



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



SIĞIR SERUM ALBUMİN NANOPARÇACIKLARININ

ÜRETİMİ VE KONTROLLÜ KLORAMFENİKOL

SALIMINDA KULLANIMI

Leyla YEŞİLÇİNAR

Kimya Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIĞIR SERUM ALBUMİN NANOPARÇACIKLARININ
ÜRETİMİ VE KONTROLLÜ KLORAMFENİKOL
SALIMINDA KULLANIMI

Leyla YEŞİLÇİNAR

Kimya Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 06/07/2017

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Cahit AKGÜL

ANAkkALE

Leyla YEŞİLÇİNAR tarafından Prof. Dr. Cahit AKGÜL yönetiminde hazırlanan ve 06/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan **“Sığır Serum Albumin Nanoparçacıklarının Üretimi ve Kontrollü Kloramfenikol Salımında Kullanımı”** başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Ali KILINÇ

Başkan

Prof. Dr. Cahit AKGÜL

Üye

Doç. Dr. Ayhan ORAL

Üye

.....

.....

.....

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2016-1003

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Leyla YEŞİLÇİNAR

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Cahit AKGÜL, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen Araş. Gör. Arif Sercan ŞAHUTOĞLU, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının Bilimsel Araştırma Projesi (FYL-2016-1003) olarak gerçekleştirmesine maddi destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına ayrıca teşekkür ederim.

Leyla YEŞİLÇİNAR
Çanakkale, Temmuz 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Celsius derece
µg	Mikrogram
AZI	Azitromisin
BBB	Kan-beyin bariyeri
BRT	Britton Robinson tamponu
BSA	Sığır serum albumini
CH ₃ COOH	Asetik asit
tCNS	Merkezi sinir sistemi
Da	Dalton
dk	Dakika
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DOX	Doksorubisin (Doxorubicin)
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FACS	Floresan Aktive Hücre Ayırma
G	Gram
H ₃ BO ₄	Borik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPMC	(Hidroksi propil) metil selüloz
HSA	İnsan Serum Albumini
ISFI	<i>In-situ</i> şekillendirme implantları
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
NaBH ₄	Sodyum borhidrür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
OX26	Transferrin antikoru

PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pI	İzoelektrik nokta
PLGA	Poli laktik-ko glikolik asit
Ppm	Milyonda bir kısım
RAD	Arjinin-alanin-aspartik asit
RGD	Arjinin-glisin-aspartik asit
Rh B	Rodamin B
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (rounds per minute)
sa	Saat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SN	Stabilize nanoküre
TNBS	2,4,6- trinitrobenzen sülfonik asit

ÖZET

SİĞİR SERUM ALBUMİN NANOPARÇACIKLARININ ÜRETİMİ VE KONTROLLÜ KLORAMFENİKOL SALIMINDA KULLANIMI

Leyla YEŞİLÇİNAR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Cahit AKGÜL

06/07/2017, 67

Bu çalışmada Sığır Serum Albumin (BSA) proteininden desolvasyon, şok çöktürme ve dekstran polialdehit ile çapraz bağlanarak elde edilen nanoparçacıkların karakterize edilmesi ve kontrollü ilaç salım sistemi potansiyellerinin incelenmesi amaçlandı. Protein çöktürücü olarak etanol kullanıldı. BSA nanoparçacıklarının hazırlanmasında; farklı etanol-BSA çöktürme oranları, etanol-BSA çöktürme oranlarına karşı parçacık boyutunun değişimi ve farklı pH'lardaki parçacık boyutlarının değişimi gibi parametreler incelendi. Elde edilen sonuçlara göre; % 70 etanol-BSA çöktürme oranı ve pH 7 BRT ortamı nanoparçacıkların hazırlanmasında en uygun koşullar olarak belirlendi. Hazırlanan nanoparçacıkların morfoloji çalışması taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile aydınlatılarak dinamik ışık saçılımı (DLS) ile desteklendi. DLS sonuçlarına göre; desolvasyon yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutu $448,0 \pm 8,4$ nm iken şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutu $232,0 \pm 1,24$ nm olarak belirlendi.

Üretilen BSA nanoparçacıklarına rodamin B (Rh B) ve kloramfenikol yükleme çalışmaları yapıldı. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yapılan farklı miktarlarda rodamin B ve kloramfenikol yüklemesinde optimum miktar 24 mg olarak belirlendi. Şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yapılan farklı miktarlarda rodamin B ve kloramfenikol yüklemesinde optimum miktar sırasıyla 28 mg ve 32 mg olarak belirlendi. Belirlenen optimum miktarlarda yükleme yapılan yapılardan üç farklı pH da salımlar incelendi. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanmış nanoparçacıklara Rh B yüklendiğinde, 100 saatte pH 2,0'de % 49,81, pH 5,0'de % 14,79 ve pH 7,4'de % 84,22'si salınmıştır. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış nanoparçacıklara

Rh B yüklendiğinde ise, 48 saatte pH 2,0'de % 78,65, pH 5,0'de % 54,43, pH 7,4 de % 76,32 salım olduğu gözlemlendi. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanmış nanoparçacıklara kloramfenikol yüklendiğinde, 120 saatte pH 2,0'de % 20,90, pH 5,0'de % 25,41 ve pH 7,4'de % 56,50'si salınırken; şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış nanoparçacıklara kloramfenikol yüklendiğinde, 72 saatte pH 2,0'de % 14,87'sini, pH 5,0'de % 78,65'ini ve pH 7,4'de % 98,94'ünü saldığı gözlemlendi.

Anahtar sözcükler: Sığır Serum Albumini, Nanoparçacık, Kontrollü İlaç Salım Sistemi, Kloramfenikol



ABSTRACT

PRODUCTION OF BOVINE SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES AND THEIR USE IN CONTROLLED CHLORAMPHENICOL RELEASE

Leyla YESILCINAR

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Cahit AKGUL

06/07/2017, 67

In this study, Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles were prepared using desolvation, shock aggregation methods. Ethanol and dextran polyaldehyde were used as the protein precipitating agent and crosslinking agent respectively. Nanoparticles were characterized and investigated for their potential as controlled release system. Variation of particle sizes according to ethanol-BSA precipitation ratios and at different pHs were investigated. Optimum conditions were determined as 70 % ethanol-BSA ratio and pH 7 BRT. The morphologies of prepared nanoparticles were investigated using scanning electron microscopy (SEM) and supported by dynamic light scattering (DLS), According to DLS results; the size of BSA nanoparticles prepared with desolvation method was 448.0 ± 8.4 nm while the size of BSA nanoparticles prepared with shock aggregation method was 232.0 ± 1.24 nm.

When Rh B and chloramphenicol were loaded to BSA nanoparticles prepared by desolvation method, optimum amount was 24 mg. When Rh B and chloramphenicol were loaded to BSA nanoparticles prepared by shock aggregation, optimum amounts were 28 mg and 32 mg respectively. BSA nanoparticles loaded with Rh B or chloramphenicol at their optimum amounts were investigated for their release at 3 different pH values. Whilst BSA nanoparticles prepared by desolvation and loaded with Rh B, released 49.81 % at pH 2.0, 14.79 % at pH 5.0 and 84.22 % at pH 7.4 in 100 hours, BSA nanoparticles prepared by shock aggregation and loaded with Rh B, released 78.65 % at pH 2.0, 54.43 at pH 5.0, 76.32 % at pH 7.4 in 48 hours. BSA nanoparticles prepared by desolvation and loaded with chloramphenicol, released 20.90 % at pH 2.0, 25.41 % at pH 5.0 and 56.50 % at pH 7.4 in

120 hours, BSA nanoparticles prepared by shock aggregation and loaded with chloramphenicol, released 14.87 % at pH 2.0, 78.65 at pH 5.0, 98.94 % at pH 7.4 in 72 hours.

Keywords: Bovine Serum Albumin, Nanoparticle, Controlled Drug Release System, Chloramphenicol



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Protein	1
1.1.1. Proteinlerin Genel Özellikleri.....	1
1.1.2. Proteinlerin Yapısı.....	2
1.1.3. Proteinlerin Sınıflandırılması	3
1.1.4. Sığır Serum Albumini.....	3
1.1.4.1. Sığır Serum Albumininin Yapısı.....	4
1.1.5. Protein İmmobilizasyonu.....	5
1.1.5.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon	6
1.1.5.1.1. Bağlama.....	6
1.1.5.1.2. Tutuklama.....	7
1.1.5.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon	8
1.2. Nanoteknoloji.....	9
1.2.1. Nanoteknolojinin Tanımı.....	9
1.2.2. Nanoteknolojinin Gelişimi	9
1.2.3. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları	9
1.2.4. Nanoyapılar	9
1.2.4.1. Nanoyapıları Elde Etme Yöntemleri.....	11
1.2.5. Nanobiyoteknoloji	12
1.2.5.1. Nanobiyoteknolojinin Uygulama Alanları.....	12
1.3. Antibiyotikler	13
1.3.1. Antibiyotiklerin Tanımı.....	13
1.3.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması	14

1.3.2.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması.....	14
1.3.2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması	14
1.3.2.3. Antibiyotiklerin Etki Spektrumuna Göre Sınıflandırılması	16
1.3.2.4. Antibiyotiklerin Bağışıklık Düzenleyici Etkilerine Göre Sınıflandırılması	16
1.3.3. Kloramfenikol.....	17
1.3.3.1. Kloramfenikolün Keşfi Ve Yapısı	17
1.3.3.2. Kloramfenikolün Etki Mekanizması	18
1.3.3.3. Kloramfenikolün Yan Etkileri	18
1.4. Kontrollü İlaç Salımı.....	20
1.4.1. Kontrollü İlaç Salımının Tanımı	20
1.4.2. Kontrollü İlaç Salımının Gelişimi	20
1.4.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	20
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	21
2.1. Proteinlerin Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması	21
2.2. Antibiyotiklerin Kontrollü İlaç Salım Sistemleriyle Uygulamaları	24
2.3. BSA'nın Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması	26
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.1.2. Çözelti ve Reaktiflerin Hazırlanışı	30
3.1.2.1. Tampon Çözeltiler.....	30
3.1.2.2. Diğer Çözeltiler.....	31
3.1.2.3. Bradford Reaktifi	31
3.1.3. Araç ve Gereçler.....	31
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Maksimum Dalga Boyunun Tespiti.....	32
3.2.1.1. Rodamin B'nin Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti...	32
3.2.1.2. Kloramfenikolün Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti	32
3.2.2. Protein Tayini	32
3.2.3. Dekstran Oksidasyonu.....	32
3.2.4. Girişim Çalışmaları	32
3.2.4.1. Kullanılan Kimyasalların Girişim Etkilerinin İncelenmesi	32
3.2.4.2. Sodyum Borhidrürün BSA'e Girişim Etkisi	33
3.2.4.3. Sodyum Borhidrürün Rodamin B'ye Girişim Etkisi.....	33

3.2.4.4. Sodyum Borhidrürün Kloramfenikole Girişim Etkisi.....	33
3.2.5. BSA Nanoparçacıklarının Hazırlanması	33
3.2.5.1. BSA Nanoparçacıklarının Optimizasyonu	33
3.2.5.1.1. Etanol-BSA Çöktürme Optimizasyonu	33
3.2.5.1.2. Çapraz Bağlama Optimizasyonu	34
3.2.5.2. Ölçek Büyütme Çalışmaları	34
3.2.5.3. BSA Nanoparçacıklarının Üretimi	35
3.2.5.3.1. Desolvasyon Yöntemi	35
3.2.5.3.2. Şok Çöktürme Yöntemi	35
3.2.5.3.3. Çapraz Bağlama.....	35
3.2.5.3.4. İndirgeme	35
3.2.5.3.5. Yıkama.....	35
3.2.6. Rodamin B / Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Üretimi	35
3.2.7. Morfoloji Çalışmaları	36
3.2.8. İlaç Yükleme Çalışmaları	36
3.2.8.1. BSA Nanoparçacıklarına Rodamin B Yükleme.....	36
3.2.8.2. BSA Nanoparçacıklarına Kloramfenikol Yükleme	37
3.2.9. Salım Çalışması	37
3.2.9.1. Rodamin B Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması.....	37
3.2.9.2. Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması.....	38
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39
4.1. Maksimum Dalga Boyunun Tespiti	39
4.1.1. Rodamin B'nin Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti	39
4.1.2. Kloramfenikolün Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti	39
4.2. Standart Grafiklerin Oluşturulması	40
4.2.1. Rodamin B Kalibrasyon Grafiği.....	40
4.2.2. Kloramfenikol Kalibrasyon Grafiği	41
4.3. Protein Tayini.....	41
4.4. Kullanılan Kimyasalların Girişim Etkilerinin İncelenmesi.....	42
4.4.1. Sodyum Borhidrürün BSA'e Girişim Etkisi.....	43
4.4.2. Sodyum Borhidrürün Rodamin B'ye Girişim Etkisi	43
4.4.3. Sodyum Borhidrürün Kloramfenikole Girişim Etkisi	44
4.5. BSA Nanoparçacıklarının Optimizasyonu	45
4.5.1. Etanol-BSA Çöktürme Optimizasyonu	45
4.5.1.1. Farklı Etanol-BSA Oranlarında Parçacık Boyutunun İncelenmesi	45
4.5.1.2. Farklı Etanol-BSA Oranlarında Çöken Protein Miktarının Belirlenmesi...	45

4.5.1.3. Farklı pH’larda Parçacık Boyutunun İncelenmesi	46
4.5.2. Çapraz Bağlama Optimizasyonu	47
4.6. BSA Nanoparçacıklarının Hazırlanması	47
4.6.1. Desolvasyon Yöntemi	47
4.6.2. Şok Çöktürme Yöntemi	47
4.6.3. Morfoloji çalışmaları	47
4.7. Rodamin B / Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Hazırlanması	49
4.8. İlaç Yükleme Çalışmaları	50
4.8.1. BSA Nanoparçacıklarına Rodamin B Yükleme	50
4.8.2. BSA Nanoparçacıklarına Kloramfenikol Yükleme	52
4.9. Salım Çalışmaları	55
4.9.1. Rodamin B Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması	55
4.9.2. Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması	56
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Proteinlerin yapısı.....	2
Şekil 1.2. Sığır serum albuminin amino asit dizisi ve tersiyer yapısı.....	4
Şekil 1.3. Çapraz bağlama yöntemi	6
Şekil 1.4. Quantum dotların boyutların değişmesiyle yaptığı ışımlar.....	10
Şekil 1.5. Karbon nanotüp	11
Şekil 1.6. Quantum dot	11
Şekil 1.7. Kloramfenikolün yapısı	18
Şekil 1.8. Tiamfenikolün yapısı	18
Şekil 1.9. İlacın zamana karşı kontrollü salımı.....	19
Şekil 4.1. Rodamin B'nin soğurma yaptığı maksimum dalga boyu	39
Şekil 4.2. Kloramfenikolün soğurma yaptığı maksimum dalga boyu	40
Şekil 4.3. Rodamin B kalibrasyon grafiği.....	40
Şekil 4.4. Kloramfenikolün kalibrasyon grafiği	41
Şekil 4.5. Protein kalibrasyon grafiği (BSA).....	42
Şekil 4.6. Kullanılan kimyasalların girişim etkisi.....	42
Şekil 4.7. Sodyum borhidrürün BSA'ye girişim etkisi.....	43
Şekil 4.8. Sodyum borhidrürün rodamin B'ye girişim etkisi.....	44
Şekil 4.9. Sodyum borhidrürün kloramfenikole girişim etkisi	44
Şekil 4.10. Farklı etanol-BSA oranlarında parçacık boyutu	45
Şekil 4.11. Farklı etanol-BSA oranlarında çöken protein miktarı	46
Şekil 4.12. Farklı etanol-BSA oranlarında çöken protein konsantrasyonu.....	46
Şekil 4.13. % 70 Etanol-BSA'nın farklı pH'lardaki parçacık boyutu	47
Şekil 4.14. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarının SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.15. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarının SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.16. BSA nanoparçacıklarının DLS ile parçacık boyutunun belirlenmesi.....	49
Şekil 4.17. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına rodamin B yükleme.....	50
Şekil 4.18. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü rodamin B'nin SEM görüntüsü.....	51
Şekil 4.19. Şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına rodamin B yükleme.....	51
Şekil 4.20. Şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü rodamin B'nin SEM görüntüsü.....	52
Şekil 4.21. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına kloramfenikol yükleme	53
Şekil 4.22. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün SEM görüntüsü.....	53
Şekil 4.23. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına kloramfenikol yükleme.....	54
Şekil 4.24. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün SEM görüntüsü.....	54
Şekil 4.25. Rodamin B yüklü BSA nanoparçacıklarının (desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış) salımı.....	55
Şekil 4.26. Rodamin B yüklü BSA nanoparçacıklarının (şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış) salımı.....	55

Şekil 4.27. Kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıklarının (desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış) salımı.....	56
Şekil 4.28. Kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıklarının (şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış) salımı.....	57



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. 20 çeşit standart aminoasit ve kısaltmaları	1
Çizelge 1.2. Proteinlerin sınıflandırılması	3
Çizelge 1.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	5
Çizelge 1.4. Çapraz bağlama yönteminin avantaj ve dezavantajları	6
Çizelge 1.5. Adsorpsiyon yönteminin avantaj ve dezavantajları.....	7
Çizelge 1.6. Kovalent bağlama yönteminin avantaj ve dezavantajları	7
Çizelge 1.7. Tutuklama yönteminin avantaj ve dezavantajları	8
Çizelge 1.8. Nanoyapıları elde etme yöntemleri.....	11
Çizelge 1.9. Nanobiyoteknolojinin ele aldığı konular	13
Çizelge 1.10. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması	14
Çizelge 1.11. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırılması	15
Çizelge 1.12. Antibiyotiklerin etki spektrumuna göre sınıflandırılması	16
Çizelge 1.13. Antibiyotiklerin bağışıklık düzenleyici etkilerine göre sınıflandırılması	17
Çizelge 1.14. Kloramfenikolün yan etkileri.....	18
Çizelge 1.15. Kontrollü ilaç salım sistemleri.....	20

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Protein

1.1.1. Proteinlerin Genel Özellikleri

Protein sözcüğünü Yunanca'da "birinci öneme sahip" anlamına gelen prota'dan gelmektedir. Proteinler; birçok aminoasidin zincir halinde bir araya gelmesiyle oluşan büyük yapıli organik bileşiklerdir. Bu zincirlerde bir aminoasidin karboksil grubu ile diğel aminoasidin amino grubu arasında peptit bağı oluşur. Protein yapılarında 20 çeşit standart aminoasit vardır. Vücudun kendiliğinden sentezleyemediğı ancak ihtiyaç duyduğu aminoasitlere esansiyel aminoasitler, vücutta sentezlenebilen, dışarıdan besin yoluyla alınması zorunlu olmayan aminoasitlere esansiyel olmayan aminoasitler denir. Hastalık, büyüme gebelik gibi durumlarda artan ihtiyaçtan dolayı esansiyel olan aminoasitlere de yarı esansiyel aminoasitler denir (Gümrah, 2008).

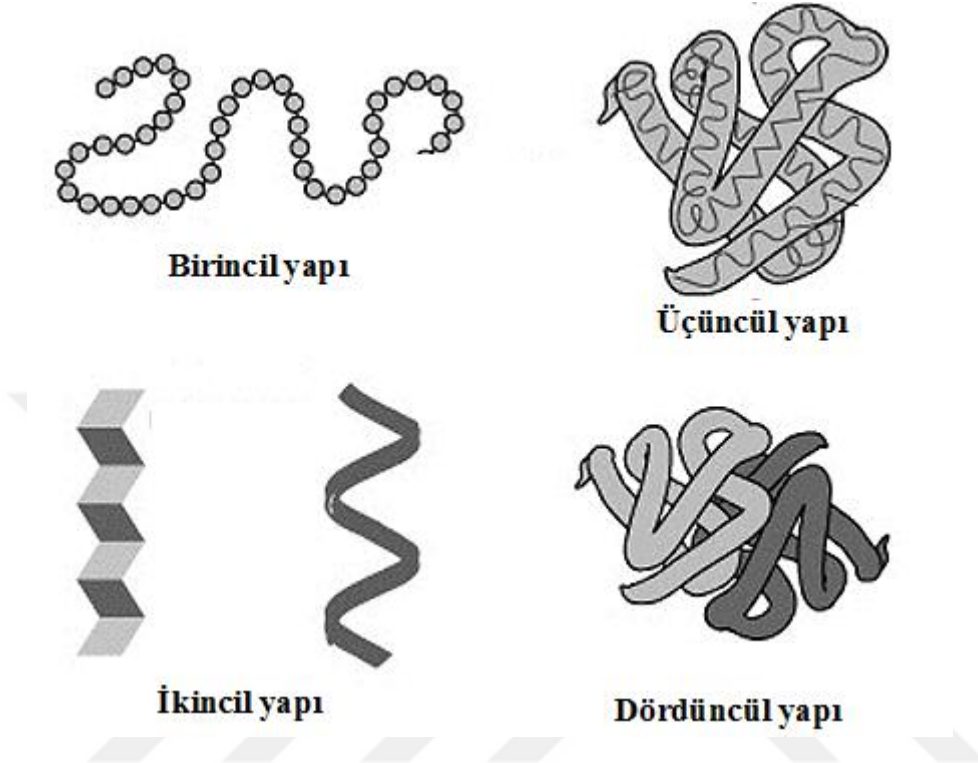
Çizelge 1.1. 20 çeşit standart aminoasit ve kısaltmaları

Aminoasit	Üç harfli kısaltması	Tek harf kısaltmaları
Glisin**	Gly	G
Alanin***	Ala	A
Valin*	Val	V
Lösin*	Leu	L
İzolösin*	Ile	I
Prolin***	Pro	P
Fenilalanin*	Phe	F
Tirozin**	Tyr	Y
Triptofan*	Trp	W
Serin**	Ser	S
Treonin*	Thr	T
Sistein**	Cys	C
Metiyonin*	Met	M
Asparajin***	Asn	N
Glutamin***	Gln	Q
Aspartat***	Asp	D
Glutamat***	Glu	E
Lizin*	Lys	K
Arjinin**	Arg	R
Histidin*	His	H

* Esansiyel aminoasitler
**Yarı esansiyel aminoasitler
***Esansiyel olmayan aminoasitler

1.1.2. Proteinlerin Yapısı

Proteinler yapılarına göre; primer (birincil), sekonder (ikincil), tersiyer (üçüncül), kuarterner (dördüncül) olmak üzere dört gruba ayrılırlar.



Şekil 1.1. Proteinlerin yapısı

(<https://www.umass.edu/molvis/workshop/prot1234.htm>)

Proteinin primer yapısı; belli sayıdaki, belli türdeki aminoasitlerin belli bir düzene göre peptit bağlarıyla bağlanmasıyla oluşur. Sekonder yapısı; bir polipeptidin zincirlerinin bükülmesi ve katlanmasıyla oluşur. Tersiyer yapısı ise; proteinin sekonder yapısı oluşuktan sonra uzayda daha ileri katlanmalar sonucunda veya lifler halinde globüler veya fibriler yapısıdır. Kuaterner yapısı ise; iki veya daha fazla alt brimden oluşan yapılardır. Bu yapılara oligomerler de denilmektedir.

1.1.3. Proteinlerin Sınıflandırılması

Çizelge 1.2. Proteinlerin sınıflandırılması

Homoproteinler (Basit Proteinler)	Heteroproteinler (Konjuge Proteinler)
Albuminler	Lipoproteinler
Gluteinler	Fosfoproteinler
Provitaminler	Metalloproteinler
Histonlar	Kromoproteinler
Skleroproteinler	

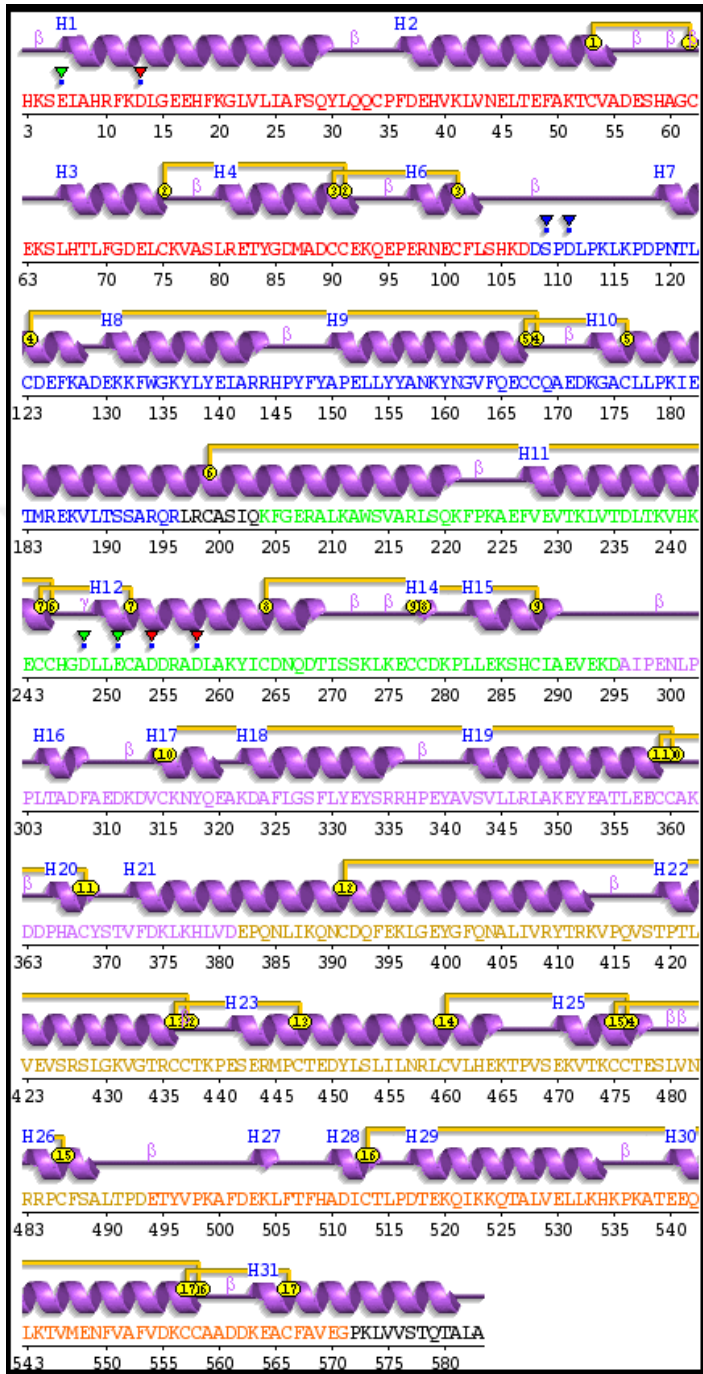
- Albuminler; hayvansal ve bitkisel organizmalarda yaygın olarak bulunurlar.
- Gluteinler; bitkisel proteinlerdir.
- Provitaminler; hayvansal proteinlerdir.
- Histonlar; bazik özelliğe sahiptirler ve nükleik asitlerle nükleoproteinleri oluştururlar.
- Skleroproteinler; İnsan ve hayvan organizmasında bulunan kolajen, keratin ve elastin gibi proteinlerdir.
- Lipoproteinler; proteinlerin lipidlerle yaptığı bileşiklerdir.
- Fosfoproteinler; fosforik asit içeren proteinlerdir.
- Metalloproteinler; hemoglobin, miyogloblin, feritin gibi metal iyonlarını içeren proteinlerdir.

Kromoproteinler; kan proteinlerinin pigmentlerle oluşturdukları bileşiklerdir (Tekman ve Öner, 1994).

1.1.4. Sığır Serum Albumini

Sığır serum albumini; 583 amino asitten oluşmuş olup, $\approx 69,323$ Da molekül ağırlığına sahiptir. 25°C de saf suda izoelektrik noktası (pI) 4,7 olan bir moleküldür. Medikal öneminden, bol bulunmasından, düşük maliyetinden, kolay saflaştırılabilmesinden, ligant bağlayabilme özelliğinden dolayı farmakokinetik alanında yaygın olarak ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır (Elzoghby, 2012).

1.1.4.1. Sığır Serum Albumininin Yapısı



Şekil 1.2. Sığır serum albumininin amino asit dizisi ve tersiyer yapısı (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3V03>).

Sığır serum albumini; 583 aminoasite, 6 alan (domain), 24 β -dönüş, 1 γ - dönüş, 17 disülfid bağı, kalsiyum iyonu ve asetat iyonu içeren *Bos taurus* organizmasına ait taşıyıcı bir proteindir (<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3V03>).

Albumini nanoparçacıkları, biyoparçalanabilir olmaları, kolay hazırlanabilir olmaları ve tekrarlanabilir olmalarından dolayı kontrollü ilaç salımında tercih edilirler.

1.1.5. Protein İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon kelimesi ilk kez 1971 yılında ABD’de düzenlenen Enzim Mühendisliği Konferansında ortaya çıkmıştır. İmmobilizasyon; enzimin ya da proteinin aktivitelerinin korunarak, tekrar tekrar kullanılabilme koşulu ile belli bir bölgeye fiziksel veya kimyasal olarak hapsedilmesidir.

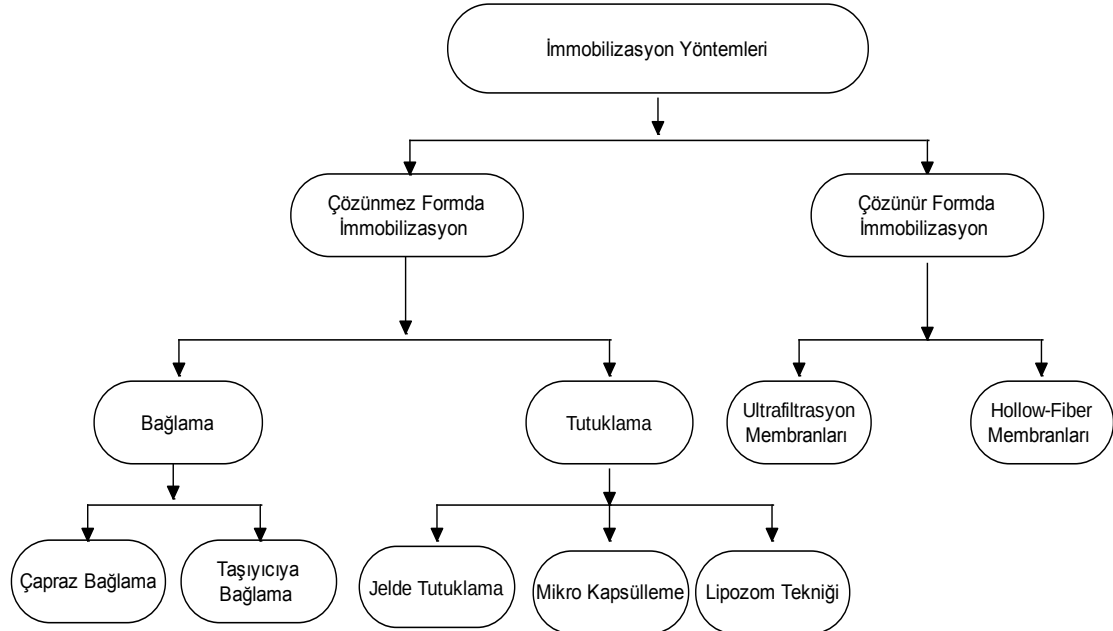
İmmobilize proteinin serbest proteine üstünlükleri;

- Çevre koşullarına daha dayanıklıdır.
- Tekrar tekrar kullanılabilir.
- Serbest proteine göre daha kararlıdır.
- Çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.

İmmobilize proteinin serbest proteine dezavantajları;

- İşlem süresinin uzaması
- Kütle transferi problemleri

Çizelge 1.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi



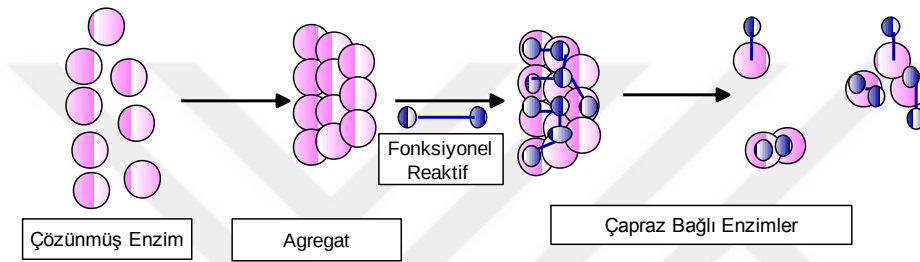
1.1.5.1. Çözünmez Formda İmmobilizasyon

Çözünmez formda immobilizasyon bağlama ve tutuklama olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir.

1.1.5.1.1. Bağlama

- Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama ile yapılan immobilizasyon yönteminde; küçük moleküler yapıları olan bi- ve multi- fonksiyonel gruplu reaktifler çapraz bağlanacak yapılar arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen kompleks yapılar oluştururlar.



Şekil 1.3. Çapraz bağlama yöntemi

Çapraz bağlanma derecesi; protein ve reaktifin derişimine, pH'ına ve immobilize edilecek enzime bağlı olarak değişir (Sheldon, 2007).

Çizelge 1.4. Çapraz bağlama yönteminin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
Yüksek bağlanma kuvveti	Düşük aktivite geri kazanımı
Düşük enzim kaçışları	Düşük mekanik kararlılık
Bağlı enzimde yüksek kararlılık	Tekrar kullanım zorluğu
Taşıyıcıya gerek olmaması	Jelimsi yapı
Aktivitenin taşıyıcıyla eksilmemesi	

- Taşıyıcıya Bağlama

Taşıyıcıya bağlanma; adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olmak üzere beş grupta incelenir.

Adsorpsiyon yöntemi; enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski yöntemdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın (aktif karbon, kül, silikajel, kalsiyum karbonat, gluten) enzim çözeltisi ile karıştırılması ve fazla enzimin yıkanarak uzaklaştırılması esasına dayanır (Nelson ve ark., 1916).

Çizelge 1.5. Adsorpsiyon yönteminin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
Kolay olması	İmmobilizasyon koşullarının belirlenmesinin zor olması
Değişik yükteki taşıyıcıları seçme olasılığı	Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın güçlü olmamasından dolayı enzimin ortamdaki kaçışı
İmmobilizasyon gerçekleştirilirken saflaştırma işleminin de yapılabilmesi	

İyonik bağlama; iyon değiştirme özelliğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent kadar kuvvetli olmadığından enzim taşıyıcıdan ayrılabilir (Telefoncu, 1997).

Şelat bağlama yönteminde; geçiş metalleri kullanılır. İmmobilizasyon metalin boş d orbitali ile enzimin aminoasit grupları arasında gerçekleşir (Yıldırım, 2010).

Kovalent bağlama yöntemi; enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan yöntemlerdendir.

Çizelge 1.6. Kovalent bağlama yönteminin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
Enzim kaçışı olmaz	Ürün veriminde düşüş
Enzim taşıyıcı yüzeyinde tutunduğundan substratla kolayca etkileşir	Optimum koşulları belirlemede zorluk
Kararlılık yüksektir	Taşıyıcının yenilenmesi ve biyokatalizörün taşıyıcıdan geri kazanılması zordur

Biyospesifik bağlama; koenzimler, inhibitörler, antikor gibi bileşiklerle enzimler arasında biyospesifik etkileşim esasına dayanır (Telefoncu, 1997).

1.1.5.1.2. Tutuklama

Tutuklama yöntemi; enzimi belli bir bölgede durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu yerde hapsolür ve başka bir yere çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içerisinde gerçekleşebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içerisinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi diğer immobilizasyon yöntemlerinden ayıran en önemli özellik enzimin taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmamış olmasıdır (Bickerstaff, 1997).

Çizelge 1.7. Tutuklama yönteminin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
Uygulama kolaylığı	Enzim kaçışları
Düşük aktivite kaybı	Substratın küçük olmasının zorluğu
Düşük enzim gereksinimi	Kütle transfer sınırlamaları
Nötral ve suda çözünmeyen taşıyıcılar	Difüzyon bariyerleri

Tutuklama yöntemi; jelde tutuklama, mikrokapsülleme ve lipozom tekniği olmak üzere üç grupta incelenir.

Polimer matriksde tutuklama yöntemi; çapraz bağlı polimerin enzim çözeltisi içerisinde oluşturulmasına esasına dayanır. Bu yöntemde en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanan poliakrilamiddir.

Mikrokapsülleme yöntemi; bir enzimin yarı geçirgen membran içinde tutuklanması esasına dayanır. Mikrokapsüllerin büyüklükleri 1-100 µm arasında değişmektedir. İmmobilizasyonda kullanılacak olacak membranın; gözenek boyutu substrat molekülünün kapsülün girişine ve çıkışına olanak verecek boyutta olmalıdır. Substrat ne kadar küçükse, immobilize edilmiş yapının verimliliği de o kadar yüksek olur.

Lipozom yöntemi; lipidlerden oluşmuş sıvı-yüzey aktif madde membranı içine tutuklama yapılması esasına dayanır. Bu yöntemin avantajı; aynı anda birden çok enzimin immobilizasyonu gerçekleştirilebilirken dezavantajı ise işlem sırasında enzimin inaktive olması ve enzim kaçışı olasılığıdır.

1.1.5.2. Çözünür Formda İmmobilizasyon

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi; enzimin taşıyıcıya kimyasal ya da fiziksel bir etkileşiminin yanı sıra, yarı geçirgen zar tarafından çevrelendiği ve enzime hareket alanının sağlandığı bir yöntemdir. Substratın membrandan geçip enzime ulaşmasının zorluğundan dolayı küçük yapıli substrata sahip enzimler tercih edilmelidir (Alagöz, 2007).

Enzimlerin membran içerisinde immobilizasyonunda enzim kaçışı söz konusu değildir Bu yüzden çözünür formda immobilizasyonda ultrafiltrasyon membranları ve Hollow-Fiber membranları kullanılmaktadır (Telefoncu, 1997).

1.2. Nanoteknoloji

1.2.1. Nanoteknolojinin Tanımı

Nanometre metrenin milyarda biri anlamına gelen ölçü birimidir. Nanoteknoloji ise nano boyuttaki yapıların ve sistemlerin tasarlanması, işlenmesi ve üretilmesi ile ilgilenen teknolojidir (Kuruca, 2013). “Nano” kelimesi Yunanca’daki cüce kelimesi anlamına gelmektedir. Nanoteknoloji; ucuz, güvenilir, temiz ve finansal karşılığı yüksek olduğundan önemlidir (Naschie, 2006).

1.2.2. Nanoteknolojinin Gelişimi

Nanoteknolojinin ortaya çıkışı, 1959 yılında fizikçi Richard Feynman’ın yapmış olduğu konuşmada “küçük boyutlarda yapılabilecek çok şey var” sözlerine dayandırılır (Şekeroğlu, 2013). Nanoteknoloji kelimesini ilk kez 1974 yılında Japon Norio Taniguchi kullanmıştır. Daha sonra da 1986 yılında K. Eric Drexler’in yapmış olduğu çalışma sonucunda dünyaya duyurulmuştur (Drexler, 1986).

1.2.3. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknoloji disiplinlerarası bir bilim dalıdır. Nanoteknolojinin kimya, matematik, fizik, biyoloji, malzeme bilimi, mühendislik, eczacılık-tıp, elektronik, bilgisayar vb. çok çeşitli uygulama alanı bulunmaktadır.

Lotus bitkisinin üzerine toz parçacıkları ve su geldiğinde yapraklarını hareket ettirerek kendiliğinden temizleme özelliği gösterir. Bu kendi kendini temizleme özelliğinden yararlanılarak tekstilde kir tutmayan kumaşlar yapılmaktadır (Gür, 2010). Bitkilere yapraktan verilen gübrelerde stoma açıklığı az olduğu için mikro ya da makro boyutlarda gübrelerin geçişi zordur. Bu da bitkilerin mineral ihtiyacını tam olarak karşılayamamasına ve veriminin düşmesine neden olur. Ancak nano boyutlarda gübreler stomalardan daha kolay geçeceğinden bitkinin minerallerden daha iyi faydalanmasını sağlar. Bilgisayar parçalarının nanometre boyutlarında elde edilmesiyle işlem güçleri, kapasiteleri, sinyal iletimi, hızı artarak boyutu ise küçülecektir. Nanomalzemeler sayesinde televizyon ve bilgisayar ekranları daha düz ve parlak hale getirilebilir. (Kayır ve ark., 2010).

1.2.4. Nanoyapılar

Nanoyapıların ilki fullerenlerdir. Fullerenler 60 karbon atomundan oluşan (C60) 1 nm çapındaki futbol topu görünümüne sahip yapılardır. Daha sonra geliştirilen

nanoyapılara karbon nanotüpler (tek duvarlı karbon nanotüp ve çok duvarlı karbon nanotüp), dendrimerler, quantum dotlar örnek verilebilir (Benli, 2008)

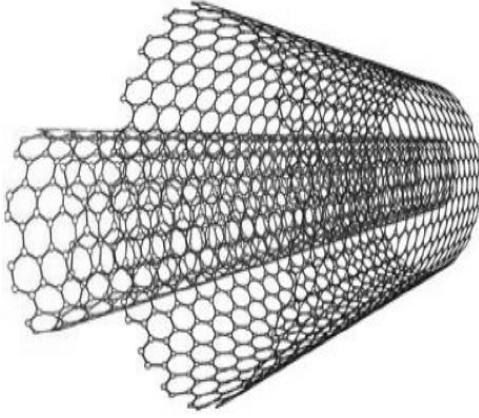
Karbonun allotroplarından biri grafitir, grafitin katmanlarına ise grafen denilir. Karbon atomları birbirine altıgen oluşturacak şekilde grafen katlandığında tüp haline gelir. Nanotüpler çelikten daha hafif ve daha sağlam olması, iletken özellikte olması gibi birçok avantajından dolayı küçük boyutlardaki elektronik cihazların yapımında kullanılmaktadır. Karbon nanotüpler; ince ekranların yapımında, enerji depolamada, elektrokimyasal aygıtlarda, nanoboyutlu elektronik aygıtlarda, mikroskop problemlerinde, kimyasal sensörlerde, ayakkabı altlıklarında, elektrik kabloları ve hatlarında, bataryalarda, kanser tedavisinde, elektronik devrelerde, biyosensörlerde, şekil değiştiren uçaklarda, radar emiliminde, hidrojen depolamada kullanılmaktadır.

Quantum dotlar yaklaşık 5 nm boyutunda olup kadmiyum ve selenyumdan oluşur (Benli, 2008). Quantum dotlar, birkaç atomdan binlerce atoma kadar atomu barındırabilen yapay yapılardır. Quantum dotların boyutlarının değişmesiyle yaptığı ışımaların da rengi değişmektedir (Durmuşoğlu, 2012).

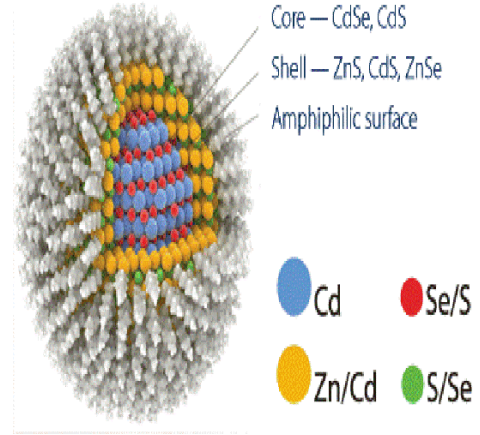


Şekil 1.4. Quantum dotların boyutların değişmesiyle yaptığı ışımalar (Durmuşoğlu, 2012)

Quantum dotları bu özelliğinden dolayı; görüntüleme işlemlerinde, güneş panellerinde, bilgisayar uygulamalarında kullanılmaktadır (Durmuşoğlu, 2012).



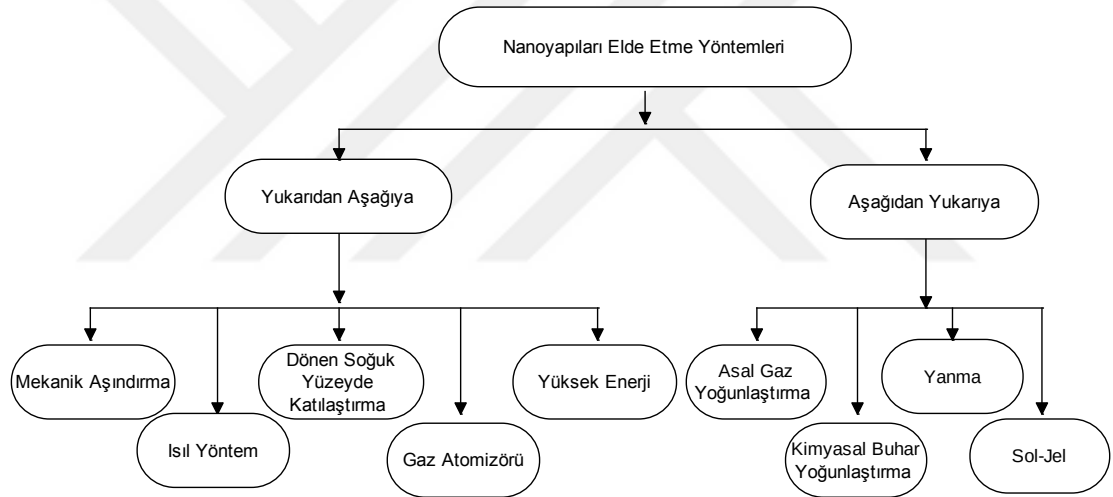
Şekil 1.5. Karbon nanotüp



Şekil 1.6. Quantum dot

1.2.4.1. Nanoyapıları Elde Etme Yöntemleri

Çizelge 1.8. Nanoyapıları elde etme yöntemleri



Mekanik Aşındırma: Mekanik aşındırma yöntemi ile makro boyutlardaki bir malzeme mekanik öğütücü bir makine ile atomik boyutlara indirilir.

Isıl Yöntem: Isıl yöntemde nanoyapılar elde edilirken belirli sıcaklık değerleri uygulanır.

Dönen Soğuk Yüzeyde Katılaştırma: Bu yöntemde yüksek hızda püskürtme ile malzeme küçük boyutlara inerken dönen yüzeyde aniden soğuma meydana gelir ve malzemede yoğunlaşma olur. Yoğunlaşan malzeme nanoboyutlardadır.

Gaz Atomizörü: Bu yöntemde yüksek hızlarda asal gaz püskürtme haznesine püskürtülür. Oluşan çarpışma sonucunda nanoboyutta metal parçaları meydana gelir.

Yüksek Enerji Yöntemi: Bu yöntemle; yüksek elektrik akımı, monokromatik radyasyon ve güneş radyasyonu sırasıyla katı bir malzemeye gönderilir ve nanoparçacık elde edilir.

Asal Gaz Yoğunlaştırma: Bu yöntemin temel prensibi malzemenin helyum atmosferinde buharlaştırılıp helyum atmosferinde yoğunlaştırılmasına dayanır. Atomlar yoğunlaşarak nanoparçacıklara dönüşürler (Ateş ve Bahçeci, 2015).

Kimyasal Buhar Yoğunlaştırma: Bu yöntemle malzeme buharlaştırılır ve sıcak bir yüzeyde ayrıştırılarak nanoboyutlarda malzeme üretimi gerçekleştirilir.

Yanma: Malzemenin yapısına göre yanma işlemi gerçekleştirilerek nanoboyutlarda yapılar elde edilir.

Sol-Jel: Bu yöntem solüsyon-jelleşme anlamındadır. Sol-Jel yöntemi ile sıvı fazdan kolloidal nanoparçacıklar elde edilir (Gürmen ve Ebin, 2008).

1.2.5. Nanobiyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji; nano ve biyoteknoloji olmak üzere iki kavramdan oluşmaktadır. Nanobiyoteknolojiye nano boyutlardaki biyoloji ve biyokimya alanındaki çalışma alanı denilebilir (Tazebay ve Erdoğan, 2011).

Nanometre ölçekli yapıların analizi, nanometre ölçekli yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması, daha dayanıklı, daha hızlı, daha ucuz yapıların üretimi veya işlenmesi, nanometre boyutlarındaki hassasiyete sahip cihazların geliştirilmesi vb. nanobiyoteknolojinin amaçları arasındadır (İlhan, 2014).

1.2.5.1. Nanobiyoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanobiyoteknolojinin ele aldığı konular interfaz sistemleri, protein bazlı nanoyüzeyler, DNA bazlı nanoyüzeyler ve nanoanalitik olmak üzere dört başlık altında incelenebilir.

Çizelge 1.9. Nanobiyoteknolojinin ele aldığı konular

1. İnterfaz Sistemleri	2. Protein Bazlı Nanoyüzeyler	3. DNA Bazlı Nanoyüzeyler	4. Nanoanalitik
Biyouyumlu anorganik cihazlar	Nanopor teknoloji	DNA- protein nanoyüzeyleri	Kuantum nokta ile bioetiketleme
Biyosensör için Mikrokontakt baskı uygulamaları	Genetik parçacık organizasyon	DNA-nanoparçacık bileşikleri	Protein-nanoparçacık eşleniklerinin histokimyası
Hücre -nanoyapılarının etkileşimleri	Mikrobiyal nanoparçacık üretimi		AFM ile Biyomoleküler yapı analizi
Silikon yüzeylerindeki nöronal hücre ağları	Bakteriyorodopsin teknoloji		
	Biyomoleküler motorlar		
	Nanobiyoelektronik cihazlar		

Kullandığımız ilaçlarda; istenilen sürede etki gösterememe, sadece hedef bölgeye değil tüm vücuda etki etme, ya da hedef bölgeye ulaşamama gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Bu tip sorunların bir kısmı nanobiyoteknoloji sayesinde çözülebilmektedir. Örneğin, nano boyutlarda üretilen taşıyıcılar sayesinde ilacın hedef hücreye ulaşması sağlanabilmektedir. Nano boyutların olağanüstü özelliklerinden yararlanılarak ilaçların özellikleri artırılabilir ya da yeni özellikler kazandırılabilir.

- **Kanser Araştırmalarında Nanoteknolojinin Kullanımı:** Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere zarar vermeden öldürülmesi konusunda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Örneğin; sadece kanserli dokulara ve civarına kemoterapi ajanı veya çeşitli ilaçları salabilen nano kesecikler geliştirilmektedir.

- **Doku Mühendisliğinde Nanoteknolojinin Kullanımı:** Doku mühendisliğinin temel hedefi; laboratuvar ortamında doku ya da organ geliştirmektir. Geliştirilen organlar biyouyumlu proplar ile dokunun/ organın vücuda uyumunun takibi gibi birçok önemli avantajları vardır (İlhan, 2014).

1.3. Antibiyotikler

1.3.1. Antibiyotiklerin Tanımı

Antibiyotik kavramı ilk kez 1944 yılında Waksman tarafından kullanılmıştır (Woodruff, 2014). Yunanca'da anti (karşı) ve bios (yaşam) kelimelerinden üretilmiş olan antibiyotik sözcüğü, bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da yok

eden maddelere denir (Aktuğlu, 1997). Doğal antibiyotiklerin yan dallarında değişiklik yapılmasıyla elde edilen antibiyotiklere yarı sentetik antibiyotikler denilmektedir. Sülfonamidler, kinolonlar gibi maddeler dikkate alındığında ise antibiyotik terimi yerine kemoterapik terimi de kullanılmaktadır (Töreci, 2003).

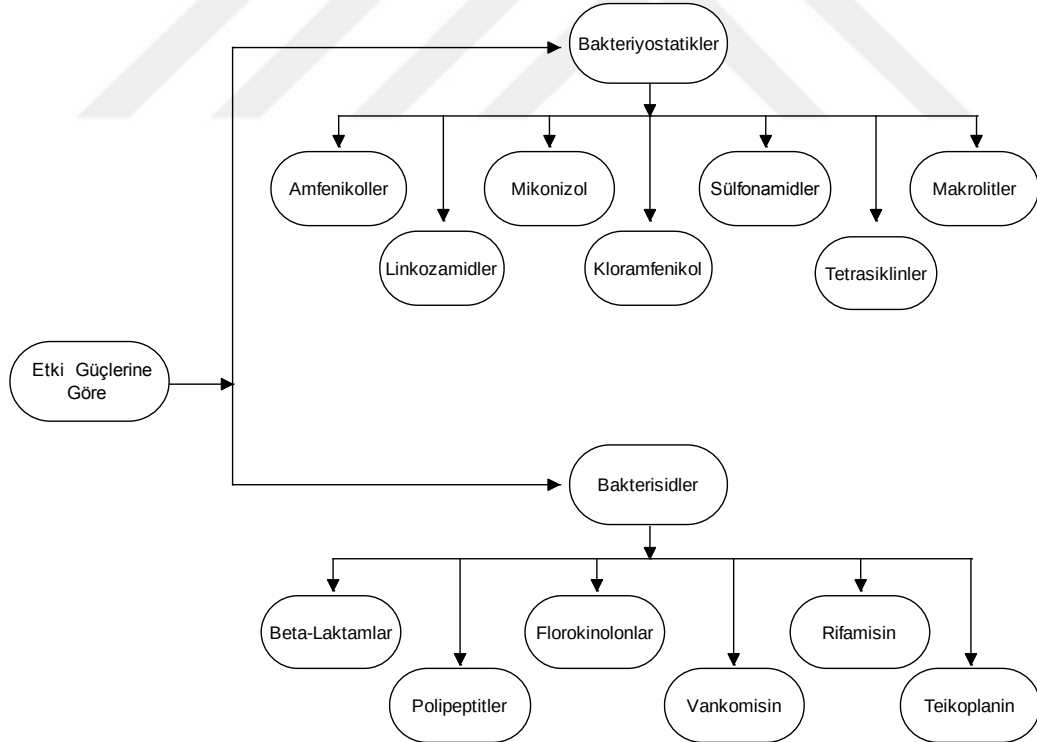
1.3.2. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. En çok kullanılan sınıflandırmalar; ilaçların etki mekanizmalarına ve etki güçlüklerine göre yapılanlardır (Akkan, 1997).

1.3.2.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki güçlerine göre temel olarak bakteriyostatikler ve bakterisidler olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması çizelge 1.10. da gösterilmiştir.

Çizelge 1.10. Antibiyotiklerin etki güçlerine göre sınıflandırılması

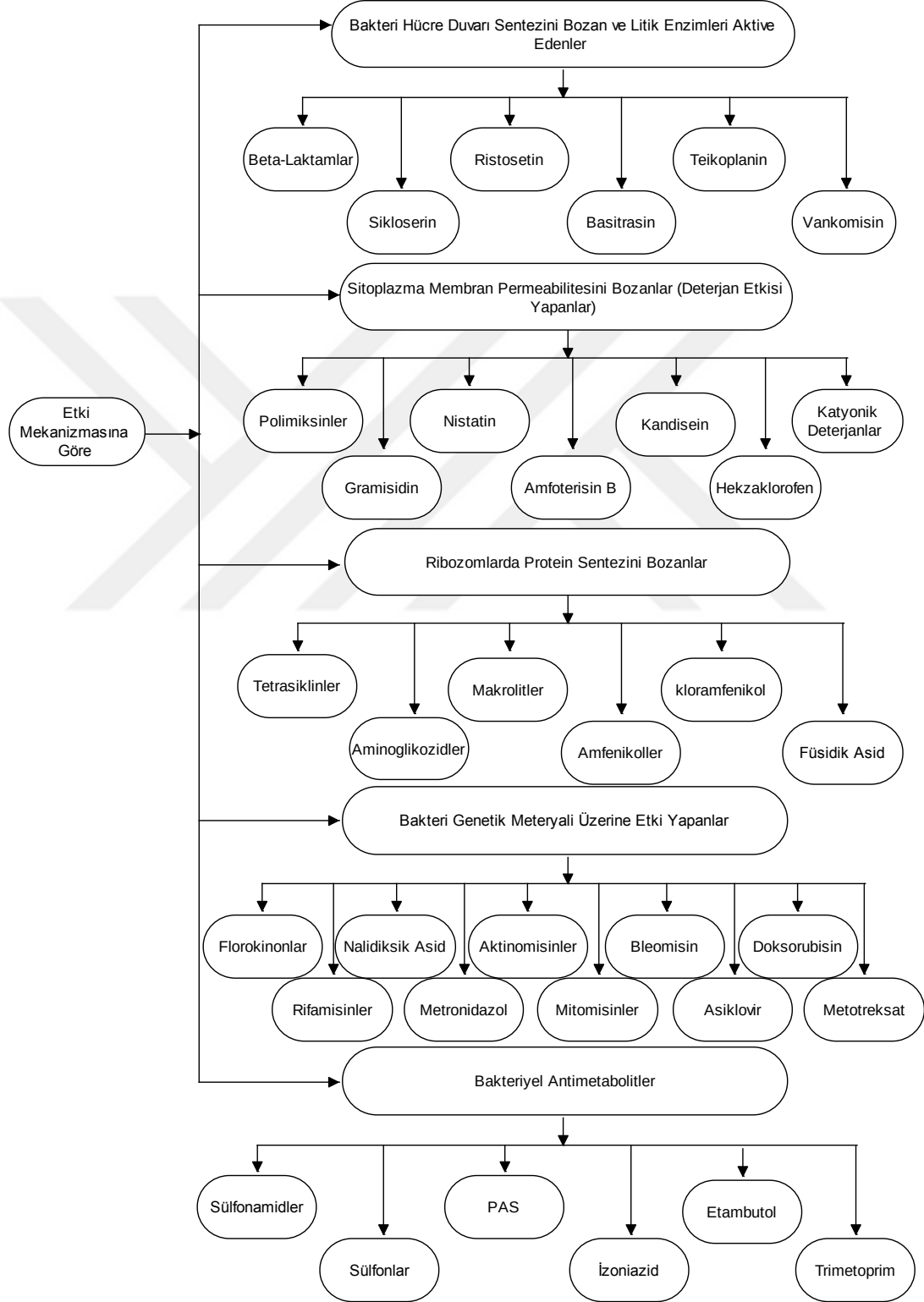


1.3.2.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki ettikleri mekanizmalara göre; bakteri hücre duvarı sentezini bozan ve likit enzimleri aktive edenler, sitoplazma membran permeabilitesini bozanlar (deterjan

etkisi yapanlar), ribozomda protein sentezini bozanlar, bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar ve bakteriyel antimetabolitler olmak üzere beş kısımda incelenmektedir. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması çizelge 1.11. de gösterilmiştir.

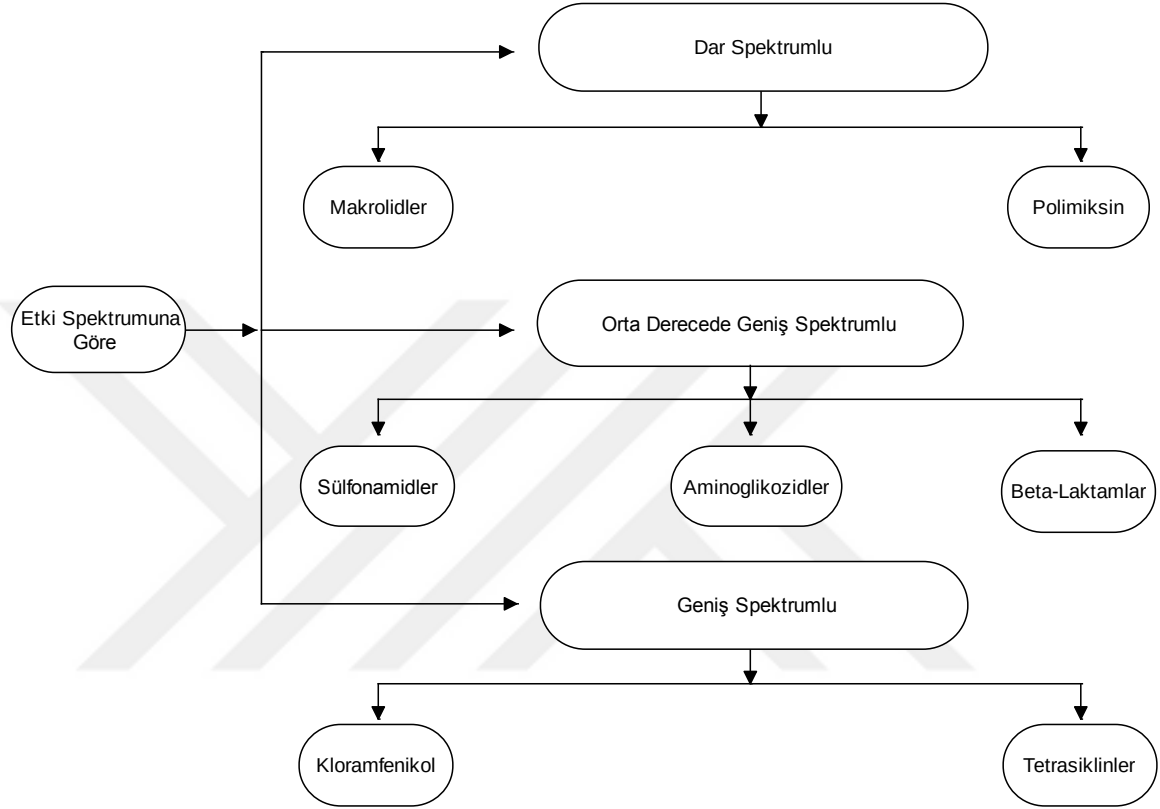
Çizelge 1.11. Antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre sınıflandırılması



1.3.2.3. Antibiyotiklerin Etki Spektrumuna Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki spektrumuna göre; dar spektrumlu, orta derecede geniş spektrumlu ve geniş spektrumlu olmak üzere üç kısımda incelenmektedir. Antibiyotiklerin etki spektrumuna göre sınıflandırılması çizelge 1.12. de gösterilmiştir.

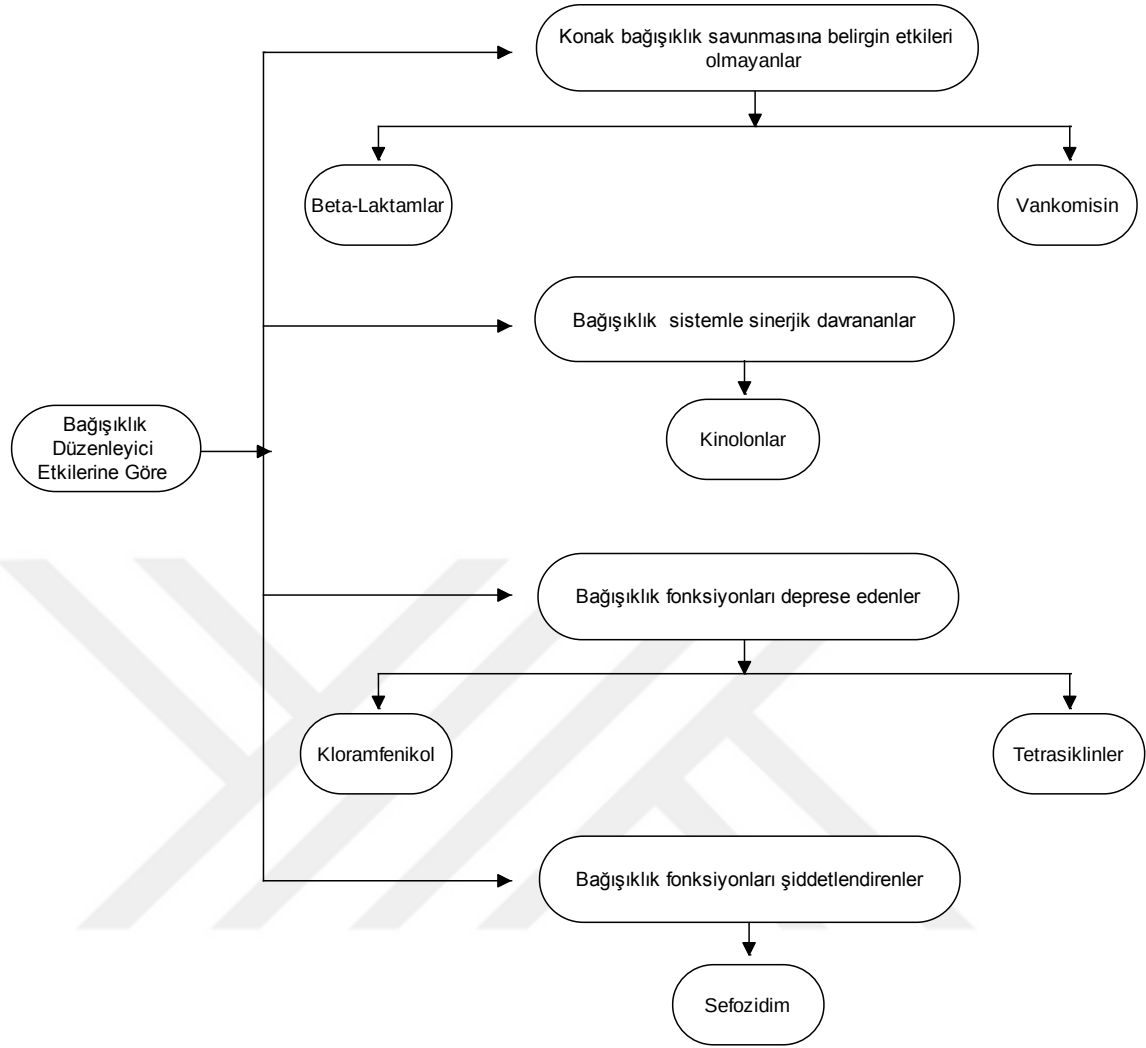
Çizelge 1.12. Antibiyotiklerin etki spektrumuna göre sınıflandırılması



1.3.2.4. Antibiyotiklerin Bağışıklık Düzenleyici Etkilerine Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler bağışıklık düzenleyici etkilerine göre; konak bağışıklık sistemine belirgin etkileri olmayanlar, bağışıklık sistemi ile sinerjik davrananlar, bağışıklık sistemi fonksiyonlarını baskılayanlar ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarını şiddetlendirenler olmak üzere dört kısımda incelenmektedir. Antibiyotiklerin bağışıklık düzenleyici etkilerine göre sınıflandırılması çizelge 1.13. de gösterilmiştir.

Çizelge 1.13. Antibiyotiklerin bağışıklık düzenleyici etkilerine göre sınıflandırılması



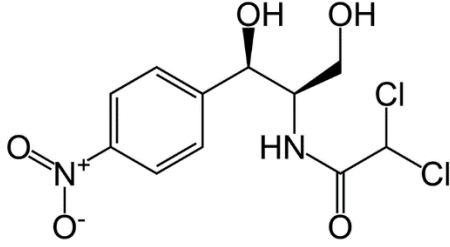
1.3.3. Kloramfenikol

1.3.3.1. Kloramfenikolün Keşfi ve Yapısı

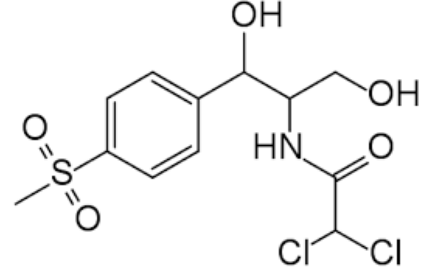
1947 yılında Burkholder, Venezuela'dan alınmış olan toprak örneklerinden ürettiği *Streptomyces Venezuela* kültürlerinde antibiyotik aktivitesi gösteren bir madde olduğunu tespit etmiştir. Bu maddenin gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğunu deneylerle göstermiş ve izole edip kloramfenikol adıyla 1948 yılında yayınlamıştır. Kısa süre içerisinde geniş kullanım alanı bulunan ilacın, 1950'li yıllarda yan etkileri ortaya çıkmaya başlamıştır (Aktuğlu, 1997). Kloramfenikolün yan etkileri bölüm 1.3.3.3. de anlatılmıştır.

Kloramfenikolün kimyasal yapısı diğer birçok antibiyotiğe göre çok daha basittir. Dikloroasetik asit içeren nitro benzen türevidir. Yapılan araştırmalar sonucunda toksik etkiye neden olan grubun para pozisyonundaki nitro (-NO₂) grubu olduğu bulunmuştur. Nitro grubu yerine metilsülfonil (-CH₃SO₂) grubu takılarak tiamfenikol adı verilen

antibiyotik geliştirilmiştir. Kloramfenikolün neden olduğu aplastik anemiye tiamfenikolün neden olmadığına dair yayınlar olmasına rağmen kesin bir şey gösterilmemiştir (Ayaz, 2003).



Şekil 1.7. Kloramfenikolün yapısı



Şekil 1.8. Tiamfenikolün yapısı

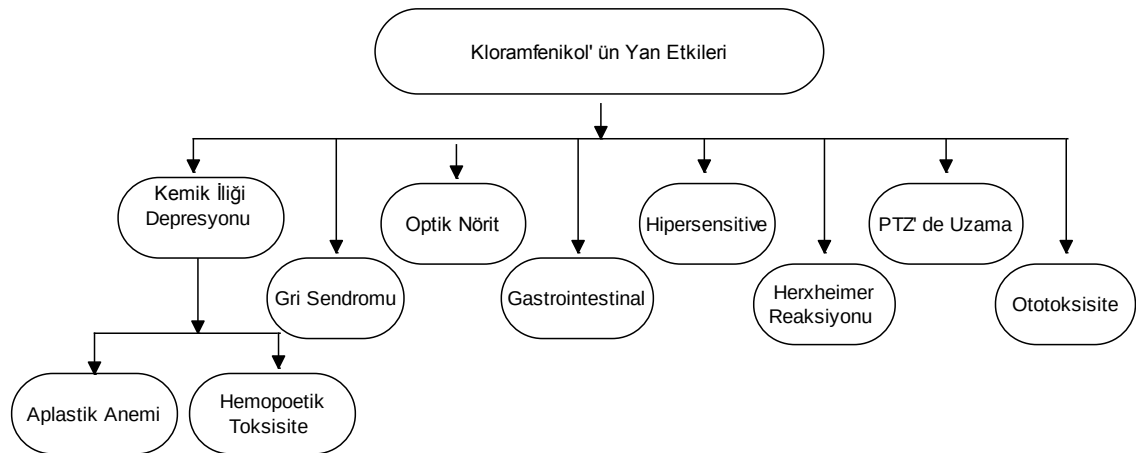
1.3.3.2. Kloramfenikolün Etki Mekanizması

Kloramfenikol protein sentez inhibitörüdür ve ribozomun 50S alt birimine bağlanır. Kloramfenikolün bu bölgeye bağlanması; peptidil transferaz enziminin aminoasite erişmesini ve polipeptide bağlanmasını engelleyerek protein sentezini durdurmasına neden olur (Töreci, 2003).

1.3.3.3. Kloramfenikolün Yan Etkileri

Kloramfenikolün yan etkileri çizelge 1.14. de gösterilmiştir (Ünal ve ark., 1989).

Çizelge 1.14. Kloramfenikolün yan etkileri



1.4. Kontrollü İlaç Salımı

1.4.1. Kontrollü İlaç Salımının Tanımı

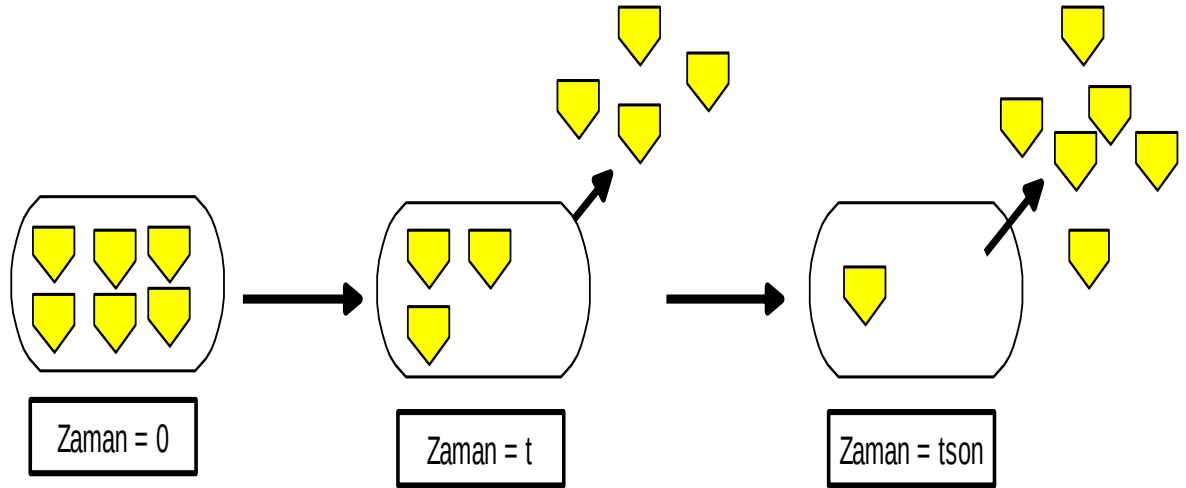
İlaç salım sistemi; kimyasal ya da fiziksel bir tetikleyici ile vücudun belli bölümüne belli dozda, belli hızda ilacın salınmasına denir.

Kontrollü ilaç salımının klasik sisteme üstünlükleri:

- Kontrollü salım sisteminde belli bir dozda ilaç alındıktan sonra ilaç sabit bir şekilde kalır ve sık sık ilaç alınma gereksinimi ortadan kalkar.
- Düşük dozlarda tedavi sağlanabilir.
- Düşük dozlarda tedavi sağlandığında yan etkiler ve toksik etkiler de azalmış olur.
- Kontrollü salım sistemlerinde hedef bölgelere ilaç gönderilir (Gürsoy, 2012).

1.4.2. Kontrollü İlaç Salımının Gelişimi

1938’li yıllarda etkin madde salımını geciktirmek amacıyla yapılmış bir çalışmanın patent almasıyla kontrollü salım kavramı ortaya çıkmıştır. İlk ilaç salım preparatı 1952 yılında “SmithKline and French Laboratories” firması tarafından “Spansule” adıyla farklı seviyelerde kaplanmış parçacıkların bir araya getirilmesiyle göreceli olarak daha uzun sürede ve daha yavaş salım yapan bir preparat hazırlamıştır (Çolak, 2009).

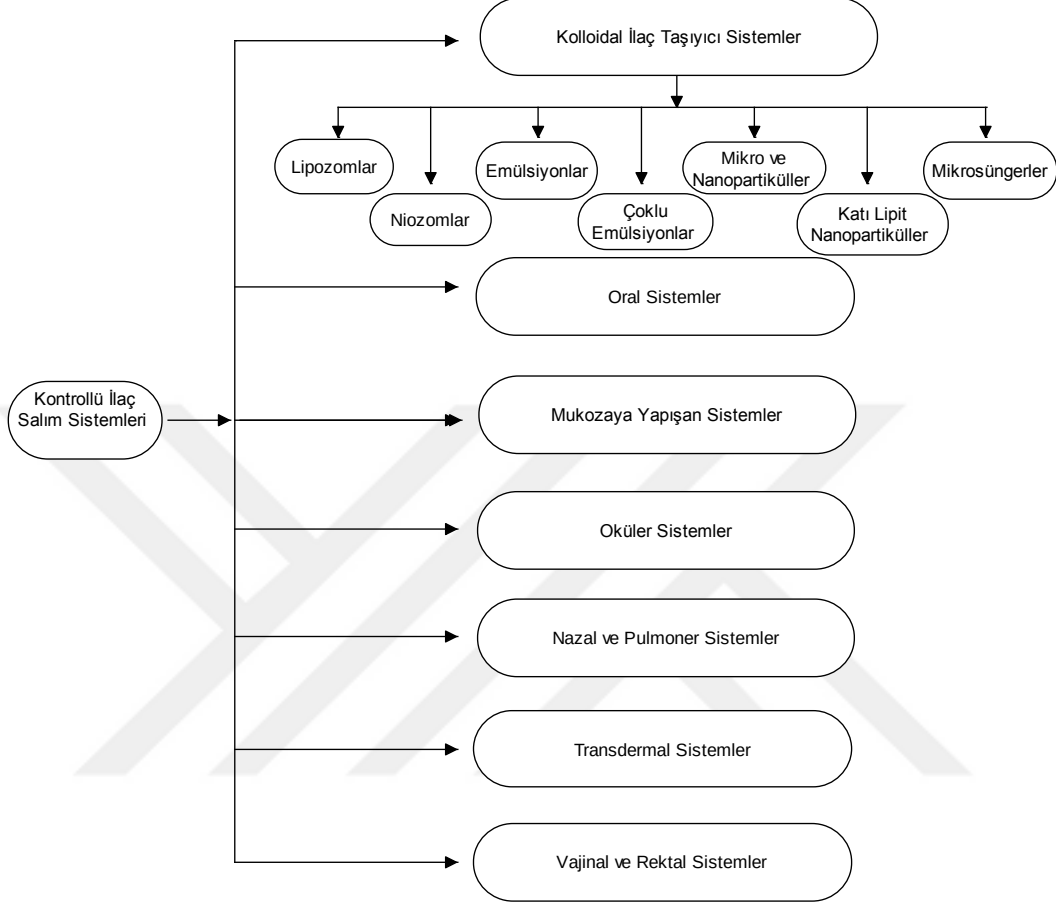


Şekil 1.9. İlacın zamana karşı kontrollü salımı

1.4.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Kontrollü salım sistemlerin çizelge 1.15. de gösterilmiştir (Gürsoy, 2012).

Çizelge 1.15. Kontrollü ilaç salım sistemleri



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Proteinlerin Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması

Santhi ve ark. (1999), koaservasyon tekniği ile amfoterisin-B (amphotericin-B) yüklü yumurta albumini nanokürelerinin farklı pH'da ve farklı çapraz bağlayıcı miktarlarında nanokürelerin boyutların nasıl değiştiğini incelemişlerdir. pH 8, 9, 10 da sırasıyla ortalama 532, 497, 287 nm nanoküreler elde edilmiştir. pH 9'da boyut dağılımı düzenliken, pH 8 ve 10'da boyut dağılımı düzensizdir. Yumurta albumini % 2, 3 ve 4'lük glutaraldehit – etanol ile çapraz bağlanmıştır ve sonuç olarak % 2 glutaraldehit – etanol ile çapraz bağlandıklarında düzenli nanoküreler elde edilirken, % 3 ve 4 glutaraldehit – etanol ile çapraz bağlandıklarında düzensiz nanoküreler elde edilmiştir. Amfoterisin-B yüklü yumurta albumini nanokürelerinin HPLC ile ne kadar ilacı saldırdığı ölçülmüştür. 24. saatin sonunda pH 7,4 fosfat tamponunda ortalama ilacın % 97,7'sinin salındığı görülmüştür. (Santhi ve ark., 1999).

Weber ve ark. (2000), insan serum albumini (HSA) nanoparçacıklarının desolvasyon yöntemiyle hazırlanması, karakterizasyonu ve optimizasyonu için bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada proteinin desolvasyonu sonucunda ortaya çıkan nanoparçacıklar farklı miktarlarda glutaraldehit eklenerek çapraz bağlanmıştır. Parçacık boyutu, zeta potansiyeli ve nanoparçacıkların yüzeyindeki mevcut amino gruplarının sayısı belirlenmiştir. Amino grupları spektrofotometrik yöntem kullanılarak 2, 4, 6 – trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile tayin edilmiştir. Sonuçlar parçacık boyutunun ağırlıklı olarak eklenen çözücü madde miktarına bağlı olduğunu, çapraz bağlayıcı miktarı veya çapraz bağlama prosedürünün türüne bağlı olmadığını göstermiştir. Artan miktarda glutaraldehit, HSA nanoparçacıklarının yüzeyindeki amino gruplarının sayısını azaltmış ve ayrıca taşıyıcı sistemin zeta potansiyelini düşürmüştür. Sıcaklık ve ısı denatürasyon süresi sadece nanoparçacıkların stabilitesi üzerinde bir etkiye sahipken amino gruplarının miktarı veya parçacık boyutu üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Isıl denatürasyon ile elde edilen HSA nanoparçacıklarının yüzeylerinde en fazla amino grubuna sahip oldukları gösterilmiştir (Weber ve ark., 2000).

Langer ve ark. (2003)'ün yaptığı bir çalışmada; HSA'nin desolvasyon metodu ile hazırlanıp çapraz bağlanmasının ardından oluşan HSA nanoparçacıklarının ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmaya göre; parçacık boyutu, özellikle damar içi enjeksiyondan sonra nanoparçacıkların *in vivo*

davranışları için çok önemli bir parametredir. Bu çalışmanın amacı, HSA esaslı nanoparçacıkların boyutlarının, 100 ve 300 nm arasında kontrol edilebildiği bir desolvasyon prosedürünün geliştirilmesi olmuştur. Tanımlanmış koşullar altında parçacık hazırlamayı mümkün kılan bir pompa kontrollü hazırlama yöntemi kurulmuştur. Desolvasyon maddesinin eklenme hızı, pH değeri ve HSA çözeltisinin iyonik bileşimi, protein konsantrasyonu, parçacık saflaştırma koşulları gibi hazırlama işleminin çeşitli parametreleri incelenmiştir. Desolvasyon işleminden önce HSA çözeltisinin pH değeri parçacık boyutunu belirleyen en önemli faktör olarak tanımlanmıştır. Bu parametrenin değeri değiştirilerek, (ortalama) parçacık çapları 150 ile 280 nm arasında tutulabilmiş, daha yüksek pH değerleri ile daha küçük nanoparçacıklar elde edilebilmiştir. Parçacıkların diferansiyel santrifüjle yıkanması boyut dağılımlarının belirgin olarak daha dar olmasına yol açmıştır. Önerilen hazırlama koşullarında parçacık boyutunun ve parçacık büyüklüğünün dağılımının tekrarlanabilirliği, analitik ultra santrifüjdeki çökme hızı analizi ile gösterilmiştir ve bu nanoparçacıkların hücresel alımı, konfokal mikroskop görüntüleme ve FACS analizi ile incelenmiştir. Elde edilen nanoparçacıkların kararlılığı pH ve tampon titrasyon deneyleri ile incelenmiştir (Langer ve ark., 2003).

Azarmi ve ark. (2006), püskürtme-dondurma-kurutma tekniği kullanarak doksorubisin (doxorubicin) (DOX) yüklü nanoparçacıklar üretmişlerdir. 10 ± 4 nm'lik ortalama geometrik taşıyıcı parçacık boyutu, konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir. DOX yüklü nanoparçacıkların taşıyıcı parçacıkların yeniden çözülmesinden sonra parçacık boyutu 173 ± 43 nm olarak belirlenmiştir. Serbest DOX ve DOX yüklü nanoparçacıkların hücreler tarafından alınması konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak takip edilmiştir. Bu çalışma, kuru toz aerosol formunda nanoparçacıklar kullanılarak akciğer kanseri tedavisi yaklaşımını desteklemektedir (Azarmi ve ark., 2006).

HSA'dan oluşturulan nanoparçacıkların, hedef ilaçların tümör hücrelerine iletilmesinde umut vadeden bir strateji olabileceği düşünülmektedir Steinhäuser ve ark. (2006)'nın yaptıkları çalışmada; tiolatlanmış (thiolated) trastuzumab ile kovalent olarak modifiye edilmiş HSA nanoparçacıkları geliştirilmiştir. Farklı tiolasyon (thiolation) koşullarını ve antikoru dimerizasyonu derecesi belirlemişlerdir. Tiolatlanmış (thiolated) antikoru boyut dışlama kromatografisi (SEC) ile trastuzumab-konjüge nanoparçacıkların hazırlanması için en iyi tiolasyon (thiolation) prosedürü tespit edilmiştir. 6 haftalık bir depolama süresince, parçacıkların kararlı olduğu, boyut ve zeta potansiyeli gibi fizikokimyasal özelliklerinde herhangi bir değişiklik göstermediği görülmüştür. Elde

edilen veriler doğrultusunda trastuzumab konjuge HSA nanoparçacıkları kullanılarak tümör hücrelerinin yönlendirilmiş hedeflemesi için kararlı ve biyolojik aktif taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik bir temel oluşturulmuştur (Steinhauser ve ark., 2006).

Kan-beyin bariyeri (BBB), ilaçların çoğunun beyne girmesine önemli bir engel teşkil eder ve bu nedenle beyin tümörleri, alzheimer ve diğer nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere birçok ciddi merkezi sinir sistemi (CNS) hastalığının tedavisini şiddetle kısıtlar. Polisorbitat 80 ile kaplanmış nanoparçacıkların veya ekli apolipoprotein E, BBB' nin karşısında ilaçların verilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, bu gelişmiş taşıma mekanizması hala tam olarak anlaşılmamıştır. Zensi ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, hedefleyici molekül olarak apolipoprotein E (Apo E) ile kovalent bağlanmış insan serum albumini (HSA) nanoparçacıkları hazırlanarak SV 129 farelerinin damar içine enjekte edilmiştir. Hayvanların beyinleri transmisyon elektron mikroskopisi ile incelenmiştir. Sadece kovalent bağlı apolipoprotein E'ye sahip nanoparçacıklar, beyin kılcal endotel hücrelerinde ve nöronlarda tespit edilirken, beyin içinde apolipoprotein E içermeyen nanoparçacıklar saptanamamıştır. Bu bulgular, kovalent bağlanmış apolipoprotein E'ye sahip nanoparçacıkların bir endositik mekanizma ile serebral endotele alındığını ve bunu takiben beyin parankim içine transsitoz gönderdiğini göstermektedir (Zensi ve ark., 2009).

İlaçların malign dokuya spesifik olarak uygulanması ve taşınması, teşhis ve terapi sırasında kritik bir noktadır. Nanoparçacıklar mükemmel ilaç taşıyıcı sistemler olarak bilinir ve hedeflenen ligandlarla yüzey modifikasyonu imkanı sunar, böylece hedeflenen dokuda spesifik birikim meydana gelir. Löw ve ark. (2011) tarafından, biyolojik olarak parçalanabilir HSA'ne bağlı setuksimab nanoparçacıkları, hücresel bağlanma ve hücre içi birikimi açısından araştırılmıştır. Olası sitotoksik potansiyel, spesifik bağlanma ve hücre içi birikimi test etmek için farklı EGFR ifade eden kolon karsinom hücreleri kullanılmıştır. Sonuç olarak setuksimab ile modifiye edilmiş HSA-nanoparçacıklarının ilaç taşınması için umut verici bir taşıyıcı sistem olduğu belirtilmiştir. Bilinen çalışmalara göre bu çalışma; farklı EGFR ifade eden kolon karsinom hücrelerine HSA nanoparçacıklarının spesifik birikimlerini araştıran ilk çalışmadır (Löw ve ark., 2011).

Dubey ve ark. (2011) tarafından, albumini nanokürelerini, siklik arginin-glisin-aspartik asit/ arginin-alanin-aspartik asit (RGD / RAD) peptidi ile konjuge edilmiş ve boyut dağılımı temel alınarak karakterize edilmiştir. Hazırlanan tüm nanokürelerin ortalama boyutu yaklaşık olarak 100 nm ve en fazla ilaç tutuklaması % $67,2 \pm 5,2$ olarak bulunmuştur. Nanokürelerin *in-vitro* endotel hücre bağlanması, SN ve RAD-SN' lerine

kıyasla RGD-SN'lerinin insan göbek damar endotel hücrelerine (human umbilical vein endothelial cells) 8 kat daha yüksek bağlandığı görülmüştür. RGD peptid bağlı nanoküreleri akciğer metastazının, anjiyogenezisin önlenmesinde ve serbest fluorourasil, SN ve RAD-SN'lere kıyasla tümörlerin etkili regresyonunda etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, florourasil içeren siklik RGD peptid ile sabitlenmiş, sterik olarak stabilize nanokürelerin primer tümör ve metastaza karşı, sterik olarak stabilize nanoküre ve serbest ilaçtan daha aktif olduğunu göstermiştir (Dubey ve ark., 2011).

Terapötik proteinin kontrollü salınması protein uygulamaları önemli bir yere sahiptir. Gupta ve ark. (2017) kontrollü bir şekilde protein salımını sağlayabilen bir nanomateryal hakkında çalışma yapmışlardır. Nanomateryal, folik asit moleküllerinden sentezlenmiştir ve BSA bu nanoparçacıkların içerisinde bir model protein olarak yüklenmiştir. Sentezlenen folik asit nanoparçacıklarının boyut dağılımı 200 ile 300 nm arasında gözlenmiştir. HPLC kullanarak gerçekleştirilen salım çalışması, toplam folik asit ve BSA'nın % 95'inden fazlasının 48 saat içinde fosfat tamponlu tuz çözeltisinde bırakıldığını ortaya koymaktadır. Folik asit salımının BSA salımıyla birlikte araştırılması, parçacıkların folik asit-protein kompleksi yoluyla oluştuğunu ortaya koymaktadır. Salım ortamındaki tuz konsantrasyonunun, nanoparçacıkların salım oranını kontrol etmek için önemli bir parametre olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, folik asit nanoparçacıklarının, protein kapsüllenmesi ve minimum ilaç kaybıyla kontrollü bir şekilde salınması için etkili taşıyıcı olduğu ortaya konulmuştur (Gupta ve ark.,2017).

2.2. Antibiyotiklerin Kontrollü İlaç Salım Sistemleriyle Uygulamaları

Bhavane ve ark. (2007)'nin yapmış olduğu bir çalışmada, siprofloksasin yüklü nanoyapılı aglomeralı veziküllerin (agglomerated vesicles), sağlıklı bir tavşan modelinin akciğerlerindeki dağılımı incelenmiştir. Aglomeraları oluşturmak üzere nano boyutlu lipozomlar arasında çapraz bağlar oluşturulmuştur. Serbest siprofloksasin, lipozomal siprofloksasin ve siprofloksasin yüklü aglomeralı lipozomların akciğer aşılmasından (pulmoner instilasyonundan) sonra ilacın kan seviyeleri değerlendirilmiştir. Lipozomlar ve aglomeralı veziküller 24 saat içinde kan içine uzun süreli ilaç salımını gösterirken, serbest siprofloksasinin salım gerçekleştirmediği gözlenmiştir. (Bhavane ve ark., 2007).

Jain ve Banerjee (2008), kontrollü bir şekilde antibiyotik salımı için nanoteknoloji temelli sistemler geliştirmişlerdir. Siprofloksasin hidroklorit yüklü nanoparçacıkları dört farklı ilaç taşıyıcısı kullanarak (albumin, jelatin, kitosan, lipid (katı lipid nanoparçacıkları) hazırlamışlardır. Oluşturulan nanoparçacıkların ortalama parçacık boyutları ve ilaç

enkapsülasyon verimleri incelenmiştir. Albumini nanoparçacıklarının 120 saatte, kitosan nanoparçacıklarının 96 saatte, katı lipid nanoparçacıklarının ise 80 saatte ilacı saldıgı görülmüştür. Kitosan ve katı lipid nanoparçacıklarının sürekli siprofloksasin salımı için umut verici taşıyıcılar olduğu sonucuna varılmıştır (Jain ve Banerjee, 2008).

Azitromisin (AZI), eritromisin ile karşılaştırıldığında, hücre içi gram negatif bakterilere karşı daha iyi bir etkinliğe sahip yeni bir makrolid antibiyotiktir. AZI nanoparçacıklarının PLGA polimer kullanılarak hazırlanması ve hazırlanan nanoparçacıkların etkinliğinin, serbest AZI çözeltisi ile karşılaştırılması amacıyla Azhdarzadeh ve ark. (2012) bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, AZI nanoparçacıkları modifiye yarı-emülsiyon çözücü difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan nanoparçacıkların AZI çözeltisiyle karşılaştırıldığında antibakteriyel aktiviteleri, agar kuyu difüzyonunu kullanarak farklı bakterilerine karşı analiz edilmiştir. Nano formülasyonun inhibisyon bölgesi çapları (IZD), muamele edilmemiş AZI ile mukayese edilmiştir. AZI'nin ortalama inhibisyon konsantrasyon (MIC) değerleri, nutrient broth ortamında seri seyreltme yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Nanoparçacıkların test edilen bakterilere karşı MIC değerleri serbest AZI'ye kıyasla 8 kat azalmıştır. Sonuçlar, AZI nanoparçacıklarının geliştirilmiş bir potansiyeline işaret etmektedir ve bunlar, modifiye yüzey özelliklerini, ayrıca artan ilaç adsorpsiyonunu ve alımını göstermektedir (Azhdarzadeh ve ark., 2012).

Simeonova ve ark. (2017) nın yaptığı bir çalışmada, siprofloksasin yüklü poli (bütül siyanoakrilat) nanoparçacıkları (CfH-PBCN) için, parçacık oluşturma prosesleri gibi farklı polimerizasyon teknikleri, parenteral (bağırsak dışı) uygulama için nanoparçacık özellikleri açısından en uygun olanı seçmek üzere değerlendirilmiştir. Seçilen teknikle hazırlanan formülasyonların boyut, boyut dağılımı, yüzey yükü, yükleme verimi, ilaç salma gibi parametreleri incelenmiştir. Emülsiyon polimerizasyonu, ortalama çapı 300 nm' nin altında dar boyut dağılımına ve % 61-81 arasında yüksek bir ilaç yüküne sahip nanoparçacıklara yol açan en iyi teknik olarak bulunmuştur. CfH' nin, polimerizasyon işleminin başlatılmasında yer aldığı ve bunun da, gram pozitif bakterilerde ve ökaryotik hücrelerdeki etkinliğe duyarlılığını azaltabilecek CfH molekülünün modifikasyonu ile sonuçlandığı belirtilmiştir. CfH-PBCN'nin farklı bakteri türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi, bu ilacın polimer nanoparçacıkları ile ilişkisinden büyük ölçüde etkilenmediği sonucuna varılmıştır (Simeonova ve ark., 2017).

Nairi ve ark. (2017)'nın yaptıkları çalışmada, MCM-41, SBA-15 ve (amino fonksiyonlu) SBA-15-NH₂ sıralı mezo-gözenekli silis (OMS) malzemelerinden ampisilin

(β -laktam penisilin benzeri antibiyotik) adsorpsiyonu ve salımı araştırılmıştır. Silika matrisler gözenek büyüklüğü ve yüzey yükü bakımından farklıdır. OMS örnekleri, küçük açılı X-ışınları saçılımı (SAXS), transmisyon elektron mikroskopisi (TEM), N_2 adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi, fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) ve potansiyometrik titrasyonlar ile karakterize edilmiştir. Hareketsizleştirilen ve salınan ampisilinin miktarı, UV-Vis spektroskopisi ile takip edilmiştir. Deneysel adsorpsiyon izotermi, ampisilin yüklemesinin adsorbentin gözenek boyutuna bağlı olmadığını kanıtlamıştır. Yükleme miktarının ise, sorbent yüzeyinin yüzey yük yoğunluğu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu davranışı, SBA-15-NH₂'nin protonlanmış amino grubu ile ampisilinin negatif yüklü karboksilat grubu arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak açıklanmaktadır. Sürekli bir ilaç salımı elde etmek için, matris yüzeyinin kimyasal doğası, dokusal özelliklerinden daha önemli bir rol oynamaktadır. SBA-15-NH₂ matrisi, antibiyotik ilaçların lokal olarak sürekli salınması için uygun bir aday olarak gösterilmiştir (Nairi ve ark., 2017).

2.3. BSA'nın Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması

Merodio ve ark. (2001), üç farklı yolla ganciclovir yüklü BSA nanoparçacıkları hazırlamışlardır. 1. yolda etanolün üzerine protein çözeltisi damla damla karıştırma altında katılarak bulanık hale getirilmiş, glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Elde edilen nanoparçacığa ganciclovir yüklenmiştir. 2. Yolda protein çözeltisine ganciclovir katılarak nanoparçacık hazırlanmıştır. 3. Yolda ise protein çözeltisine ilaç katıldıktan sonra çapraz bağlanmış daha sonra etanol damla damla katılmıştır. Hazırlanan ilaç yüklü nanoparçacıkların 37° C'de pH 7,4 tamponunda salımları incelenmiştir. Nanoparçacık boyutu (nm), enkapsülasyon verimi (%), ilaç yükleme verimi (%) sırasıyla 1. yolda 225±6, 49,7±2,1, 14,6±1,1; 2. yolda 290±7, 65,3±2,5, 26,2±0,9; 3.yolda 320±9, 60,4±3,2, 20,8±1 olarak bulunmuştur (Merodio ve ark., 2001).

Rahimnejad ve ark. (2006) tarafından ilaç salım sisteminde nanoparçacıkların üretimi için BSA kullanılmıştır. Üretilen nanoparçacıkların boyutu, lazer ışığı taraması ile ölçülmüştür. Uygun bir nanoparçacık boyutu elde etmek amacıyla pH, sıcaklık, BSA konsantrasyonu, çalkalama hızı, glutaraldehit konsantrasyonu, organik çözücü ekleme hızı ve BSA / organik çözücünün oranı gibi parametreler incelenmiştir. Elde edilen nanoparçacıkların en küçük boyutu 101 nm en büyük boyutu 503 nm olarak belirlenmiştir. İnkübatörde 4° C de minimum 300-400 rpm'lik sabit çalkalama hızıyla nanoparçacıkların istenen boyutu elde edilmiştir. Ayrıca protein konsantrasyonunun ve parçacık boyutu

üzerine, ilave edilen organik çözücünün (etanol) oranı araştırılmıştır. (Rahimnejad ve ark., 2006).

Hidrofilik ilaçlar / peptitler, zayıf çapraz kan-beyin geçirgenliğine sahiptir. Kan-beyin bariyeri boyunca ilaçların efektif translokasyonu için çeşitli yüzey özellikleri farklı olan çeşitli ilaç dağıtım sistemleri bildirilmiştir. Mishra ve ark. (2006)'nın yaptıkları bir araştırmada, damar içi uygulama sonrasında, mühendislik uygulanmış albumin nanoparçacıkların beyin hedeflemesi için potansiyeli değerlendirilmiştir. Suda çözünür antiviral ilaç azidotimidin (AZT) yüklenmiş, PEG'lenmiş albumin nanoparçacıkları glutaraldehit ile kimyasal çapraz bağlanarak ultra-emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. PEG'lenmiş nanoparçacıkların yüzeyi beyin hedeflemesi demirleyerek modifiye edilmiştir. Nanoparçacıklar: büyüklük, polidispersite, yüzeysel yük, ilaç yüklemesi ve *in vitro* ilaç salımı için karakterize edilmiştir. Floresan çalışmaları, değiştirilmemiş nanoparçacıklarla karşılaştırıldığında beyin dokularında transferine bağlı nanoparçacıkların artan alımını ortaya koymuştur. *In vivo* değerlendirmede, damar içi uygulama sonrasında nanoparçacıkların doku dağılımının değerlendirilmesi için albino sıçanlar üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Transferrin sabitlenmiş PEG ile hazırlanmış albumin nanoparçacıkları (Tf-PEG-NPs) kullanıldığında, AZT'nin beyin lokalizasyonu için belirgin bir artış gözlenmiştir. Dolayısıyla transferrin ligandının beyin hedeflemesi için nanoparçacıklar üzerindeki spesifik rolü tespit edilmiştir (Mishra ve ark., 2006).

Yang ve ark. (2007) tarafından emülsifikasyon yoluyla 10-hidroksikamptotesin (10-Hydroxycamptothecin) (HCPT) yüklü BSA nanoparçacıkları hazırlanmıştır. Hazırlanan ilaç yüklü nanoparçacıkların 37° C'de pH 7,4, fosfat tamponunda karıştırma altında salımları incelenmiştir. Nanoparçacık boyutu 600 nm, enkapsülasyon verimi % 58, ilaç yükleme verimi % 90,5 olarak bulunmuştur. HCPT tripsin içeren yapılar pH 7,4 PBS ortamında 20 saat içerisinde % 90'dan fazla serbest bırakabilirken, saf pH 7,4 PBS ortamında 40 saatte % 25'ini serbest bırakabilmiştir (Yang ve ark., 2007).

Maghsoudi ve ark. (2008), desolvasyon tekniği ile 5-Fluorouracil yüklü BSA nanoparçacıkları hazırlamışlardır. BSA'nın üzerine suda çözünmüş ilaç çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında inkübe edilerek istenen pH değerine getirilmiştir. Oda sıcaklığında 550 rpm'de desolvasyon ajanı olan etanol eklenmiştir. % 8'lik glutaraldehit eklenerek gece boyu karıştırma altında çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanoparçacık santifüjlenmiştir. Pellet NaCl çözeltisinde dağıtılmıştır. İlaç yüklü BSA nanoparçacıkların

salımı diyaliz ve sonrasında spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Nanoparçacık boyutu 210 nm olarak bulunmuştur (Maghsoudi ve ark., 2008).

Zu ve ark. (2009)'nın yapmış oldukları çalışmada *in vitro* koşullarda PC-3 hücrelerini hedefleyen epigallokatekin-3-gallat (EGCG) BSA nanoparçacıkları ve etkinlik yeteneğinin değerlendirilmesi için, folat aracılı EGCG BSA nanoparçacıkları (FA-EGCG-BSANP) hazırlanmıştır. Nanoparçacıkların morfolojisi ve parçacık boyutu atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ile belirlenmiştir. HPLC, EGCG'nin enkapsülasyon verimi ve ilaç yükleme hızını analiz etmek için kullanılmıştır. BSA nanoparçacıkları üzerindeki folat konjugasyonunun miktarı ultraviyole (UV) spektrofotometre analizi ile belirlenmiştir. PC-3 hedefleme kabiliyeti, lazer tarama konfokal mikroskopu (LSCM) ve florofotometre mikroskopu kullanılarak gözlenmiş ve FA-EGCG-BSANP'nin etkinliği MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazolium Bromide) yöntemiyle değerlendirilmiştir. FA-EGCG-BSANP' nin morfolojisi ve parçacık boyutu ortalama 200 nm olarak belirlenmiştir. Kültürlenmiş PC-3 hücreleri tarafından alınan FA-EGCG-BSANP, konsantrasyona bağlı olarak EGCG-BSANP miktarının 23,65 katıdır. FA-EGCG-BSA ile tedavi edilen PC-3 hücrelerinin ölüm oranı % 82,8 iken, EGCG ve EGCG-BSANP ile tedavi edilenler sırasıyla % 58,6 ve % 55,1'dir. PC-3 hücrelerinin ölüm oranı, nanoparçacıkların alım miktarı ile pozitif korelasyon göstermiştir (Zu ve ark., 2009).

Zhao ve ark. (2010), desolvasyon tekniği ile paklitaksel (paclitaxel) yüklü BSA nanoparçacıkları hazırlamışlardır. Bu çalışmada; suda çözünmeyen antikanser ilacı olan paklitaksele desolvasyon ajanı olan etanol eklenerek glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. İlaç tutma ve yükleme verimi yaklaşık olarak sırasıyla % 95,3 ve % 27,2 olarak bulunmuştur (Zhao ve ark., 2010).

Yu ve ark. (2014)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, BSA nanoparçacıkları, desolvasyon yöntemi ve bunu takiben glutaraldehit fiksasyonu ve ısı denatürasyonu ile hazırlanmıştır. Nanoparçacıklar ortalama 492 nm çaplı küresel şekilde gözlenmiştir. Model ilaç olarak rodamin B kullanılmıştır. Rodamin B yüklü nanoparçacıklar, kontrollü salınım profili göstererek, kemik spiral tabakada biriktirilmiştir. BSA nanoparçacıklarının, iç kulak hastalıklarının tedavisinde lokal ilaç verme alanında potansiyel uygulamalar gösterebileceği bildirilmiştir (Yu ve ark., 2014).

Kontrollü salım sistemlerinde; ilacın belli dozda, belli hücreye ya da dokuya hedeflendirilmesinden dolayı zararlı etkiler ve ihtiyaç duyulan ilaç miktarı azaltılabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı kontrollü salım sistemleri bugün birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışma da; çeşitli stratejilerle hazırlanmış

Çapraz bağlı protein nanoagregatlarının kontrollü ilaç salımında kullanılabilme potansiyeli incelenmiştir. Çalışmada; model protein olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Protein nanoparçacıkları, bir tanesi denatüre edici diğeri ise yapıyı koruyucu iki farklı yöntemle hazırlanmıştır. Model bileşik olarak rodamin B kullanılmış ve hedef bileşik olan kloramfenikolün farklı yöntemlerle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklenme kapasiteleri ve verimleri ile kontrollü salımları incelenerek karşılaştırılmıştır.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma - Aldrich veya Merck firmalarından sağlanmıştır.

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Sığır serum albumini (lyophilized powder fraksiyon V), kloramfenikol, rodamin B, Coomassie Brilliant Blue G250, sodyum hidroksit, fosforik asit, asetik asit, borik asit, potasyum klorür, etanol, dekstran (Sigma 09184, *Leuconostoc spp.*, mol kütlesi $\approx 100,000$), glutaraldehit (% 25), sodyum meta periyodat, sodyum bor hidrür, sodyum klorür, sodyum dihidrojen fosfat, ≈ 12 kDa gözenek boyutuna sahip selüloz diyaliz membranı (Sigma D9652, MW 12203 Da), ters ozmoz su

3.1.2. Çözelti ve Reaktiflerin Hazırlanışı

3.1.2.1. Tampon Çözeltiler

0,1 M pH = 5 PBS: 3.90 g sodyum di hidrojen fosfat bir miktar ters ozmoz suda çözüldü, % 1 olacak şekilde sodyum klorür eklendi, pH'ı 5'e ayarlandı ve 250 mL'ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,1 M pH = 7,4 PBS: 3.90 g sodyum di hidrojen fosfat bir miktar ters ozmoz suda çözüldü, % 1 olacak şekilde sodyum klorür eklendi, pH'ı 7,4'e ayarlandı ve 250 mL'ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,2 M pH = 2 BRT: 0,558 g NaOH, 2,301 g H₃BO₄, 2,136 mL CH₃COOH, 2,502 mL H₃PO₄ ve 5,964 g KCl bir miktar suda çözüldü ve pH'ı 2 ye ayarlandı ve 500 mL'ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,2 M pH = 6 BRT: 2,386 g NaOH, 1,736 g H₃BO₄, 1,612 mL CH₃COOH, 1,887 mL H₃PO₄ ve 2,959 g KCl bir miktar suda çözüldü ve pH'ı 6 ye ayarlandı ve 500 mL' ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,02 M pH = 6 BRT: 50 mL 0,2 M pH=6 BRT tamponu balon jojeye alınarak 500 mL'ye ters ozmoz su ile tamamlandı

0,2 M pH = 7 BRT: 2,574 g NaOH, 1,622 g H₃BO₄, 1,5057 mL CH₃COOH, 1,763 mL H₃PO₄ ve 1,804 g KCl bir miktar suda çözüldü ve pH'ı 7 ye ayarlandı ve 500 mL ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,02 M pH = 7 BRT: 50 mL 0,2 M pH=7 BRT tamponu balon jojeye alınarak 500 mL'ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,2 M pH = 9 BRT: 3,224 g NaOH, 1,477 g H₃BO₄, 1,371 mL CH₃COOH, 1,605 mL H₃PO₄ bir miktar suda çözüldü ve pH'ı 9 ye ayarlandı ve 500 mL ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

0,02 M pH = 9 BRT: 50 mL 0,2 M,pH=9 BRT tamponu balon jojeye alınarak 500 mL'ye ters ozmoz su ile tamamlandı.

3.1.2.2. Diğer Çözeltiler

2 mg/mL Kloramfenikol çözeltisi: 200 mg kloramfenikol tartılarak bir miktar ters ozmoz suda çözüldü ve ters ozmoz su ile 100 mL ye tamamlandı.

2 mg/mL Rodamin B çözeltisi: 200 mg rodamin B tartılarak bir miktar ters ozmoz suda çözüldü ve ters ozmoz su ile 100 mL ye tamamlandı.

10 mg/mL BSA çözeltisi: 1 g BSA tartılarak bir miktar 0,02 M pH=7 BRT'da çözüldü ve 0,02 M pH=7 BRT ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.2.3. Bradford Reaktifi

10 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) 12,5 mL % 95'lik etanol içerisinde çözüldü. Üzerine 13,75 mL % 88'lik H₃PO₄ ilave edilerek ters ozmoz su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3. Araç ve Gereçler

UV - Vis Spektrofotometre (PerkinElmer Lambda25), mikrosantrifüj (Hettich EBA21), soğutuculu santrifüj (Nüve NF800R), pH metre (Inolab WTW720), vorteks cihazı (Velp Scientifica 2x³), analitik terazi (Precisa XB220A), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica ARE), inkübatör (Heidolph 1000), Thermomixer (Eppendorf Thermomixer C), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL JSM-7100F), kaplama cihazı (Quorum), Dinamik ışın saçılımı (DLS) (Brookhaven Ins. & Corp. 90 Plus)

3.2. Yöntem

3.2.1. Maksimum Dalga Boyunun Tespiti

3.2.1.1. Rodamin B'nin Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti

0,5 - 4 ppm konsantrasyon aralığında rodamin B çözeltileri hazırlanarak UV-Vis spektrofotometresinde 400-800 nm dalga boyu aralığında tarama yapıldı (Yu ve ark., 2014).

3.2.1.2. Kloramfenikolün Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti

5-55 µg/mL standart kloramfenikol çözeltileri hazırlanarak UV-Vis spektrofotometresinde 200-400 nm aralığında tarama yapıldı (Hegazy ve ark., 2015).

3.2.2. Protein Tayini

Protein tayini sığır serum albumininin (BSA), Comassie Brilliant Blue G250 ile verdiği reaksiyon sonucunda oluşan renkli kompleksin absorbansının spektrofotometrik olarak takip edilmesi ile gerçekleştirildi Bradford yöntemine göre; 150 µL örneğin üzerine 3 mL Bradford reaktifi eklenerek ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 595 nm'de absorbansa bakıldı (Bradford, 1976).

3.2.3. Dekstran Oksidasyonu

1,65 g dekstran 50 mL ters ozmoz su içerisinde çözülerek içerisine 3,85 g sodyum metaperiyodat eklendi. Çözelti oda sıcaklığında 90 dk. karıştırılarak dekstran oksidasyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sırasında çözelti ≈12 kDa gözenek boyutuna sahip selüloz diyaliz membranı kullanılarak her seferinde 5 L ters ozmoz suya karşı oda sıcaklığında en az 2 saat olmak üzere 5 kez diyaliz edildi (Mateo ve ark., 2003).

3.2.4. Girişim Çalışmaları

3.2.4.1. Kullanılan Kimyasalların Girişim Etkilerinin İncelenmesi

Etanol, ters ozmoz su, 2,5 mg/mL kloramfenikol, 10 mg/mL BSA, pH 7,4 PBS, dekstran polialdehit ve sodyum borhidrür UV-Vis spektrofotometresinde 200-400 nm. dalga boyu aralığında taranarak girişim yapan kimyasallar belirlendi.

3.2.4.2. Sodyum Borhidrürün BSA'ye Girişim Etkisi

Ters ozmoz suda hazırlanan 1 mg/mL BSA çözeltisi UV-Vis spektrofotometresinde 200-400 nm dalga boyu aralığında tarandı. BSA çözeltisine buz banyosunda, 1 saat, karıştırma altında 1 mg/mL olacak şekilde sodyum borhidrür eklendi. UV-Vis spektrofotometresinde 200-400 nm dalga boyu aralığında tarandı. Hem serbest BSA'nin hem de indirgenmiş BSA'nin verdikleri absorbanslar doğrultusunda birbirlerine olan girişimleri incelendi.

3.2.4.3. Sodyum Borhidrürün Rodamin B'ye Girişim Etkisi

Ters ozmoz suda hazırlanan 4 ppm rodamin B çözeltisi UV-Vis spektrofotometresinde 400-800 nm dalga boyu aralığında tarandı. Rodamin B çözeltisine buz banyosunda, 1 saat, karıştırma altında 1 mg/mL olacak şekilde sodyum borhidrür eklendi. UV-Vis spektrofotometresinde 400-800 nm dalga boyu aralığında tarandı. Hem serbest Rh B'nin hem de indirgenmiş Rh B'nin verdikleri absorbanslar doğrultusunda birbirlerine olan girişimleri incelendi.

3.2.4.4. Sodyum Borhidrürün Kloramfenikole Girişim Etkisi

Ters ozmoz suda hazırlanan 45 µg/mL kloramfenikol çözeltisi UV-Vis spektrofotometresinde 200-400 nm dalga boyu aralığında tarandı. Kloramfenikol çözeltisine buz banyosunda, 1 saat, karıştırma altında 1 mg/mL olacak şekilde sodyum borhidrür eklendi. UV-Vis spektrofotometresinde 200-400 nm dalga boyu aralığında tarandı. Hem serbest kloramfenikolün hem de indirgenmiş kloramfenikolün verdikleri absorbanslar doğrultusunda birbirlerine olan girişimleri incelendi.

3.2.5. BSA Nanoparçacıklarının Hazırlanması

BSA nanoparçacıkları, klasik desolvasyon (Yu ve ark., 2014) ve şok agregasyon yöntemleri kullanılarak hazırlandı (Schoevaart ve ark., 2004).

3.2.5.1. BSA Nanoparçacıklarının Optimizasyonu

3.2.5.1.1. Etanol-BSA Çöktürme Optimizasyonu

Farklı Etanol-BSA Oranlarında Çöken Protein Miktarının Belirlenmesi;

1,5 mL'lik santrifüj tüplerine 400 µL 10 mg/mL BSA çözeltisi eklendi. Üzerine 600 µL soğuk etanol (-18° C'de bekleyen) katılıp vortekslenerek -18° C'de 15 dk'da çöktürüldü

(% 60 etanol-BSA). Oluşan agregat 12000 rpm’de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant fazında Bradford yöntemine göre protein tayini yapıldı. Çöken protein miktarı ve çöken protein konsantrasyonları hesaplandı.

Yukarıda % 60 etanol-BSA oranı için anlatıldığı gibi son hacim 1 mL olacak şekilde % 70, 80 ve 90 için de denendi ve en uygun etanol-BSA çöktürme oranı belirlendi. Tüm işlemler hem ters ozmoz suda hazırlanan BSA hem de 0,02 M pH=7 BRT’de hazırlanan BSA için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Farklı Etanol-BSA Oranlarında Parçacık Boyutunun İncelenmesi;

Termomikserde (4° C, 700 rpm) 50 mL’lik falkonlara % 60, 70, 80, 90 etanol-BSA (ters ozmoz suda) toplam hacim 5 mL olacak şekilde 30 dk karıştırılarak çöktürüldü. Oluşan agregatın 3 mL sinde dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) ile parçacık boyutuna bakıldı.

Farklı pH’larda Parçacık Boyutunun İncelenmesi;

Termomikserde (4° C, 700 rpm) 50 mL’lik falkonlara % 70 etanol-BSA (0,02 M pH 6, 7, 9 BRT) toplam hacim 5 mL olacak şekilde 30 dk karıştırılarak çöktürüldü. Oluşan agregatın 3 mL’inde dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) ile parçacık boyutuna bakıldı.

3.2.5.1.2. Çapraz Bağlama Optimizasyonu

% 70 Etanol için farklı miktarlarda glutaraldehit ve dekstran polialdehit ile çapraz bağlama gerçekleştirildi. 4 ayrı falkonda 3,5 mL etanole 1,5 mL 10mg/mL BSA (ters ozmoz suda) eklenerek termomikserde (4° C, 700 rpm) 30 dk çöktürüldü. 1. falkona % 2,5 1 mM glutaraldehitten 19 µL, 2. falkona % 2,5 0,5 mM glutaraldehitten 9,5 µL, 3. falkona 250 µL dekstran polialdehit 4. falkona 125 µL dekstran polialdehit eklenerek 25° C, 700 rpm’de 3 saat çapraz bağlandı.

3.2.5.2. Ölçek Büyütme Çalışmaları

Elde edilen optimizasyon bulgularının doğrultusunda; termomikserde (4° C, 700 rpm) 50 mL’lik falkonda 15 mL 10 mg/mL BSA (pH=7 0,02 M BRT’de) üzerine 35 mL soğuk etanol eklendi. 30 dk termomikserde çöktürüldü. Oluşan agregat magnetik karıştırıcıda 2,5 mL dekstran polialdehit ile 25° C, 700 rpm’de 3 saat çapraz bağlandı ve görsel olarak incelendiğinde mikro-nanoparçacık karışımı olduğu görüldü. Çapraz bağlama işlemi 2,5 mL dekstran polialdehit yerine 250 µL dekstran polialdehit ile denendi ve nanoparçacık oluşumu gözlemlendi. Bradford yöntemine göre yapılan protein tayini

sonucuna göre ortalama % 95'in üzerinde BSA'nın çapraz bağlandığı sonucuna varıldı. BSA nanoparçacıklarının üretim presedürü de bu bilgiler doğrultusunda oluşturuldu.

3.2.5.3. BSA Nanoparçacıklarının Üretimi

3.2.5.3.1. Desolvasyon Yöntemi

Çöktürme işlemi termomikserde (4°C , 700 rpm) 50 mL'lik falkonlara 10 mg/mL BSA (pH=7 0,02 M BRT'de) 15 mL eklendi üzerine 35 mL soğuk etanol damla damla katıldı. 30 dk termomikserde çöktürüldü (Yu ve ark., 2014).

3.2.5.3.2. Şok Çöktürme Yöntemi

Çöktürme işlemi termomikserde (4°C , 700 rpm) 50 mL'lik falkonlarda 35 mL soğuk etanolün üzerine 15 mL 10 mg/mL BSA (pH=7 0,02 M BRT'de) aniden eklendi. 30 dk termomikserde çöktürüldü (Schoevaart ve ark., 2004).

3.2.5.3.3. Çapraz Bağlama

Oluşan agregat (50 mL) magnetik karıştırıcıda 250 μL dekstran polialdehit ile 25°C , 700 rpm'de 3 saat çapraz bağlandı (Schoevaart ve ark., 2004).

3.2.5.3.4. İndirgeme

1 mg/mL NaBH_4 ile 1 saat magnetik karıştırıcıda buz banyosunda karıştırılarak indirgendi (2 Kez).

3.2.5.3.5. Yıkama

Elde edilen BSA nanoparçacık preparatlarından, serbest proteini uzaklaştırmak amacıyla 0,02 M pH=7 BRT ile serbest protein ortamdan uzaklaşmaya kadar yıkandı (3-4 kez). Her yıkamadan sonra protein tayini yapıldı.

3.2.6. Rodamin B / Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Üretimi

Termomikserde (4°C , 700 rpm) 50 mL'lik falkonlarda farklı miktarlarda rodamin B ve kloramfenikol ayrı ayrı 35 mL etanolde çözüldü, 15 mL 0,02 M pH=7 BRT de hazırlanmış BSA çözeltisi (10 mg/mL) aniden eklendi. 30 dk termomikserde çöktürüldü. Oluşan agregat (50 mL) magnetik karıştırıcıda 250 μL dekstran polialdehit ile 25°C , 700 rpm'de 3 saat çapraz bağlandı. 1 mg/mL NaBH_4 ile 1 saat magnetik karıştırıcıda buz banyosunda karıştırılarak indirgendi (2 Kez). Elde edilen rodamin B ve kloramfenikol

yüklü BSA nanoparçacıklarından, serbest proteini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, 0,02 M pH=7 BRT ile serbest protein ortamdan uzaklaşınca kadar yıkandı (3-4 kez). Her yıkamadan sonra protein tayini yapıldı (Merodio ve ark., 2001).

3.2.7. Morfoloji Çalışmaları

Üretilen yapıların morfolojik incelenmesi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirip, dinamik ışık saçılımı metodu (Dynamic light scattering (DLS)) ile desteklenmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile yüzey görüntüleri alınmadan önce. numunelerin iletkenlik özelliklerini arttırmak için Quorum kaplama cihazında 8×10^{-1} mbar/Pa vakum uygulanıp, 10 mA voltaj uygulanarak altın-paladyum (% 80-20) kaplama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 15,0 -20,0 kV voltaj uygulanarak fotoğraflar çekildi.

3.2.8. İlaç Yükleme Çalışmaları

3.2.8.1. BSA Nanoparçacıklarına Rodamin B Yükleme

Beş ayrı falkon tüpünde 0,08 g BSA nanoparçacığı 26, 22, 18, 16 ve 14 mL ters ozmoz suda dağıtıldı. Hazırlanan 2 mg/mL rodamin B çözeltisinden sırasıyla; 4, 8, 12, 14, 16 mL eklenerek oda koşullarında ($\approx 25^\circ\text{C}$), 700 rpm'de 2 saat karıştırıldı. 4°C , 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi. UV-Vis spektrofotometresinde 554 nm dalga boyunda absorpsiyona bakıldı. Yüklendi rodamin B'yi ortamdan uzaklaştırmak için 3 kez ters ozmoz su ile yıkama işlemi yapıldı. Aşağıdaki formüller kullanılarak ilaç yükleme ve enkapsülasyon verimleri hesaplandı. Her bir yükleme üç kez tekrarlandı (Yu ve ark., 2014).

$$\text{İlaç Yükleme Kapasitesi (w/w\%)} = \frac{\text{Nanoparçacıklarda yüklenmiş kimyasal miktarı}}{\text{Nanoparçacık miktarı}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (w/w\%)} = \frac{\text{Nanoparçacıklarda yüklenmiş kimyasal miktarı}}{\text{Başlangıçta eklenen kimyasal miktarı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.8.2. BSA Nanoparçacıklarına Kloramfenikol Yükleme

Beş ayrı falkon tüpünde 0,08 g desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacığı 26, 22, 18, 16 ve 14 mL ters ozmoz suda dağıtıldı. Hazırlanan 2 mg/mL kloramfenikol çözeltisinden sırasıyla; 4, 8, 12, 14, 16 mL eklenerek oda koşullarında ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), 700 rpm'de 2 saat karıştırıldı. 4°C , 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi.

Beş ayrı falkon tüpünde 0,08 g şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacığı 26, 22, 18, 14 ve 5 mL ters ozmoz suda dağıtıldı. Hazırlanan 2 mg/mL kloramfenikol çözeltisinden sırasıyla; 4, 8, 12, 16, 25 mL eklenerek oda koşullarında ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), 700 rpm'de 2 saat karıştırıldı. 4°C , 4000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi.

UV-Vis spektrofotometresinde 277 nm dalga boyunda (kloramfenikol + serbest protein) absorbansına bakıldı. 280 nm de serbest proteinin girişiminden dolayı aynı örneklerde Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bradford yöntemiyle örneklerde ölçülen protein konsantrasyonlarında standard BSA çözeltileri hazırlanarak absorbans ölçümleri yapıldı. Kloramfenikol + serbest protein'in absorbansından protein absorbansı çıkarılarak kloramfenikol absorbansı tespit edildi. Yüklenecek kloramfenikolu ortamdan uzaklaştırmak için 3 kez ters ozmoz su ile yıkama işlemi yapıldı. Bölüm 3.2.6.1'de verilen formüller kullanılarak ilaç yükleme ve enkapsülasyon verimleri hesaplandı. Her bir yükleme üç kez tekrarlandı (Yu ve ark., 2014).

3.2.9. Salım Çalışması

3.2.9.1. Rodamin B Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması

Rodamin B yüklü BSA nanoparçacıkları 100 mL pH = 2 BRT, pH = 5, 7,4 PBS'de dağıtıldı. 37°C , 200 rpm'de inkübe edildi. Belli aralıklarda 1,5 mL örnek alınıp 12000 rpm, 10 dk santrifüjlenip süpernatantın 554 nm'deki absorbansına bakıldı (Sarabia-Sainz ve ark., 2015).

Salım miktarı şekil 4.3. de gösterilen rodamin B'nin kalibrasyon grafiğindeki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$y = 0,2582x - 0,0247$$

denkleminde y ile belirtilen yere spektrofotometreden okunan absorbans değeri alınarak ppm cinsinden derişim bulundu. Gerekli işlem yapılarak (/1000) derişim mg/mL'ye çevrildi. Toplam hacim ile çarpılarak mg olarak ne kadar salım yaptığı bulundu. Aşağıdaki formül kullanılarak kümülatif salım (%) miktarı hesaplandı.

$$\text{Kümülatif salım (\%)} = \frac{\text{Salınan kimyasal miktarı (mg)}}{\text{Yüklenen kimyasal miktarı (mg)}} * 100 \quad (3.3)$$

3.2.9.2. Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması

Kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıkları 100 mL pH = 2 BRT, pH = 5, 7,4 PBS’de dağıtıldı. 37° C, 200 rpm’de inkübe edildi. Belli aralıklarda 1,5 mL örnek alınıp 12000 rpm 10 dk santrifüjlenip süpernatantın 277 nm’deki absorbansına bakıldı (Sarabia-Sainz ve ark., 2015). Serbest proteinin girişiminden dolayı her örnekte protein tayini yapıldı. Kloramfenikol + protein miktarından protein miktarı çıkarılarak kloramfenikol miktarı bulundu.

Salım miktarı şekil 4.4. de gösterilen kloramfenikolün kalibrasyon grafiğindeki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$y = 0,0259x + 0,009$$

denkleminde y ile belirtilen kloramfenikolün absorbans değeri alınarak µg/mL cinsinden derişim bulundu. Gerekli işlem yapılarak (/1000) derişim mg/mL’ye çevrildi. Toplam hacim ile çarpılarak mg olarak ne kadar salım yaptığı bulundu. Bölüm 3.2.9.2. de verilen formül kullanılarak kümülatif salım (%) miktarı hesaplandı.

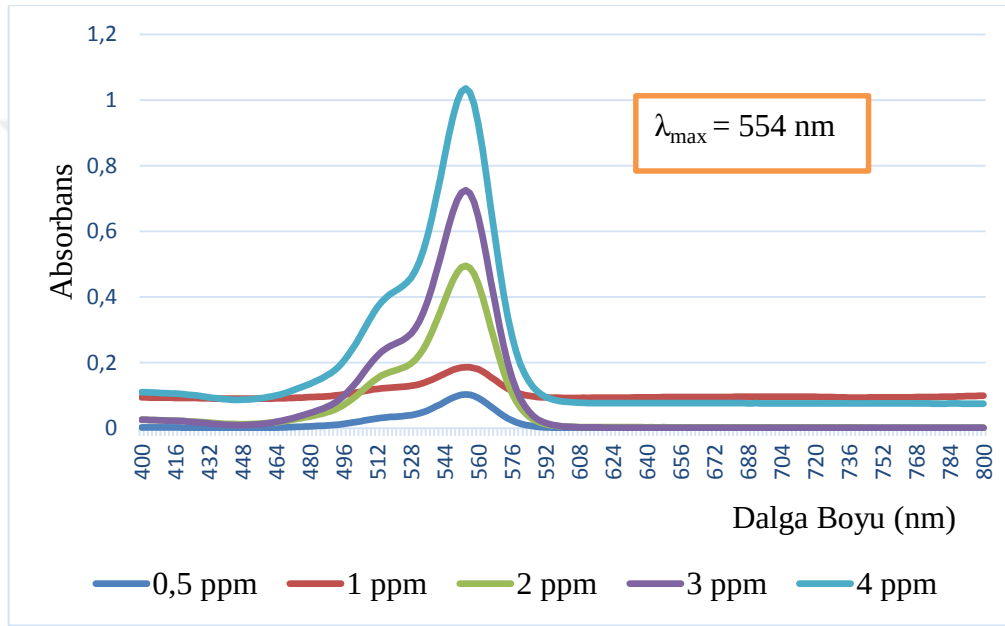
BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Maksimum Dalga Boyunun Tespiti

4.1.1. Rodamin B'nin Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti

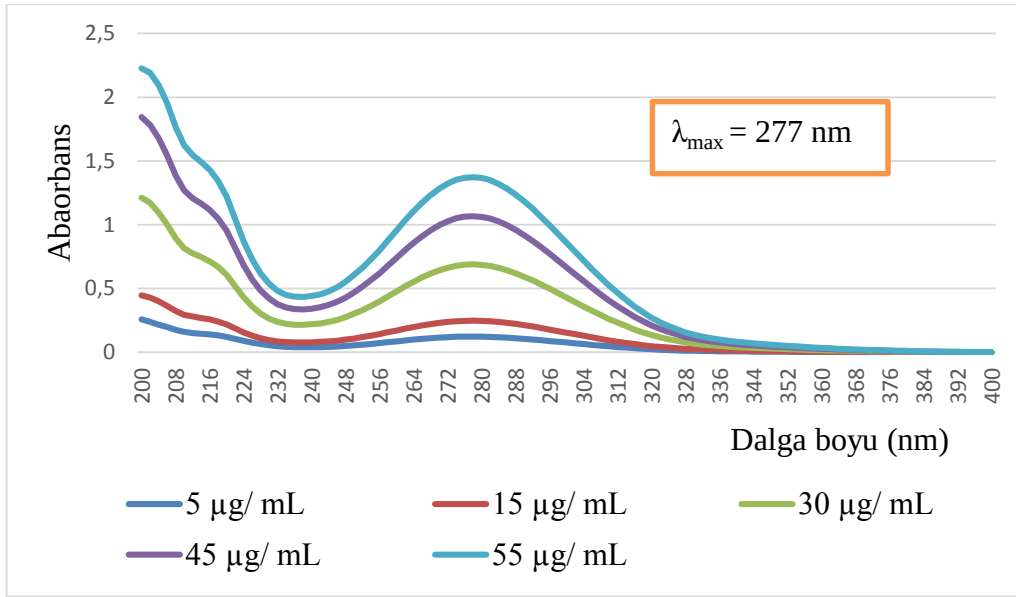
Bölüm 3.2.1.1. de anlatıldığı gibi dalga boyu taraması yapılmıştır. UV-Vis spektrofotometresinden alınan absorbans değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.1. de gösterildiği gibi maksimum dalga boyu $\lambda_{\max} = 554 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Rodamin B'nin maksimum soğurma yaptığı dalga boyu

4.1.2. Kloramfenikolün Maksimum Soğurma Yaptığı Dalga Boyunun Tespiti

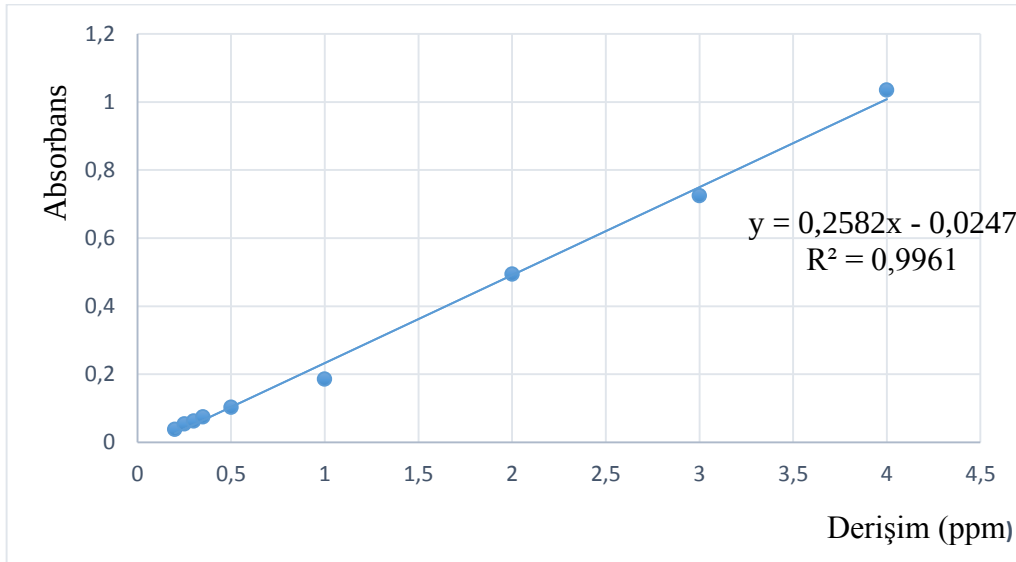
Bölüm 3.2.1.2. de anlatıldığı gibi dalga boyu taraması yapılmıştır. UV-Vis spektrofotometresinden alınan absorbans değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.2. de gösterildiği gibi maksimum dalga boyu $\lambda_{\max} = 277 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur.



4.2. Standart Grafiklerin Oluşturulması

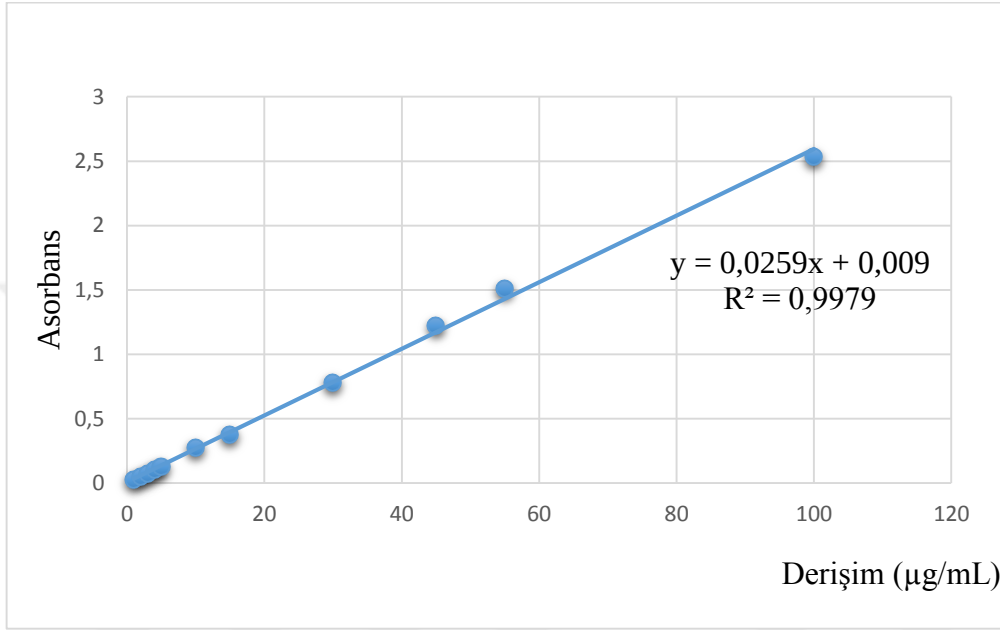
4.2.1. Rodamin B Kalibrasyon Grafiği

0,2-4 ppm konsantrasyon aralığında rodamin B çözeltilerinin 554 nm’de verdikleri absorbanslar kullanılarak şekil 4.3. deki kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Grafikten elde edilen doğru denklemi daha sonra Rh B miktarlarını hesaplamak için kullanılmıştır.



4.2.2. Kloramfenikol Kalibrasyon Grafiği

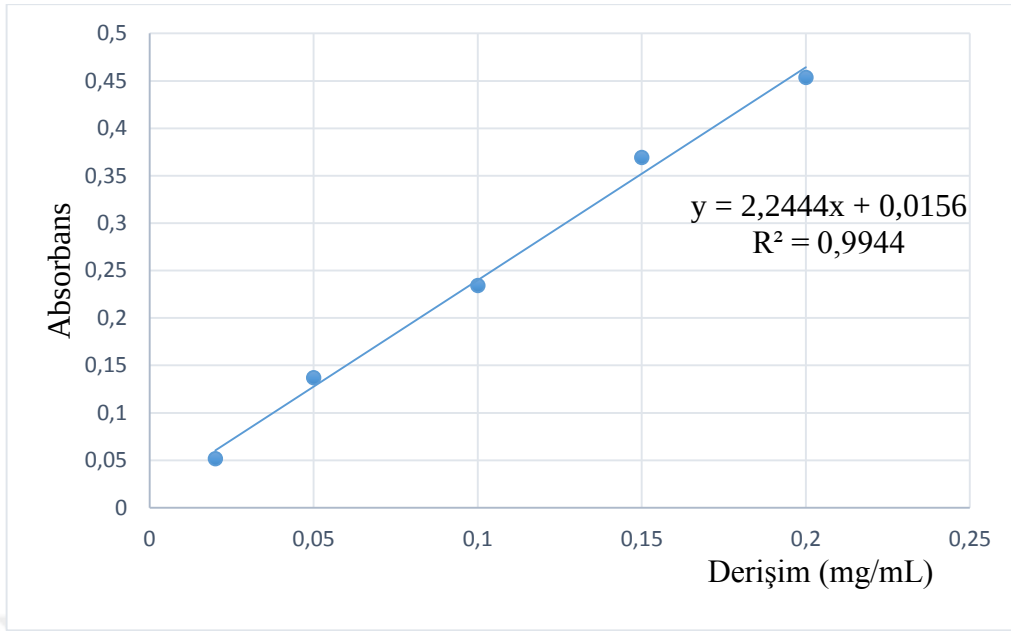
1-100 µg/mL ters ozmoz suda kloramfenikol çözeltileri hazırlanarak 277 nm’de verdikleri absorbanslar kullanılarak şekil 4.4 deki kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Grafikten elde edilen doğru denklemi daha sonra kloramfenikol miktarlarını hesaplamak için kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Kloramfenikolün kalibrasyon grafiği

4.3. Protein Tayini

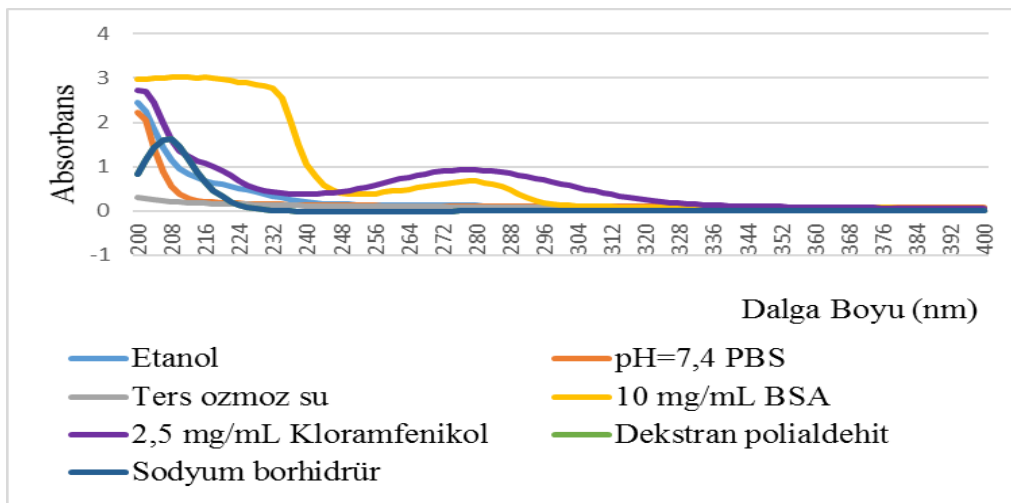
Bölüm 3.2.2. de anlatıldığı gibi BSA için Bradford yöntemiyle protein tayini yapılmıştır. UV-Vis spektrofotometresinden alınan absorbanslar kullanılarak şekil 4.5. deki kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Hazırlanan her yeni Bradford reaktifi için yeni kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır ve bu grafiklerden bir tanesi gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Protein kalibrasyon grafiğı (BSA)

4.4. Kullanılan Kimyasalların Girişim Etkilerinin İncelenmesi

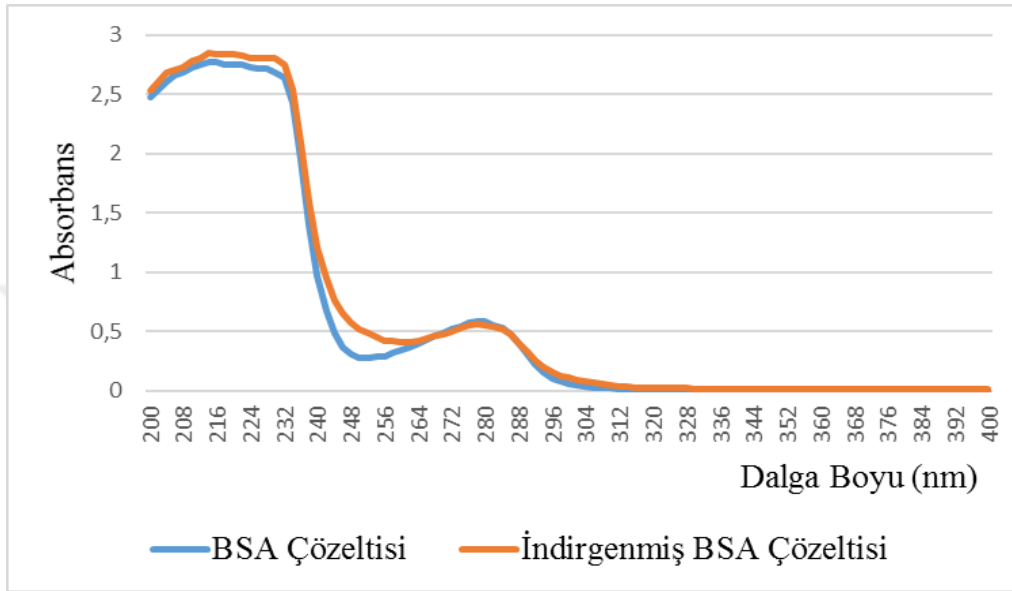
Bölüm 3.2.4.1. de anlatıldığı gibi deneyler süresince kullanılan kimyasalların girişim etkileri incelenmiştir. UV-Vis spektrofotometresinden alınan absorbanslar kullanılarak şekil 4.6. daki grafik oluşturulmuştur. Kloramfenikol ve BSA çözeltileri 280 nm.'de pik verirken diğer kimyasalların pik vermediğı gözlenmiştir. BSA'nın kloramfenikole yaptığı girişimden dolayı yükleme ve salım çalışmasında kloramfenikol takibi yapılırken protein tayini de yapılmıştır.



Şekil 4.6. Kullanılan kimyasalların girişim etkisi

4.4.1. Sodyum Borhidrürün BSA'ye Girişim Etkisi

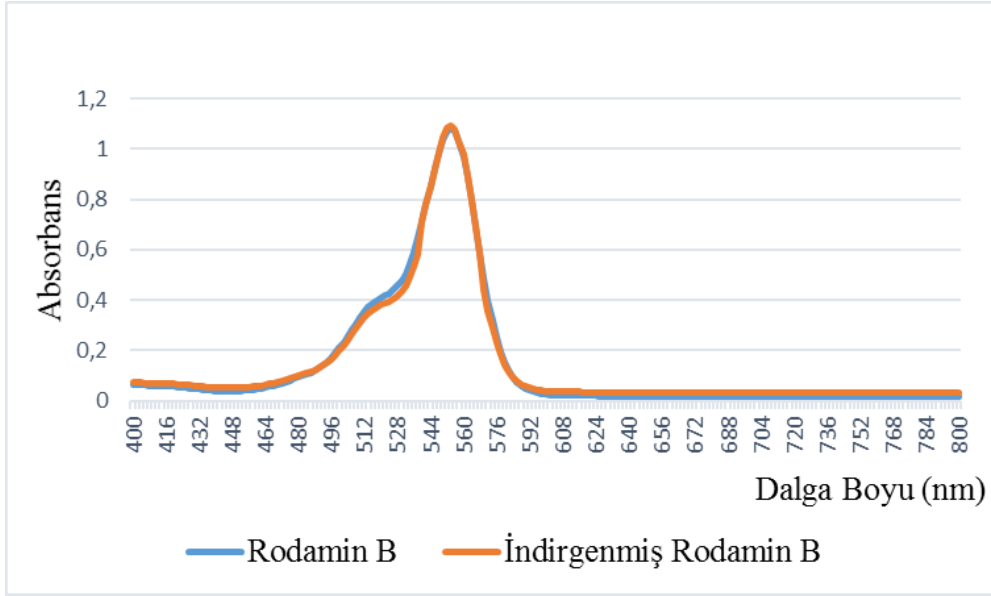
Bölüm 3.2.4.2. de anlatıldığı gibi sodyum borhidrürün BSA'ye olan girişim etkisi incelenmiştir. Serbest BSA'nin ve indirgenmiş BSA'nin verdiği absorbanslar kullanılarak şekil 4.7. deki grafik oluşturulmuştur. Sodyum borhidrürün serbest BSA'ye girişim yapmadığı görülmüştür.



Şekil 4.7. Sodyum borhidrürün BSA'ye girişim etkisi

4.4.2. Sodyum Borhidrürün Rodamin B'ye Girişim Etkisi

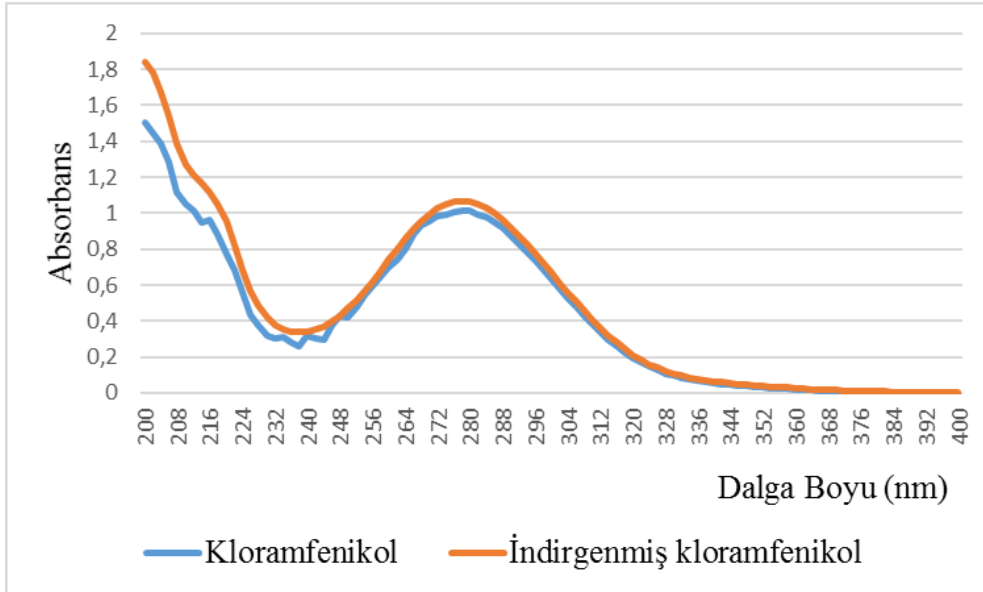
Bölüm 3.2.4.3. de anlatıldığı gibi sodyum borhidrürün Rh B'ye olan girişim etkisi incelenmiştir. Serbest Rh B'nin ve indirgenmiş Rh B'nin verdiği absorbanslar kullanılarak şekil 4.8. deki grafik oluşturulmuştur. Sodyum borhidrürün serbest Rh B'ye girişim yapmadığı görülmüştür.



Şekil 4.8. Sodyum borhidrürün rodamin B'ye girişim etkisi

4.4.3. Sodyum Borhidrürün Kloramfenikole Girişim Etkisi

Bölüm 3.2.4.4. de anlatıldığı gibi sodyum borhidrürün kloramfenikole olan girişim etkisi incelenmiştir. Serbest kloramfenikol ve indirgenmiş kloramfenikolün verdiği absorbanslar kullanılarak şekil 4.9. daki grafik oluşturulmuştur. Sodyum borhidrürün serbest kloramfenikole girişim yapmadığı görülmüştür.



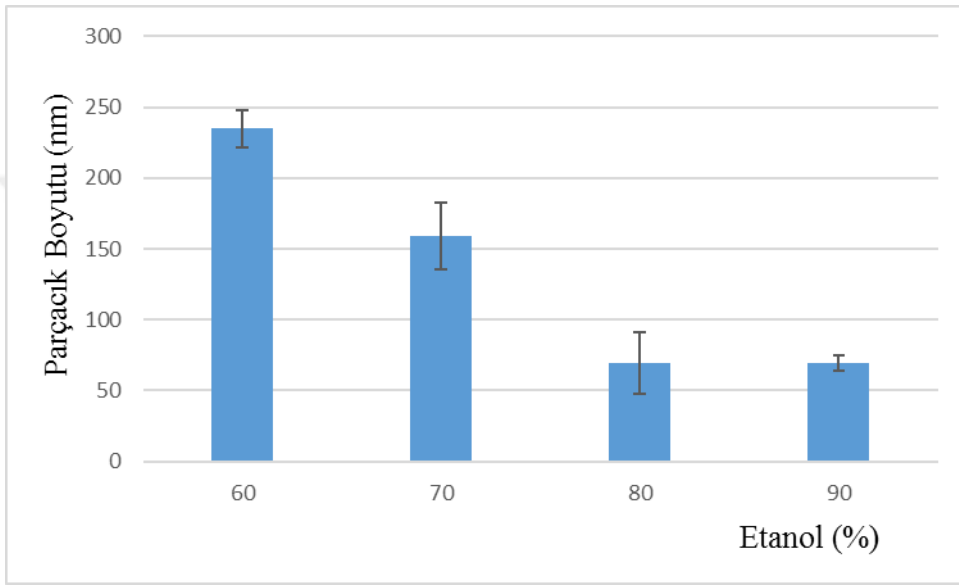
Şekil 4.9. Sodyum borhidrürün kloramfenikole girişim etkisi

4.5. BSA Nanoparçacıklarının Optimizasyonu

4.5.1. Etanol-BSA Çöktürme Optimizasyonu

4.5.1.1. Farklı Etanol-BSA Oranlarında Parçacık Boyutunun İncelenmesi

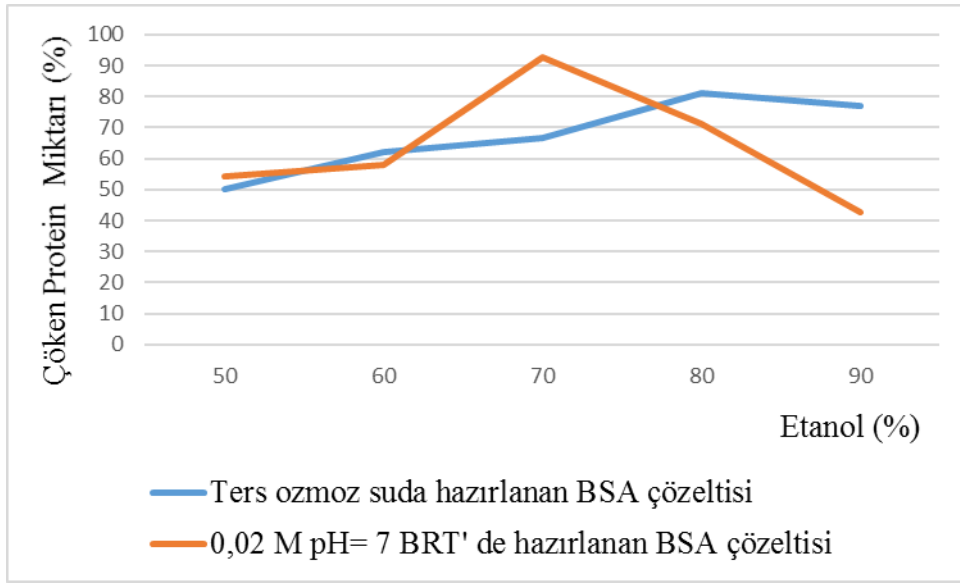
Bölüm 3.2.5.1.1. de anlatıldığı gibi farklı etanol-BSA oranları kullanılarak agregatlar elde edilmiştir. Elde edilen agregatların dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) ile parçacık boyutuna bakılmıştır. Parçacık boyutları ve etanol-BSA oranları kullanılarak şekil 4.10. daki grafik oluşturulmuştur.



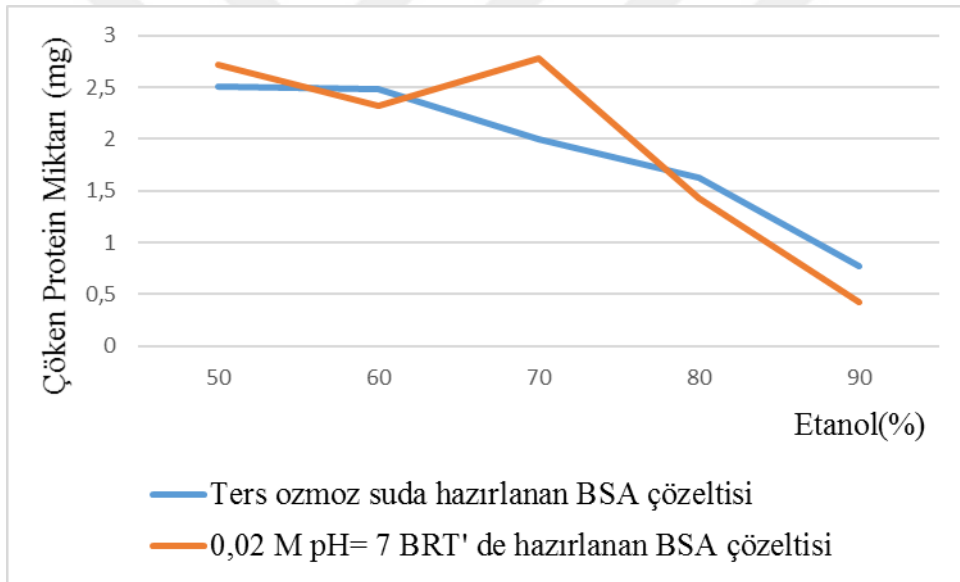
Şekil 4.10. Farklı etanol-BSA oranlarında parçacık boyutu

4.5.1.2. Farklı Etanol-BSA Oranlarında Çöken Protein Miktarının Belirlenmesi

Bölüm 3.2.5.1.1. de anlatıldığı gibi % 60, 70, 80 ve 90 etanol oranlarında çöken protein miktarı % ve mg cinsinden hesaplanarak etanol-BSA oranlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Etanol (çöktürücü) miktarı arttıkça çöken protein miktarının artması beklenirken sonuçların bu şekilde olmadığı görülmüştür. Çünkü; yapılan çalışmada etanol miktarı arttıkça protein miktarı azalmıştır. Buna bağlı olarak da sonuçlar değişiklik göstermiştir. Çalışılan % 60 - 90 çöktürme aralığında en iyi sonucun % 70 etanol oranı olduğu şekil 4.12. ve şekil 4.13. deki grafiklerden görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda; % 70 Etanol 0,02 M pH=7 BRT ortamında çöktürme işleminin gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



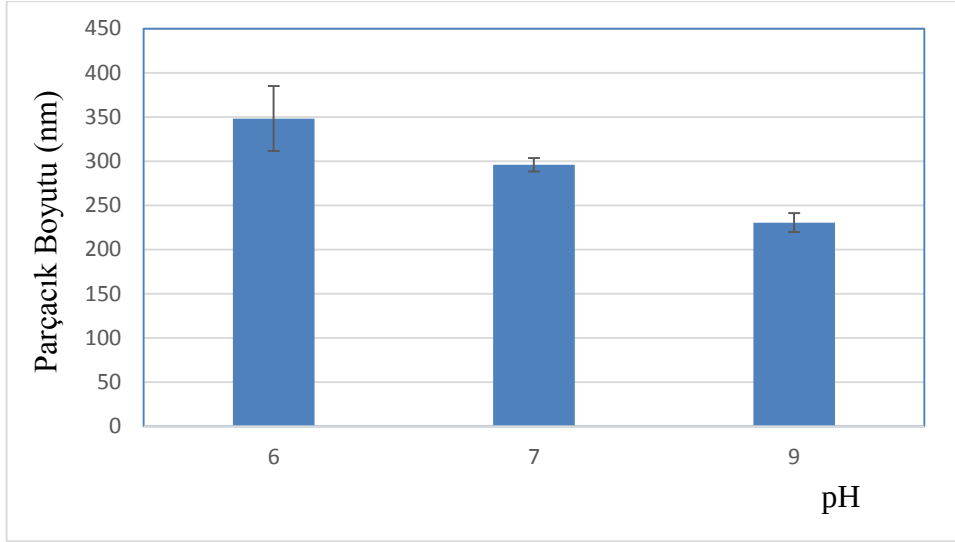
Şekil 4.11. Farklı etanol-BSA oranlarında çöken protein miktarı (%)



Şekil 4.12. Farklı etanol-BSA oranlarında çöken protein miktarı (mg)

4.5.1.3. Farklı pH'larda Parçacık Boyutunun İncelenmesi

Bölüm 3.2.5.1.1 de anlatıldığı gibi farklı pH'larda parçacık boyutları incelenmiştir. Elde edilen agregatların dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) ile parçacık boyutuna bakılmıştır. Parçacık boyutları ve pH değerleri kullanılarak şekil 4.11. deki grafik oluşturulmuştur.



Şekil 4.13. % 70 Etanol-BSA'nın farklı pH'lardaki parçacık boyutu

4.5.2. Çapraz Bağlama Optimizasyonu

Bölüm 3.2.5.1.2. de anlatıldığı gibi % 70 etanol için farklı miktarlarda glutaraldehit ve dekstran polialdehit çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehit için her iki miktarda da gözle görülebilecek büyüklükte mikroparçacıklar oluşurken, dekstran polialdehit için her iki miktarda da nanoparçacık oluşumu gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak çapraz bağlama ajanı olarak dekstran polialdehit tercih edilmiştir.

4.6. BSA Nanoparçacıklarının Hazırlanması

4.6.1. Desolvasyon Yöntemi

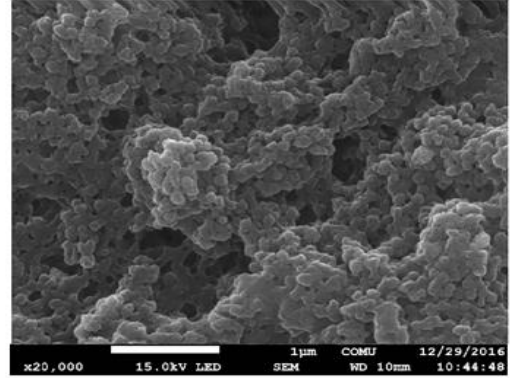
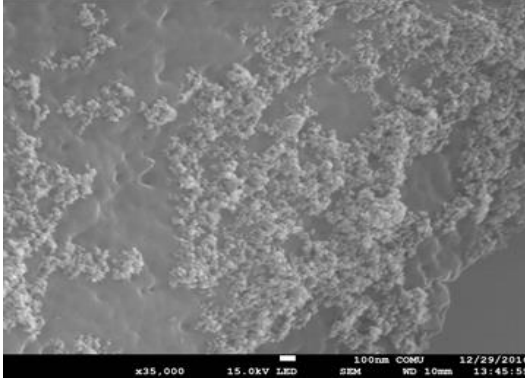
Bölüm 3.2.5.3.1. de anlatıldığı gibi desolvasyon yöntemine göre literatür ile uyumlu olarak 448 nm boyutlarında BSA nanoparçacıkları hazırlanmıştır (Yu ve ark., 2014).

4.6.2. Şok Çöktürme Yöntemi

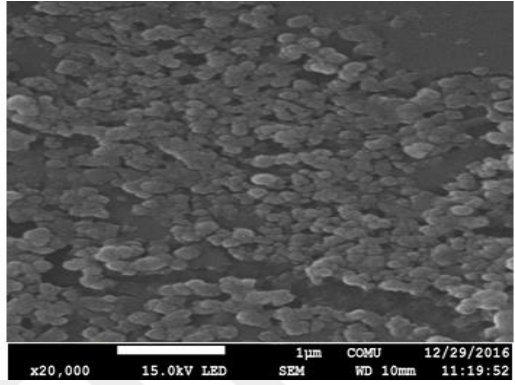
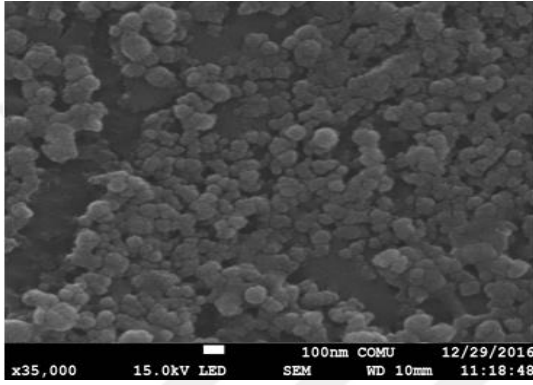
Bölüm 3.2.5.3.2. de anlatıldığı gibi şok çöktürme yöntemine göre literatürden daha küçük boyutlarda (232 nm) BSA nanoparçacıkları hazırlanmıştır (Schoevaart ve ark., 2004).

4.6.3. Morfoloji çalışmaları

Üretilen yapıların morfolojik incelenmesi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirip, dinamik ışık saçılımı metodu (Dynamic light scattering (DLS)) ile desteklenmiştir.

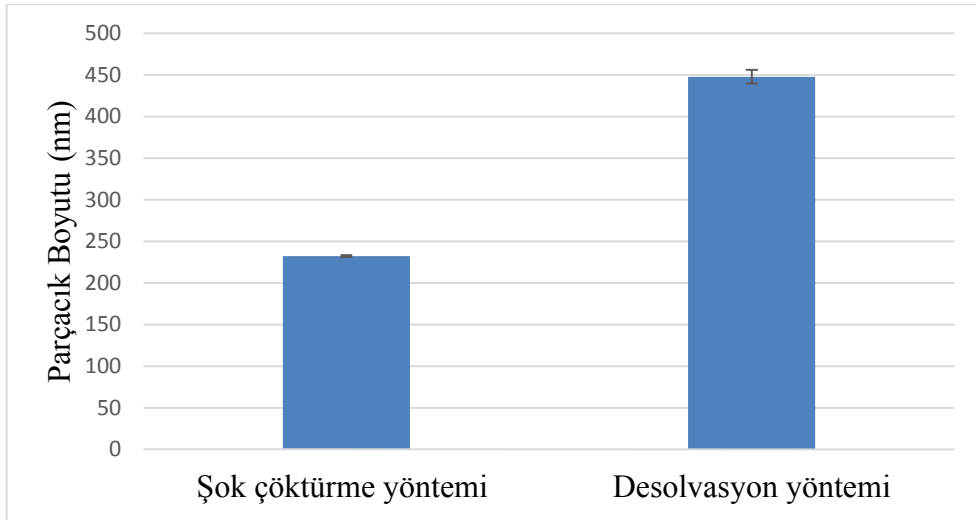


Şekil 4.14. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarının SEM görüntüleri



Şekil 4.15. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarının SEM görüntüleri

Bölüm 3.2.7. de anlatıldığı gibi hem desolvasyon yöntemine göre hemde şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarının SEM görüntüleri 15,0 kV voltaj uygulanarak 35000 ve 15000 kat büyütülerek çekilmiştir. Şekil 4.14. ve şekil 4.15. de görüldüğü gibi nanoparçacıkların küresel şekilde olması literatür ile de uyumludur (Schoevaart ve ark., 2004; Yu ve ark., 2014). Kürelerin net bir şekilde ayrı ayrı görülmemesinin nedeni protein nanoparçacıklarının üst üste yığılmasından kaynaklanmaktadır. Hem SEM hem de DLS sonuçlarına bakıldığında ise birbirlerini destekler nitelikte olduğu görülmektedir.



Şekil 4.16. BSA nanoparçacıklarının DLS ile parçacık boyutunun belirlenmesi

Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarının ortalama parçacık boyutu $232,0 \pm 1,24$ nm desolvasyon yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarının ortalama parçacık boyutu $448,0 \pm 8,40$ nm olarak literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Schoevaart ve ark., 2004; Yu ve ark., 2014)

Sonuçlara göre; desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutu, şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutunun ≈ 2 katıdır. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacık boyutunun, şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacık boyutundan fazla olmasının nedeni; desolvasyon yönteminde etanolün damla damla katılması sonucunda BSA'nin denatüre olmasıdır. Desolvasyon yönteminin proteini denatüre ettiği literatürde yer alan bilgilerdendir (Elzoghby ve ark., 2012). Çöktürme esnasında etanolün aniden katımıyla (şok çöktürme yöntemiyle) bu denatüre etki ortadan kaldırılmıştır.

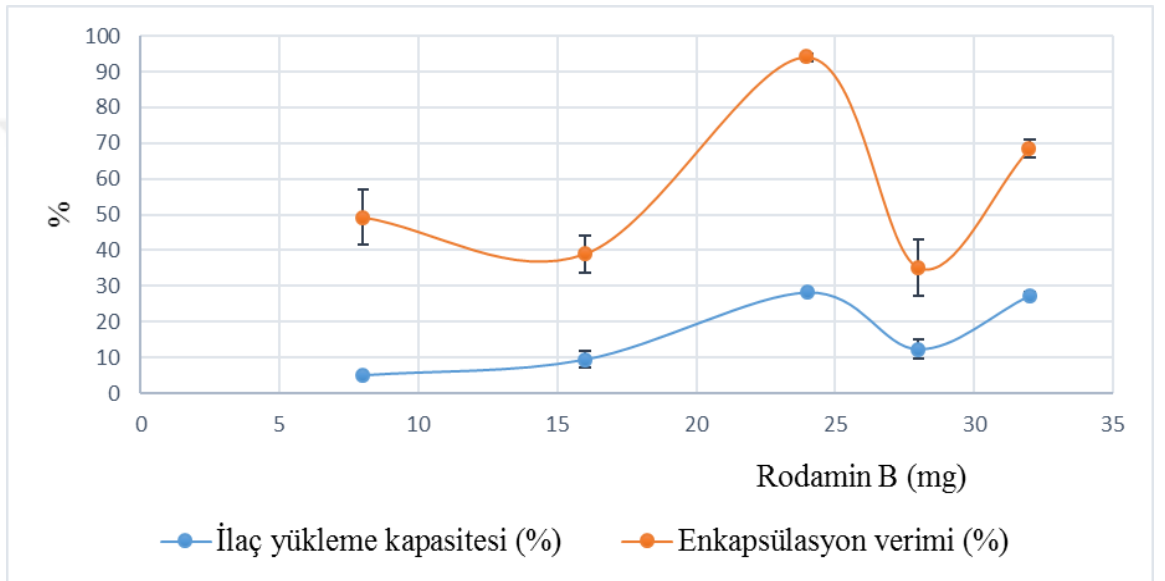
4.7. Rodamin B / Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Hazırlanması

Bölüm 3.2.6. da anlatıldığı gibi Rh B yüklü ve kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıkları üretilmiştir. Ancak çalışmanın bu kısmında tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmemiştir. Bu yüzden bu kısım üzerine fazla yoğunlaşılmeden nanoparçacık üretilip daha sonra kimyasal yükleme kısmı üzerinde durulmuştur.

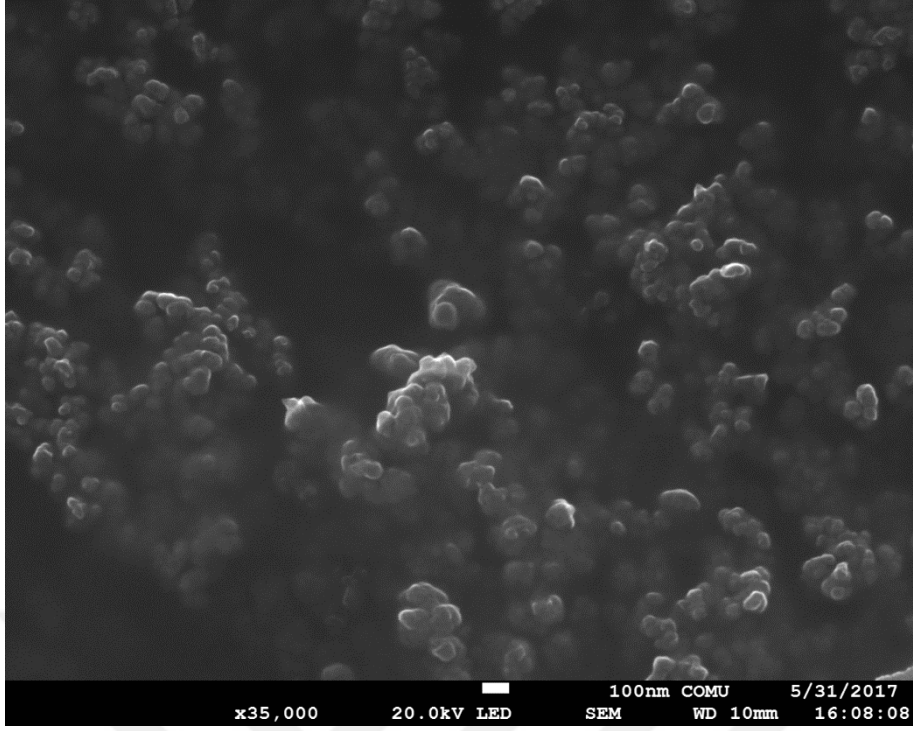
4.8. İlaç Yükleme Çalışmaları

4.8.1. BSA Nanoparçacıklarına Rodamin B Yükleme

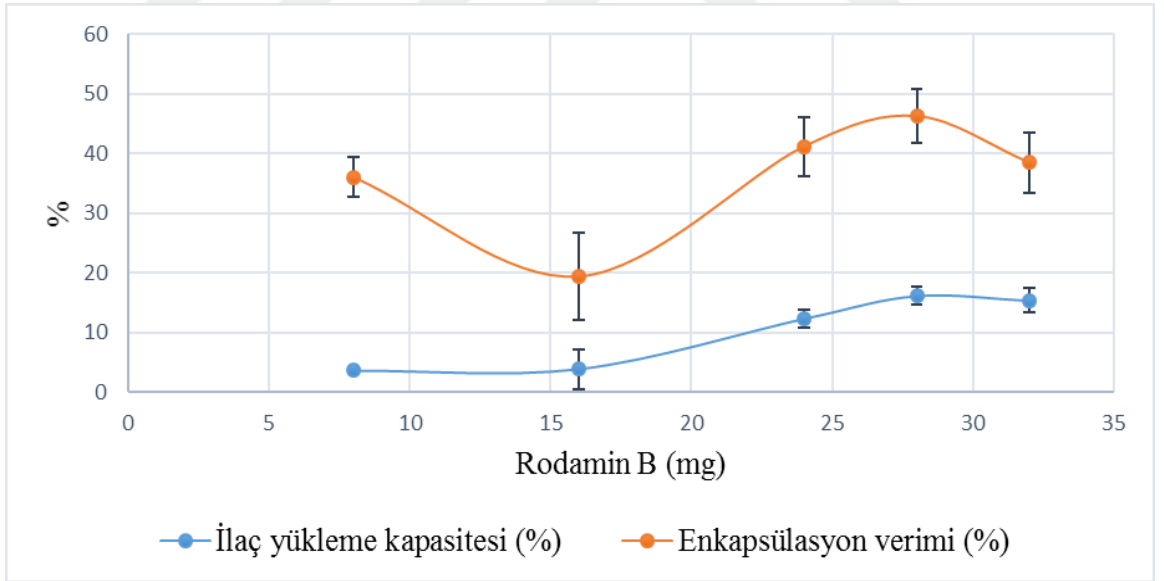
Bölüm 3.2.8.1. de anlatıldığı gibi hem desolvasyon yöntemine göre hem de şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına farklı miktarlarda Rh B yüklenmiştir. İlaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimlerine bakıldığında desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarında optimum yüklemenin 24 mg, şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarında optimum yüklemenin 28 mg olduğu görülmüştür (Şekil 4.17, Şekil 4.19).



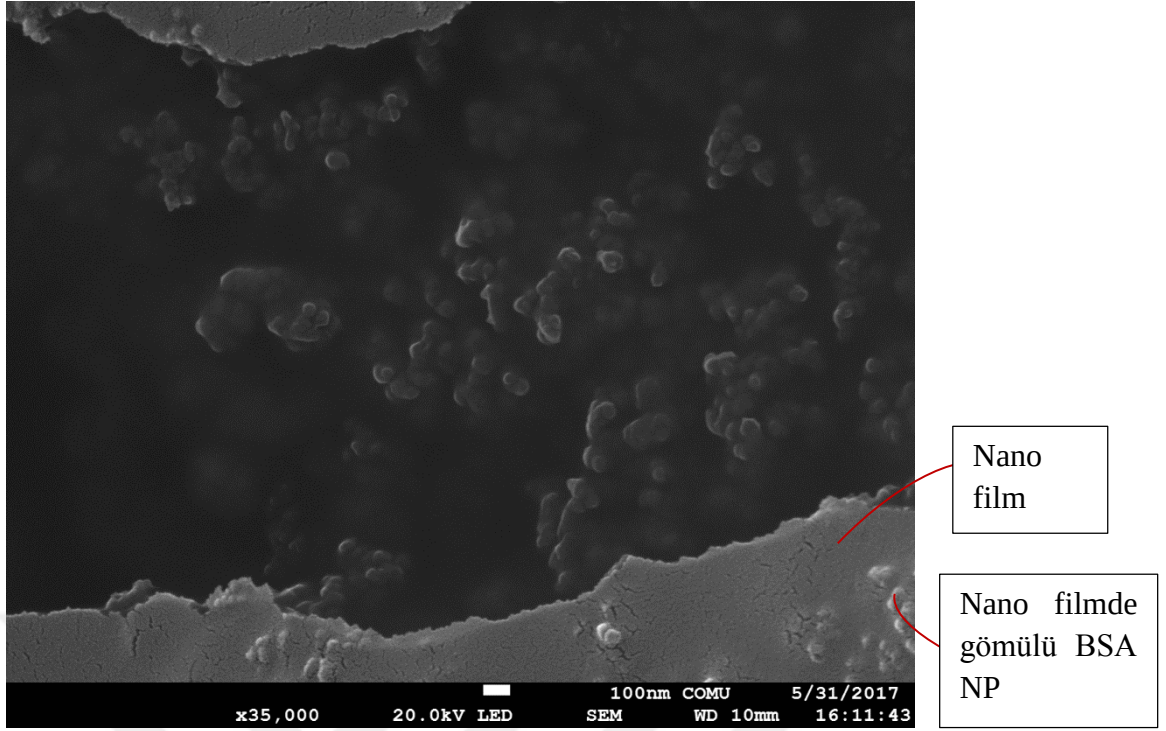
Şekil 4.17. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına rodamin B yükleme



Şekil 4.18. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü rodamin B'nin SEM görüntüsü



Şekil 4.19. Şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına rodamin B yükleme



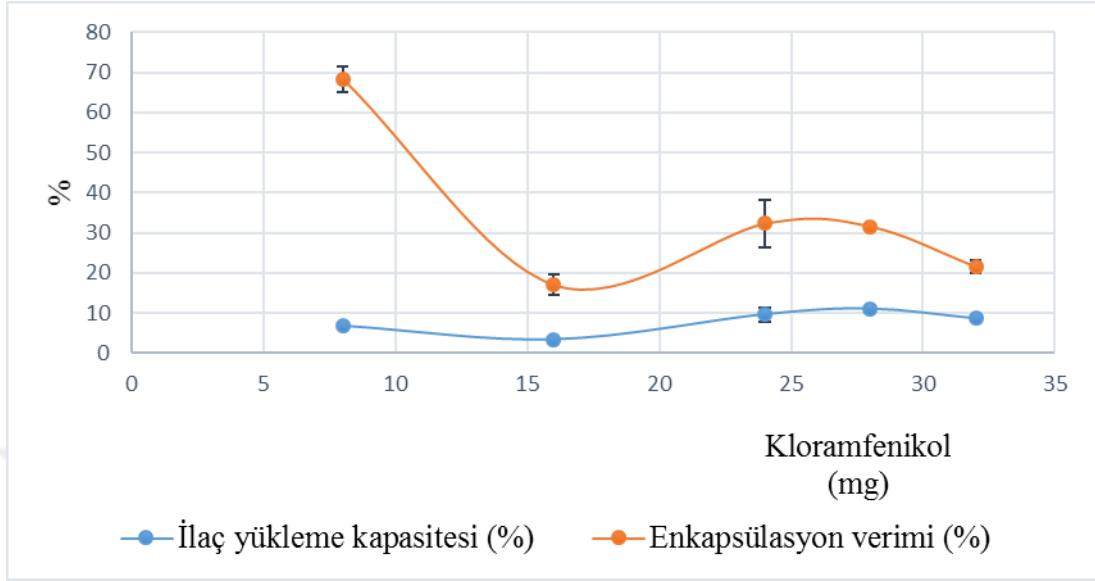
Şekil 4.20. Şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü rodamin B'nin SEM görüntüsü

Bölüm 3.2.7. de anlatıldığı gibi hem desolvasyon yöntemine göre hemde şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklenen Rh B'nin SEM görüntüleri 20,0 kV voltaj uygulanarak 35000 kat büyütülerek çekilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi nanoparçacıkların küresel şekilde olması literatür ile de uyumludur (Yu ve ark., 2014). Kürelerin net bir şekilde ayrı ayrı görülmemesinin nedeni protein nanoparçacıklarının üst üste yığılmasından kaynaklanmaktadır. SEM görüntülerinde numune hazırlarken kullanılan yüksek hızdaki (12000 rpm) santrifüjden dolayı filmler oluşmuştur. SEM görüntülerinde film tabakası şeklindeki oluşan filmlerde gömülü vaziyette BSA nanoparçacıkları görülmektedir. Şuana kadar yaptığımız çalışmalarda bu istenmeyen durumun önüne geçebilecek bir yöntem geliştirilememiştir.

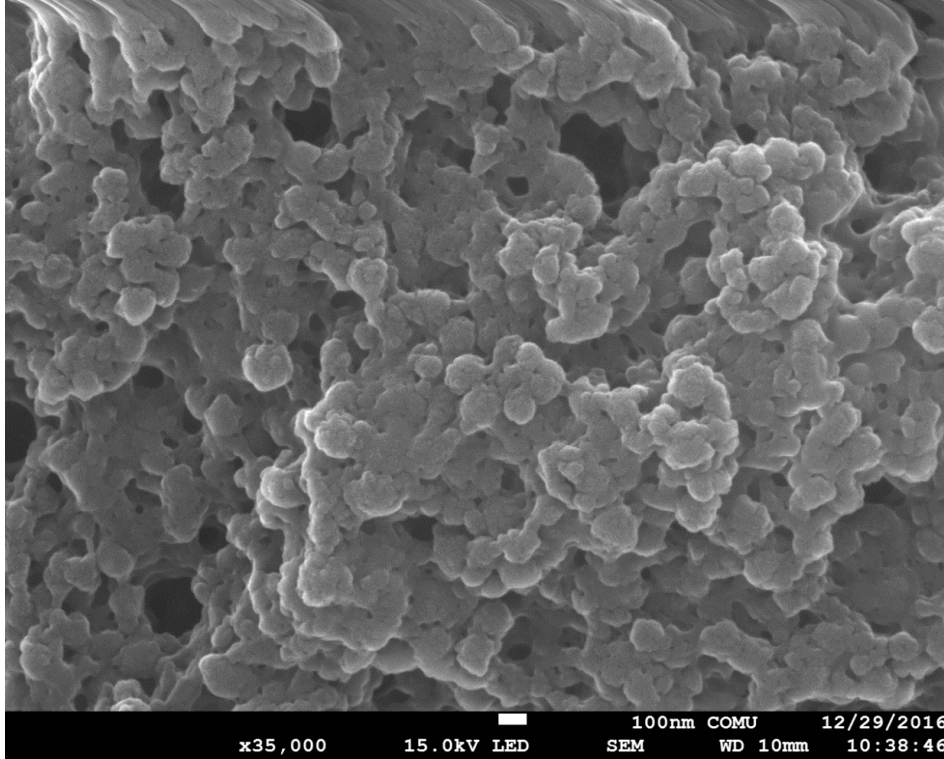
4.8.2. BSA Nanoparçacıklarına Kloramfenikol Yükleme

Bölüm 3.2.8.2. de anlatıldığı gibi hem desolvasyon yöntemine göre hem de şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına farklı miktarlarda kloramfenikol yüklenmiştir. İlaç yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimlerine bakıldığında desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarında optimum

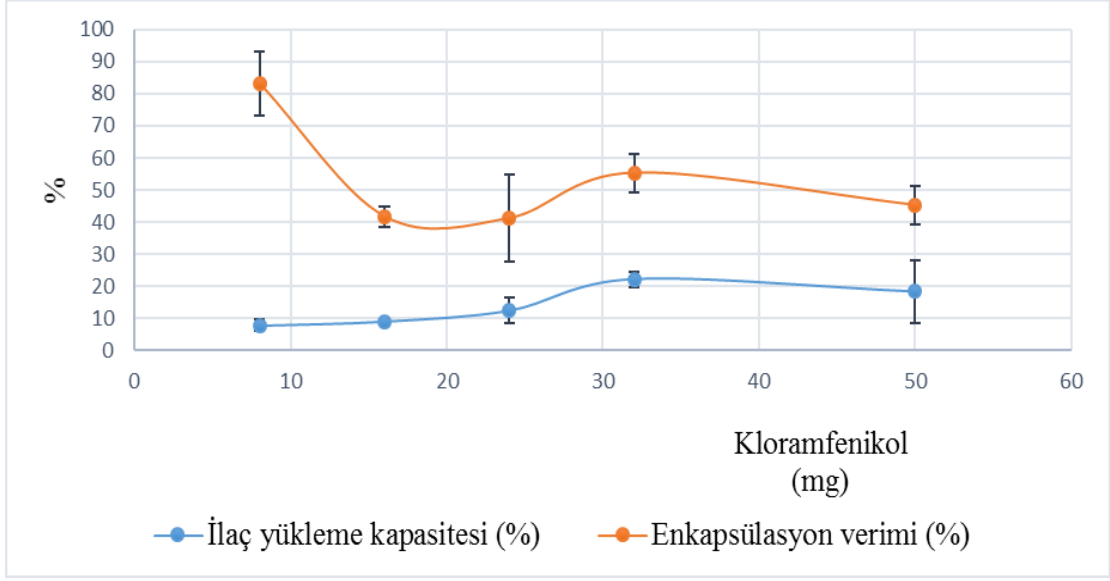
yüklemenin 24 mg, şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarında optimum yüklemenin 32 mg olduğu görülmüştür (Şekil 4.21, Şekil 4.23).



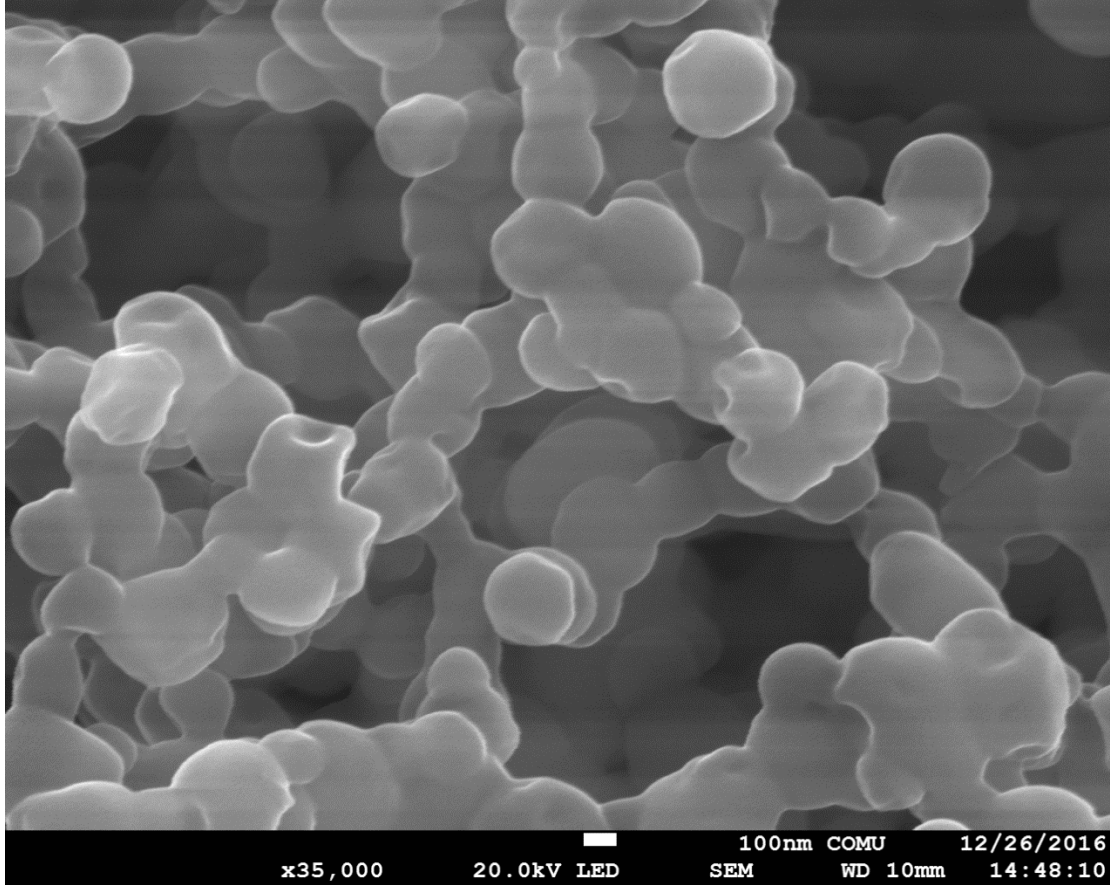
Şekil 4.21. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına kloramfenikol yükleme



Şekil 4.22. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün SEM görüntüsü



Şekil 4.23. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına kloramfenikol yükleme



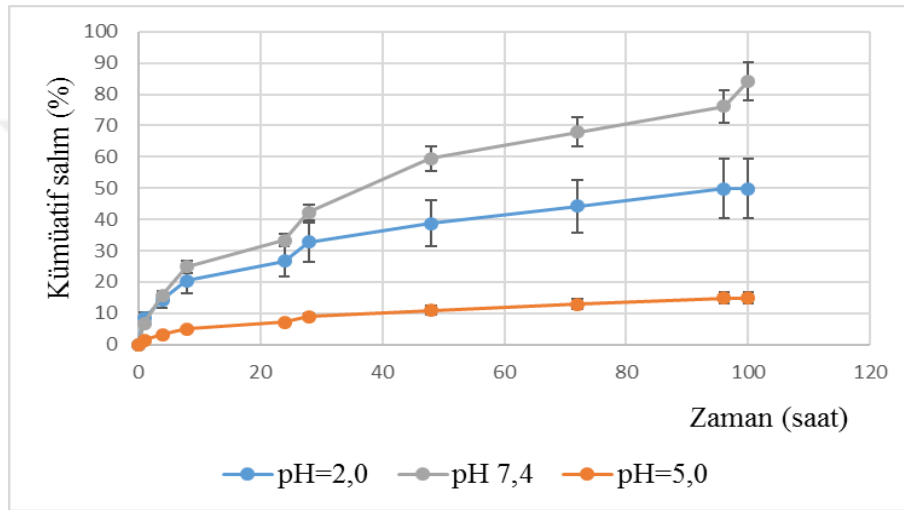
Şekil 4.24. Şok çöktürme yöntemiyle hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün SEM görüntüsü

Bölüm 3.2.7. de anlatıldığı gibi hem desolvasyon yöntemine göre hem de şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklenen kloramfenikolün SEM görüntüleri 15,0-20,0 kV voltaj uygulanarak 35000 kat büyütülerek çekilmiştir.

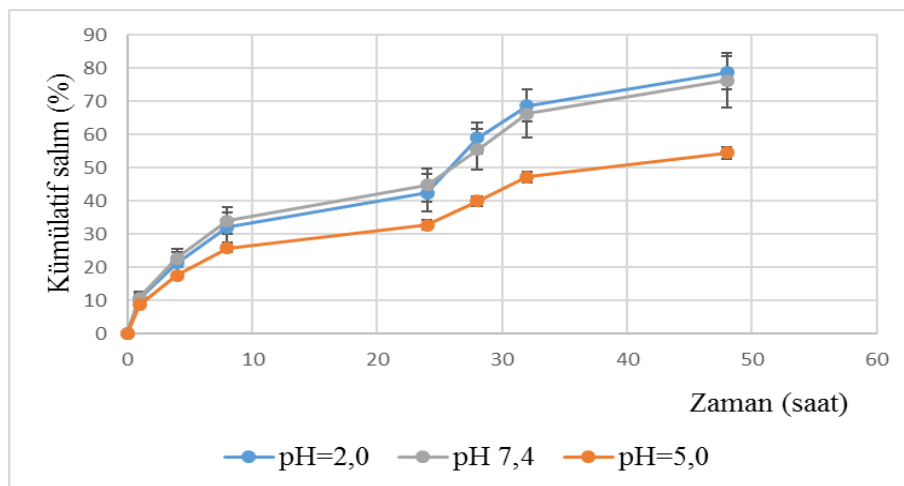
4.9. Salım Çalışmaları

4.9.1. Rodamin B Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması

Bölüm 3.2.9.1. de anlatıldığı gibi Rh B yüklü BSA nanoparçacıklarından zamana bağlı olarak Rh B salımı incelenmiştir.



4.25. Rodamin B yüklü BSA nanoparçacıklarının (desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış) salımı



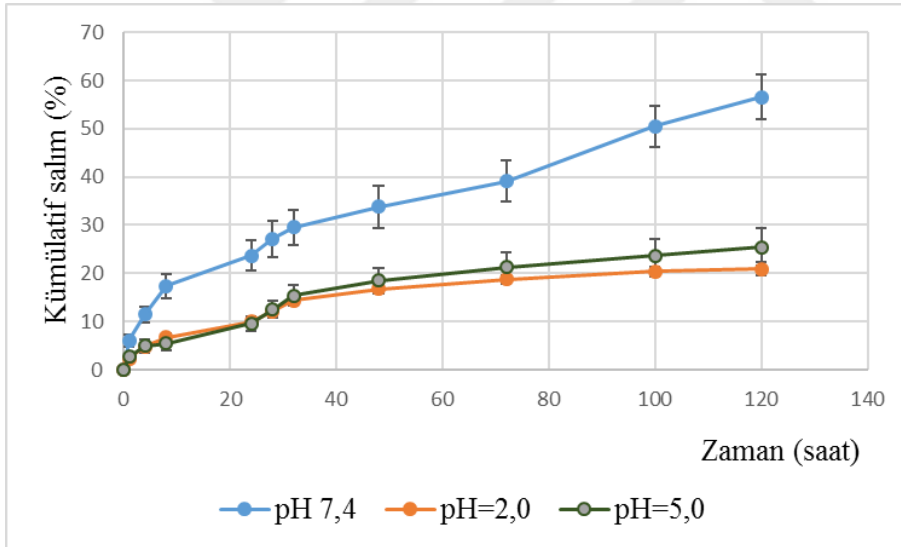
4.26. Rodamin B yüklü BSA nanoparçacıklarının (şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış) salımı

Yapılan çalışmada; desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü Rh B'nin 100 saatte pH=2'de % 49,81'ini pH=5'de % 14,79'unu ve pH=7,4'de % 84,22'sini saldıgı, şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü Rh B'nin 48 saatte pH 2'de % 78,65'ini pH 5'de % 54,43'ünü pH 7,4'de % 76,32'sini saldıgı gözlemlenmiştir.

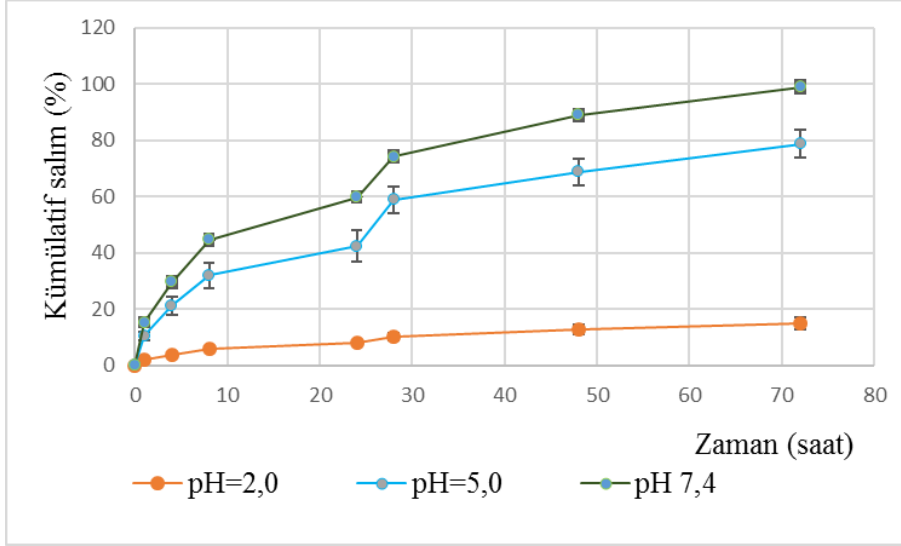
Şekil 4.25. e bakıldığında üç farklı pH'dan salım için en etkili olanı pH=7,4 olduğu 100 saatte en fazla Rh B'yi ortama salmasından anlaşılmaktadır. Şekil 4.26. ya bakıldığında üç farklı pH'dan salım için yine en etkili olanının pH=2,0 olduğu 48 saatte en fazla Rh B'yi ortama salmasından anlaşılmaktadır. Ancak pH=7,4 ile pH=2,0'ın hemen hemen salım miktarı aynı olduğundan dolayı optimum pH'ın 7,4 olduğu söylenebilmektedir.

4.9.2. Kloramfenikol Yüklü BSA Nanoparçacıklarının Salım Çalışması

Bölüm 3.2.9.2. de anlatıldığı gibi kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıklarından zamana bağlı olarak kloramfenikol salımı incelenmiştir.



4.27. Kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıklarının (desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış) salımı



4.28. Kloramfenikol yüklü BSA nanoparçacıklarının (şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış) salımı

Yapılan çalışmada; desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün 120 saatte pH=2’de % 20,90’ını pH=5’de % 25,41’ini ve pH=7,4’de % 56,50’sini saldıgı, şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün 72 saatte pH 2’de % 14,87’sini pH 5’de % 78,65’ini pH 7,4’de % 98,94’ünü saldıgı gözlemlenmiştir.

İyi bir kontrollü salım belli dozlardaki kimyasalı uzun sürede salmasıyla gerçekleşir. Şekil 4.27. ye bakıldığında üç farklı pH’dan salım için en etkili olanı pH=7,4 olduğu 120 saatte en fazla kloramfenikolü ortama salmasından anlaşılmaktadır. Şekil 4.28. e bakıldığında üç farklı pH’dan salım için yine en etkili olanının pH=7,4 olduğu 72 saatte en fazla kloramfenikolü ortama salmasından anlaşılmaktadır.

Yapılan salım çalışmaları incelendiğinde şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış olan BSA nanoparçacıklarına yüklü olan kimyasalların daha kısa sürede daha fazla kimyasalı saldıgı görülmektedir. Kontrollü salım çalışmasında eğer nanoparçacık hazırlama yöntemi olarak desolvasyon yöntemi ile şok çöktürme yöntemini karşılaştıracak olursak sonuçlar bize şok çöktürme yönteminin kontrollü ilaç salım çalışmalarında gerek nanoparçacık boyutu, gerekse ilacı bırakma hızı açısından daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Nanoteknolojinin son yıllardaki gelişiminin sonucunda, kontrollü ve hedeflenmiş ilaç salımında nanoparçacıkların kullanılması giderek önem kazanan konulardan olmuştur. Ancak proteinlerin kontrollü ilaç salımında kullanımına yönelik çalışmalar nispeten sınırlı sayıdadır. Bu durumun nedenlerinden bazıları, protein nanoparçacıklarının hazırlanmasının, tekrarlanabilirliğinin ve boyut kontrolünün zor olmasının yanında, kullanılan yöntemlerin genellikle proteini denatüre edici özellikte olmasıdır.

Yeni antibiyotikler geliştirmenin zorluğu var olanların farklı stratejilerle kullanılabilirliğinin artırılmasını teşvik etmektedir. Kloramfenikol farklı stratejiler kullanılarak yan etkilerinin azaltılması hedeflenen antibiyotiklerden birisidir. Kontrollü salım sistemleri, yan etkilerin azaltılması ve antibiyotiğin kullanılabilirliğinin artırılmasına olanak sağlayabilecek stratejilerin en önemlilerindendir.

Bu çalışmada, protein nanoparçacıkları bir tanesi denatüre edici (desolvasyon yöntemi) diğeri ise yapıyı koruyucu (şok çöktürme yöntemi) iki farklı yöntemle hazırlandı. Protein çöktürücü ajan olarak etanol, çapraz bağlayıcı olarak dekstran polialdehit kullanıldı. BSA nanoparçacıklarının hazırlanmasında; farklı etanol-BSA çöktürme oranları, etanol-BSA çöktürme oranlarına karşı parçacık boyutunun değişimi ve farklı pH'lardaki parçacık boyutlarının değişimi ve çapraz bağlayıcı seçimi gibi parametreler incelendi. Elde edilen sonuçlara göre; pH 7 BRT'de % 70 etanol-BSA çöktürme oranında proteinin % 92,51'i çöktüğü için nanoparçacıklar % 70 etanol-BSA (0,02 M pH 7 BRT'de) ortamında hazırlandı. Çapraz bağlayıcı seçiminde glutaraldehit ve dekstran polialdehit kullanılarak, glutaraldehit kullanımında gözle görülebilecek büyüklükte mikroparçacıklar görülürken dekstran polialdehitte mikroparçacık gözlenmemesinden dolayı çapraz bağlayıcı ajanı olarak dekstran polialdehit tercih edilmiştir.

Hazırlanan nanoparçacıkların morfoloji çalışması taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile aydınlatılarak dinamik ışık saçılımı (DLS) ile desteklendi. Ancak, SEM görüntülerinde numune hazırlarken kullanılan yüksek hızdaki (12000 rpm) santrifüjden dolayı filmler oluşmuştur. SEM görüntülerinde film tabakası şeklindeki gömülü vaziyette BSA nanoparçacıkları görülmektedir. Yaptığımız çalışmalarda bu istenmeyen durumun önüne geçebilecek bir yöntem geliştirilememiş olup bu hususta daha farklı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

DLS sonuçlarına göre; desolvasyon yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutu $448,0 \pm 8,4$ iken şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutu $232,3 \pm 1,24$ olarak literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlara göre; desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutu, şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarının boyutunun ≈ 2 katıdır. Desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacık boyutunun, şok çöktürme yöntemine göre hazırlanan BSA nanoparçacık boyutundan fazla olmasının nedeni; desolvasyon yönteminde etanolün damla damla katılması sonucunda BSA'nin denatüre olmuş olması olabilir. Desolvasyon yönteminin proteini denatüre ettiği literatürde yer alan bilgilerdendir. Çöktürme esnasında etanolün aniden katımıyla (şok çöktürme yöntemiyle) bu denatüre etki ortadan kaldırılmıştır. Böylelikle çok çöktürme yöntemiyle hem proteini denatüre etmeden hem de daha küçük parçacık boyutuna sahip (kontrollü ilaç salımı için ideal boyutlar) nanoparçacıklar üretilebilmektedir.

Çalışma süresince kullanılan kimyasalların girişim etkisi incelendiği serbest BSA'nin kloramfenikole girişim yaptığı görüldü. Bu girişim etkisinden dolayı ilgili deneylerde ekstrasdan matematiksel işlemler yapılarak dolaylı yollardan doğru sonuçlar elde edilmeye çalışıldı.

İlaç yükleme çalışması olarak iki yol tercih edildi: Birinci yolda BSA nanoparçacıkları üretimi sırasında ilaç yüklenirken, ikinci yolda BSA nanoparçacığı hazırlandıktan sonra ilacı yüklendi. İlk başta birinci yol daha iyi sonuç verecekmiş gibi görüldüğü halde; çapraz bağlanmadan kalan serbest proteinin girişim etkisinden kaynaklı olan tekrarlanabilirlik sıkıntıları yaşanarak bu yolda başarılı sonuçlar alınamadı. İkinci yolda nanoparçacık üretildikten sonra serbest protein yıkama işlemiyle ortamdan uzaklaştırmaya çalışıldığı için girişim etkisi azaltılmış oldu tekrarlanabilir sonuçlar elde edildi.

Üretilen BSA nanoparçacıklarına 700 rpm'oda koşullarında 2 saatlik karıştırma altında farklı miktarlarda rodamin B kloramfenikol yüklenmiştir. Desolvasyon yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yapılan farklı miktarlarda rodamin B ve kloramfenikol yüklemeinde optimum miktar 24 mg olarak belirlendi. Şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış BSA nanoparçacıklarına yapılan farklı miktarlarda rodamin B ve kloramfenikol yüklemeinde optimum miktar sırasıyla 28 mg ve 32 mg olarak belirlendi.

Belirlenen optimum miktarlar üç farklı pH için, 37 °C ve 200 rpm'de salımları incelendi. Yapılan çalışmada; desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına

yüklü Rh B'nin 100 saatte pH=2'de % 49,81'ini pH=5'de % 14,79'unu ve pH=7,4'de % 84,22'sini saldığı, şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü Rh B'nin 48 saatte pH 2'de % 78,65'ini pH 5'de % 54,43'ünü pH 7,4'de % 76,32'sini saldığı gözlemlenmiştir.

Şekil 4.25. e bakıldığında üç farklı pH'dan salım için en etkili olanı pH=7,4 olduğu 100 saatte en fazla Rh B'yi ortama salmasından anlaşılmaktadır. Şekil 4.26. ya bakıldığında üç farklı pH'dan salım için yine en etkili olanının pH=2,0 olduğu 48 saatte en fazla Rh B'yi ortama salmasından anlaşılmaktadır. Ancak pH=7,4 ile pH=2,0'ın hemen hemen salım miktarı aynı olduğundan dolayı optimum pH'ın 7,4 olduğu söylenebilmektedir.

Desolvasyon yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün 120 saatte pH=2'de % 20,90'ını pH=5 de % 25,41'ini ve pH=7,4'de % 56,50'sini saldığı, şok çöktürme yöntemiyle hazırlanan BSA nanoparçacıklarına yüklü kloramfenikolün 72 saatte pH 2'de % 14,87'sini pH 5'de % 78,65'ini pH 7,4'de % 98,94'ünü saldığı gözlemlenmiştir.

İyi bir kontrollü salım belli dozlardaki kimyasalı uzun sürede salmasıyla gerçekleşir. Şekil 4.27. ye bakıldığında üç farklı pH'dan salım için en etkili olanı pH=7,4 olduğu 120 saatte en fazla kloramfenikolü ortama salmasından anlaşılmaktadır. Şekil 4.28. e bakıldığında üç farklı pH'dan salım için yine en etkili olanının pH=7,4 olduğu 72 saatte en fazla kloramfenikolü ortama salmasından anlaşılmaktadır.

Yapılan salım çalışmaları incelendiğinde şok çöktürme yöntemine göre hazırlanmış olan BSA nanoparçacıklarına yüklü olan kimyasalların daha kısa sürede daha yüksek miktarda salındığı görölmektedir. Desolvasyon metoduyla hazırlanan nanoparçacıkların ise kloramfenikolü daha uzun sürede daha düşük miktarlarda saldığı belirlenmiştir. Kontrollü salım çalışmasında eğer nanoparçacık hazırlama yöntemi olarak desolvasyon yöntemi ile şok çöktürme yöntemi karşılaştırılacak olursa, şok çöktürme yönteminin kontrollü ilaç salım çalışmalarında gerek nanoparçacık boyutu, gerekse ilacı bırakma hızı açısından daha avantajlı olduğu görölmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen sonuçlar biyoyumlu bir malzeme olan BSA dan çeşitli yöntemlerle elde edilecek nanoparçacıkların, kontrollü salım sistemi olarak kullanılabileceği ve bu yapılar sayesinde çeşitli yan etkileri nedeniyle kısıtlı kullanıma sahip kloramfenikol gibi etken maddelerin, tekrar daha verimli bir şekilde kullanılabilmelerine olanak sağlanabileceğini göstermiştir. Yeni etken maddelerin geliştirilme süreçlerinin maliyetli ve uzun zaman alan süreçler olduğu düşünöldüğünde, çeşitli nedenlerle kullanımları kısıtlanan mevcut etken maddelerin daha etkili bir şekilde

kullanılabilmelerine olanak sağlayacak bu tür sistemlerin geliştirilmesi hem maliyet hem de süre açısından daha avantajlı çözümler sunabilecektir.



KAYNAKLAR

- Akkan G., (Mayıs 2-3, 1997). Antibiyotiklerin Sınıflandırılması. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 15 Mayıs 2017, <http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/01/0103ga.pdf>
- Aktuğlu Y., (Mayıs 2-3, 1997). Giriş ve Genel Bilgiler. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 15 Mayıs 2017, <http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/01/0101ya.pdf>
- Alagöz D., 2007. β -Galaktozidaz ve Glukoz İzomeraz'ın Eupergit Desteğe Kovalent İmmobilizasyonu ve İmmobilize Enzimlerin Laktoz Hidrolizi ve Glukoz İzomerasyonunda Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi. Adana, Türkiye.
- Ateş H., Bahçeci E., 2015. Nano Malzemeler için Üretim Yöntemleri. Gazi Üniv. Fen Bilimleri Dergisi, 3 (2): 483-499.
- Ayaz C., 2003. Antibiyotikler. Ed Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., İçinde: Kloramfenikol ve Tiamfenikol. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 393-399.
- Azarmi S., Tao X., Chen H., Wang Z., Finlay W. H., Löbenberg R., Roa W. H., 2006. Formulation and cytotoxicity of doxorubicin nanoparticles carried by dry powder aerosol particles. *Int. J. Pharm.* 319: 155–161.
- Azhdarzadeh M., Lotfipour F., Zakeri-Milani P., Mohammadi G., Valizadeh H., 2012. Anti-bacterial performance of azithromycin nanoparticles as colloidal drug delivery system against different gram-negative and gram-positive bacteria. *Adv. Pharmaceut. Bull.*, 2 (1): 17-24.
- Benli B., 2008. Nanoteknoloji ve antik çağlara uzanan killi nanoyapılar. *Kil Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, 1 (3): 143-162.
- Bhavane R., Karathanasis E., Annapragada A. V., 2007. Triggered release of ciprofloxacin from nanostructured agglomerated vesicles. *Int. J. Nanomed.*, 2 (3): 407-418.

- Bickerstaff G. F., 1997. Immobilization of Enzymes and Cells (Vol. 1). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey., 1-11.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal.Biochem., 72: 248-254.
- Çolak B., 2009. Maleikanhidrit Kopolimerlerinin Asetilsalisilikasit İle Kimyasal Modifikasyonu ve Kontrollü Salımının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Drexler E., 1986. Engines of Creation The Coming Era of Nanotechnology Mayıs 19, 2017, http://xaonon.dyndns.org/misc/engines_of_creation.pdf
- Dubey P. K., Singodia D., Verma R. K., Vyas S. P., 2011. RGD modified albumin nano RGD modified albumin nanospheres. J. Pharm. Pharmacol., 63: 33-40.
- Durmuşoğlu, E., 2012. Kuantum Nokta. Metalurji Mühendisleri Odası Dergisi, 150: 31-34.
- Elzoghby A. S., 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. J. Control Release, 157: 168-182.
- Gupta R., Mohanty S., 2017. Nanoparticle formulation having ability to control the release of protein for drug delivery application. Mater. Sci. Eng., 70: 327-333.
- Gümrah Ö., 2008. Toplam Protein Tayin Yöntemleri ve Enzimlerle Hidrolizlenmiş Protein Çözeltilerinde Aminoasit Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Türkiye.
- Gür M., 2010. Nanomimarlık Bağlamında Nanomalzemeler. Uludağ Üniv. Mühendislik-Mimarlık Fak. Dergisi, 15 (2): 81-90.
- Gürmen S., Ebin B., 2008. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri - 1. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası, 150: 31-38.
- Gürsoy A. Z., 2012. Farmasötik Teknoloji- Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. İçinde: Ed. Gürsoy A.Z., Kontrollü Salım Sistemleri. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul. 409-422.

- Hegazy M. A., Lotfy H. M., Rezk M. R., Omran Y. R., 2015. Novel spectrophotometric determination of chloramphenicol and dexamethasone in the presence of non labeled interfering substances using univariate methods and multivariate regression model updating. *Spectrochim. Acta A.*, 140: 600-613.
- İlhan F., 2014. Nanobiyoteknoloji Ve İnsan. Bitirme Tezi. Erciyes Üniversitesi, Türkiye.
- Jain D., Banerjee R., 2008. Comparison of Ciprofloxacin Hydrochloride-Loaded Protein, Lipid, and Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Biomed. Mater. Res. B.*, 86: 105-112.
- Kayır Y. Z., Baççıl E. G., 2010. Nanoteknoloji Nedir? KOSGEB Sincan İşletme Geliştirme Merkezi, Ankara.
- Kuruca B. H., (19 Ocak 2013). Nanotıp ve Nanoteknoloji. 26 Nisan 2017, <http://www.kuark.org/2013/01/nanotip-ve-nanoteknoloji/>
- Langer K., Balthasar S., Vogel V., Dinauer N., Briesen H. V., Schubert D., 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int. J. Pharmaceut.*, 257 (1-2): 169-180.
- Löw K., Wacker M., Wagner S., Langer K., Briesen H. V., 2011. Targeted human serum nanoparticles for specific uptake in EGFR-expressing colon carcinoma cells. *Nanomed.*, 7 (4): 454-463.
- Maghsoudi A., Shojaosadati S. A., Farahani E. V., 2008. 5-Fluorouracil-loaded BSA nanoparticles: formulation optimization and in vitro release study. *AAPS PharmSciTech.*, 9: 1092-1096.
- Mateo C. P., 2003. New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Crosslinked Enzyme Aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 86: 273-276.
- Merodio M., Arnedo A., Renedo M. J., Irache J. M., 2001. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 12: 251-259.
- Mishra V., Mahor S., Rawat A., Gupta P. N., Dubey P., Khatri K., Vyas S. P., 2006. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *J. Drug Target*, 14 (1): 45-53.

- Nairi V., Medda L., Monduzzi M., Salis A., 2017. Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica. *J. Colloid Interf Sci.*, 497: 217-225.
- Naschie M. S. E., 2006. Nanotechnology for the Developing World. *Chaos Solitons&Fractals*, 30 (4): 769-773.
- Nelson J. M., Edwards G. G., 1916. Adsorption of Invertase. *J. Chem. Soc.*, 38 (5): 1109-1115.
- Rahimnejad M., Jahanshahi M., Najafpour G. D., 2006. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 (20): 1918-1923.
- Santhi K., Dhanaraj S. A., Rajendran S. D., Raja K., Ponnusankar S., Suresh B., 1999. Nonliposomal Approach—A Study of Preparation of Egg Albumin Nanospheres Containing Amphotericin-B. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25 (4): 547-551.
- Sarabia-Sainz A., Sarabia-Sainz H. M., Montfort G. R., Mata-Haro V., Guzman-Partida A. M., Guzman R., Garcia-Soto M., Vazquez-Moreno L., 2015. K88 Fimbrial Adhesin Targeting of Microspheres Containing Gentamicin Made with Albumin Glycated with Lactose. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 22425-22437.
- Schoevaart R., Wolbers M. W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A. P. G., Rantwijk F. V., van der Wielen L. A. M., Sheldon R. A., 2004. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Botechnol. & Bioeng.*, 87 (6): 754-762.
- Sheldon R. A., 2007. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.*, 349: 1289-1307.
- Simeonova M. Y., Krystev D., Ivanova G., Abrahams I., Georgieva N., 2017. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Ciprofloxacin Loaded Polymer Nanoparticles for Parenteral Application. *Int. J. Nanomater. Nanotechnol. Nanomed.*, 3 (2): 034-043.
- Steinhauser I., Spänkuch B., Strebhardt K., Langer K., 2006. Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells. *Biomaterials*, 27: 4975-4983.

- Şekeroğlu A. Z., 2013. Nanoteknolojiden Nanogenotoksikolojiye: Kobalt-Krom Nanopartiküllerinin Genotoksik Etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70 (1): 33-42.
- Tazebay U. H., Erdoğan H., 2011. Nanobiyoteknoloji İnsanlığa Ne Sunacak?. *Bilim ve Teknik*, (3):39-42.
- Tekman Ş., Öner N., 1994. Genel Biyokimya Dersleri (4.baskı). İçinde: Proteinler, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul. 199-251.
- Telefoncu A., 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu. Ed. Telefoncu A., İçinde: İmmobilize Enzimler. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir. 193-248.
- Töreci K., 2003. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları. Ed. Leblebicioğlu H., İçinde: Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 15-30.
- Ünal S., Akova M., 1989. Kloramfenikol. Ed. Akalın E. H., Antibiyotikler: Temel bilgiler ve klinik kullanımları. Türk Tabipleri Birliği Yayınları, Ankara. 120-125.
- Weber C., Coester C., Kreuter J., Langer K., 2000. Desolvation process and surface characteristics of protein nanoparticles,. *Int. J. Pharmaceut.*, 194 (1): 91-102.
- Woodruff H. B., 2014. Selman A. Waksman Winner of the 1952 Nobel Prize for Physiology for Physiology of Medicine. *AppL. Environ. Microbiol.*, 80 (1): 2-8.
- Yang L., Cui F., Cun D., Tao A., Shi K , Lin W., 2007. Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles,. *Int. J. Pharmaceut.*, 340: 163-172.
- Yıldırım D., 2010. *Mucor miehe ve Pseudomonas sp Lipazlarının Aktifleştirilmiş Florosil Desteğe Glutaraldehit ve Polisüksinimid Üzerinden Ayır Ayrı İmmobilizasyonu.* Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Türkiye.
- Yu Z., Yu M., Zhang Z., Hong G., Xiong Q., 2014. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. *Nanoscale Res. Lett.*, 9: 343.
- Zensi A., Begley D., Pontikis C., Legros C., Mihoreanu L., Wagner S., Büchel C., Briesen H. , Kreuter J., 2009. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurons. *J. Control Release*, 137: 78-86.

Zhao D., Zhao X., Zu Y., Li J., Zhang Y., Jiang R., Zhang Z., 2010.

Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded. *Int. J. Nanomed.*, 5: 669-677.

Zu Y. G., Yuan S., Zhao X. H., Zhang Y., Zhang X. N., Jiang R., 2009. Preparation,

activity and targeting ability evaluation in vitro on folate mediated epigallocatechin-3-gallate albumin nanoparticles. *Yao Xue Xue Bao*, 44: 525-531.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Leyla YEŞİLÇİNAR

Doğum Yeri: Edremit

Doğum Tarihi: 14.08.1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (Orta), Yunanca (Başlangıç)

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Ulusal Bildiriler

Yeşilçinar L., Şahutoğlu A., Akgül C., “*Bacillus licheniformis* Kullanılarak Derin Kültür Yöntemiyle Amilaz Üretimi ve Çapraz Bağlı Enzim Agregatları Biçiminde İmmobilizasyonu”, Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü Öğrenci Kongresi, Çanakkale, 29-30 Nisan 2016, s. 71

b) Uluslararası Bildiriler

Yeşilçinar L., Akgül C., “Sığır Serum Albumin Nanoparçacıklarının Üretimi ve Kontrollü Kloramfenikol Salımında Kullanımı”, Uluslararası 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi, İstanbul, 26-29 Nisan 2017, s. 222

Şahutoğlu A., Yeşilçinar L., Akgül C., “Preparation and Characterization of Cross-linked Albumin and Hemoglobin Nano-aggregates by a Microemulsion Disruption Based Method”, Uluslararası 3. İlaç ve Eczacılık Kongresi, İstanbul, 26-29 Nisan 2017, s. 430

c) Katıldığı Projeler

“Sığır Serum Albumin Nanoparçacıklarının Üretimi ve Kontrollü Kloramfenikol Salımında Kullanımı”, BAP Yüksek Lisans, 2016/1003, Araştırmacı, 18.10.2016 - Devam Ediyor

"Ters Misellerden Yararlanılarak Çapraz Bağlı Protein Nano-Agregatlarının Hazırlanması", TÜBİTAK Projesi, 215Z097, Bursiyer, Ocak 2016 - Devam Ediyor

İŞ DENEYİMİ

Özel Ezine Birleşim Dershanesi, Kimya Öğretmeni, 08.09.2016-25.07.2017

İLETİŞİM

Leyla-yesilcinar@hotmail.com