$ ’de görülen karbonil bandı (C=O) ve  $1215\text{ cm}^{-1}$ ’de görülen eter (C-O-C) bandı kopolimerden kaynaklanmaktadır. Juglon yüklü misellerde  $1650\text{ cm}^{-1}$ ’de juglon örneğine göre şiddeti düşük C=O bandı görülmektedir. Bu durum juglonun genel olarak misel içerisine enkapsüle olduğunun ancak düşük miktarda juglonun misel yüzeyine tutunmuş olabileceğinin göstergesidir.



Şekil 4.11 Juglon, boş misel ve juglon yüklü misele ait FT-IR spektrumları

#### 4.2.5 XRD Analizi

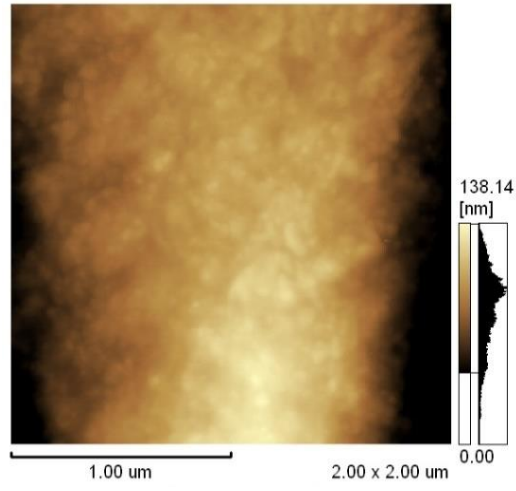
Juglon, boş misel ve juglon yüklü misellerin kristal/amorf yapıları hakkında bilgi edinmek için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. XRD analizi sonucu elde edilen spektrumlar Şekil 4.12’de verilmiştir. Juglonun XRD spektrumu incelendiğinde 13,02°’de şiddetli ve 27,02° ve 28,27°’deki daha az şiddetli juglona ait karakteristik piklerin olduğu görülmekte olup bu pikler literatür ile uyuşmaktadır [163]. Polimere ait XRD spektrumunda ise 19,02° ve 21,5°’de sırası ile PEG ve PCL bloklarına ait pikler 23,6°’de ise 23,4°’deki PEG ve 23,8°’deki PCL’ye ait piklerin tepe noktalarının çakışması ile oluşan pik görülmekte ve bu piklerin varlığı literatür ile uyuşmaktadır [164]. Juglon yüklü misel spektrumunda ise juglonun kristalin yapısına ait şiddetli pikleri içermediği ve boş miselde bulunan karakteristik piklerin de şiddetinin azaldığı görülmektedir. Bu sonuç juglonun misellere enkapsüle edilmesi ile amorf bir yapının elde edildiğinin göstergesidir.



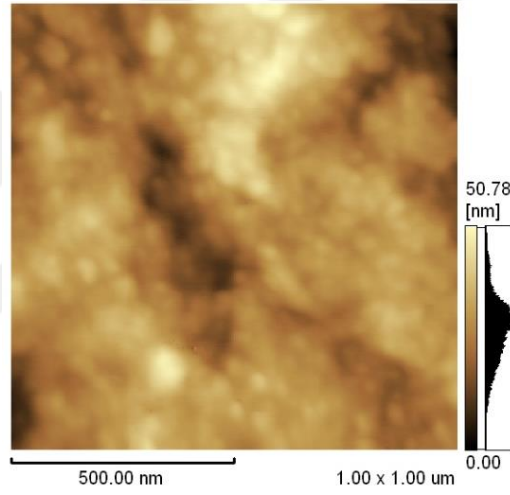
Şekil 4.12 Juglon, polimer ve juglon yüklü misele ait XRD spektrumları

#### 4.2.6 AFM Analizi

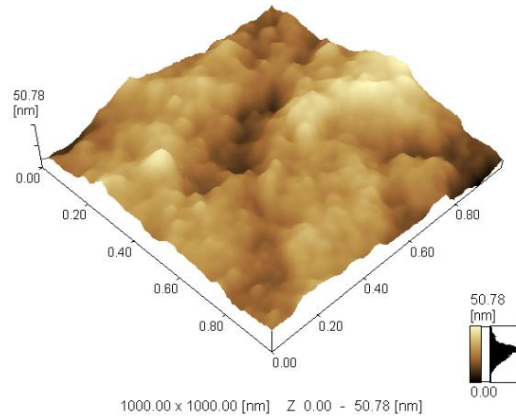
AFM görüntüleri incelendiğinde hazırlanan numunenin yoğunluğu nedeni ile agregat oluşumu gözlemlendiği için çok net görüntü alınamadığı tespit edilmiştir. Ancak AFM görüntülerinde misellerin küresel yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.14'e göre misel boyutlarının yaklaşık 50 nm dolaylarında olduğu görülmüştür, bu boyut değerlerinin DLS metodu ile tespit edilen ortalama boyut olan 86 nm'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum DLS ile hidrodinamik yarı çapın ölçülmesi, AFM'de ise kurutulmuş örneğin analiz edilmesi ile açıklanmaktadır.



Şekil 4.13 Misellerin 2D AFM görüntüsü ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ lik alan)



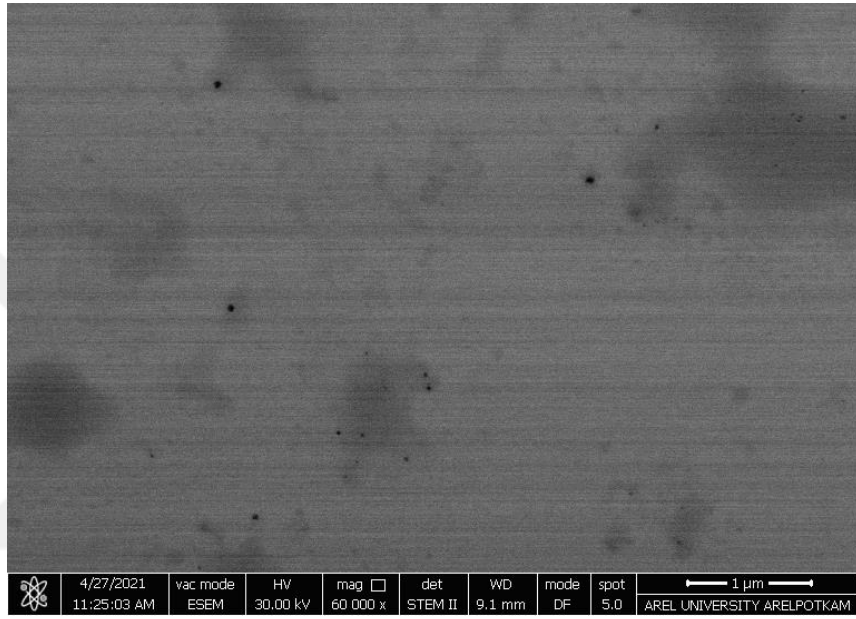
Şekil 4. 14 Misellerin 2D AFM görüntüsü ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ lik alan)



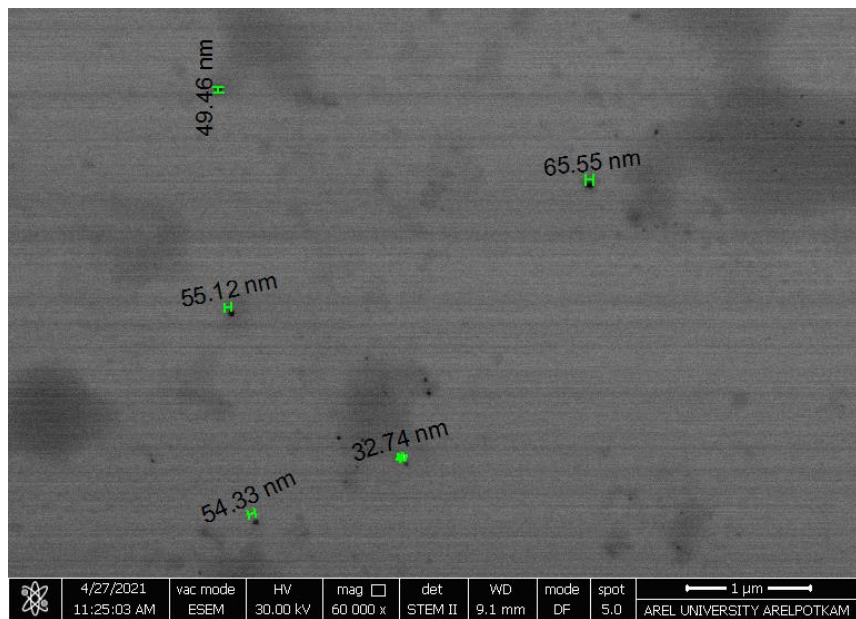
Şekil 4.15 Misellerin 3D AFM görüntüsü ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ lik alan)

#### 4.2.7 SEM Analizi

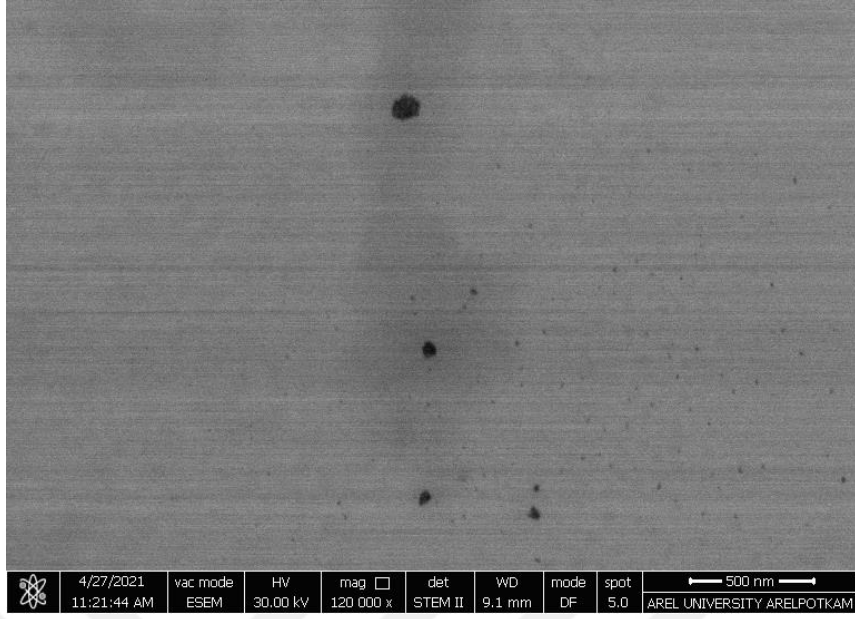
SEM analizi iki farklı numune hazırlama yöntemi ile iki farklı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Suda süspansiyon edilmiş misellerin doğrudan sulu numune karakterizasyonuna olanak sağlayan ESEM modu ile analizi sonucu elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19’da verilmiştir. Suda disperse edilen misellerin çift taraflı karbon bant üzerine damlatılıp kurutulması sonucu analiz edilmesi ile elde edilen SEM görüntüsü ise Şekil 4.20’de verilmiştir.



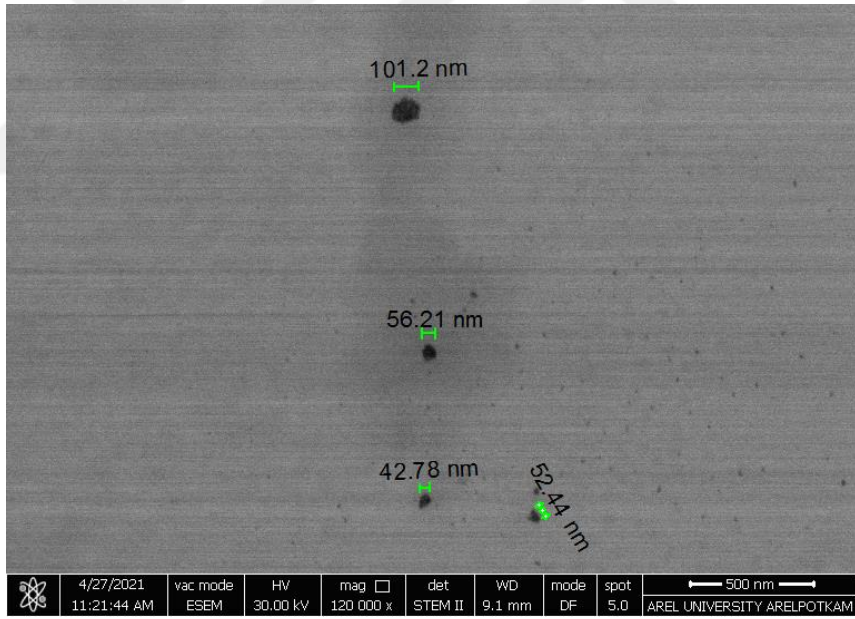
Şekil 4.16 Misellerin 60.000 x büyütmede SEM görüntüsü



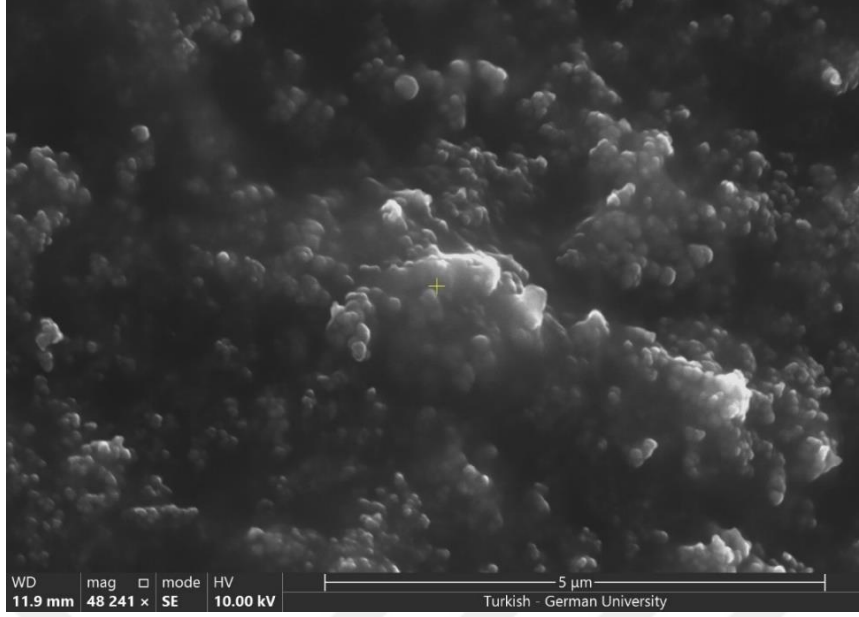
Şekil 4.17 Misellerin 60.000 x büyütmede boyutlandırılmış SEM görüntüsü



Şekil 4.18 Misellerin 120.000 x büyütmede SEM görüntüsü



Şekil 4.19 Misellerin 120.000 x büyütmede boyutlandırılmış SEM görüntüsü



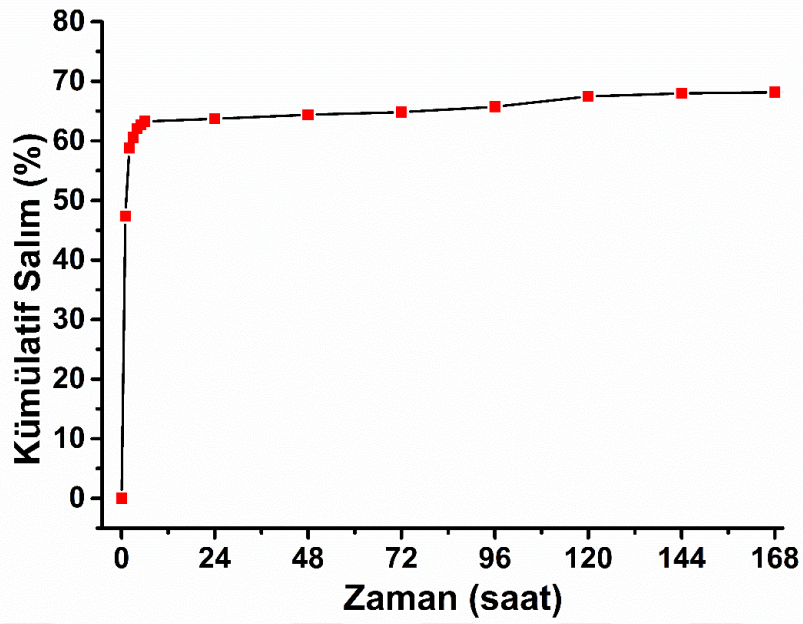
**Şekil 4.20** Misellerin 48.000 x büyütmede SEM görüntüsü

SEM görüntüleri incelendiğinde Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19’da doğrudan sulu numunenin analizi ile alınan görüntülerde misel yoğunluğunun az olduğu görülmektedir. Bunun nedeni misellerin su ile süspanse edilmesi sonucunda seyreltik bir numune hazırlanmış olmasıdır. Ancak bu aynı zamanda misellerin suyun içinde agregat oluşturmadan başarılı bir şekilde disperse edildiğinin göstergesidir.

SEM analizi sonucu elde edilen mikrograflarda misel boyutlarının 30 ile 100 nm arasında değiştiği ve misellerin küresel morfolojide oldukları görülmektedir. Bu sonuçlar DLS metodu ile elde edilen sonuçları desteklemektedir. DLS metodu ile hesaplanan ortalama boyut 86,10 nm olup, boyut dağılım grafiği (Şekil 4.9) incelendiğinde boyut dağılımının 30 nm’den başladığı görülmektedir.

#### **4.2.8 *In-vitro* Salım Çalışması**

Juglon yüklü PEG-*b*-PCL misellerinin salım profili, belirlenen aralıklarda salım ortamından alınan örneğin 424 nm’de UV-Vis spektrofotometre kullanılarak analiz edilmesi ve Şekil 4.8’de verilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak farklı zaman aralıklarında salınan juglon miktarının hesaplanması ile kümülatif olarak oluşturulmuştur (Şekil 4.21). Salım ilk 6 saatte hızlı bir şekilde %63’e ulaşmış, 7. günde misel içerisindeki juglonun %68’inin salınmasıyla tamamlanmıştır.





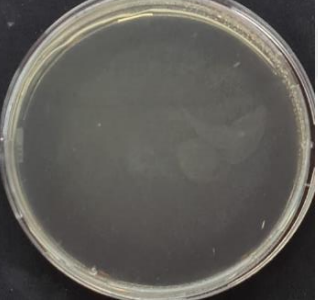
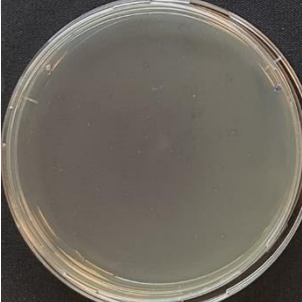

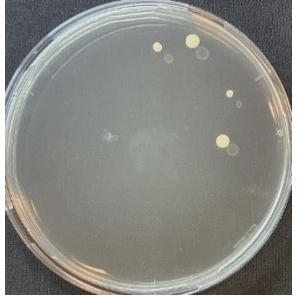







Şekil 4.21 Juglon yüklü misellerin salım grafiği

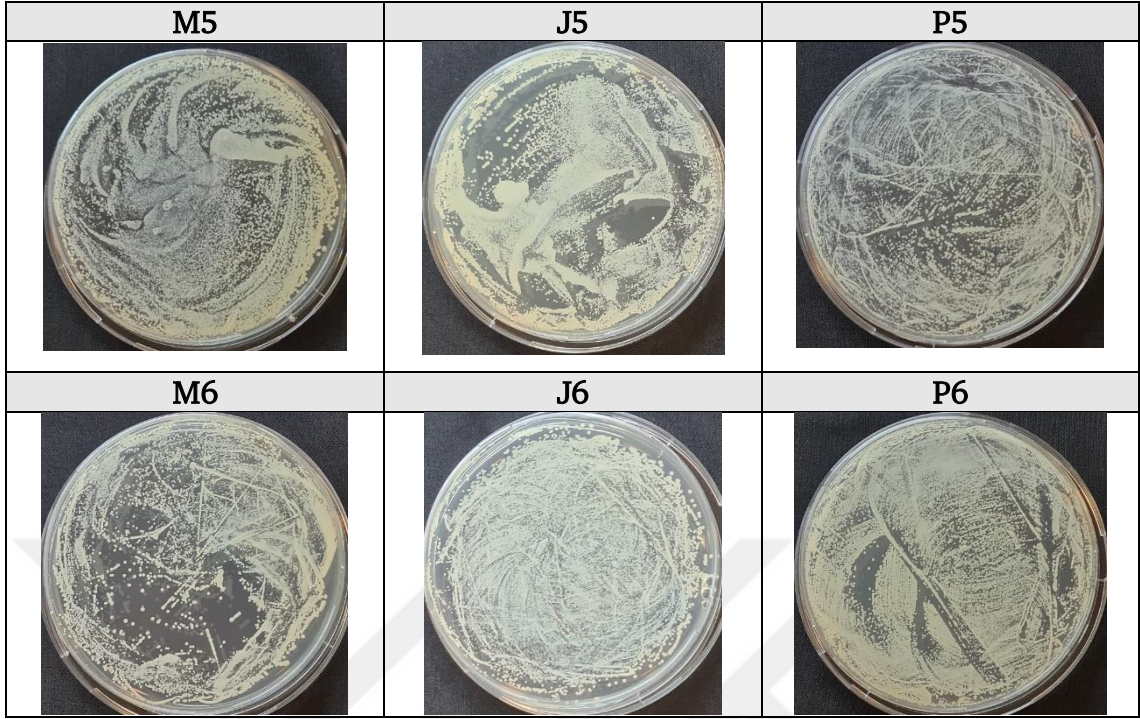
### 4.3 Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Sentezlenen juglon yüklü misellerin antifungal etkinliği *C. albicans* (ATCC 10231), *A. flavus* (ATCC204304) ve *Fusarium spp.* (ATCC 20883) suşları üzerinde agar dilüsyon metodu kullanılarak araştırılmıştır. Mikroorganizmaların 7,8  $\mu\text{g/mL}$ -250  $\mu\text{g/mL}$  arasında değişen konsantrasyonlarda polimer, juglon yüklü misel ve serbest juglon [juglonun 5. gün sonunda %67 kümülatif salımı göz önüne alınarak misellerden salınan maksimum juglon miktarına eşdeğer] içeren petriyelerde 5 gün boyunca inkübasyonu sağlandıktan sonra petri görüntüleri incelenmiş, MFK ve MİK değerleri belirlenmiştir. Besi yerlerindeki polimer, misel ve serbest juglon miktarları bölüm 3.3.19'da bulunan Tablo 3.6, 3.7 ve 3.8'de verilmiştir. Çalışmada 2 farklı kontrol grubu kullanılmış olup mPEG-*b*-PCL polimerinin kontrol olarak kullanılması ile polimerin 7,8  $\mu\text{g/mL}$ -250  $\mu\text{g/mL}$  arasında değişen konsantrasyonlarda büyüme üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Antifungal etkinliğin karşılaştırmalı olarak tespitinde kullanılan kontrol grubu ise mikroorganizmaların ortamda polimer, serbest juglon ya da misel olmaksızın sadece besi yerinde inkübasyonu ile elde edilen ilgili tabloların en üstünde yer almakta olan her mikroorganizma için bir adet hazırlanan kontrol petriyeleridir. Tablo 4.11'de *C.albicans*, Tablo 4.12'de *A.flavus* ve Tablo 4.13'de *Fusarium spp.* için petri görüntüleri verilmiştir.

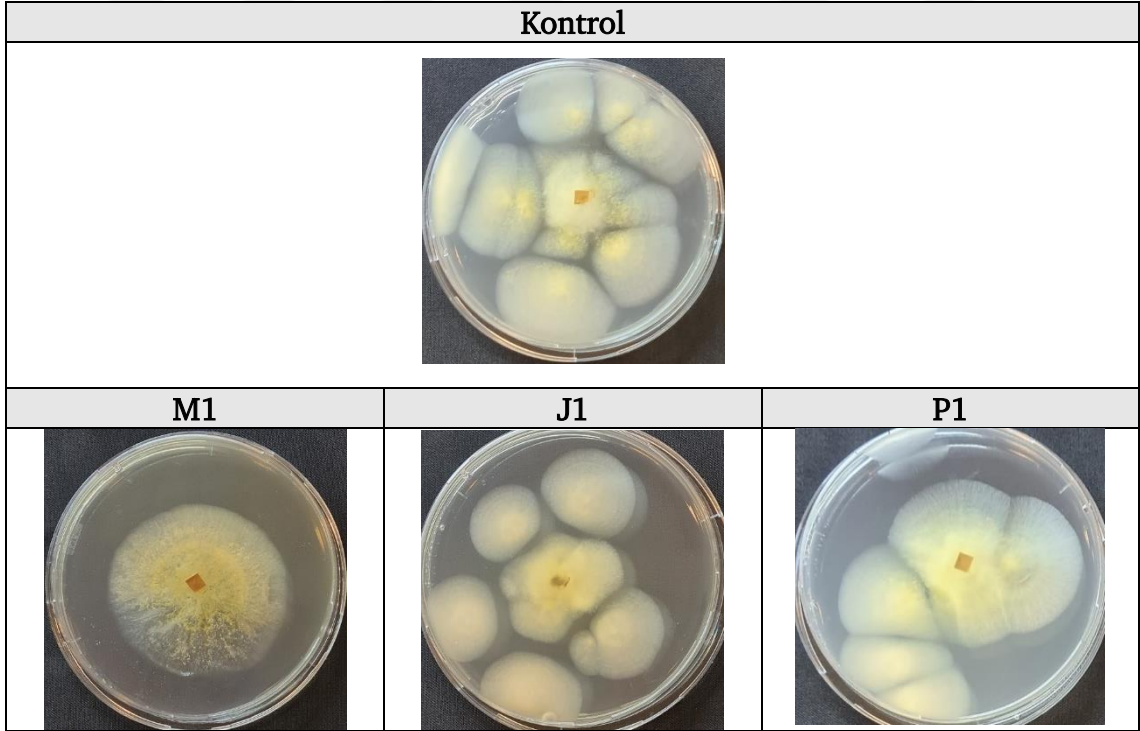
Tablo 4.11 *C.albicans* için agar dilüsyon petri görüntüleri

Kontrol		
		
M1	J1	P1
		
M2	J2	P2
		
M3	J3	P3
		
M4	J4	P4
		

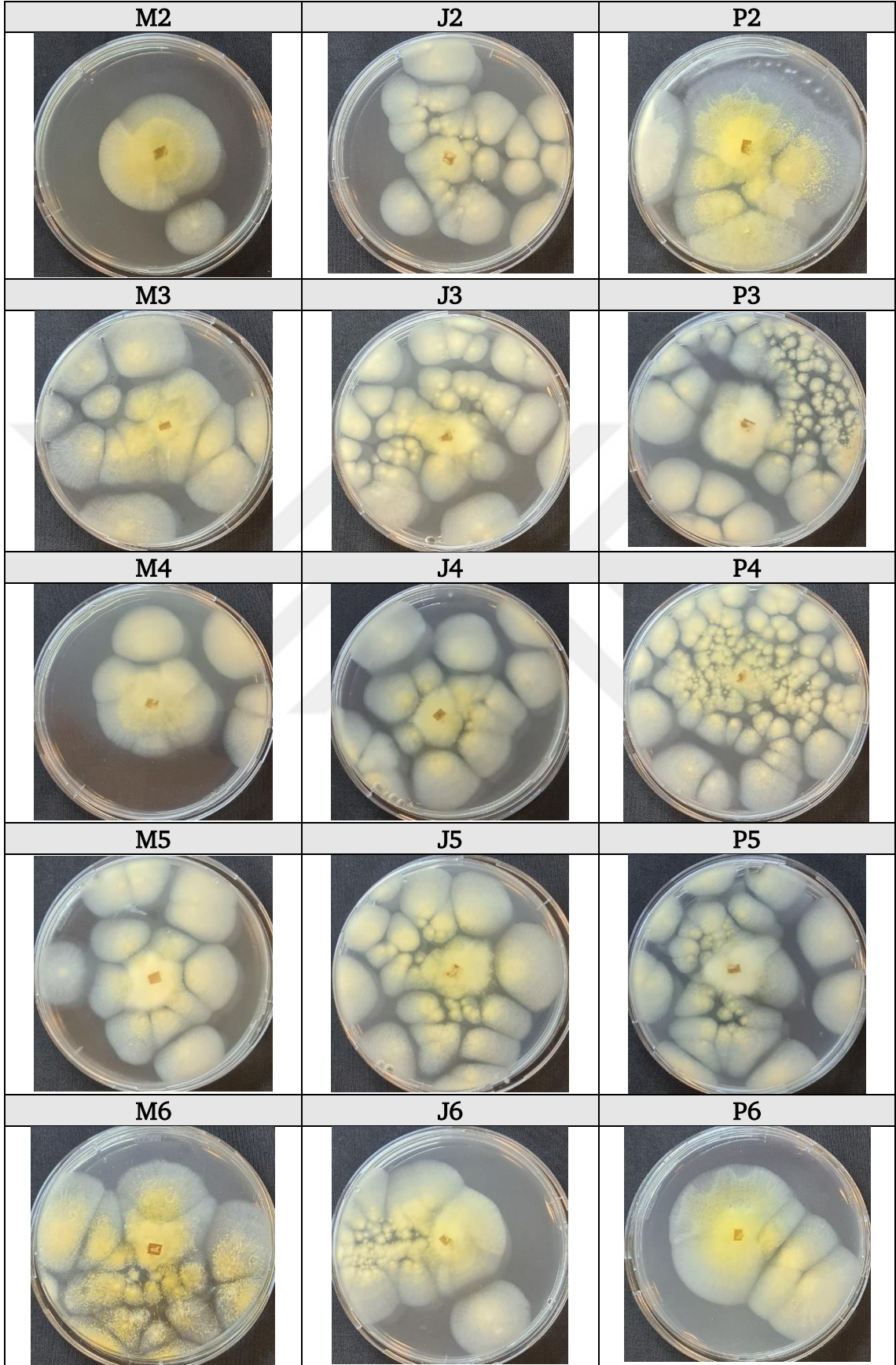
#### 4.11 *C.albicans* için agar dilüsyon petri görüntüleri



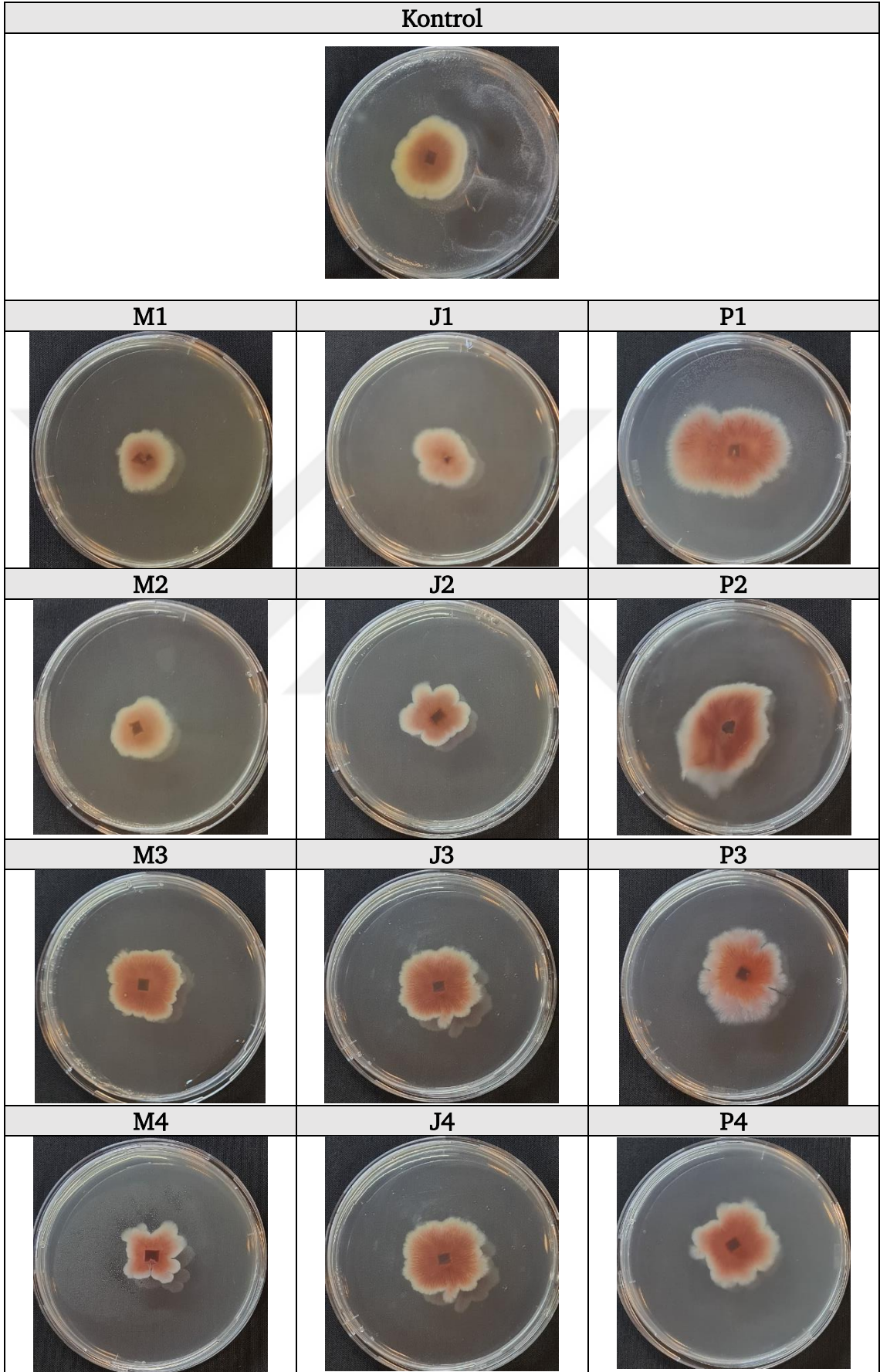
Tablo 4.12 *A.flavus* agar dilüsyon petri görüntüleri



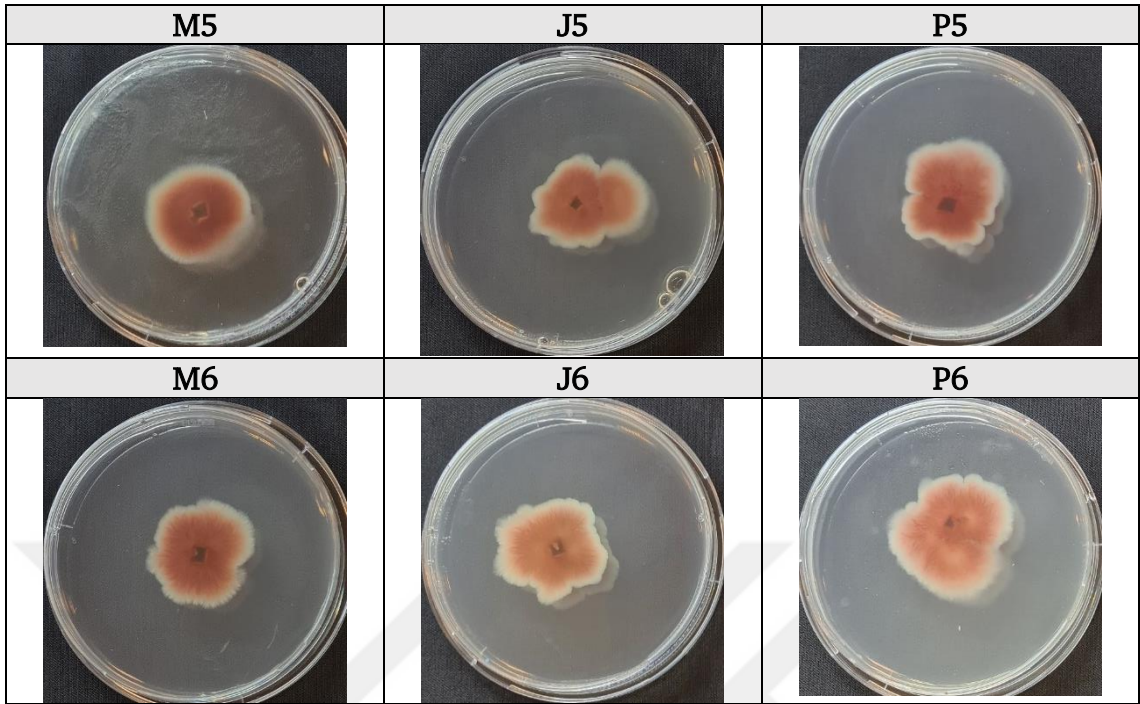
Tablo 4.12 *A.flavus* agar dilüsyon petri görüntüleri (devamı)



Tablo 4.13 *Fusarium spp.* agar dilüsyon petri görüntüleri



**Tablo 4.13** *Fusarium spp.* agar dilüsyon petri görüntüleri (devamı)



Mikroorganizmaların ilgili petrilerde 5 gün inkübasyonu sonucunda petri görüntüleri incelenmiş, polimerlerin (P1-P6 → 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81 µg/mL) tüm konsantrasyonlarda mikroorganizmaların büyümesi üzerine bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Antifungal aktivite serbest juglon, misel ve kontrol grubu petrilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesiye analiz edilmiş, minimum fungisidal (MFK) ve minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) tespit edilmiştir. *A.flavus* ve *Fusarium spp.* için belirlenen MFK değerleri agar dilüsyon metodunda çalışılması gereken konsantrasyonu belirlemek için ön çalışma olarak gerçekleştirilen top agar dilüsyon metodu sonucunda elde edilmiştir. Top agar metodunda agar dilüsyondan farklı olarak 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında misel ve karşılık gelen serbest juglon konsantrasyonlarında da antifungal aktivite değerlendirilmiş olup her iki konsantrasyonda da hem serbest juglon hem de misel için *A.flavus* ve *Fusarium spp.*'da büyüme görülmemiştir. Bu sebeple 500 µg/mL misel ve karşılık gelen serbest juglon konsantrasyonu bu mikroorganizmalar için MFK olarak belirlenmiştir. MFK belirlendiği için ve agar dilüsyon metodunda fazla miktarda misele ihtiyaç duyulduğundan bu yüksek konsantrasyonlara çıkılmamıştır. *C.albicans* için ise

MFK agar dilüsyon metodunda tespit edilmiş ve 125 µg/mL misel (M2) ve karşılık gelen serbest juglon konsantrasyonu (J2) MFK olarak belirlenmiştir. İlgili konsantrasyonların misel ve juglon konsantrasyonu karşılığı bölüm 3.3.19, Tablo 3.7 ve 3.8’de belirtilmiştir.

MFK değerleri Tablo 4.14’te misel içeriğindeki juglon konsantrasyonu üzerinden verilmiştir

**Tablo 4.14** MFK değerleri

MFK Değerleri (µg/mL)			
Örnek	<i>A.flavus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>Fusarium spp.</i>
Juglon yüklü misel	41,88	10,47	41,88
Serbest juglon	41,88	10,47	41,88

Tablo 4.14 incelendiğinde MFK değerlerinin *A.flavus* ve *Fusarium spp.* için 41,88 µg/mL, *C.albicans* için ise 10,47 µg/mL olarak 4 kat daha düşük olduğu ancak 3 mikroorganizma için de hem misel hem de juglon için aynı olduğu görülmektedir. Bu durum juglonun *C.albicans* üzerinde düşük konsantrasyonlarda bile *A.flavus* ve *Fusarium spp.*’ye göre daha etkili olduğu göstermekte olup, 3 mikroorganizma için de nanataşyıcı sistemin juglona göre minimum fungisidal konsantrasyonda fark yaratmadığı görülmektedir.

MİK belirlenmesi için ise 3 mikroorganizma için de agar dilüsyon metodundan elde edilen ilgili petrilereki büyümeler kontrol petrisi ile karşılaştırılmış ve büyümenin inhibe edildiği en düşük konsantrasyonlar *A.flavus* için M2 ve J1, *C.albicans* için M3 ve J3, *Fusarium spp.* için ise M4 ve J2 olarak belirlenmiştir. İlgili konsantrasyonların misel ve juglon konsantrasyonu karşılığı bölüm 3.3.19, Tablo 3.7 ve 3.8’de belirtilmiştir.

MİK değerleri Tablo 4.15’te misel içeriğindeki juglon konsantrasyonu üzerinden verilmiştir.

Tablo 4.15 MİK değerleri

MİK Değerleri ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
Örnek	<i>A.flavus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>Fusarium spp.</i>
Juglon yüklü misel	10,47	5,23	2,62
Serbest juglon	20,93	5,23	10,47

Tablo 4.15 incelendiğinde *C.albicans* için juglon ve miselin aynı konsantrasyonda ( $5,23 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) MİK verdiği, ancak *A.flavus* için miselin ( $10,47 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) serbest juglona ( $20,93 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) göre 2 kat daha etkili olduğu ve *Fusarium spp.* için ise miselin ( $2,62 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) serbest juglona ( $10,47 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) göre 4 kat daha etkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar nanotaşıyıcı sistemin *A.flavus* ve *Fusarium spp.* üzerinde serbest juglona göre daha yüksek etkinliğinin olduğunu göstermektedir.

#### 4.4 Bulgular ve Öneriler

Bu tez çalışması ile juglon ilk defa PEG-*b*-PCL misellerine enkapsüle edilmiş olup hidrofobik özellik gösteren juglonun sudaki çözünürlüğünün iyileştirilerek biyoyararlanımın artırılması hedeflenmiştir. Tez kapsamında öncelikle mPEG-*b*-PCL diblok kopolimeri mPEG'in başlatıcı, kalay oktoatın ise katalizör olarak kullanıldığı  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Polimer sentezi mikrodalga destekli sentez ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemin en büyük avantajı geleneksel yöntemlere göre reaksiyon süresini oldukça kısaltmasıdır. Bunun yanı sıra mikrodalga uygulaması ile moleküller hızlı ve homojen bir şekilde istenilen sentez sıcaklığına ulaşmakta ve böylece istenmeyen reaksiyonlar engellenerek, temiz ve yüksek verimde ürün oluşumu sağlanmaktadır. Tez çalışmasında 30 dakikada mPEG-*b*-PCL polimeri sentezlenmiş ve elde edilen polimer yıkama işlemiyle tepkimeye girmeden kalan monomerler, oligomerler ve katalizörden arındırılıp saflaştırıldıktan sonra kurutulmuş ve reaksiyon verimi %75 olarak hesaplanmıştır. Polimerin kimyasal yapısının tayini ve diblok kopolimer oluşumunu doğrulamak amacı ile FT-IR ve

<sup>1</sup>H-NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. Başlatıcı olan mPEG ve sentezlenen mPEG-*b*-PCL polimerinin FT-IR ve <sup>1</sup>H-NMR sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve diblok kopolimer sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği doğrulanmıştır. GPC ile polimerin moleküler ağırlığı tayin edilerek PCL blok uzunluğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçları PCL blok uzunluğunun hedeflenilenden daha kısa olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında mPEG<sub>5000</sub>-*b*-PCL<sub>5000</sub> diblok kopolimeri sentezlenmesi hedeflenmiş ancak sentez GPC analizi sonucuna göre mPEG<sub>5308</sub>-*b*-PCL<sub>1675</sub> ile sonuçlanmıştır. PCL blok uzunluğunun hedeflenilenden kısa olması nanopartikül sentezinin modifiye edilmesini gerekli kılmıştır. Amfifilik moleküllerin misel yapıyı oluşturduğu en düşük konsantrasyon olarak tanımlanan kritik misel konsantrasyonu (CMC); değişen polimer konsantrasyonlarında pirenin prob olarak kullanılarak floresans spektrofotometrede analiz edilmesiyle  $2,5 \times 10^{-3}$  mg/mL olarak bulunmuştur.

Juglon yüklü PEG-*b*-PCL miselleri nanoçöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Nanoçöktürme misel sentezinde sıklıkla kullanılan uygulaması kolay, ultrasonikatör ve homojenizatör gibi cihazlar gerektirmeyen, çoğunlukla stabilizatör kullanımına ihtiyaç duyulmaksızın gerçekleştirilen bir yöntemdir. Nanoçöktürmede su ile karışabilen ve uçucu olan bir organik faz ve sulu faz olmak üzere iki faza ihtiyaç duyulmaktadır. Organik faz olarak hem juglon hem de mPEG-*b*-PCL kopolimerini çözebildiği ve oda sıcaklığında uçucu olduğu için aseton seçilmiştir. Sentez organik fazda çözünen juglon ve polimerin enjektör yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerindeki sulu faza damla damla ilave edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Aseton ve suyun karışması sonucu polimer ve juglon suda çözünmedikleri için misel yapıyı oluşturmuştur. Misel oluşumu mekanizması; diblok kopolimerin kendiliğinden hidrofobik bloklarının (PCL) sudan kaçarak iç kısımda yoğunlaşması ile çekirdek, hidrofilik bloklarının (PEG) ise su ile etkileşim halinde kabuk kısmı oluşturması şeklinde açıklanmaktadır. Organik çözücü 4-5 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırma esnasında uçurulmuş ve misel süspansiyonu 0.22 µm'lik enjektör ucu filtreden geçirilerek enkapsüle olmamış juglonun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Misel süspansiyonunun boyut ve PDI değeri analiz edildiğinde istenilen aralıkta (boyut < 150 nm, PDI < 0,3) olmadığı yalnızca kopolimer kullanılmasıyla istenilen özellikte misellerin sentezlenemediği

tespit edilmiştir. Diblok kopolimerin hidrofobik blok uzunluğu misellerin çekirdek kısmını oluşturarak stabilitesini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Sentezlenen polimerin PCL blok uzunluğunun kısa olması misellerin stabilitesini etkilemiş boyut ve PDI değerlerinin yüksek çıkmasına neden olmuştur. Boyut ve PDI değerlerini hedeflenen aralıkta tutmak için sentez modifiye edilmiş ve sentez aşamasında kopolimere homopolimer (PCL) eklenerek çekirdeğin stabilitesinin artması sağlanmıştır. Bu amaç için PCL ( $M_n$  80.000 Da) kullanılmıştır. Eklenecek PCL miktarı belirlenirken stabil, monodispers misellerin sentezlenmesini sağlayan ancak misellerin boyutunu arttırmayacak miktar tespit edilmiştir. En uygun homopolimer/kopolimer oranını tespit etmek için optimizasyon çalışması yapılmış ve 0,15 mg homopolimer:4,85 mg kopolimer oranı optimum olarak belirlenmiştir. PCL ( $M_n$  80.000 Da) sayıca molekül ağırlığı yüksek bir homopolimer olduğu için düşük ağırlık oranında PCL eklenmesiyle stabilitenin arttığı görülmüştür. Belirlenen optimum homopolimer/kopolimer karışım oranı kullanılarak juglon/polimer karışım oranının belirlenmesi üzerine de optimizasyon çalışması yapılmış boyut, PDI, %EE ve %YK sonuçlarının değerlendirilmesi ile 0,75 mg juglon:5 mg polimer karışım oranı optimum olarak belirlenmiştir. Son olarak ölçek büyütme çalışması yapılmış ve sentezin 30 mL (sulu faz) ölçekte yapılmasına karar verilmiştir. PCL ( $M_n$  80.000 Da) asetonda çözünmediği için ikinci organik çözücü olarak su ile karışabilen THF düşük miktarda kullanılmıştır. İhtiyaç duyulan PCL miktarı çok az olduğu için THF içerisinde yüksek konsantrasyonda PCL stok hazırlanmış ve bu stoktan gerekli miktarda alınarak asetonda çözünmüş juglon ve mPEG-*b*-PCL ile karıştırılarak yeni organik faz elde edilmiştir. Sentez kopolimer ile yapılaben benzer şekilde; bu organik fazın sulu faza karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen misellerin ortalama boyutu  $86,10 \pm 3,04$  nm, PDI değeri  $0,212 \pm 0,015$  zeta potansiyel değeri  $-7,08 \pm 1,49$  mV olarak belirlenmiştir. Ölçülen misel karakteristik değerleri (boyut ve PDI değerleri) hedeflenen aralıkta (boyut < 150 nm, PDI < 0,3) elde edilmiştir. Nanoçöktürme yöntemi %65 reaksiyon verimi ile gerçekleştirilmiş, enkapsülasyon etkinliği %62 ve ilaç yükleme kapasitesi %12,5 olarak hesaplanmıştır. PCL blok uzunluğunun hedeflenilenden kısa olması % EE ve % YK değerlerinin düşük olmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmalar PCL blok uzunluğunun PEG blok uzunluğuna eşit ya da daha fazla

olması durumunda % EE ve % YK değerleri daha yüksek ve boyutları daha küçük miseller sentezlendiğini ancak PCL blok uzunluğu PEG blok uzunluğundan kısa olduğunda stabilite azaldığından boyutun artarak, % EE ve % YK değerlerinin azaldığını göstermektedir [164].

Juglonun PEG-*b*-PCL misellerine enkapsülasyonunu doğrulamak amacı ile FT-IR analizi yapılmış ve juglon, boş misel ve juglon yüklü misel spektrumları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde juglonun misel içerisine enkapsüle olduğu doğrulanmıştır. Ancak juglon yüklü misel spektrumunda boş misel spektrumundan farklı olarak 1650 cm<sup>-1</sup>'de görülen düşük şiddetteki band, bir miktar juglonun misel yüzeyine tutunduğunu göstermektedir. Kristal yapının incelenmesi için gerçekleştirilen XRD analizi sonuçları incelendiğinde tek başına juglonun kristal özellikte olup XRD spektrumunun karakteristik ve şiddetli pikler içerdiği, ancak juglon yüklü misel spektrumu incelendiğinde bu karakteristik şiddetli piklerin görülmediği juglonun misellere enkapsüle olarak amorf bir yapının elde edildiği görülmektedir. Misellerin morfolojik karakterizasyonu için yapılan AFM ve SEM analiz sonuçları küresel ve boyut dağılımı DLS metodu sonuçları ile paralellik gösteren misellerin sentezlendiği doğrulanmıştır.

Misellerin *in-vitro* salım profili incelendiğinde salımın ilk 6 saatte % 63'e ulaşarak patlama salımı (burst release) gerçekleştiği görülmektedir. Salım 7. gün sonunda %68'e ulaşmıştır. Salımın hızlı gerçekleşmesinin nedeni PCL blok uzunluğunun kısa olması ile ilişkilendirilmiştir. PCL bozunma hızı yavaş olan bir polimerdir, istenilen PCL blok uzunluğu sağlanamadığından, çekirdek kısmını oluşturan PCL blok daha kısa kalmış ve bu durum juglonun salım profilinin hızlı olmasına neden olmuştur. Ancak sentezlenen nanotaşıyıcı formülasyonunun topikal uygulamalar için kullanılması düşünüldüğünden ve yüzeysel mantar enfeksiyonları hızlı seyredip yayılarak hızlı bir şekilde tedavi gerektirdiğinden bu salım profilinin hedeflenen tedavi için uygunluk gösterdiği değerlendirilmiştir.

Misellerin antifungal aktivitesinin belirlenmesi için gerçekleştirilen agar dilüsyon metodu sonuçları incelendiğinde serbest juglon ve juglon yüklü misellerin minimum fungisidal konsantrasyonu (MFK) değerlerinin 3 mikroorganizma için de serbest juglon ve misel için aynı olduğu tespit edilmiştir. Ancak minimum

inhibitör konsantrasyonu (MİK) sonuçları *A.flavus* ve *Fusarium spp.* için juglon yüklü misellerin serbest juglona göre daha düşük konsantrasyonda büyümeyi daha çok inhibe ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar *A.flavus* ve *Fusarium spp.* için nanotaşıyıcı sistemin serbest juglona göre daha yüksek antifungal etkinliği olduğunu göstermektedir.

İleriki çalışmalarda antifungal etkinliğin artırılabilmesi için antimikrobiyal peptidler sınıfına giren histidin aminoasidi içeriği bakımından zengin histatin peptidleri ile fonksiyonelleştirilmiş misellerin sentezlenmesi planlanmaktadır. Histatin ile hedeflendirilmiş etkin madde yüklü misellerin hem etkin madde hem de hedefleyici peptid varlığı ile oluşacak sinerjik etki sonucunda daha düşük dozlarda daha yüksek antifungal aktivite gösterebileceği ön görülmektedir. Böylece MFK konsantrasyonlarının düşürülebileceği değerlendirilmiştir.

Bunun yanı sıra PCL-PEG-PCL triblok kopolimerinin kullanılması ile sentezlenebilecek çiçek benzeri yapıdaki miseller ile daha yüksek stabilite, daha büyük çekirdek ve bu sayede artan etkin madde yükleme kapasitesi ile iyileştirilen fizikokimyasal özellikler sonucunda biyoyararlanım ve biyoaktivitenin de artırılabilceği öngörülmektedir.

## KAYNAKÇA

---

- [1] B. Kischkel, S. A. Rossi, S. R. Santos, J. D. Nosanchuk, L. R. Travassos, and C. P. Taborda, “Therapies and Vaccines Based on Nanoparticles for the Treatment of Systemic Fungal Infections,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10, no. 463, 2020.
- [2] K. M. Pianalto and J. A. Alspaugh, “New Horizons in Antifungal Therapy,” *Journal of Fungi 2016*, vol. 2, no. 4, pp. 26, 2016.
- [3] S. Y. Chon, H. Q. Doan, R. M. Mays, S. M. Singh, R. A. Gordon, and S. K. Tyring, “Antibiotic overuse and resistance in dermatology,” *Dermatologic Therapy*, vol. 25, no. 1, pp. 55–69, 2012.
- [4] A. Zielinska *et al.*, “Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, 2020.
- [5] A. Malaiya, D. Jain, and A. K. Yadav, “Nanoparticles and pancreas cancer,” *Nano Drug Delivery Strategies for the Treatment of Cancers*, pp. 145–164, 2021.
- [6] G. Pasut and F. M. Veronese, “Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies,” *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no. 8–9, pp. 933–961, 2007.
- [7] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, and U. S. Schubert, “Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 36, pp. 6288–6308, 2010.
- [8] M. Gou *et al.*, “Self-assembled hydrophobic honokiol loaded MPEG-PCL diblock copolymer micelles,” *Pharmaceutical Research*, vol. 26, no. 9, pp. 2164–2173, 2009.
- [9] E. M. Carmona and A. H. Limper, “Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections,” *Clinics in Chest Medicine*, vol. 38, no. 3, pp. 393–402, 2017.
- [10] M. D. Lenardon, C. A. Munro, and N. A. R. Gow, “Chitin synthesis and fungal pathogenesis,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 4, pp. 416–423, 2010.
- [11] R. Vassallo, J. E. Standing, and A. H. Limper, “Isolated *Pneumocystis carinii* Cell Wall Glucan Provokes Lower Respiratory Tract Inflammatory Responses,” *The Journal of Immunology*, vol. 164, no. 7, pp. 3755–3763, 2000.
- [12] G. Garber, “An overview of fungal infections,” *Drugs*, vol. 61, no. SUPPL. 1, pp. 1–12, 2001.
- [13] G. D. Brown, D. W. Denning, N. A. R. Gow, S. M. Levitz, M. G. Netea, and T. C. White, “Hidden killers: Human fungal infections,” *Science Translational Medicine*, vol. 4, no. 165, 2012.

- [14] M. Rai *et al.*, *Nanotechnology for the Treatment of Fungal Infections on Human Skin*, 1st ed., vol. 2. Elsevier Inc., 2017.
- [15] Y. L. Chang, S. J. Yu, J. Heitman, M. Wellington, and Y. L. Chen, “New facets of antifungal therapy,” vol. 8, no. 2, pp. 222–236, 2016.
- [16] A. Gullo, “Invasive fungal infections: the challenge continues,” *Drugs*, vol. 69 Suppl 1, pp. 65–73, 2009.
- [17] M. Karthaus, “Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin: review of the literature,” *European journal of medical research*, vol. 16, no. 4, pp. 145–152, 2011.
- [18] M. Bassetti, M. Peghin, and J. F. Timsit, “The current treatment landscape: candidiasis,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 71, no. suppl\_2, pp. ii13–ii22, 2016.
- [19] P. G. Pappas, “Invasive Candidiasis,” *Infectious Disease Clinics*, vol. 20, no. 3, pp. 485–506, 2006.
- [20] M. A. Pfaller, P. G. Pappas, and J. R. Wingard, “Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 43, no. Supplement\_1, pp. S3–S14, 2006.
- [21] J. L. Vincent *et al.*, “International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units,” *JAMA*, vol. 302, no. 21, pp. 2323–2329, 2009.
- [22] D. S. Perlin, R. Rautemaa-Richardson, and A. Alastruey-Izquierdo, “The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 17, no. 12, pp. e383–e392, 2017.
- [23] E. K. Spaitakis, G. Aperis, and E. Mylonakis, “New agents for the treatment of fungal infections: Clinical efficacy and gaps in coverage,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 43, no. 8, pp. 1060–1068, 2006.
- [24] F. C. Odds, A. J. P. Brown, and N. A. R. Gow, “Antifungal agents: Mechanisms of action,” *Trends in Microbiology*, vol. 11, no. 6, pp. 272–279, 2003.
- [25] S. Nami, A. Aghebati-Maleki, H. Morovati, and L. Aghebati-Maleki, “Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 110, pp. 857–868, 2019.
- [26] Y. Yeğenoğlu, “Antifungal direnci gösteren mantarlar,” *Ankem Dergi*, vol. 26, no. 2, pp. 254–260, 2012.
- [27] S. Nami *et al.*, “The Utilization of RNA Silencing Technology to Mitigate the Voriconazole Resistance of *Aspergillus Flavus*; Lipofectamine-Based Delivery,” *Advanced pharmaceutical bulletin*, vol. 7, no. 1, pp. 53–59, 2017.
- [28] N. H. Georgopapadakou and T. J. Walsh, “Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies,” *Antimicrobial*

*agents and chemotherapy*, vol. 40, no. 2, pp. 279–291, 1996.

- [29] D. J. Sheehan, C. A. Hitchcock, and C. M. Sibley, “Current and emerging azole antifungal agents,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 40–79, 1999.
- [30] R. E. Lewis and D. P. Kontoyiannis, “Rationale for Combination Antifungal Therapy,” *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 21, no. 8P2, pp. 149S-164S, 2001.
- [31] A. C. O. Souza and A. C. Amaral, “Antifungal therapy for systemic mycosis and the nanobiotechnology era: Improving efficacy, biodistribution and toxicity,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. MAR, p. 336, 2017.
- [32] D. W. Denning, “Echinocandin antifungal drugs,” *The Lancet*, vol. 362, no. 9390, pp. 1142–1151, 2003.
- [33] M. A. Pfaller *et al.*, “In vitro susceptibility of invasive isolates of candida spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 150–156, 2008.
- [34] S. Nami, A. Aghebati-Maleki, H. Morovati, and L. Aghebati-Maleki, “Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 110, pp. 857–868, 2019.
- [35] M. Krogh-Madsen, M. C. Arendrup, L. Heslet, and J. D. Knudsen, “Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, no. 7, pp. 938–944, 2006.
- [36] L. Y. Young, C. M. Hull, and J. Heitman, “Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 9, p. 2717, 2003.
- [37] O. A. Comely *et al.*, “Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: A randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad Trial),” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 44, no. 10, pp. 1289–1297, 2007.
- [38] R. Duschinsky, Pleven Edward, and Heidelberger Charles, “The synthesis of 5-Fluoropyrimidines,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 79, no. 16, pp. 4559–4560, 1957.
- [39] A. H. Groll, J. C. Gea-Banacloche, A. Glasmacher, G. Just-Nuebling, G. Maschmeyer, and T. J. Walsh, “Clinical pharmacology of antifungal compounds,” *Infectious disease clinics of North America*, vol. 17, no. 1, pp. 159–191, 2003.
- [40] R. E. Lewis, “Pharmacodynamic implications for use of antifungal agents,” *Current opinion in pharmacology*, vol. 7, no. 5, pp. 491–497, 2007.
- [41] R. B. Diasio, D. E. Lakings, and J. E. Bennett, “Evidence for conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in humans: possible factor in 5-fluorocytosine clinical toxicity,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

vol. 14, no. 6, p. 903, 1978.

- [42] B. E. Harris, B. W. Manning, T. W. Federle, and R. B. Diasio, "Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by human intestinal microflora," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 29, no. 1, p. 44, 1986.
- [43] A. Vermes, E. J. Kuijper, H. J. Guchelaar, and J. Dankert, "An in vitro study on the active conversion of flucytosine to fluorouracil by microorganisms in the human intestinal microflora," *Chemotherapy*, vol. 49, no. 1–2, pp. 17–23, 2003.
- [44] A. R. Voltan, G. Quindós, K. P. M. Alarcón, A. M. Fusco-Almeida, M. J. S. Mendes-Giannini, and M. Chorilli, "Fungal diseases: Could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy?," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 11, pp. 3715–3730, 2016.
- [45] R. Saka and N. Chella, "Nanotechnology for delivery of natural therapeutic substances: a review," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 19, no. 2, pp. 1097–1106, 2021.
- [46] A. R. Bilia *et al.*, "Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs," *Planta Medica*, vol. 83, no. 5, pp. 366–381, 2017.
- [47] Y. Barenholz, "Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned," *Journal of Controlled Release*, vol. 160, no. 2, pp. 117–134, 2012.
- [48] V. Balzani, "Nanoscience and Nanotechnology: A Personal View of a Chemist," *Small*, vol. 1, no. 3, pp. 278–283, 2005.
- [49] A. Bhattacharyya, P. Duraisamy, M. Govindarajan, A. A. Buhroo and R. Prasad, "Nano-biofungicides: emerging trend in insect pest control," *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology*, Springer, Cham, pp. 307-319, 2016.
- [50] A. Misra and A. Shahiwala, "Applications of polymers in drug delivery," Elsevier, 2020.
- [51] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [52] Y. Nakamura, A. Mochida, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, "Nanodrug delivery: is the enhanced permeability and retention effect sufficient for curing cancer?," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 27, no. 10, pp. 2225–2238, 2016.
- [53] M. L. Focarete and A. Tampieri, "Core-shell nanostructures for drug delivery and theranostics: Challenges, strategies, and prospects for novel carrier systems," *Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics: Challenges, Strategies, and Prospects for Novel Carrier Systems*, pp. 1–453, 2018.
- [54] D. Lombardo, M. A. Kiselev, and M. T. Caccamo, "Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine," *Journal of Nanomaterials*, 2019.

- [55] A. Gagliardi *et al.*, “Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, pp. 17, 2021.
- [56] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, and O. C. Farokhzad, “Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release,” *Chemical Reviews*, vol. 116, no. 4, pp. 2602–2663, 2016.
- [57] Z. Zhang, P. C. Tsai, T. Ramezanli, and B. B. Michniak-Kohn, “Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases,” *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, vol. 5, no. 3, pp. 205–218, 2013.
- [58] J. Panyam and V. Labhasetwar, “Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 55, no. 3, pp. 329–347, 2003.
- [59] I. Armentano *et al.*, “Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering,” *Progress in Polymer Science*, vol. 38, no. 10–11, pp. 1720–1747, 2013.
- [60] Y. Qi and A. Chilkoti, “Protein–polymer conjugation — moving beyond PEGylation,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 28, pp. 181–193, 2015.
- [61] S. Acharya and S. K. Sahoo, “PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 3, pp. 170–183, 2011.
- [62] F. Ungaro *et al.*, “Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers,” *Journal of Controlled Release*, vol. 157, no. 1, pp. 149–159, 2012.
- [63] S. Mohammadi-Samani and B. Taghipour, “PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches,” *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 20, no. 4, pp. 385–393, 2015.
- [64] N. Rescignano *et al.*, “In-vitro degradation of PLGA nanoparticles in aqueous medium and in stem cell cultures by monitoring the cargo fluorescence spectrum,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 134, pp. 296–304, 2016.
- [65] X. Zhang, M. Sun, A. Zheng, D. Cao, Y. Bi, and J. Sun, “Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, no. 5, pp. 632–638, 2012.
- [66] P. Grossen, D. Witzigmann, S. Sieber, and J. Huwyler, “PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application,” *Journal of Controlled Release*, vol. 260, pp. 46–60, 2017.
- [67] K. M. El-Say and H. S. El-Sawy, “Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 528, no. 1–2, pp. 675–691, 2017.
- [68] M. Rai, M. Razzaghi Abyaneh, and A. P. Ingle, “Nanobiotechnology in

- diagnosis, drug delivery and treatment". John Wiley&Sons, 2020.
- [69] S. Derman, K. Kizilbey, and Z. M. Akdeste, "Polymeric nanoparticles", *Sigma*, 31, pp. 107-120, 2013.
- [70] U. Bazylińska, A. Lewińska, Ł. Lamch, and K. A. Wilk, "Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 442, pp. 42–49, 2014.
- [71] A. M. Caminade, R. Laurent, and J. P. Majoral, "Characterization of dendrimers.," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 15, pp. 2130–2146, 2005.
- [72] T. Betancourt, A. Doiron, K. A. Homan, and L. Brannon-Peppas, "Controlled release and nanotechnology," *Nanotechnology in drug delivery*, Springer, pp. 283–312, 2009.
- [73] S. Svenson and D. A. Tomalia, "Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 57, no. 15, pp. 2106–2129, 2005.
- [74] R. Trivedi and U. B. Kompella, "Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles," *Nanomedicine*, vol. 5, no. 3, pp. 485–505, 2010.
- [75] Y. Y. Diao *et al.*, "Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells.," *International journal of nanomedicine*, vol. 6, pp. 1955–1962, 2011.
- [76] A. Kumar, H. M. Mansour, A. Friedman and E. R. Blough, "Nanomedicine in drug delivery," Boca Raton FL:CRD Press, p. 445, 2013.
- [77] A. Kapse, N. Anup, V. Patel, G. K. Saraogi, D. K. Mishra, and R. K. Tekade, "Polymeric micelles: a ray of hope among new drug delivery systems," *Drug Delivery Systems*, pp. 235–289, 2020.
- [78] K. Letchford, R. Liggins, and H. Burt, "Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: theoretical and experimental data and correlations," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 3, pp. 1179–1190, 2008.
- [79] S. R. Croy and G. S. Kwon, "Polymeric Micelles for Drug Delivery," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 12, no. 36, pp. 4669–4684, 2006.
- [80] K. Miyata, R. J. Christie, and K. Kataoka, "Polymeric micelles for nano-scale drug delivery," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 71, no. 3, pp. 227–234, 2011.
- [81] V. P. Torchilin, "Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives," *Pharmaceutical research*, vol. 24, no. 1, pp. 1–16, 2007.
- [82] M. L. Forrest, J. A. Yáñez, C. M. Remsberg, Y. Ohgami, G. S. Kwon, and N. M. Davies, "Paclitaxel Prodrugs with Sustained Release and High Solubility in Poly(ethylene glycol)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) Micelle Nanocarriers:

- Pharmacokinetic Disposition, Tolerability, and Cytotoxicity,” *Pharmaceutical research*, vol. 25, no. 1, p. 194, 2008.
- [83] M. P. Xiong *et al.*, “Formulation of a Geldanamycin Prodrug in mPEG-b-PCL Micelles Greatly Enhances Tolerability and Pharmacokinetics in Rats,” *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, vol. 129, no. 1, p. 33, 2008.
- [84] D. Kakkar *et al.*, “Amphiphilic PEO-b-PBLG Diblock and PBLG-b-PEO-b-PBLG Triblock Copolymer Based Nanoparticles: Doxorubicin Loading and In Vitro Evaluation,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 15, no. 1, pp. 124–137, 2015.
- [85] A. C. Miller, A. Bershteyn, W. Tan, P. T. Hammond, R. E. Cohen, and D. J. Irvine, “Block copolymer micelles as nanocontainers for controlled release of proteins from biocompatible oil phases,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 4, pp. 732–741, 2009.
- [86] Z. Zhang, D. W. Grijpma, and J. Feijen, “Thermo-sensitive transition of monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) films to micellar-like nanoparticles,” *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, vol. 112, no. 1, pp. 57–63, 2006.
- [87] C. Zhang, J. W. Chung, and R. D. Priestley, “Dialysis Nanoprecipitation of Polystyrene Nanoparticles,” *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, no. 20, pp. 1798–1803, 2012.
- [88] K. Tauer, R. Deckwer, I. Kühn, and C. Schellenberg, “A comprehensive experimental study of surfactant-free emulsion polymerization of styrene,” *Colloid and Polymer Science*, vol. 277, no. 7, pp. 607–626, 1999.
- [89] R. Jenjob *et al.*, “Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 19, no. 6, p. 1900063, 2019.
- [90] D. Fischer, “Polymeric Drug Delivery Systems for Encapsulating Hydrophobic Drugs,” *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, pp. 199–223, 2013.
- [91] D. Moinard-Checot, Y. Chevalier, S. Briançon, H. Fessi, and S. Guinebretière, “Nanoparticles for drug delivery: Review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process,” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, no. 9–10, pp. 2664–2681, 2006.
- [92] D. Moinard-Chécot, Y. Chevalier, S. Briançon, L. Beney, and H. Fessi, “Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process,” *Journal of colloid and interface science*, vol. 317, no. 2, pp. 458–468, 2008.
- [93] J. Leroux, E. Allémann, E. Doelker, and R. Gurny, “New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method,” *European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics*, 41, 14, 1995.
- [94] P. Lertsutthiwong, K. Noomun, N. Jongaroonngamsang, P. Rojsitthisak, and U. Nimmannit, “Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric

- oil,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 2, no. 74, pp. 209–214, 2008.
- [95] A. L. Lima, T. Gratieri, M. Cunha-Filho, and G. M. Gelfuso, “Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose,” *Methods*, 2021.
- [96] T. Urbaniak and W. Musiał, “Influence of Solvent Evaporation Technique Parameters on Diameter of Submicron Lamivudine-Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Conjugate Particles,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 9, 2019.
- [97] S. Talegoankar, Tariq Mohammad, and Z. Iqbal, “Formulations of Nanoparticles in Drug Delivery,” *Nanomedicine in Drug Delivery*, pp. 255–302, 2013.
- [98] M. Mahalingam and K. Krishnamoorthy, “Selection of a Suitable Method for the Preparation of Polymeric Nanoparticles: Multi-Criteria Decision Making Approach,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 5, no. 1, p. 57, 2015.
- [99] L. Lyu *et al.*, “Cover Image, Volume 138, Issue 45,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 138, no. 45, p. 51585, 2021.
- [100] R. H. Fang and L. Zhang, “Dispersion-Based Methods for the Engineering and Manufacture of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery Applications,” *undefined*, vol. 1, no. 1, pp. 106–112, 2011.
- [101] J. Jung and M. Perrut, “Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey,” *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 20, no. 3, pp. 179–219, 2001.
- [102] Y. P. Sun, M. J. Meziari, P. Pathak, and L. Qu, “Polymeric Nanoparticles from Rapid Expansion of Supercritical Fluid Solution,” *Chemistry – A European Journal*, vol. 11, no. 5, pp. 1366–1373, 2005.
- [103] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissagnet, N. Ammoury, and S. Benita, “Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 55, no. 1, pp. R1–R4, 1989.
- [104] K. Miladi, S. Sfar, H. Fessi, and A. Elaissari, “Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications,” *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, pp. 17–53, 2016.
- [105] C. J. Martínez Rivas *et al.*, “Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery,” *International journal of pharmaceutics*, vol. 532, no. 1, pp. 66–81, 2017.
- [106] S. Galindo-Rodriguez, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, “Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods,” *Pharmaceutical Research*, vol. 21, no. 8, pp. 1428–1439, 2004.
- [107] C. J. Martínez Rivas *et al.*, “Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 532, no. 1, pp. 66–81, 2017.
- [108] Jeong Soon Jang, So Yeon Kim, Sang Bong Lee, Kyung Ok Kim, Joong Soo

- Han, and Young Moo Lee, "Poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) diblock copolymeric nanoparticles for non-viral gene delivery: The role of charge group and molecular weight in particle formation, cytotoxicity and transfection," *Journal of Controlled Release*, vol. 113, no. 2, pp. 173–182, 2006.
- [109] M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, and G. Golomb, "Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics," *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, vol. 83, no. 3, pp. 389–400, 2002.
- [110] A. Rai, S. Senapati, S. K. Saraf, and P. Maiti, "Biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone) as a controlled drug delivery vehicle of vancomycin for the treatment of MRSA infection," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, no. 30, pp. 5151–5160, 2016.
- [111] J. P. Raval, D. R. Naik, K. A. Amin, and P. S. Patel, "Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres," *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, no. 5, pp. 566–573, 2014.
- [112] H. J. Haroosh, Y. Dong, and K. T. Lau, "Tetracycline hydrochloride (TCH)-loaded drug carrier based on PLA:PCL nanofibre mats: Experimental characterisation and release kinetics modelling," *Journal of Materials Science*, vol. 49, no. 18, pp. 6270–6281, 2014.
- [113] A. T. Alex, A. Joseph, G. Shavi, J. V. Rao, and N. Udupa, "Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery," *Drug delivery*, vol. 23, no. 7, pp. 2144–2153, 2014.
- [114] N. Kasinathan, M. Amirthalingam, N. D. Reddy, H. V. Jagani, S. M. Volety, and J. V. Rao, "In-situ implant containing PCL-curcumin nanoparticles developed using design of experiments," *Drug delivery*, vol. 23, no. 3, pp. 1017–1025, 2014.
- [115] J. Suksiriworapong, K. Sripha, J. Kreuter, and V. B. Junyaprasert, "Comparative Study of Ibuprofen and Indomethacin Loaded Poly(caprolactone) Nanoparticles : Physicochemical Properties," *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 37, pp. 17–27, 2010.
- [116] K. H. Hsu, S. P. Fang, C. L. Lin, Y. S. Liao, Y. K. Yoon, and A. Chauhan, "Hybrid Electrospun Polycaprolactone Mats Consisting of Nanofibers and Microbeads for Extended Release of Dexamethasone," *Pharmaceutical research*, vol. 33, no. 6, pp. 1509–1516, 2016.
- [117] S. Nandhakumar, M. D. Dhanaraju, V. D. Sundar, and B. Heera, "Influence of surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles," *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, vol. 55, no. 2, pp. 249–258, 2017.
- [118] D. Hernan Perez De La Ossa *et al.*, "Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy,"

*Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 3, pp. 927–932, 2012.

- [119] S. Elhasi, R. Astaneh, and A. Lavasanifar, “Solubilization of an amphiphilic drug by poly(ethylene oxide)-block-poly(ester) micelles,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 65, no. 3, pp. 406–413, 2007.
- [120] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, “Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review,” *Journal of Controlled Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [121] R. Feng *et al.*, “Glycyrrhetic acid-modified PEG-PCL copolymeric micelles for the delivery of curcumin,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. 111, pp. 30–37, 2017.
- [122] A. Chroni, T. Mavromoustakos, and S. Pispas, “Biocompatible PEO-b-PCL Nanosized Micelles as Drug Carriers: Structure and Drug–Polymer Interactions,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 9, p. 1872, 2020.
- [123] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E. M. Lima, and D. E. Discher, “Micelles of different morphologies - Advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery,” *Pharmaceutical Research*, vol. 24, no. 11, pp. 2099–2109, 2007.
- [124] N. Dubey *et al.*, “Preparation and biological evaluation of paclitaxel loaded biodegradable PCL/PEG nanoparticles for the treatment of human neuroendocrine pancreatic tumor in mice.,” *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 9–15.
- [125] A. Eatemadi, H. Daraee, H. T. Aiyelabegan, B. Negahdari, B. Rajeian, and N. Zarghami, “Synthesis and Characterization of Chrysin-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticle and its effect on breast cancer cell line,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 84, pp. 1915–1922, 2016.
- [126] A. A., M. J.R., P. N.C., V. E. T., and D. F.F., “Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, no. 11, pp. 3582-3586, 1977.
- [127] A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palczuk, and F. F. Davis, “Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, no. 11, pp. 3578–3581, 1977.
- [128] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, “Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery,” *Nature biotechnology*, vol. 33, no. 9, p. 941, 2015.
- [129] S. Bamrungsap *et al.*, “Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system,” *Nanomedicine*, vol. 7, no. 8, pp. 1253–1271, 2012.
- [130] M. L. Gou *et al.*, “Improving anticancer activity and reducing systemic toxicity of doxorubicin by self-assembled polymeric micelles,” *Nanotechnology*, vol. 22, no. 9, p. 095102, 2011.
- [131] H. Danafar, S. Davaran, K. Rostamizadeh, H. Valizadeh, and M. Hamidi,

- “Biodegradable m-PEG/PCL Core-Shell Micelles: Preparation and Characterization as a Sustained Release Formulation for Curcumin,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 4, no. Suppl 2, p. 501, 2014.
- [132] J. Zhao *et al.*, “Celastrol-loaded PEG-PCL nanomicelles ameliorate inflammation, lipid accumulation, insulin resistance and gastrointestinal injury in diet-induced obese mice,” *Journal of Controlled Release*, vol. 310, pp. 188–197, 2019.
- [133] M. Colaric, R. Veberic, A. Solar, M. Hudina, and F. Stampar, “Phenolic Acids, Syringaldehyde, and Juglone in Fruits of Different Cultivars of *Juglans regia* L.,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 16, pp. 6390–6396, 2005.
- [134] C. J. Soderquist, “Juglone and allelopathy,” *Journal of chemical education*, vol. 50, no. 11, pp. 782–783, 1973.
- [135] W. J. Rietveld, “Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species,” *Journal of Chemical Ecology* 1983 9:2, vol. 9, no. 2, pp. 295–308, 1983.
- [136] V. Chobot and F. Hadacek, “Milieu-dependent pro- and antioxidant activity of juglone may explain linear and nonlinear effects on seedling development,” *Journal of Chemical Ecology*, vol. 35, no. 3, pp. 383–390, 2009.
- [137] A. Masek, E. Chrzescijanska, M. Latos-Brozio, and M. Zaborski, “Characteristics of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) using voltammetry and spectrophotometric methods,” *Food Chemistry*, vol. 301, p. 125279, 2019.
- [138] B. Kiran Aithal, M. R. Sunil Kumar, B. Nageshwar Rao, N. Udupa, and B. S. Satish Rao, “Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells,” *Cell Biology International*, vol. 33, no. 10, pp. 1039–1049, 2009.
- [139] X. B. Zhang, C. L. Zou, Y. X. Duan, F. Wu, and G. Li, “Activity guided isolation and modification of juglone from *Juglans regia* as potent cytotoxic agent against lung cancer cell lines,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2015.
- [140] H. Xu, X. Yu, S. Qu, and D. Sui, “Juglone, isolated from *Juglans mandshurica* Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 23, no. 12, pp. 3631–3634, 2013.
- [141] R. C. Montenegro *et al.*, “Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative,” *Chemico-Biological Interactions*, vol. 184, no. 3, pp. 439–448, 2010.
- [142] J. Cui and J. Jia, “Discovery of juglone and its derivatives as potent SARS-CoV-2 main proteinase inhibitors,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 225, p. 113789, 2021.
- [143] J. Wang *et al.*, “Antibacterial Activity of Juglone against *Staphylococcus*

- aureus: From Apparent to Proteomic,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 6, 2016.
- [144] X. Hou *et al.*, “Allelopathic inhibition of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on the growth and physiological performance in *Microcystis aeruginosa*,” *Journal of Environmental Management*, vol. 232, pp. 382–386, 2019.
- [145] A. M. Clark, T. M. Jurgens, and C. D. Hufford, “Antimicrobial activity of juglone,” *Phytotherapy Research*, vol. 4, no. 1, pp. 11–14, 1990.
- [146] D. Wianowska, S. Garbaczewska, A. Cieniecka-Roslonkiewicz, A. L. Dawidowicz, and A. Jankowska, “Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone,” *Microbial Pathogenesis*, vol. 100, pp. 263–267, 2016.
- [147] A. Karagöz and S. Dinçer, “Microwave-Assisted Synthesis of Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-block-poly(ethylene glycol) and Poly(lactide)-block-poly(ethylene glycol),” *Macromolecular Symposia*, vol. 295, no. 1, pp. 131–137, 2010.
- [148] S. V. K. Rompicharla, P. Trivedi, P. Kumari, P. Ghanta, B. Ghosh, and S. Biswas, “Polymeric micelles of suberoylanilide hydroxamic acid to enhance the anticancer potential in vitro and in vivo,” *Nanomedicine*, vol. 12, no. 1, pp. 43–58, 2017.
- [149] M. Topuzogullari, V. Bulmus, E. Dalgakiran, and S. Dincer, “PH- and temperature-responsive amphiphilic diblock copolymers of 4-vinylpyridine and oligoethyleneglycol methacrylate synthesized by RAFT polymerization,” *Polymer*, vol. 55, no. 2, pp. 525–534, 2014.
- [150] A. Minost, J. Delaveau, M.-A. Bolzinger, H. Fessi, and A. Elaissari, “Nanoparticles via Nanoprecipitation Process,” *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, vol. 6, no. 3, pp. 250–258, 2012.
- [151] M. Zamani, A. Shirinzadeh, M. Aghajanzadeh, S. Andalib, and H. Danafar, “In vivo study of mPEG–PCL as a nanocarriers for anti-inflammatory drug delivery of simvastatin,” *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 24, no. 6, pp. 663–670, 2019.
- [152] T. Arasoglu *et al.*, “Synthesis, characterization and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 123, no. 6, pp. 1407–1419, 2017.
- [153] H. Danafar, S. Davaran, K. Rostamizadeh, H. Valizadeh, and M. Hamidi, “Biodegradable m-PEG/PCL core-shell micelles: Preparation and characterization as a sustained release formulation for curcumin,” *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, vol. 4, no. Suppl 2, pp. 501–510, 2014.
- [154] Z. Song, W. Zhu, N. Liu, F. Yang, and R. Feng, “Linolenic acid-modified PEG-PCL micelles for curcumin delivery,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 471, no. 1–2, pp. 312–321, 2014.
- [155] H. Nosrati, P. Barzegari, H. Danafar, and H. Kheiri Manjili, “Biotin-functionalized copolymeric PEG-PCL micelles for in vivo tumour-targeted

- delivery of artemisinin,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 47, no. 1, pp. 104–114, 2019.
- [156] M. Kovaliov *et al.*, “Extended-release of opioids using fentanyl-based polymeric nanoparticles for enhanced pain management,” *RSC Advances*, vol. 7, no. 76, pp. 47904–47912, 2017.
- [157] Y. Xi, T. Song, S. Tang, N. Wang, and J. Du, “Preparation and Antibacterial Mechanism Insight of Polypeptide-Based Micelles with Excellent Antibacterial Activities,” *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 12, pp. 3922–3930, 2016.
- [158] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, “Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods,” *Nanotechnology*, vol. 27, no. 2, p. 025103, 2015.
- [159] T. Arasoglu *et al.*, “Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) Using a Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticle System,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 64, no. 38, pp. 7087–7094, 2016.
- [160] Z. Karami, S. Sadighian, K. Rostamizadeh, M. Parsa, and S. Rezaee, “Naproxen conjugated mPEG-PCL micelles for dual triggered drug delivery,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 61, pp. 665–673, 2016.
- [161] C. Shen, S. Guo, and C. Lu, “Degradation behaviors of star-shaped poly(ethylene glycol)–poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles in aqueous solution,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 92, no. 10, pp. 1891–1898, 2007.
- [162] Ö. Topel, B. A. Çakir, L. Budama, and N. Hoda, “Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 177, pp. 40–43, 2013.
- [163] L. Guo *et al.*, “Renewable juglone nanowires with size-dependent charge storage properties,” *RSC Advances*, vol. 8, no. 4, pp. 2077–2081, 2018.
- [164] Y. Liang *et al.*, “Chain length effect on drug delivery of chrysin modified mPEG–PCL micelles,” *RSC Advances*, vol. 5, no. 73, pp. 59014–59021, 2015.

## TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

---

### Konferans Bildirileri

1. M. Isık, M. Topuzogulları , S. Derman. “Synthesis and characterization of juglone loaded PEG-b-PCL polymeric micelles using nanoprecipitation method”, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara/Türkiye, 19-20 Mart 2020.

### Projeler

1. Nanoçöktürme Yöntemi ile Biyoaktif Polietilen Glikol-*b*-Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Üretimi, Doç. Dr. Serap Derman (Yürütücü), Melis Işık Toksoy (Araştırmacı), YÜLAP FYL-2019-3752, 22.11.2019-22.02.2022.