

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

APTAMER TABANLI TEİKOPLANIN YÜKLÜ POLİ LAKTİK
– KO GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ÜZERİNE IN VİTRO ETKİSİ

Samet UÇAK

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Temmuz, 2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

APTAMER TABANLI TEİKOPLANIN YÜKLÜ POLİ LAKTİK – KO
GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ÜZERİNE IN VİTRO ETKİSİ

Samet UÇAK tarafından hazırlanan tez çalışması 13.07.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP, Üye
Atılım Üniversitesi

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Bilge GÜVENÇ TUNA, Üye
Yeditepe Üniversitesi











Danışmanım Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan APTAMER TABANLI TEİKOPLANİN YÜKLÜ POLİ LAKTİK – KO GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNE IN VİTRO ETKİSİ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Samet UÇAK

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün DKT türü, FDK-2018-3244 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Sevgili Eşim Sibel
ve Caniçi Oğlumuz Sarp'a*



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi birikimi ve kıymetli tecrübelerini paylaşarak, hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen, büyük bir sabırla ve anlayışıyla bana rehberlik edip yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP'a yürekten müteşekkirim.

Tez çalışmam sırasında desteğini ve sorduğum sorular karşısında sabrını eksik etmeyen, yol göstericiliğiyle çalışmanın değerini artıran değerli hocalarım, Konya Gıda Tarım Üniversitesi, KIT-ARGEM AR&GE Laboratuvar sorumlusu Uzman Mert SUDAĞIDAN'a ve Linköping Üniversitesi, Fizik, Kimya ve Biyoloji (IFM) ve Moleküler Yüzey Fiziği ve Nanobilim (MOLYT) departmanlarından Doç. Dr. Barış Ata BORSA'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteğini ve yardımlarını eksik etmeyen Doç. Dr. Kaan POLATOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Yücel YÜCEL, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVİ, Dr. Öğr. Üyesi Mohammad Y.M. AL-TALAHMA, Arş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ, Arş. Gör. İpek ÖZYURT, Arş. Gör. Yunus ŞAHİN, Arş. Gör. Zeynep GÜNGÖRDÜ DALAR ve Arş. Gör. Ferhat PEKTAŞ'a teşekkür ederim.

Tez yazımında yazılımda destek olan değerli dostum Yazılım Uzmanı Hasan ÇELİK'e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmanın tamamlanması sırasında bana herhangi bir şekilde destek veren herkese minnettarım.

Beni yetiştirip bu günlere getirip her zaman bana güvenen ve beni destekleyen annem Tulin ve babam Bekir UÇAK'a; bana inandıklarını ve güvendiklerini her zaman hissettiren annem Saliha ve babam Necdet MİNNAS'a; her daim yanımda olduğunu yürekten hissettiğim sevgili eşim, canıçı oğlumuz Sarp'ın annesi Sibel UÇAK'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

Samet UÇAK

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Stafilocoklar	4
2.1.1 <i>S. aureus</i> Antibiyotik Direnç Tarihçesi	5
2.1.2 <i>S. aureus</i> Virülans Faktörleri	6
2.1.3 <i>S. aureus</i> Enfeksiyonları	9
2.1.4 Tedavi	11
2.2 İlaç Taşıma Sistemlerinde Polimerik Nanopartiküller	13
2.2.1 Polimerik İlaç Taşıma Sistemlerinde Kullanılan Nanopartiküller	13
2.3 Aptamerler	15
2.3.1 SELEX (“Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment”, “Ligantların Üssel Zenginleştirme ile Sistemik Evrimi”)	17
2.4 Hedefe Yönelik İlaç Taşıma Sisteminde PLGA - Aptamer konjugatı	18
3 MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 Materyal	20
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	20

3.1.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	21
3.2	Yöntem	22
3.2.1	Stok Solüsyonlar ve Tamponlar	22
3.2.2	Teikoplanin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Yüzeylerinin Aptamerle Kaplanması	23
3.2.3	PLGA Nanopartiküllerin Sentezi	23
3.2.4	Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	25
3.2.5	Kontrollü Salım Deneyi	29
3.2.6	Antimikrobiyal Test (Brot Dilüsyon) Buyyon Dilüsyon Testi . . .	29
4	SONUÇ VE ÖNERİLER	33
4.1	Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları	33
4.1.1	Boyut Dağılımı Analizi ve Zeta Potansiyel Değerleri Sonuçları .	33
4.1.2	HPLC Analiz Yöntemi ile Enkapsülasyon Veriminin (EV) Hesaplanması	36
4.1.3	Etken Madde Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması	38
4.1.4	Etken Madde Yükleme Veriminin Hesaplanması (YV) Hesaplanması	38
4.1.5	Yüzey Alanı Ölçümü Analizi (Brunauer-Emmett-Teller – BET Analizi) Sonuçları	38
4.1.6	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları	40
4.1.7	Atomik Güç Mikroskobu (AFM) Analizi Sonuçları	40
4.1.8	FT-IR Analizi Sonuçları	42
4.2	Kontrollü Salım Deneyi Sonuçları	45
4.3	Antimikrobiyal Test Sonuçları	47
4.4	Tartışma	54
4.5	Öneriler	58
	KAYNAKÇA	59
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	71

SİMGELİSTESİ

Abs.	Absorbans
Kd	Ayrışma Sabiti
bç	Baz Çifti
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
w/v	Derişim
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
CO ₂	Karbondioksit
L	Litre
MΩ	Megaohm
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
ORT	Ortalama
sa	Saat
sn	Saniye

°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
SD	Standart Sapma
H ₂ O	Su
%	Yüzde



KISALTMA LİSTESİ

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
<i>A. teichomycetis</i>	<i>Actinoplanes teichomycetis</i>
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
BET Analizi	Brunauer-Emmett-Teller Analizi
BOS	Boş PLGA Nanopartikülleri
CA-MHB	Kasyon Ayarlı Mueller Hinton II Broth
CFU	Koloni Oluşturan Birim
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
D-ala	D-alanin
DCM	Diklorometan
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorid
EV	Enkapsülasyon Verimi
FDA	A.B.D. Gıda ve İlaç İdaresi
FT	Teikoplanin Yüklü PLGA Nanopartikülleri
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
gp43	Bakteriyofaj T4 DNA Polimeraz
Gram (+)	Gram Pozitif
Gram (-)	Gram Negatif
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

MRSA	Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
NHS	N-Hidroksisüksinimit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
PLGA	Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVA	Polivinil Alkol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
RV	Reaksiyon Verimi
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SELEX	Ligantların Exponansiyel Zenginleştirme ile Sistematik Evrimi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SHDS	Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
ssDNA	Tek Zincirli DNA
subsp.	Alt Tür
TP	Teikoplanin
YTÜ	Yıldız Teknik Üniversitesi
YV	Etken Madde Yükleme Verimi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Altın üzüm salkımı olarak adlandırılan <i>S. aureus</i>	5
Şekil 2.2	İnsanda <i>S. aureus</i> Enfeksiyonları	10
Şekil 2.3	Nanoküre ve Nanokapsül yapısının şematik gösterimi	14
Şekil 2.4	PLGA'nın kimyasal yapısı	15
Şekil 2.5	Aptamerlerin işlevselliğinin şematik gösterimi.	16
Şekil 2.6	DNA Aptamerlerin SELEX ile in-vitro seçimi.	17
Şekil 2.7	Nanopartiküler sistem kullanılarak hedeflenmiş ilaç sistemi	19
Şekil 3.1	İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak teikoplanin yüklü PLGA nanopartiküllerin sentezi	24
Şekil 3.2	A) 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu B) 10 ml – 16x160 mm cam tüpler ve 96 kuyucuklu düz tabanlı mikrolaka	30
Şekil 3.3	Teikoplanin – CA-MHB solüsyonunun farklı konsantrasyonlarda hazırlanması	30
Şekil 3.4	Referans suşların 96-kuyucuklu mikrolakalara yerleşimi-1	31
Şekil 3.5	Referans suşların 96-kuyucuklu mikrolakalara yerleşimi-2	31
Şekil 3.6	Referans suşların 96-kuyucuklu mikrolakalara yerleşimi-3	31
Şekil 3.7	Referans suşların 96-kuyucuklu mikrolakalara yerleşimi-4	31
Şekil 3.8	Referans suşların 96-kuyucuklu mikrolakalara yerleşimi-5	32
Şekil 3.9	Referans suşların 35 °C'de 24 sa boyunca her 15 dk da otomatik olarak ölçümünü alan mikrolaka okuyucu	32
Şekil 4.1	İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan boş PLGA nanopartiküllere ait A) boyut dağılımı analizi B) zeta potansiyel değerleri	34
Şekil 4.2	İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan teikoplanin yüklü nanopartiküllere ait A) boyut dağılım analizi B) zeta potansiyel değerleri	34
Şekil 4.3	Teikoplanin analitik standartları kalibrasyon eğrisi	37
Şekil 4.4	SEM görüntüsü: A) boş PLGA 100X B) boş PLGA 30000X C) Teikoplanin yüklü PLGA 100X D) Teikoplanin yüklü PLGA 30000X .	40

Şekil 4.5	Atomik Güç Mikroskobu (AFM görüntüsü): A) boş PLGA faz B) boş PLGA 3D topografi C) Teikoplanin yüklü PLGA faz D) Teikoplanin yüklü PLGA 3D topografi	41
Şekil 4.6	Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, boş PLGA için FT-IR spektrumu	43
Şekil 4.7	Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, teikoplanin yüklü PLGA için FT-IR spektrumu	43
Şekil 4.8	Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, NHS ve EDC konjuge boş PLGA için FT-IR spektrumu	44
Şekil 4.9	Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, NHS ve EDC konjuge teikoplanin yüklü PLGA için FT-IR spektrumu	44
Şekil 4.10	Kontrollü salım grafiği	46
Şekil 4.11	Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin <i>S.aureus</i> (ATCC 29213) üzerine etkisi	47
Şekil 4.12	Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin <i>S.aureus</i> (ATCC 29213) üzerine etkisi - mikrolaka resmi	48
Şekil 4.13	Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin <i>S.epidermidis</i> (ATCC 12228) üzerine etkisi	48
Şekil 4.14	Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin <i>S.epidermidis</i> (ATCC 12228) üzerine etkisi - mikrolaka resmi	49
Şekil 4.15	Teikoplanin ve aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın <i>S.aureus</i> (ATCC 43300 ve ATCC 25923) üzerine etkisi	49
Şekil 4.16	Teikoplanin ve aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın <i>S.aureus</i> (ATCC 43300 ve ATCC 25923) üzerine etkisi - mikrolaka resmi . . .	50
Şekil 4.17	Teikoplaninin <i>S.aureus</i> 'un farklı suşları üzerine etkisi	50
Şekil 4.18	Teikoplaninin <i>S.aureus</i> 'un farklı suşları üzerine etkisi - mikrolaka resmi	51
Şekil 4.19	Aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın <i>S.aureus</i> 'un farklı suşları üzerine etkisi	51
Şekil 4.20	Aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın <i>S.aureus</i> 'un farklı suşları üzerine etkisi - mikrolaka resmi	52
Şekil 4.21	Teikoplaninin farklı referans suşlar üzerine etkisi	52
Şekil 4.22	Teikoplaninin farklı referans suşlar üzerine etkisi - mikrolaka resmi	53
Şekil 4.23	Aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın farklı referans suşlar üzerine etkisi	53
Şekil 4.24	Aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın farklı referans suşlar üzerine etkisi - mikrolaka resmi	54

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	Teikoplanin miktarını tespit etmek için hazırlanan HPLC analiz metodu	26
Tablo 4.1	BOS'a ait 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonucu	33
Tablo 4.2	FT'ye ait 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonucu	33
Tablo 4.3	1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,01 mg/ml oranlarında ölçülen absorbands değerleri	36
Tablo 4.4	FT absorbands değerleri	37
Tablo 4.5	Enkapsüle olmayan FT miktarları	37
Tablo 4.6	BOS ve FT için karşılaştırmalı BET analizi özet tablosu	39
Tablo 4.7	Kontrollü salım deneyi sonuçları (Abs. : Absorbans, ORT: Ortalama, SD: Standart sapma, % : Yüzde)	45

APTAMER TABANLI TEİKOPLANIN YÜKLÜ POLİ LAKTİK – KO GLİKOLİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNE IN VİTRO ETKİSİ

Samet UÇAK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Bu tez çalışmasında; antibiyotik – mikroorganizma etkileşimini sınırlamak ve antibiyotik dozundaki kaybın önlenmesi amacıyla aptamer konjuge PLGA nanopartiküler sistem kullanıldı. Teikoplanin antibiyotiği ikili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma metodu kullanılarak PLGA nanopartiküllerine yüklendi ve PLGA nanopartikülleri (BOS) ve teikoplanin (TP) yüklü PLGA nanopartikülleri (FT) sentezlendi. BOS ve FT'ye ait yapılan 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonuçlarına göre BOS için, partikül boyutu $228 \pm 1,484$ nm olarak ölçülmüşken, FT için $226 \pm 5,568$ nm ölçüldü. Nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi (EV) %98, etken madde reaksiyon verimi (RV) %69 ve etken madde yükleme verimi (YV) %7 olarak ölçüldü. BET analizine göre, BOS ve FT için, BET yüzey alanı $7.9798 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $10.0573 \text{ m}^2/\text{g}$, Por hacmi $< 1.269 \text{ nm} : 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$ ve $< 1.269 \text{ nm} : 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$, Por alanı $> 216.632 \text{ nm} : 0.000 \text{ cm}^2/\text{g}$ ve $> 117.233 \text{ nm} : 0.000 \text{ cm}^2/\text{g}$ olarak ölçüldü. Nanopartiküllerin yüzey topografyasını görüntülemek için yapılan SEM ve AFM analizine göre, sentezlenen nanopartiküllerin nano boyutlu, dar bir aralıkta boyut dağılımına sahip, pürüzsüz – küresel şekilde oldukları saptandı. PLGA nanopartiküllerinin yüzeyi *S.aureus* bakterisine özgün olan aptamer ile konjuge edildi. Konjugasyonun doğru şekilde olduğunu saptamak için FT-IR analizi yapıldı. FT-IR çalışmasında, NHS/EDC bağlayıcısının PLGA yüzeyine bağlandığı N-H bükülme titreşimi ($1640\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$) ile gösterildi.

Karakterize PLGA nanopartiküller elde edildikten sonra, antibiyotiğin ne kadar sürede

salındığını öğrenmek için kontrollü salım çalışması gerçekleştirildi. Deney 20 gün olarak gerçekleştirildi. Yapılan kontrollü salım çalışmasında, PLGA'nın ilk 1 saat içinde enkapsüle ettiği teikoplaninin %55'ini, 20. gün sonunda %80'ini ortama bıraktığı belirlendi.

Elde edilen teikoplanin yüklü aptamer konjuge nanopartiküllerin etkinliklerini incelemek için *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-95), *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 43300), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. Enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) referans suşları kullanıldı. Antimikrobiyal test olan Buyyon Dilüsyon (Brot Dilüsyon) testi uygulanarak, boş PLGA, saf teikoplanin, PLGA yüklü teikoplanin ve teikoplanin yüklü aptamer konjuge PLGA nanopartiküllerin referans suşlar üzerindeki etkinlikleri incelendi. Saf teikoplanine karşı aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın uygulandığı referans suşlarda, MİK değerlerinin *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923) ve *S. aureus* (ATCC 43300) suşlarında 32 kat, kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşunda (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşunda (EGE-KK-95) 64 kat daha düşük olduğu görüldü.

Saf teikoplanin antibiyotiğinin *S. aureus* ve *S. epidermidis* bakterilerini inhibe ettikleri bilinmektedir. Bu sebeple, antibiyotik – mikroorganizma etkileşimini sınırlamak adına *S. aureus* aptameri kullanıldı. Amaç, *S. aureus* aptamerinin diğer bakterilerle etkileşime girmeyerek antibiyotiğin ortama salımını engellemesidir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen teikoplanin yüklü aptamer konjuge PLGA nanopartikülleri hem *S. aureus* hem de *S. epidermidis* bakterilerine verildi. *S. aureus* spesifik aptamer kullanıldığı için aptamerin *S. epidermidis*'e bağlanmadığı ve teikoplanin salımına izin vermediği gözlemlendi. Bunun sonucunda da *S. epidermidis* suşunda inhibisyon görülmedi. Elde edilen sonuçlar hedefe yönelik ilaç çalışmaları için umut vaat etmektedir. Bu yüzden bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Aptamer, minimum inhibisyon konsantrasyonu, PLGA, *S. aureus*, teikoplanin.

ABSTRACT

IN VITRO EFFECT ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* OF APTAMER BASED TEICOPLANIN LOADED POLY LACTIC - CO GLYCOLIC ACID NANOPARTICLES

Samet UÇAK

Department of Molecular Biology and Genetics
Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

In this thesis study, aptamer conjugated PLGA nanoparticulate system was used to limit antibiotic-microorganism interactions and to prevent loss of antibiotic doses. Teicoplanin antibiotic was loaded by applying double emulsion (water / oil / water) solvent evaporation method to PLGA nanoparticles and PLGA nanoparticles (BOS) and teicoplanin (TP) loaded PLGA nanoparticles (FT) were synthesized. According to the results of 3 replicated particle size and zeta potential measurement analysis of BOS and FT, particle size was measured as $228 \pm 1,484$ nm for BOS and $226 \pm 5,568$ nm for FT. The encapsulation efficiency (EV) was measured as 98%, active substance reaction efficiency (RV) 69% and active substance loading efficiency (YV) as 7% of the nanoparticles. According to the BET analysis, It was measured as BET surface area $7.9798 \text{ m}^2/\text{g}$, and $10.0573 \text{ m}^2/\text{g}$, pore volume $< 1269 \text{ nm}: 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$ and $< 1269 \text{ nm}: 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$, pore area $> 216,632 \text{ nm} 0.000 \text{ cm}^2/\text{g}$ and $> 117.233 \text{ nm}: 0.000 \text{ cm}^2/\text{g}$ for the BOS and FT. According to the SEM and AFM analysis performed to display the surface topography of the nanoparticles, it was found that the synthesized nanoparticles were nano-sized, smooth-spherical with a narrow range size distribution. After the characterized particles were obtained, the surface of the PLGA nanoparticles were conjugated with aptamer specific *S.aureus* bacteria. FT-IR analysis was performed to determine that the conjugation was correct. In the FT-IR study, it was shown by the N-H bending vibration ($1640\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$) that the NHS / EDC binder was attached to the PLGA surface.

After obtaining the characterized PLGA nanoparticles, controlled release study was

performed to find out how long the antibiotic was released. The experiment was performed for 20 days. In the controlled release study, it was determined that PLGA released 55% of the teicoplanin which was encapsulated within the first hour and 80% at the end of the 20th day.

S. aureus (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), the clinical strain of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (EGE-KK-13) isolated from blood culture, the clinical strain of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (EGE-KK- 95), *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 43300), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) and *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) reference strains were used to examine the effectiveness of the resulting teicoplanin loaded aptamer conjugated nanoparticles. The efficacy of empty PLGA, pure teicoplanin, PLGA loaded teicoplanin and teicoplanin loaded aptamer conjugated PLGA nanoparticles on the reference strains were examined by applying the antimicrobial test, Buyyon Dilution (Brot Dilution) test. In the reference strains where pure teicoplanin was administered against teicoplanin loaded PLGA, MIC values were 32 times lower in *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923) and *S. aureus* (ATCC 43300), 64 times lower in the clinical strain of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (EGE-KK-13) isolated from blood culture and the clinical strain of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (EGE-KK- 95) isolated from blood culture.

Pure teicoplanin antibiotics are known to inhibit *S. aureus* and *S. epidermidis* bacteria. For this reason, *S. aureus* aptamer has been used to limit the antibiotic-microorganism interaction. The aim is to prevent the aptamer of *S. aureus* bacteria from interacting with other bacteria, preventing antibiotic release into the environment. Teicoplanin loaded aptamer conjugated PLGA nanoparticles, which were characterized, were delivered to both *S. aureus* and *S. epidermidis* bacteria. Since *S. aureus* specific aptamer was used, it was observed that the aptamer was not bound to *S. epidermidis* and did not allow teicoplanin release. As a result, the inhibition was not observed in *S. epidermidis* strains. The results show promise for targeted drug studies. Therefore, further studies are needed in this field.

Keywords: Aptamer, minimum inhibition concentration, PLGA, *S. aureus*, teicoplanin.

1.1 Literatür Özeti

Literatür araştırmalarına göre, aktif hedefleme ile nanopartiküler sistemin hedef hücreler üzerinde birikiminin pasif hedeflemeye göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir[1]. Bu tez çalışmasında, hedef üzerinde aktif hedefleme ile nanopartikül sayısı artırılıp etken madde miktarı sınırlandırılarak, düşük konsantrasyonda yüksek verim elde etmek hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda etken madde yüklenerek oluşturulan PLGA nanopartiküler sistemin aptamer konjugasyonu ile *S. aureus* bakterisi üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmıştır..

Nanopartiküller ilk olarak aşı ve antineoplastik ilaçların taşınması için 1970'li yıllarda geliştirilmiştir [2]. Çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere terapötik ve tanı/teshis sağlayan ajanlar için taşıyıcı bir sistem olan polimerik nanopartiküllerin, özellikle etken maddenin hedeflemesinde sahip oldukları avantajlardan dolayı, bu sistemlerin önemini ortaya koymaktadır [3]. Nanopartiküller doğal ya da sentetik polimerlerle hazırlanmaktadır. Sentetik polimerlerle hazırlanan PLGA, biyouyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. Üretimlerinde kolaylık, toksik ve immünojenik özellik göstermemeleri ve karakterizasyonunda çok yönlülük gibi özelliklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemlerde en sık kullanılan polimerlerden birisidir [4]. Kanseri, patojen bakteri gibi çeşitli uygulamalar için formüle etmede kolaylığın yanı sıra, ilaç taşıma sistemlerinde kullanımı A.B.D. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır [5].

Nanopartiküler sistemlerin aktif hedeflenmesinde aptamerler sıklıkla kullanılmaktadır [6]. 1990 yılında iki farklı laboratuvarında birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmalar sonucunda [7, 8] Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilimi literatürüne, aptamer (Latin kelime “aptus” ve Yunan kelime “meros” “uygun parçacık”) ve aptamerleri meydana getirebilmek için kullanılan yöntem olan SELEX (“Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment”, “Ligantların Exponansiyel Zenginleştirme ile Sistemik Evrimi”) terimleri katılmıştır. Aptamerler, in vitro

koşullarda sentetik olarak sentezlenen, tek zincirli nükleik asitlerdir. Aptamerler çok çeşitli hedef moleküllere (proteinler, metal iyonları, monosakkaritler, peptidler, mikroorganizmalar, hücreler, dokular) [9] yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanabilen sentetik oligonükleotitlerdir. DNA veya RNA yapıda olabilirler. Aptamerlerin en önemli özelliklerinden birisi, sahip oldukları 3 boyutlu yapılarıdır. Aptamerlerin hedef moleküllere spesifik bağlanmaları 3 boyutlu yapıları sayesinde gerçekleşmektedir. Aptamerler, hedeflerine kolayca modifiye edilebilmektedirler [7–11]. Düşük moleküler ağırlıklı olmaları, tekrar tekrar kolaylıkla sentenebilmeleri, toksik olmayan hedefleme ligandları olmaları, aktif konformasyonlarını geri kazanabilme özellikleri, aktif hedefleme açısından aptamerlere kullanım avantajı sağlamaktadır. Aptamerler, biyosensör olarak kullanımının yanı sıra, teşhis, tedavi ve ilaç taşıma sistemlerinde aktif hedeflemede kullanılmaktadır [12].

Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch irinde tanımlamış, 1880'de Pasteur tarafından bu bakteriler sıvı besiyerinde üretilmiş [13] ve 1880'de İskoçyalı cerrah Sir Alexander Ogston, bu organizmaların kümelenmelerini üzüm salkımına benzeterek, bu organizmaları stafilokok (Grekçe, staphyle - üzüm salkımı) olarak isimlendirmiştir. İskoçyalı cerrah Sir Alexander Ogston tarafından bu bakterilerin insanlarda apselere neden olduğu, ayrıca farelerde de patojen etki yaptığı vurgulanmıştır [13, 14]. 1884 yılında ise Alman hekim Friedrich Julius Rosenbach, bu mikroorganizmaları saf kültürde yetiştirebilmiş ve renk üretimine göre kategorize etmiştir [15, 16]. Klinik olarak en çok önem arz eden türlerden birisi *S. aureus* bakterisidir. Gram (+) kok morfolojisine sahip *S. aureus* antibiyotiklere karşı direnç kazanma konusunda oldukça adaptif bir türdür [17]. 2019'da A.B.D. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından yayınlanan veriler, 2017 verilerine dayanılarak yayınlanmış, A.B.D.'de *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların 119.000 kişiyi enfekte ettiğini ve yaklaşık 20.000 kişinin ölümüne neden olarak büyük bir sorun teşkil ettiğini göstermiştir [18].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hedef hücrelere aktif taşıma ile hedeflendirilmiş nanopartiküler sistemlerin etken madde birikimini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda yapılan tez çalışmasında 3 farklı alanın birleştirilmesiyle, *S. aureus* bakterisi üzerinde aktif hedefleme ile düşük antibiyotik konsantrasyonu altında, yüksek inhibitör etki yaratarak bilime katkıda bulunulması hedeflenmiştir. Antibiyotik direncine sahip bakterilerin günden güne artması ve yayılması, bu bakterilere karşı tüm dünyada artan sağlık harcamaları bu alanda tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini önemli hale getirmektedir. Bu tez çalışmasının, literatür araştırmalarına göre ilk olma özelliği taşıyan bilimsel çalışma olması, çalışmanın önemini göstermektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bakteri kaynaklı enfeksiyonların günümüzde giderek yayılması ve bakterilerin antibiyotiklere karşı hızlı şekilde direnç kazanmaları, bu alanda yeni ilaç sistemlerinin tasarlanmasını gerektirmektedir. Bu tez çalışması ile;

- Teikoplanin antibiyotiğini biyobozunur ve biyouyumlu polimerik ilaç taşıma sistemi olan PLGA nanopartikülü içerisine yükleyerek etken maddenin kaybını minimum düzeye indirmek ve kontrollü salım ile biyolojik aktivitesini arttırmak,
- Aktif hedefleme için kullanılan aptamer ile nanopartiküler sistemin konjugasyonunu sağlayıp, etken madde etkinliğinin hedef organizma dışındaki mikroorganizmalar ile etkileşimini sınırlandırıp minimum düzeye getirmek,
- Aktif hedeflemeli nanopartiküler sistem kullanarak düşük antibiyotik konsantrasyonunda yüksek inhibitör etki yaratarak literatüre katkı sağlayıcı bilgiler oluşturmak hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Son yıllarda hızlanarak devam eden dirençli bakteri oluşumu nedeniyle düşünülen ilk aşama tedbirler, kullanılan antibiyotiklerin etkilerinin arttırılması ve kullanım dozlarının düşürülmesi yönündedir. Bu tez çalışmasında geliştirilen aptamer konjuge antibiyotik yüklü nanopartikül formülasyonunun aktif hedefli sunulup, hedef mikroorganizma *S. aureus* bakterisi üzerinde düşük antibiyotik konsantrasyonunda yüksek inhibitör etki yaratması beklenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

Gram (+) kok morfolojisine sahip olan Stafilokoklar, bilinen en eski bakterilerdendir. İnsanlarda görülen basit deri enfeksiyonlarından, ölümcül enfeksiyonlara kadar çok çeşitli enfeksiyon türlerinde etkilidir [19].

Antibiyotikler, bakterileri inhibe etmede oldukça başarılıdır. Ancak, özellikle yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak çoğu Stafilokok bakterisinin Penisilin antibiyotiği direncine sahip olması, bir kısım Stafilokok bakterisinin de metisilin antibiyotiği direncine sahip olması, antibiyotiklerin kullanımında şüphelere yol açmaktadır [20]. Bunun yanında antibiyotiklerin hedefe giderken diğer mikroorganizmaları da etkilemeleri, antibiyotik dozundaki kayıp, antibiyotiklerin neden olduğu yan etkiler gibi durumlar antibiyotik kullanımında dezavantajlara neden olmaktadır [21].

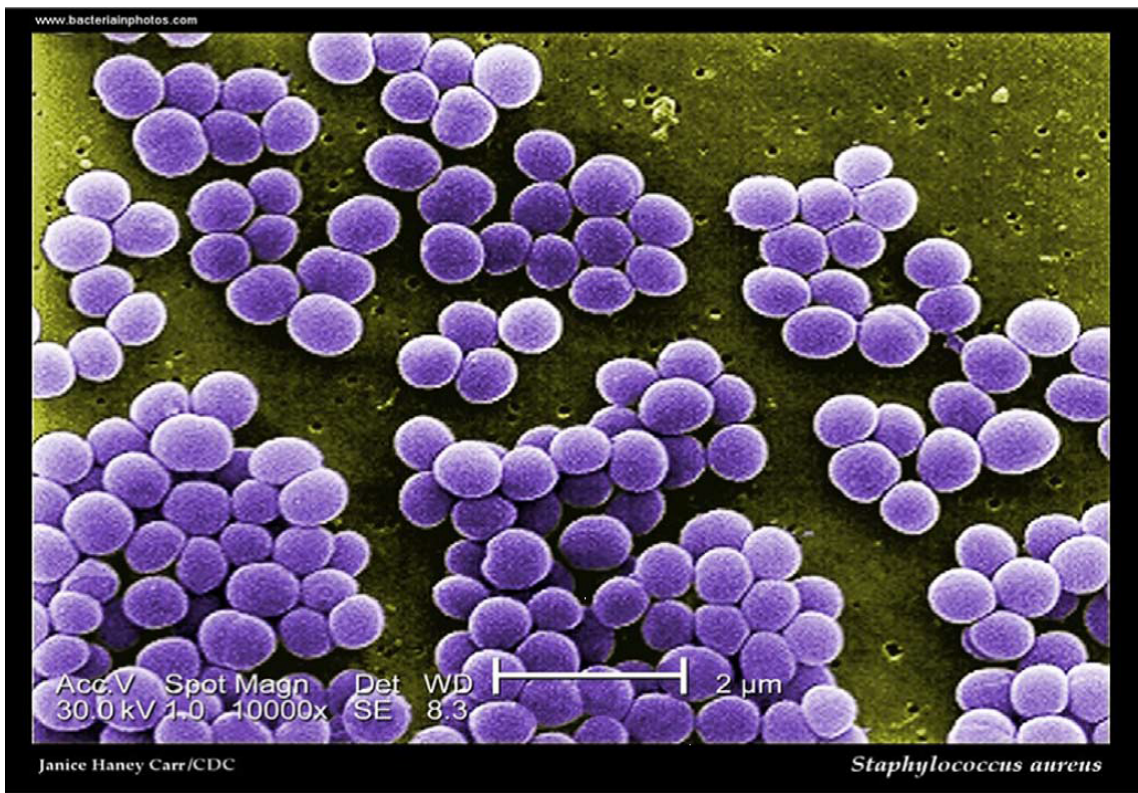
2.1 Stafilokoklar

Stafilokoklar, ortalama olarak 0,5 – 1,5 μm çapında, Gram (+) kok morfolojisine sahip, kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren, hareketsiz yapıda, spor oluşturmama gibi özelliklere sahip üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan *Micrococcaceae* familyasının üyeleridir. Bütün stafilokoklar katalaz enzimi (H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya yıkımını gerçekleştirir.) üretir [22, 23].

Stafilokoklar, fakültatif anaerob olmalarına karşın (yalnız *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* anaerobtur), genellikle aerob üremeyi sever. %10 NaCl ve 18 – 40 $^{\circ}\text{C}$ arası ortamlarda üreme özelliği gösterir. Sıvı ve katı besi yerlerinde kolaylıkla ürer. Katı besi yerinde 24 - 48 saat içinde bol miktarda ürer. Stafilokoklar genel olarak doğada, tozda, toprakta, hayvanların deri, mukoza dokularında ve dışkılarında, insanların deri, burun boşluğu ve lezyonlarında çoğalabilir [23, 24]. *S. aureus*, Stafilokoklar içerisinde klinik olarak en çok önem arz eden türlerden birisidir.

2.1.1 *S. aureus* Antibiyotik Direnç Tarihçesi

Toplum kaynaklı enfeksiyonların kaynaklarından biri olan *S. aureus*, her geçen gün yayılmaya devam etmektedir. Tüm popülasyonunun %15-36'sı insanların deri, mukozal zarları ve nazofarenks florasında kolonize olan kommensal bir bakteridir [25, 26]. Staphylococcus ismi, Yunanca “Staphyle” ve “cocci” kelimesinden, Şekil 2.1’de görüldüğü gibi [26] “üzüm salkımı” ve Latince’den “aureus” kelimesinden, büyük sarı kolonilerde yetişmesi nedeniyle “altın” anlamına gelir. *S. aureus*, sıcak ve kuru koşullarda hayatta kalabilirken, tuzlu ortamda da gelişebilmektedir [26, 27].



Şekil 2.1 Altın üzüm salkımı olarak adlandırılan *S. aureus*

Antibiyotik öncesi *S. aureus* bakteriyemi hastalarının mortalitesi %80'i geçti ve hastaların %70'inden fazlası metastatik enfeksiyon geliştirdi. 1940'lı yılların başında penisilin antibiyotiğinin kullanılmaya başlanması ile stafilokok enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde çarpıcı bir şekilde yükseliş olduğu gözlemlendi [28]. 1940'ın ortalarında Florey ve Chain tarafından saflaştırılan penisilinin, henüz kullanımının 2. senesi gibi erken bir tarihte, penisiline dirençli stafilokoklar ilk önce hastanelerde daha sonra da toplumda görülmeye başlandı [29]. 1960'ların sonuna gelindiğinde, hem toplumun % 80'inden fazlasının hem de hastane kaynaklı stafilokok izolatlarının penisilinlere dirençli olduğu görüldü [30].

S. aureus'a 1959 yılında β -laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin üretildi. Ancak antibiyotiğe karşı direnç kazanmak için inanılmaz bir yeteneğe sahip, dinamik ve adaptif bir bakteri olan *S. aureus*, 1961 yılında metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları olarak hızla ortaya çıktı ve yayılmaya başladı [31]. 1990'lı yıllara gelindiğinde ise artık MRSA suşları tüm dünyaya yayıldı [32]. Metisiline alternatif olarak pek çok β -laktam penisilin üretildi. Ancak bu üretilenlere karşı da kısa sürede *S. aureus* direnç geliştirdi. Vankomisin, her ne kadar metisilinden önce 1958 yılında onaylansa da, 1980'lerin sonunda hastane ortamlarında MRSA enfeksiyonlarının tedavisi için tercih edilen bir antibiyotik haline geldi. *S. aureus*, vankomisine karşı da çok hızlı direnç geliştirdi ve ilk kayıt 1997 yılında Japonya'dan literatüre girdi [33, 34].

2.1.2 *S. aureus* Virülans Faktörleri

Virülansı en yüksek olan stafilokok türü *S. aureus*'dur. Stafilokokların virülansında rol oynayan faktörler; yapısal bileşenler, enzimler ve toksinler olmak üzere 3 ana başlık altında incelenmektedir.

2.1.2.1 Yapısal Bileşenler

Bazı *S. aureus* suşları stabil bir ekzopolisakkarit tabakası (kapsül) üretebilmektedir. Üretilen polisakkarit yapıdaki kapsül, fagositozu önlemek amacıyla virülans özellik göstermektedir. Polisakkarit yapının antijenine göre 11 farklı serotip bulunmasına rağmen, insan klinik izolatlarının yaklaşık %70'ini serotip 5 ve 8 oluşturmaktadır [35]. Koagülaz-negatif stafilokoklarda, kapsüle ek olarak gevşek şekilde bağlanmış ve suda çözünebilen bir ekzopolisakkarit tabakası (slime tabaka) bulunmaktadır. Bu tabaka, bakterilerin dokulara ve yabancı cisimlere (kateter vb. cerrahi malzemeler) bağlanmalarını sağlamaktadır [36].

S. aureus hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramikasitten oluşan peptidoglikan, hücre duvarının dış iskeletinin sağlam olmasını sağlamaktadır. Peptidoglikan tabakanın başlıca özellikleri; makrofajlardan sitokin salınımını uyarmak, komplemanın aktivasyonuna yol açarak trombosit agregasyonuna neden olmak [37], opsonik antikorların üretimini indüklemek [38], monositlerden interlökin-1 salınımını uyarak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına yol açmaktır [39].

Sadece Gram (+) bakterilerde bulunan teikoik asitler, alternatif fosfat ve ribitol (duvar teikoik asitleri - peptidoglikan tabakaya bağlıdır) veya gliserol (lipoteikoik asitler -

sitoplazmik membrana bağlıdır) gruplarından oluşmaktadır. Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri ile türe özgü bir yapı göstermektedirler. Teikoik asitler fibronektine bağlanırlar ve mukozal yüzeylere tutunmayı sağlarlar [40, 41].

Yüzey proteini olan Protein A, *S. aureus*'un hücre duvarında yer almaktadır. *S. aureus*'un antikor aracılı immün sistem tarafından yok edilmesini önlemede rol almaktadır. Protein A, immünoglobulin G'nin (IgG) Fc bölgesine bağlanarak opsonofagositozu inhibe edebilme özelliğine sahiptir [42].

2.1.2.2 Enzimler

Katalaz, *S. aureus*'ta bulunan ve toksik H₂O₂'yi O₂ ve H₂O'ya dönüştüren bir heme protein enzimidir. Bakteriyel hücredeki bu enzimin amacı, *S. aureus*'u hidrojen peroksit aracılı bakterisidal mekanizmalardan korumaktır. *S. aureus*, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri ile öldürülmeye direnç kazanmaktadır [43]. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında Stafilokok ve Streptokokların (katalaz negatif) ayrımı katalaz test ile belirlenmektedir. Temel olarak bu test ile sıvı veya katı besiyerindeki bakteri kültürlerine hidrojen peroksit ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenir hale gelmesi, hidrojen peroksinin ayrışmasını, dolayısıyla da katalazın varlığını göstermektedir [44].

Staphylococcus'un koagülaz üretebildiğini ilk kez 1903 yılında Loeb bildirdi. Ayrıca Loeb, *S. aureus*'un kanın pıhtılaşmasına neden olmada özel bir etkisi olduğunu gösterdi [45]. Ekstrasellüler bir enzim olan koagülaz, *S. aureus* suşlarında serbest koagülaz ve bağlı koagülaz (clumping factor-kümeleşme faktörü) olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır [46]. Serbest koagülaz; koagülaz reaksiyon faktörü ile etkileşim sonucu fibrinojenin fibrine dönüşümü katalizlenmektedir. Bağlı koagülaz (clumping factor-kümeleşme faktörü); fibrinojeni fibrine çevirmekte ve kümeleşmeye neden olmaktadır. Koagülaz ilk önce protrombine etki etmekte, bu şekilde fibrinojenin fibrine çevrilmesi katalizlenmektedir [46, 47]. Koagülaz *S. aureus* için, fagositozu veya fagositik hücrelerin içerisindeki tahribatı engellemesi açısından önemlidir. Koagülaz testi *S. aureus*'un tanısında tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaktadır [48].

1933 yılında Duran-Reynals, yaptığı çalışmayla *S. aureus* suşlarında virülant özellik gösteren “yayılma faktörü” terimini literatüre kattı [49]. Hiyalüronik asit, memeli hücrelerinin plazma zarında sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Hiyalüronik asit, ciltte, iskelet dokusunda, umbilikal kordda, akciğerlerde, kalp kapakçıklarında, beyinde ve birçok dokuda bol miktarda bulunmaktadır [50]. Hiyaluronidaz, hiyalüronik asitin β -1,4 glikozidik bağını parçalayan bakteri enzimleridir. Bu sayede

S. aureus konak dokusunda kolayca yayılmaktadır [51].

Stafilokinazlar, *S. aureus*'un hücre yüzeyi reseptörleri yoluyla konaktaki plazminojene bağlamasını kolaylaştırmakta, plazminojeni aktive ederek plazmine dönüştürmekte ve fibrinolitik etki oluşturmaktadır. Böylece *S. aureus*'un konak dokularda yayılmasını sağlamaktadır [52, 53].

Lipazın triasilgliseritler için geniş substrat spesifikliğine sahip olduğu bilinmektedir. Lipazlar, insan serumunu bir besin kaynağı olarak hidrolize ederek, *S. aureus*'un cilt kolonizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca *S. aureus*'un cilt altı dokulara yayılmasını da sağlamaktadır [54, 55].

1956 yılında Cunningham ve meslektaşları, *S. aureus*'un salgıladığı deoksiribonükleaz enziminin varlığını literatüre kattı [56]. Termotabil olan deoksiribonükleaz enzimleri, endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip olan fosfodiesterazlardır. Bu sayede de nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotitlere parçalamaktadırlar [57]. Ayrıca, deoksiribonükleazlar *S. aureus* bakterisinde biyofilm oluşumunda düzenleyici rol oynamaktadır [58].

2.1.2.3 Toksinler

S. aureus, alfa, beta, delta ve gama olmak üzere hemolizinler ve Panton-Valentine lökositin olarak adlandırılan sitotoksik moleküller üretmektedir.

Alfa toksinler, hemolitik, nörotoksik, dermonekrotik etki göstermektedir. Özellikle tavşanlara 1 mg kadar intravenöz enjekte edildiğinde öldürücüdür ancak insan epitel hücreleri için de toksiktir [59].

Beta toksini, koyun kanı agar plakaları üzerindeki aktivitesinden dolayı sıcak-soğuk toksin olarak da bilinmektedir. *S. aureus* tarafından salgılanan nötr bir sfingomyelinazdır. Beta toksini, konak bağışıklık sistemini atlatmak için eritrositleri liziz etmektedir. Ek olarak, beta toksin nötrofilleri de etkilemektedir [60].

Delta toksini, küçük ve ısıya dayanıklıdır. Bakteri protoplastları da dahil olmak üzere eritrositler, organeller ve diğer hücreler için litik etki göstermektedir. Geniş bir spektruma sahip olduğu için, dokular için potansiyel olarak sitotoksiktir ve lökositler üzerinde olumsuz etki göstermektedir [61].

Gama toksin neredeyse *S. aureus*'un bütün suşları tarafından üretilebilirken, Panton-Valentine lökositin suşların yalnızca %2-3'ü tarafından üretilebilmektedir. Her iki toksin de S ve F komponentleri olarak iki komponentten oluşmaktadır. Bu

komponentler birbirleriyle ilişkisi olmayan salgısal protein olarak üretilmektedirler. Yapılan çalışmalarda, immün yanıtın şekillenmesinde S alt ünitesinin F alt ünitesine göre daha büyük öneme sahip olduğu da gösterilmiştir [62].

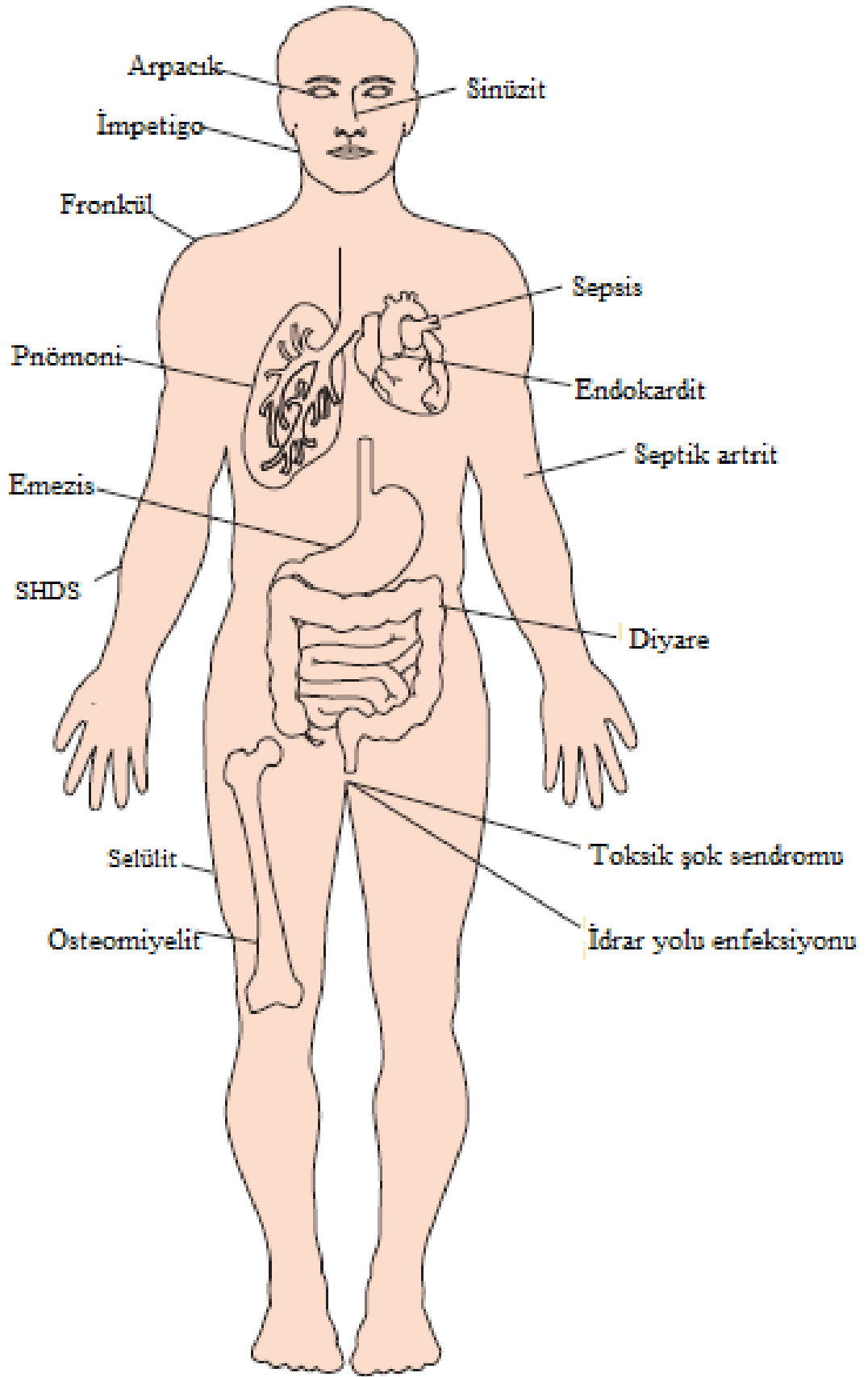
S. aureus tarafından üretilen eksfoliyatif toksinler, epidermolitik toksinler olarak da bilinmektedir. Spesifik serum proteazlar, doku bütünlüğünü sağlamada görevli desmosomal kadherinleri yalnızca cildin yüzeysel katmanlarında tanıyıp engellemektedir. Eksfoliyatif toksinler, doğrudan Stafilokokal haşlanmış deri sendromu (SHDS) hastalığına neden olmaktadır [63].

Toksik şok sendromu toksini, genelde ısı ve proteolizise karşı dirençli, hipotansiyon, ateş, mukoza zarlarında hiperemi, deskuamasyon ve eritroderma ile karakterize bir toksindir [64]. Süperantijen mekanizması ile sitokin salınımını uyarmaktadır. Bu sayede de hastalarda şok gelişmesine ve ölümlere neden olabilmektedir [65].

Enterotoksinler, ısıya dirençli yapıya sahiptir. Gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, toksik şok benzeri sendroma, artritise, alerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara neden olabilmektedir. T hücre proliferasyonunu uyarmaktadır. Bu yönüyle süperantijen fonksiyonu göstermektedir. Stafilokokal gıda zehirlenmesinde genellikle semptomlar 30 dakika ile 8 saat arasında ortaya çıkmaktadır. Semptomlar; kusma, şiddetli kramplar, intoksikasyon mide bulantısı, abdominal ağrı ve diyare ile seyretmektedir [66].

2.1.3 *S. aureus* Enfeksiyonları

S. aureus, tüm popülasyonun %15-36'sını kolonize eden kommensal bir bakteridir. İnsanda doku ve organlara ciddi hasarlar verebilirken, birçok enfeksiyon hatalığının gelişmesine sebep olmakta, ürettiği toksinlerle ölümcül semptomlara da yol açabilmektedir [67]. En sık rastlanan enfeksiyonlar; Şekil 2.2'deki gibi [68] deri apseleri, yara enfeksiyonları, derin doku apseleri, menenjit, perikardit, endokardit, osteomiyelit, toksik şok sendromu, haşlanmış deri sendromu, arpacık, impetigo, pnömoni, emezis, sinüzit, selülit, diyare, idrar yolu enfeksiyonu, bakteriyemi ve sepsis olarak çeşitlenmektedir [67-69].



Şekil 2.2 İnsanda *S. aureus* Enfeksiyonları

2.1.4 Tedavi

S. aureus, direnç geliştirme yeteneği kanıtlanmış olağanüstü adaptif bir patojendir. Yaklaşık 70 yıl önce ilk kullanımlarından bu yana β -laktam antibiyotiklerinin etkinliğinin sürekli erozyona uğraması özellikle endişe vericidir. Bu yüzden tedavide doğru antibiyotiğin seçimi, antibiyotik seçiminde de antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması çok büyük önem arz etmektedir [70]. Günümüzde *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde başlıca; penisilinaza dirençli penisilinler (metisilin, oksasilin, sefalotin vb.) [71], β -laktamazlar (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam vb.) [72], sefalosporinler (sefalekssin, sefadroksil, sefazolin vb.) [73], aminoglikozidler (amikasin, gentamisin, netilmisin vb.) [74], makrolidler (eritromisin, azitromisin, klaritromisin vb.) [75], fusidik asit [76], kinolonlar [77], karbapenemler (meropenem, imipenem vb.) [78], linkozamidler (linkomisin, klindamisin vb.) [79], Rifampisin [80], glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin, vb.) [81] antibiyotikleri olmakla birlikte, çok çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır. Son yıllarda β -laktam antibiyotiklere dirençli stafilokoklardaki artış nedeniyle glikopeptit antibiyotiklerin klinikte kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır.

2.1.4.1 Glikopeptit Antibiyotikler

Günümüzde Gram (+) bakteri enfeksiyonları artmaya devam etmektedir. Bu nedenle, uygun antibiyotik kullanımı oldukça önem arz etmektedir. Özellikle Beta-laktam antibiyotiklere karşı artan direnç glikopeptid antibiyotiklerin bu alanda kullanımını arttırmaktadır. Glikopeptit antibiyotikler içerisinde, ilk olarak 1956 yılında *Streptomyces orientalis*'ten izole edilen vankomisin, sonrasında da 1978 yılında *Actinoplanes teichomycetis*'ten izole edilen teikoplanin literatüre eklendi [82, 83]. Çalışmamızda etki mekanizması vankomisinle aynı olmasına rağmen, kullanımında çeşitli avantajlar sağlayan glikopeptid antibiyotik grubundan teikoplanin kullanıldı.

2.1.4.2 Teikoplanin

1978 yılında *A. teichomycetis*'ten izole edilen teikoplanin, glikopeptid antibiyotikler grubunda yer almaktadır [84]. Teikoplanin, Gram (+) bakterilerine karşı etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir ve hücre duvar yapısını oluşturan peptidlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanmak suretiyle transglikolizasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe ederek etkisini göstermektedir [85, 86]. Teikoplanin polar yapıda bir moleküldür. Benzer polarite, moleküler ağırlık ve biyolojik özelliklere sahip beş bileşenin karışımıdır. Bu moleküller, $A_2 - 1$, $A_2 - 2$, $A_2 - 3$, $A_2 - 4$ ve $A_2 - 5$ 'tir. Tüm teikoplanin bileşenlerinde ortak olan yapısal birim, doğrusal bir heptapeptit, bir D-mannoz ve asetil-D-glukozamin grubudur [87].

2.1.4.3 Teikoplanin Farmakokinetiği

Teikoplanin molekülünün yapısında bulunan açıl alifatik zincirlerin varlığı, bu antibiyotiği yüksek oranda lipofilik yapmaktadır. Bu özellik teikoplanine mükemmel şekilde doku ve hücrel penetrasyonu sağlamaktadır [88]. Teikoplanin uygulaması, intravenöz enjeksiyon ve intramüsküler olarak iki yolla verilebilmektedir. Ağırlıklı olarak plazma proteinlerine %90 oranında bağlanmaktadır. Ağız yoluyla alınan teikoplaninde emilim olmamaktadır. Teikoplanin gastrointestinal kanaldan absorbe edilememektedir. Ağırlıklı olarak renal yolla elimine edilmektedir. İntravenöz uygulanan dozda yaklaşık olarak %2 – 3 arası metabolize olmaktadır. Teikoplanin yaklaşık 88 – 182 saat arası olmak üzere uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir [89].

2.1.4.4 Teikoplaninin Terapötik Kullanımı

Vankomisine göre, uzun yarılanma ömrü ile günde tek doz kullanılabilmesi, yan etkilerinin daha az oluşu, intravenöz enjeksiyon uygulamasının yanı sıra intramüsküler olarak da verilebilmesi gibi sahip olduğu avantajlar ile 1984 yılında kullanıma giren teikoplanin, kullanımı ve araştırmaları bakımından son yıllarda hızını arttırmaktadır [90].

Teikoplanin, klinikte Gram (+) mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Gram (-) mikroorganizmalara etki etmemektedir. Terapötik olarak, sepsis, cerrahi profilaksi, protez ve plastik cihazlarla ilişkili enfeksiyonlar, pnömoni, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu, endokardit, osteomyelit, immünolojik hasar gören hastalarda oluşan enfeksiyonlar gibi hastalıklarda kullanılmaktadır [91, 92].

2.1.4.5 Teikoplaninin Toksisitesi

Teikoplanin, vankomisine oranla daha az toksisite göstermektedir. Genellikle nötropeni, eozinofili, trombositopeni, nefrotoksisite veya ototoksisite görülmesi nadirdir. Teikoplaninin bir aminoglikozit ile eş zamanlı kullanımının bu yan etki riskini arttırmadığı görülmektedir. Teikoplanin kullanımına bağlı olarak Kırmızı Adam Sendromu belirti ve semptomlarının görülmesi nadirdir [93, 94]. Yapılan bir çalışma ile teikoplanin verilen 3378 hastada en yaygın belirlenen yan etkiler; aşırı duyarlılık (89 hasta, % 2,6), anormal karaciğer fonksiyonu (57 hasta, % 1,7), ateş (27 hasta, % 0,8), lokal intolerans (55 hasta, %1.6), anormal böbrek fonksiyonu (22 hasta, % 0.7) ve ototoksisite (11 hasta, % 0.3) olarak belirlenmiştir [94].

2.2 İlaç Taşıma Sistemlerinde Polimerik Nanopartiküller

İlaç taşıma sistemleri, ilaçların terapötik indekslerini arttırırken toksik etkilerini azaltabilmektedir. Sistem tasarımı, yüksek terapötik etkiyi optimum dozda ortaya çıkarmada kilit role sahiptir [95]. Burada nanopartiküllerin boyutları, yüzey özellikleri, etken maddenin salımı göz ardı edilmemesi gereken çok önemli parametrelerdir [96].

10-1000 nm arası boyut büyüklüğüne sahip olan nanopartiküller, küçük boyutları ve geniş yüzey alanları sayesinde kendine has özelliklere sahip olan makromoleküllerden oluşan katı kolloidal sistemlerdir [97].

Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, etken maddelerin hedefe iletilmesi konusunda pratiklik sağlamaktadır. İlaç taşıma sistemi içerisine yüklenen etken maddenin yarılanma ömrünü uzatmaktadır. Bunun sonucunda da sağlık harcamalarında giderler önemli ölçüde kısıtlanmış olmaktadır [98].

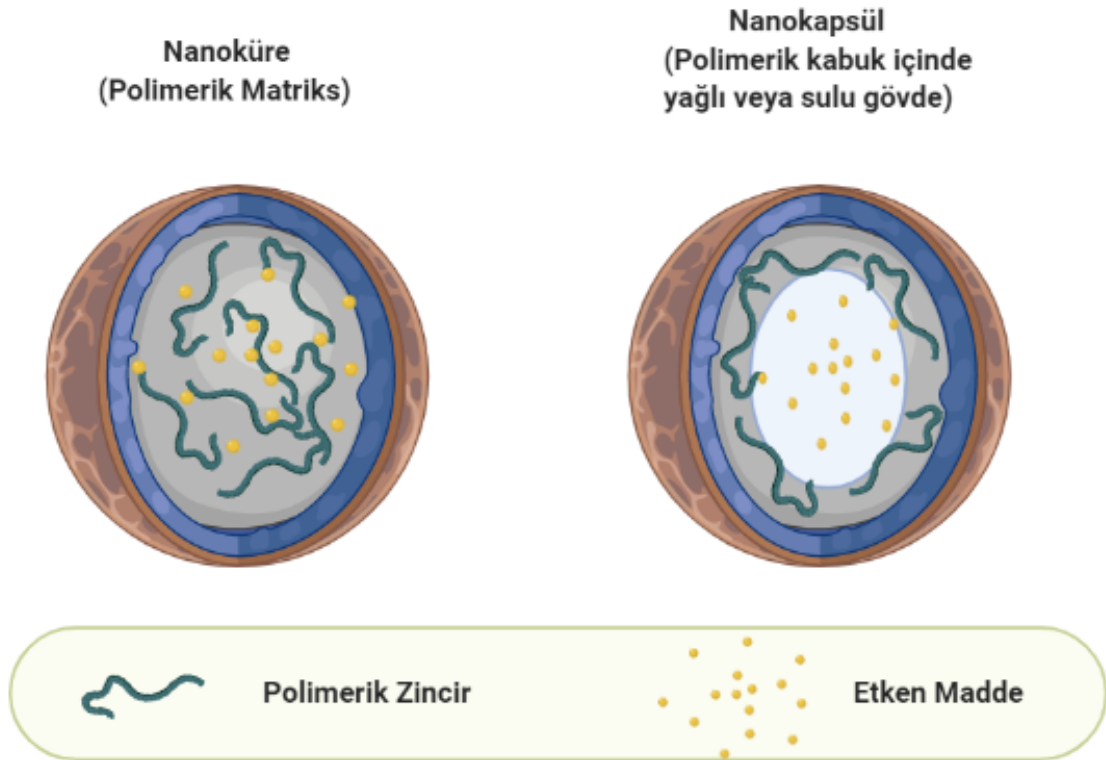
İlaç taşıma sistemlerinde nanopartiküller sağladığı pek çok avantajla kullanım üstünlüğüne sahiptir. Başlıca avantajlar; Nanopartiküllerin üretilmeleri kolay ve ucuzdur [99]. Nanopartiküller kolaylıkla modifiye edilerek aktif ya da pasif olarak hedeflendirilebilmektedir [100]. Yüksek oranda etken madde yükleme kapasitesine sahip olan nanopartiküller, etken maddenin intraselüler dağılımını arttırmaktadır [101]. Polimerik nanopartiküller etken maddenin kontrollü salımını sağlamaktadır. Etken maddenin hedef bölgeye salımı günler hatta haftalar sürebilmektedir. Böylece kararlılığı arttırmaktadır [102]. Polimerik nanopartiküller matris içine hapsedilmiş etken maddeyi degradasyondan korumaktadır. Böylece hedef hücreye daha yüksek oranda etken maddenin ulaşma olasılığı artmaktadır [103]. Uygulama esnasında etken madde düşük dozlarda verildiği için yan ve toksik etkileri yok denecek kadar az olmaktadır [104].

2.2.1 Polimerik İlaç Taşıma Sistemlerinde Kullanılan Nanopartiküller

Polimerik İlaç Taşıma Sistemlerinde sentetik ve doğal polimerler olmak üzere iki farklı polimer çeşidi kullanılmaktadır. Kullanılacak olan polimeri seçmede, kullanılacak etken maddenin ne olduğu, dozu, salım süresi gibi parametreler önemli rol oynamaktadır [105].

Etken maddeler, polimerik nanopartiküllerin içerisine hapsedilmekte ya da yüzeyine tutturulmaktadır. Etken maddenin nanopartiküllerin içerisine hapsedilen, polimerik zar ile çevrelenmiş boşluk içerisinde sıvı halde çekirdeği bulunan veziküler sistemlere nanokapsüller [106], etken maddenin nanopartikül yüzeyine adsorbe ettirildiği ya

da polimerik matriks yapı içinde çözündüğü ve homojen şekilde dağıldığı matris sistemlere nanoküreler [107] denilmektedir.



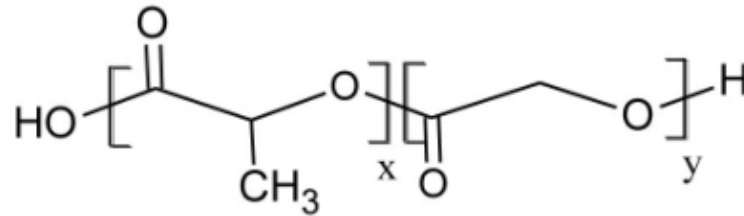
Doğal ve sentetik polimerler biyobozunur polimerlerdir. İlaç taşıma sistemlerinde sahip oldukları avantajlar ile oldukça fazla kullanılmaktadır. Doğal polimerlere örnek; aljinat, kitin, agaroz, dekstran, hiyaluronik asit, albümin, kollajen, jelatin vb. gibi maddeler verilirken [108, 109], sentetik polimerlere örnek; poli (laktik asit), poli (glikolik asit), poli (laktik-ko-glikolik asit), poli (amidler), poli (amino asitler), poli (esterler) gibi maddeler [110] verilmektedir.

2.2.1.1 Poli (D, L – Laktik – Ko - Glikolik Asit) (PLGA)

İlaç taşıma sistemlerinde FDA tarafından kullanımı onaylanan sentetik polimerlerle hazırlanan PLGA, biyouyumlu ve biyobozunur bir polimerdir [111]. PLGA gibi sentetik polimerler sahip oldukları 2 temel özellik sayesinde birçok avantaj sağlamaktadır. Bu özellikler; küçük partikül boyutu, bu sayede kolay üretilmesi ve kontrollü salım özelliği olan biyobozunurluktur [112, 113].

PLGA nanopartikülleri vücuda alındıklarında hidroliz yoluyla laktik asit ve glikolik asit monomerlerine parçalanmaktadır, bu monomerler sitrik asit döngüsüne girerek CO₂ ve H₂O olarak metabolize olmaktadır [114]. PLGA nanopartikülleri kullanılan ilacın

etkisini arttırma ve görülen olası yan etkileri azaltma gibi etkilerinden dolayı sağlık bilimlerinin birçok alanında kullanılmaktadır. Nanopartikül büyüklüğü terapötik etki için kilit rol oynamaktadır. Özellikle 50-500 nm boyut aralıklarındaki nanopartiküller dolaşımında daha uzun süre yer almaktadır [115, 116].



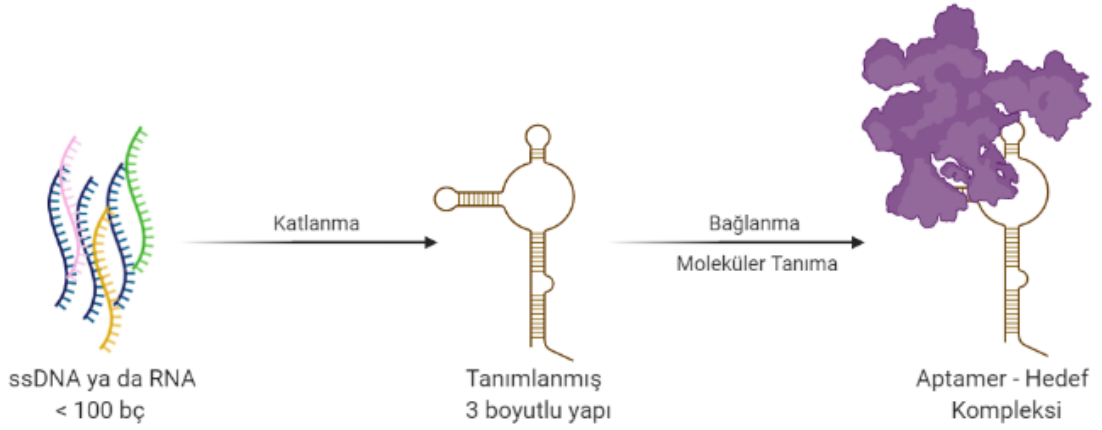
Şekil 2.4 PLGA'nın kimyasal yapısı

Şekil 2.4'deki kimyasal yapıya sahip PLGA [117]; poli laktik asit ve poli glikolik asitin bir kopolimeridir. PLGA'nın yapısında bulunan poli laktik asit, asimetrik α -karbon içeren D veya L formunda olarak stereokimyasal yapıda bulunabilirken, kimi zaman R ve S formunda bulunabilmektedir. Enantiyomerik formları poli D-laktik asit ve poli L-laktik asittir. PLGA genellikle D - ve L - laktik asit formlarının eşit oranda kullanıldığı zaman, poli D, L – laktik – ko - glikolik asit ismini almaktadır [118]. PLGA kopolimerini oluşturan poli laktik asit - poli glikolik asit oranı üzerine ayarlamalar yapılabilmektedir. Bu sayede kopolimeri daha hidrofobik ya da hidrofilik hale getirmek mümkün olmaktadır. Bu sayede de PLGA'nın degradasyon oranı ve ilaç salım hızı gibi parametrelerde modifikasyonlar kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum da ilaç taşıma sistemlerinde büyük avantajlar sağlamaktadır [119].

Etken maddelerin PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemleri içerisine başarılı şekilde, yüksek enkapsülasyon oranlarında yüklenebilmesi sayesinde, bu sistemler ilaçların hedeflendirilmesinde (hücresel veya doku bazında) başarılı şekilde kullanılmaktadır. PLGA ile hazırlanmış ilaç sistemleri ilaç salımını uzatırken, biyoyararlanımı artırmaktadır [120].

2.3 Aptamerler

Aptamerler, in-vitro koşullarda sentetik olarak sentezlenen, tek zincirli nükleik asitlerdir. Aptamerlerin hedeflemede yüksek afiniteye sahip olması, özellikle nanoyüzeylere bağlanırken afiniteyi değiştirmemesi aptamerlere olan ilgiyi arttırmaktadır [121].



Şekil 2.5 Aptamerlerin işlevselliğinin şematik gösterimi.

Şekil 2.5'te de görüldüğü üzere aptamerler hedeflerine üç boyutlu yapıları sayesinde bağlanmaktadır. Aptamerler geniş yüzey alanlarına sahiptir. Bu sayede, aptamer - hedef molekül arasındaki etkileşim daha güçlü hale gelmektedir ve olası en küçük farklılıklar halinde dahi bağlanma engellenmektedir [122].

Hedefe özgünlükleri Kd (ayırma sabiti) değerlerinden kolayca anlaşılmaktadır. Bu değer nanomolar ve pikomolar seviyesinde olması, aptamerlerin yüksek afinitelerinin sonucudur [123].

Antikorlara alternatif olma yolunda çok hızlı bir şekilde gelişen aptamerler, moleküler görüntüleme, hassas ve hızlı tanı sistemleri, ilaç taşınması, klinik tanı, gıda ve çevre güvenliği gibi pek çok uygulama alanında rol almaktadır. Aptamerler; kolayca üretilip, ucuz olup, kimyasal olarak kolay modifiye edilip, değişik analitik tasarımlara kolayca entegre edilebilmektedir. Bu gibi özelliklerinden dolayı aptamer temelli biyosensörler antikorlarla karşılaştırıldığında birçok üstünlüğe sahiptir [124]. Antikorlara ait özelliklere benzer olarak aptamerler teofilin (Molar Kütle: 180 g/mol) kadar küçük, 30S ribozomal alt birim (Molar Kütle: $>10^6$ g/mol) kadar büyük hedefleri seçebiliyor, daha sonra tekrar tanıyabilmektedir [125].

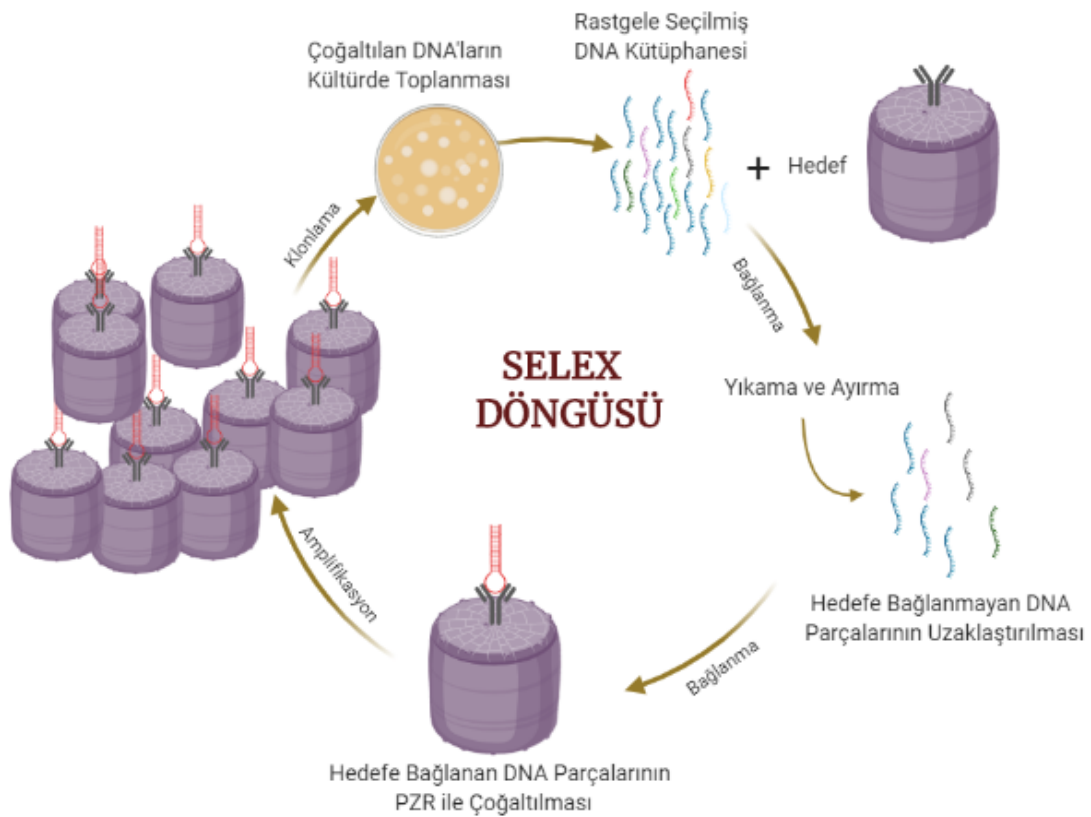
Aptamerlerin en büyük handikapları nükleaz varlığında in vitro ve in vivo koşullarında degrade olmaları ve hassasiyetlerini kaybetmeleridir. Bu istenmeyen durumdan kurtulabilmek için çok fazla çalışma gerçekleştirildi. Aptamerleri stabilize etmek için geliştirilen metotlardan en başarılı olanı ayna görüntülü "Spiegelmer" metotudur. Bu metot, oligonükleotit omurgasının veya pirimidin kısmının 2' - pozisyonunun kimyasal modifikasyonu esasına dayanmaktadır [126].

Terapötik özellikte ilk aptamer, FDA tarafından 2004 yılında onay alarak Macugen

(pegaptanib) ismiyle, “Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu” tedavisi için piyasaya sürüldü [127]. Günümüzde de çeşitli hastalıklar için ilaç potansiyeli olan pek çok aptamer çalışması yapılmaktadır.

2.3.1 SELEX (“Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment”, “Ligantların Üssel Zenginleştirme ile Sistemik Evrimi”)

In vitro koşullarda seçim tekniği olan SELEX, aptamer seçiminde çok çeşitli hedeflere sıkıca ve spesifik bağlanma özelliği katmasından dolayı, nükleik asitlerin izolasyonu için çok yararlı bir tekniktir. Bu teknik ilk defa 1990 yılında yapılan iki bağımsız çalışma ile literatüre katılmıştır. Tuerk ve Gold tarafından yapılan çalışma ile bakteriyofaj T4 DNA polimeraz (gp43) ile mRNA'nın ribozom bağlanma bölgesi arasındaki etkileşim incelenmiştir. Randomize edilmiş bir RNA havuzundan gp43 bağlanma dizileri seçilmiş ve bu seçim prosedürü SELEX olarak adlandırılmıştır [7]. Aynı yıl Ellington ve Szostak, spesifik 3-D yapısına katlanabilen, rastgele dizilmiş bir RNA kütüphanesinden küçük ligandlar (organik boyalar) için spesifik bağlanma bölgelerine bağlanabilen RNA moleküllerini bulmak için benzer bir strateji kullanmışlardır [8].



Şekil 2.6 DNA Aptamerlerin SELEX ile in-vitro seçimi.

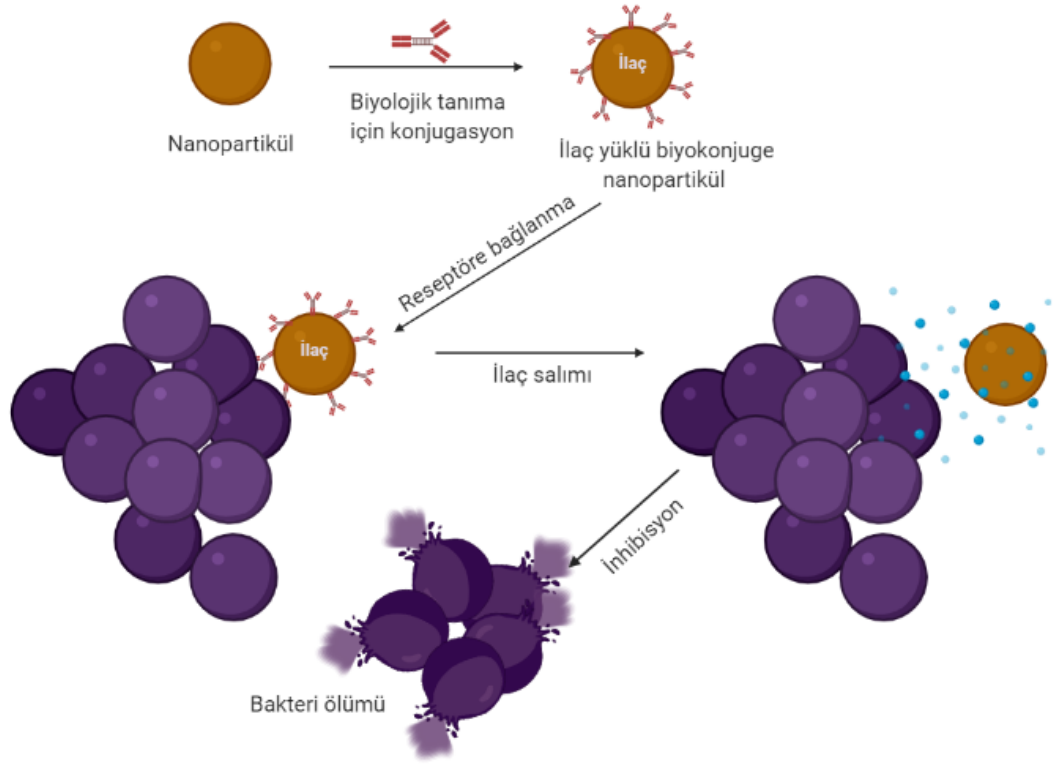
Şekil 2.6'da verilen DNA aptamerlerin SELEX ile in-vitro seçimi 5 temel aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşama, hedefe bağlanmayı gerçekleştirmek için 10^{15} - 10^{16} farklı dizi çeşidi içeren, 40 – 80 nükleotit uzunluğunda bir merkez bölgeye sahip oligonükleotit kütüphanesi hazırlamaktır. İkinci aşama, yıkama ve ayırma işlemidir. Bu aşamada özgün bağlanmayan ya da düşük afinitelerle bağlanan diziler yıkama işlemi yapılarak ortamdan uzaklaştırılır. Üçüncü aşama amplifikasyondur. Bu aşamada hedefe bağlanan DNA dizileri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak çift zincirli DNA elde edilir. Dördüncü aşama, PZR ile çoğaltılarak elde edilen çift zincirli DNA, tek zincirli DNA'ya çevrilir. Bu dört aşama 10 – 12 arası tekrarlanır ve afinitesi en yüksek aptamerler seçilir. Her bir tur SELEX turu olarak adlandırılır. Son olarak beşinci aşama klonlama aşamasıdır. Bu aşamada yüksek afiniteye sahip aday aptamerlerin sekanslarını belirlemek üzere bakteriye (genellikle *E.coli*) klonlanır [128–130].

2.4 Hedefe Yönelik İlaç Taşıma Sisteminde PLGA - Aptamer konjugatı

Aktif hedefleme ile oluşturulan nanopartiküler sistemler kullanılarak, seçilen hedef üzerinde nanopartikül sayısının arttırıldığı, bu sayede de etken madde miktarı sınırlandırılarak, düşük konsantrasyonda yüksek verim elde edildiği bilinmektedir.

Son yıllarda aptamer tabanlı nanopartiküler sistemler kullanılarak hedefe yönelik ilaç sistemlerinin geliştirilmesi yaygın hale gelmiştir. Bu sistemlerin kullanılmasındaki asıl amaç, ilacın etkisinin hedefin dışındaki hücre ya da mikroorganizmalar üzerinde minimum düzeylerde olmasıdır.

Nanopartiküler sistem kullanılarak hedeflenmiş ilaç taşıma sistemleri temel olarak 5 aşamada gerçekleşmektedir. Şekil 2.7'de de verilen bilgiler ışığında öncelikle nanopartikül içerisine ilacın yüklenmesiyle ilk aşama başlamaktadır. İkinci aşamada ilaç yüklü nanopartikülün yüzeyi hedefe yönelik aptamer ile kaplanmaktadır. Üçüncü aşamada aptamer kaplı, ilaç yüklü nanopartikül hedefe gönderilmektedir. Dördüncü aşamada aptamer hedefe konjuge olduktan sonra ilacın salınımına izin vermektedir. Son aşamada hedefin üzerinde salınan ilaç ile sadece hedef üzerinde inhibitör etki oluşmakta ve ilgili mikroorganizmanın inhibisyonu gerçekleşmektedir.



Şekil 2.7 Nanopartiküler sistem kullanılarak hedeflenmiş ilaç sistemi

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- N- Hidroksisüksinimit– Sigma Aldrich (130672)
- N - (3 - Dimetilaminopropil) - N' - etilkarbodiimid hidroklorid – Sigma Aldrich (E6383)
- Polivinil Alkol- Sigma Aldrich (363138))
- Poli(laktik-ko-glikolik asit) PLGA – Sigma Aldrich (719870)
- Teikoplanin toz antibiyotik – HiMedia (CMS8940)
- 10X Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) – Sigma Aldrich (P5493)
- Diklorometan – Sigma Aldrich (24233-2)
- *S. aureus* aptamer – Sentegen ((200 nmol skala)/baz)
- Etanol (C₂H₅OH) – Sigma (32205)
- Tryptone soya agar – Oxoid (CM0131B)
- Mueller Hinton II Broth Cation - adjusted – BD (212322)

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazı – Shimadzu
- Peristaltik Pompa – Masterflex L / S, Cole Parmer
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı – 2mag (e)motion magnetic stirrers – MIX 15 eco
- Santrifüj cihazı – Beckman Coulter, Allegra X-30R
- UV-Vis Spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Liyofilizatör – Telstar
- Zeta Potansiyel ve Parçacık Ölçüm Cihazı – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- Vorteks – Stuart, Heidolph
- Densitometre – Den-1B, Biosan, Litvanya
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) – Shimadzu UV 1800
- Quantachrome BET analiz cihazı - Yıldız Teknik Üniversitesi MERKLAB
- Taramalı Elektron Mikroskopisi - Zeiss EVO LS 10 - Yıldız Teknik Üniversitesi MERKLAB
- Atomik Kuvvet Mikroskobu (hpAFM) - Nanomagnetics Instruments (Ankara)
- İnkübatör - incubator 1000 – Heidolph
- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) - Perkin Elmer Frontier Spectrometer – ATR
- Mikroplaka okuyucu - BioTek Synergy H1, USA
- Mikroplaka okuyucu - EPOCH-2, Bio-Tek, USA

3.2 Yöntem

3.2.1 Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Hazırlanan tüm solüsyonlar uygun şartlar altında, uygun maddeler ve çözücüler kullanılarak özenle hazırlandı.

3.2.1.1 Teikoplanin (TP) Antibiyotiği Solüsyonu

Glikopeptid yapıda olan teikoplanin, Gram (+) bakterilerine karşı etkili antibiyotiktir. Suda homojen olarak çözünmektedir. Stok solüsyon hazırlanışı; 15 ml falkon tüp içerisine 10 ml deiyonize su (18.2 M Ω - cm, 25 °C) ve 100 mg teikoplanin antibiyotiği eklendi. 30 saniye orta hızda vorteks cihazında karıştırıldı. Homojen karışım elde edildikten sonra falkon tüp kullanılacağı zamana kadar +4 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.1.2 Polivinil Alkol (PVA) Solüsyonu

İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yönteminde kullanılmak üzere %0,1 ve %3'lük PVA solüsyonu hazırlandı. %0,1'lik PVA solüsyonu hazırlanışı; 700 ml deiyonize su (18.2 M Ω - cm, 25 °C) ve 0,7 g PVA 1 L'lik cam şişe içerisine eklendi ve 60 °C manyetik karıştırıcıda homojen solüsyon elde edene kadar karıştırıldı. Daha sonra elde edilen homojen %0,1'lik PVA solüsyonu kullanılacağı zamana kadar +4 °C buzdolabına kaldırıldı. %3'lük PVA solüsyonu hazırlanışı; 250 ml deiyonize su (18.2 M Ω - cm, 25 °C) ve 7,5 g PVA 1 L'lik cam şişe içerisine eklendi ve 60 °C manyetik karıştırıcıda homojen solüsyon elde edene kadar karıştırıldı. Daha sonra elde edilen homojen %3'lük PVA solüsyonu kullanılacağı zamana kadar +4 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.1.3 N - Hidroksisüksinimit (NHS) ve N - (3 - Dimetilaminopropil) - N' - etilkarbodiimid hidroklorid (EDC) solüsyonlarının Hazırlanışı

NHS (Sigma Aldrich) ve EDC (Sigma Aldrich), 5' ucu amin modifiyeli olarak seçilen aptamerin, yüzeyi karboksilik asit olan PLGA'ya konjugasyonunu sağlamak üzere, çapraz bağ elde etmek için kullanıldı. NHS 50 mg/ml, EDC 100 mg/ml olacak şekilde deiyonize su ile muamele edildi.

3.2.1.4 *S. aureus* Aptameri

Deney kökeni olarak *S. aureus* (ATCC29213) için özgül aptamer ligandı GCGCCCTCTCACGTGGCACTCAGAGTGCCGGAAGTTCTGCGTTAT [131] olarak 5' ucu amin modifiyeli olacak şekilde, %60 GC içeriği sahip, HPLC cihazı ile saflaştırılmış şekilde, hizmet alımı yapılarak Sentegen Biyoteknoloji firmasında sentezlendi. Seçilen aptamer çalışmada kullanılmak üzere deiyonize su ile 25mM olacak şekilde seyreltildi.

Çalışmada kullanılan aptamer, Cao ve meslektaşlarının [131], 2009 yılındaki çalışmalarındaki bulgular göz önüne alınarak seçildi. İlgili çalışmada *S. aureus* aptamer sekansı, negatif seçim aşamalarında *S. epidermidis* bakterisi kullanılarak tam hücre SELEX metodolojisi ile elde edildi.

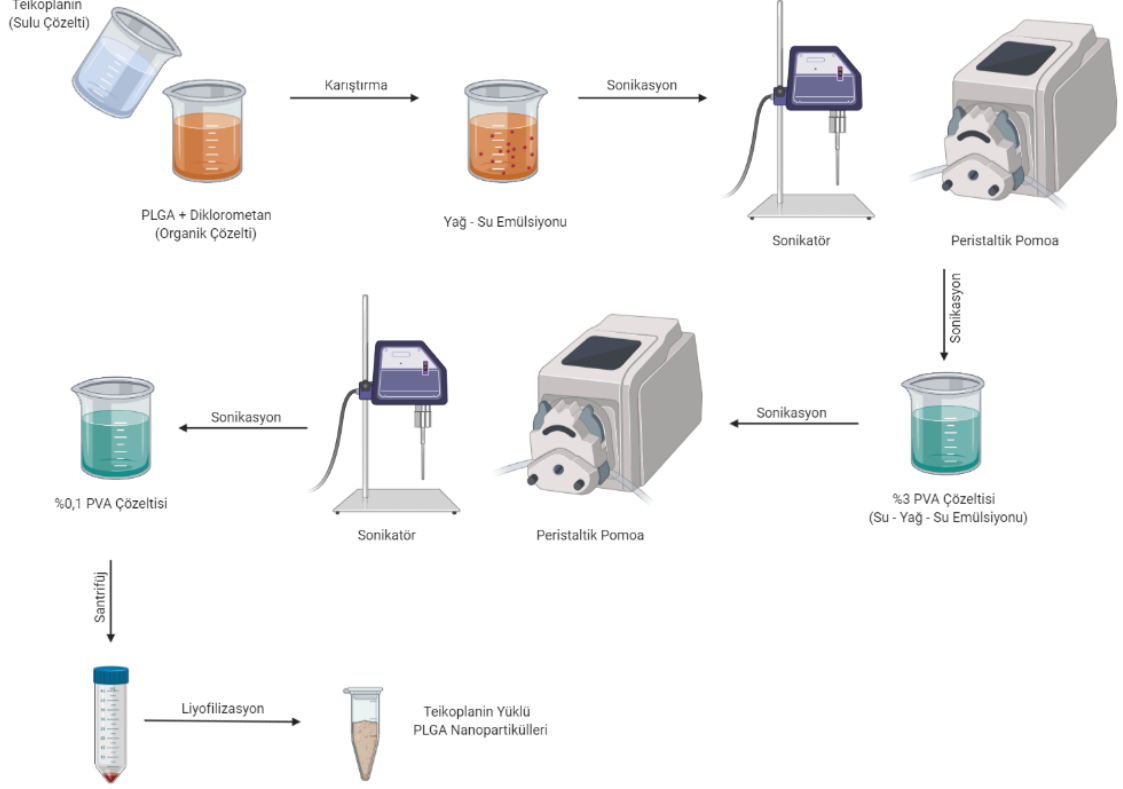
3.2.2 Teikoplanin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Yüzeylerinin Aptamerle Kaplanması

Teikoplanin yüklü PLGA nanopartikülleri (10 μg / μl) 250 μl 10 mM fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) (pH 7.4) ile 3 kez yıkandı (Santrifüj işlemi 1 dk, 15000 rpm). Yıkama işleminin ardından süpernatant kısmı atıldıktan sonra, 200 μl (400 mM/L) EDC ve 200 μl (100mM/L) NHS eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika düşük hızda (100 rpm) inkübasyonun ardından örnek üzerine 500 μl aptamer eklendi. Bu işlem sonrasında çapraz bağın sağlanması için örnek oda sıcaklığında düşük hızda (30 rpm) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su ile 3 kez yıkama işlemi (Santrifüj işlemi 1 dk, 15000 rpm) gerçekleştirildi. Yıkama işlemi sonrasında 500 μl deiyonize su eklenen örnek analiz edilinceye kadar +4 °C'ye kaldırıldı [132].

3.2.3 PLGA Nanopartiküllerin Sentezi

Nanopartikül sentezi için FDA onaylı, sentetik polimerlerle hazırlanan PLGA nanopartikülleri kullanıldı. Teikoplanin yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında ikili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanıldı.

3.2.3.1 İkili Emülsiyon (su/yağ/su) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi Kullanılarak Teikoplanin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Sentezi



Şekil 3.1 İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak teikoplanin yüklü PLGA nanopartiküllerin sentezi

Şekil 3.1’de ikili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak [133] teikoplanin yüklü PLGA nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirildi. Bu yöntem gere; 100 mg 50:50 PLGA nanopartikülü, 1 ml diklorometan organik çözücü içerisinde çözüldü. 10 mg/ml oranında deiyonize su içerisinde hazırlanan teikoplanin solüsyonundan 500 µl alınarak (5 mg teikoplanin), hazırlanan PLGA+DCM içerisine eklenerek vortekslendi.

Organik fazı hazırlamak üzere oluşan karışım peristaltik pompa kullanılarak (akış hızı:5) sonikatör cihazı (%80 güç) yardımıyla 90 sn süre ile sonike edilerek 5 ml %3 PVA solüsyonu üzerine aktarıldı. Dış faz oluşturmak için, peristaltik pompa kullanılarak (akış hızı:2) oluşan karışım beher içerisinde bulunan 35 ml %0.1 PVA solüsyonu üzerine manyetik karıştırıcı üzerinde yavaşça eklendi.

Oluşan nanopartiküllerin boyut dağılımını küçültmek ve oluşturulan solüsyondaki organik çözücüü buharlaştırmak için 24 sa manyetik karıştırıcı üzerinde (770 rpm) oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 24 sa inkübasyondan sonra, partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü yapabilmek adına örnekten 300 µl alınarak ependorfa aktarıldı. Çöktürme ve yıkama işlemlerini yapabilmek adına solüsyon 50 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.

Oluşturulan solüsyondan katı nanopartikülü elde etmek için, +4 °C 9000 rpm hızda 40 dk santrifüj işlemi uygulandı ve çöktürme sonrası elde edilen nanopartiküllerin dış yüzeyinde bulunan surfaktan kalıntılarını uzaklaştırmak için üzerine yavaşça 35 ml saf su eklenerek homojen hale getirildi ve aynı işlem tekrarlanarak 9000 rpm'de 30 dk 3 kez santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı.

Üst fazlar enkapsülasyon veriminin indirekt olarak tayini için saklandı. Kalıntılardan uzaklaştırılmış katı nanopartiküller liyofilizatöre kaldırılmak üzere 10 ml saf su içerisinde homojen bir solüsyon haline getirilerek önce 2 sa -20 °C'ye ardından -80 °C'ye konuldu. Katı nanopartiküller liyofilizatörde 24 sa süre ile kurutulduktan sonra analiz için hazır hale getirildi ve analiz edilinceye kadar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.4 Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

3.2.4.1 Teikoplanin Yüklü PLGA Nanopartiküllerin HPLC Analiz Yöntemi ile Kalibrasyon Eğrisi Oluşturulması

PLGA içerisine yüklenmiş teikoplanin miktarını tespit etmek için Tablo 3.1'de detayları verilen HPLC analiz metodu kullanıldı [134].

Tablo 3.1'de verilen bilgiler ışığında, 1 g Trikloroasetik asit 1 L deiyonize su içerisinde çözdürüldü. Solüsyondan 730 mL alınıp 270 mL asetronitril ile karıştırıldı (27:73, pH: 2.53). Oluşturulan solüsyon 30 dakika sonikasyon işlemi için ultrasonic su banyosuna konuldu (30 °C, 53 frekans, %90 güç) ve degaz işlemi yapılarak solüsyon içerisindeki çözünmüş hava çıkarıldı. Elde edilen solüsyonyi HPLC analiz cihazına koymadan önce, cihaz 15 dakika şartlandırıldı. Ardından örnekler 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,01 mg/ml oranlarında cihaza verilerek standart eğri elde edildi ve PLGA içerisindeki teikoplanin miktarı cihazın LC Solution yazılımı ile hesaplandı.

Tablo 3.1 Teikoplanin miktarını tespit etmek için hazırlanan HPLC analiz metodu

1. HPLC Sistemi Shimadzu UV-1800	• Pompa (LC-6AD) • UV-Vis dedektör (SPD-M20A) • Kolon fırını (FRC-10A)
2. Mobil Faz	• %0.1 Asetonitril • Trikloroasetik asit (27:73, pH = 2.53) (Bütün solüsyonler HPLC saflıktadır)
3. Referans Madde	• Teikoplanin
4. Kromatografik Şartlar	• Mobil Faz: Gradient • Akış : 1,0 ml/dk • Kolon Sıcaklığı: Oda sıcaklığı (25°C) • Enjeksiyon hacmi: 40 µl • Dalga boyu izleme : 218 nm
5. Prosedür	• Test solüsyonu: Örnekler 2 kere 0.45 µm Millipore filtreden geçirilerek HPLC analizine hazır hale getirildi.
6. Hesaplama	• Veri edinme ve ön işlemler LC Solution (Shimadzu) yazılımı ile gerçekleştirildi. Analiz örneklerindeki teikoplanin, standart pik ve örnek kromatogramındaki pikin UV spektrumu ve alıkonma zamanı eşleştirilerek belirlendi.

3.2.4.2 HPLC Analiz Yöntemi ile Etken Madde Yükleme Veriminin Hesaplanması (YV)

PLGA içerisine yüklenen teikoplanin antibiyotiği miktarını saptamak için nanopartikülün santrifüjü sonrası elde edilen üst faz kullanıldı. İlk santrifüj sonrası ve yıkama sonrası elde edilen üst fazlar toplandı ve pellet içerisine yüklenen teikoplanin antibiyotiği miktarı indirekt yöntem ile saptandı. Konsantrasyonu bilinen bir seri standart teikoplanin antibiyotiği solüsyonunun HPLC analiz cihazında UV spektrumları alındı, standart teikoplanin UV kalibrasyon eğrisi çizildi. Daha sonra yüklenmemiş teikoplanin antibiyotiği miktarını hesaplamak için, toplanan üst fazın UV spektrumu alındı ve HPLC analiz cihazı ile UV değeri ölçüldü. Etken Madde Yükleme Verimi (YV), 3.1’de verilen YV (%) formülü ile hesaplandı [135].

$$YV (\%) = \frac{\text{PLGA içindeki ilaç miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen PLGA nanaopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.4.3 HPLC Analiz Yöntemi ile Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması (EV)

Nanopartikül içerisine yüklenen teikoplanin antibiyotiği miktarını saptamak için nanopartikülün santrifüjü sonrası elde edilen üst faz kullanıldı. İlk santrifüj sonrası ve yıkama sonrası elde edilen üst fazlar toplanarak, pellet içerisine yüklenen teikoplanin antibiyotiği miktarı indirekt yöntem ile saptandı. Konsantrasyonu bilinen bir seri standart teikoplanin antibiyotiği solüsyonunun HPLC analiz cihazında UV spektrumları alındı, standart teikoplanin UV kalibrasyon eğrisi çizildi. Daha sonra yüklenmemiş teikoplanin antibiyotiği miktarını hesaplamak için, toplanan üst fazın UV spektrumu alındı ve HPLC analiz cihazı ile UV değeri ölçüldü. Enkapsülasyon Verimi (EV), 3.2'de verilen EV (%) formülü ile hesaplandı [136].

$$EV (\%) = \frac{\text{PLGA içindeki ilaç miktarı (mg)}}{\text{İlaç miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.4.4 HPLC Analiz Yöntemi ile Reaksiyon Veriminin Hesaplanması (RV)

Nanopartikül içerisine yüklenen teikoplanin antibiyotiği miktarını saptamak için nanopartikülün santrifüjü sonrası elde edilen üst faz kullanıldı. İlk santrifüj sonrası ve yıkama sonrası elde edilen üst fazlar toplanarak, pellet içerisine yüklenen teikoplanin antibiyotiği miktarı indirekt yöntem ile saptandı. Konsantrasyonu bilinen bir seri standart teikoplanin antibiyotiği solüsyonunun HPLC analiz cihazında UV spektrumları alındı, standart teikoplanin UV kalibrasyon eğrisi çizildi. Daha sonra yüklenmemiş teikoplanin antibiyotiği miktarını hesaplamak için, toplanan üst fazın UV spektrumu alındı ve HPLC analiz cihazı ile UV değeri ölçüldü. Reaksiyon Verimi (RV), 3.3'te verilen RV (%) formülü ile hesaplandı [137].

$$RV (\%) = \frac{\text{Üretilen PLGA miktarı (mg)}}{\text{PLGA + Teikoplanin miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.4.5 Yüzey Alanı Ölçümü Analizi (Brunauer-Emmett-Teller – BET Analizi)

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi kullanılarak, yüzey alanı, gözenek boyut dağılımı, mikro, mezo ve makro gözenek boyutu ölçümlerini düşük basınç ve yüksek çözünürlükte tespit eden analiz yöntemidir [138]. Analiz, YTÜ Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Numunelere, saflaştırma ve sudan arıtma işlemi için öncelikle 24 °C'de 24 sa süreyle degaz işlemi uygulandı. Ardından karakterizasyon çalışması için gerekli ölçümler yapıldı. Maddenin hangi basınçta ne kadar azot tuttuğunu gösteren

“adsorpsiyon izotermi” elde edildi. Bu veriye dayanarak BET Yüzey Alanı (Tek veya Çok Noktalı), Mikro Gözenek Boyut Dağılımı (0.5 nm – 2 nm), Mezo Gözenek Boyut Dağılımı (2 nm–50 nm), Toplam Gözenek Hacmi, Ortalama Gözenek Boyutu gibi parametreler hesaplandı.

3.2.4.6 Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü Analizi

Nanopartikül karakterizasyon çalışmalarında, partikül boyutu ve yüzey özellikleri çok önemli iki etkindir. Zeta potansiyel ölçümü, nanopartiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin nanopartiküller arası çekim gücüne bağlı olarak ölçülmesidir. Zetasizer (Malvern Instruments, UK) cihazı, nanopartiküllerin boyutu, zeta potansiyeli, molekül ağırlığı gibi parametrelerin analizinde başarılı şekilde kullanılmaktadır [139]. Üretilen teikoplanin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartiküllerin boyut analizleri ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri, dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında 25 °C’de, $\pm 0,1$ °C hassasiyeti ile gerçekleştirildi. Tüm analizler otomatik modda ve 3 tekrar ile yapıldı. Zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler kuvvetlerde M3-PALS (Faz analiz Işık Saçılması) tekniği kullanılarak yine aynı cihazda 25 °C’de $\pm 0,1$ °C hassasiyeti ile ve 3 tekrarda gerçekleştirildi.

3.2.4.7 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

SEM analizi, elektron ışınlarını numune yüzeyine odaklayarak nano ölçekli görüntüler elde edilebilen yüksek çözünürlüklü bir analiz yöntemidir. Nanopartikül karakterizasyon çalışmalarında, yüzey topografyası görüntüleme için güzel bir yöntemdir [140]. Analiz, YTÜ Merkez Laboratuvarı’ndan hizmet alımı ile gerçekleştirildi. PLGA nanopartikül örneklerinin analizi, yüksek vakum koşulları altında (3000 Pa), Zeiss (EVO LS 10) marka yüksek çözünürlüklü mikroskopta gerçekleştirildi.

3.2.4.8 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

SEM analizi gibi AFM analiz yöntemi de nanopartikül karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir diğer nanometrik görüntüleme yöntemidir. SEM analizi gibi AFM analiz yöntemi de nanopartikül karakterizasyon çalışmalarında, yüzey topografyası görüntüleme için güzel bir yöntemdir [141]. Analiz, Nanomagnetics Instruments Laboratuvarı’ndan (Ankara) hizmet alımı ile gerçekleştirildi. Analiz, Dinamik modda, 256x256 piksel çözünürlükte, hpAFM cihazında gerçekleştirildi.

3.2.4.9 Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometre (FT-IR) Analizi

FT-IR analiz yöntemi birçok işlevinin yanı sıra, yüzey karakterizasyonu çalışmalarında organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu teknik ile organik bileşiklere ait fonksiyonel grupların titreşim modları izlenmektedir [142]. PLGA nanopartiküllerinin yüzeylerinde amin bağ oluşumunu belirlemek için Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) (Perkin Elmer Frontier Spectrometer – ATR) kullanıldı. Ölçümler 3 tekrarlı olarak, 128 tarama, 4 cm^{-1} çözünürlük, 650-4000 cm^{-1} absorpsiyon aralığında gerçekleştirildi.

3.2.5 Kontrollü Salım Deneyi

Liyofilize teikoplanin yüklü PLGA nanopartiküllerinin, 5 mg tartılarak, 10 mL PBS tamponunun (pH = 7.4, %0.01 sodyum azid) içerisinde 0.5 mg/mL konsantrasyonunda salım suspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan salım suspansiyonları incubator 1000 (Heidolph) cihazında 100 rpm hızda 37 °C’de inkübe edildi. Belirlenen zaman aralıklarında (0 dk, 5 dk, 15 dk, 30 dk, 1 sa, 2 sa, 3 sa, 4 sa, 5 sa, 6 sa, 12 sa, 18 sa, 1 gün, 2 gün, 3 gün, 4 gün, 5 gün, 6 gün, 7 gün, 10 gün, 20 gün) 6000 rpm’de 20 dakika santrifuj edilerek salım suspansiyonlarının üst fazları toplandı. Toplanan üst fazların yerine PBS tampon solusyonu eklenerek salım işlemi devam ettirildi [143]. Kontrollü salım deneyi tamamlandıktan sonra salınmış ilaç miktarını belirlemek için BioTek Synergy H1 mikropilok okuyucusunda kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Oluşturulan kalibrasyon eğrisi ile zamana bağlı salım grafiğı oluşturuldu.

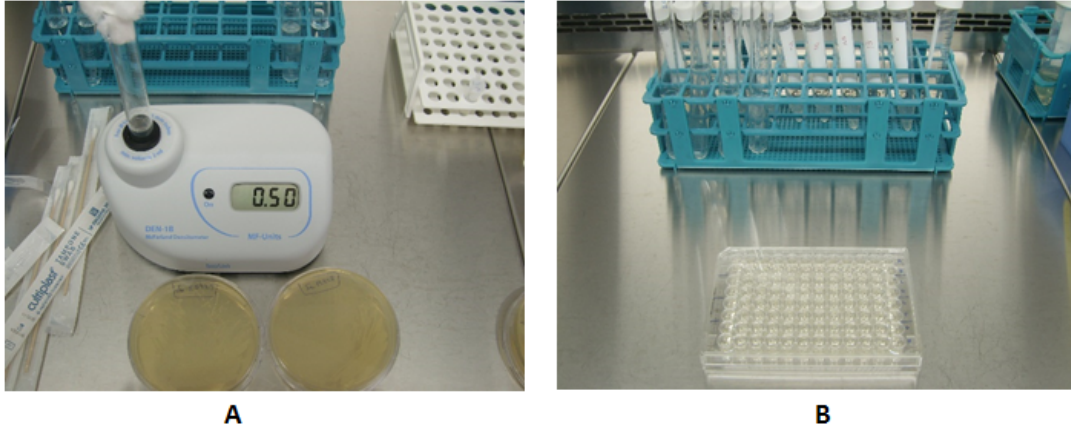
3.2.6 Antimikrobiyal Test (Brot Dilüsyon) Buyyon Dilüsyon Testi

Buyyon dilüsyon testi için bakteriler Tripton Soya Agar’da bir gece (16 sa) 37 °C’de üretildi. Bu amaçla referans suşlar *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-95), *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) kullanıldı.

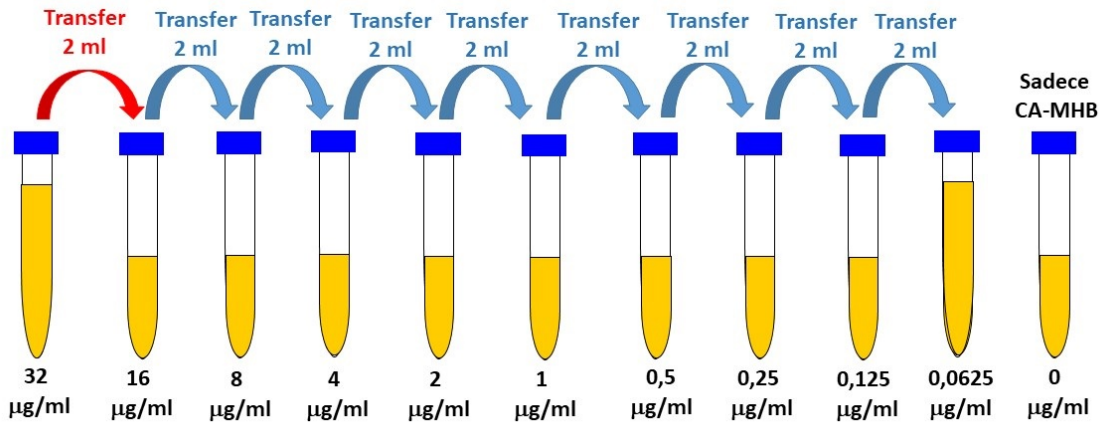
Buyyon dilüsyon testi CLSI (2018) [144] standartlarının önerdiği doğrultuda gerçekleştirildi. Şekil 3.2’de görüldüğü üzere, üretilen kültürlerden bakteri suspansiyonları 10 ml – 16x160 mm cam tüpler kullanılarak steril %0.9 (w/v) NaCl içerisinde densitometre kullanılarak McFarland 0.5’e ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) ayarlandı.

Test malzemeleri Şekil 3.3’de gösterildiğı şekilde hazırlandı ve hazırlanan 10

konsantrasyonun, Mueller Hinton II Broth Cation-adjusted (CA-MHB) kullanılarak seri dilüsyonları hazırlandı.



Şekil 3.2 A) 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu B) 10 ml – 16x160 mm cam tüpler ve 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroparka



Şekil 3.3 Teikoplanin – CA-MHB solüsyonunun farklı konsantrasyonlarda hazırlanması

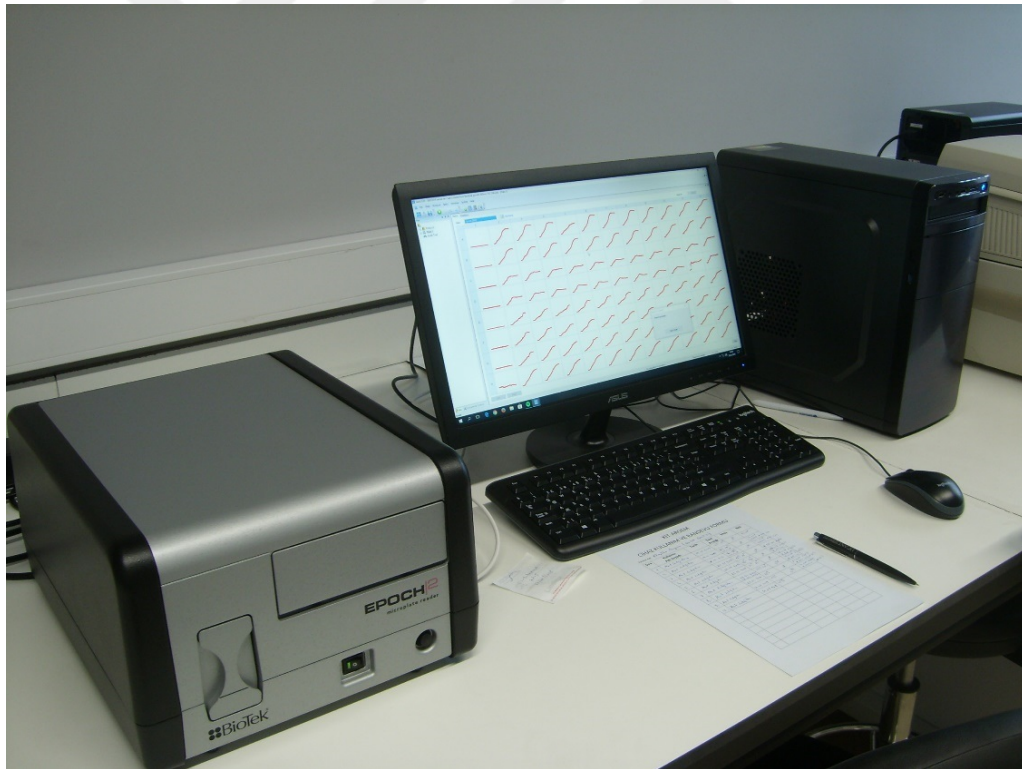
Aseptik koşullarda %0.9 (w/v) NaCl içerisinde 32 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan teikoplanin, 2 ml alınarak 2 ml CA-MHB içeren tüpe aktarıldı ve vortex ile karıştırma ardından 2 ml alınarak 2 ml CA-MHB içeren tüpe aktarıldı.

Her bir teikoplanin konsantrasyonundan 200 µl duplike olacak şekilde 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroparkaya aktarıldı. Şekil 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de referans suşların 96-kuyucuklu mikraoplakalara yerleşimi verildi. Her bir konsantrasyon üzerine 20 µl McFarland 0.5’e ayarlanmış bakteri inoküle edildi.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S. aureus (ATCC 13300)	A	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
	B	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
E. coli (ATCC 29522)	C	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
	D	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
P. aeruginosa (ATCC 27853)	E	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
	F	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC 14028)	G	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
	H	negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml

Şekil 3.8 Referans suşların 96-kuyucuklu mikropalaklara yerleşimi-5

Hazırlanan mikropalaka kapağı kapatılarak mikropalaka okuyucuya (EPOCH-2, Bio-Tek, USA) yerleştirildi (Şekil 3.9), 35 °C’de inkübe edilerek 24 sa boyunca her 15 dk da bir otomatik olarak, 600 nm’de absorbands değerleri toplandı.



Şekil 3.9 Referans suşların 35 °C’de 24 sa boyunca her 15 dk da otomatik olarak ölçümünü alan mikropalaka okuyucu

4 SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

4.1.1 Boyut Dağılımı Analizi ve Zeta Potansiyel Değerleri Sonuçları

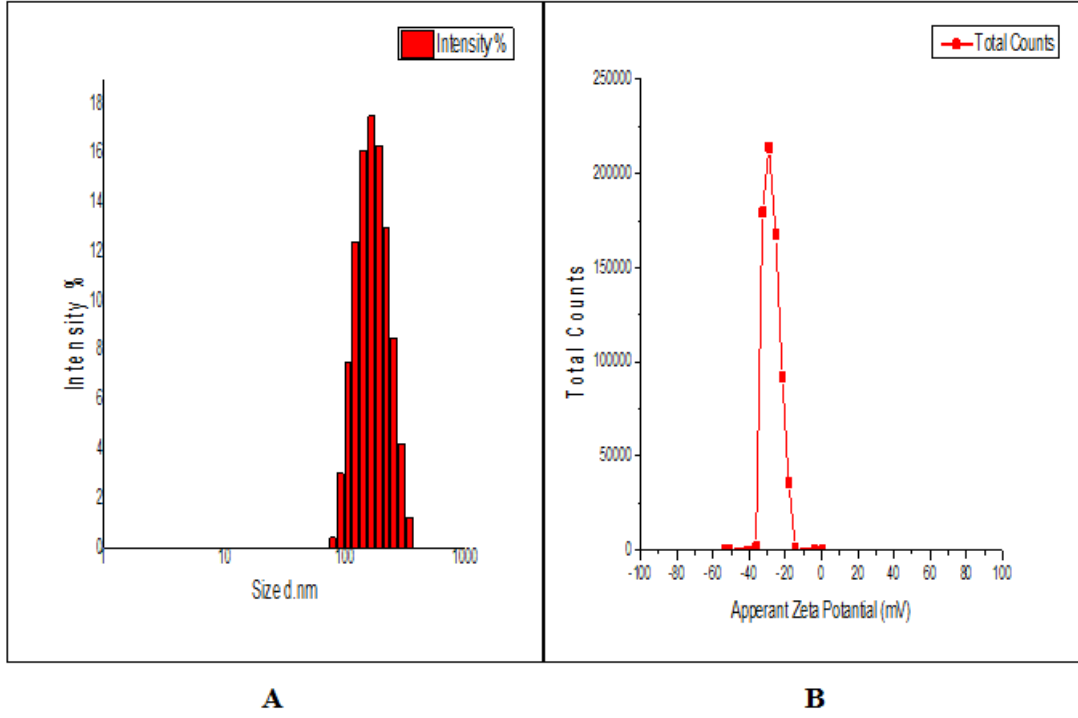
İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi uygulanarak boş PLGA nanopartiküllerin (BOS) ve teikoplanin (TP) yüklü PLGA nanopartiküllerin (FT) sentezlenmesi ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Tablo 4.1 BOS'a ait 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonucu

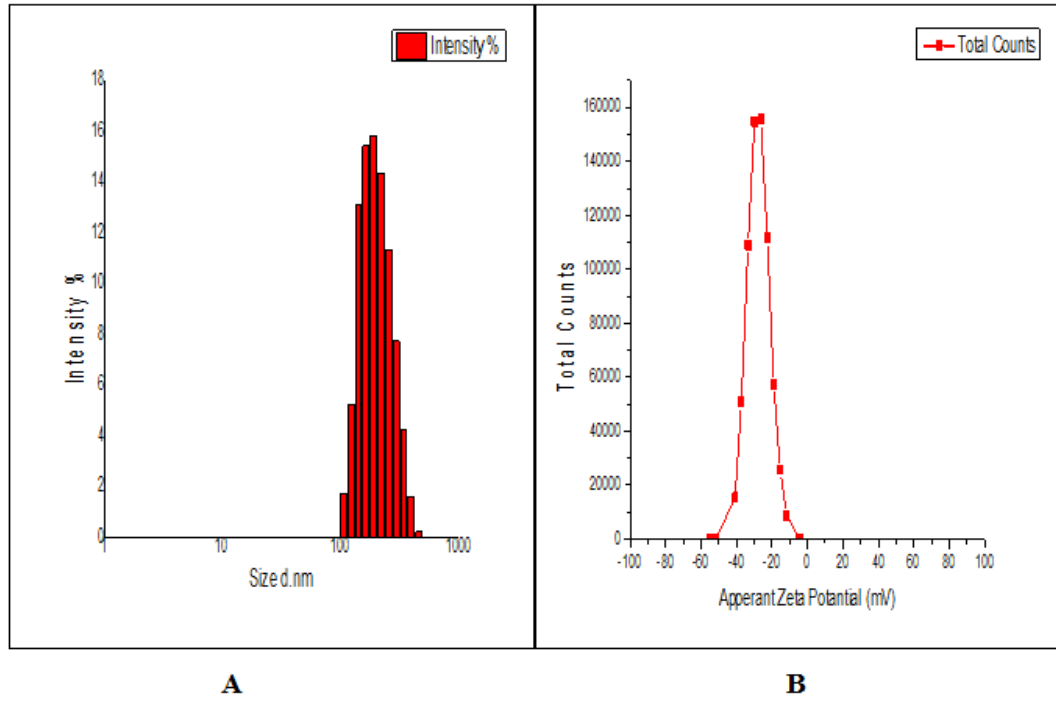
Örnek	T (°C)	(d.nm)	ZP (mV)	PdI	Elde edilen kuru np (mg)
BOS	25	226,4	-28,0	0,246	66,2
BOS	25	228,4	-28,7	0,263	66,2
BOS	25	229,3	-30,3	0,290	66,2
BOS Ortalama	25	228 ± 1,484	-29,0 ± 1,179	0,266 ± 0,022	66,2

Tablo 4.2 FT'ye ait 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonucu

Örnek	T (°C)	(d.nm)	ZP (mV)	PdI	Elde edilen kuru np (mg)
FT	25	231,8	-27,4	0,227	72,2
FT	25	224,8	-28,0	0,219	72,2
FT	25	220,8	-27,6	0,181	72,2
FT Ortalama	25	226 ± 5,568	-27,7 ± 0,306	0,209 ± 0,025	72,2



Şekil 4.1 İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan boş PLGA nanopartiküllere ait A) boyut dağılım analizi B) zeta potansiyel değerleri



Şekil 4.2 İkili emülsiyon (su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan teikoplanin yüklü nanopartiküllere ait A) boyut dağılım analizi B) zeta potansiyel değerleri

Tablo 4.1’de BOS ve 4.2’de FT’ye ait yapılan 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonuçlarına göre boş PLGA nanopartiküller için, partikül boyutu $228 \pm 1,484$ nm olarak ölçüldü. Teikoplanin yüklü nanopartiküller için $226 \pm 5,568$ nm ölçüldü. Boş nanopartikül ile içerisinde etken madde olan nanopartikül arasında partikül boyutuyla ilgili ölçümlere bakıldığı zaman, birbirine çok yakın boyutlarda oldukları görüldü. Şekil 4.1 A ve 4.2 A’da, boyut dağılım analizi sonuçlarına göre boş PLGA nanopartiküller ve teikoplanin yüklü nanopartiküllerin boyut dağılımlarının dar bir aralıkta olduğu gözlemlendi.

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri hakkında önemli bilgi sağlayan yüzey zeta potansiyel değerlerine bakıldığında, Tablo 4.1’de boş PLGA nanopartiküller için zeta potansiyel $-29,0 \pm 1,179$ mV olarak ölçüldü. Tablo 4.2’de teikoplanin yüklü nanopartiküller için $-27,7 \pm 0,306$ mV olarak ölçüldü. Boş nanopartikül ile içerisinde etken madde olan nanopartikül arasında zeta potansiyeliyle ilgili ölçümlere bakıldığı zaman, partikül boyutunda olduğu gibi birbirine çok yakın değerlerde oldukları görüldü. Şekil 4.1 B ve 4.2 B’de, zeta potansiyel değerleri sonuçlarına göre boş PLGA nanopartiküller ve teikoplanin yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin boyut dağılımları gibi dar bir aralıkta olduğu gözlemlendi.

Nanopartiküllerin Çoklu Dağılım İndeksleri (PDI) değerlerinin küçük olması, boyut dağılımlarının dar olduğunun göstergesidir. Tablo 4.1’de boş PLGA nanopartiküller için PDI değeri $0,266 \pm 0,022$ ölçüldü. Tablo 4.2’de teikoplanin yüklü nanopartiküller için PDI değeri $0,209 \pm 0,025$ olarak ölçüldü. PDI değeri açısından da, boyut ve zeta potansiyel değerlerinde olduğu gibi, boş nanopartikül ile içerisinde etken madde olan nanopartikül arasında birbirine çok yakın değerlerde oldukları görüldü.

Tablo 4.1, 4.2 ve Şekil 4.1, 4.2 dikkate alındığında, zeta potansiyeli değerlerinden, üretilen nanopartikül yüzeyinde herhangi bir kalıntı olmadığı, boyut sonuçları ve PDI değerlerinden, üretilen nanopartiküllerin boyut dağılımının dar bir aralıkta olduğu anlaşılmaktadır.

4.1.2 HPLC Analiz Yöntemi ile Enkapsülasyon Veriminin (EV) Hesaplanması

Üst fazda bulunan teikoplanin miktarını tespit etmek için HPLC analiz metodu uygulandı. HPLC analiz sonuçlarına göre enkapsülasyon verimi aşağıdaki formül ile hesaplandı. PLGA içerisine enkapsülen olan ilaç miktarı Tablo 4.4, formül (4.2), (4.3) ve (4.4) içerisinde detaylıca gösterildi. Yapılan hesaplama göre PLGA içerisine %98 oranında teikoplanin enkapsüle edildi.

$$EV (\%) = \frac{4.89 \text{ (mg)}}{5 \text{ (mg)}} \times 100 = \%98 \quad (4.1)$$

Tablo 4.3 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,01 mg/ml oranlarında ölçülen absorbans değerleri

Konsantrasyon mg/ml	Alan	Alan	Alan	Ortalama	Standart sapma (SD)
1	8803051	9136127	9432702	9123960	315001,7815
0,5	6662316	6991649	6876292	6843419	167109,3409
0,2	5414174	5332017	5308790	5351660,333	55370,04851
0,1	4758019	4933862	4944595	4878825,333	104758,8992
0,025	4581968	4785525	4701798	4689763,667	102310,7128
0,01	4490598	4524025	4637379	4550667,333	76931,95652

Teikoplaninin PLGA içerisine enkapsüle miktarı Şekil 4.3, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4 sonuçlarına göre hesaplandı. Şekil 4.3' te bulunan ($y = 4.636.005,6662x + 4.488.537,5449$) denkleme göre, FT'nin absorbans değerleri sırasıyla Tablo 4.4'teki değerler olan 5025270, 4993384, 5004281 absorbans değerleri, 4.2, 4.3 ve 4.4'teki formüllere eklendi ve Tablo 4.5'teki ortalama değer olan $0,1120 \pm 0,0035$ mg, teikoplaninin başlangıç konsantrasyonu olan 5 mg'dan çıkartılarak, teikoplaninin PLGA içerisine enkapsülasyon miktarı 4,89 mg olarak bulundu.

Tablo 4.4 FT absorbands değerleri

Absorbans Değeri	Alan	Alan	Alan	Ortalama	Standart sapma (SD)
FT	5025270	4993384	5004281	5007645	16206,99297

Tablo 4.5 Enkapsüle olmayan FT miktarları

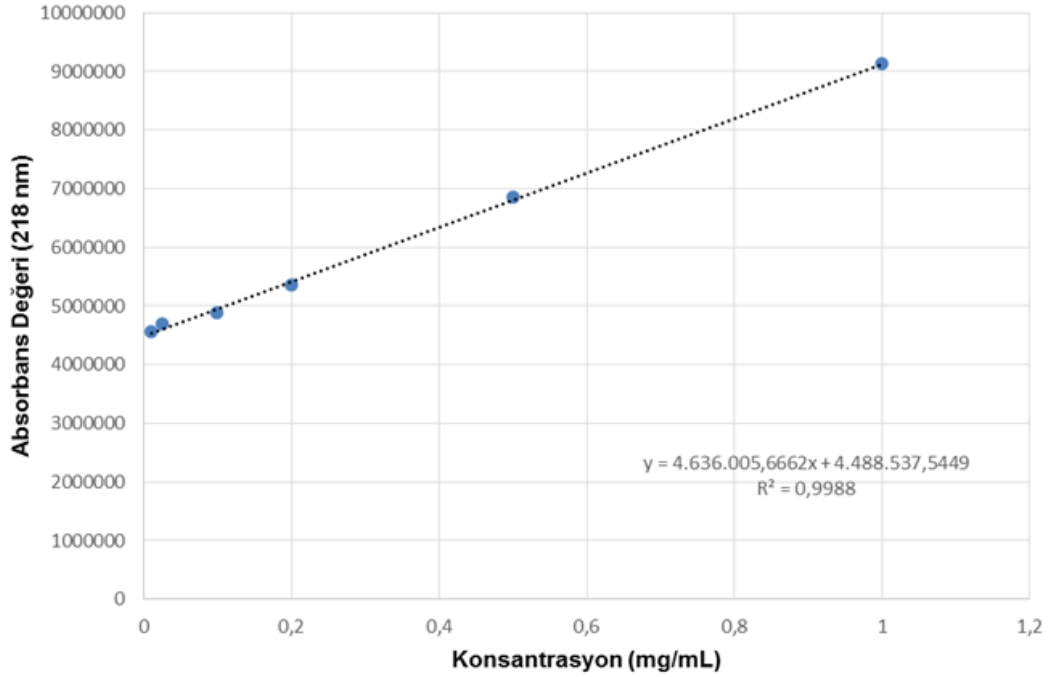
Enkapsüle Olmayan	Alan	Alan	Alan	Ortalama	Standart sapma (SD)
FT	0,1158	0,1158	0,1112	0,1120	0,0035

$$\frac{5025270 - 4488537,5449}{4636005,6662} = 0,01158 \quad (4.2)$$

$$\frac{4993384 - 4488537,5449}{4636005,6662} = 0,01089 \quad (4.3)$$

$$\frac{5004281 - 4488537,5449}{4636005,6662} = 0,01112 \quad (4.4)$$

Teikoplanin Standart Eğrisi



Şekil 4.3 Teikoplanin analitik standartları kalibrasyon eğrisi

4.1.3 Etken Madde Reaksiyon Veriminin (RV) Hesaplanması

PLGA nanopartikül üretiminin reaksiyon verimini belirlemek için elde edilen katı nanopartiküller tartıldı ve reaksiyon verimi aşağıdaki formül kullanılarak %69 olarak hesaplandı.

$$RV (\%) = \frac{72,2 \text{ (mg)}}{100 + 5 \text{ (mg)}} \times 100 = \%69 \quad (4.5)$$

4.1.4 Etken Madde Yükleme Veriminin Hesaplanması (YV) Hesaplanması

Etken madde yüklenme verimi, PLGA içerisindeki ilaç miktarının, elde edilen PLGA nanopartikül miktarına oranlanmasıyla hesaplandı. Etken madde yükleme verimine PLGA ve sentez için kullanılan PVA miktarları önemli oranda etki etmektedir. Çalışmamızda etken madde yükleme verimi %7 olarak hesaplandı.

$$YV (\%) = \frac{4.89 \text{ (mg)}}{72,2 \text{ (mg)}} \times 100 = \%7 \quad (4.6)$$

4.1.5 Yüzey Alanı Ölçümü Analizi (Brunauer-Emmett-Teller – BET Analizi) Sonuçları

BOS ve FT için, nanopartiküllerin yüzey alanı, por hacmi, por büyüklüğü gibi parametrelerin belirlenmesi amacıyla BET analizini gerçekleştirmek için, YTÜ Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı ile destek alındı. Alınan sonuçların özet verileri, Tablo 4.6'da verildi.

BET analizine göre, BOS ve FT için, BET yüzey alanı $7.9798 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $10.0573 \text{ m}^2/\text{g}$, Por hacmi $< 1.269 \text{ nm} : 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$ ve $< 1.269 \text{ nm} : 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$, Por alanı $> 216.632 \text{ nm} : 0.000 \text{ cm}^2/\text{g}$ ve $> 117.233 \text{ nm} : 0.000 \text{ cm}^2/\text{g}$ olarak ölçüldü.

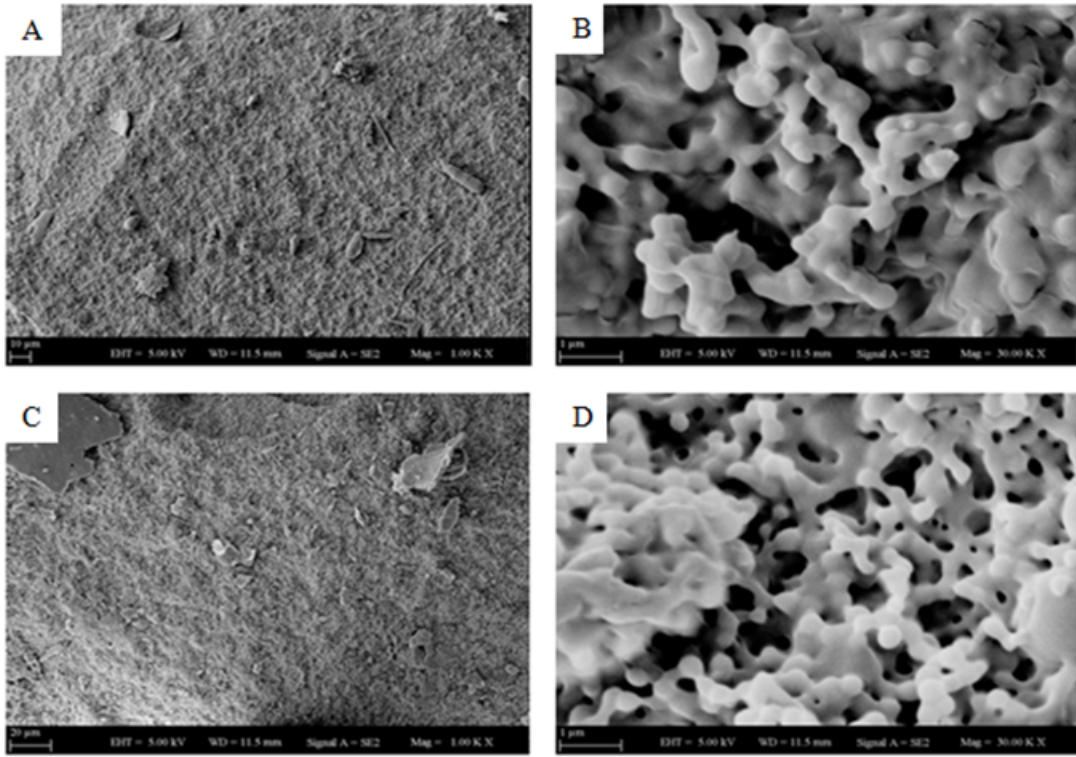
Tablo 4.6 BOS ve FT için karşılaştırmalı BET analizi özet tablosu

YÜZEY ALANI (m^2/g)	BOS	FT
BET Yüzey Alanı	7.9798	10.0573
t-Plot Mikropor Alanı	6.3524	6.3561
t-Plot Dış Yüzey Alanı	1.6274	3.7012
1.7000 nm - 300.0000 nm Çap Aralığında BJH Adsorpsiyon Kümülatif Por Alanı	7.237	9.103
1.7000 nm - 300.0000 nm Çap Aralığında BJH Desorpsiyonlu Kümülatif Por Yüzey alanı	13.0832	14.4562
POR HACMİ (cm^3/g)	BOS	FT
P / Po = 0.989220727, 179.6684 nm Çapından Küçük Gözenekli Tek Nokta Adsorpsiyon Toplam Por Hacmi	0.167947	0.184430
t-Plot Mikropor Hacmi	0.003058	0.003000
1.7000 nm - 300.0000 nm Çap Aralığında BJH Adsorpsiyon Kümülatif Por Hacmi	0.166142	0.182080
1.7000 nm - 300.0000 nm Çap Aralığında BJH Desorpsiyonlu Kümülatif Por Hacmi	0.167970	0.184362
POR BÜYÜKLÜĞÜ (nm)	BOS	FT
Adsorpsiyon Ortalama Por Genişliği Por Çapı (4V / A)	84.18649	73.35177
BJH Adsorpsiyon Ortalama Por Çapı (4V / A)	91.8245	80.0069
BJH Desorpsiyon Ortalama Por Çapı(4V / A)	51.3543	51.0123
YOĞUNLUK FONKSİYONEL TEORİSİ (DFT) POR BÜYÜKLÜĞÜ	BOS	FT
Por Hacmi	< 1.269 nm : 0.0000 cm^3/g	< 1.269 nm : 0.0000 cm^3/g
Porların Toplam Hacmi	$\leq$ 216.632 nm : 0.16554 cm^3/g	$\leq$ 117.233 nm : 0.18073 cm^3/g
Por Alanı	> 216.632 nm : 0.000 cm^2 /g	> 117.233 nm : 0.000 cm^2 /g
Porların Toplam Alanı	$\geq$ 1.269 nm : 4.399 cm^2 /g	$\geq$ 1.269 nm : 5.696 cm^2 /g

4.1.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

Yapılan Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) karakterizasyon çalışmasında, Şekil 4.4 incelendiğinde, sentezlenen nanopartiküllerin, Anwer ve meslektaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmadaki gibi [133] nano boyutlu, dar bir aralıkta boyut dağılımına sahip, pürüzsüz – küresel şekilde oldukları saptandı.

İlave olarak, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) altında 30.000 katlık büyüme elde edildiğinde, boş PLGA ve teikoplanin yüklü PLGA görüntülerinin birbirine benzer şekillerde oldukları gözlemlendi.

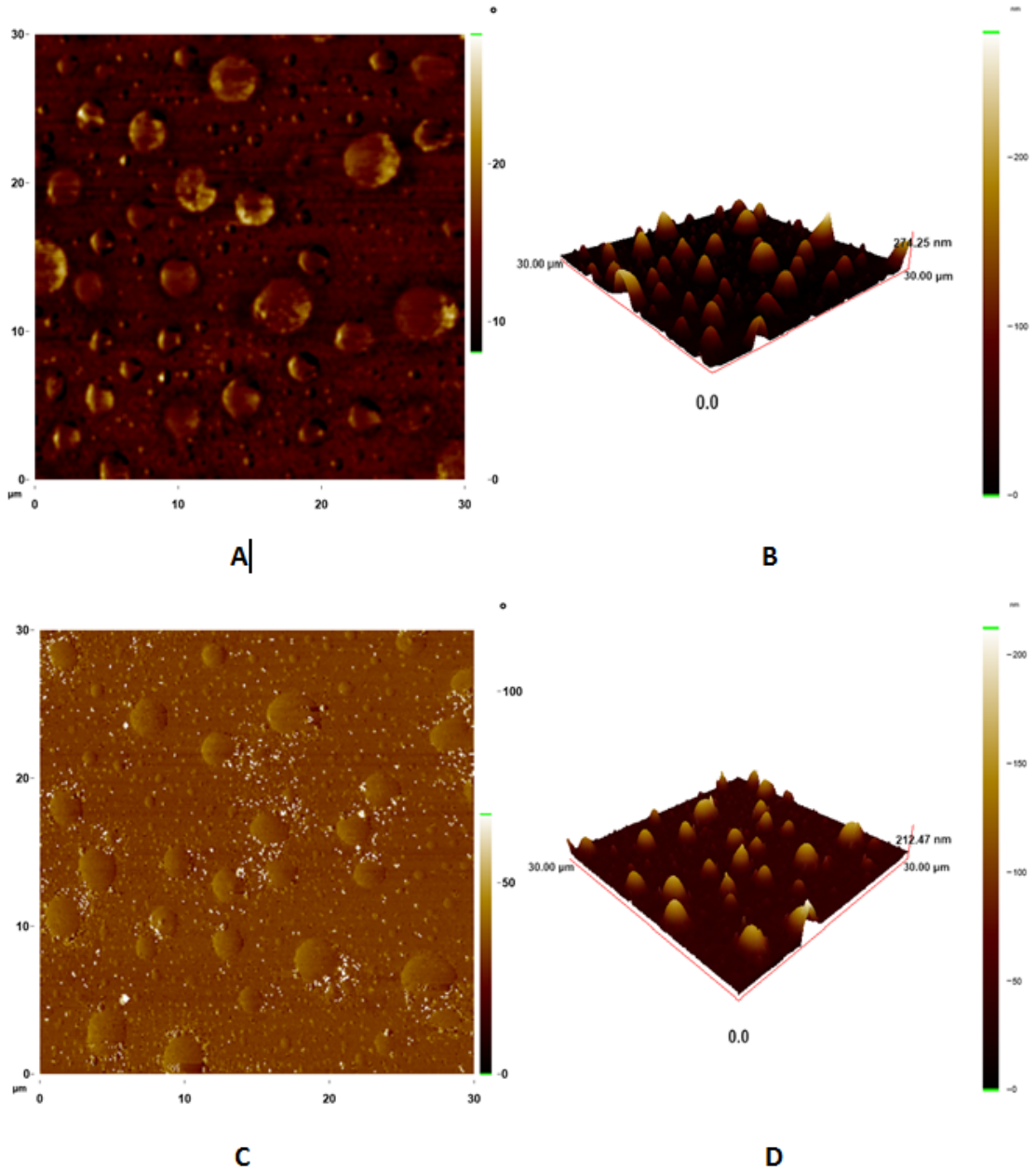


Şekil 4.4 SEM görüntüsü: A) boş PLGA 100X B) boş PLGA 30000X C) Teikoplanin yüklü PLGA 100X D) Teikoplanin yüklü PLGA 30000X

4.1.7 Atomik Güç Mikroskobu (AFM) Analizi Sonuçları

Karakterizasyon çalışmalarında güvenilirliği arttırmak adına SEM analizine ek olarak AFM analizi de gerçekleştirildi. AFM analizi ile nanopartiküllerin boyut ve yüzey morfolojileri incelendi. Şekil 4.5 incelendiği zaman, A ve B’de yer alan şekillerde boş PLGA’nın sırasıyla faz ve 3D topografi görüntüleri, C ve D’de teikoplanin yüklü PLGA’nın sırasıyla faz ve 3D topografi görüntüleri yer aldı.

AFM analizine göre, boş PLGA için boyut 30-274 nm, teikoplanin yüklü PLGA için boyut 30-212 nm ölçüldü. Boyut dağılımlarına bakacak olursak, hem boş PLGA hem de teikoplanin yüklü PLGA nanopartikülleri homojen olarak görüldü. Şekil 4.4'teki SEM görüntülerine paralel olarak, sentezlenen nanopartiküllerin nano boyutlu, dar bir aralıkta boyut dağılımına sahip, pürüzsüz – küresel şekilde oldukları saptandı.



Şekil 4.5 Atomik Güç Mikroskobu (AFM görüntüsü): A) boş PLGA faz B) boş PLGA 3D topografi C) Teikoplanin yüklü PLGA faz D) Teikoplanin yüklü PLGA 3D topografi

4.1.8 FT-IR Analizi Sonuçları

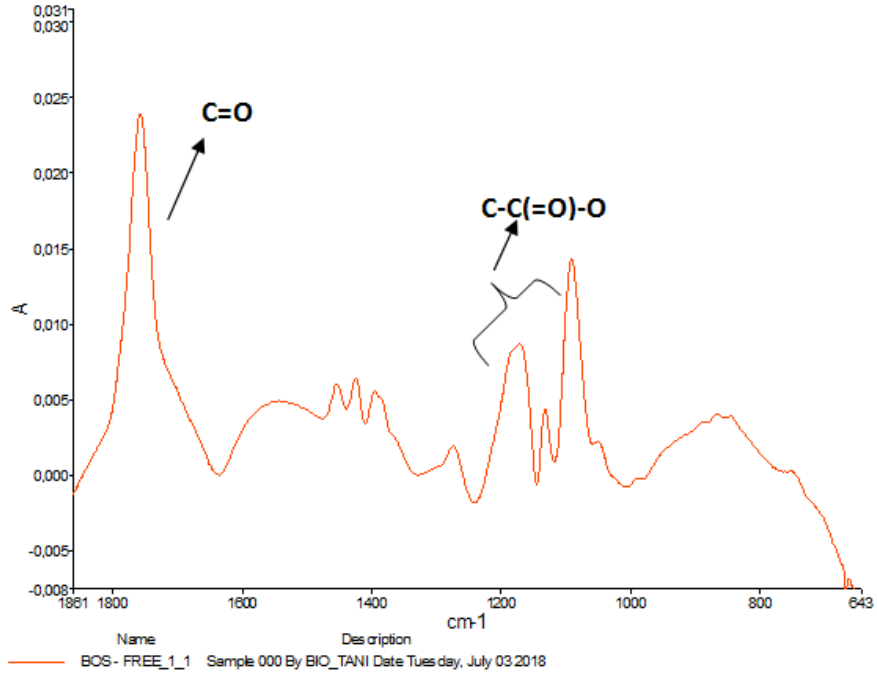
Karakterize nanopartiküller elde edildikten sonra, PLGA nanopartiküllerinin yüzeyi *S.aureus* bakterisine özgün olan aptamer ile konjuge edildi. Konjugasyonun doğru şekilde olduğunu saptamak için FT-IR analizi yapıldı. FT-IR çalışması ATR modunda 3 tekrar ile gerçekleştirildi. FT-IR çalışmasında, NHS/EDC bağlayıcısının PLGA yüzeyine bağlandığı N-H bükülme titreşimi ($1640-1550\text{ cm}^{-1}$) ile gösterildi.

5' ucu amin modifiyeli *S. aureus* aptamerini (200 mM), 5' – amin (GCGCCCTCTCACGTGGCACTCAGAGTGCCGGAAGTTCTGCGTTAT) nanopartiküllere konjuge edebilmek için nanopartiküllerin üzeri NHS ve EDC ile kaplandı. Bu sayede aptamerin nanopartiküle konjuge olacağı uygun yüzey alanı oluşturuldu. Bu işlemin ardından 25 mM amin modifiye aptamer, nanopartikül yüzeyine tutturularak, teikoplanin yüklü PLGA - aptamer biyokonjugatı elde edildi.

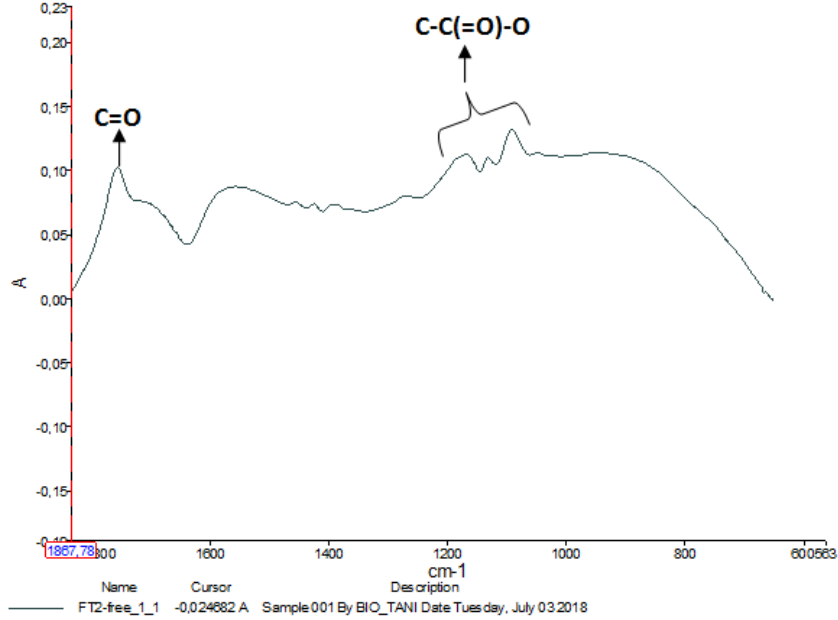
Şekil 4.6 ve 4.7 incelendiği zaman, boş PLGA ve teikoplanin yüklü PLGA nanopartiküllere ait FT-IR (ATR modunda) spektrumları, karbonil C=O gerilme titreşimi ($1820-1670\text{ cm}^{-1}$) ve asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilme titreşimleri ($1300-1000\text{ cm}^{-1}$) olarak belirlendi. Söz konusu şekillerde (Şekil 4.6 ve 4.7) NHS/EDC kaplama bulunmadığı için beklendiği üzere N-H bükülme titreşimi ($1640-1550\text{ cm}^{-1}$) görülmedi.

Şekil 4.8 ve 4.9 incelendiği zaman, Şekil 4.6 ve 4.7'ye benzer olarak karbonil C=O gerilme titreşimi ($1820-1670\text{ cm}^{-1}$) ve asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilme titreşimleri ($1300-1000\text{ cm}^{-1}$) görüldü.

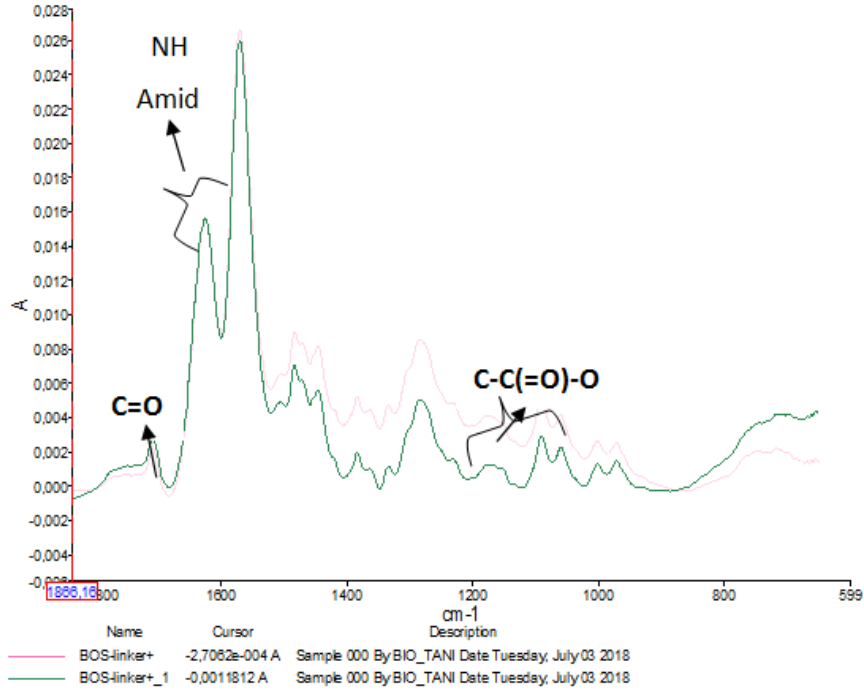
Aptamerleri PLGA yüzeyine bağlayabilmek için NHS/EDC bağlayıcısı kullanıldı. Bunun sonucunda da, Şekil 4.6 ve 4.7'den farklı olarak, Şekil 4.8 ve 4.9'da N-H bükülme titreşimi ($1640-1550\text{ cm}^{-1}$) görüldü. Görülen N-H bükülme titreşimi ($1640-1550\text{ cm}^{-1}$) ile PLGA'nın yüzeyinin NHS/EDC bağlayıcısı ile kaplandığı belirlendi.



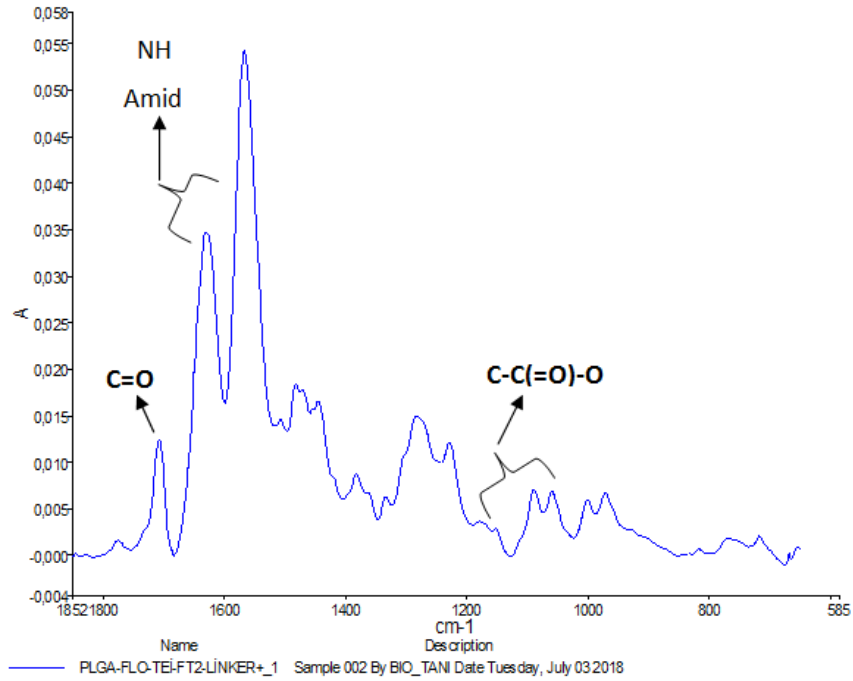
Şekil 4.6 Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, boş PLGA için FT-IR spektrumu



Şekil 4.7 Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, teikoplanin yüklü PLGA için FT-IR spektrumu



Şekil 4.8 Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, NHS ve EDC konjuge boş PLGA için FT-IR spektrumu



Şekil 4.9 Evrensel azaltılmış toplam yansıma (ATR) modunda, NHS ve EDC konjuge teikoplanin yüklü PLGA için FT-IR spektrumu

4.2 Kontrollü Salım Deneyi Sonuçları

Karakterize PLGA nanopartiküller elde edildikten sonra, antibiyotiğin ne kadar sürede salındığını öğrenmek için kontrollü salım çalışması gerçekleştirildi. Deney 20 gün olarak gerçekleştirildi.

Kontrollü salım çalışması ile teikoplanin yüklü PLGA nanopartikülleri, % 0.01 sodyum azit içeren PBS içerisinde (pH 7.4), inkübatörde 100 rpm hızda 37 °C’de inkübe edildi.

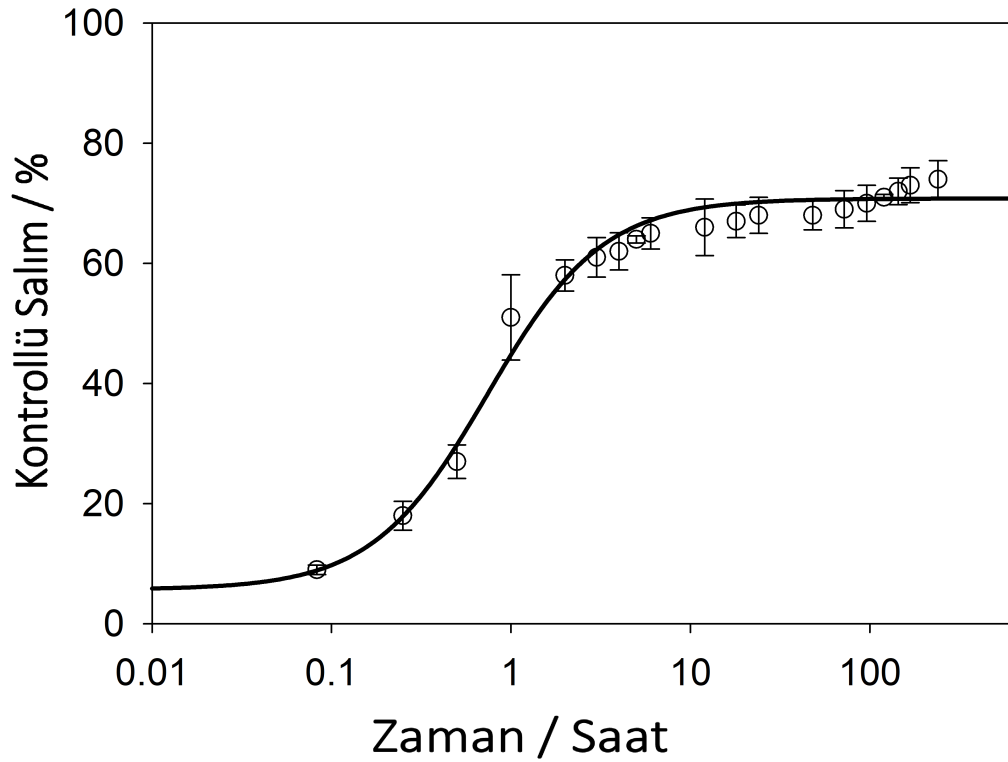
Tablo 4.7’de verilen zaman aralıklarında tüpler santrifüjlendi ve üst fazlar toplandı. Toplanan üst fazların yerine PBS tampon solusyonu eklenerek salım işlemi devam ettirildi. Kontrollü salım deneyi tamamlandıktan sonra salınmış ilaç miktarını belirlemek için örnekler analiz edildi.

Tablo 4.7 Kontrollü salım deneyi sonuçları
(Abs. : Absorbans, ORT: Ortalama, SD: Standart sapma, % : Yüzde)

Zaman	Abs. (460-515nm)	Abs. (460-515nm)	Abs. (460-515nm)	ORT	SD	%
Saf	0,1566	0,1603	0,1482	0,1550	0,0062	100
0 dk	0,0112	0,0117	0,0110	0,0113	0,0004	7
5 dk	0,0137	0,0142	0,0126	0,0135	0,0008	9
15 dk	0,0295	0,0250	0,0288	0,0278	0,0024	18
30 dk	0,0335	0,0342	0,0327	0,0335	0,0008	22
1 sa	0,0862	0,0778	0,0920	0,0853	0,0071	55
2 sa	0,0895	0,0936	0,0888	0,0906	0,0026	58
3 sa	0,0925	0,0933	0,0985	0,0948	0,0033	61
4 sa	0,0943	0,0948	0,0999	0,0963	0,0031	62
5 sa	0,0987	0,0996	0,0998	0,0994	0,0006	64
6 sa	0,0993	0,1032	0,0983	0,1003	0,0026	65
12 sa	0,1031	0,1053	0,0963	0,1016	0,0047	66
18 sa	0,1042	0,1053	0,1040	0,1045	0,0007	67
1 gün	0,1058	0,1080	0,1020	0,1053	0,0030	68
2 gün	0,1070	0,1033	0,1078	0,1060	0,0024	68
3 gün	0,1085	0,1103	0,1043	0,1077	0,0031	69
4 gün	0,1088	0,1112	0,1052	0,1084	0,0030	70
5 gün	0,1093	0,1102	0,1095	0,1097	0,0005	71
6 gün	0,1099	0,1113	0,1142	0,1118	0,0022	72
7 gün	0,1107	0,1120	0,1163	0,1130	0,0029	73
10 gün	0,1135	0,1164	0,1196	0,1165	0,0031	75
20 gün	0,1219	0,1230	0,1270	0,1240	0,0027	80

Kontrollü salım deneyi tamamlanıp tablo 4.7'deki verilerin toplanmasının ardından, Şekil 4.10' daki grafik elde edildi. Şekil 4.10' daki grafik incelendiği zaman, PLGA nanopartikülünün ilk 1 sa içinde enkapsüle ettiği teikoplaninin %55'ini ortama bıraktığı belirlendi.

Yapılan kontrollü salım çalışmasında, PLGA' nın ilk 1 sa içinde gerçekleştirdiği salımın oldukça hızlı olduğu, 1 sa dan sonra 20 güne kadar belirlenen zaman aralıklarında kademeli olarak yavaş bir salım gerçekleştirdiği belirlendi. İlave olarak, 20. gün sonunda analiz sonucu PLGA'nın enkapsüle ettiği teikoplaninin %80'ini ortama bıraktığı görüldü. PLGA nanopartiküllerinin enkapsüle ettiği etken maddeyi ortama uzun bir zaman aralığında saldığı için, PLGA nanopartiküllerin hedefe yönelik ilaç çalışmalarında kullanılabilirliği yüksek olduğu belirlendi.



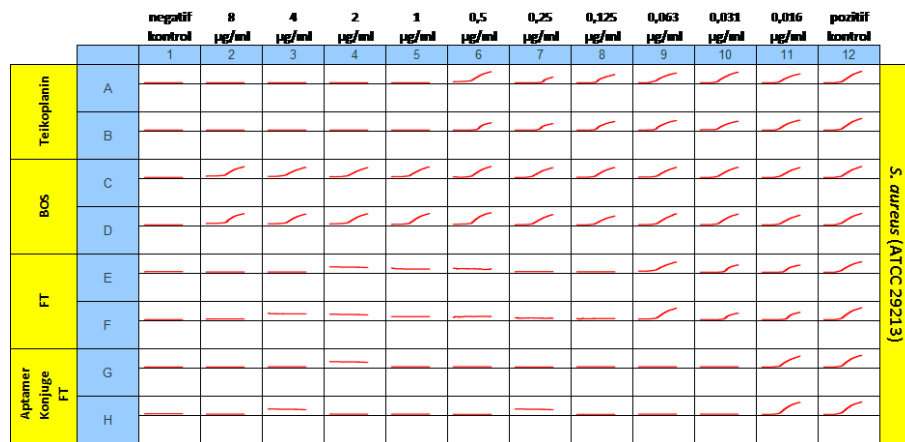
Şekil 4.10 Kontrollü salım grafiği

4.3 Antimikrobiyal Test Sonuçları

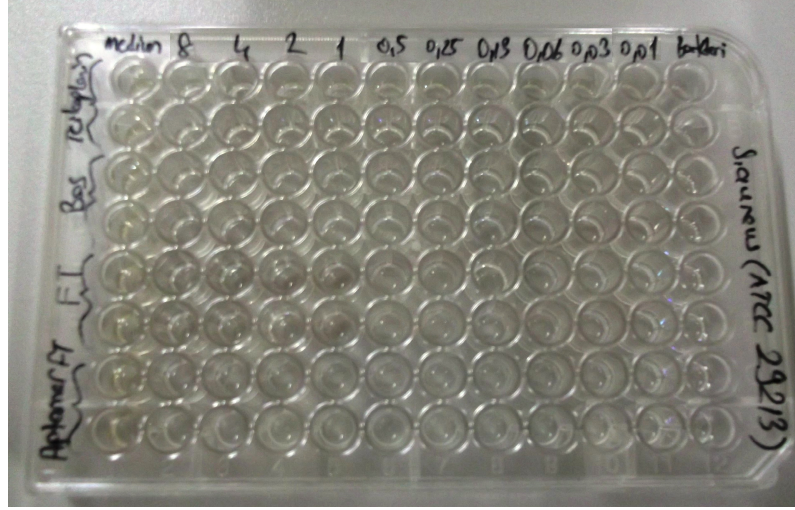
Antimikrobiyal test olan Buyyon Dilüsyon (Brot Dilüsyon) testi uygulanarak, boş PLGA, saf teikoplanin , PLGA yüklü teikoplanin ve teikoplanin yüklü aptamer konjuge PLGA nanopartiküllerin referans suşlar üzerindeki etkinlikleri incelendi. Her bir konsantrasyon üzerine 0.5 McFarland, 20 μ l bakteri inoküle edilen referans suşların, 35 °C’de inkübe edilerek 24 sa boyunca her 15 dk da bir otomatik olarak, 600 nm’de absorbands değerleri toplandı.

Çalışmada *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 43300), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-95), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) referans suşları kullanıldı.

Şekil 4.11’de görüldüğü üzere, *S.aureus* (ATCC 29213) suşu sadece teikoplanin ile muamele edildiği zaman, CLSI (2018) [145] standartlarında belirtildiği gibi 1 μ g/ml’de inhibe olduğu görüldü. Antibiyotik içermeyen boş PLGA ile muamele edildiği zaman her hangi bir inhibisyon görülmedi. Aptamer konjuge olmayan teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, 0.125 μ g/ml’de inhibe olduğu görüldü. Aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, en yüksek etkiyi göstererek 0.031 μ g/ml’de inhibe olduğu görüldü. Şekil 4.11 irdelendiğinde, *S.aureus* (ATCC 29213) suşu için aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, saf teikoplanine göre MİK değerinde 32 katlık düşüş gözlemlendi.

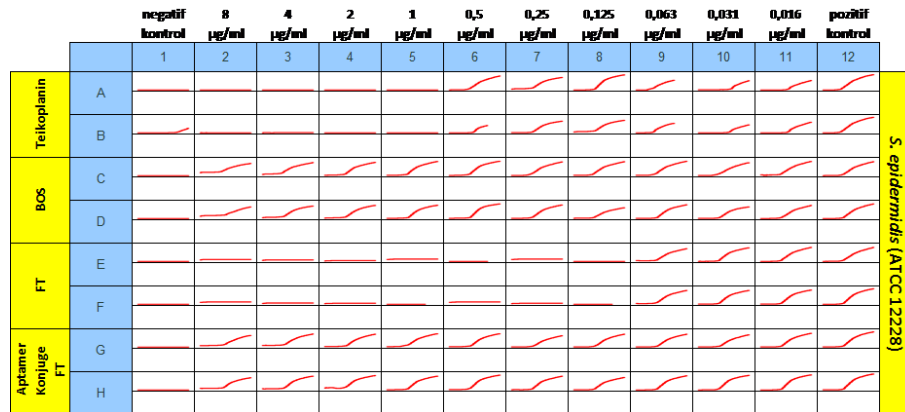


Şekil 4.11 Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin *S.aureus* (ATCC 29213) üzerine etkisi



Şekil 4.12 Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin *S.aureus* (ATCC 29213) üzerine etkisi - mikropilaka resmi

Şekil 4.13'te görüldüğü üzere, *S.epidermidis* (ATCC 12228) suşu sadece teikoplanin ile muamele edildiği zaman, 1 $\mu\text{g/ml}$ 'de inhibe olduğu görüldü. Antibiyotik içermeyen boş PLGA ile muamele edildiği zaman her hangi bir inhibisyon görülmeydi. Aptamer konjuge olmayan teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 'de inhibe olduğu görüldü. Aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, her hangi bir inhibisyon görülmeydi. Şekil 4.13 irdelendiğinde, *S.epidermidis* (ATCC 12228) suşu için aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* spesifik aptamer kullanıldığı için aptamerin hedefe bağlanmadığı ve teikoplanin salımına izin vermediği belirlendi. Bu nedenle *S.epidermidis* suşunda inhibisyon görüldü.



Şekil 4.13 Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin *S.epidermidis* (ATCC 12228) üzerine etkisi

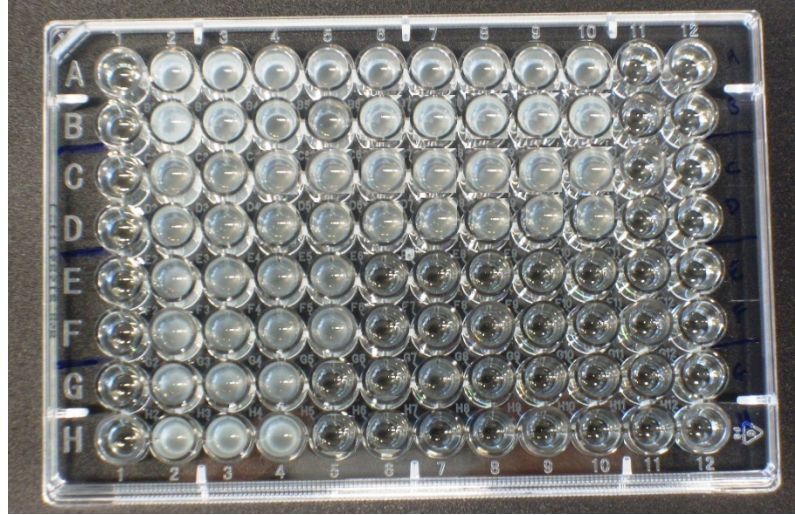


Şekil 4.14 Teikoplanin, BOS, FT ve aptamer konjuge FT'nin *S.epidermidis* (ATCC 12228) üzerine etkisi - mikrolaka resmi

Şekil 4.15'te görüldüğü üzere, *S.aureus* (ATCC 43300) ve *S.aureus* (ATCC 25923) suşlarına sadece teikoplanin ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* (ATCC 43300) suşunun 2 $\mu\text{g/ml}$ 'de, *S.aureus* (ATCC 25923) suşunun 1 $\mu\text{g/ml}$ 'de inhibe oldukları görüldü. *S.aureus* (ATCC 43300) ve *S.aureus* (ATCC 25923) suşlarına aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* (ATCC 43300) suşunun 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ 'de ve *S.aureus* (ATCC 25923) suşunun 0,031 $\mu\text{g/ml}$ 'de inhibe oldukları görüldü. Yapılan çalışmada, saf teikoplanine karşı aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın uygulandığı referans suşlarda, MİK değerlerinin *S.aureus*(ATCC 43300) ve *S.aureus* (ATCC 25923) suşlarında 32 kat daha düşük olduğu görüldü.

		negatif kontrol	0 $\mu\text{g/ml}$	0,0075 $\mu\text{g/ml}$	0,015 $\mu\text{g/ml}$	0,031 $\mu\text{g/ml}$	0,062 $\mu\text{g/ml}$	0,125 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	
Teikoplanin	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>S. aureus</i> ATCC 43300
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Aptamer Konjuge Teikoplanin Yüklü PLGA	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>S. aureus</i> ATCC 43300
	F	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	G	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
	H	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Şekil 4.15 Teikoplanin ve aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın *S.aureus* (ATCC 43300 ve ATCC 25923) üzerine etkisi

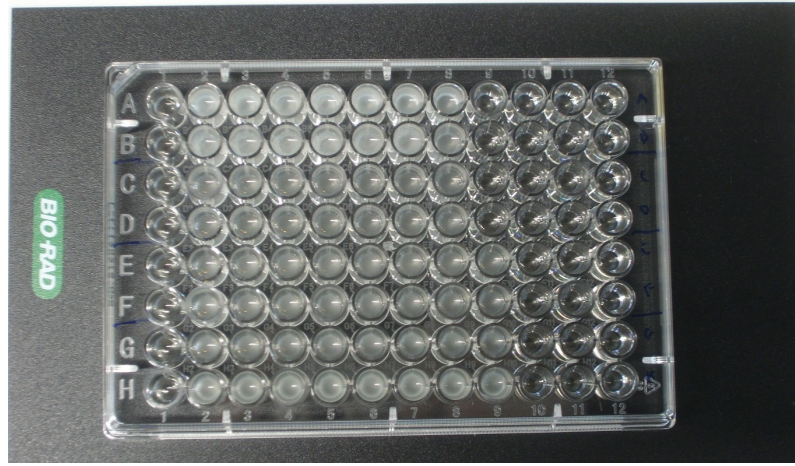


Şekil 4.16 Teikoplanin ve aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın *S.aureus* (ATCC 43300 ve ATCC 25923) üzerine etkisi - mikropilaka resmi

Şekil 4.17'de görüldüğü üzere, *S.aureus* (ATCC 25923), *S.aureus* (ATCC 43300), kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-13) ve kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-95) suşlarına sadece teikoplanin ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* (ATCC 25923) suşunun 1 $\mu\text{g/ml}$ 'de, *S.aureus* (ATCC 43300) suşunun 2 $\mu\text{g/ml}$ 'de, kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-13) ve kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-95) suşlarının 8 $\mu\text{g/ml}$ 'de inhibe oldukları görüldü. İlave olarak, *S.aureus* (ATCC 25923), *S.aureus* (ATCC 43300) referans suşları için, Şekil 4.15 ile aynı MİK değerleri elde edildi.

		negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 $\mu\text{g/ml}$	0,125 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S. aureus (ATCC 25923)	A												
	B												
S. aureus (ATCC 43300)	C												
	D												
S. aureus (EGE-KK-13)	E												
	F												
S. aureus (EGE-KK-95)	G												
	H												

Şekil 4.17 Teikoplaninin *S.aureus*'un farklı suşları üzerine etkisi

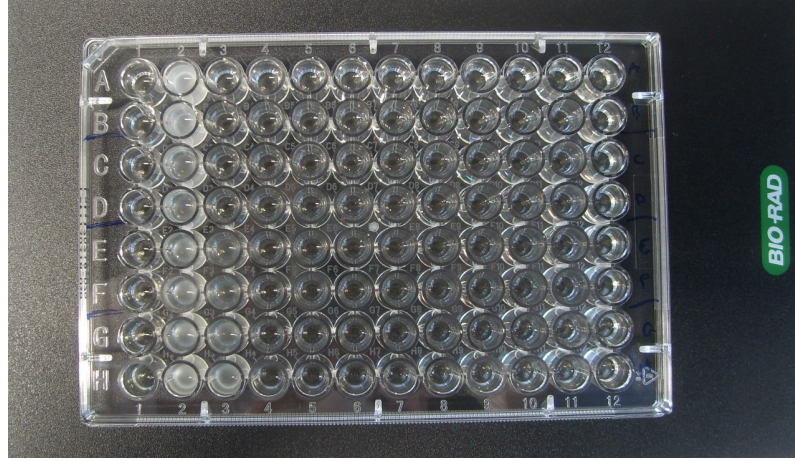


Şekil 4.18 Teikoplaninin *S.aureus*'un farklı suşları üzerine etkisi - mikropilaka resmi

Şekil 4.19'da görüldüğü üzere, *S.aureus* (ATCC 25923), *S.aureus* (ATCC 43300), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-13) ve kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-95) suşlarına aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* (ATCC 25923) ve *S.aureus* (ATCC 43300) suşlarının 0,0625 µg/ml'nin altında bir MİK değerinde (Şekil 4.15'te aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* (ATCC 25923) suşunun MİK değeri 0,031 µg/ml ve *S.aureus* (ATCC 43300) suşunun MİK değeri 0,0625 µg/ml olarak bulundu) oldukları görüldü. Kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-13) ve kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-95) suşlarına aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA uygulandığı zaman 0,125 µg/ml'de inhibe oldukları görüldü.

		negatif kontrol	pozitif kontrol	0,0625 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	A												
	B												
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	C												
	D												
<i>S. aureus</i> (EGE-KK-13)	E												
	F												
<i>S. aureus</i> (EGE-KK-95)	G												
	H												

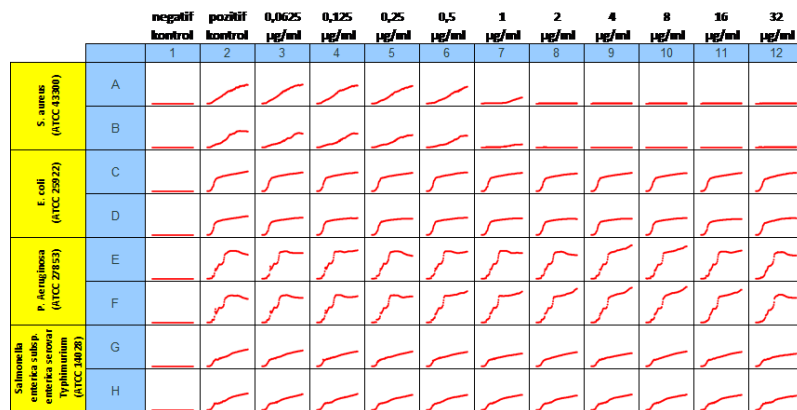
Şekil 4.19 Aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın *S.aureus*'un farklı suşları üzerine etkisi



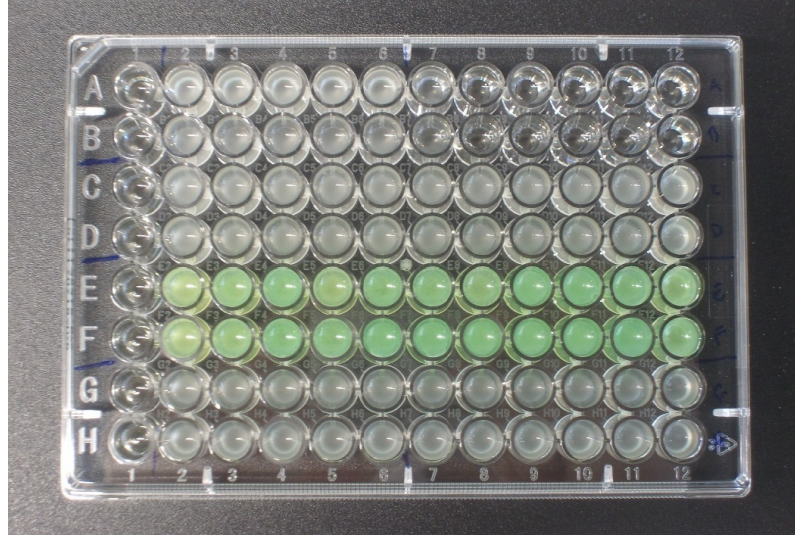
Şekil 4.20 Aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın *S.aureus*'un farklı suşları üzerine etkisi - mikropilaka resmi

Şekil 4.17 ve 4.19 karşılaştırıldığı zaman, aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın uygulandığı referans suşlarda, MİK değerlerinin kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-13) ve kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) (klinik suş) (EGE-KK-95) suşlarında 64 kat daha düşük olduğu görüldü.

Şekil 4.21'de, *S.aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) suşlarına teikoplanin ile muamele edildiği zaman, beklendiği üzere sadece *S.aureus* (ATCC 43300) suşunda 2 µg/ml MİK değerinde inhibisyon görüldü. *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) suşları Gram (-) olduklarından dolayı inhibisyon görülmedi. Bu suşlar çalışmada negatif kontrol olarak kullanıldı. Yapılan tekrarlı deneyler sonucunda, Şekil 4.21'de de *S.aureus* (ATCC 43300) referans suşu için, Şekil 4.15 ile 4.17'de aynı MİK değerleri (2 µg/ml) elde edildi.

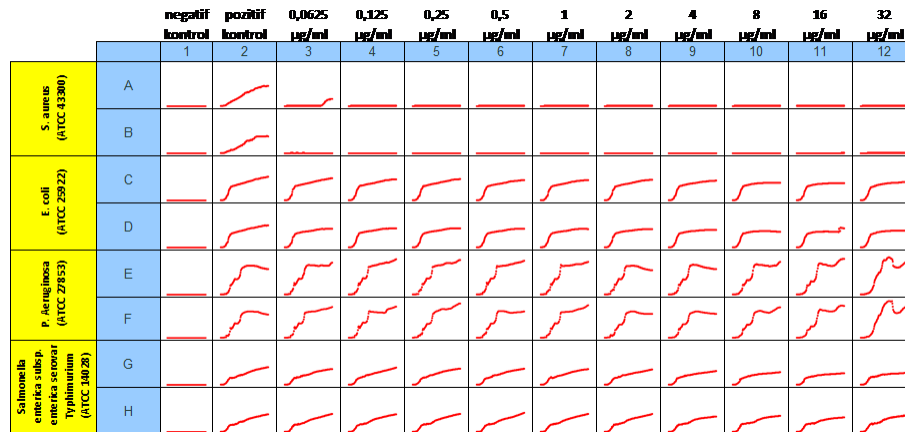


Şekil 4.21 Teikoplaninin farklı referans suşlar üzerine etkisi

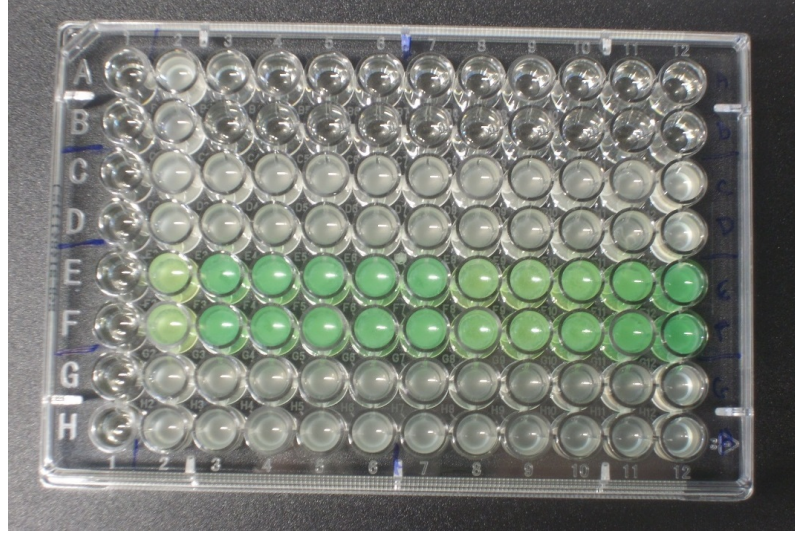


Şekil 4.22 Teikoplaninin farklı referans suşlar üzerine etkisi - mikropilaka resmi

Şekil 4.23'te, *S.aureus* (ATCC 43300), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) suşlarına aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, *S.aureus* (ATCC 43300) suşunda, MİK değeri Şekil 4.15 ve Şekil 4.19 ile aynı olarak 32 kat daha düşük ($0,0625\mu\text{g/ml}$) olduğu görüldü. İlave olarak, çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) suşlarına aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA ile muamele edildiği zaman, beklendiği üzere inhibisyon görülmeydi.



Şekil 4.23 Aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın farklı referans suşlar üzerine etkisi



Şekil 4.24 Aptamer konjuge tekoplanin yüklü PLGA'nın farklı referans suşlar üzerine etkisi - mikroparka resmi

4.4 Tartışma

Son yıllarda hızlanarak devam eden dirençli bakteri oluşumu nedeniyle düşünülen ilk aşama tedbirler, kullanılan antibiyotiklerin etkilerinin arttırılması ve kullanım dozlarının düşürülmesi yönündedir. Bu düşüncüyü temel alarak başlanılan tez çalışmasında gelecek için umut veren sonuçlar elde edildi.

Çalışmanın ilk ayağını PLGA nanopartiküllerin karakterizasyonu çalışmaları oluşturdu. Karakterizasyon çalışmalarında partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi, BET analizi, SEM analizi, AFM analizi ve FT-IR analizi gerçekleştirildi. Karakterizasyon çalışmalarından zeta potansiyel ölçümü analizi, SEM analizi, AFM analizi sonuçlarına göre BOS ve FT için partikül büyüklüğü, yüzey morfolojileri ve zeta potansiyellerinin birbirlerine yakın değerler olduğu saptandı.

BOS ve FT'ye ait yapılan 3 tekrarlı partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonuçlarına göre BOS için, partikül boyutu $228 \pm 1,484$ nm, FT için $226 \pm 5,568$ nm ölçüldü. BOS için zeta potansiyel $-29,0 \pm 1,179$ mV, FT için $-27,7 \pm 0,306$ mV olarak ölçüldü. BOS için PDI değeri $0,266 \pm 0,022$, FT için PDI değeri $0,209 \pm 0,025$ olarak ölçüldü. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi doğrultusunda, enkapsülasyon verimi (EV) %98, etken madde reaksiyon verimi (RV) %69 ve etken madde yükleme verimi (YV) %7 olarak ölçüldü.

2018 yılında Arasoğlu ve meslektaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada [146] etken maddenin yapısından kaynaklı, çalışmamızdan farklı olarak tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi kullanılmıştır. Partikül boyutu 206.2 ± 1.2 nm, zeta potansiyel -19.8 ± 2.5 mV, PDI değeri 0.064 ± 0.02 olarak rapor edilmiştir. İlave

olarak çalışmada enkapsülasyon verimi 87.2 ± 2.5 ve etken madde reaksiyon verimi 53.3 ± 1.8 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız karşılaştırıldığı zaman benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Zeta potansiyel ve PDI değerlerindeki küçük farklılıklar, yapılan çalışmanın, bizim çalışmamıza oranla nanopartiküllerin daha düzenli ve stabil yapıda olduğunu göstermektedir. Ancak çalışmamızda elde edilen enkapsülasyon verimi ve etken madde reaksiyon veriminin, yapılan çalışmaya göre daha yüksek oranlarda olduğu görülmektedir. Gaspar ve meslektaşlarının 2018 yılında gerçekleştirdiği çalışmada [147], bizim de çalışmamızda kullandığımız yöntem olan ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Boş PLGA partikül boyutu 263.5 ± 2.6 nm, vankomisin yüklü PLGA boyutu 239.3 ± 1.53 nm, PDI değerleri 0.1 olarak bulunmuştur. Bulunan PDI değeri ile çalışmada elde edilen nanopartiküllerin, bizim de çalışmamızda belirttiğimiz gibi monodispers olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmada boş nanopartikül boyutu ile antibiyotik yüklü nanopartikül boyutunun birbirine yakın olmasıyla çalışmamızla benzer sonuçlar içermektedir. Ek olarak yapılan çalışmada enkapsülasyon verimi %90.2 olarak rapor edilmiştir. Bu oran çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek oranla paralellik göstermektedir.

BET analizi verilerine göre, BOS için yüzey alanı $7.9798 \text{ m}^2/\text{g}$, ortalama por çapı 91.8245 nm ve por hacmi $< 1.269 \text{ nm} : 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$, FT için yüzey alanı $10.0573 \text{ m}^2/\text{g}$, ortalama por çapı 80.0069 nm ve por hacmi $< 1.269 \text{ nm} : 0.0000 \text{ cm}^3/\text{g}$ olarak ölçüldü.

2012 yılında Tang ve meslektaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada [148], kalsiyum fosfat entegre PLGA nanopartiküllerini 207 ± 5 nm boyutta sentezledikleri bildirilmiştir. Gen transfer vektörü olarak adlandırdıkları nanopartiküllerin yüzey alanı $57.5 \text{ m}^2/\text{g}$ bulunmuştur. Bulunan bu değer bizim çalışmamızda bulduğumuz değerden yaklaşık 5,5 kat daha fazladır. Partikül boyutunun küçüldükçe yüzey alanının arttığı ve yüzey alanının büyüklüğünün etken madde salımı ve yüklemesinde avantaj sağladığı düşünülürse [149], bu durum ilaç taşıma sistemleri için önemli bir etken olacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmada çalışmamızdan farklı olarak yüzey alanının daha büyük çıkmasının olası nedeninin, PLGA üzerine kalsiyum entegrasyonu olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

SEM ve AFM analizleri ile nanopartiküllerin boyut ve yüzey morfolojileri incelendi. Çalışmada SEM ve AFM analizi sonuçları beklendiği üzere benzer çıktı. AFM analizine göre, BOS için boyut 30-274 nm, FT boyut 30-212 nm ölçüldü. Bu sonuçlar partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi sonuçları ile de uygunluk gösterdi. SEM ve AFM analizleri sonuçlarına göre, sentezlenen nanopartiküllerin nano boyutlu, dar bir aralıkta boyut dağılımına sahip, pürüzsüz – küresel şekilde oldukları saptandı.

2006 yılında Dorati ve meslektaşları [150] tarafından, PLGA yüzey karakterizasyonu üzerinden SEM ve AFM analizleri kullanarak karşılaştırmalı bir çalışma yapılmış ve sentezlenen nanopartiküllerin bizim çalışmamızla uyumlu olarak nano boyutlu, dar bir aralıkta boyut dağılımına sahip, pürüzsüz – küresel şekilde olduklarını gösterilmiştir. Ayrıca SEM ve AFM analizleri karşılaştırıldığında, AFM analizinin yüzey morfolojisinde ekstra bilgiler verdiği belirtilmiştir. Benzer olarak 2016 yılında Sun ve meslektaşları [151], kuersetin yüklü PLGA nanopartikülleri için karakterizasyon çalışmasında SEM ve AFM analizleri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda çalışmamızla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

BOS ve FT'ye ait FT-IR (ATR modunda) spektrumları, karbonil C=O gerilme titreşimi ($1820\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$) ve asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilme titreşimleri ($1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) olarak belirlendi.

PLGA'nın yüzeyinin NHS/EDC bağlayıcısı ile kaplandığı zaman, benzer olarak karbonil C=O gerilme titreşimi ($1820\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$) ve asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilme titreşimlerinin ($1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) yanı sıra N-H bükülme titreşimi ($1640\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$) görüldü. Bu sonuç, nanopartiküllerin yüzeyinin başarılı bir şekilde NHS/EDC bağlayıcısı ile kaplandığını göstermektedir.

Kumar ve meslektaşlarının 2014 [152] ve 2016 [153] yıllarında gerçekleştirdiği çalışmalarda bizim çalışmamıza benzer olarak PLGA'nın yüzeyinin NHS/EDC bağlayıcısı ile kaplandığı ($1650\text{ - }1530\text{ cm}^{-1}$) gösterilmiştir. Bu reaksiyonun bir sonucu olarak kararlı bir amid bağı oluştuğu bildirilmiştir.

Yapılan kontrollü salım çalışmasında, PLGA'nın PBS içinde başlangıçtaki patlama etkisini takiben ilk 1 saat içinde gerçekleştirdiği salımın (%55) oldukça hızlı olduğu, 1 saatten sonra 20 güne kadar (%80) belirlenen zaman aralıklarında kademeli olarak yavaş bir salım gerçekleştirdiği belirlendi.

Kashi ve meslektaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdiği çalışmada [154], çeşitli sentezleme yöntemleriyle yaptıkları çalışmada, kontrollü salım için, PLGA içine yüklenen minosiklin antibiyotikinin, PBS içinde başlangıçtaki patlama etkisini takiben, bizim çalışmamızla uygun olarak yüksek miktarda etken maddenin salımının gerçekleştiği belirlenmiştir. Devam eden zamanda ise çalışmamızdaki bulgularımızla benzer olarak, salım 5 günden fazla olacak şekilde kontrollü ve yavaş bir şekilde gerçekleşmiştir. Ek olarak yapılan çalışmada salım hızının, nanopartikül hazırlama yöntemi, nanopartikül yapısı, molekül ağırlığı, parçacık büyüklüğü ve polimer bileşimi gibi etkenlere bağlı olarak değişim gösterdiğini belirtilmiştir. Zakeri-Milani ve meslektaşlarının 2013 yılında gerçekleştirdiği çalışmada [155], bizim çalışmamıza uygun olarak ilk yarım saatte hızlı bir salım gerçekleştirdiği görülmüştür. Ancak

çalışmamızın aksine, bu salım ilk yarım saatte %96 ile çok hızlı gerçekleşmiş olup, kalan miktarın salımı ise 6-8 saat arası yavaş şekilde gerçekleştiği bildirilmiştir. Ungaro ve meslektaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışma [156], Zakeri-Milani ve meslektaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmanın aksine, bizim çalışmamıza benzer olarak 30 güne kadar belirlenen zaman aralıklarında kademeli olarak yavaş bir salım gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Yapılan tez çalışmasında *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-95), *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 43300), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) ve *S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC 14028) referans suşları kullanıldı.

Saf teikoplanine karşı aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA'nın uygulandığı referans suşlarda, MİK değerlerinin *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923) ve *S. aureus* (ATCC 43300) suşlarında 32 kat, kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşunda (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşunda (EGE-KK-95) 64 kat daha düşük olduğu görüldü. Ayrıca hedeflemeyi gösterebilmek adına *S. epidermidis* (ATCC 12228) bakterisine aptamer konjuge teikoplanin yüklü PLGA uygulandı ve inhibisyon görülmeydi. Bu sayede de aptamerin işlevselliği açıkça ortaya konuldu.

Kavruk ve meslektaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdiği çalışmada [157], patojen inhibisyonu için aptamer konjuge vankomisin yüklü mezoporlu silika nanopartikülü kullanılmıştır. Antibiyotiğin kontrollü salımına dayalı bu sistemde çalışmamıza benzer olarak, vankomisin antibiyotiği için *S. aureus* üzerinde ölçülen MİK değerinde önemli ölçüde azalmalar görüldüğü bildirilmiştir. Valizadeh ve meslektaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdiği çalışmada [158], klaritromisin antibiyotiğinin antibakteriyal etkisi nanopartiküler sistem kullanılarak bazı bakteriler üzerinde denenmiştir. Saf klaritromisin antibiyotiğine kıyasla *S. aureus* bakterisine klaritromisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartikülünü uygulandığında MİK değerinde 8 katlık bir düşüş görülmüştür. Booyesen ve meslektaşlarının 2018 yılında gerçekleştirdiği çalışmada [159], vankomisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartikülünü MRSA üzerinde denenmiştir. Saf vankomisin ile müdahale edildiğinde MRSA MİK değerleri 5 ve 3 µg/mL bulunurken, vankomisin antibiyotiği yüklü PLGA nanopartikülü ile muamele edildiğinde MİK değerleri 1 µg/mL olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada MİK değerlerinde 5 ve 3 katlık bir düşüş gözlemlenmiştir.

4.5 Öneriler

Antibiyotiklerin hedefe giderken diğer mikroorganizmaları da etkilemeleri, doz kaybı, yan etkiler gibi durumlar, antibiyotik kullanımında dezavantajlara neden olmaktadır. Bu dezavantajların asgari sınırlara indirilebilmesi hedeflenerek başlanılan çalışmada teikoplanin antibiyotiği yüklü aptamer konjuge PLGA nanopartikülü kullanılarak hedefe yönelik ilaç sistemi oluşturuldu. PLGA nanopartikülü karakterizasyonu çalışmalarında partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü analizi, SEM analizi, AFM analizi, BET analizi, FT-IR analizi teknikleri kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin özellikleri belirlendi. Elde edilen özellikler ilaç taşıma sistemlerinin kullanımı açısından literatürde yer alan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Kontrollü salım deneyi ile etken maddenin nanopartikül içerisinden salımının uzun sürelerde gerçekleştiği belirlendi. Elde edilen veriler ile, PLGA nanopartiküllerinin enkapsüle ettiği etken maddeyi ortama uzun bir zaman aralığında saldıdığı için, hedefe yönelik ilaç sistemleri çalışmalarında kullanılabilirliğinin yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı.

Antimikrobiyal test sonuçlarına göre kullanılan hedef suş ve kontrol suşlarında umut verici sonuçlara ulaşıldı. *S. aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (ATCC 25923), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-13), kan kültüründen izole edilen metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) klinik suşu (EGE-KK-95), *S. aureus subsp. aureus* (ATCC 43300) suşlarında MİK değerlerinde önemli azalmalar görüldü. Özellikle de MRSA suşlarının MİK değerlerinde elde edilen azalma, gelecekte yapılacak çalışmalar açısından umut vaat etti. Elde edilen sonuçlara göre, karakterize edilen ilaç sistemimiz ile hedef suşlarda daha az miktarda etken maddeyle daha yüksek inhibisyon görüldü. Bu durum da antibiyotiklerin sahip oldukları dezavantajları önemli ölçüde azaltmış oldu. Hedeflemeye yönelik yapılan çalışmada, aktif hedefleme ile teikoplaninin normal şartlarda inhibe ettiği *S. epidermidis* (ATCC 12228) bakterisine, teikoplanin antibiyotiği yüklü aptamer konjuge PLGA nanopartikülü olarak verildiği zaman inhibisyon etkisi görülmedi. Bu sonuçlara göre, çalışmanın amaçlarından biri olan spesifik hedefleme başarıyla gerçekleştirilmiş oldu. Sonuçlara göre, hedefe yönelik ilaç sistemi çalışmalarında aptamerlerin kullanımının etkisi açıkça ortaya çıktı.

Hedefe yönelik ilaç sistemleri çalışmalarında özellikle aptamer konjuge nanopartiküler sistemlerin kullanımı üzerine yeterince çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışma ışığında elde edilen umut verici sonuçlar ile bu alanda yapılacak çalışmaların artmasının ve literatürde konuyla alakalı bilgi havuzunun genişlemesinin gerekliliği açıkça ortaya çıkmaktadır. Bu tez doğrultusunda elde edilen in vitro bulgular in vivo çalışmalar için bir ön deneme niteliği oluşturmaktadır.

- [1] C. Dağlıoğlu, “İlaç taşıma sistemleri olarak nanopartiküller kullanılarak pasif ve aktif tümör hedeflemelerinin karşılaştırmalı incelenmesi,” *Akademik Platform Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, 2018.
- [2] M. Kumar, “Nano and microparticles as controlled drug delivery devices,” *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 234–258, 2000.
- [3] T. Şengel-Türk C. and C. Hasçıçek, “Polimerik nanopartikuler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu,” *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, vol. 38, no. 2, pp. 137–154, 2009.
- [4] S. Derman, K. Kızılbaş, and Z. M. Akdeste, “Polymeric nanoparticles,” *Sigma*, vol. 31, pp. 107–120, 2013.
- [5] R. A. Jain, “The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(plga) devices,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2475–2490, 2000.
- [6] A. Aravind, P. Jeyamohan, R. Nair, S. Veerananarayanan, Y. Nagaoka, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, “As1411 aptamer tagged plga-lecithin-peg nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery,” *Biotechnology and bioengineering*, vol. 109, no. 11, pp. 2920–2931, 2012.
- [7] C. Tuerk and L. Gold, “Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Rna ligands to bacteriophage t4 dna polymerase,” *Science*, vol. 249, no. 4968, pp. 505–510, 1990.
- [8] A. D. Ellington and J. W. Szostak, “In vitro selection of rna molecules that bind specific ligands,” *nature*, vol. 346, no. 6287, p. 818, 1990.
- [9] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, “Selex—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands,” *Biomolecular engineering*, vol. 24, no. 4, pp. 381–403, 2007.
- [10] T. Mairal, V. C. Özalp, P. L. Sánchez, M. Mir, I. Katakis, and C. K. O’Sullivan, “Aptamers: Molecular tools for analytical applications,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 390, no. 4, pp. 989–1007, 2008.
- [11] T. Hermann and D. J. Patel, “Adaptive recognition by nucleic acid aptamers,” *Science*, vol. 287, no. 5454, pp. 820–825, 2000.
- [12] F. S. Anarjan, “Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands,” *Nano-Structures & Nano-Objects*, vol. 19, p. 100370, 2019.
- [13] Y.-A. Que and P. Moreillon, “Staphylococcus aureus (including staphylococcal toxic shock),” *Mandell, Douglas, and Bennett’s principles and practice of infectious diseases*, pp. 2237–2271, 2015.

- [14] A. Ogston, "Micrococcus poisoning," *Journal of anatomy and physiology*, vol. 16, no. Pt 4, p. 526, 1882.
- [15] M. F. Khan, "Brief history of staphylococcus aureus: A focus to antibiotic resistance," *EC Microbiology*, vol. 5, pp. 36–39, 2017.
- [16] G. A. Somerville, *Staphylococcus: Genetics and Physiology, History of the Staphylococcus aureus*. Caister Academic Press, UK, 2016.
- [17] K. M. Craft, J. M. Nguyen, L. J. Berg, and S. D. Townsend, "Methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype," *MedChemComm*, vol. 10, no. 8, pp. 1231–1241, 2019.
- [18] K. T. Kavanagh, "Control of mssa and mrsa in the united states: Protocols, policies, risk adjustment and excuses," *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, vol. 8, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [19] M. T. Madigan, *Mikroorganizmaların biyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ankara, 2012.
- [20] N. Çakır, "Antibiyotik kullanımı ve direnç sorunu," *Türkiye Klinikleri Journal of Microbiology Infection*, vol. 2, no. 2, pp. 67–78, 2003.
- [21] S. Erol, Z. Özkurt, M. Parlak, M. Ertek, and M. Taşıyan, "Bir üniversite hastanesinde antibiyotik kullanımı ve antibiyotik kullanım politikasının gerekliliği," *Flora*, vol. 9, no. 1, pp. 54–60, 2004.
- [22] W. Levinson and E. Jawets, *Tıbbi mikrobiyoloji ve immunoloji uzmanlık ve yeterlilik sınavları için*. Güneş Kitabevi, Ankara, 2001.
- [23] K. C. Carroll, J. Butel, and S. Morse, *Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E*. McGraw-Hill Education, Chicago, 2015.
- [24] W. Levinson and T. Özgünen, *Tıbbi mikrobiyoloji ve immünoloji*. Güneş Kitabevi, Ankara, 2008.
- [25] P. O. Verhoeven, J. Gagnaire, E. Botelho-Nevers, F. Grattard, A. Carricajo, F. Lucht, B. Pozzetto, and P. Berthelot, "Detection and clinical relevance of staphylococcus aureus nasal carriage: An update," *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 12, no. 1, pp. 75–89, 2014.
- [26] M. Rubab, H. M. Shahbaz, A. N. Olaimat, and D.-H. Oh, "Biosensors for rapid and sensitive detection of staphylococcus aureus in food," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 105, pp. 49–57, 2018.
- [27] I. A. Myles and S. K. Datta, "Staphylococcus aureus: An introduction," in *Seminars in immunopathology*, Springer, vol. 34, 2012, pp. 181–184.
- [28] J. A. Bhat and R. Tenguria, "Significance of mrsa in nosocomial infections," *International Journal of Applied Science-Research and Review*, vol. 1, no. 1, pp. 027–036, 2014.
- [29] M. Lobanovska and G. Pilla, "Focus: Drug development: Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future?" *The Yale journal of biology and medicine*, vol. 90, no. 1, p. 135, 2017.
- [30] E. Klein, D. L. Smith, and R. Laxminarayan, "Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant staphylococcus aureus, united states, 1999–2005," *Emerging infectious diseases*, vol. 13, no. 12, p. 1840, 2007.

- [31] F. D. Lowy, "Antimicrobial resistance: The example of staphylococcus aureus," *The Journal of clinical investigation*, vol. 111, no. 9, pp. 1265–1273, 2003.
- [32] B. Sancak, "Mrsa direnç mekanizmaları: Dünyada ve türkiye'de epidemiyolojisi," *Ankem Derg*, vol. 26, pp. 38–47, 2012.
- [33] D. P. Levine, "Vancomycin: A history," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 42, no. Supplement_1, S5–S12, 2006.
- [34] W. A. McGuinness, N. Malachowa, and F. R. DeLeo, "Focus: Infectious diseases: Vancomycin resistance in staphylococcus aureus," *The Yale journal of biology and medicine*, vol. 90, no. 2, p. 269, 2017.
- [35] R. Baselga, I. Albizu, and B. Amorena, "Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. a review," *Veterinary microbiology*, vol. 39, no. 3-4, pp. 195–204, 1994.
- [36] R. Baselga, I. Albizu, M. De La Cruz, E. Del Cacho, M. Barberan, and B. Amorena, "Phase variation of slime production in staphylococcus aureus: Implications in colonization and virulence.," *Infection and Immunity*, vol. 61, no. 11, pp. 4857–4862, 1993.
- [37] H. A. Verbrugh, R. Peters, M. Rozenberg-Arska, P. K. Peterson, and J. Verhoef, "Antibodies to cell wall peptidoglycan of staphylococcus aureus in patients with serious staphylococcal infections," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 144, no. 1, pp. 1–9, 1981.
- [38] P. K. Peterson, B. J. Wilkinson, Y. Kim, D. Schmeling, S. D. Douglas, P. G. Quie, and J. Verhoef, "The key role of peptidoglycan in the opsonization of staphylococcus aureus.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 61, no. 3, pp. 597–609, 1978.
- [39] S. Bhakdi, M. Muhly, S. Korom, and F. Hugo, "Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes.," *Infection and Immunity*, vol. 57, no. 11, pp. 3512–3519, 1989.
- [40] M. Gross, S. E. Cramton, F. Götz, and A. Peschel, "Key role of teichoic acid net charge instaphylococcus aureus colonization of artificial surfaces," *Infection and immunity*, vol. 69, no. 5, pp. 3423–3426, 2001.
- [41] R. Fong, K. Kajihara, M. Chen, I. Hotzel, S. Mariathasan, W. L. Hazenbos, and P. J. Lupardus, "Structural investigation of human s. aureus-targeting antibodies that bind wall teichoic acid," in *mAbs*, Taylor & Francis, vol. 10, 2018, pp. 979–991.
- [42] T. J. Foster and M. Höök, "Surface protein adhesins of staphylococcus aureus," *Trends in microbiology*, vol. 6, no. 12, pp. 484–488, 1998.
- [43] G. Mandell, "Catalase, superoxide dismutase, and virulence of staphylococcus aureus. in vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 55, no. 3, pp. 561–566, 1975.
- [44] T. Foster, "Staphylococcus," in *Medical Microbiology. 4th edition*, University of Texas Medical Branch at Galveston, USA, 1996.

- [45] L. Loeb, "The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood," *The Journal of medical research*, vol. 10, no. 3, p. 407, 1903.
- [46] Ö. Kılınçel, C. E. Öztürk, N. Kılıç, E. Çalışkan, F. Avcıoğlu, İ. Şahin, and Ş. Öksüz, "Stafilokokları doğru tanımlıyor muyuz?" *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 6, no. 1, pp. 30–33, 2016.
- [47] B. Kaçmaz, S. Gül, D. B. Öztürk, and E. Ecemiş, "Staphylococcus aureus suşlarında koagülaz testi için uygun sıcaklığın araştırılması," *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, p. 99, 2015.
- [48] G. Durmaz, A. Aydınli, and Y. Akgün, "Staphylococcus aureus identifikasyonunda tüp koagülaz, lam koagülaz ve lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırılması," *Flora*, vol. 2, no. 3, pp. 208–11, 1997.
- [49] F. Duran-Reynals, "Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 58, no. 2, pp. 161–181, 1933.
- [50] C. B. Ibberson, C. L. Jones, S. Singh, M. C. Wise, M. E. Hart, D. V. Zurawski, and A. R. Horswill, "Staphylococcus aureus hyaluronidase is a cody-regulated virulence factor," *Infection and immunity*, vol. 82, no. 10, pp. 4253–4264, 2014.
- [51] W. L. Hynes and S. L. Walton, "Hyaluronidases of gram-positive bacteria," *FEMS microbiology letters*, vol. 183, no. 2, pp. 201–207, 2000.
- [52] T. Jin, M. Bokarewa, T. Foster, J. Mitchell, J. Higgins, and A. Tarkowski, "Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism," *The Journal of Immunology*, vol. 172, no. 2, pp. 1169–1176, 2004.
- [53] M. I. Bokarewa, T. Jin, and A. Tarkowski, "Staphylococcus aureus: Staphylokinase," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 38, no. 4, pp. 504–509, 2006.
- [54] J. Rollof and S. Normark, "In vivo processing of staphylococcus aureus lipase.," *Journal of bacteriology*, vol. 174, no. 6, pp. 1844–1847, 1992.
- [55] M. Kuroda, S. Nagasaki, R. Ito, and T. Ohta, "Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of staphylococcus aureus," *FEMS Microbiology letters*, vol. 273, no. 1, pp. 28–34, 2007.
- [56] L. Cunningham, B. W. Catlin, and M. P. De Garilhe, "A deoxyribonuclease of micrococcus pyogenes1," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 78, no. 18, pp. 4642–4645, 1956.
- [57] R. Hacha and E. Fredericq, "Purification and some enzymic properties of staphylococcus aureus deoxyribonuclease," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, vol. 123, no. 3, pp. 493–502, 1966.
- [58] M. R. Kiedrowski, J. S. Kavanaugh, C. L. Malone, J. M. Mootz, J. M. Voyich, M. S. Smeltzer, K. W. Bayles, and A. R. Horswill, "Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus," *PloS one*, vol. 6, no. 11, e26714, 2011.
- [59] M. M. Dinges, P. M. Orwin, and P. M. Schlievert, "Exotoxins of staphylococcus aureus," *Clinical microbiology reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 16–34, 2000.

- [60] M. Huseby, K. Shi, C. K. Brown, J. Digre, F. Mengistu, K. S. Seo, G. A. Bohach, P. M. Schlievert, D. H. Ohlendorf, and C. A. Earhart, "Structure and biological activities of beta toxin from staphylococcus aureus," *Journal of bacteriology*, vol. 189, no. 23, pp. 8719–8726, 2007.
- [61] G. A. Bohach, "Staphylococcus aureus exotoxins," in *Gram-Positive Pathogens, Second Edition*, American Society of Microbiology, USA, 2006.
- [62] H. K. Müştak and Ö. M. Esendal, "Staphylococcus aureus ekzotoksinleri," *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, p. 69, 2010.
- [63] M. Bukowski, B. Wladyka, and G. Dubin, "Exfoliative toxins of staphylococcus aureus," *Toxins*, vol. 2, no. 5, pp. 1148–1165, 2010.
- [64] P. L. Garbe, R. J. Arko, A. L. Reingold, L. M. Graves, P. S. Hayes, A. W. Hightower, F. W. Chandler, and C. V. Broome, "Staphylococcus aureus isolates from patients with nonmenstrual toxic shock syndrome: Evidence for additional toxins," *JAMA*, vol. 253, no. 17, pp. 2538–2542, 1985.
- [65] T. Miethke, C. Wahl, D. Regele, H. Gaus, K. Heeg, and H. Wagner, "Superantigen mediated shock: A cytokine release syndrome," *Immunobiology*, vol. 189, no. 3-4, pp. 270–284, 1993.
- [66] İ. Erol and Ö. İşeri, "Stafilokokal enterotoksinler," *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, vol. 51, no. 3, pp. 239–245, 2004.
- [67] E. Botelho-Nevers, J. Gagnaire, P. Verhoeven, C. Cazorla, F. Grattard, B. Pozzetto, P. Berthelot, and F. Lucht, "Decolonization of staphylococcus aureus carriage," *Medecine et maladies infectieuses*, vol. 47, no. 5, pp. 305–310, 2017.
- [68] H. F. Wertheim, D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh, and J. L. Nouwen, "The role of nasal carriage in staphylococcus aureus infections," *The Lancet infectious diseases*, vol. 5, no. 12, pp. 751–762, 2005.
- [69] J. Horn, K. Stelzner, T. Rudel, and M. Fraunholz, "Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 308, no. 6, pp. 607–624, 2018.
- [70] H. F. Chambers and F. R. DeLeo, "Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, no. 9, p. 629, 2009.
- [71] L. K. McDougal and C. Thornsberry, "The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins.," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 23, no. 5, pp. 832–839, 1986.
- [72] D. J. Payne, R. Cramp, D. J. Winstanley, and D. Knowles, "Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases.," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 38, no. 4, pp. 767–772, 1994.
- [73] İ. Yıldız, M. A. Varkal, and E. Üzüvar, "Günümüzde sefaloparinler ve antibiyotik direnci," *Çocuk Dergisi*, vol. 14, no. 1, pp. 22–27, 2014.
- [74] T. C. Eickhoff and J. M. Ehret, "In vitro activity of netilmicin compared with gentamicin, tobramycin, amikacin, and kanamycin," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 11, no. 5, pp. 791–796, 1977.

- [75] L. Wondrack, M. Massa, B. Yang, and J. Sutcliffe, "Clinical strain of staphylococcus aureus inactivates and causes efflux of macrolides.," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 40, no. 4, pp. 992–998, 1996.
- [76] Ö. Deveci, D. Kılıç, S. Kaygusuz, N. Duruyürek, C. Karabıçak, C. Ağalar, and A. Tekin, "Evaluation of resistance to fusidic acid in staphylococci isolates," *J Microbiol Infect Dis*, vol. 1, no. 1, pp. 22–5, 2011.
- [77] D. L. Paterson, "collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 38, no. Supplement_4, S341–S345, 2004.
- [78] J. Bradley, J. Garau, H. Lode, K. Rolston, S. Wilson, and J. Quinn, "Carbapenems in clinical practice: A guide to their use in serious infection," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 11, no. 2, pp. 93–100, 1999.
- [79] G. Lina, A. Quaglia, M.-E. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandenesch, and J. Etienne, "Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 43, no. 5, pp. 1062–1066, 1999.
- [80] J. Perlroth, M. Kuo, J. Tan, A. S. Bayer, and L. G. Miller, "Adjunctive use of rifampin for the treatment of staphylococcus aureus infections: A systematic review of the literature," *Archives of Internal Medicine*, vol. 168, no. 8, pp. 805–819, 2008.
- [81] F. C. Tenover, J. W. Biddle, and M. V. Lancaster, "Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in staphylococcus aureus.," *Emerging infectious diseases*, vol. 7, no. 2, p. 327, 2001.
- [82] G. Aygün, "Antibiyotikler 11," *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*, vol. 31, pp. 39–54, 2002.
- [83] K. Nicolaou, C. N. Boddy, S. Bräse, and N. Winssinger, "Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 38, no. 15, pp. 2096–2152, 1999.
- [84] F. Parenti, G. Beretta, M. Berti, and V. Arioli, "Teichomycins, new antibiotics from actinoplanes teichomyceticus nov. sp," *The Journal of antibiotics*, vol. 31, no. 4, pp. 276–283, 1978.
- [85] P. E. Reynolds, "Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 8, no. 11, pp. 943–950, 1989.
- [86] F. Van Bambeke, "Glycopeptides in clinical development: Pharmacological profile and clinical perspectives," *Current opinion in pharmacology*, vol. 4, no. 5, pp. 471–478, 2004.
- [87] S. Murphy and R. Pinney, "Teicoplanin or vancomycin in the treatment of gram-positive infections?" *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, vol. 20, no. 1, pp. 5–11, 1995.
- [88] M. Rowland, "Clinical pharmacokinetics of teicoplanin," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 18, no. 3, pp. 184–209, 1990.

- [89] A. P. R. Wilson, "Clinical pharmacokinetics of teicoplanin," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 39, no. 3, pp. 167–183, 2000.
- [90] O. Öncül, "Vankomisin ve teikoplanin öyküsü," *ANKEM 2010; 24 (Suppl 2): S101*, vol. 9, 2010.
- [91] D. M. Campoli-Richards, R. N. Brogden, and D. Faulds, "Teicoplanin a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential," *Drugs*, vol. 40, no. 3, pp. 449–486, 1990.
- [92] M. J. Wood, "The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 37, no. 2, pp. 209–222, 1996.
- [93] P. C. Matthews, A. L. Chue, D. Wyllie, A. Barnett, T. Isinkaye, L. Jefferies, A. Lovering, and M. Scarborough, "Increased teicoplanin doses are associated with improved serum levels but not drug toxicity," *Journal of Infection*, vol. 68, no. 1, pp. 43–49, 2014.
- [94] A. Wilson, "Comparative safety of teicoplanin and vancomycin," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 10, no. 2, pp. 143–152, 1998.
- [95] P. Sabaeifard, A. Abdi-Ali, M. R. Soudi, C. Gamazo, and J. M. Irache, "Amikacin loaded plga nanoparticles against pseudomonas aeruginosa," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93, pp. 392–398, 2016.
- [96] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Progress in polymer science*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
- [97] P. Couvreur, "Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers.," *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, vol. 5, no. 1, pp. 1–20, 1988.
- [98] Z. Tüylek, "ilaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim.," *Bozok Tıp Dergisi*, vol. 7, no. 3, pp. 89–98, 2017.
- [99] O. Kayser, A. Lemke, and N. Hernandez-Trejo, "The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems," *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 6, no. 1, pp. 3–5, 2005.
- [100] H. Wan, Q. Sun, H. Li, F. Sun, N. Hu, and P. Wang, "Screen-printed gold electrode with gold nanoparticles modification for simultaneous electrochemical determination of lead and copper," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 209, pp. 336–342, 2015.
- [101] A. E. Müderrisoğlu and T. Çomoğlu, "ilaç taşıyıcı polimerik partiküler sistem formülasyonlarına genel bakış," *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, vol. 39, no. 4, pp. 343–368, 2010.
- [102] L. Mu and S. Feng, "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (taxol®): Plga nanoparticles containing vitamin e tpgs," *Journal of controlled release*, vol. 86, no. 1, pp. 33–48, 2003.
- [103] C. T. Şengel-Türk, C. Haşıçek, and N. Gönül, "Beyne ilaç hedeflendirilmesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler," *Journal of Neurological Sciences*, vol. 24, no. 3, pp. 254–263, 2007.

- [104] L. Zhang, F. Gu, J. Chan, A. Wang, R. Langer, and O. Farokhzad, "Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments," *Clinical pharmacology & therapeutics*, vol. 83, no. 5, pp. 761–769, 2008.
- [105] S. H. Rao, B. Harini, R. P. K. Shadamarshan, K. Balagangadharan, and N. Selvamurugan, "Natural and synthetic polymers/bioceramics/bioactive compounds-mediated cell signalling in bone tissue engineering," *International journal of biological macromolecules*, vol. 110, pp. 88–96, 2018.
- [106] C. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, "Polymer-based nanocapsules for drug delivery," *International journal of pharmaceutics*, vol. 385, no. 1-2, pp. 113–142, 2010.
- [107] N. S. Murthy, Z. Zhang, S. Borsadia, and J. Kohn, "Nanospheres with a smectic hydrophobic core and an amorphous peg hydrophilic shell: Structural changes and implications for drug delivery," *Soft matter*, vol. 14, no. 8, pp. 1327–1335, 2018.
- [108] J. M. Dang and K. W. Leong, "Natural polymers for gene delivery and tissue engineering," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 58, no. 4, pp. 487–499, 2006.
- [109] R. C. Nagarwal, S. Kant, P. Singh, P. Maiti, and J. Pandit, "Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery," *Journal of controlled release*, vol. 136, no. 1, pp. 2–13, 2009.
- [110] P. A. Gunatillake and R. Adhikari, "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering," *Eur Cell Mater*, vol. 5, no. 1, pp. 1–16, 2003.
- [111] S. Derman, Z. M. Akdeste, S. C. Ates, B. Mansuroglu, K. Kizilbey, M. Bagirova, and A. Allahverdiyev, "The study of syntetic peptide loaded plga nanoparticles cytotoxicity in vitro," *Fres Environ Bull*, vol. 26, pp. 1646–1653, 2017.
- [112] B. Tuncer, B. Mansuroğlu, and S. Derman, "Antioxidant effect of catechin loaded polymeric nanoparticle.," *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 34, no. 3, 2016.
- [113] T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, and S. S. Davis, "Plga nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug," *Journal of Controlled Release*, vol. 57, no. 2, pp. 171–185, 1999.
- [114] T. Akagi, M. Baba, and M. Akashi, "Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine," in *Polymers in nanomedicine*, Springer, 2011, pp. 31–64.
- [115] J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "Formulation of functionalized plga-peg nanoparticles for in vivo targeted drug delivery," *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–876, 2007.
- [116] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, "Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles," *Molecular pharmaceutics*, vol. 5, no. 4, pp. 505–515, 2008.

- [117] A. Shabir, F. Alhusban, Y. Perrie, and A. R. Mohammed, "Effects of ball-milling on plga polymer and its implication on lansoprazole-loaded nanoparticles," *Journal of basic and clinical pharmacy*, vol. 2, no. 2, p. 71, 2011.
- [118] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly lactic-co-glycolic acid (plga) as biodegradable controlled drug delivery carrier," *Polymers*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, 2011.
- [119] M. Hans and A. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 6, no. 4, pp. 319–327, 2002.
- [120] E. Yalçın, F. Çiçek, and K. Çavuşoğlu, "Siklodekstrin bağlı poli (laktid-ko-glikolid) mikropartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu, in vitro kolesterol gideriminde kullanılabilirliği," *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 35, no. 3, pp. 9–22, 2013.
- [121] V. C. Ozalp, F. Eyidogan, and H. A. Oktem, "Aptamer-gated nanoparticles for smart drug delivery," *Pharmaceuticals*, vol. 4, no. 8, pp. 1137–1157, 2011.
- [122] A. T. Bayraç and B. B. Kandemir, "Domuz jelatinine özgü dna aptamerlerinin seçilimi ve karakterizasyonu," *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 22, no. 2, pp. 774–778, 2018.
- [123] Y. Wang, J. Killian, K. Hamasaki, and R. R. Rando, "Rna molecules that specifically and stoichiometrically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities," *Biochemistry*, vol. 35, no. 38, pp. 12 338–12 346, 1996.
- [124] H. Hasegawa, N. Savory, K. Abe, and K. Ikebukuro, "Methods for improving aptamer binding affinity," *Molecules*, vol. 21, no. 4, p. 421, 2016.
- [125] R. C. Conrad, S. Baskerville, and A. D. Ellington, "In vitro selection methodologies to probe rna function and structure," *Molecular diversity*, vol. 1, no. 1, pp. 69–78, 1995.
- [126] D. Oberthür, J. Achenbach, A. Gabdulkhakov, K. Buchner, C. Maasch, S. Falke, D. Rehders, S. Klussmann, and C. Betzel, "Crystal structure of a mirror-image l-rna aptamer (spiegelmer) in complex with the natural l-protein target ccl2," *Nature communications*, vol. 6, p. 6923, 2015.
- [127] E. W. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham Jr, D. R. Guyer, and A. P. Adamis, "Pegaptanib, a targeted anti-vegf aptamer for ocular vascular disease," *Nature reviews drug discovery*, vol. 5, no. 2, p. 123, 2006.
- [128] R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, "Flumag-selex as an advantageous method for dna aptamer selection," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 383, no. 1, pp. 83–91, 2005.
- [129] T. Sampson, "Aptamers and selex: The technology," *World Patent Information*, vol. 25, no. 2, pp. 123–129, 2003.
- [130] V. Cengiz Ozalp, M. Kavruk, O. Dilek, and A. Tahir Bayrac, "Aptamers: Molecular tools for medical diagnosis," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 15, no. 12, pp. 1125–1137, 2015.

- [131] X. Cao, S. Li, L. Chen, H. Ding, H. Xu, Y. Huang, J. Li, N. Liu, W. Cao, Y. Zhu, *et al.*, "Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of staphylococcus aureus," *Nucleic acids research*, vol. 37, no. 14, pp. 4621–4628, 2009.
- [132] A. Aravind, S. H. Varghese, S. Veerananarayanan, A. Mathew, Y. Nagaoka, S. Iwai, T. Fukuda, T. Hasumura, Y. Yoshida, T. Maekawa, *et al.*, "Aptamer-labeled plga nanoparticles for targeting cancer cells," *Cancer nanotechnology*, vol. 3, no. 1, p. 1, 2012.
- [133] S. Derman, Z. A. Mustafaeva, E. S. Abamor, M. Bagirova, and A. Allahverdiyev, "Preparation, characterization and immunological evaluation: Canine parvovirus synthetic peptide loaded plga nanoparticles," *Journal of biomedical science*, vol. 22, no. 1, p. 89, 2015.
- [134] J. Shen, Z. Jiao, Y. Zhou, H. Zhu, and Z. Song, "Quantification of teicoplanin in human plasma by liquid chromatography with ultraviolet detection," *Chromatographia*, vol. 65, no. 1-2, pp. 9–12, 2007.
- [135] G. Mohammadi, E. Namadi, A. Mikaeili, P. Mohammadi, and K. Adibkia, "Preparation, physicochemical characterization and anti-fungal evaluation of the nystatin-loaded eudragit rs100/plga nanoparticles," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 38, pp. 90–96, 2017.
- [136] Z. Zhang and S.-S. Feng, "The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly (lactide)–tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 27, no. 21, pp. 4025–4033, 2006.
- [137] S. Lakshmana Prabu, A. Shirwaikar, A. Shirwaikar, A. Kumari, *et al.*, "Formulation and evaluation of sustained release microspheres of rosin containing aceclofenac," 2009.
- [138] S. Brunauer, P. H. Emmett, and E. Teller, "Adsorption of gases in multimolecular layers," *Journal of the American chemical society*, vol. 60, no. 2, pp. 309–319, 1938.
- [139] W. W. Wilson, M. M. Wade, S. C. Holman, and F. R. Champlin, "Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements," *Journal of microbiological methods*, vol. 43, no. 3, pp. 153–164, 2001.
- [140] A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, and J. Kreuter, "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles," *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 57, no. 2, pp. 369–375, 2004.
- [141] S. Sharma, H. I. Rasool, V. Palanisamy, C. Mathisen, M. Schmidt, D. T. Wong, and J. K. Gimzewski, "Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative afm, fescm, and force spectroscopy," *ACS nano*, vol. 4, no. 4, pp. 1921–1926, 2010.

- [142] A. Deniz, A. Sade, F. Severcan, D. Keskin, A. Tezcaner, and S. Banerjee, "Celecoxib-loaded liposomes: Effect of cholesterol on encapsulation and in vitro release characteristics," *Bioscience reports*, vol. 30, no. 5, pp. 365–373, 2010.
- [143] S. Dixit, S. R. Singh, A. N. Yilma, R. D. Agee II, M. Taha, and V. A. Dennis, "Poly (lactic acid)–poly (ethylene glycol) nanoparticles provide sustained delivery of a chlamydia trachomatis recombinant momp peptide and potentiate systemic adaptive immune responses in mice," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 10, no. 6, pp. 1311–1321, 2014.
- [144] CLSI, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically 11th ed. CLSI standard M07*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.
- [145] CLSI, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 28th ed. CLSI supplement M100*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.
- [146] T. Arasoğlu and S. Derman, "Assessment of the antigenotoxic activity of poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with caffeic acid phenethyl ester using the ames salmonella/microsome assay," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 66, no. 24, pp. 6196–6204, 2018.
- [147] L. M. d. A. C. Gaspar, A. C. S. Dórea, D. Droppa-Almeida, I. S. de Mélo Silva, F. E. Montoro, L. L. Alves, M. L. H. Macedo, and F. F. Padilha, "Development and characterization of plga nanoparticles containing antibiotics," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 20, no. 11, p. 289, 2018.
- [148] J. Tang, J.-Y. Chen, J. Liu, M. Luo, Y.-J. Wang, X.-w. Wei, X. Gao, B.-l. Wang, Y.-B. Liu, T. Yi, *et al.*, "Calcium phosphate embedded plga nanoparticles: A promising gene delivery vector with high gene loading and transfection efficiency," *International journal of pharmaceutics*, vol. 431, no. 1-2, pp. 210–221, 2012.
- [149] S. Xiong, S. George, H. Yu, R. Damoiseaux, B. France, K. W. Ng, and J. S.-C. Loo, "Size influences the cytotoxicity of poly (lactic-co-glycolic acid) (plga) and titanium dioxide (tio 2) nanoparticles," *Archives of toxicology*, vol. 87, no. 6, pp. 1075–1086, 2013.
- [150] R. Dorati, M. Patrini, P. Perugini, F. Pavanetto, A. Stella, T. Modena, I. Genta, and B. Conti, "Surface characterization by atomic force microscopy of sterilized plga microspheres," *Journal of microencapsulation*, vol. 23, no. 2, pp. 123–133, 2006.
- [151] D. Sun, N. Li, W. Zhang, E. Yang, Z. Mou, Z. Zhao, H. Liu, and W. Wang, "Quercetin-loaded plga nanoparticles: A highly effective antibacterial agent in vitro and anti-infection application in vivo," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 18, no. 1, p. 3, 2016.
- [152] R. Kumar, G. C. Sahoo, K. Pandeya, V. Dasa, M. Yousuf, S. R. Ansaria, and P. Dasa, "Plga-peg encapsulated sitamaquine nanoparticles drug delivery system against leishmania donovani," *J Sci Innov Res*, vol. 3, no. 1, 85e90, 2014.

- [153] R. Kumar, G. C. Sahoo, K. Pandey, V. Das, and P. Das, "Study the effects of plga-peg encapsulated amphotericin b nanoparticle drug delivery system against leishmania donovani," *Drug delivery*, vol. 22, no. 3, pp. 383–388, 2015.
- [154] T. S. J. Kashi, S. Eskandarion, M. Esfandyari-Manesh, S. M. A. Marashi, N. Samadi, S. M. Fatemi, F. Atyabi, S. Eshraghi, and R. Dinarvand, "Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded plga nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method," *International journal of nanomedicine*, vol. 7, p. 221, 2012.
- [155] P. Zakeri-Milani, B. D. Loveymi, M. Jelvehgari, and H. Valizadeh, "The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin plga-nanoparticles as colloidal drug delivery system," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 103, pp. 174–181, 2013.
- [156] F. Ungaro, I. d'Angelo, C. Coletta, R. d. di Villa Bianca, R. Sorrentino, B. Perfetto, M. A. Tufano, A. Miro, M. I. La Rotonda, and F. Quaglia, "Dry powders based on plga nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers," *Journal of controlled release*, vol. 157, no. 1, pp. 149–159, 2012.
- [157] M. Kavruk, O. Celikbicak, V. Ozalp, B. Borsa, F. Hernandez, G. Bayramoglu, B. Salih, and M. Arica, "Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens," *Chemical Communications*, vol. 51, no. 40, pp. 8492–8495, 2015.
- [158] H. Valizadeh, G. Mohammadi, R. Ehyaei, M. Milani, M. Azhdarzadeh, P. Zakeri-Milani, and F. Lotfipour, "Antibacterial activity of clarithromycin loaded plga nanoparticles," *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 67, no. 1, pp. 63–68, 2012.
- [159] E. Booysen, M. Bezuidenhout, A. D. P. van Staden, D. Dimitrov, S. M. Deane, and L. M. Dicks, "Antibacterial activity of vancomycin encapsulated in poly (dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles using electrospraying," *Probiotics and antimicrobial proteins*, vol. 11, no. 1, pp. 310–316, 2019.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgileri: sametucak@gmail.com

Makale

1. S. Ucak, M. Sudagidan, B. A. Borsa, B. Mansuroglu and V. C. Ozalp, "Inhibitory effects of aptamer targeted teicoplanin encapsulated PLGA nanoparticles for *Staphylococcus aureus* strains," World Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 36, no. 5, Article number: 69, 2020.

Konferans Bildirisi

1. S. Ucak, B. Mansuroglu and V. C. Ozalp, "PLGA Nanoparticles as Tool for Enhanced Delivery of Teicoplanin," 6. Uluslararası Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi, İzmir, Türkiye, (Poster Sunum), 5-8 Eylül 2018, s.84.
2. S. Ucak, M. Sudağidan, B. Mansuroglu and V. C. Ozalp, "Aptamer Conjugated Teicoplanin Loaded PLGA Nanoparticles: In-Vitro Effect on *S.aureus*," 7. Uluslararası Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği Kongresi, İstanbul, Türkiye, (Poster Sunum), 27-29 Eylül 2019, s.68.
3. S. Ucak, M. Sudagidan, B. A. Borsa, B. Mansuroglu and V. C. Ozalp, "Aptamer targeted teicoplanin in PLGA nanoparticles for *Staphylococcus aureus*," 30. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi (ECCMID), Paris, Fransa, (sözlü sunum), 18-21 Nisan 2020, (COVID-19 pandemisi nedeniyle kongre iptal edildi. çalışmanın özet kitabında basılmasına tarafımızdan izin verilmedi.)

Proje

1. Yürütücü: Doç. Dr. Banu Mansuroğlu, Araştırmacı: Samet UÇAK, "Aptamer Tabanlı Teikoplanin Yüklü Poli – (D, L – Laktik – Ko – Glikolik Asit) (PLGA) Nanopartiküllerin *S.aureus* Üzerine İn Vitro Etkisi," Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tez Projesi, Doktora (DKT), Proje No. FDK-2018-3244 (24 ay).