

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİYALÜRONİK ASİT ESASLI MİKRO/NANO BOYUTLU
ANTİBAKTERİYEL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ, ENZİM VE pH'A
DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ

Gülşah BAKIRDÖĞEN

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Serap DERMAN

Eş Danışman

Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ

Ocak, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİYALÜRONİK ASİT ESASLI MİKRO/NANO BOYUTLU
ANTİBAKTERİYEL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ, ENZİM VE pH'A DUYARLILIKLARININ
İNCELENMESİ**

Gülşah BAKIRDÖĞEN tarafından hazırlanan tez çalışması 24.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serap DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Serap DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Murat TOPUZOGULLARI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Atilla TAŞDELEN, Üye
Yalova Üniversitesi

Prof. Dr. Yasemin YÜKSEL DURMAZ, Üye
İstanbul Medipol Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Hyalüronik Asit Esaslı Mikro/Nano Boyutlu Antibakteriyel İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Enzim ve pH’a Duyarlılıklarının İncelenmesi” 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.

Gülşah BAKIRDÖĞEN



Bu alışma, “İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün TGA-2019-42288” numaralı projesi, YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ve 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar BİDEB-TÜBİTAK bursu ile desteklenmiştir.



Eşime
ve
canım oğluma

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince her zaman yanımda olan, bilgileri ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her koşulda bir ağabey ve bir abla gibi beni destekleyen, sabır ve anlayış gösterip sevgilerini benden esirgemeyen, bir bilim insanı olma yolunda, çalışma azimleri ve başarılarıyla her zaman örnek aldığım çok değerli iki hocam Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ ve Prof. Dr. Serap DERMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Atilla TAŞDELEN ve Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na tez sürecim boyunca sağladıkları katkı ve öneriler için teşekkür ederim.

Antimikrobiyal çalışmalar sırasında bilgi birikimini ve katkılarını sağlayan çok sevgili Prof. Dr. Tülin ÖZBEK'e ve deneysel çalışmaları gerçekleştiren Emine SELÇUK'a, floresans ölçümleri sırasında laboratuvarının imkanlarını kullanmama olanak sağlayan Prof. Dr. Bünyamin KARAGÖZ'e ve kolistin sülfat antibiyotigini sağlayan Deva İlaç Şirketi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım süresi boyunca, proje kapsamında maddi destek sağlayan İTÜ-BAP Koordinatörlüğü'ne, ayrıca YÖK 100/2000 ve TÜBİTAK BİDEB 2211/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında bana maddi destekte bulunan YÖK'e ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Başından sonuna tüm doktora sürecimi birlikte götürdüğüm, her zor zamanımda yanımda olup sevgisini ve desteğini hiç esirgemeyen Dr. Elif KAHVECİ'ye, doktora eğitimimde birlikte olduğum sevgili Öğr. Gör. Dr. Özlem MARANCI YILDIRIM'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, dostluklarıyla her zaman yanımda olan Dr. Öğr. Üye. Sinem SİPAHİOĞLU KARA ve Sevinç GÜLYÜZ'e, laboratuvarda birlikte çalıştığım ve destekleriyle yanımda olan Dr. Ahmet ÇETİNKAYA, Araş. Gör. Neslihan ÇAKIR, Şeyma SARI, Adalet Nur KAYA ve Kahveci Araştırma Grubu'nun diğer üyelerine, yine destekleriyle yanımda olan hocalarım Öğr. Gör. Dr. Şennur ÖZÇELİK ve Öğr. Gör. Dr. Çağatay ALTINKÖK'e, çalışmalarım sırasında arkadaşlıkları ve destekleri ile yanımda

olan Dr. Nilbeste BONCUKÇU, İrem ÇOKSU ve Derman'S Laboratuvar'ın diğer üyelerine teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemde emeği sonsuz olan canım annem ve babam Neşe EROL ve Mehmet Tarık EROL'a, her zaman yanımda olan ağabeyim Engin EROL, ablam Nilay EROL ve biricik yeğenim Eliz Ada EROL'a, destekleri ile doktora çalışmalarımı kolaylaştıran ikinci ailem olan sevgili Figen BAKIRDÖĞEN, Metin BAKIRDÖĞEN ve Ersin BAKIRDÖĞEN'e teşekkür ederim.

Sevgisi ve desteği ile hayatıma anlam katan, çıktığım bu yolda her zaman yanımda olan sevgili eşim Cem Tahsin BAKIRDÖĞEN'e ve en kıymetlim, canım oğlum Kuzey'e sonsuz teşekkür ederim.

İstanbul, 2024

Gülşah BAKIRDÖĞEN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xvii
ÖZET	xviii
ABSTRACT	xx
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 İlaç Salım Sistemleri	6
2.2 İlaç Salımında Taşıyıcıların Sınıflandırılması	16
2.3 Polimerik Mikro/Nanopartiküller	20
2.4 Hiyalüronik Asit (HA)	38
2.5 Poli(β -amino ester) (PBAE)	42
2.6 Antimikrobiyal Direnç (AMR)	46
2.7 Click Kimyası	49
3 GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	55
3.2 Hiyalüronik Asidin Modifikasyonu ve Öncül Maddelerin Sentezi	57
3.3 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Sentezi	61
3.4 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Enzimatik Parçalanma ve Salım Davranışlarının İncelenmesi	65
3.5 Antibiyotik Yüklü Nanokomplekslerin Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi	67
4 BULGULAR	68
4.1 Hiyalüronik Asidin Modifikasyonu ve Öncül Maddelerin Sentezi	68
4.2 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Sentezi	74
4.3 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Enzimatik Parçalanma ve Salım Davranışlarının İncelenmesi	83
4.4 Antibiyotik Yüklü Nanokomplekslerin Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi	95

5 SONUÇ	100
KAYNAKÇA	102
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	118



SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikadaki devir sayısı
cm ⁻¹	Dalga sayısı
Da	Dalton
°C	Derece santigrat
g	Gram
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
δ	Kimyasal kayma değeri (ppm)
M_w	Kütlece ortalama molekül ağırlığı
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
mV	Milivolt
M	Molar
nm	Nanometre
π - π	Pi-pi
cm	Santimetre
M_n	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
%	Yüzde
ζ	Zeta potansiyel

KISALTMA LİSTESİ

¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
AMR	Antimikrobiyal direnç
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
BBB	Kan-beyin bariyeri
Boc	<i>tert</i> -Bütiloksikarbonil koruma grubu
BSA	Sığır serum albümin
CFU	Koloni oluşturan birimler
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CMC	Kritik misel konsantrasyonu
CRP	Kontrollü radikal polimerizasyonu
CuAAC	Bakır katalizli azid-alkin katılması
DCC	<i>N,N'</i> -disiklohegzilkarbodiimid
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMAP	4-(Dimetilamino)piridin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doksorubisin
ECM	Ekstraselüler matriks
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid hidroklorür
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELS	Elektroforetik ışık saçılması
EPR	Artırılmış Geçirgenlik ve Alıkoyma
EPS	Ekstraselüler polimerik maddeler
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
FITC	Fluoresein izotiyosiyanat
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
GAG	Glikozaminoglikan
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HA	Hiyalüronik asit
HA _D	Düşük molekül ağırlığına sahip hiyalüronik asit

HAS	Hyaluronan sentaz
HA-Tz	Hiyalüronik asit-tetrazin
HA _y	Yüksek molekül ağırlığına sahip hiyalüronik asit
HCl	Hidroklorik asit
HYAL 1-4	Hiyalüronidaz 1-4
ICG	İndiyosiyanin yeşili
IEDDA	Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder
KO	Kolistin sülfat
LCST	Düşük kritik çözelti sıcaklığı
LPS	Lipopolisakkarit
MBC	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MEC	Minimum etkili konsantrasyon
MHB	Mueller Hinton broth
MIC	Minimum inhibitor konsantrasyon
MRSA	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
MTC	Maksimum toksik konsantrasyon
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NaNO ₂	Sodyum nitrit
NHS	<i>N</i> -hidroksisüksinimit
NIR	Yakın kızılötesi
NMP	Nitroksit aracılı radikal polimerizasyonu
ONB	<i>orto</i> -Nitrobenzil
PBAE	Poli(β -amino ester)
PBS	Fosfat tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PE- <i>b</i> -PEG	Polietilen- <i>b</i> -poli(etilen glikol)
PEG	Poli(etilen glikol)
PET	Pozitron emisyon tomografisi
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PNIPAM	Poli(<i>N</i> -izopropilakrilamid)
pI	İzoelektrik nokta
RAFT	Tersinir Katılma-Ayrılma Zincir Transfer Polimerizasyonu

RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SRB	Sulforhodamin B
STEM	Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu
TCO	<i>trans</i> -Siklookten
TFA	Trifluro asetik asit
Tz-NH ₂	Amin fonksiyonlu tetrazin
UCST	�st kritik çözelti sıcaklığı
UV-Vis	Ultraviyole Görünür Spektroskopisi
VAN	Vankomisin hidroklorür
VRSA	Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	İlaçların geleneksel uygulama yolları [18].....	7
Şekil 2.2	Bir ilacın taşıyıcıdan üç tür salım kinetiği, ani salım (siyah düz çizgi), periyodik salım (siyah kesikli çizgi) ve sıfır dereceli salım (turuncu çizgi) [21].....	8
Şekil 2.3	İlaç taşıyıcı sistemlerin salım mekanizmasına göre sınıflandırılması. Difüzyon kontrollü sistemler (A) matris veya (B) rezervuar bazlı olabilir; kimyasal olarak kontrol edilen sistemlerde ilaç (C) yüzey erozyonuyla veya (D) yan zincirli polimerik sistemlerden salınabilir; solventle aktiveleştirilen sistemler ilacı (E) şişme veya (F) ozmotik basınçla serbest bırakır; ve (G) uyarılarla tetiklenen sistemler, bazı dış veya çevresel uyarılarla ilacı serbest bırakır [20].....	8
Şekil 2.4	Kütle ve yüzey erozyonu şematik gösterimi [22].....	9
Şekil 2.5	pH'a duyarlı polimerik misellerin salım mekanizmaları. (a) Fiziksel ayrılma; (b) Kimyasal bağ bölünmesiyle dağılma; (c) Kimyasal bağ bölünmesiyle salım; (d) Nanopartikül şişmesi [26]	13
Şekil 2.6	Aktif ve pasif hedeflemenin şematik gösterimi [28]	14
Şekil 2.7	İlaç salım sistemlerinde kullanılan çeşitli yapılar [18].....	16
Şekil 2.8	Polimer-ilâç konjugatlarının şematik gösterimi [37].....	19
Şekil 2.9	Nanopartikül hazırlamada kullanılan nanoçöktürme yönteminin şematik gösterimi [46].....	24
Şekil 2.10	Farklı kaynaklardan elde edilen biyopolimerler [53]	27
Şekil 2.11	Uyarılara duyarlı bazı malzemelerin moleküler yapıları [66]	29
Şekil 2.12	Fotokromik moleküllerin foto-izomerizasyon mekanizması: (a) azobenzen; (b) stilben; ve (c) spiropiran [68]	31
Şekil 2.13	pH'a duyarlı polimerlerin tipik örnekleri [69]	32
Şekil 2.14	pH'a duyarlı nanosistemlerde kullanılan asitle kırılabilen bağlar [26]	33
Şekil 2.15	İlaç salımında ve teşhiste kullanılabilecek enzime duyarlı nanomalzeme örnekleri ve enzimle parçalanması; a) polimer bazlı nanopartiküller, b) polimerle stabilize edilmiş lipozomlar, c) inorganik nanopartiküller [72]	35
Şekil 2.16	Literatürde yapılmış enzimle tetiklenebilir sistemlere örnekler [66] ...	36
Şekil 2.17	GSH/GSSG redoks çiftinin kimyasal yapısı	37
Şekil 2.18	Disülfid bağlarının ilaç salım sistemlerinde kullanıldığı farklı konumlar [77].....	37
Şekil 2.19	Hyalüronik asidin kimyasal yapısı ve özellikleri [81]	38
Şekil 2.20	HA'nın yapısı. D-glukuronik asit ve D-N-asetilglukozamin, bir disakkarit oluşturmak üzere β -1,3 bağları (mavi) ile bağlanır. Çoklu	

disakkaritler, HA oluşturmak üzere β -1,4 bağları (kırmızı) ile bağlanır [86].....	41
Şekil 2.21 Literatürde yapılan enzime duyarlı (A) nanokapsül [1] ve (B) polimerzom [6] şeklindeki ilaç salım sistemlerine örnek şematik gösterim.....	41
Şekil 2.22 PBAE'lerin Michael katılması reaksiyonuyla sentezi.....	43
Şekil 2.23 PBAE sentez şeması ve sentez için kullanılan bazı monomerler [107].....	43
Şekil 2.24 Literatürde yapılan HA ve PBAE içeren (A) nanopartikül [11] ve (B) nanojel [12] örneklerinin şematik gösterimi	45
Şekil 2.25 DNA aktarımında kullanılan HA/PBAE içeren nanokompleks yapının şematik gösterimi [112]	45
Şekil 2.26 (a) Bakteriyel hücre zarflarının yapıları ve polimer bazlı antibiyotik salım sistemleri için hedef bölgeler. (b) Bakteriyel biyofilmin yapısal özellikleri ve antibiyotiklere direnci [35]	47
Şekil 2.27 Antimikrobiyal dirençte (solda) ve nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesinde (sağda) yer alan ana mekanizmaların şematik gösterimi [52].....	48
Şekil 2.28 Tetrazin- <i>trans</i> -siklookten Diels-Alder <i>Click</i> Reaksiyonu (a) ve iki molekülün birbirine bağlanmasının şematik gösterimi (b)	51
Şekil 2.29 Tetrazin ve TCO arasındaki IEDDA reaksiyonunun mekanizması	52
Şekil 2.30 Üç kollu yıldız şekilli blok kopolimerlerin IEDDA reaksiyonuyla eldesi [146].....	52
Şekil 2.31 Literatürde IEDDA reaksiyonuyla elde edilen protein yüklü bir hidrojel şematik gösterimi [147].....	53
Şekil 2.32 Canlı hücre görüntülemesinde kullanılan tetrazin konjuge edilmiş kuantum dotlar [148].....	53
Şekil 2.33 IEDDA kimyası kullanılarak tetiklenen ilaç salım örneği [149].....	54
Şekil 2.34 IEDDA reaksiyonuyla elde edilen amfifilik blok kopolimerlerden pH'a duyarlı misel eldesi [10].....	54
Şekil 3.1 <i>tert</i> -Bütil 4-siyanobenzilkarbamat sentezi.....	57
Şekil 3.2 <i>tert</i> -Bütil 4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzilkarbamat (Tz-NH-Boc) sentezi	58
Şekil 3.3 3-Benzilamino-6-metil-1,2,4,5-tetrazin (Tz-NH ₂) sentezi	59
Şekil 3.4 Hiyalüronik asit-tetrazin (HA-Tz) sentezi.....	59
Şekil 3.5 Norbornen çapraz bağlayıcı sentezi	60
Şekil 3.6 Kolistin sülfat (KO) ve vankomisin hidroklorürün (VAN) fluoresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmesi.....	61
Şekil 3.7 Yüzeyler arası (<i>interfacial</i>) tetrazin Diels-Alder <i>Click</i> Reaksiyonu ile HA esaslı nano/mikro-kapsül sentezi.....	62
Şekil 4.1 <i>tert</i> -Bütil 4-siyanobenzilkarbamatın ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	68

Şekil 4.2 <i>tert</i> -Bütil 4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzilkarbamatin (Tz-NH-Boc) ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	69
Şekil 4.3 3-Benzilamino-6-metil-1,2,4,5-tetrazinin (Tz-NH ₂) ¹ H-NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆).....	70
Şekil 4.4 HA-Tz'nin (GB19/1) ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O).....	71
Şekil 4.5 HA-Tz'nin (GB19/5) ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O).....	71
Şekil 4.6 HA-Tz'nin (GB54/1) ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O).....	72
Şekil 4.7 Norbornen çapraz bağlayıcısının ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	73
Şekil 4.8 KO-FITC molekülünün ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O).....	74
Şekil 4.9 KO-FITC (0,3 mg/mL) (a), KO (3,3 mg/mL) (b), VAN-FITC (0,6 mg/mL) (c) ve VAN (0,5 mg/mL) (d) sulu çözeltilerinin UV-Vis spektrumları	74
Şekil 4.10 Sulforhodamine B'nin UV-Vis spektrumu ve kalibrasyon eğrisi	76
Şekil 4.11 pH 7,4 ve pH 5,5'te tampon çözeltiler içerisinde dispers edilen nanokomplekslerin (A: GB74/1; B: GB59/3; C: GB56/4) hidrodinamik boyutları; D: GB56/3 hidrodinamik boyut için, pH 7,4'teki dispersiyonuna seyreltik HCl çözeltisinin eklenmesiyle pH 5,5'e değiştirildi	79
Şekil 4.12 Sükroz, HA, PBAE ve KO-FITC@HA/PBAE'nin FT-IR spektrumu .	80
Şekil 4.13 Nanokompleksin (GB56/3) (a) pH 7,4'teki konsantrasyon değişiminin boyuta etkisi; (b) pH'ın, nanokomplekslerin (4 mg/mL) zeta potansiyelleri üzerindeki etkisi; ve (c) pH 7,4'te nanokompleksin yoğunluğa göre boyut dağılımı	81
Şekil 4.14 HA _D ile hazırlanan nanokompleksin STEM görüntüleri (PBS pH 7,4 ile dispers edilmiş)	83
Şekil 4.15 GB28/6 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin (a) ve floresans şiddetinin (b) grafikleri.....	84
Şekil 4.16 GB28/7 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin (a) ve floresans şiddetinin (b) grafikleri.....	85
Şekil 4.17 GB28/8 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin (a) ve floresans şiddetinin (b) grafikleri.....	87
Şekil 4.18 GB28/9 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin (a) ve floresans şiddetinin (b) grafikleri.....	88
Şekil 4.19 SRB ve hiyalüronidaz enzimi etkileşimi çalışmasına ait UV-Vis spektrumları	90
Şekil 4.20 KO-FITC'e ait PBS pH 7,4 (a) ve PBS pH 5,5'teki (b) kalibrasyon eğrileri için hazırlanan, çeşitli konsantrasyonlardaki örneklerin floresans spektrumları ve kalibrasyon eğrileri	92

- Şekil 4.21** KO-FITC'nin nanokomplekslerinin (GB56/3, HA_D) (a) (GB59/3, HA_Y) (b) pH 7,4 ve pH 5,5 kümülatif salım grafikleri92
- Şekil 4.22** pH 5,5'te antibiyotiğin (KO-FITC), 4,0 mg/mL hiyalüronidaz varlığında HA_Y nanokompleksinden (GB59/3) (I) ve 0,4 mg/mL hiyalüronidaz varlığında HA_D nanokompleksinden (GB56/4) (II) kümülatif salımının karşılaştırılması (a). Hiyalüronidaz enzimi (4,0 mg/mL) varlığında GB59/3'ün koloidal karışımının 48 saatlik salım öncesi (b) ve sonrası (c) görüntüsü. Hiyalüronidaz enzimi (0,4 mg/mL) varlığında GB56/4'ün koloidal karışımının 48 saatlik salım öncesi (d) ve sonrası (e) görüntüsü94
- Şekil 4.23** VAN-FITC'e ait PBS pH 7,4 (a) ve PBS pH 5,5'teki (b) kalibrasyon eğrileri için hazırlanan, çeşitli konsantrasyonlardaki örneklerin floresans spektrumları ve kalibrasyon eğrileri95
- Şekil 4.24** Nanokompleksten (GB74/1) VAN-FITC'nin pH 7,4 ve pH 5,5'te enzimli ve enzimsiz kümülatif salım profilleri95

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Farmakolojik sonuçları etkileyen polimerik nanopartikül özellikleri [42].....	22
Tablo 2.2 Parçacık boyutuna göre atılım ve kullanılan uygulamalar [43].....	22
Tablo 2.3 Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri [46].....	23
Tablo 3.1 Antibakteriyel deneylerde kullanılan bakterilerin kodları ve karakteristik özellikleri	56
Tablo 3.1 Antibakteriyel deneylerde kullanılan bakterilerin kodları ve karakteristik özellikleri (devamı).....	57
Tablo 3.2 Optimizasyon sonrası yapılan nanokapsül sentezinde kullanılan madde miktarları.....	63
Tablo 3.3 Nanokapsül sentezinde kullanılan madde miktarları	63
Tablo 3.4 HA/PBAE nanokomplekslerinin hazırlanmasında kullanılan madde miktarları.....	65
Tablo 4.1 Nanoparçacıkların DLS ve ELS sonuçları.....	75
Tablo 4.2 Süpernatantlardaki toplam boya kütlelerinin hesaplanması	76
Tablo 4.3 Farklı boylarla elde edilen nanoparçacıkların DLS ve ELS sonuçları	77
Tablo 4.4 Nanokomplekslerin boyutları ve zeta potansiyelleri	78
Tablo 4.5 Yaklaşık bir yıl sonra nanokomplekslerin dispersiyon örneklerinin koloidal özellikleri (pH 7,4 PBS'de konsantrasyonu 4 mg/mL olan nanokomplekslerin dispersiyonu -20 °C'de yaklaşık bir yıl saklandı ve DLS ölçümleri yapıldı.)	82
Tablo 4.6 -20 °C'de yaklaşık bir yıl boyunca saklanan liyofilize haldeki nanokomplekslerin koloidal özellikleri (-20 °C'de saklanan liyofilize örnekler bir yıl sonra pH 7,4 PBS'de 4 mg/mL konsantrasyonda yeniden dispers edildi ve DLS ölçümleri alındı)	82
Tablo 4.7 Sulforhodamine B'nin enzimle etkileşiminin incelenmesinde kullanılan madde miktarları	89
Tablo 4.8 Nanokomplekslerden ilacın 24 saatteki kümülatif salım değerleri.....	91
Tablo 4.9 KO ve nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesi. Petri kaplarının MIC ve MBC değerlerinin belirlendiği görüntüler.....	96
Tablo 4.9 KO ve nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesi. Petri kaplarının MIC ve MBC değerlerinin belirlendiği görüntüler (devamı)	97
Tablo 4.10 VAN ve nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesi. Petri kaplarının MIC ve MBC değerlerinin belirlendiği görüntüler.....	99

Hiyalüronik Asit Esaslı Mikro/Nano Boyutlu Antibakteriyel İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Enzim ve pH'a Duyarlılıklarının İncelenmesi

Gülşah BAKIRDÖĞEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serap DERMAN

Eş-Danışman: Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ

Antimikrobiyal direnç (AMR), günümüzde dünya çapında insan sağlığını tehdit eden en önemli unsurlardan biri haline gelmiştir. Bu sorunun ortadan kaldırılması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar arasında ise lokal ve isteğe bağlı salım yeteneğine sahip yeni ilaç salım sistemleri, AMR'nin önlenmesinde umut verici yaklaşımlardan biridir. Bu bağlamda tez kapsamında, bakteri enzimi varlığında veya pH ile tetiklenerek ilaç salımı yapabilecek, nano yapıları polimerik ilaç taşıyıcı bir sistemin geliştirilmesi ve biyolojik etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiş ve iki farklı sistem geliştirilmiştir. İlk olarak hiyalüronik asit temelli nanokapsül yapıları bir sistem tasarlanmıştır. Bu sistemin hazırlanmasında yüzeyler arası (*interfacial*) tetrazin Diels-Alder *Click* Reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Boya yüklü nanokapsüller sentezlenmiş ve bu yapıların enzimle salım davranışları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda alternatif bir yöntem ve yapı geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Tasarlanan bu alternatif çalışmada negatif

yüklü olan hiyalüronik asit (yüksek veya düşük moleküler kütleli) ile pozitif yüklü ve pH'a duyarlı olan poli(β -amino ester) arasında fiziksel etkileşimle gerçekleştirilen, içerisinde antibiyotik (kolistin sülfat veya vankomisin) yüklü olan nanokompleksler elde edilmiştir. Sentezlenen maddeler NMR, FT-IR ve UV-Vis spektroskopileri ile karakterize edilmiştir. Boyut ve topolojik karakterizasyonları dinamik ışık saçılımı (DLS) ve taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) ile yapılmıştır. Elde edilen yapıların antibiyotik salım çalışmaları enzim ve pH duyarlılığı kapsamında floresans spektroskopisi ile incelenerek sistemin antibakteriyel aktivitesi tayin edilmiştir. Antibiyotik yüklü nanokomplekslerin, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı önemli ölçüde daha fazla etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesiyle, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecek etkili bir ilaç salım sistemi geliştirildiği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: İlaç taşıyıcı sistem, hiyalüronik asit, nanokompleks, poli(β -amino ester), antibiyotik.

Development of Hyaluronic Acid Based Micro/Nano Sized Antibacterial Drug Delivery Systems, Investigation of Enzyme and pH Responsivity

Gülşah BAKIRDÖĞEN

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serap DERMAN

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ

Antimicrobial resistance (AMR) has become one of the most important threats to human health worldwide today. There are various efforts for elimination of this serious issue. Among these efforts, novel drug delivery systems with ability of local and on-demand delivery are one of the promising approaches for preventing AMR. In this regard, within the scope of thesis, it is aimed to develop a nano-structured polymeric drug delivery system that can be triggered in the presence of bacterial enzyme and pH, and to evaluate its biological effectiveness. In this context, two different systems have been developed. First, a hyaluronic acid-based nanocapsule system was designed. In the preparation of this system, the interfacial tetrazine Diels-Alder Click Reaction method was used. Dye-loaded nanocapsules were synthesized and the enzyme release behavior of these structures was investigated. According to the preliminary results, an alternative structure and approach was developed to improve the system. In the second approach, the nanocomplexes loaded with antibiotics (colistin sulfate or vancomycin) were obtained by physical interaction between negatively charged hyaluronic acid (high or low molecular mass), and positively charged and pH sensitive poly(β -amino

ester). The synthesized intermediate molecules and polymers were characterized by NMR, FT-IR and UV-Vis spectroscopy. Dimensional and topological characterizations of particulate structures were made by dynamic light scattering (DLS) and a scanning transmission electron microscopy (STEM). Antibiotic release potentials of the obtained structures were examined by fluorescence spectroscopy in terms of enzyme and pH sensitivity, and the antibacterial activity of the system was determined. It has been observed that the nanocomplex loaded with the antibiotics exhibited significantly greater efficacy against *E. coli* and *S. aureus*. By evaluating the results, it has been revealed that an effective drug delivery system that can be used in the treatment of infectious diseases has been developed.

Keywords: Drug delivery system, hyaluronic acid, nanocomplex, poly(β -amino ester), antibiotic.

1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda dünya çapındaki en büyük sağlık sorunlarından biri olan bakteriyel enfeksiyonlar için kullanılan tedavi yöntemlerinden en yaygını antibiyotiklerdir. Fakat antibiyotiklerin aşırı kullanımı bakteriyel direncin artmasına ve böylelikle terapötik etkinliğin azalmasına neden olmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarla bu problemin çözülmesi için nano boyutlu parçacık yapılı ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir [1, 2]. Bu sistemler sayesinde antibiyotiğin lokal olarak hedeflenmesi sağlanırken aynı zamanda ilacın vaktinden önce salımı da engellenmektedir. Enfeksiyon bölgesindeki bakteriyel toksinler, enzim fazlalığı ve düşük pH gibi tetikleyici durumlar göz önüne alınarak yapı dizayn edilebilir [3]. Yara bölgesinde yer alan bakteriler, yara eksudası içerisinde planktonik hücreler veya biyofilm matrisinin içinde korunan sessiz hücreler olarak bulunabilirler [4]. Antibiyotiğin belirlenen bölgeye lokal salımı için çeşitli yöntemlerin geliştirildiği ve mevcut sistemlerin de iyileştirildiği literatürdeki çalışmalarda görülmektedir. Bu uygulamalar içerisinde, enfeksiyonel bir durumda biyolojik uyarana cevap olarak antibiyotik veya antimikrobiyal bileşiğin ortama salındığı sistemler de yeni uygulanan yöntemlerdendir [5].

Omurgalı canlılarda ve bakterilerde de bulunan hiyalüronik asit (HA), D-glukuronik asit ile D-N-asetilglukozaminin β -1,4 ve β -1,3 glikozid bağlarıyla birbirine tekrarlayarak bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir. Hücre dışı matriksin (ekstraselüler matriks, ECM) bileşenlerinden biri olan HA, hücre dışı doku desteği, yara iyileştirme, hücre göçünde etkin görev alma ve matriks düzenleme etkileri gibi çeşitli doğal biyolojik özelliklere sahiptir. *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türü bakteriler de dahil birçok enfeksiyon kaynağı mikroorganizma türü tarafından salınan hiyalüronidaz enzimi varlığında parçalanmaktadır. Bu enzimin hücre dışı ortamdaki HA'yı parçalayıp patojenez etki göstermesi [6, 7], kontrollü antimikrobiyal terapötik salım için kullanılmasına olanak sağlamaktadır [1, 8].

Ancak, HA gibi biyomoleküllerin doğal ortam koşullarında çalışabilmek, aktivite kaybı yaşamadan biyomolekülleri modifiye etmek veya biyolojik kaynaklı terapötik ajanları kimyasal reaksiyon varlığında enkapsüle etmek, biyolojik sistemlerin karmaşıklığından dolayı zordur. Bu zorluklardan dolayı ihtiyaç haline gelen ve biyoortogonal reaksiyonlar olarak bilinen teknoloji son yıllarda ortaya çıkmış ve biyolojik moleküle herhangi bir zarar vermeden seçici olarak modifikasyon yapılmasına izin vermiştir. Biyoortogonal reaksiyonlar yüzlerce fonksiyonel grubun bulunduğu biyolojik ortamlardaki kompleks biyokimyasal reaksiyonlardan etkilenmedikleri gibi biyokimyasal reaksiyonlar üzerine herhangi bir olumsuz etki de göstermemektedirler [9]. Bu nedenle bu tez çalışmasında biyoortogonal reaksiyonlar içerisinde, son yıllarda geliştirilmiş ve literatürdeki en hızlı konjugasyon yöntemi olan Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder (IEDDA) *Click* Reaksiyonu tercih edilmiştir. Reaksiyonun çok hızlı oluşu, yüksek hızlı bağlanmanın gerekli olduğu yüzeyler arası polimerizasyon reaksiyonlarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Poli(β -amino ester) (PBAE) ise, biyolojik sistemlerle uyumlu olarak kullanılabilen sentetik polimerlerdendir. Toksik olmaması, fonksiyonlandırılabilir, biyouyumlu ve biyobozunur olması özellikleriyle sıklıkla tercih edilmektedirler. Biyobozunur ester bağları sayesinde bazik veya asidik koşullar altında toksik olmayan daha küçük moleküllere ayrışabilirler ve böylece nekroz ve apoptozun neden olduğu sitotoksiteyi azaltırlar. Bu nedenle de terapötik uygulamalar için uygun moleküllerdir. Ayrıca, PBAE'ler yapılarında taşıdıkları aminler vasıtasıyla pH'a duyarlı polimer olarak da ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadırlar [10].

HA ve PBAE moleküllerinin birlikte kullanıldığı çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler literatürde görülmektedir. Örnek olarak, ilaç taşıyıcı bir sistemde PBAE çekirdeğine ve HA kabuğuna sahip bir nanopartikül yapısı [11], CD44 reseptörünü hedefleyen HA ve pH'a duyarlı PBAE içeren nanojel sistemi [12] ve hiperdallanmış yapıdaki PBAE ile tiyol fonksiyonel HA arasında tiyol-en *Click* reaksiyonu ile elde edilen enjekte edilebilir hidrojel uygulaması [13] verilebilir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, enzim veya pH'a duyarlı, bakteri varlığında tetiklenerek ilaç (antibiyotik) salımı yapabilecek, nano yapıları polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin

geliştirilmesi ve biyolojik etkinliğinin değerlendirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda *Staphylococcus* ve *Streptococcus* türü bakteriler de dahil birçok enfeksiyon kaynağı mikroorganizma türü tarafından salınan hiyalüronidaz enzimi varlığında parçalanabilen ve bu etki ile içerisinde barındırdığı antibiyotiği salabilen HA temelli nanokapsül yapıları bir salım sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu sistemin hazırlanması için yüzeyler arası (*interfacial*) tetrazin Diels-Alder *Click* Reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Geliştirilen sistemin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde potansiyeli yüksek bir salım sistemi olacağı düşünülmektedir. Bu tür mikroorganizmaya özel ilaç salım sistemi sayesinde antibiyotik lokal olarak hedeflenmesi ve ilacın mikroorganizma varlığında salımı gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde antibiyotik zamanında verilmesi sağlanacak ve sistemik dolaşım içerisine yapılan salımda karşılaşılan yan etkiler veya antibiyotik direncinin oluşması gibi sorunların önüne geçme potansiyeli olan bir sistem geliştirilmiş olacaktır.

Bu amaçlar doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar sonrasında, aşağıda detayları verilen nedenlerden dolayı arzu edilen etkinliğe ulaşılamamıştır. Tasarlanan yapının kısmen elde edilmesi, fakat enzimle çalışmalar sırasında model sistemin enzimle birlikte kompleks davranışlar göstermesi, aynı amaç için farklı bir yöntemle farklı bir yapıya geçilmesine neden olmuştur. Bu doğrultuda, fiziksel etkileşimle bir nanokompleks oluşturulması ve elde edilen yapının hem pH'a hem de enzime duyarlı olması ile bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılması tezin nihai hedefi olmuştur. Bunun için negatif yüklü HA (yüksek veya düşük moleküler kütleli) ile pozitif yüklü ve pH'a duyarlı olan PBAE arasında fiziksel etkileşimle elde edilecek nanokompleks içerisine antibiyotik (kolistin sülfat veya vankomisin) yüklenmesi hedeflenmiştir. Yine bu sayede lokal hedeflenme sağlanarak ilacın vaktinden önce salımını engelleyebilecek bir potansiyel yapı ortaya konmuştur. Elde edilen nanokomplekslerin antibiyotik salım çalışmaları, yapıların enzim ve pH duyarlılığı kapsamında incelenmiş ve sistemin antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir.

1.3 Hipotez

HA, hücre dışı matriksin bileşenlerinden biri olup, benzersiz moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleriyle hücre içi aktivitelerde, inflamasyonun

başlatılmasında, yara iyileşmesinde ve çeşitli biyokimyasal süreçlerde etkilidir. Üzerinde bulunan karboksil ve hidroksil gibi fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilebilir ve ilaç salım sistemlerinde kullanılabilirler. Bu sayede elde edilen sistemin biyoyumluluğunu ve biyobozunurluğunu geliştirerek etkin bir yapı sunarlar. Aynı zamanda antimikrobiyal özelliği sayesinde de ilaç salım sistemlerinde tercih edilmektedirler. Bu özelliklerinin yanı sıra, çeşitli enfeksiyon kaynağı mikroorganizma türleri tarafından salınan hiyalüronidaz enzimi varlığında parçalanmaları, tez kapsamında geliştirilen bakteri varlığında tetiklenerek ilaç salımının yapılabilceği bir sistemde kullanılmasında avantaj sağlayacaktır. Tasarlanan HA esaslı nanokapsüller, ilk defa yüzeyler arası (*interfacial*) tetrazin Diels-Alder *Click* Reaksiyonu vasıtasıyla sentezlenecektir. Farklı *Click* reaksiyonları kullanılarak bu tür nanokapsüller elde edilmesine [1] rağmen özgün bir şekilde ilk defa tetrazin reaksiyonu ile sentezlenecektir. Bunun için öncelikle HA'nın tetrazin ile modifiye edilmesi ve bifonksiyonel norbornen çapraz bağlayıcısı ile sulu dispersiyon ortamında çapraz bağlı yapıların elde edilmesi tasarlanmıştır. Elde edilecek sistemin içerisine yüklenen antibiyotiğin serbest antibiyotiğe kıyasla daha etkili olacağı hipotezi savunulmaktadır. Buna göre öncelikle nanokapsüllere model boya yüklenmiş ve yapıların enzimle salım çalışmaları değerlendirilmiştir.

PBAE molekülleri pH'a duyarlı, fonksiyonlandırılabilir, biyoyumlu ve biyobozunur yapılardır. Biyobozunur ester bağlarına sahip olmaları, bazik veya asidik koşullar altında parçalanabilmesine ve toksik olmayan daha küçük moleküllere ayrışmasına olanak sağlar. Bu nedenle de terapötik uygulamalar için uygun moleküller olduğu ve kanser ilaçları, antimikrobiyaller, proteinlerin taşınması ve doku onarımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanıldığı literatürde görülmüştür. Üzerinde bulunan pozitif yükler sayesinde negatif yüklü moleküllerle kompleks yapma özelliğine sahiptir. Bu sebeplerle, yine serbest antibiyotiğe göre daha etkili bir yapının elde edilmesi hipotezi kapsamında gerçekleştirilecek ikinci çalışmada, PBAE polimerlerinin kullanılması tercih edilmiştir. PBAE'lerin hem negatif yüklü HA ile kompleks yapma hem de pH'a duyarlılık özelliklerinden yararlanılmıştır. Aljinat/PBAE [14, 15] ve HA/kitosan [16] dahil olmak üzere çeşitli kompleks sistemler kullanılmış olmasına rağmen, kompleks HA/PBAE malzemelerinin antibiyotik salımı için kullanımına dair bir

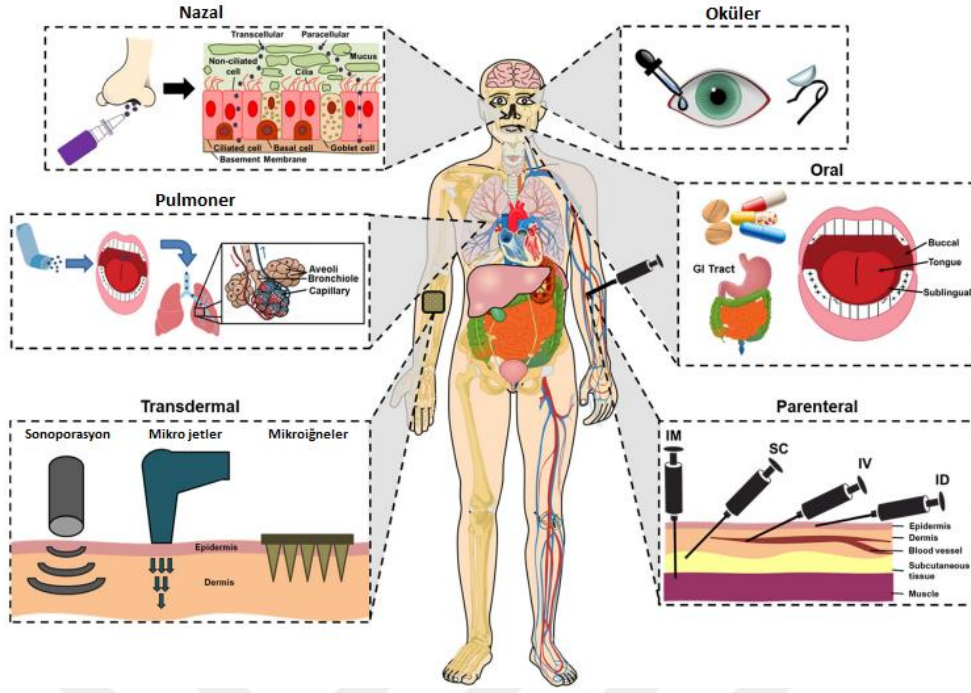
rapor bulunmamaktadır. Bunun için öncelikle negatif yüklü ve enzime duyarlı HA ile pozitif yüklü ve pH'a duyarlı PBAE arasında fiziksel etkileşimle bir nanokompleks oluşturulması ve içerisine antibiyotik yüklenmesi planlanmıştır. Böylelikle hedefe yönelik, bakteri enfeksiyonu ortamında salımın yapılabileceği potansiyel bir yapı ortaya konmuştur. Alternatif olarak geliştirilen bu nanokompleks yapılı taşıyıcıların salım çalışmaları incelenmiş ve sistemin antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir.



2.1 İlaç Salım Sistemleri

Geçmişten günümüze hastalıkların tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bitkisel ilaçların kullanıldığı 1900'li yılların başından sonra sentetik kimyadaki gelişmeler ışığında 1940'lı yıllarda antibiyotiğin keşfi gerçekleşmiştir. 1950'lerin başında ise ilaçlar, uygulamanın daha basit olması ve sürekli, kontrollü bir terapötik etki için ilk kez mikrokapsüller halinde formüle edilmiştir. “Spansules®” denilen ilaç, çeşitli kalınlıklarda kaplamalarla çevrili ilaç pelletleri içeren mikrokapsüller olup, bu sayede salım süresini uzatmayı başarmıştır. Böylece ilaç salımının temeli atılmıştır [17].

İlaç salım sistemleri parenteral, oral, transdermal, nazal gibi geleneksel ilaç uygulama yöntemlerinin (Şekil 2.1) sınırlamalarını hafifletmeyi amaçlar. İlaçların hedefe ulaşmasında çeşitli güçlükler ortaya çıkabilir. Bunlardan en çok kullanılanı oral uygulamada, mükemmel hasta uyumu bulunmaktadır. Fakat, ağızdan dağıtımda, ağız boşluğu, mide ve bağırsakların zorlu ortamlarının yanı sıra bağırsağın epitel mukozal tabakası boyunca zayıf taşıma, karşılaşılan zorluklardandır. Ayrıca, sistemik absorpsiyondan sonra, ağız yoluyla alınan ilaçlar, bağırsak ve karaciğer enzimleri tarafından ilk geçiş metabolizmasına maruz kalır. Bu da ilacın bozulmasına ve kandaki ilaç konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Oral uygulama dışında parenteral yol ise, etkili ilaç konsantrasyonlarına hızlı bir şekilde ulaşılmasını sağlar ancak enjeksiyon bölgesinin ağrısı nedeniyle hasta uyumunun zayıf olmasına neden olur. Transdermal dağıtımda hasta uyumu yüksektir, fakat kullanılan ilaçların küçük ve lipofilik olması bu yöntemin sınırlanmasına neden olur. İşte bu nedenlerle ilaç salım sistemleri; ilacın etkinliğini arttıran, olumsuz yan etkileri önleyen, düşük hasta uyumunu ele alan ve biyolojik engelleri aşan yeni uygulama yöntemlerini mümkün kılmayı amaçlamaktadır [18].

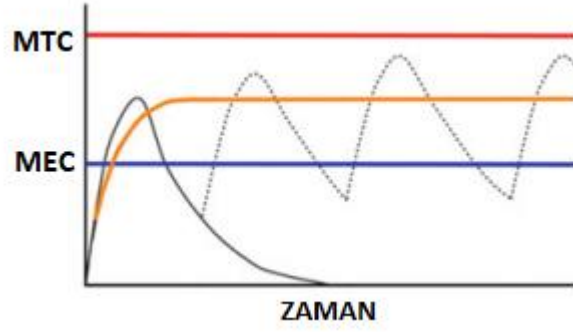


Şekil 2.1 İlaçların geleneksel uygulama yolları [18]

2.1.1 Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

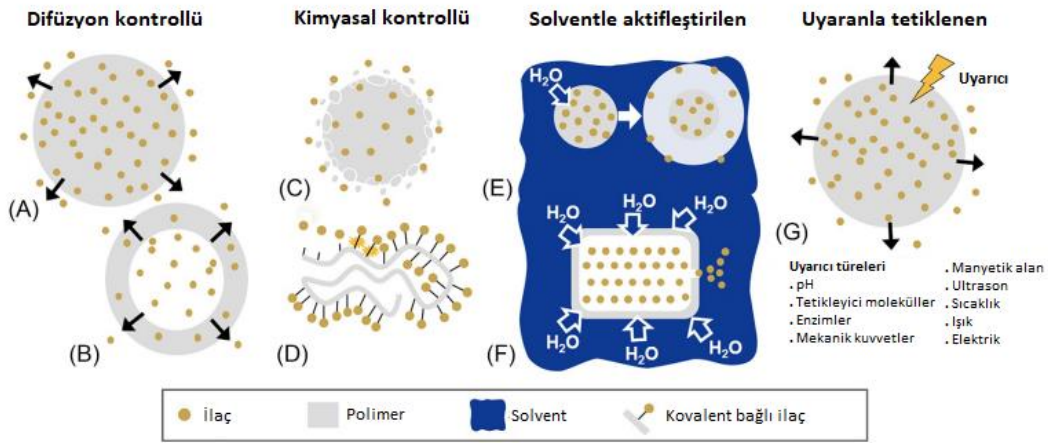
İlaç salımında temel hedefler, ilacın uygulandığı bölgeden hastalıklı bölgeye etkin ve spesifik bir şekilde ulaştırılması, yan etkilerin en aza indirilmesi, maliyetlerin azaltılması ve sağlıklı komşu hücrelere zarar vermeden hastalıklı hücrelere etki etmesidir [19]. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ise bu hedeflere ek olarak genellikle amaç, ilacın uzun sürede, sabit bir hızda (*zero-order*) kontrollü ve sürekli salınmasıdır [20]. İlaç konsantrasyonunun etkili olması ve toksik olmaması için, minimum etkili konsantrasyon (MEC) ve maksimum toksik konsantrasyon (MTC) olarak adlandırılan iki eşik değer arasında olması gerekir. Genellikle bir ilaç üç şekilde salınır (Şekil 2.2):

- 1) Ani salım (*burst release*); ilacın hedeflenen ortamda çözünmesi ve tüm miktarının salınmasıdır.
- 2) Periyodik salım; bir ilacın periyodik olarak salındığı ve konsantrasyonunu iki eşik arasında yüksek dalgalanmayla koruduğu salımdır.
- 3) Sıfır dereceli (*zero-order*) salım; ilacın uzun bir süre boyunca önemli bir değişiklik olmaksızın sabit bir konsantrasyonda salınmasıdır [21].



Şekil 2.2 Bir ilacın taşıyıcıdan üç tür salım kinetiği, ani salım (siyah düz çizgi), periyodik salım (siyah kesikli çizgi) ve sıfır dereceli salım (turuncu çizgi) [21]

İlaç salım sistemleri mekanizmalarına göre genel olarak dört sınıfa ayrılır. Bunlar difüzyon kontrollü, kimyasal kontrollü, solventle aktifleştirilen ve manyetik kontrollü salım sistemleridir (Şekil 2.3) [20].



Şekil 2.3 İlaç taşıyıcı sistemlerin salım mekanizmasına göre sınıflandırılması.

Difüzyon kontrollü sistemler (A) matris veya (B) rezervuar bazlı olabilir; kimyasal olarak kontrol edilen sistemlerde ilaç (C) yüzey erozyonuyla veya (D) yan zincirli polimerik sistemlerden salınabilir; solventle aktifleştirilen sistemler ilacı (E) şişme veya (F) ozmotik basınçla serbest bırakır; ve (G) uyarılarla tetiklenen sistemler, bazı dış veya çevresel uyarılarla ilacı serbest bırakır [20]

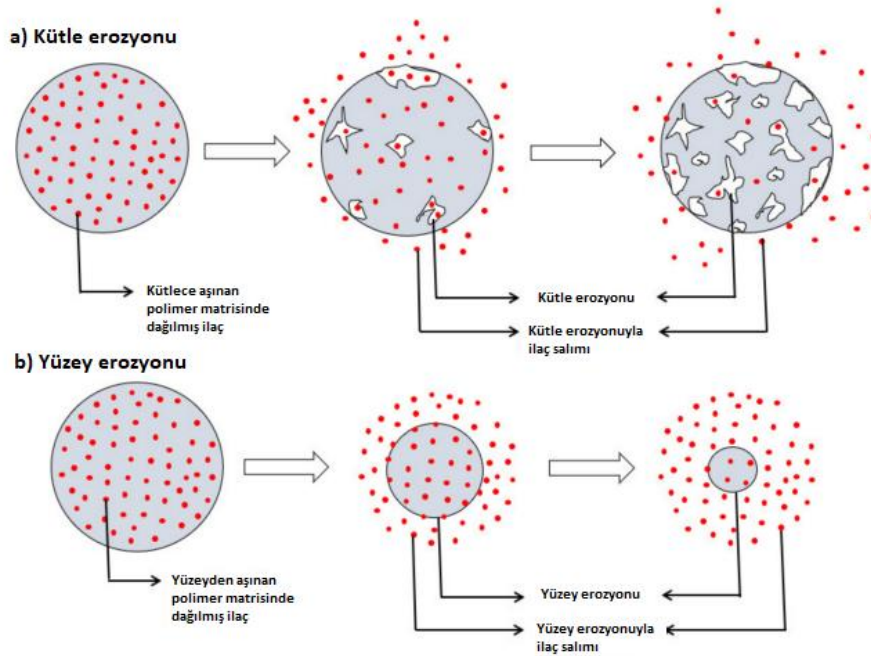
2.1.1.1 Difüzyon Kontrollü Salım Sistemleri

Difüzyon kontrollü salım sistemleri, ilacın polimer bir fazda dağıldığı matris sistemi (Şekil 2.3-A) ya da bir polimerin ilaç moleküllerini çevrelediği rezervuar sistemi (Şekil 2.3-B) şeklinde olabilir. İlaçların polimer matris ve/veya gözenekli kanallar yoluyla difüzyonu, salım hızını sınırlar. Bu sistemlerin matematiksel modellemesi, salım sisteminin türüne (matris ya da rezervuar), polimer fazın gözenek boyutuna (gözeneksiz, mikro gözenekli veya makro gözenekli), salım

sistemindeki ilacın çözünürlüğüne (çözünmüş ya da dağılmış) ve salım sisteminin geometrik özelliklerine bağlıdır [20].

2.1.1.2 Kimyasal Kontrollü Salım Sistemleri

Bu sistemlerde taşıyıcılar, hidroliz, enzimatik parçalanma ya da diğer *in vivo* kimyasal mekanizmalar sonucunda vücutta parçalanarak, kimyasal yapılarının değiştiği biyobozunur polimerlerden yapılırlar. Bu nedenle ilacın salınmasından sonra sistemin ortamdan çıkarılmasına ihtiyaç duyulmaz. Kimyasal kontrollü salım sistemleri, polimer-ilac dispersiyon ve polimer-ilac konjugat sistemleri olmak üzere ikiye ayrılır. Polimer-ilac dispersiyon sistemlerinde ilac, biyobozunur bir polimer içerisinde eşit şekilde dağılır veya çözülür ve fizyolojik koşullar altında polimerlerin parçalanmasıyla salınır. Polimerlerin yığın halinde parçalanmasıyla oluşan kütle erozyonu ve polimerlerin yüzeyden parçalanması veya çözünmesi nedeniyle oluşan yüzey erozyonu olmak üzere iki şekilde bozunma gerçekleşebilir (Şekil 2.4). Polimer-ilac konjuge sistemlerinde (Şekil 2.3-D) ise ilac, polimere kovalent bağlanma veya polimerin omurgasına aşılama yoluyla kimyasal olarak konjuge edilir. İlac, fizyolojik koşullar altında polimer-ilac bağlarının ayrılmasıyla salınır [22].



Şekil 2.4 Kütle ve yüzey erozyonu şematik gösterimi [22]

2.1.1.3 Çözücüyle Aktifleştirilen Salım Sistemleri

Çözücüyle aktifleştirilen salım sistemleri, ozmotik basınç kontrollü ve şişme kontrollü olmak üzere ikiye ayrılır. Bir çözücünün, şişme veya ozmoz yoluyla polimerik salım sistemine nüfuz etmesiyle ilaç salımı kontrol edilir [20].

Şişme kontrollü salım

İlaç, camsı haldeki hidrofilik polimer içerisinde dağılır veya çözülür. Sulu bir çözeltide, su polimerik matrisin içine girerek onun şişmesine ve ilacın salınmasına olanak sağlar. İdeal bir şişme kontrollü sistem, polimerin sadece şişmiş bölgelerinde ilaç salımına izin verir [20, 22].

Ozmotik basınç kontrollü salım

Bu sistemlerde salım mekanizması ozmotik basınca dayanır. En basit şekli, yarı geçirgen, rijit bir membranla enkapsüle edilmiş, içerisinde dağılmış ya da çözünmüş ilaç bulunan bir rezervuardan oluşan sistemdir (Şekil 2.3-F). Burada ilacın kendisi ozmozı yönlendirir. Ozmoz, yarı geçirgen bir zarıdan çözücünün, madde konsantrasyonunun düşük olduğu yerden yüksek olduğu yere doğru hareket etme durumudur [22]. Su, yarı geçirgen membrandan girerek ilacı bir delikten dışarı doğru hareket ettirir. İlacın bu şekilde hareket etmesi, suyun akışının uyguladığı ozmotik basınç sayesinde gerçekleşir [20].

2.1.1.4 Manyetik Kontrollü Salım Sistemleri

Manyetik kontrollü salım sistemleri, ilk olarak ayrı bir sınıf olarak oluşturulmuştur. Fakat uyaranla tetiklenen ilaç salım sistemlerine dahil edilebilir (Şekil 2.3-G). Bu tip salım sistemleri, manyetik alan, ultrason, sıcaklık, ışık veya elektrik gibi dış uyaranlara veya pH, tetikleyici moleküller ve enzim gibi çevresel uyaranlara yanıt olarak, difüzyonu veya erozyonu hızlandırarak ilacı serbest bırakır veya salım hızını artırır. Aynı zamanda ilacın lokal olarak salınmasına olanak sağlarlar [20].

2.1.2 Enzime Duyarlı Salım Sistemleri

Bu sistemlerde enzimler tetikleyici olarak kullanılır. Substrata özgü olmaları ve ılıman koşullarda (düşük sıcaklık, nötr pH değeri vb.) oldukça seçici olmaları gibi benzersiz özelliklere sahiptirler. Enzimlerin biyolojik ve metabolik süreçlerle ilişkili olması, inflamasyon bölgesinde enzime duyarlı ilaç salımının

kullanılabilmesine olanak sağlar [22]. Farklı patolojik durumlarda ve birçok hastalıkta enzim ifadesi (ekspresyonu) ve aktivitesi düzensiz şekilde gözlenmiştir. Örneğin, katı tümörlerde proteazlar, peptidazlar ve lipazlar gibi çeşitli enzim türlerinin ekspresyonu, normal dokulardaki konsantrasyonlarıyla karşılaştırıldığında genellikle daha yüksektir, çünkü bu enzimlerin yüksek konsantrasyonları, tümör hücresi büyümesinde, anjiyogeneizde, invazyon ve metastazda çok önemli bir rol oynar. Düzensiz enzimler, farklı kanser türlerinde ve evrelerinde teşhis ve öngörü (prognostik) için biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle de hedefe yönelik kanser tedavisinde biyolojik tetikleyici olarak kullanılabilirler. Ayrıca, enzimler kendi substratları için olağanüstü bir seçiciliğe sahiptirler. Bu özellikler sayesinde, son yıllarda, polimerik nanopartiküller, lipozomlar, inorganik nanopartiküller dahil olmak üzere, seçici ve etkili hedefe yönelik ilaç salımı için enzime duyarlı birçok sistem geliştirilmiştir [23].

Kanser dışında, enfeksiyon kaynaklı hastalıklarda da enzim düzensizliği söz konusudur. Sağlıklı dokulardan farklı olarak bakteriyel enfeksiyonların mikroortamı, düşük pH, yüksek hidrojen peroksit (H_2O_2), fazla miktardaki enzimler ve toksinler açısından benzersizdir. Örneğin bakteriler, fibrinin doku matrikslerini parçalamak için hiyaluronidaz, kollajenaz, nöraminidaz ve streptokinaz gibi birçok hücre dışı enzimi salgırlar. Fosfolipazlar ve lesitinazlar gibi membran parçalayıcı enzimler de bazı bakteriler tarafından üretilir. Bu şekilde bakteriler tarafından kendiliğinden enzimlerin salınması, antimikrobiyal ilaç salımında büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, enzime duyarlı salım sistemlerinin kullanılması, diğer tetikleyici sistemlere göre daha avantajlıdır [24].

2.1.3 pH'a Duyarlı Salım Sistemleri

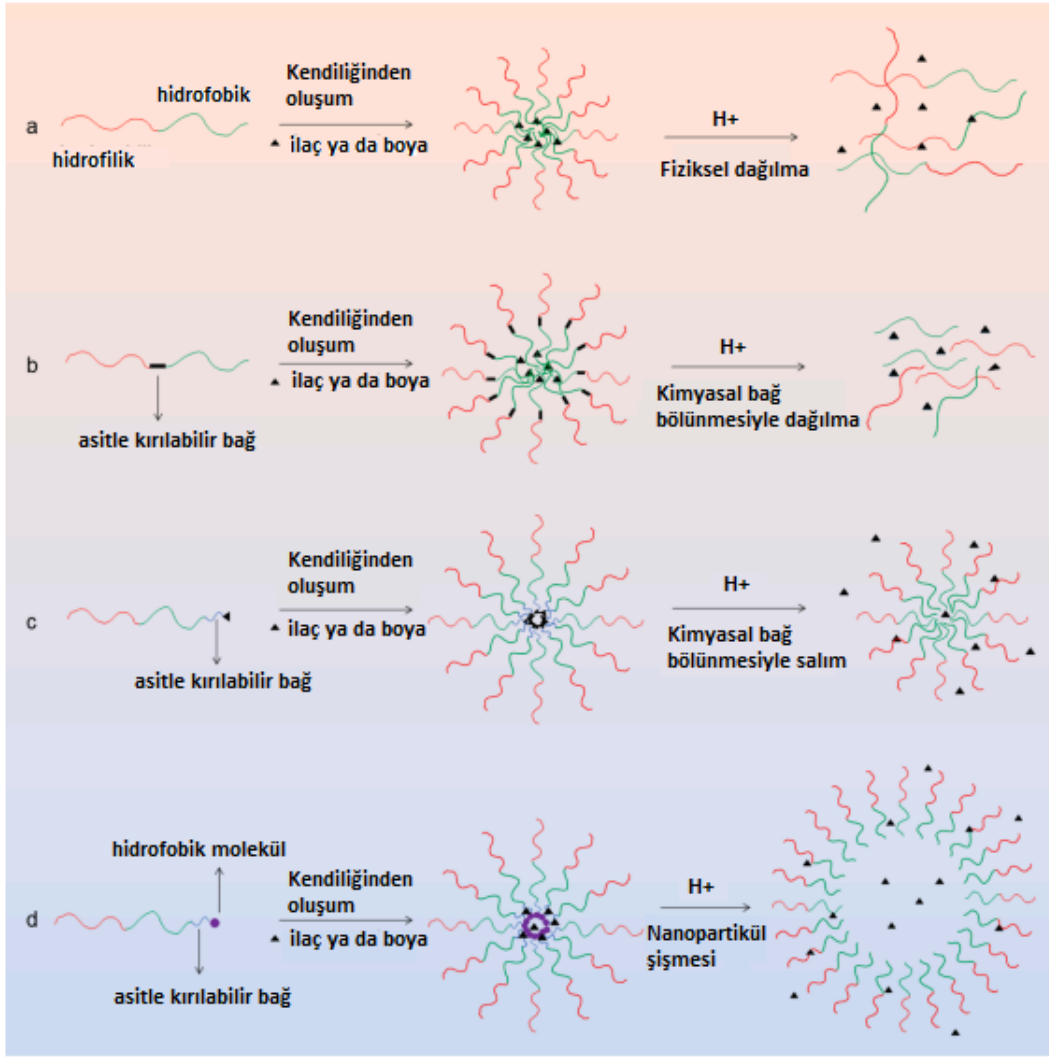
pH'a duyarlı biyomateryeller, pH değişimini algılar ve polimer zincirlerinde fiziko-kimyasal değişikliklere uğrayarak ilacın salınmasını tetikler. pH'a duyarlı polimerler, poliasitler (bazik pH'ta salım) veya polibazlar (asidik pH'ta salım) olabilir [22]. Sindirim sisteminin çeşitli bölümlerinde, farklı organlarda, dokularda ve hücresel bölümlerde pH değerleri geniş bir aralıkta farklılık gösterir. Örneğin pH değerleri, midede 1,5-3,5, ince bağırsakta 5,5-6,8, kolonda ise 6,4-7,0 aralığında değişmektedir. Tümörlerdeki ve inflamatuvar dokulardaki pH değerleri,

kan ve normal dokuların pH'ı olan 7,4'ten daha düşüktür. Yükselen metabolik hızlar ve artan aerobik glikolizin bir sonucu olarak, çoğu katı tümörün mikro ortamı pH 6,5-7,2 aralığındadır. Endozomlar ve lizozomlar gibi asidik hücresel yapılar ise sırasıyla pH 5,5–6,0 ve pH ~4,5–5,0 olmak üzere daha düşük pH değerleri sergilerler. İşte bu şekilde vücuttaki normal ve hastalıklı dokuların pH değerlerinin farklı olması, ilaç salım sistemlerinde hedefe yönelik salımın gerçekleştirilmesi için idealdir. Çünkü ilaç, 7,4 fizyolojik pH değerindeki sistemik dolaşım sırasında inhibe edilir ve sadece hastalıklı hücrenin asidik ortamında salınır [23, 25].

pH'a duyarlı nanosistemler dört farklı şekilde tepki verebilir (Şekil 2.5):

1. Fiziksel ayrılma,
2. Kimyasal bağ bölünmesiyle nanopartikülün ayrılması,
3. Kimyasal bağ bölünmesiyle salım,
4. Nanopartikül şişmesi.

pH duyarlılığı esas olarak iyonlaşabilen grupların protonasyonundan veya polimerik malzemelerdeki kimyasal bağların asit hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, konformasyon veya kimyasal değişikliklerle de elde edilebilmektedir. Moleküler olarak, pH'a duyarlı nanosistemlerin uyarılara cevap verebilirliği, nano çekirdekteki hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, π - π istiflenmesi veya iyonik bağlarla ilişkili olabilir [26].

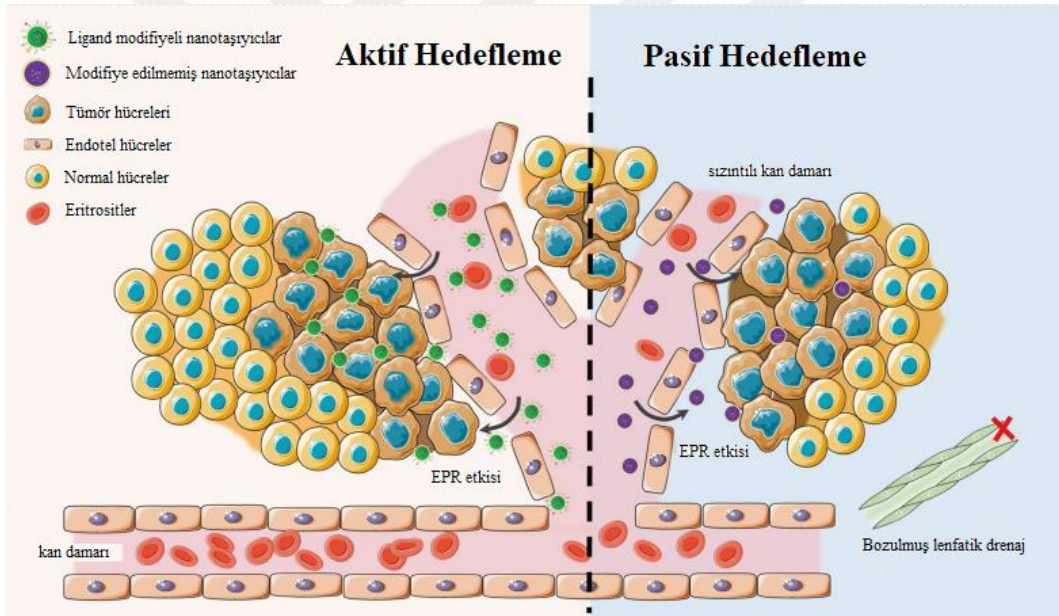


Şekil 2.5 pH'a duyarlı polimerik misellerin salım mekanizmaları. (a) Fiziksel ayrılma; (b) Kimyasal bağ bölünmesiyle dağılma; (c) Kimyasal bağ bölünmesiyle salım; (d) Nanopartikül şişmesi [26]

2.1.4 Hedefleyici İlaç Salım Sistemleri

Hedefleyici ilaç salım sistemlerinde, ilacın hastalıklı bölgeye seçici olarak taşınması, bu bölgede farmakolojik etkilerin artırılması ve tüm vücut üzerindeki olumsuz etkilerin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır. Bir ilacın biyoyoumlu bir polimer ile konjuge edilmesi çözünürlüğün artmasına, ilacın toksik etkilerinin en aza inmesine ve ilacın etki süresinin optimize edilmesine olanak sağlar. Bu da ilacın vücuda verilmesinde kolaylık sağlar. Bunun dışında nanotaşıyıcılar, anatomik bariyerler nedeniyle ilacın nüfuz etmesinin zor olduğu bölgelere ilacın ulaştırılmasında kullanılır. Örneğin kan-beyin bariyeri (BBB) çoğu ilacın içeri girmesine izin vermez. Beyin için seçici bir bariyer görevi görür. Nanoparçacıklar kan-beyin bariyeri dahil birçok bölgeye ve dokulara ulaşabilmektedirler. Bu

nedenle nanotaşıyıcıların hedeflenen dokulara yönelik ilaç salım sistemlerinde kullanımı popüler hale gelmiştir [22]. Nanotaşıyıcılar olarak lipozomlar, polimerik miseller, polimerik nanopartiküller, polimer-ilâç kojugatları, nanojeller, karbon nanotüpler gibi ilâç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemlerin boyutları 300 nm'nin altındadır. İlaç veya gen taşınmasında çok etkilidirler. Bu tür sistemleri kullanmanın en büyük avantajı, ilâç yüklü nanotaşıyıcıların farmakokinetik davranışının, ilâçlar veya genler yerine nanosistemlere bağlı olmasıdır. Genel olarak pasif ve aktif hedefleme olmak üzere iki tür hedefleme vardır [27]. Pasif hedefleme, artan geçirgenlik ve tutma etkisinin (EPR) bir sonucu olarak makromoleküllerin tümör gibi hedeflenen dokularda kararlı bir şekilde birikmesiyle gerçekleşir. Aktif hedefleme ise, nanotaşıyıcı ile hedef hücredeki reseptörler arasında spesifik etkileşimler meydana geldiğinde gerçekleşir (Şekil 2.6) [21].



Şekil 2.6 Aktif ve pasif hedeflemenin şematik gösterimi [28]

2.1.4.1 Pasif Hedefleme

İlacın, taşıyıcı bir sistemle pasif hedeflenerek istenilen bölgeye ulaştırılması fiziko-kimyasal veya farmakolojik faktörlere bağlıdır. Pasif hedeflemede, nanoparçacıkların boyut ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra, tümör damar yapısı, arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi ve tümörün mikroortamı da önemlidir. Tümör dokuları besin ve oksijene ihtiyaç duyduğunda anjiyogenezi uyarır. Tümör hücreleri, molekülleri serbest bırakarak sinyal gönderir ve böylece

çevredeki konakçı dokularda yeni kan damarı oluşumu başlar. Anjiyojenik kan damarları arasındaki boşluklar normal hücreler arasındaki boşluklardan daha geniştir. Kanser endotel hücreleri arasında 300-700 nm'lik boşluklar bulunmaktadır. Değişen damar yapısıyla yetersiz lenf boşaltılır ve bu da EPR etkisinin tetiklenmesine yol açar (Şekil 2.6). Nanopartiküllerin boyutu 100 nm'den fazla olmamalıdır. Tümör dokusu içinde nanopartiküllerin dağılımını etkileyen faktörler dolaşım, yarılanma ömrü, yüzey özellikleri, boyut ve anjiyogenez seviyesidir [29].

Pasif hedeflemede tümör hücrelerini çevreleyen mikroortam da etkilidir. Tümör hücrelerinin hızlı büyümesi ve aşırı çoğalması için yüksek metabolizma hızına ihtiyaç vardır. Ancak vücudun besin ve oksijen kaynağı genellikle tümör dokusunun ihtiyacını karşılamaya yetmez. Böylece tümör hücreleri ekstra enerji kaynağı olarak hipoksik metabolizmayı (glikoliz) kullanır. Bu da pH'ın düşmesine ve asidik bir ortamın oluşmasına neden olur [29].

Pasif hedefleyici ilaç salım sistemleri genel olarak lipozomlar, polimerik nanopartiküller, metal oksit nanopartiküller ve silikon dioksit nanopartiküller gibi çeşitli yapılarda oluşturulmaktadır [30].

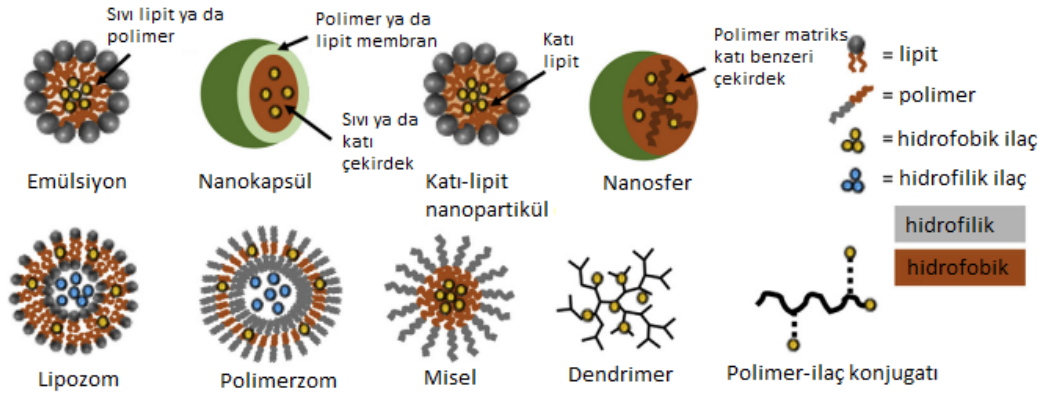
2.1.4.2 Aktif Hedefleme

Kanser veya diğer hastalıkların tedavisinde ilaçların, hedef doku ve hücrelere ulaşması ve çevredeki sağlıklı hücrelere herhangi bir olumsuz etki yapmaması çok önemlidir. Aktif hedeflemenin mekanizması, pasif hedeflemeye göre çok daha gelişmiştir. Kanser hücrelerinde besinleri almak için aşırı eksprese edilmiş reseptörler bulunur ve bunlar sağlıklı hücre reseptörlerinden farklıdır. Aktif hedeflemede, hedef hücre yüzeyinde aşırı eksprese edilmiş reseptörlere uygun ligandlara sahip ilaç içeren nanopartiküller kullanılarak hedef doku veya hücrelere ulaşılır. Nanopartiküllerin *in vivo* olarak aktif hedeflenmesinde öncelikle EPR etkisi gözlenir ve daha sonra yüzey modifikasyonlarıyla hedeflenen tümör bölgesine ulaşılır (Şekil 2.6) [19, 30]. Aktif hedeflemeden sorumlu etkileşimler genel olarak üç ana sınıfa ayrılır: karbonhidrat-lektin, antikör-antijen ve ligand-reseptör. Nanopartiküllerin hedefleme kısımları olarak karbonhidratlar, antikörler, peptitler veya küçük moleküller kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda hedefleme

kısımında birden fazla bağlanma bölgesinin varlığının daha iyi biyolojik tanıma ve reseptör aracılı endositoz sağladığı da ortaya çıkmıştır [29].

2.2 İlaç Salımında Taşıyıcıların Sınıflandırılması

İlaç taşıyıcıları sahip oldukları şekillerine, geometrilerine ve üretim yöntemlerine göre sınıflandırılabilirler [31]. İlaç salım sistemlerinde ilaçlar çözülebilir, sistemin içine hapsedilebilir, kimyasal olarak bağlanabilir ya da sistem üzerinde adsorbe edilebilir. Elde edilen sistemden ilacın salımı difüzyon, çözünme veya şişme yoluyla olabilir [18]. Şekil 2.7’de ilaç salım sistemlerinde kullanılan çeşitli yapılar gösterilmiştir.



Şekil 2.7 İlaç salım sistemlerinde kullanılan çeşitli yapılar [18]

2.2.1 Lipozomlar

Lipozomlar bir veya daha fazla çift fosfolipid tabakasından oluşan küresel keseciklerdir (Şekil 2.7). Bu sistemler hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları aynı anda taşıyabilirler. Buna göre çekirdek kısmına hidrofilik ilaç, çift fosfolipid tabakasına da hidrofobik ilaç yüklenebilir. En önemli avantajları, kararlılığın artması ve enkapsüle edilmiş ilacın toksisitesinin azalmasıdır. Lipozom tabakaları hücre zarıyla çok benzer ve biyouyumlu olduğundan, hedef hücre zarlarıyla doğrudan kaynaşabilirler. Bu kesecikler biyolojik olarak inert, biyobozunur, antijenik olmayan ve pirojenik olmayan yapılardır. Farmasötik, kozmetik ve nutrasötik uygulamalarda kullanılan ilaç taşıyıcılarıdır. Lipozomların en temel sorunu üretimiyle alakalıdır. Üstelik kullanılan hammaddeler pahalıdır [31].

2.2.2 Polimerzomlar

Lipozomlar çift tabakalı yapılar halinde kendiliğinden birleşen amfifilik lipidlerden oluşurken, polimerzomlar ise amfifilik kopolimerlerden oluşur (Şekil 2.7). Polimerzom formülasyonları karmaşıktır ve düzgün bir dağılım sağlamak hidrofilik bloğun ağırlık oranına bağlıdır. Lipozomlara göre daha kararlıdır. Polimerzomlarda da hem hidrofilik hem de hidrofobik yapılar taşınabilir. Bu sayede tedavi ve teşhis için aynı anda kullanılacak bir sistem hazırlanabilir. Polimerzomlar, protein (monoklonal antikorlar ve antikor parçaları dahil), peptit, küçük organik molekül, karbonhidrat ve aptamer yapıları kullanılarak fonksiyonel hale getirilebilirler. Fonksiyonelleştirilmiş polimerzomlar da kanser, inflamasyon ve beyin hastalıkları gibi farklı hastalıklarda terapötik amaçlarla kullanılabilir. Diğer taşıyıcılara benzer şekilde polimerzoma ilaç yüklenmesi de, taşıyıcının çift tabakası veya çekirdeği ile ilaç arasındaki etkileşime bağlıdır. Polimerzomların biyoyumlu ve biyobozunur olması gerekir [18, 32].

2.2.3 Polimerik Miseller

Polimerik miseller nano boyutlu (5-100 nm), amfifilik blok kopolimerlerden oluşan ve genellikle kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üzerinde sulu ortamlarda kendiliğinden oluşan kolloidal parçacıklardır (Şekil 2.7). Hidrofilik bir kabuk ve hidrofobik bir çekirdekten meydana gelirler. Bu sayede suda çözünmeyen ilaçlar kolaylıkla taşınabilirler. Misellerin boyut aralıkları nedeniyle, EPR etkisi gösteren dokularda geçiş ve tutulmalarında önemli bir rolü vardır. Kopolimerlerin hidrofilik kısımları dışarıda bir araya gelerek, çekirdeği degradasyondan ve opsonizasyondan koruyan bir kabuk görevi görür. Ayrıca amfifilin suda çözünmesini sağlar. Diğer yandan kopolimerlerin hidrofobik kısımları da misel yapının çekirdeğini oluşturarak ilacın enkapsüle edilmesine olanak sağlar [33, 34].

Polimerik miseller, hidrofilik bölümlerinin ucundaki ligand molekülleri ile modifiye edilebilirler. Böylece hedef bölgelerle kolayca karşılaşabilir ve etkileşime girebilirler. Örnek olarak, Li ve çalışma arkadaşları, bakteriyel hedeflemeyi geliştirmek ve enfeksiyon bölgelerinde vankomisin ve siprofloksasin antibiyotiklerinin salımını sırasıyla tetiklemek için vankomisin ile modifiye edilmiş polimerik bir misel hazırlamışlardır [35].

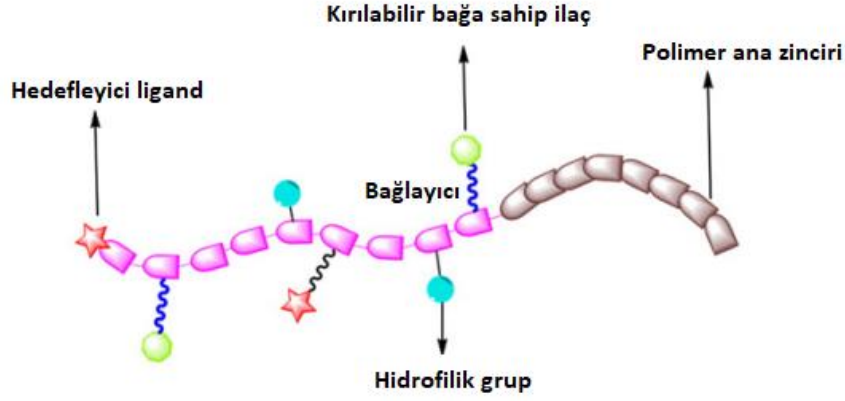
2.2.4 Polimer-İlaç Konjugatları

Polimer-ilaç konjugatları ilk olarak 1975 yılında Helmut Ringsdorf tarafından geliştirilmiştir. Bu model, biyouyumlu bir polimer omurgasına bağlı üç bileşenden oluşur. Buna göre polimer-ilaç konjugatlarında;

- 1) Çözünürlüğü sağlayan hidrofilik bir grup,
- 2) Bağlayıcı (*linker*) aracılığıyla polimer omurgasına kovalent olarak bağlanan bir ilaç,
- 3) İstenen fizyolojik hedefe ya da belirli bir biyolojik hedefe bağlanmayı sağlayan hedefleyici kısım bulunmaktadır (Şekil 2.8).

Hedefleyici olarak folik asit, antikor, şeker ve peptit molekülleri kullanılıp istenilen bölgeye kolaylıkla taşınma sağlanır. Bağlayıcı olarak da peptit bağı, disülfid bağı, hidrazin ve azo grupları gibi farklı yapılar kullanılabilir. Bu bağlar, belirli koşullar altında uyaranlara maruz kaldıklarında parçalanarak konjuge ilacı serbest bırakabilen bağlayıcılar olarak görev yaparlar. Seçilen bağlayıcılar ilaç yüklenmesinde, ilacın stabilitesinde ve salımında etkilidir. Ön ilaç, ilacın polimere bağlanıp inaktif hale gelmesi sonucunda oluşur. Bu sayede ilaç *in vivo* halde etkisizdir. pH, redoks ortamı, enzimler, hipoksik koşullar gibi iç uyaranlar veya ışık, ısı, manyetik alan ve ultrason gibi dış uyaranlara maruz kalmasıyla bağlayıcılar parçalanır ve ilaç tekrar aktif hale gelir. Hedeflenen bölgede ilaç salımı gerçekleşir [36].

Polimer-ilaç konjugatlarının ilaç salım sistemi olarak kullanılmasında birçok avantaj bulunmaktadır. Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmaları, gelişmiş ilaç çözünürlüğü, ilaç farmakokinetiğinin modülasyonu, oldukça tahriş edici ve sitotoksik ilaçların sistemik ve lokal yan etkilerinin azaltılması, *in vivo* ilaç kararlılığının artırılması ve ilacın salım hızının ve bölgesinin kontrollü olması bu avantajlardan birkaçıdır [37].



Şekil 2.8 Polimer-ilâç konjugatlarının şematik gösterimi [37]

2.2.5 Nanopartiküller

Nanopartikül bazlı ilâç salım sistemleri, istenilen boyut genellikle 100 nm civarında olmasına rağmen, 10-1000 nm aralığındaki küresel parçacıklardan oluşur. Nanopartiküller biyouyumlu, biyobozunur malzemelerden yapılır ve çekirdek bir matrisin içinde dağılmış ya da çözünmüş ilâçlar içerir. İlâcın eklendiği yöntemeye göre nanokapsül ve nanoküre olmak üzere iki sınıf tanımlanmıştır (Şekil 2.7). Nanokapsüllerde ilâç polimer bir membranla çevrelenmiş içi boş bir çekirdek içerisinde tutulur. Nanokürelerde ise ilâç molekülleri polimerik matriks sisteminde eşit şekilde dağılır. İlâçlar vücuda girdikten sonra difüzyon, bozunma, şişme veya erozyon yoluyla parçacıklardan salınabilir. Bu sistemlerin etkinliği, boyuta, partikülün kararlılığına, yüklenen ilâç miktarına, ilâcın türüne (hidrofilik veya hidrofobik ilâçlar, siRNA ya da DNA, proteinler vb.) ve farklı uygulama yollarının kullanımına bağlıdır. Nanopartiküller, büyük ölçüde proteinlerin, antibiyotiklerin, vitaminlerin ve aşılarda taşınmasında kullanılarak kanser tedavisi, gen tedavisi, virüs tedavisi ve radyoterapi gibi çeşitli uygulamalarda etkili olurlar [31, 38]. Nanopartiküller ile ilgili daha detaylı bilgi “2.3 Polimerik Mikro/Nano Partiküller” bölümünde verilmektedir.

2.2.6 Dendrimerler

Dendrimerler, kararlı ve modifiye edilmesi kolay, oldukça dallanmış polimer zincirleridir. İlk olarak kovalent veya elektrostatik etkileşimlerle ilâç yüklenmesine olanak sağlayan basit yapılar şeklinde elde edilirken, zamanla hidrofobik ilâçların çekirdek içerisine enkapsüle edildiği daha karmaşık

hidrofobik-hidrofilik yapılar geliştirilmiştir [18]. Dendrimerler, üç boyutlu yapıda, oldukça dallanmış polimerlere sahip makromoleküllerdir. Şekil 2.7’de örnek bir dendrimer yapısı görülmektedir. Temel olarak üç bileşenden oluşur: başlatıcı bir çekirdek, tekrarlayan birimlerden oluşan bir iç katman ve iç katmanın en dışına eklenen bir dış katman. Dendrimerler, sahip oldukları benzersiz özellikleri sayesinde antimikrobiyal ilaç salımında etkili olarak kullanılabilirler. İyi tanımlanmış oldukça dallanmış üç boyutlu yapıları, geniş yüzey alanı/boyut oranı sağlayarak, *in vivo* mikroorganizmalarla daha fazla reaktiviteye olanak tanırırlar. Fonksiyonel yüzey gruplarına sahip olmaları, polidispersiteleri ve hücre zarını taklit etme yetenekleri, ilaç taşıyıcı olarak kullanılmalarında etkilidir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik ajanlar, ilacı dendritik yapı içinde enkapsülleyerek veya yapıdaki fonksiyonel gruplar sayesinde elektrostatik ya da kovalent bağlarla terminal gruplarında ilaçlarla etkileşime girerek aynı anda yüklenebilir. Çeşitli viral ve bakteriyel reseptörlere spesifik ve yüksek bağlanma afinitesine sahip dendrimerler sentezlenebilir [39].

2.3 Polimerik Mikro/Nanopartiküller

1-1000 µm aralığında çapa sahip olan parçacıklara mikropartiküller, 1-1000 nm aralığında çapa sahip parçacıklara ise nanopartiküller adı verilir. Ancak çoğu durumda mikropartiküllerin çapı 100 µm’den küçüktür. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (National Nanotechnology Initiative (NNI)) tarafından herhangi bir boyutu 1-100 nm arasında olan partiküller nanopartikül olarak tanımlanmıştır [40]. Ancak günümüzde yapılan çalışmalarda yaygın olarak nanopartiküllerin boyutları 400 nm’ye kadar çıkmaktadır [41, 42]. Nanoyapılar, hücre geçirgenliğini arttırmak, terapötik salımı arttırmak, dozaj miktarını ve sıklığını azaltmak ve kullanılan ajanların etkinliğini arttırmak için kullanılabilir. Bir nanopartikülün şekli, en boy oranı, parçacık boyutu ve çapı hücre içine alınmada doğrudan etkilidir [43]. Mikro ve nanopartiküller hidrofilik veya hidrofobik ilaçlar, vitaminler, mineraller gibi çok çeşitli aktif maddeleri dağıtmada kullanılabilirler. Bunları vücutta yönetme yolları farklıdır [44].

Mikro ve nanopartiküller, hücreler ve hücre içi bileşenlerle aynı boyut ölçeğindedir. Bu da onları, yüzey reseptörlerinin uyarılması veya hücre içine alımı ve hücre içinde taşıyıcının salımı gibi çeşitli uygulamalar için ideal bir araç haline

getirir. Çoğu durumda, terapötiklerin parçacık çekirdeğinden salımı istenilen zaman aralığında kontrol edilebilir. Peptit veya protein antijenleri gibi hassas biyolojik yapılar, partikülün çekirdeğine enkapsüle edilerek zorlu fizyolojik koşullara maruz kalmadan hedeflerine ulaşabilir. Ayrıca bu teknolojiler optimum farmakokinetik değerlerinde hem lokal hem de sistemik olarak uygulanabilir. Son olarak, bu parçacıklar, polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerlerle ya da hiyalüronik asit gibi biyopolimerlerle bir kalkan gibi kaplanarak, kırmızı kan hücrelerinin “beni yeme” sinyalini taklit ederek gizlenebilirler [45].

2.3.1 Polimerik Mikro/Nanopartiküllerin Tasarlanması

İlaç taşıyıcı sistemin tasarlanmasında önceliklerin belirlenmesi, istenilen sonucun ne olduğunun bilinmesi çok önemlidir. Buna göre aşağıdaki soruların cevaplanması, tasarlanacak yapı için gereklidir.

- 1) Mikro/nanopartikülün kullanım amacı nedir?
- 2) Hedef bölge neresidir?
- 3) İstenilen hedef rotası nedir?
- 4) Salım için istenen süre ne kadardır?

Bu soruları yanıtlamak, hangi polimerin, ne tür bir yapının ve hangi sentez yönteminin söz konusu tasarım için en uygun olduğunu tanımlayacaktır.

Mikropartikül yapılar, nano boyuta göre daha stabildir. Boyuta bağlı taşıma, daha fazla ilaç yükleme ve daha uzun sürede kontrollü salım özelliklerine sahiptir. Nano boyuttaki yapılar ise, vücutta daha iyi dolaşabilirler. Homojen bir çözelti olmadıkları halde çok iyi dispers oldukları için homojen gibi gözükürler. Nano boyutla pasif, aktif ve tetiklenebilir hedefleme yapılabilir. Nanopartiküllerin önemli tasarım özelliklerinden bazıları boyut, yüzey fonksiyonelliği, mekanik özellikler, yükleme etkinliği, kapsüllenmiş ilaç-taşıyıcı oranı, bozunma mekanizması ve polimerin biyouyumluluğudur. Tablo 2.1’de ilaç salım parametreleri üzerinde etkisi olduğu bilinen tasarım özellikleri özetlenmektedir [41, 42]. Tablo 2.2’de ise belirli nanopartikül uygulamaları için hangi parçacık boyutunun yararlı olabileceğine ilişkin öneriler listelenmiştir [43].

Tablo 2.1 Farmakolojik sonuçları etkileyen polimerik nanopartikül özellikleri [42]

Tasarım özellikleri	Farmakolojik Özellikler				
	Hedef dolaşımı	Doku/Hücre	Hücre içi	Tedavi süresi	Toplam salım miktarı
Yüzey kimyası	+	+	+	-	-
Duyarlılık	+	+	+	+	+
Boyut	+	+	+	-	+
Şekil	+	+	+	+	+
Mekanik özellikler	+	-	+	-	-
Yükleme kapasitesi	-	-	-	+	+
Parçalanma	+	+	+	+	+

Tablo 2.2 Parçacık boyutuna göre atılım ve kullanılan uygulamalar [43]

Partikül boyutu (küresel yapıya dayanan)	Nanoilaç uygulamaları
<10 nm	Ekstravazasyon veya renal klirens yoluyla hızla temizlenir.
10-20 nm	Tespit, görüntüleme, kan-beyin bariyerini (BBB) geçme potansiyeli.
20-100 nm	İlaç/gen salımı, kanser tedavisi, inflamasyon bölgeleri (fizyolojik bariyerlerden kaçmak için en uygun aralık; yüksek dolaşım potansiyeli, karaciğer ve dalak tarafından azaltılmış filtrasyon).
100-200 nm	İlaç/gen salımı (uzun süreli dolaşım için yüksek potansiyel).
200 nm- 1 µm	Genellikle dalak tarafından temizlenir.
>1 µm	Genellikle opsonize olup karaciğer ve dalakta birikir ve dolaşımdan hemen atılır.

2.3.2 Nanopartikül Sentezi

Belirli bir uygulama için istenen özelliklere sahip polimerik nanopartiküller, kullanılacak olan ilacın fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli yöntemlerle sentezlenirler. Elde edilecek nanopartiküllerin görevini yerine getirebilmesi, uygun sentez yönteminin seçilmesine bağlıdır. Bu sentez yöntemleri, monomerlerin polimerizasyonu veya polimerlerin dispersiyonu olmak üzere ikiye ayrılır (Tablo 2.3) [46]. Bu yöntemlerden en sık kullanılanları aşağıda açıklanmıştır.

Tablo 2.3 Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri [46]

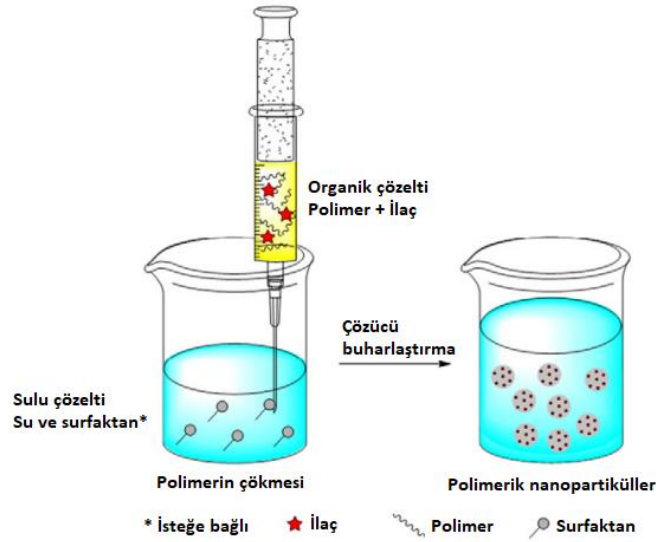
Monomerlerin Polimerizasyonu	Polimerlerin Dispersiyonu
Emülsiyon	Emülsiyon-çözücü uçurma
Mini emülsiyon	Emülsiyon-çözücü difüzyonu
Mikro emülsiyon	Salting-out
Yüzeyler arası (<i>interfacial</i>) polimerizasyon	Nanoçöktürme
Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyonu	Diyaliz
	Süperkritik akışkan teknolojisi

2.3.2.1 Yüzeyler Arası (*Interfacial*) Polimerizasyon

Tez kapsamında yapılan ilk çalışmada da kullanılan yüzeyler arası polimerizasyon (ya da çapraz bağlama) yönteminde organik faz ve sulu faz olmak üzere birbirine karışmayan iki çözücü kullanılır. Monomer ve ilaç molekülü organik fazda çözülür ve daha sonra yavaşça karıştırılarak sulu faza damla damla eklenir. Bu işlemi kullanmanın en önemli yararı, organik fazda çözünen bir ilaç kullanılıyorsa sadece yüzeyden ziyade nanopartikülün çekirdeğine ilacın iyi bir şekilde enkapsüle edilmesidir. Dezavantajı ise; yoğun karıştırma oranı nedeniyle proteinlerin ve peptidlerin denatüre olmasıdır [42]. Yapılan bir çalışmada yağ/su yüzeyler arası polimerizasyon yöntemi kullanılarak çapraz bağlı albümin kabuklu nanokapsül sentezlenmiş ve paklitaksel ilacı enkapsüle edilmiştir [47].

2.3.2.2 Nanoçöktürme

Nanoçöktürme yöntemi ilk olarak Fessi ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu tekniğin temel prensibi, organik çözücünün lipofilik bir çözeltiliden sulu faza yer değiştirmesinden sonra bir polimerin arayüzeyde birikmesine dayanmaktadır (Şekil 2.9). Polimer, suyla karışabilen bir solventle çözülür ve bu çözelti, karıştırılan sulu bir çözeltiliye tek seferde, aşamalı olarak damla damla veya kontrollü ekleme hızıyla eklenir. Polimer çözeltisi çözücüsünün sulu faza doğru hızlıca kendiliğinden gerçekleşen difüzyonu nedeniyle, su moleküllerinden kaçınmak amacıyla nanopartiküller anında oluşur. Çözücü nanodamlacıklardan dışarı yayılırken, polimer de nanokapsüller veya nanoküreler şeklinde çöker. Çözücünün uzaklaştırılmasıyla nanopartiküller elde edilmiş olur [46].



Şekil 2.9 Nanopartikül hazırlamada kullanılan nanoçöktürme yönteminin şematik gösterimi [46]

2.3.2.3 Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma sentez yöntemi, nanopartikül eldesinde geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntem için polimer uçucu bir çözücüde çözülür. Daha sonra sulu fazda emülsiyon haline getirilir ve karışım tipik olarak bir surfaktan ve yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılarak işlenir. Böylelikle nanodamlacık dispersiyonu elde edilir. Oda sıcaklığında ya da düşük basınç altında buharlaştırılarak organik çözücü uzaklaştırılır ve nanopartiküller elde edilir [46].

2.3.2.4 Emülsiyon Polimerizasyonu

Çeşitli polimerlerin üretiminde, en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri emülsiyon polimerizasyonudur. Dispersiyon ortamında su kullanılması nedeniyle çevre dostudur. Surfaktan kullanımına bağlı olarak, geleneksel ve surfaktan içermeyen emülsiyon polimerizasyonu olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Geleneksel sistemde bileşenler su, suda çözünürlüğü düşük olan bir monomer, suda çözünür bir başlatıcı ve surfaktandan oluşur. Reaksiyonun sonunda nanopartikül boyutları yaklaşık 100 nm'dir ve her biri birçok polimer zinciri içerir. Surfaktan içermeyen yöntemde, yüzey aktif maddenin olmaması nanopartikül üretimi için basit ve yeşil bir işlem olarak ilgi görmektedir. Bu sistemdeki reaktifler suda çözünür bir başlatıcı (potasyum persülfat), deiyonize su ve vinil, akril gibi monomerlerdir.

Nanopartiküllerin stabilizasyonu, iyonlaşabilen başlatıcıların ya da iyonik iyonik kopolimerlerin kullanılmasıyla gerçekleşir [48].

2.3.2.5 Diyaliz

Bu yöntemde polimer için fiziksel bir bariyer olarak diyaliz tüpleri ya da uygun moleküler kesme ağırlığına sahip yarı geçirgen membranlar kullanılır. Genellikle polimer organik çözücünde çözülür ve diyaliz membranının içine yerleştirilir. Uygun çözücü içine yerleştirilerek diyaliz gerçekleştirilir. Diyaliz tüpünün içinde bulunan çözücü ile dışında bulunduğu çözücünün yer değiştirmesi, karışımın polimeri giderek daha az çözebilmesine ve böylece polimerin kademeli olarak çökmesine neden olur. Küçük ve dar dağılımlı nanopartiküllerin oluşturulmasında kullanılır. Diyaliz yöntemi basit ve yaygın bir yöntem olmasına rağmen, diyaliz ortamının büyük hacimde olması, uzun süreli işlem sırasında nanopartikül yükünün erken salınmasına neden olabilir [46].

2.3.3 Polimerik Nanopartiküllerin Antimikrobiyal İlaç Salımında Kullanımı

Polimerler, monomer birimlerinin birden fazla tekrar etmesiyle oluşan makromoleküllerdir. Homopolimerler aynı monomer birimlerinden oluşurken kopolimerler iki ya da daha fazla sayıda farklı monomer birimlerinden oluşur. Polimerler boyut ve yapı gibi kimyasal özelliklerinin değiştirilebilir olması nedeniyle çeşitlilik gösterirler. Ayrıca fizikokimyasal özellikleri düzenlenerek işlevleri değiştirilebilir [30]. Polimerlerin bu özellikleri, nanopartikül ilaç salım sistemi sentezinde büyük avantaj sağlar.

Literatürde nanopartikül üretimi için lipit ve amfifilik moleküllerden inorganik bileşiklere kadar çok çeşitli malzeme türleri kullanılmış ve modifiye edilmiştir. Organik makromolekül bazlı antimikrobiyal ilaç taşıyıcıları arasında polimerik nanopartiküller birçok avantaja sahip olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bu avantajlar;

- 1) Üretim kolaylığı,
- 2) Fizyolojik ortamda ve depolama koşullarında fiziksel ve kimyasal kararlılık,
- 3) Boyut ve boyut dağılımı, şekil, gözeneklilik, yüzey yükü, moleküler ağırlık, ilaç yükleme etkinliği gibi ayarlanabilir özellikler,

- 4) Hidrofilik/hidrofobik özelliklerin modifikasyonu ile kontrollü ilaç salımı,
- 5) Ligandlarla yüzeyin fonksiyonelleştirilmesidir [49].

Yara bölgesinde yer alan bakteriler, yara eksudası içerisinde planktonik hücreler veya biyofilm matrisinin içinde korunan sessiz hücreler olarak bulunabilirler [4]. Kronik yaraların %60'ında biyofilm oluşumu gözlenmektedir. Bu tip yaralarda, biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek, çoklu antibiyotik dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* öne çıkmaktadır [50]. Vücuttaki bakteriyel enfeksiyonların %80'inden fazlasının biyofilm ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir [3].

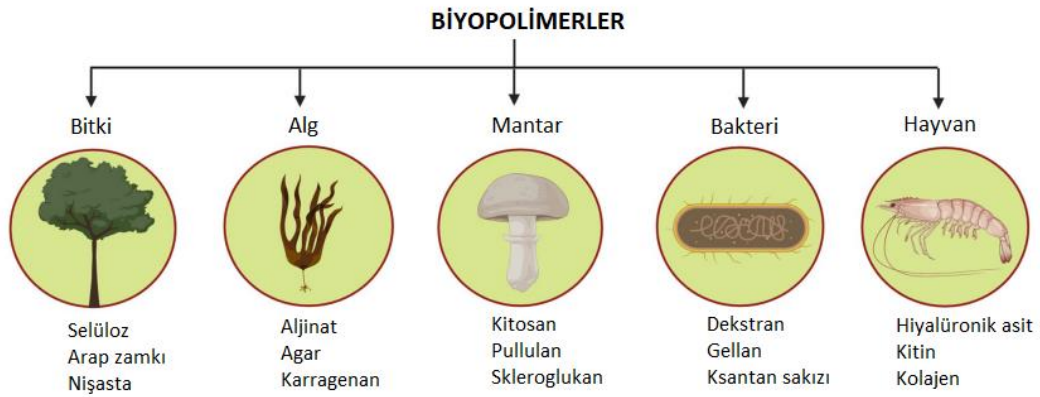
Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla antibiyotiklerin belirlenen bölgeye lokal salımı için farklı yöntemler geliştirilmekte ve var olan sistemler iyileştirilmektedir. Polimerik taşıyıcının değiştirilmesi, modifiye edilmiş antibiyotiklerin kullanılması, bilinen antibiyotiklere dayanan polimerik ön-ilaçların üretilmesi, gümüş nanopartiküllerin toplanması, antibiyotikler yerine antimikrobiyal peptitler ya da antimikrobiyal peptit önleyicilerinin dahil edilmesi bu çalışmalardandır. Bunun dışında minimal invaziv olarak uygulanabilen ve sürekli bir antimikrobiyal salım profiline sahip sistemlerin oluşturulması ve enfeksiyonel bir durumda biyolojik uyarana cevap olarak antibiyotik veya antimikrobiyal bileşiğin ortama salındığı sistemler de yeni uygulanan yöntemlerdendir [51].

Polimerik nanosistemler, kolajen, kitosan, jelatin veya albümin gibi doğal polimerlerden ya da polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA) veya poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi sentetik polimerlerden sentezlenebilir. Ayrıca nanopartiküller, nanokapsüller, nanoküreler, miseller, veziküller, dendrimerler veya hibrit inorganik-polimer nanosistemler dahil olmak üzere birçok formda geliştirilebilirler [52].

2.3.3.1 Doğal Polimerler

Doğal polimerler olarak geçen biyopolimerler, nanomateriyallerin sentezinde kolaylık sağlar. Çünkü biyokütle morfolojileri genellikle nano düzeydedir. Biyopolimerler bitkiler, algler, mantarlar, bakteriler ve hayvanlar gibi çeşitli organizmalarda bulunurlar. Nişasta, aljinat, kitosan, hiyalüronik asit ve dekstran bunlardan en sık kullanılanlarıdır (Şekil 2.10). Biyopolimerler bileşimleri

açısından benzersizdir ve çeşitli fizyolojik özelliklere sahiptirler [53]. Biyoinert olmaları sayesinde vücuda herhangi bir zararları bulunmaz. Biyoyumlu biyopolimerler, fiziksel ve kimyasal özellikleri (yüzey yükü gibi) değiştirerek, kararlılığı arttırarak ve ilaçların ve nanopartiküllerin korunmasını sağlayarak nanopartiküllerin fonksiyonel hale gelmelerinde etkili olarak kullanılırlar [54]. Polimerik nanomalzemeler 10 nm-1 µm aralığında katı kolloidal parçacıklardır [53].



Şekil 2.10 Farklı kaynaklardan elde edilen biyopolimerler [53]

Biyopolimerik nanomalzemeler çeşitli şekillerde elde edilebilirler. Özellikle biyopolimerlerin molekül içi hidrojen bağlarıyla bağlanması moleküler kapsüllerin oluşmasını sağlar. Metallerin biyopolimerlere bağlanmasıyla da sentezlenebilirler. Örneğin nişasta, metalleri ya da metal oksitleri bünyesine katarak polimerik nanokompozitler oluşturabilir. Yapılan bir çalışmada gümüş metali supramoleküler bir şekilde nişasta içerisine dahil edilerek nanomateryal elde edilmiştir [55]. Kitosan, çapraz bağlanma ve modifikasyon için bol miktarda serbest amino grubuna sahip doğrusal bir polisakkarittir [35]. Pozitif yüklü kitosan sadece bakteri hedeflemeyi arttırmakla kalmaz, aynı zamanda antibakteriyel etkiler de gösterebilir [56]. Bu nedenle kitosan, kullanımının uyumluluğu nedeniyle nanoteknoloji ile ilgili uygulamalarda kullanılmaktadır [57, 58].

Biyopolimerlerden hiyalüronik asit (HA) de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin Lei ve ark. HA'nın tümör, eklem, viterus ve cilt dokularında ilaç salım sistemi olarak kullanılabilen albumin nanotaşıyıcılarının yüzey modifikasyonunda bir ligand olarak kullanılabileceğini bulmuşlardır [59].

Yapılan bir çalışmada yumurtalık kanserinin tedavisi için HA ile modifiye edilmiş dendrimer kapsüllü altın nanopartikülleri, aktif hedefleyici ilaç salım sistemi olarak elde edilmiştir [60]. HA'nın karboksil ve hidroksil gruplarına sahip olması fonksiyonlaştırılmasına olanak sağlar. Biyouyumlu ve biyobozunur olması, ilaç salım sisteminin etkinliğini arttırmaya ve toksisitenin azalmasına neden olur. Suda çözünürlüğü arttırarak ilaç salımının iyileştirilmesini sağlar. Birçok kanser hücresinde aşırı eksprese edilen CD44 reseptörünün ligandı olduğu için tümör hedefli ilaç salım sistemlerinin oluşturulmasında önemli rol oynar [61]. HA ile ilgili daha detaylı bilgiler "2.4 Hiyalüronik Asit" bölümünde verilmiştir.

2.3.3.2 Sentetik Polimerler

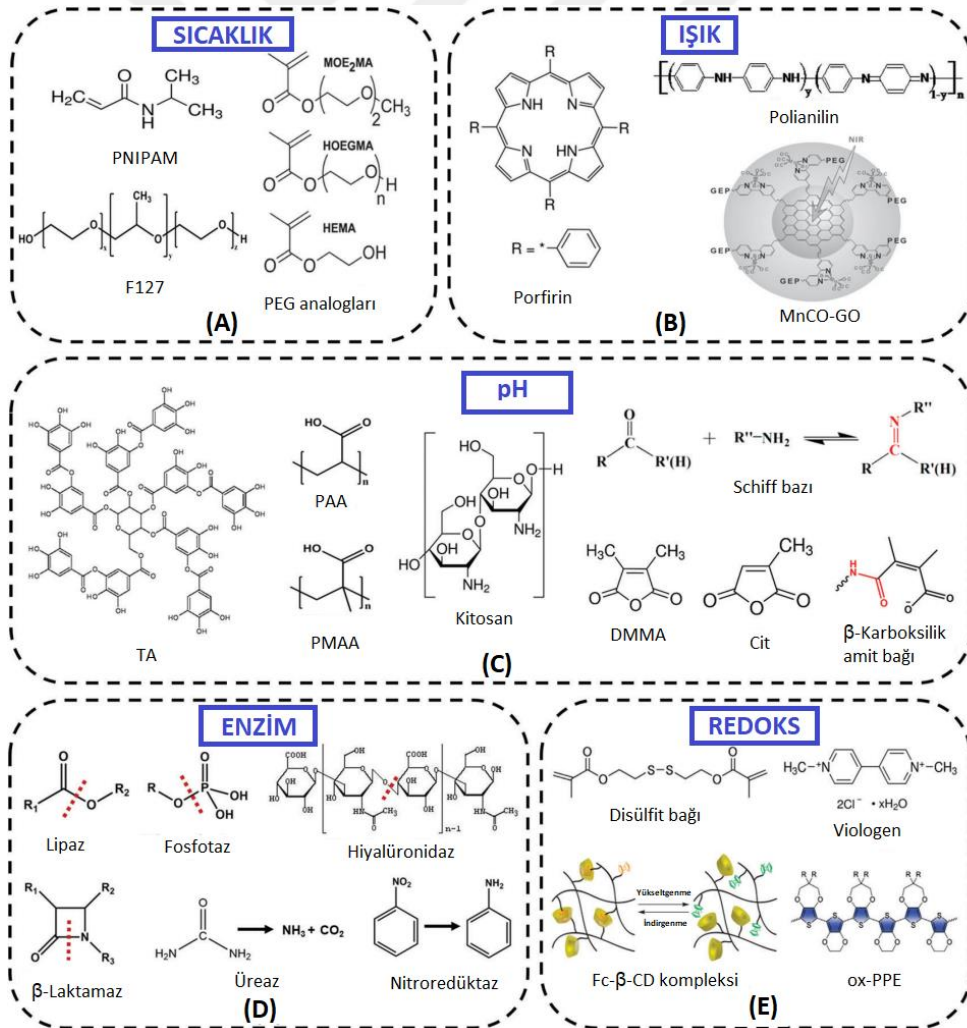
Sentetik polimerler biyomedikal uygulamalardaki nanopartikül sentezinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları PLGA, PEG, PLA ve PCL hem antibiyotiklerin hem de alternatif antibakteriyel ilaçların taşınmasında tercih edilmektedir [52]. PLGA bazlı antibiyotik taşıyıcılar, terapötik etkilerin sürdürülmesi için antibiyotik salımını uzatabilir. Fakat dokuya hedeflenmesi, uyarıcılara duyarlı olması ve hücre bariyerlerinden geçebilmesi için bazı modifikasyonlara ihtiyaç duyar [35]. Örneğin; mide epitel hücre zarlarıyla kaplı antibiyotik yüklü PLGA nanopartiküllerinin midedeki *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) patojenlerini spesifik olarak hedefleyebildiği gösterilmiştir [62]. Başka bir çalışmada, antibakteriyel aktiviteleri ile bilenen kafeik asit ve juglon doğal biyobileşiklerini içeren PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş ve etkileri araştırılmıştır [63]. Bunların dışında poli-L-lisin ile fonksiyonlaştırılmış rifampisin içeren PLA nanopartikülleri sentezlenmiş ve potansiyeli araştırılmıştır. Bu katyonik peptit, planktonik bakterilere ve biyofilm büyümesine karşı negatif nanopartikül yüzey yükünü pozitive çevirebilir [64].

Laboratuvar araştırmalarında, gelişmiş polimerizasyon yöntemleri ve makromoleküllerin kendiliğinden oluşum teknolojisi, polimerik nanotaşıyıcıların özel mimarilerle hazırlanmasını ve birden fazla fonksiyonun nispeten kolay, kesin ve çok yönlü yollarla entegre edilmesini mümkün kılar. Amfifilik blok kopolimerler, antibiyotik salımı için supramoleküler yapılar (miseller [10] ve kesecikler [65] gibi) oluşturmak üzere kendiliğinden birleşebilen en temsili sentetik polimerlerdir. Tersinir katılma-parçalama zincir transferi (RAFT) polimerizasyonu, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ve nitroksit

aracılı radikal polimerizasyonu (NMP) gibi kontrollü radikal polimerizasyon (CRP) yöntemleri, iyi tanımlanmış amfifilik blok kopolimerlerin sentezinde çoğunlukla kullanılmaktadır [35].

2.3.3.3 Uyarılara Duyarlı Polimerler

Uyarılara duyarlı malzemeler, uyarın kaynağına göre fiziksel uyarılara (sıcaklık, ışık, elektrik, tuz gibi) yanıt veren ve bakteriyel metabolit uyarılarına (pH, enzim, redoks gibi) yanıt veren malzemeler olmak üzere ikiye ayrılır. Fiziksel duyarlı malzemeler çoğunlukla tüm moleküler yapının ayarlanmasıyla tasarlanır. Bakteriyel metabolitlere duyarlı malzemeler ise asit ve enzime duyarlı bağlar gibi spesifik kimyasal bağlar içermelidir. Son zamanlarda ise farklı fonksiyonel gruplara sahip polimerlerin kombinasyonuyla çoklu uyarılara yanıt veren materyaller geliştirilmiştir. Farklı uyarılara duyarlı malzemelerin temel yapısal özellikleri Şekil 2.11’de gösterilmektedir [66].



Şekil 2.11 Uyarılara duyarlı bazı malzemelerin moleküler yapıları [66]

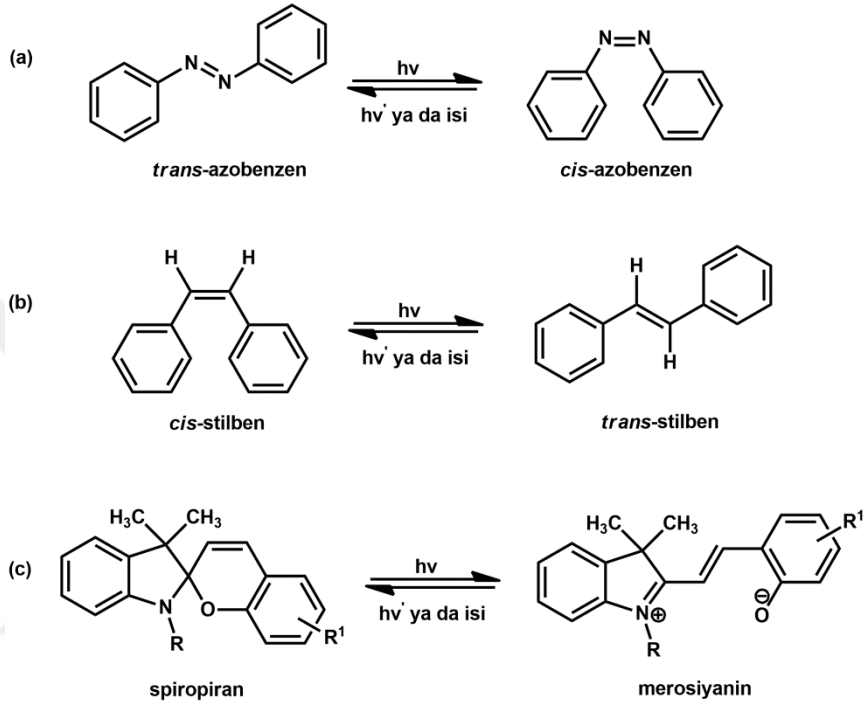
Sıcaklığa duyarlı polimerler

Oda sıcaklığı ile vücut sıcaklığı arasında geçiş sıcaklığına sahip olan malzemeler biyolojik alanda sıcaklığa duyarlı materyaller olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [66]. Sıcaklık, tümör bölgelerinde ilaç salımını tetiklemek ve kontrol etmek için kolayca kullanılabilir. Sıcaklığın bir uyarıcı olarak kullanılması fikri, tümör mikroortamının normal sağlıklı dokudan 1-2 °C daha sıcak olmasından kaynaklanır. Isıya duyarlı polimerler, çözünür veya çözünmez hale geldikleri bir geçiş sıcaklığına sahiptir. Düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST), daha fazla çözünür durumdan daha az çözünür duruma geçişin meydana geldiği sıcaklıktır. Tersine gerçekleşen durumdaki sıcaklığa ise üst kritik çözelti sıcaklığı (UCST) denir. Kanserli hastalarda hipertermal tedavi genellikle 42 °C’de gerçekleştirildiğinden ısıya duyarlı salım sistemleri vücut sıcaklığının üzerinde bir LCST’ye sahip olmalıdır [67]. Poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNIPAM) en yaygın kullanılan ısıya duyarlı polimerdir (Şekil 2.11-A). 32 °C’nin altındaki sıcaklıklarda hidrofilik spiral yapıdadır ve suda çözünür. 32 °C’nin üstündeki sıcaklıklarda ise hidrofobik kürecik formuna dönüşür ve suda çözünmez [66].

Işığa duyarlı polimerler

Işık, invaziv olmaması, zamansal ve mekansal olarak kontrol edilebilmesi ve ilaç salımını tetikleyebilmesi nedeniyle polimerik nanopartikül sistemlerinde uyarıcı olarak kullanılmaktadır. Işığa duyarlı polimerik nanopartikül sistemleri genellikle iki yaklaşımla elde edilir. Bunlardan birincisi, ultraviyole (UV) ışıkla bölünebilen *orto*-nitrobenzil (ONB) gibi ışıkla parçalanabilen kimyasal bağlayıcılar ile ilaçların polimerlere aşılmasındır. Diğer yaklaşım ise ilacı, ışınlama ile yapılarını bozabilecek ışığa duyarlı polimerlerin içine enkapsüle etmektir. Böylece bağların kırılması ya da konformasyonel değişiklik sonucu yapı bozularak ilacın salımı sağlanır [35]. Işığa duyarlı polimerler, polimerik omurgaya veya yan zincirlere azobenzen, stilben ve spiropiranlar gibi ışığa duyarlı moleküller eklenerek elde edilebilir. Bu fonksiyonel grupların her birinin fotoaktivitesi, birbirine dönüşebilen iki izomerin varlığına dayanmaktadır. Şekil 2.12-a,b’de azobenzen ve stilben durumunda ışıkla etkileşim sonucu konformasyonel değişim görülmektedir. Spiropiranlarda ise ışınlama sonucu halka açılma reaksiyonu gözlenir (Şekil 2.12-c).

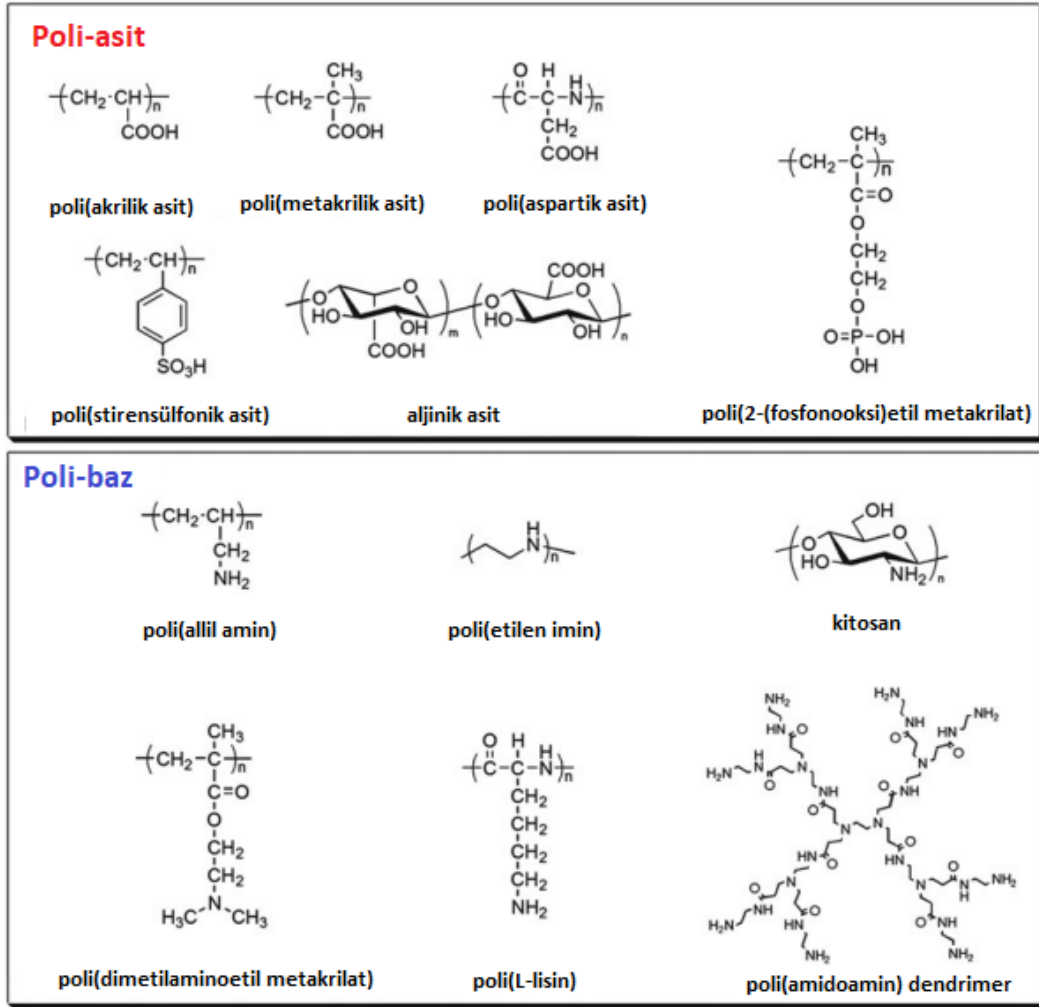
Işığa duyarlı nanopartikül sistemlerini tasarlarken dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta da, salımı tetiklemek için kullanacak ışığın dalga boyudur. UV ve görünür bölge ışık kısa nüfuz derinliğine (birkaç mikrometre) sahip olduğu için lokal kullanımlarda etkilidir. Yakın kızılötesi (NIR) ışık, birkaç milimetrelik daha yüksek bir cilt nüfuz derinliğine sahiptir. Bu nedenle dahili salım uygulamalarında kullanılabilir [68].



Şekil 2.12 Fotokromik moleküllerin foto-izomerizasyon mekanizması: (a) azobenzen; (b) stilben; ve (c) spiropiran [68]

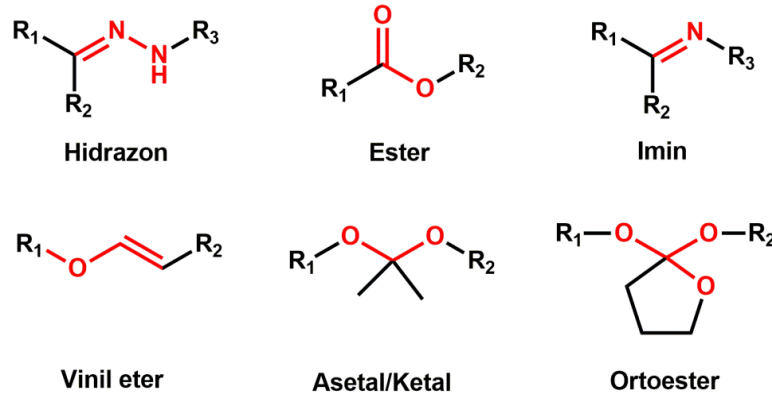
pH'a duyarlı polimerler

pH'a duyarlı polimerler, pH'taki değişime yanıt olarak konformasyon, hidrofiliklik/hidrofobiklik, çözünürlük ve hacim gibi özelliklerinde değişikliğe uğrayan akıllı polimerlerdir. pH'a duyarlı polimerlerin temel bileşenleri, karboksik ve amino grupları gibi polimer omurgasına bağlı asidik veya bazik gruplardır. Asidik veya bazik gruplara sahip tipik pH'a duyarlı polimer örnekleri Şekil 2.13'te verilmiştir [69].



Şekil 2.13 pH'a duyarlı polimerlerin tipik örnekleri [69]

pH'a duyarlı ilaç salım sistemlerinin tasarımında iki ana strateji mevcuttur. Bunlardan ilki, pH değerlerindeki değişime yanıt olarak konformasyonda ya da çözünürlükte değişiklik meydana gelmesi için polimer omurgasında iyonlaşabilir gruplara sahip polimerik sistemlerin kullanılmasıdır. Diğer ise, aside duyarlı bağlar taşıyan polimerlerin kullanımıdır. Asidik ortamda bağın kırılması sonucu, polimer omurgasına bağlı ilacın salımı, polimer yükünün modifikasyonu veya hedefleyici ligandların açığa çıkması sağlanır [67]. Yaygın olarak kullanılan aside duyarlı yapılar arasında hidrazon, imid, ester, orto ester, asetal gibi bağlar yer alır (Şekil 2.14). H^+ 'nın etkisiyle bağ kopar ve yük serbest bırakılır [26].



Şekil 2.14 pH'a duyarlı nanosistemlerde kullanılan asitle kırılabilen bağlar [26]

pH'a duyarlı olarak polimerik şişme davranışı, albumin ve jelatin gibi çeşitli doğal polimerlerde de gözlenmiştir. Doğrusal yapıdaki bu polimerler, amorf bölgeleri bir arada tutan çapraz bağlayıcılar olarak görev yapıp helezonlar oluşturabilirler. Bu doğal proteinler, izoelektrik noktalarında (pI) minimum yüzey yüküne sahiptirler. Kendi pI değerinden farklı bir pH değerinde, yüzey yükünün artması ve bununla beraber elektrostatik itme kuvvetinde artışın meydana gelmesiyle yoğun bir şişme davranışı gösterirler [67].

Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada pH'a duyarlı amfifilik bir blok kopolimer sentezlenmiş ve kanser hücresi hedeflenerek ilaç salımı incelenmiştir [10]. Buna göre poli(2-deoksi-2-metakrilamido-D-glikoz-ko-2-hidroksietil metakrilat)-*b*-poli(β-amino ester) [P(MAG-*ko*-HEMA)-*b*-PBAE] bileşiği sentezlenerek pH'a duyarlı polimerik miseller, pH 6,75 civarında tersiyer amin grupları üzerinde keskin bir protonlanma/deprotonlanma geçişi ile elde edilmiştir. Bu değer altında Doksorubisin'in (DOX) pH'a duyarlı olarak salımı etkili bir şekilde gösterilmiştir. Başka bir çalışmada, endozomun asidik ortamında ilacı salan, yaklaşık 90 nm çapa sahip, pH'a duyarlı, içerisinde DOX antikanser ilacı olan nanojeller sentezlenmiştir [70]. Endozomal pH'da yani pH 5-6'da nanojeller şişerek ilaç salınmış ve insan hepatom hücre dizisi HuH-7'ye karşı antitümör aktivitesi göstermiştir.

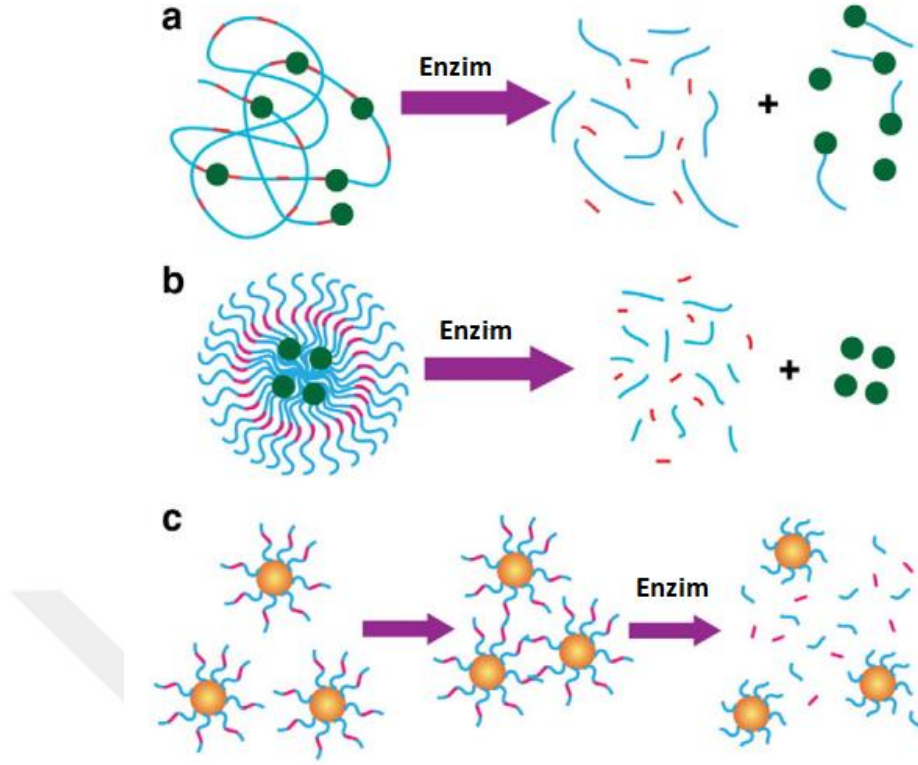
Enzime duyarlı polimerler

Enzime duyarlı polimerler, ılımlı koşullar altında (sulu ortam, pH 5-8, 37 °C) bile enzimin doğrudan etkisiyle yapısı veya işlevselliği değişen polimerlerdir. Enzim katalizli reaksiyonlar belirli substratlara karşı oldukça seçici ve etkilidir. Enzime duyarlı polimerik sistemler, enzimle parçalanabilen polimerler kullanılarak ya da

polimerlerin spesifik enzimlere duyarlı kısımlarla fonksiyonlaştırılmasıyla tasarlanabilir. Enzime duyarlı sistemler için hem PEG, PNIPAAm ve PLL gibi sentetik polimerlerden, hem de hiyalüronik asit, polipeptitler, jelatin ve dekstran gibi doğal polimerlerden yararlanılabilir. Son yıllarda kullanılan enzime duyarlı polimerler genellikle supramoleküler yapılar, çapraz bağlı jeller ve nanopartikül yüzeyler şeklindedir. Bu yapılardaki sistemler lipazlar, proteazlar, fosfotazlar, kinazlar, glikosidazlar, açıl transferazlar ve redoks enzimleri olmak üzere çok farklı çeşitte enzime yanıt verebilir özellikte elde edilebilirler [71]. Şekil 2.11-D’de bazı enzimlerin etki ettikleri yapılar görülmektedir.

Tümör bölgesinde konjuge ilaçların enzime duyarlı salımı için yaygın olarak kullanılan iki yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar antikora yönelik enzim ön ilaç tedavisi ve polimere yönelik enzim ön ilaç tedavisidir. Polimere yönelik enzim ön ilaç tedavisinde, polimer-ilâç konjugatının EPR etkisiyle tümör dokusunda birikmesi sonucu polimer-enzim konjugatı oluşur. Daha sonra polimer-ilâç konjugatındaki bağlayıcı enzimle parçalanır ve salım gerçekleşir [67].

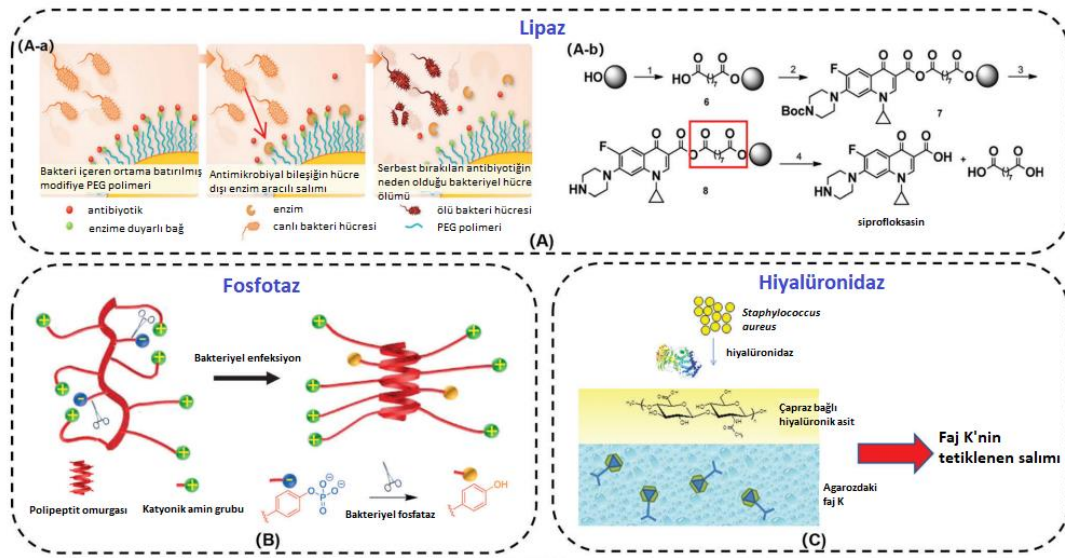
İlaç salımı ve teşhiste kullanılmak üzere enzime duyarlı çeşitli nanomalzemeler elde edilebilir. Bunlardan polimer bazlı nanopartiküller (Şekil 2.15-a), enzimle parçalanabilen bir bağlayıcı aracılıyla ilaçlarla kovalent olarak modifiye edilebilir. Böylece enzim aktivitesi ilgili dokuda ilaç salımını tetikler. Proteazlar, ilacın taşıyıcıya bir peptit ile bağlandığı durumda ya da glikosidazlar, taşıyıcının bir polisakkarit olması durumunda ilaç salımını tetikleyebilirler. Polimerle stabilize edilmiş lipozomlar da enzime duyarlı salımda kullanılabilir (Şekil 2.15-b). Kararlılığı sağlayacak polimer, peptid bağlarıyla kararsız lipozama bağlandığında proteazlar ilaç salımını tetikleyebilir. Bu sistemlerde lipazlar, fosfolipit yapı taşlarını hidrolize edip etki edebilir. Ayrıca inorganik nanopartiküller, hedef hidrolazın aktivitesi, nanopartiküllerin birleştirilmesini veya dağılmasını kontrol ettiğinde teşhis için kullanılabilir (Şekil 2.15-c) [72].



Şekil 2.15 İlaç salımında ve teşhiste kullanılabilecek enzime duyarlı nanomalzeme örnekleri ve enzimle parçalanması; a) polimer bazlı nanopartiküller, b) polimerle stabilize edilmiş lipozomlar, c) inorganik nanopartiküller [72]

S. aureus'un çoğunluğunun, bazı *E. coli* türlerinin ve *P. aeruginosa*'nın lipaz ürettiği bilinmektedir. Literatürdeki bir çalışmada, anhidritler aracılığıyla poli(etilen glikol) (PEG) fonksiyonel yüzeyler üzerine siprofloksasin bağlanarak fizyolojik ortamda mükemmel biyouyumluluk sağlanmıştır [73]. Kendi kendini düzenleyen bu sistem, bakteriler tarafından salgılanan lipaz enzimiyle aktive olup, biyofilm oluşumunun erken aşamasında siprofloksasin ilacını salarak bakterilerin neredeyse tamamını öldürmüştür (Şekil 2.16-a). Fosfataz, *S. aureus*, metisiline dirençli *S. aureus*, *Bacillus toyonensis* ve *P. aeruginosa* gibi bakteriler tarafından salgılanan başka bir enzimdir ve yapıdaki fosforil gruplarını hidroliz eder. Xiong ve çalışma arkadaşları, enzim kaynaklı rastgele sarmaldan heliks yapıya geçişle karakterize edilen fosforil yan zincirlere sahip antimikrobiyal peptitler sentezlemişlerdir [74]. Anyonik haldeki fosforil tirozin, katyonik antimikrobiyal peptitlere dahil edilmiştir. Normal fizyolojik koşullar altında yapı rastgele sarmal haldeyken *S. aureus* ile enfekte olmuş bölgede, tirozinin fosforil grupları fosfataz tarafından parçalanmış ve antimikrobiyal peptidin sarmal yapısı onarılmıştır (Şekil 2.16-b). Bu sayede bakteri yok edici özelliği geri kazanılmış ve memeli

hücrelerine karşı spesifik olmayan sitotoksisiteyi azaltmıştır. Hiyalüronidaz enzimi ise, *Staphylococcus*, *Streptococcus* gibi Gram-pozitif bakterilerin çoğunda, *E. coli* gibi Gram-negatif türlerde ise çok az veya hiç salgılanmaz. Yapılan bir çalışmada, iki katmanlı antibakteriyel bir hidrojel oluşturulmuş ve HA koruyucu bir katman olarak kullanılmıştır [75]. Hidrojinin alt tabakasında bulunan antimikrobiyal virüs Bakteriyofaj K, normal fizyolojik koşullarda salınmazken, bakteri varlığında HA'nın hiyalüronidaz tarafından parçalanması sonucu salınmıştır (Şekil 2.16-c). Bu sayede %90'nın üzerinde öldürme oranı elde edilmiştir [66].



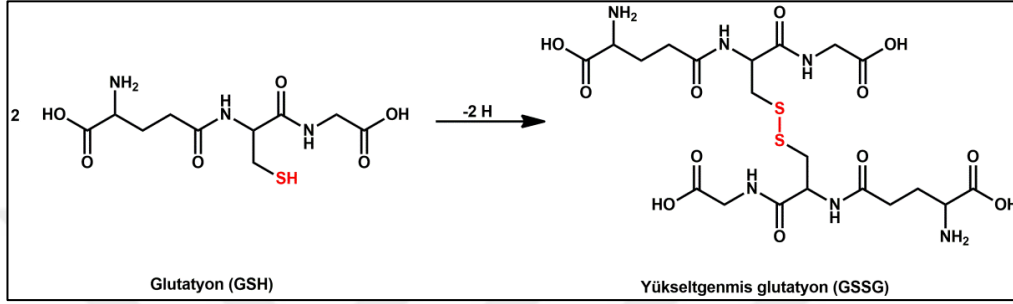
Şekil 2.16 Literatürde yapılmış enzimle tetiklenebilir sistemlere örnekler [66]

Redoksa duyarlı polimerler

Redoksa duyarlı malzemeler, çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan, bakteriler tarafından üretilen oksidanlara veya indirgeyicilere yanıt verebilen malzemelerdir. Redoksa duyarlı ilaç salım sistemlerindeki başlıca kimyasal gruplar arasında disülfid bağları, organometalik kompleksler, viyolojenler ve tetratiyafulvalenler yer alır (Şekil 2.11-E). Glutasyon ve sistein birçok hücrede en fazla bulunan indirgeyici ajandır [66].

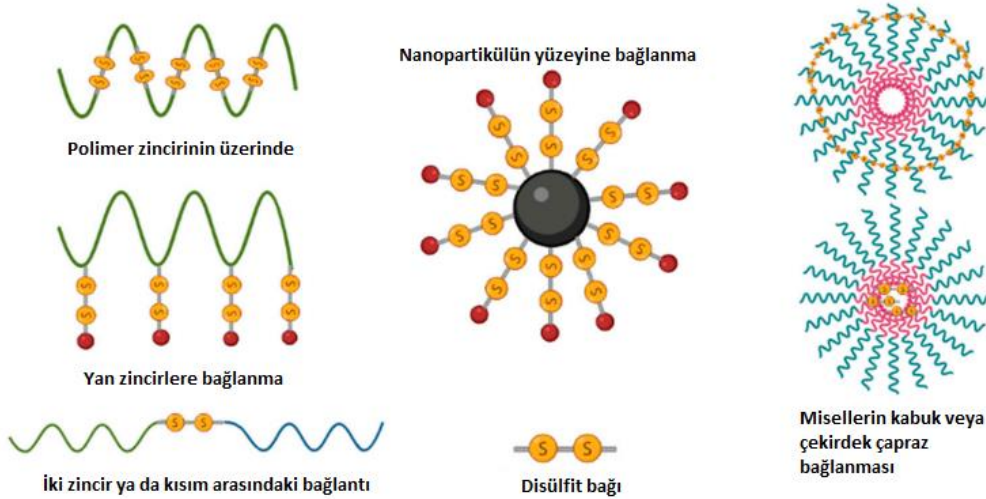
Disülfid bağları indirgemeye duyarlıdır ve yüksek konsantrasyondaki GSH tarafından kolaylıkla parçalanır. Glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olan GSH, sitoplazmada bol miktarda bulunan bir tiyol türüdür [76]. Normal hücrelerde hücre içi GSH seviyeleri 1-10 mM arasında değişirken, hücre dışı GSH seviyeleri çok daha düşüktür (2-20 μ M). Ancak tümör hücrelerindeki GSH

konsantrasyonları sağlıklı hücrelere göre dört kat daha fazladır. Tümör ve sağlıklı hücreler arasındaki bu büyük farklılık, ilaç salım sistemleri için uyarıcı olarak kullanılmasına izin verir. Etki mekanizması, tiyol grubundan bir hidrojen atomunun nanotaşıyıcıdaki spesifik kimyasal gruplara aktarılmasına dayanır. İndirgenme sonucunda nanotaşıyıcının yapısında kırılma meydana gelir ve ilaç salınır. Eş zamanlı olarak GSH, hidrojen aktarmasıyla bir disülfid bağı oluşturarak glutatyon disülfite (GSSG) yükseltgenir (Şekil 2.17) [77].



Şekil 2.17 GSH/GSSG redoks çiftinin kimyasal yapısı

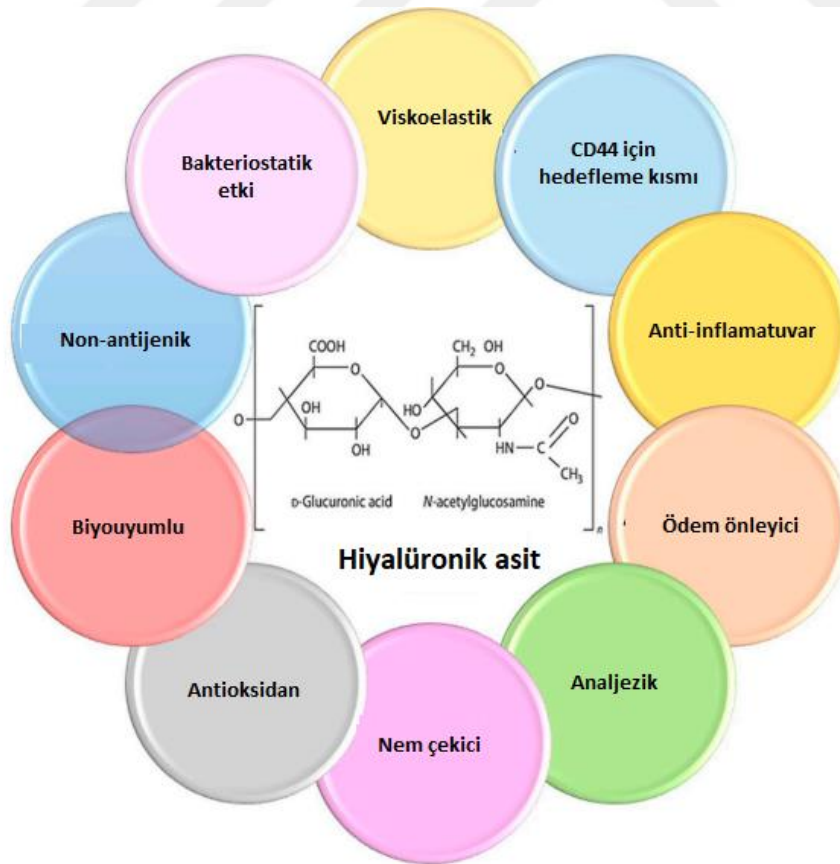
Redoksa duyarlı nanotaşıyıcılarda kullanılan fonksiyonel gruplar arasında disülfid bağları (-S-S-), diselenid bağları (-Se-Se-), süksinimid-tiyoeeter bağlantıları, tetrasülfid bağları (-S-S-S-S-) ve platin konjugasyonu (-Pt-) bulunur. Şekil 2.18, disülfid bağlarının ilaç salım sistemlerinde kullanıldığı farklı konumları göstermektedir [77].



Şekil 2.18 Disülfid bağlarının ilaç salım sistemlerinde kullanıldığı farklı konumlar [77]

2.4 Hiyalüronik Asit (HA)

1934 yılında Karl Meyer ve John Palmer ilk kez sığır gözünün vitreus sıvısından bir glikozaminoglikan (GAG) izole ettiler ve buna “hiyalüronik asit” adını verdiler. Daha sonra eklem, deri, horoz ibiği, insan göbek kordonu gibi organlarda ve bağ, epitel ve sinir dokularında bulundu. HA, omurgalılarda bulunan üç izoenziminden (HAS-1, HAS-2 ve HAS-3) oluşan hyaluronan sentaz (HAS) tarafından sentezlenir. Bu üç HAS izoenzimi, farklı boyutta HA polimerleri üretir. HA aynı zamanda *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* gibi bakteriler tarafından mikrobiyal fermantasyonla üretilmekte [78] ve moleküler ağırlığının UDP-*N*-asetilglukozamin konsantrasyonu ile kontrol edildiği bilinmektedir [79]. Hem omurgalılarda hem de bakterilerde kimyasal yapısı aynıdır. Vücuttaki çoğu hücre, hücre döngülerinin bir noktasında HA'yı sentezleme kapasitesine sahiptir. Bu da onun çeşitli biyolojik süreçlerdeki işlevini gösterir. HA, ECM'nin önemli bileşenlerinden biridir ve normalde memeli kemik iliğinde, eklem kıkırdağında ve sinovyal sıvıda bulunur [80].



Şekil 2.19 Hiyalüronik asidin kimyasal yapısı ve özellikleri [81]

HA, D-glukuronik asit ile D-N-asetilglukozaminin β -1,4 ve β -1,3 glikozid bağları ile birbirine tekrarlayarak bağlanmasıyla oluşan, suda çözünen, viskoelastik doğrusal bir polimerdir (Şekil 2.19). HA, keratin sülfat, heparin/heparan sülfat ve kondroitin/dermatan sülfat içeren GAG ailesine aittir ve sülfatlanmayan tek üyesidir [81]. HA, benzersiz moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleriyle hücre dışı matriksin yapısını korur, hücre içi aktiviteleri düzenler ve inflamasyonun başlatılmasına, yara iyileşmesine, tümör gelişimi ve metastaz ile ilişkili hücre sinyal yollarının aktivasyonuna ve iletilmesine katılır [61].

HA'nın moleküler ağırlığı biyolojik etkilerini belirleyen ana faktördür. Buna göre yüksek molekül ağırlıklı HA ($>5 \times 10^5$ Da) doku dolgusu, immün baskılayıcı veya antianjiyogenik bir biyopolimer olarak görev yapabilir. Orta molekül ağırlığı (2×10^4 - 10^5 Da) ovulasyon, embriyogenez ve yara iyileşmesinde rol oynar. 15-50 tekrarlayan disakkarit birimine sahip düşük moleküler ağırlıklı oligomerler (6×10^3 - 10^4 Da), immün sistemi uyarıcı, inflamatuvar ve anjiyogenik etkilere sahiptir. Son olarak, kısa HA zincirleri (400-4000 Da) antiapoptotik etkilere sahiptir ve ısı şok proteinlerini uyarabilirler [81].

HA'nın moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu antimikrobiyal özelliklerini belirler. Literatürde yapılan çalışmalarla bu özelliği gösterilmiştir. Buna göre HA, çeşitli planktonik mikroorganizmalara karşı doza bağlı bakteriyostatik aktivite göstermiştir [82]. Ayrıca, Radaeva ve arkadaşları HA'nın bazı *Pseudomonas* türlerine karşı önleyici aktivite gösterdiğini bulmuştur [83]. Bunun dışında klinik olarak ilgili mantar ve bakteri suşlarını kapsayan on beş standart mikrobiyal türe (ATCC) karşı HA'nın inhibitör aktivitesi ölçülmüştür [84]. Aynı zamanda, antibakteriyel kaplamalarda kullanılmak üzere test edilen çeşitli polimerler arasında HA ve türevleri, bakteriyel yapışmayı ve biyofilm oluşumunu geciktirmesiyle bilinen bir çözüm sunmaktadır [85].

HA, karboksil ve hidroksil gibi fonksiyonel gruplarıyla ilaçlara veya modifiye edici moleküllerle birleştirilmiş ilaç nanotaşıyıcılarına kolaylıkla bağlanabilir. HA'nın nanotaşıyıcılarda kullanımı, ilaç salım sisteminin biyoyumumluluğunu ve biyobozunurluğunu geliştirir. Böylece sistemin etkinliğini artırır ve toksisiteyi azaltır. Sulu çözelti içindeki dağılımın artmasını ve ilaç salımının iyileştirilmesini sağlar. Ayrıca HA, birçok kanser hücresinde aşırı eksprese edilen endositik HA

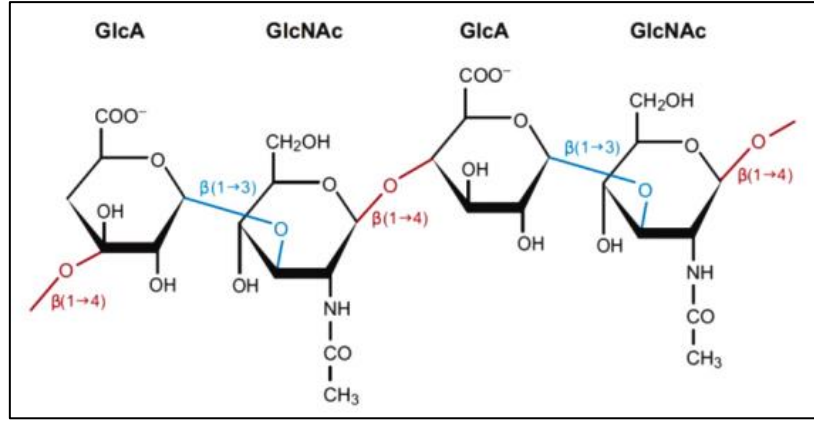
reseptörü olan CD44'ün doğal bir ligandı olduğundan, tümör hedefli ilaç salım sistemlerinde büyük avantaj sağlar [61].

2.4.1 Hiyalüronidaz Enzimi

Hiyalüronidaz, HA'nın glikosidik bağlarını parçalayarak onu monosakkaritlere ayıran bir endoglikosidazdır. Ayrıca bağ dokudaki diğer asit mukopolisakkaritleri de bir dereceye kadar parçalar. İnsanlarda bulunan hiyalüronidaz hem organlarda (testis, dalak, deri, göz, karaciğer, böbrek, rahim ve plasenta) hem de vücut sıvılarında (gözyaşı, kan ve sperm) bulunur. Vücutta, hiyalüronidaz 1-4 (HYAL 1-4), PH-20 ve HYALP1 olmak üzere bilinen altı tür hiyalüronidaz enzimi bulunmaktadır [86]. HA'nın *in vivo* bozulması, endositoz için hücre zarındaki HA reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Hiyalüronidazların bulunması durumunda, boyuta bağlı özelliklere ve işlevlere sahip daha kısa polimer zincirlerine hızla parçalanır. Lizozomda bulunan HYAL-1, tetrasakkaritleri oluşturmak için substrat olarak herhangi bir boyuttaki HA'yı kullanır. Plazma zarında bulunan HYAL-2 ise HA'yı yaklaşık 20 kDa'lık daha düşük moleküler ağırlığa kadar parçalar [85].

Meyer, hiyalüronidazları etki mekanizmasına göre üç ayrı sınıfa ayırmıştır [87]. İlki, memeli hiyalüronidazları, tetrasakkaritleri oluşturmak için β -1,4 glikosidik bağları parçalayan endo- β -N-asetilhekzoaminidazlardır. İkincisi, sülük/kancalı kurt hiyalüronidazları, pentasakkaritler ve hekzasakkaritler oluşturmak üzere β -1,3 glikosidik bağları (Şekil 2.20-mavi bağ) parçalayan endo- β -D-glukuronidazlardır. Son olarak mikrobiyal hiyalüronidazlar, hiyalüronat liyazlar olarak sınıflandırılır. Diğerlerinden farklı olarak hidroliz reaksiyonlarını katalize etmezler. Bunun yerine β -1,4 glikosidik bağlarında (Şekil 2.20-kırmızı bağ), β -eliminasyon reaksiyonu yoluyla doymamış disakkaritler üretirler [86].

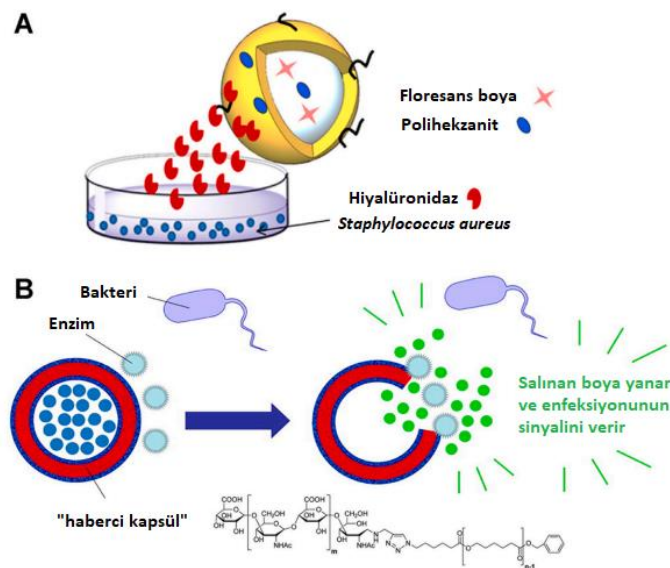
Hiyalüronidazlar ayrıca pH'a bağlı aktivite göstermelerine göre de iki sınıfa ayrılabilirler. Asit aktif hiyalüronidazlar, pH 3-4 aralığında aktive edilir. Nötr aktif hiyalüronidazlar ise, pH 5-8 aralığında aktive edilir. Yılan ve arı zehrinde bulunan hiyalüronidazlar bu gruba aittir [88].



Şekil 2.20 HA'nın yapısı. D-glukuronik asit ve D-N-asetilglukozamin, bir disakkarit oluşturmak üzere β -1,3 bağları (mavi) ile bağlanır. Çoklu disakkaritler, HA oluşturmak üzere β -1,4 bağları (kırmızı) ile bağlanır [86]

2.4.2 HA'nın İlaç Salım Sistemlerindeki Uygulamaları

D-glukuronik asit ile D-N-asetilglukozaminin β -1,4 ve β -1,3 glikozid bağları ile birbirine tekrarlayarak bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarit olan HA, omurgalı canlılarda ve bakterilerde bulunmaktadır. HA hücre dışı matriksin bileşenlerinden biri olup, *Staphylococcus* [89, 90] ve *Streptococcus* [91, 92] türü bakteriler de dahil birçok enfeksiyon kaynağı mikroorganizma türü tarafından salınan hiyalüronidaz enzimi varlığında parçalanmaktadır. Bu enzim hücre dışı ortamdaki HA'yı parçalayıp patojenez etki göstermektedir [6, 7]. Bu nedenle HA, kontrollü antimikrobiyal terapötik salım gerçekleştirilmesinde kullanılması muhtemel malzemelerden biridir [1, 8].



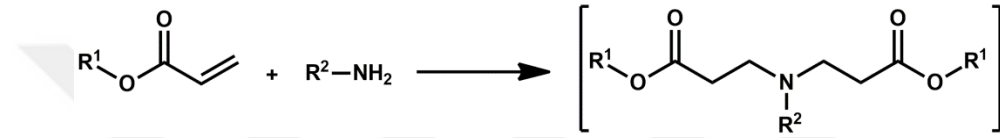
Şekil 2.21 Literatürde yapılan enzime duyarlı (A) nanokapsül [1] ve (B) polimerzom [6] şeklindeki ilaç salım sistemlerine örnek şematik gösterim

HA'nın bu özelliği dışında hücre dışı doku destek malzeme özelliği göstermesi ile yara iyileştirme, hücre göçünde etkin görev alma ve matriks düzenleme etkileri gibi çeşitli doğal biyolojik özelliklere sahip olması bu malzemenin biyomedikal mühendislik uygulamalarında da yaygın bir şekilde kullanılmasına sebebiyet vermektedir [93-96]. Hastalıklı bölgenin hedeflenmesi ve kontrollü salım gerçekleştirilmesi için HA ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirildiği literatürde görülmektedir [97, 98]. HA yapılı taşıyıcı sistemlerin özellikle kanser hücrelerinin hedeflenmesinde etkin bir şekilde kullanıldığı görülmektedir [99-101]. Bunun dışında HA yapılı taşıyıcılar antibakteriyel ajan salımında da yer almaktadır [5, 8, 102, 103]. Doğal bir polimer olan HA'nın ilaç taşıyıcı sistemlerde nanojel veya nanokapsül şeklinde kullanıldığı yapılan araştırmalarda belirtilmiştir. Örneğin, glutatona duyarlı HA yapılı nanokapsüller, aktif maddenin hücre içine taşınması için yüzeyler arası (*interfacial*) polimerizasyon (veya polikondenzasyon) yöntemi ile elde edilmiştir [2]. Yine benzer bir yöntemle, doğası gereği hiyalüronidaz enzimi varlığında parçalanabilen HA, yüzeyler arası polikatılma reaksiyonu ile ters emülsiyon tekniği kullanılarak, enzime duyarlı HA nanokapsülleri şeklinde elde edilmiştir (Şekil 2.21-A) [1]. Kullanılan bu reaksiyonun özelliği gereği biyoortogonal yüzeyler arası çapraz bağlanma yaklaşımı geliştirilerek HA nanoküreleri (nanojeller) de elde edilmiştir [104]. Benzer şekilde, HA-*b*-PCL amfifilik kopolimerinden oluşan hiyalüronidaz enzimine duyarlı nanoboyutlu polimerzomlar elde edilmiştir (Şekil 2.21-B) [6]. Başka bir örnekte ise, s-tetrazin ile modifiye edilmiş HA ile bis-*trans*-siklookten arasında gerçekleştirilen biyoortogonal yüzeyler arası çapraz bağlanma reaksiyonu ile kovalent olarak fonksiyonel hale getirilmiş hidrojeller elde edilmiştir. Çekirdek-kabuk yapısına sahip hidrojellerin insan mezenkimal kök hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir [105].

2.5 Poli(β -amino ester) (PBAE)

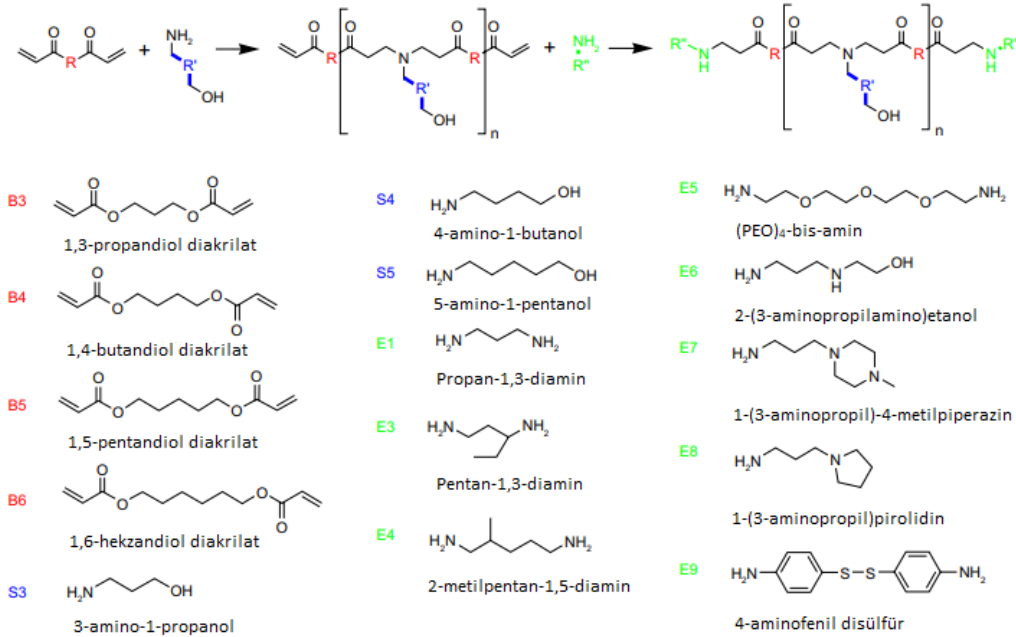
PBAE'ler toksik olmayan, fonksiyonlandırılabilir, biyoyumlu ve biyobozunur moleküllerdir. Biyobozunur ester bağları sayesinde bazik veya asidik koşullar altında toksik olmayan daha küçük moleküllere ayrışabilirler. Bu nedenle de terapötik uygulamalar için uygun moleküllerdir. PBAE'ler, doğal biyoyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve yanıt verebilirlikleri

nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi çekmiştir ve antikanser ilaçları, antimikrobiyaller, proteinlerin taşınması ve doku onarımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalar için uygun polimerlerdir. PBAE'ler genellikle, herhangi bir yan ürünün oluşmadığı, aminlerin akrilatlarla Michael katılması reaksiyonu ile sentezlenirler (Şekil 2.22). Hidrolitik olarak parçalanabilen ester bağları, PBAE'lere mükemmel biyobozunurluk sağlar, böylece nekroz ve apoptozun neden olduğu sitotoksiteyi azaltır. Tersiyer amin grupları nanokompozit oluşturmak için negatif yüklü gen ya da terapötikler ile elektrostatik olarak etkileşime girebilirler [106]. Ayrıca, PBAE'ler yapılarında taşıdıkları aminler vasıtasıyla pH'ya duyarlı polimer olarak da ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadır [10].



Şekil 2.22 PBAE'lerin Michael katılması reaksiyonu ile sentezi

PBAE sentezinde başka bir yaklaşım da Şekil 2.23'te görülmektedir. Buna göre öncelikle uç gruplarında akrilat olan polimerler sentezlenip, daha sonra polimerin amin içeren küçük moleküllerle reaksiyonu sonucu, uç grubunda amin fonksiyonel polimerler elde edilmiştir. Kullanılan bazı monomerler Şekil 2.23'te verilmiştir [107].

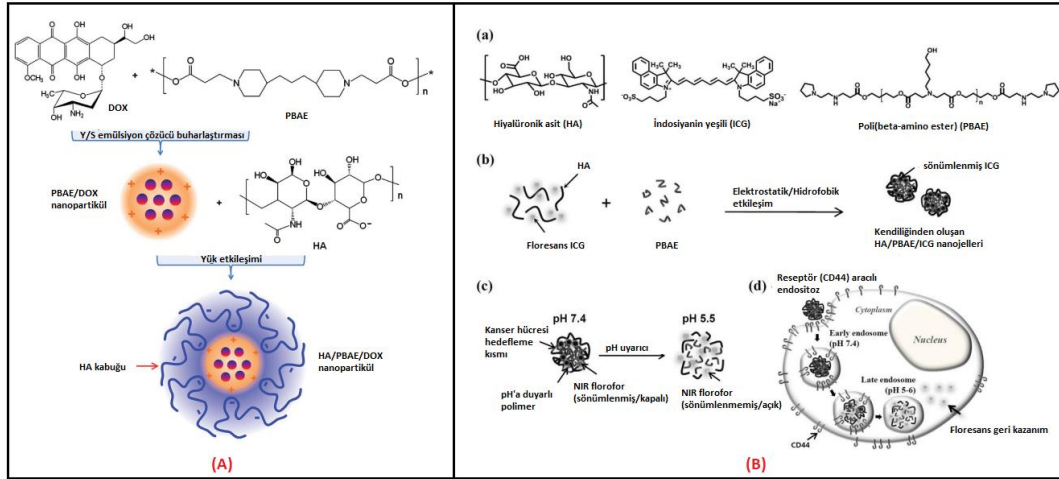


Şekil 2.23 PBAE sentez şeması ve sentez için kullanılan bazı monomerler [107]

PBAE üzerindeki amino gruplarının pK_b değeri 6,5 civarındadır; dolayısıyla bu tür polimerler pH 6,5 civarında deprotonlanma/protonlanma geçişi sergilerler. Prensip olarak hidrofobik PBAE'ler, amino gruplarının protonu giderildiği için bazik pH'larda çözünmezler. Buna karşı, amino grupları 6,5'in altındaki pH değerlerinde protonlanıp katyonik hale gelir ve dolayısıyla polimer asidik çözeltilerde kolayca çözünür.

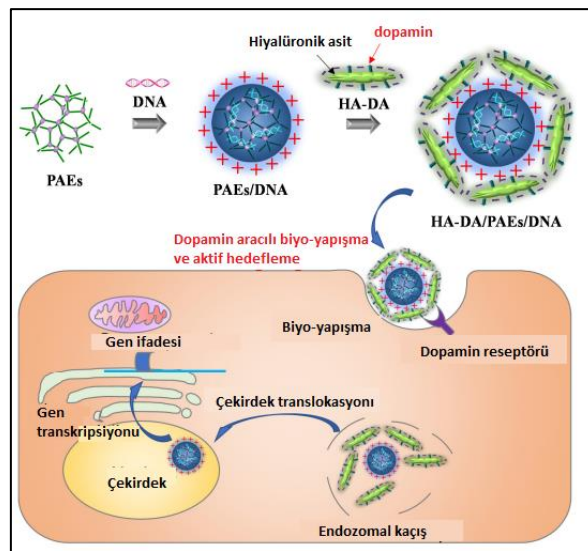
2.5.1 PBAE'nin İlaç Salım Sistemlerindeki Uygulamaları

Kitosan ve PBAE gibi polikasyonlar ve aljinat, HA ve kıkırdak agrekan gibi polianyonlar, çeşitli terapötiklerin salımında kullanılmak üzere birlikte kompleksleştirilmiştir [14-16, 108-110]. PBAE'ler ve HA'lar sırasıyla pozitif ve negatif yük taşıyabildiğinden, uygun pH değerlerinde birbirleriyle elektrostatik etkileşime girebilirler. Bu da polimerik kompleks oluşumuna, kaplamaya veya katman katman düzenlenmeye olanak sağlar. Bu tür PBAE/HA bazlı malzemeler çeşitli terapötiklerin salımında kullanılmıştır. Örneğin, antikanser ilaçlarının ve genetik materyallerin dağıtımı için HA kaplı pH'a duyarlı PBEA nanopartikülleri geliştirilmiştir [11, 111-113]. Bu çalışmalarda HA, CD44 reseptörünü hedef alan ligand olarak ve PBAE ise kanser hücrelerine özgü pH'a duyarlı polimer olarak kabul edilmiştir. An ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, meme kanseri tedavisinde ilaç taşıyıcı sistem olarak PBAE çekirdeğine ve HA kabuğuna sahip bir nanopartikül sistemi geliştirilmiştir (Şekil 2.24-A) [11]. Yine başka bir çalışmada, CD44 reseptörünü hedefleyen HA, pH'a duyarlı PBAE ve yakın kızılötesi (NIR) floresans indosiyanin yeşili (ICG) içeren nanojeller sentezlenmiş ve kanserli bölgedeki pH ile aktive olup kanser hücrelerini tespit etmede kullanılmıştır (Şekil 2.24-B) [12].



Şekil 2.24 Literatürde yapılan HA ve PBAE içeren (A) nanopartikül [11] ve (B) nanojeller [12] örneklerinin şematik gösterimi

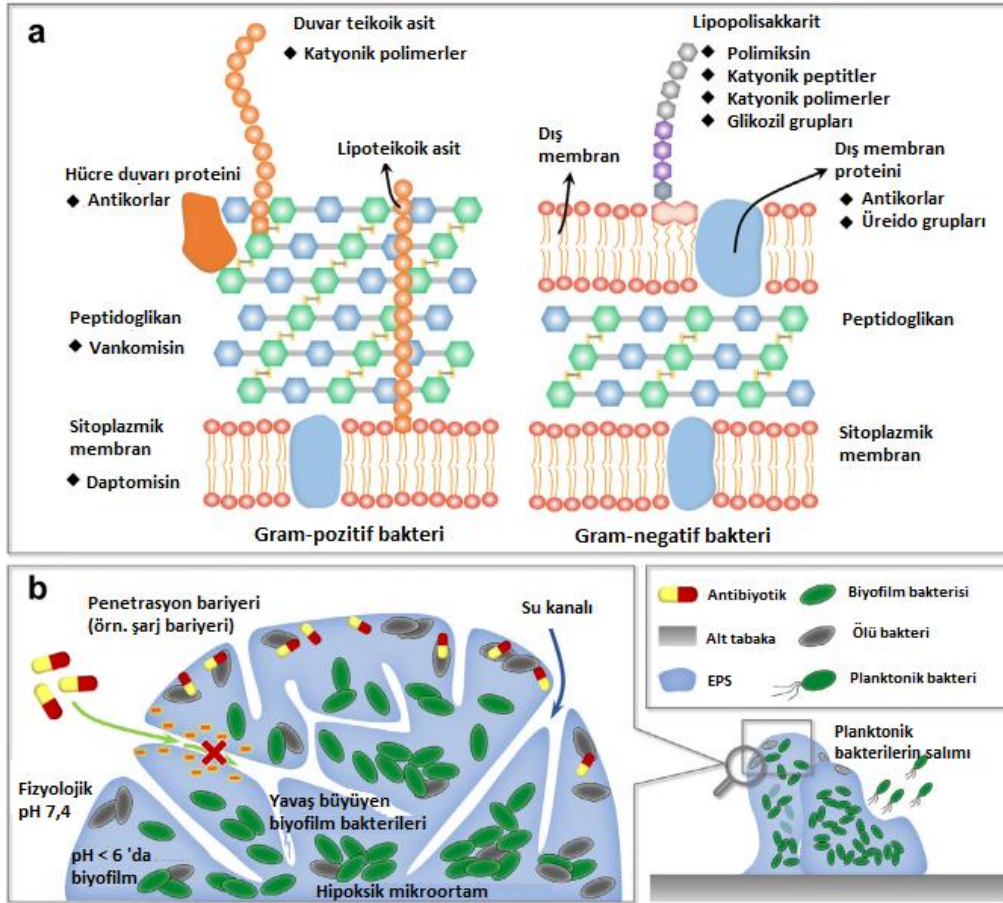
PBAE'ler düşük pH'larda protonlanarak katyonik polielektrolit hale gelirler. Bu özellikleri sayesinde de yaygın olarak genetik materyal taşımada (DNA, RNA, vb) viral olmayan vektörler şeklinde kullanılmaktadırlar. Örnek bir çalışmada DNA aktarımı için, dopamin graft edilmiş HA ve dallanmış yapıdaki PBAE arasında elektrostatik çekim yoluyla bir nanokompleks yapı oluşturulmuştur (Şekil 2.25) [112]. Bunların dışında diyabetik yaralar gibi kronik yaraların tedavisinde de kullanılan uygulamalar bulunmaktadır. Hiperdallanmış yapıdaki PBAE ile tiyol fonksiyonel HA arasında tiyol-en *Click* reaksiyonuyla elde edilen enjekte edilebilir hidrojel uygulamasında, çeşitli cilt yaralarının tedavisinde kontrol edilebilir biyobozunur yara örtüsü olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.



Şekil 2.25 DNA aktarımında kullanılan HA/PBAE içeren nanokompleks yapının şematik gösterimi [112]

2.6 Antimikrobiyal Direnç (AMR)

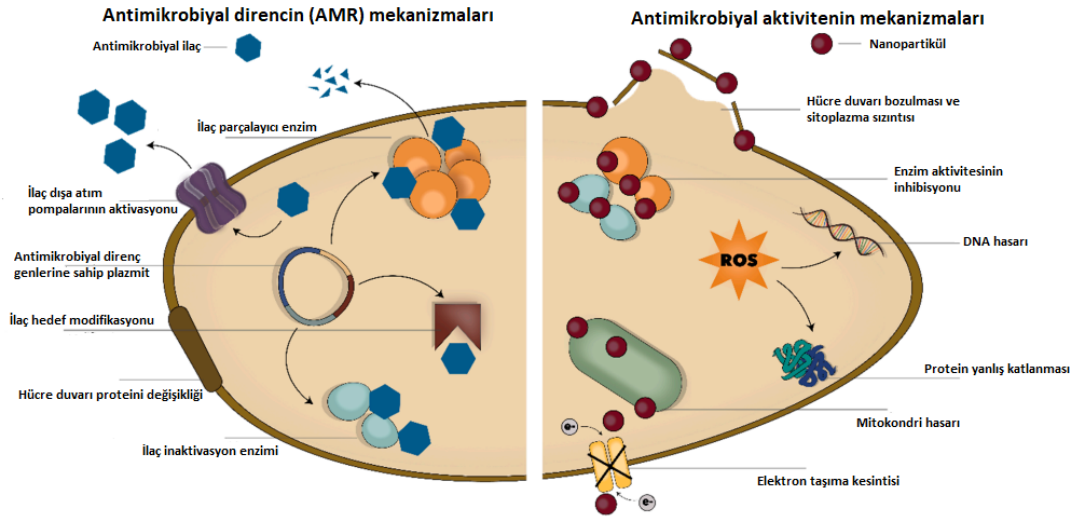
Mikroorganizmalar, nitrojen fiksasyonu, vitamin üretimi, fotosentez ve organik madde ayrışması da dahil olmak üzere çeşitli işlemlerden sorumlu olan insan varlığının önemli bir parçasıdır. Ancak mikroorganizmalar ile bağışıklık sistemi arasındaki hassas denge mikroorganizmaların lehine değişerek bağışıklık sisteminin yetersiz kalmasına neden olabilir. Bu nedenle bakteri, virüs, mantar, parazit, protozoa veya alg gibi patojen mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar, bir kişiden diğerine doğrudan veya dolaylı olarak (vektör kaynaklı) bulaşabilir ve buna bulaşıcı hastalıklar denir [52]. Enfeksiyon; vücudun her bölgesinde oluşabilecek, patojen özellikteki bir mikroorganizmanın, herhangi bir dokuda veya organda yaşayıp çoğalması sonucu oluşan ve bir kısmı bulaşıcı da olabilen bir hastalık çeşidir. Biyofilm aracılı ya da tıbbi cihaz kaynaklı, hücre içi veya hücre dışı enfeksiyonlar, her yıl milyonlarca ölüme neden olmaktadır. 20. yüzyılda antibiyotiğin keşfi bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanan ölüm ve hastalıklarda büyük bir azalmaya neden olsa da, zamanla antibiyotiklerin aşırı kullanımı sonucunda antimikrobiyal direnç (AMR) ortaya çıkmıştır [39]. AMR, günümüzde dünya çapında insan sağlığını tehdit eden en önemli unsurlardan biri haline gelmiştir. Ölüm sebepleri arasında kanser ve kalp rahatsızlıklarından sonra, yara kaynaklı ya da hastane kaynaklı olan bakteriyel enfeksiyonlar sonucu gerçekleşen ölümler gelmektedir [114]. Hatta KOVİD-19 pandemisi nedeniyle de yanlış antibiyotik kullanımı ve uzun süreli hastanede kalışların bu sorunu arttırabileceği ve acilen çözüm bulunması gerektiği görüşü bulunmaktadır [115]. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu problemin çözülmesi için nano boyutlu parçacık yapılı ilaç taşıyıcı sistemler (nanoterapötikler) geliştirilmiştir. Bu sistemler sayesinde antibiyotiğin lokal olarak hedeflenmesi sağlanır ve ilacın vaktinden önce salımı engellenmiş olur. Enfeksiyon bölgesindeki bakteriyel toksinler, enzim fazlalığı ve düşük pH gibi tetikleyici durumlar göz önüne alınarak yapı dizayn edilebilir [3].



Şekil 2.26 (a) Bakteriye hücre zarlarının yapıları ve polimer bazlı antibiyotik salım sistemleri için hedef bölgeler. (b) Bakteriye biyofilmin yapısal özellikleri ve antibiyotiklere direnci [35]

Bakteriye hücre zarfı, sitoplazmayı çevreleyen ve koruyan hücre duvarını ve iç hücre membranını ifade eder. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri hücre zarları arasındaki temel farklar hücre duvarı yapısındadır (Şekil 2.26-a). Gram-pozitif bakteriler, esas olarak peptidoglikan, duvar teikoik asit ve lipoteikoik asitlerden oluşan tek katmanlı bir hücre duvarına ve sitoplazma membranına sahiptir. Buna karşı Gram-negatif bakteriler ise, iç ve dış (fosfolipitler, lipopolisakkarit ve lipoproteinlerden oluşan) olmak üzere iki katmanlı bir membran yapısına ve daha ince bir peptidoglikan katmanına sahiptirler. Enfeksiyonel hastalıklarda, özellikle bakteriye biyofilm oluşumu çoğu bulaşıcı mikroortamın oluşumunda rol oynar. Biyofilm oluşumunun birçok kalıcı ve kronik bakteriye enfeksiyonun temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Biyofilmler, EPS (ekstraselüler polimerik maddeler) olarak bilinen, kendi kendine üretilen bir polimer matrisi içerisine kapsüllenmiş heterojen bakteri topluluklarından oluşur. Bakteriye hücreler, hipoksi, açlık ve yavaş büyüme durumlarında ortaya çıkan biyofilmlerle

enkapsüle olur, ki bu da antibiyotiklere karşı düşük duyarlılıklarıyla yakından ilişkilidir (Şekil 2.26-b) [35].



Şekil 2.27 Antimikrobiyal dirençte (solda) ve nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesinde (sağda) yer alan ana mekanizmaların şematik gösterimi [52]

Antibakteriyel direncin mekanizmaları, antibiyotiğin bakteri hücresinden dışarı pompalanması, antibiyotiğin inaktivasyonu veya hedef yapının değiştirilmesi şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.27) [34].

Dışa atım (efflux) pompaları, antibiyotikleri hücre dışına çıkaran ve düşük hücre içi konsantrasyonları koruyan membran proteinleridir. Dış zarın geçirgenliğinin azalması, antibiyotik alımının azalmasına ve birçok bakteride düşük düzeyde dirence neden olur. Dışa atım (*efflux*) pompaları hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerde bulunur ve tetrasiklinler, makrolidler, aminoglikozitler ve florokinolonlar gibi tüm antibiyotik sınıflarını etkiler [34].

Antibiyotiğin inaktivasyonu veya modifikasyonu, en önemli direnç mekanizmalarından biridir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin çoğu antibiyotikleri etkisiz hale getiren β -laktamazlar, aminoglikozid değiştirici enzimler ve kloramfenikol asetiltransferazlar olmak üzere üç ana enzim grubunu sentezler [34].

Hedef yapının değiştirilmesi, antibiyotiğin düzgün şekilde bağlanamaması nedeniyle önemli bir direnç mekanizmasıdır. Antibiyotikler, antibiyotik türlerine bağlı olarak spesifik bakteriyel hedef bölgelere bağlanarak çalışır. Hedef yapının

değişmesi, antibiyotiğin hedefine düzgün şekilde bağlanamamasına neden olur [34].

Nanoteknolojinin kullanılması, antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini arttırmada önemli bir yaklaşımdır. Nanopartikülleri antimikrobiyal ajanlar olarak kullanmanın iki önemli amacı, antimikrobiyal ilaç direnciyle mücadele etmek ve geleneksel antimikrobiyallerin salımı için taşıyıcı olarak kullanılmasını sağlamaktır. Nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesi partikül boyutu ve şekli, kimyası, yüzey alanı-hacim oranı ve zeta potansiyeli gibi değişkenlerden doğrudan etkilenir. Antimikrobiyal aktivite mekanizmasında, nanopartiküllerin membrana zarar veren aşındırıcılık yoluyla mikrobiyal hücre zarına nüfuz edebildiği ve bozabildiği, reaktif oksijen türlerinin üretimi gibi hücre içi antimikrobiyal etkileri indükleyebildiği gösterilmiştir. Bunların dışında DNA/RNA ve proteinlerle etkileşime girdiği, enzimleri etkisiz hale getirdiği, dışa atım (*efflux*) pompalarını aşırı eksprese ederek akışı arttırdığı, hücre geçirgenliğini azalttığı, metal iyonlarını serbest bıraktığı ve biyofilm oluşumunu engellediği belirtilmiştir (Şekil 2.27) [52].

2.7 Click Kimyası

Click kimyası, 2001 yılında ilk kez Sharpless ve çalışma arkadaşları tarafından ortaya konmuştur ve kimyasal reaksiyonların devrim niteliğindeki bir sınıfı olarak kabul edilmektedir [116, 117]. Hatta 2022 yılında *Click* reaksiyonları Nobel Ödülü'nü kazanarak ne kadar önemli bir konu olduğunu kanıtlamıştır. *Click* kimyası veya konjugasyon reaksiyonları, avantajlı özelliklerinden dolayı organik kimya, polimer kimyası, ilaç salım sistemleri, nanoyapılar ve biyokonjugasyon gibi çeşitli alanlarda malzemelerin fonksiyonlaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [118-120]. Bu reaksiyonların en önemli özellikleri arasında;

- 1) %100'e yakın verimle elde edilmeleri,
- 2) Yan ürün oluşmaması ya da zararsız yan ürünlerin ortaya çıkması,
- 3) Ilımlı koşullarda gerçekleşmesi,
- 4) Hızlı olması, sayılabilir.

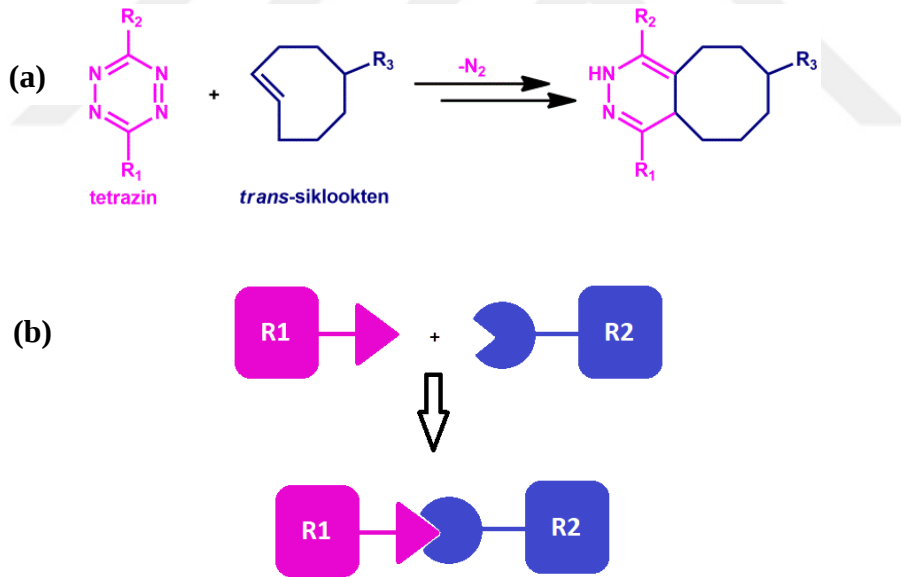
Dolayısıyla bu reaksiyonlar çok çeşitli malzemelerin hazırlanmasında büyük ilgi görmüştür [117, 121-123].

Çapraz bağlayıcılar hem nanokapsül hem de nanojel sentezinde kullanılmaktadır ve genellikle nükleofilik katılma ya da serbest radikal reaksiyon yaklaşımları kullanılarak kovalent çapraz bağlama gerçekleştirilmektedir. Bu tür reaksiyonların kullanılması protein, DNA, hücre veya faj gibi biyolojik bir yapının hasar görmesine ve aktivitesini yitirmesine neden olabilir. Dolayısıyla, biyomoleküllerin doğal ortam koşullarında çalışabilmek, aktivite kaybı yaşamadan biyomolekülleri modifiye etmek veya biyolojik kaynaklı terapötik ajanları kimyasal reaksiyon varlığında enkapsüle etmek biyolojik sistemlerin karmaşıklığından dolayı zordur. Bu zorluklardan dolayı ihtiyaç haline gelen ve biyoortogonal reaksiyonlar olarak bilinen teknoloji son yıllarda ortaya çıkmış ve biyolojik sisteme herhangi bir zarar vermeden seçici olarak modifikasyon yapılmasına izin vermiştir. Yüzlerce fonksiyonel grubun bulunduğu biyolojik ortamlardaki kompleks biyokimyasal reaksiyonlardan etkilenmedikleri gibi biyokimyasal reaksiyonlar üzerine herhangi bir olumsuz etki de göstermemektedirler. Biyoortogonal konjugasyon (bağlanma) reaksiyonları proteomiks, protein etiketleme ve protein modifikasyonu gibi *in vitro* çalışmaların yanı sıra hücre görüntülemesi, hücre etiketlemesi, tümörlü doku görüntülemesi ve PET görüntülemesi gibi çeşitli *in vivo* çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadırlar [9].

Konjugasyon reaksiyonu olarak bakır katalizli azid-alkin katılması (CuAAC), reaksiyonun çok hızlı gerçekleşmesi, yüksek verimle elde edilmesi ve ılımlı koşullarda gerçekleşmesi gibi özellikleri nedeniyle oldukça ilgi görmektedir. Fakat katalizör olarak toksik etki gösteren bakırın kullanılması, ekstra fonksiyonel grupların olması gerekliliği ve reaksiyon kinetiğinin yavaş olması sebebiyle farklı biyoortogonal reaksiyonlara gereksinim artmıştır. Bunun sonucunda süksinimid-amin, Michael katılması (tiyol-olefin), aminoksi-karbonil reaksiyonları, Staudinger ligasyonu (fosfin-azid) ve gergin halkalı alkin-azid reaksiyonları gibi çeşitli biyoortogonal reaksiyonları geliştirilerek literatürde yerini almıştır. Ancak son yıllarda geliştirilmiş ve literatürdeki en hızlı konjugasyon yöntemi olan Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder (IEDDA) *Click* Reaksiyonu tüm bu reaksiyonların önüne geçme potansiyeline sahiptir [124-133].

2.7.1 Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder (IEDDA) Reaksiyonları

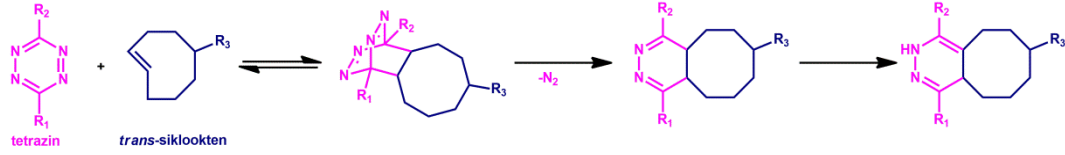
Biyomoleküllerin aktivitelerini kaybetmeden modifiye edebilen, onlara zarar vermeden seçici olarak modifikasyon yapabilen ve biyokimyasal reaksiyonlara herhangi bir olumsuz etki yaratmayan biyoortogonal reaksiyonlar sıklıkla kullanılmaktadır [9]. Bu reaksiyonlar içerisinde, Ters Elektron Gereksinimli Diels-Alder (IEDDA) *Click* Reaksiyonu, son yıllarda geliştirilmiş ve literatürdeki en hızlı konjugasyon yöntemidir. Şekil 2.28-a'da gösterilen tetrazin ve *trans*-siklookten (TCO) arasındaki reaksiyonun yarılanma ömrünün 10 saniye kadar kısa bir süre olması ve kantitatif olarak da az bir sürede gerçekleşmesi ile R gruplarında bulunan polimer, protein veya küçük moleküllerin birbirine bağlanması (Şekil 2.28-b) sağlanır [134]. Bu bağlanma, tetrazin molekülü ile TCO molekülü arasındaki Diels-Alder reaksiyonunda ortama azot gazının salınmasıyla meydana gelmektedir. Reaksiyonun çok hızlı oluşu, yüksek hızlı bağlanmanın gerekli olduğu yüzeyler arası polimerizasyon reaksiyonlarında kullanılmasına olanak sağlamaktadır.



Şekil 2.28 Tetrazin-*trans*-siklookten Diels-Alder *Click* Reaksiyonu (a) ve iki molekülün birbirine bağlanmasının şematik gösterimi (b)

Normal Diels-Alder reaksiyonunun aksine IEDDA reaksiyonu, elektron eksikliği olan bir dien ile elektron fazlalığı bulunan bir dienofil arasındaki [4 + 2] siklokatılma reaksiyonudur. Genellikle 1,2,4,5- tetrazinler ve olefinler arasında meydana gelir. Reaksiyon iki aşamada meydana gelir (Şekil 2.29). Buna göre öncelikle tetrazin ve olefin arasında Diels-Alder reaksiyonu gerçekleşir. Daha

sonra retro-[4 + 2] reaksiyonunda N₂ salınır ve sonunda reaksiyon, stabil bir dihidropiridazin veya piridazin bağlantısı aracılığıyla iki grubun birleşmesiyle sonuçlanır [135, 136].

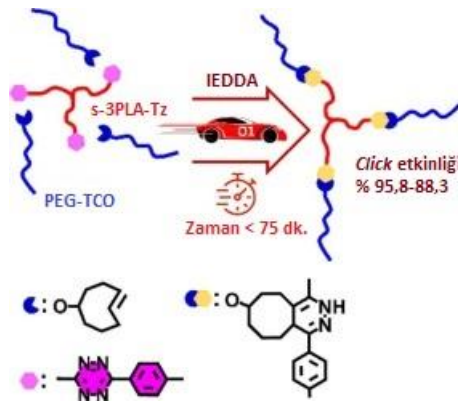


Şekil 2.29 Tetrazin ve TCO arasındaki IEDDA reaksiyonunun mekanizması

2.7.2 IEDDA Reaksiyonlarının Çeşitli Uygulamaları

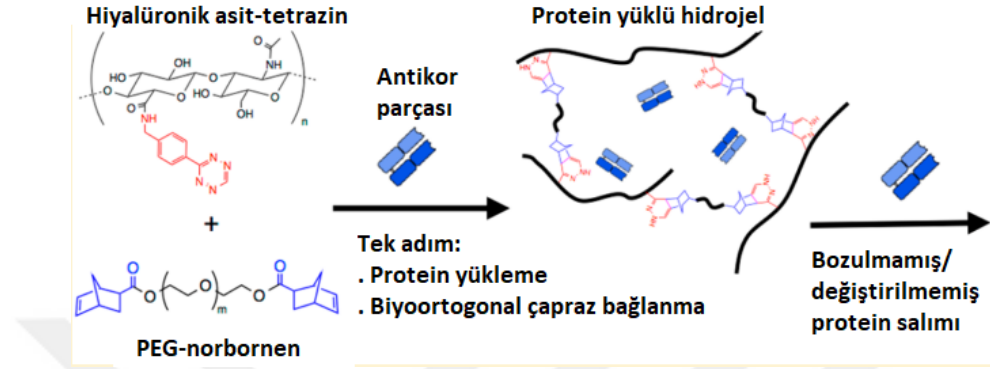
Biyootogonal reaksiyonlar 2008 yılında ilk kez Fox ve çalışma arkadaşları [124] tarafından rapor edildiğinden beri, canlı hücre görüntüleme [127, 137, 138], teşhis [139, 140], kimyasal biyoloji [141], biyomateryaller [142], malzeme bilimi [143] ve polimer bilimi [144-146] gibi pek çok alanda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Grubumuzda da sıklıkla kullanılan bu hızlı ve etkin sentez yöntemiyle çok çeşitli uygulamalar mevcuttur. Örneğin Kahveci vd. tarafından yapılan bir çalışmada üç kollu yıldız şekilli blok kopolimerler sentezlenmiştir. Öncelikle, halka açılma polimerizasyonu ile iki farklı moleküler kütleye sahip üç kollu PLA sentezlenmiş ve uç grupları tetrazin ile fonksiyonlaştırılmıştır. Ayrıca iki farklı moleküler kütleye sahip TCO fonksiyonel PEG molekülleri hazırlanmıştır. Yıldız polimerin tetrazin gruplarıyla PEG molekülündeki TCO arasında hızlı, etkili ve yüksek verimli IEDDA reaksiyonu gerçekleştirilerek, ilaç salımında da sıklıkla kullanılan yıldız şekilli amfifilik blok kopolimerlerin üretilmesine faydalı olabilecek bir yapı sentezlenmiştir (Şekil 2.30) [146].



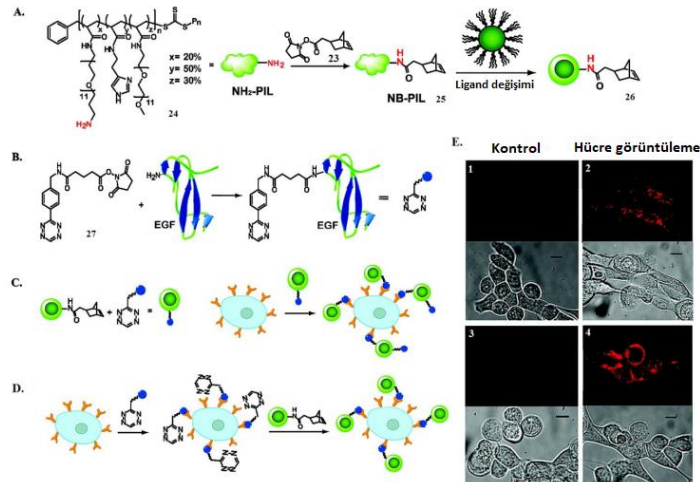
Şekil 2.30 Üç kollu yıldız şekilli blok kopolimerlerin IEDDA reaksiyonuyla eldesi [146]

Tez çalışmasına benzer bir çalışmada, protein enkapsüle edilmiş çapraz bağlı hidrojeller sentezlenmiştir (Şekil 2.31). Bunun için tetrazin fonksiyonel HA ve norbornen fonksiyonel PEG kullanılıp IEDDA reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protein yüklü hidrojellerin *in vitro* salım testlerinde, birkaç haftalık süre zarfında tüm proteinin salındığı görülmektedir [147].



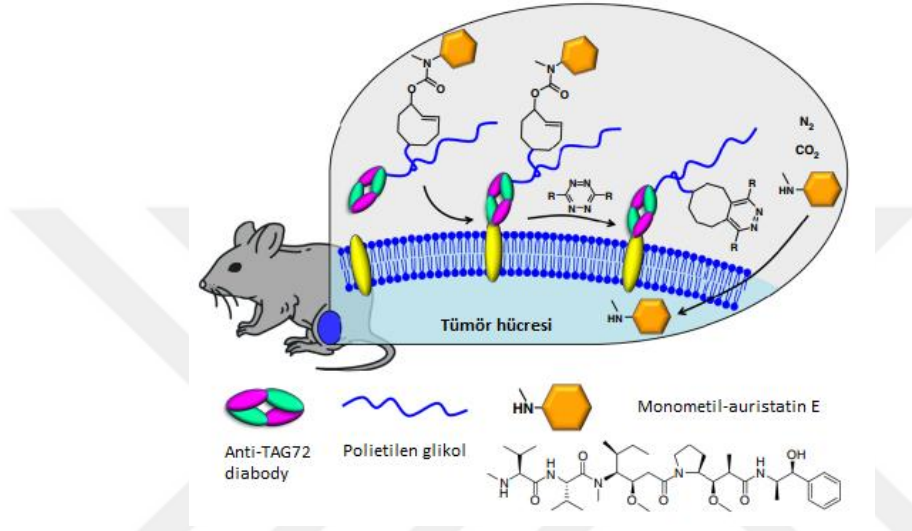
Şekil 2.31 Literatürde IEDDA reaksiyonuyla elde edilen protein yüklü bir hidrojinin şematik gösterimi [147]

Bawendi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada [148], norbornen kaplı suda çözünür kuantum dotlar elde edilmiştir (Şekil 2.32-A). Daha sonra epidermal büyüme faktörü (EGF), insan cilt kanseri hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen EGFR'yi hedefleyebilen tetrazin ile etiketlenmiştir (Şekil 2.32-B). Hücre etiketlemesi, doğrudan EGF-QD konjugatıyla (Şekil 2.32-C) veya önce tetrazin fonksiyonel EGF ile inkübe edilip ardından norbornen-QD ilave edilmesiyle (Şekil 2.32-D) yapılmıştır. Kuantum dotların floresans sinyali her iki yöntemle de tespit edilebilmiştir (Şekil 2.32-E) [143].



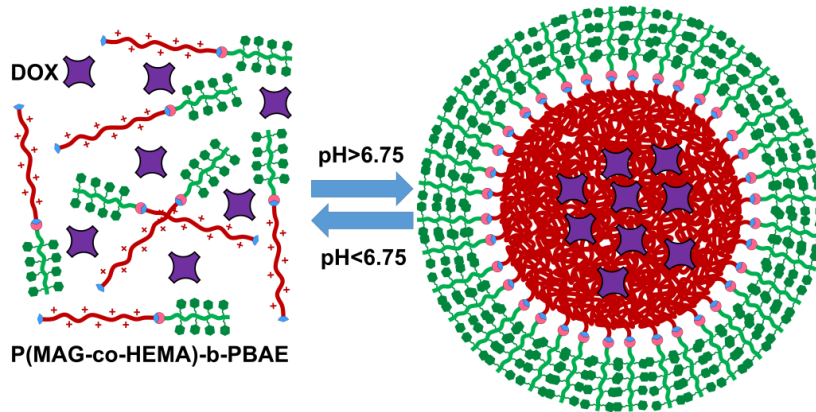
Şekil 2.32 Canlı hücre görüntülemesinde kullanılan tetrazin konjuge edilmiş kuantum dotlar [148]

Kanser hücreleri üzerindeki reseptörleri hedefleyen antikor-ilaç konjugatlarının hücre içi ilaç salımı çalışmaları mevcuttur. Fakat bazı tümör hücrelerinde, uygun içselleştirici olmayan reseptörler ve stroma hedefleri de bulunmaktadır. Literatürde yapılan bir çalışmada [149], içselleşmeyen bir kanser hücresi reseptörüne bağlı TCO fonksiyonel antikor-ilaç konjugatı ile tetrazin arasındaki reaksiyonun, çevredeki sağlıklı dokulara zarar vermeden hücre içi ilacın salınmasına yol açabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.33) [150].



Şekil 2.33 IEDDA kimyası kullanılarak tetiklenen ilaç salım örneği [149]

Grubumuz tarafından yapılan başka bir çalışmada, tetrazin fonksiyonel P(MAG-co-HEMA) ve norbornen bifonksiyonel PBAE arasında IEDDA reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve amfifilik blok kopolimerler sentezlenmiştir. DOX yüklü pH'a duyarlı polimerik miseller elde edilerek kanser hücresi hedeflenmiş ve ilaç salımı etkin bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 2.34) [10].



Şekil 2.34 IEDDA reaksiyonuyla elde edilen amfifilik blok kopolimerlerden pH'a duyarlı misel eldesi [10]

3

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Nanokapsül sentezinde miniemülsiyon oluşturmak amacıyla ultrasonik homojenizatör Bandelin Sonopuls HD2200 cihazı kullanılmıştır. ^1H -NMR analizleri, Agilent NMR System VNMR5 500 Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart olarak $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ içeren döteryumlu çözücüler kullanılmıştır. 1 cm yol uzunluğunda küvete sahip Peak Instruments C-7000 UV spektrofotometre cihazından yararlanılarak UV-Vis absorbans ölçümleri elde edilmiştir. Yapıların fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumları, ATR aksesuarı aracılığıyla Perkin-Elmer FT-IR Spectrum One-B spektrometresi cihazında $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ tarama aralığında ve 8 tarama sayısında kaydedilmiştir. Nanokapsüllerin ve nanokomplekslerin boyutu ve çoklu dağılım indisi (PDI) gibi fizikokimyasal karakterizasyonları dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile zeta potansiyel ölçümleri ise elektroforetik ışık saçılması (ELS) yöntemi ile Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Floresans çalışmaları nanokapsüller için PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrofluorometre cihazıyla, nanokompleksler için FS Agilent Cary Eclipse Floresans Spektrofotometresi ile 1 cm yol uzunluğuna sahip geleneksel bir hücre ile gerçekleştirilmiştir. Nanokompleksler için floresans ölçümleri sırasında uyarılma dalga boyu 490 nm olarak, yarı genişliği 5 nm (uyarma)/5 nm (emisyon) oranında sabit olacak şekilde ayarlanmıştır. Karbon film kaplı Cu ızgarasına damlatılıp kurumaya bırakılan nanokomplekslerin (1 mg/mL) morfolojisi, Thermo Scientific Quattro ESEM marka taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir. Yüksek vakum (15 kV) altında 9,8-10,0 mm aralığındaki çalışma mesafesinden dijital görüntüler alınmıştır. Antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında inkübe edilen plakalar, mikropilaka okuyucu olan BioTek EPOCH2 cihazıyla spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

4-(Aminometil)benzonitril hidroklorür (Sigma Aldrich), trietilamin (Sigma Aldrich), di-*tert*-bütil dikarbonat (Merck), çinko triflorometanosülfonat (Aldrich), asetonitril (Merck), hidrazin monohidrat (Sigma Aldrich), sodyum nitrit (Merck), trifloroasetik asit (TFA) (Merck), hiyalüronik asit MA:5-150 kDa (TCI), sodyum hiyalüronat MA:1500-2000 kDa (Acros Organics, %95), *N*-hidroksisüksinimit (NHS) (Merck), *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) (Sigma Aldrich), norbornen karboksilik asit (Oxchem), 1,8-oktandiol (Sigma Aldrich), *N,N'*-disiklohegzilkarbodiimid (DCC) (Aldrich), 4-(dimetilamino)piridin (DMAP) (Sigma Aldrich), kolistin sülfat (Deva İlaç tarafından sağlanmıştır), vankomisin hidroklorür (Sigma Aldrich), fluoresein izotiyosiyanat (FITC) (Sigma), polietilen-*b*-poli(etilen glikol) (PE-*b*-PEG, $M_n \sim 2250$ Da.) (Aldrich), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck), Sulforhodamin B (SRB) (Aldrich), Eosin B (Sigma Aldrich), Metilen Blue (Sigma Aldrich), süktroz (Wisent), hiyalüronidaz enzimi (Sigma Aldrich), Mueller Hinton Broth (MHB) (Sigma Aldrich), kimyasalları satın alınmıştır. PBAE'ler ($M_{w, GPC} = 9010$ g/mol) çalışma grubumuz tarafından önceki çalışmalara göre sentezlenmiştir [10]. Tablo 3.1'de antibakteriyel deneylerde kullanılan bakterilerin kodları ve karakteristik özellikleri verilmiştir.

Tablo 3.1 Antibakteriyel deneylerde kullanılan bakterilerin kodları ve karakteristik özellikleri

Bakteri	Duvar yapısı	Kaynak	Kolistin Duyarlılık	Vankomisin Duyarlılık	EUCAST MIC Kırılma Noktası (mg/mL) S ≤ R >	
<i>Escherichia coli</i>	Gram negatif	ATCC 25922	Duyarlı	Önerilmez	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram pozitif	ATCC 25923	Önerilmez	Duyarlı	2	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram negatif	ATCC 13833	Duyarlı	Önerilmez	2	2
Kolistin dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram negatif	Klinik İzolat	Dirençli	Önerilmez	-	2

Not: ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'nun tescilli ticari markasıdır.

S: Duyarlı, standart doz. R: Dirençli.

Tablo 3.1 Antibakteriyel deneylerde kullanılan bakterilerin kodları ve karakteristik özellikleri (devamı)

Bakteri	Duvar yapısı	Kaynak	Kolistin Duyarlılık	Vankomisin Duyarlılık	EUCAST MIC Kırılma Noktası (mg/L)	
					S ≤	R >
Vankomisin dirençli S. aureus (VRSA)	Gram pozitif	Klinik İzolat	Önerilmez	Dirençli	-	2
Metisilin dirençli S. aureus (MRSA)	Gram pozitif	ATCC 67101	Önerilmez	Dirençli	-	2
Bacillus cereus	Gram pozitif	ATCC 10876	Önerilmez	Duyarlı	2	2

Not: ATCC, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'nun tescilli ticari markasıdır.

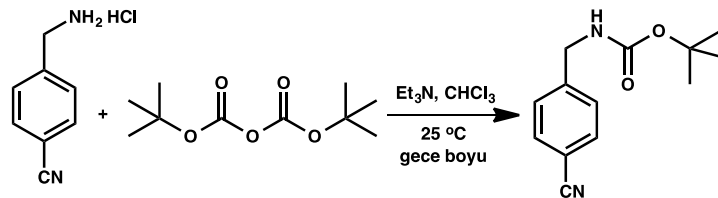
S: Duyarlı, standart doz. R: Dirençli.

3.2 Hiyalüronik Asidin Modifikasyonu ve Öncül Maddelerin

Sentezi

3.2.1 tert-Bütil 4-siyanobenzilkarbammat Sentezi

Amin foksiyonlu tetrazinin (Tz-NH₂) öncül maddesinde bulunan amin grubunun tetrazin sentezindeki şiddetli koşullardan etkilenmemesi için tert-bütilloksikarbonil (Boc-) grubu ile korunması gerekmektedir (Şekil 3.1) [151].



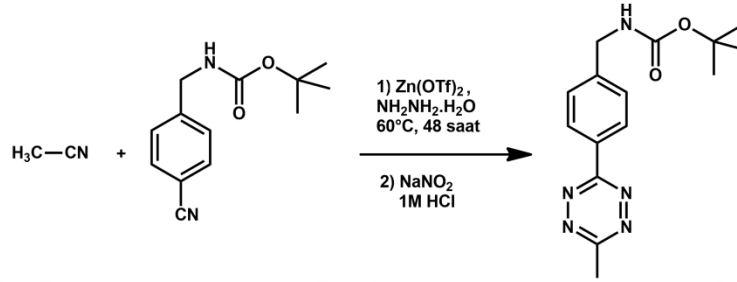
Şekil 3.1 tert-Bütil 4-siyanobenzilkarbammat sentezi

4-(aminometil)benzonitril hidroklorür (2,0 g, 11,86 mmol) ve trietilamin (2 mL, 14,35 mmol) argon gazı altında kloroforma (40 mL) eklenip reaksiyon karışımı çözüldükten sonra, bu çözeltiye di-tert-bütil dikarbonat (2,848 g, 13,05 mmol) eklendi. Oda sıcaklığında çözelti gece boyunca karıştırıldı. Elde edilen reaksiyon karışımı kloroformla seyreltilerek, seyreltik HCl (10 mL) çözeltisine dökülüp sonlandırıldı. Sırasıyla önce asit, sonra NaHCO₃ (10 mL) çözeltisi ve daha sonra da NaCl çözeltisi (10 mL) ile ekstraksiyon yapılarak organik faz MgSO₄ ile kurutuldu. Karışım süzüldükten sonra döner buharlaştırıcı ile çözücü

uzaklaştırılıp, saf ürün yüksek vakum altında kurutularak elde edildi. (beyaz katı, %97 verim).

3.2.2 *tert*-Bütil 4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzilkarbamatın (Tz-NH-Boc) Sentezi

Bu sentez için literatürdeki yöntem takip edilmiştir (Şekil 3.2) [152].



Şekil 3.2 *tert*-Bütil 4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzilkarbamat (Tz-NH-Boc) sentezi

tert-Bütil 4-siyanobenzilkarbamat (1,0 g, 4,3 mmol), asetonitril (3 mL, 57,4 mmol), çinko triflorometanosülfonat (0,805 g, 2,2 mmol) ve hidrazin monohidrat (11 mL, 228,8 mmol) 25 mL'lik balon içerisinde 60°C 'de 48 saat karıştırıldı. Oda sıcaklığına gelmesi beklenen reaksiyon karışımına, damla damla 10 mL NaNO_2 (8,4 g, 122 mmol) çözeltisi eklendi. Daha sonra 1M HCl çözeltisi damla damla ilave edilerek, pH değerinin 3 ve çözelti renginin de parlak pembe olması sağlandı. Reaksiyon sürecinde toksik NO gazı çıkması nedeniyle ortamın çok iyi havalandırılmasına dikkat edildi! Elde edilen ham ürünün etil asetat ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi ve daha sonra magnezyum sülfat ile kurutuldu. Karışım süzöldükten sonra çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılıp, en sonunda ürün hekzan/etil asetat (3:1) çözücü sisteminde silika jel kolon üzerinden saflaştırıldı (pembe katı, %47 verim).

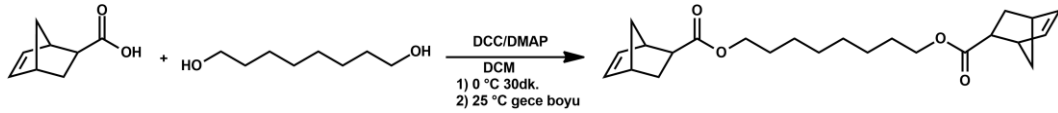
3.2.3 3-Benzilamino-6-metil-1,2,4,5-tetrazin (Tz-NH₂)

Sentezlenen Tz-NH-Boc (0,065 g, 0,215 mmol) molekülü, 2 mL tetrahidrofuran ve trifloroasetik asit (TFA) (2 mL, 26 mmol) varlığında 30 dakika boyunca karıştırılıp, reaksiyon balonu vakum pompasına takıldı. Uçucu bileşiklerin, çözücünün ve asidin uzaklaştırılmasıyla madde elde edildi (pembe katı, %97 verim) (Şekil 3.3).

sonra oda sıcaklığında 1 gece daha karıştırıldı. Son çözelti karışımı distile su ile seyreltilerek, önce 0,1 M NaCl çözeltisine, daha sonra distile suya karşı diyaliz (MWCO 10 kDa) edildi. Saflaştırılan çözelti liyofilize edildikten sonra açık pembe renkli katı ürün elde edildi ve +4°C’de saklandı (GB54/1).

3.2.5 Norbornen Foksiyonlu Hidrofobik Çapraz Bağlayıcı Sentezi

Bu sentez için literatürdeki yöntem takip edilmiştir (Şekil 3.5) [147].

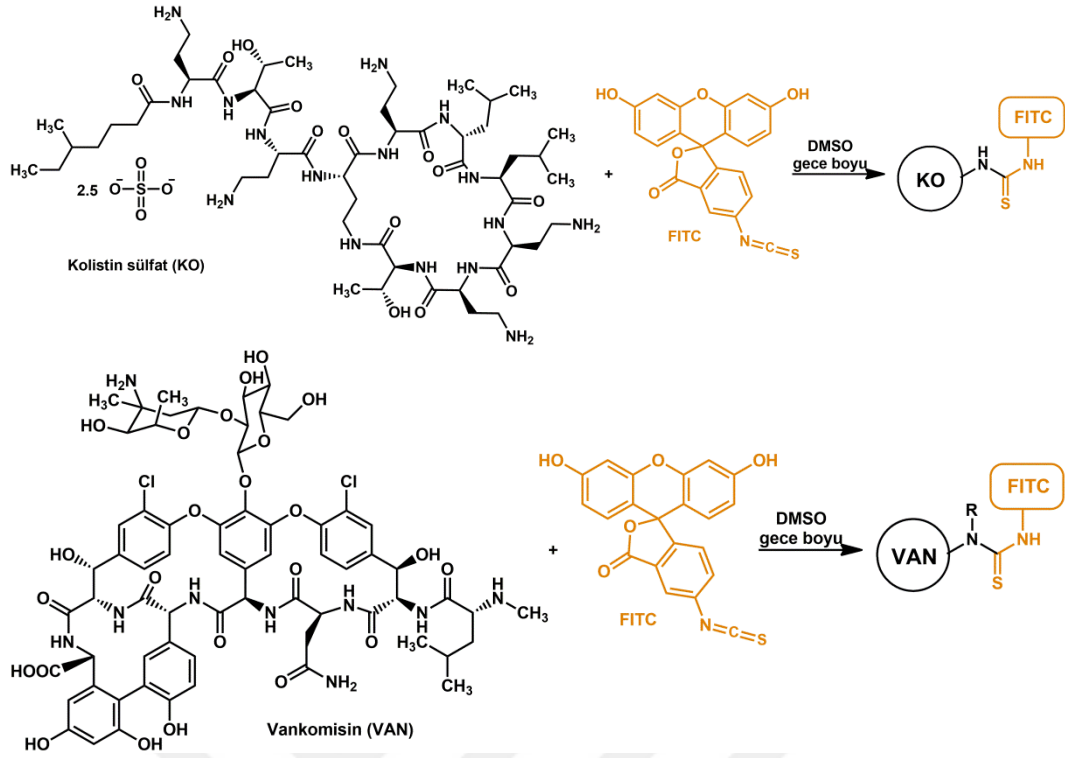


Şekil 3.5 Norbornen çapraz bağlayıcı sentezi

Norbornen karboksilik asit (690,8 mg, 5 mmol) bir miktar kuru diklorometanda çözöldü ve azot atmosferi altında buz ile soğutuldu. 1,8-oktandiol (146,2 mg, 1 mmol) bu çözeltiye eklendikten sonra 2,5 M DCC (515,8 mg, 2,5 mmol), 0,25 M DMAP (36,6 mg, 0,3 mmol) ve 2,5 M piridin (237,3 mg, 3 mmol) karışıma soğukta eklendi. Çözelti 10 dakika soğukta karıştırılıp daha sonra oda sıcaklığına getirilerek gece boyunca reaksiyon devam ettirildi. Reaksiyon karışımı süzöldükten sonra fazla çözücü uçuruldu. Etil asetatta çözülen maddeye önce doymun NaHCO₃ çözeltisiyle, daha sonra da doymun NaCl çözeltisiyle ekstraksiyon yapıldı. Organik faz kurutulup çözücünün uçurulmasından sonra, elde edilen ham ürün silika jel üzerinden hekzan/etil asetat (1:1) çözelti sistemi ile saflaştırıldı (sarı sıvı, %90 verim).

3.2.6 Kolistin Sülfat ve Vankomisin HCl’in Fluoresein İzotiyosiyanat ile İşaretlenmesi (KO-FITC, VAN-FITC)

50 mg kolistin sülfat (KO) ve 2 mg fluoresein izotiyosiyanat (FITC), DMSO ile çözülererek oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. Reaksiyon karışımı, soğuk dietileter:aseton (hacimce 9:1) karışımında çöktürölerek santrifüj edildi. Pelet, FITC molekülünün varlığından dolayı süpernatantta sarı renk görölmeyene kadar etanol ile yıkandı (sarı katı). Vankomisin hidroklorür (VAN) de aynı yöntemle işaretlendi (Şekil 3.6) [154]. FITC’nin bağlanması, ¹H-NMR ve UV-Vis spektroskopileri ile doğrulandı.



Şekil 3.6 Kolistin sülfat (KO) ve vankomisin hidroklorürün (VAN) fluoresein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmesi

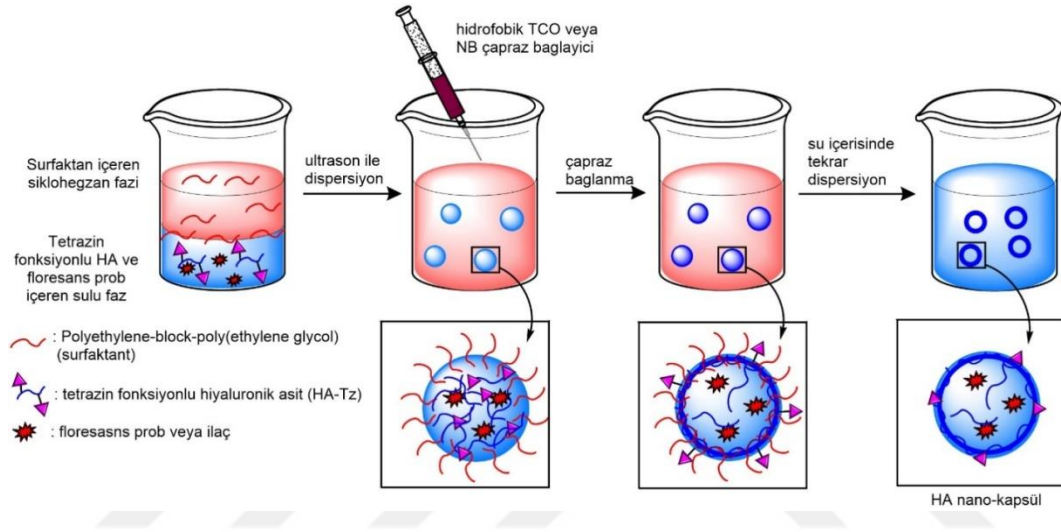
3.3 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Sentezi

3.3.1 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanokapsül Eldesi

HA temelli nanokapsüller elde etmek için yüzeyler arası (*interfacial*) tetrazin Diels-Alder *Click* Reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, örnek bir nanokapsül oluşumu literatür prosedürünün uyarlanmasıyla gerçekleştirilmiştir [2, 155].

Sulu fazda, fonksiyonel HA-Tz (25 mg) 1 mL PBS içerisinde çözüldü. Bu çözelti, surfaktan olarak kullanılan 65 mg PE-*b*-PEG ve 7,3 mL sikloheksan (organik faz) içerisine ilave edildi. Elde edilen karışım 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra miniemülsiyon oluşturmak amacıyla ultrasonik homojenizatör kullanılarak, 120 saniye (10 sn açık 1 sn kapalı) boyunca soğukta %30 amplitütte sonike edildi. 50 mg çapraz bağlayıcı ve 30 mg surfaktan, 1,5 mL sikloheksanda çözülerek hazırlanan çözelti, miniemülsiyona 5 dk. boyunca damla damla ilave edildi. Reaksiyon gece boyunca devam ettirildi. Nanokapsüller, iki kez santrifüj ile 4000 rpm'de 20 dakika boyunca çöktürülüp daha sonra sikloheksanda tekrar dispers edilerek surfaktandan arındırıldı. Ardından

sikloheksan içerisindeki nanokapsül dispersiyonuna, 1 mg/mL SDS (2,5 mL) ilave edildi ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında mekanik karıştırma ile redispers edildi. Sonra örnek (GB27/4, GB28/5 için) 5 dakika boyunca (GB28/6, GB28/7 için 20 dk.) ultrasonikasyon (%50 güçte, 25 kHz) ile tekrar dispers edilip santrifüj (4000 rpm, 2x20 dk.) edildi. Santrifüj sonunda sulu kısım membranlı ultrasantrifüj tüpüne alınarak, 4000 rpm’de 30 dakika (3x10 dk.) santrifüj edildi ve nanokapsüller saflaştırıldı. Sulu fazda elde edilen nanokapsüller 4 °C’de saklandı. Şekil 3.7’de sentez işleminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.7 Yüzeyler arası (*interfacial*) tetrazin Diels-Alder *Click* Reaksiyonu ile HA esaslı nano/mikro-kapsül sentezi

Sentez işlemi, boya molekülleri içeren ve içermeyen nanokapsüllerin elde edilmesi için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Bunun için 2 mM Sulforhodamin B (boya, SRB), PBS kullanılarak hazırlandı. Norbornen fonksiyonlu çapraz bağlayıcı kullanılarak Sulforhodamin B enkapsüle nanokapsüller sentezlendi.

Elde edilen sonuçlardan sonra HA esaslı nanoparçacıkların sentezi çeşitli optimizasyon işlemleri ile tekrar gerçekleştirilmiştir. Bu sentez sırasında kullanılan maddelerin miktarları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Optimizasyon sonrası yapılan nanokapsül sentezinde kullanılan madde miktarları

No	Deney Kodu	Başlangıç madde miktarları	Çapraz bağlayıcı karışım miktarları
1	GB28/8	GB19/5 = 25 mg PBS = 2 mM SRB çözeltisinden 1 mL Surfaktan = 65 mg Sikloheksan = 8 mL	GB5/3 = 100 mg Surfaktan = 30 mg Sikloheksan = 6 mL
2	GB27/5	GB19/5 = 25 mg PBS = 1 mL Surfaktan = 65 mg Sikloheksan = 7,3 mL	GB5/3 = 100 mg Surfaktan = 30 mg Sikloheksan = 2 mL
3	GB28/9	GB19/5 = 25 mg PBS = 2 mM SRB çözeltisinden 1 mL Surfaktan = 65 mg Sikloheksan = 7,3 mL	GB5/3 = 100 mg Surfaktan = 30 mg Sikloheksan = 2 mL

Farklı boyalar (Eosin B ve Metilen Blue) kullanılmak üzere; surfaktan, sikloheksan ve çapraz bağlayıcı miktarlarında (Tablo 3.3) değişiklikler yapılarak da denemeler gerçekleştirilmiştir.

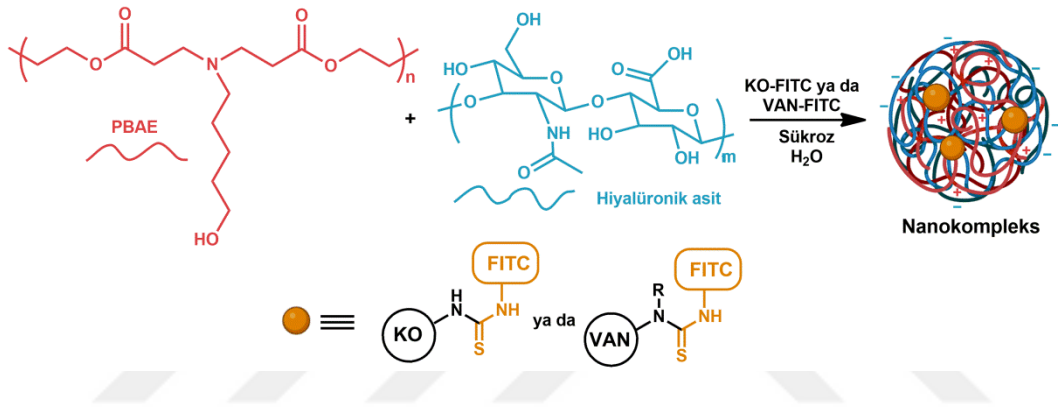
Sentez işlemi, boya molekülleri içeren ve içermeyen nanokapsüllerin elde edilmesi üzerine gerçekleştirilmiştir. Bunun için 2 mM Eosin B ve 2 mM Metilen Blue boyaları, PBS içerisinde hazırlandı. Norbornen fonksiyonlu çapraz bağlayıcı kullanılarak Eosin B ve Metilen Blue boyaları enkapsüle nanokapsüller sentezlendi.

Tablo 3.3 Nanokapsül sentezinde kullanılan madde miktarları

No	Nanoparçacık	Başlangıç madde miktarları	Çapraz bağlayıcı karışım miktarları
1	Eosin B yüklü	GB19/5 = 25 mg PBS = 2 mM Eosin B çözeltisinden 0,5 mL Surfaktan = 5,2 mg Sikloheksan = 3 mL	GB5/3 = 40 mg Surfaktan = 12 mg Sikloheksan = 0,8 mL
2	Metilen Blue yüklü	GB19/5 = 25 mg PBS = 2 mM Metilen Blue çözeltisinden 1 mL Surfaktan = 65 mg Sikloheksan = 7,3 mL	GB5/3 = 50 mg Surfaktan = 30 mg Sikloheksan = 2 mL

3.3.2 KO-FITC ve VAN-FITC Yüklü HA-PBAE Nanokomplekslerinin (HA-PBAE-(KO-FITC), HA-PBAE-(VAN-FITC)) Hazırlanması

HA/PBAE nanokompleksi literatürdeki örnek bir prosedürün uyarlanmasıyla elde edilmiştir (Şekil 3.8) [12]. Kısaca, HA (4 mg, 1500-2000 kDa, HA_Y) 19,3 mL distile suda çözüldü. Aynı yerlerde KO-FITC (1 mg/mL) sulu çözeltisi ve PBAE (12 mg/mL metanol) çözeltisi hazırlandı. HA'ya sırasıyla KO-FITC (0,2 mL) ve PBAE (0,5 mL) çözeltileri damla damla ilave edildi. 600 rpm karıştırmada 2 saat boyunca reaksiyon sürdürüldü. Bu sürenin sonunda karışıma, 50 mg/mL sükröz (1 mL) ilave edilip yarım saat karıştırıldı ve HA/PBAE nanokompleksi liyofilize edildi (GB59/2: 66,2 mg, Tablo 3.4).



Şekil 3.8 HA/PBAE nanokomplekslerinin hazırlanması

KO-FITC veya VAN-FITC içeren diğer HA/PBAE nanokompleksleri, daha düşük moleküler ağırlığa sahip olan HA (5-150 kDa, HA_D) ile hazırlandı. Bunun için 30 mg HA, 22,5 mL su içerisinde çözüldü. KO-FITC veya VAN-FITC'nin (0,33 mg/mL) sulu çözeltisi ve PBAE çözeltisi (metanol içinde 15 mg/mL) ayrı ayrı hazırlandı. Reaksiyon 3.3.2 numaralı başlıkta anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Nanokompleks, liyofilizasyondan sonra sarı katı halinde elde edildi (KO-FITC içeren GB56/3: 210 mg, VAN-FITC içeren GB74/1: 216 mg). Tablo 3.4'te tüm nanokomplekslerin üretiminde kullanılan madde miktarları özetlenmiştir.

Tablo 3.4 HA/PBAE nanokomplekslerinin hazırlanmasında kullanılan madde miktarları

Deney Kodu	HA (mg)	PBAE (mg)	Sükroz (mg)	KO-FITC (mg)	Su (mL)	Metanol (mL)	Nanokompleks (mg) ^f
GB56/3	30 ^a	45	150	7,5	48	3	210
GB56/4	20 ^a	30	100	5	32	2	137
GB59/2	4 ^b	6	50	0,2	20,5	0,5	66,2
GB59/3	12 ^b	18	150	0,6	61,5	1,5	180,4
GB68/2	10 ^a	15	50	2,5 ^c	16	1	74,7
GB68/3	20 ^a	30	100	5 ^c	32	2	145
GB68/4	10 ^a	15	50	2,5 ^c	16	1	75,3
GB69/2	10 ^a	15	50	-	16	1	70
GB69/3	10 ^a	15	50	-	16	1	76
GB72/1	20 ^a	30	100	5 ^d	32	2	144,6
GB74/1	30 ^a	45	150	7,5 ^e	48	3	216
GB79/1	10 ^a	15	-	2,5 ^c	15	1	15,2 ^g
GB80/1	10 ^a	15	-	-	15	1	12,2 ^g

^a 5-150 kDa molekül kütleli HA (HA_D) kullanılmıştır.

^b 1500-2000 kDa molekül kütleli HA (HA_Y) kullanılmıştır.

^c FITC ile etiketlenmemiş kolistin sülfat kullanılmıştır.

^d Vankomisin hidroklorür kullanılmıştır.

^e FITC ile etiketlenmiş vankomisin hidroklorür kullanılmıştır.

^f Liyafilizasyondan sonra elde edilen HA/PBAE nanokomplekslerinin kütlesi.

^g 8 mL örneğin liyafilizasyonundan sonra elde edilen HA/PBAE nanokomplekslerinin kütlesi.

3.4 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Enzimatik

Parçalanma ve Salım Davranışlarının İncelenmesi

3.4.1 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanokapsülün Enzime Bağlı Salım Deneyleri

Nanokapsüllerden enzim varlığında salım çalışmaları, floresans bir boya olan Sulforhodamine B'nin salımı 24 saat boyunca (0, 1, 2, 4, 6, 8, 9 ve 24. saatler) takip edilerek gerçekleştirilmiştir [1].

Salım deneyleri için 500 mL fosfat tamponu (0,02 M; pH 7,4; 77 mM NaCl) (PBS), kullanımdan yarım saat önce hazırlandı. Bunun yarısına %0,01 BSA eklenerek, hiyalüronidaz aktivitesi için optimum pH olan 5'e ayarlandı. Hiyalüronidaz enzimine (8, 4 ve 1 mg) (GB39/2, GB39/3; GB40/2, GB40/3; GB41/2, GB41/3, sırasıyla) hazırlanan pH 5 olan PBS'den 1 mL eklenerek karıştırıldı. Bu çözeltiye 1 mL sentezlenen nanokapsüllerin (GB39/2, GB40/2 ve GB41/2 deneyleri için GB28/6 nanokapsülü; GB39/3, GB40/3 ve GB41/3 deneyleri için GB28/7 nanokapsülü) eklenmesinden sonra numunelerin (pembe renkli çözelti) diyalizi, pH 5 olan PBS'e karşı 37 °C'de hafifçe çalkalanarak gerçekleştirildi. Nanokapsüllerin parçalanması üzerine floresans boya salımı 24 saate kadar incelendi. Belirtilen zaman aralıklarından sonra, diyaliz suyundan alınan numuneler pH 7,4 olan ve BSA içermeyen PBS ile seyreltilerek floresans spektrometresi ile ölçüldü. Aynı zamanda kontrol amacıyla enzimin ilave edilmediği örnekler (GB28/6 nanokapsülünde GB45/1 deneyi; GB28/7 nanokapsülünde GB45/2 deneyi) de hazırlanarak deneyde kullanıldı ve floresans ölçümleri (uyarılma 500-650 nm, emisyon 560 nm) alındı. 579,05 nm'de maksimum değerler elde edildi.

3.4.2 HA-PBAE-(KO-FITC) ve HA-PBAE-(VAN-FITC)

Nanokomplekslerinden pH'a ve Enzime Bağlı Salım Deneyleri

KO-FITC'nin nanokomplekslerden (GB59/3; GB56/3) salımı, diyaliz yöntemi kullanılarak pH'a bağlı olarak incelenmiştir. Bunun için 0,01 M PBS pH 7,4 ve pH 5,5 olarak iki farklı salım ortamı kullanılıp, deney her iki pH değeri için de üçer ayrı denemeyle eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Her deneme için 4 mg/mL konsantrasyon değerindeki numunelerden 5 mL alınıp, moleküler ağırlık kesme (MWCO) değeri 10 kDa olan diyaliz membranına yerleştirildi ve 30 mL salım ortamına (0,01 M PBS pH 7,4 ve pH 5,5) karşı diyaliz edildi. 100 rpm ve 37 °C'deki su banyosunda karıştırılarak 0, 1, 2, 4, 6, 24 ve 48. saatlerde örnekler alınarak yerine aynı miktarda PBS ilave edildi [11]. Nanokompleksten salınan KO-FITC, floresans spektroskopisi (uyarılma 490 nm, emisyon 517 nm) ile takip edildi.

Deney ayrıca enzim varlığında da gerçekleştirildi. Bunun için 20 mg HA-PBAE-(KO-FITC) kompleksi (GB59/3; GB56/4) 4 mL PBS pH 7,4 içerisinde, 20 mg hiyalüronidaz enzimi ise 1 mL PBS pH 7,4 içerisinde çözülerek (GB 56/4 için 2

mg enzim) karıştırıldı. Yukarıda bahsedildiği gibi PBS pH 5,5 salım ortamında diyaliz gerçekleştirilip belirtilen saatlerde örnekler alındı.

Tüm salım çalışmaları aynı zamanda enzim varlığında ve yokluğunda HA-PBAE-(VAN-FITC) nanokompleksi (GB74/1) için de gerçekleştirildi. Deney yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

3.5 Antibiyotik Yüklü Nanokomplekslerin Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi

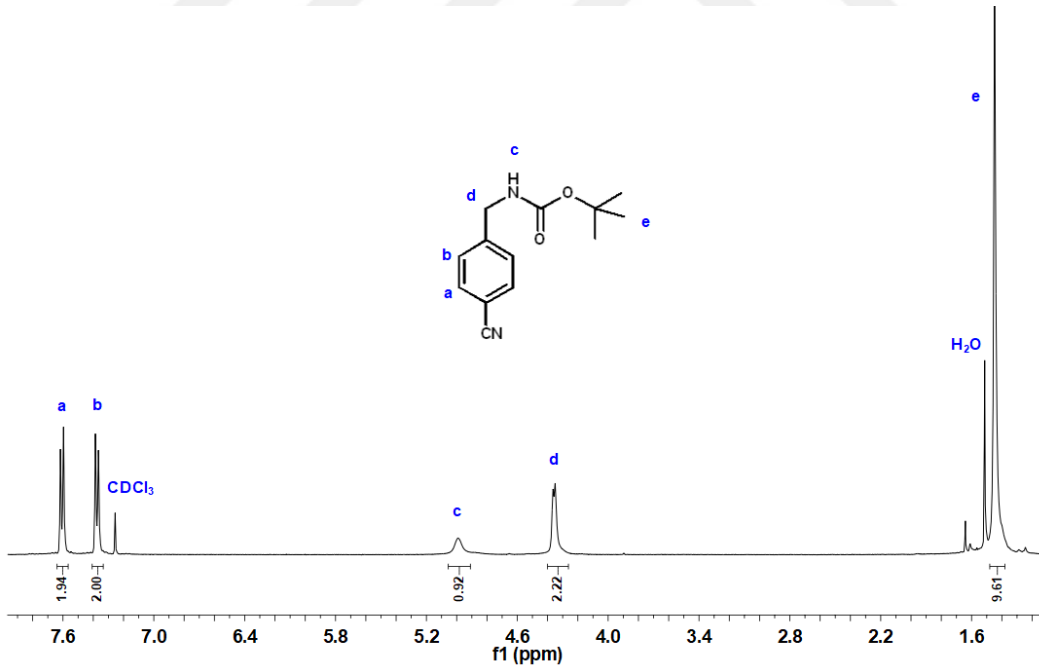
Ayrı ayrı olarak vankomisin (VAN) ve kolistin sülfat (KO) antibiyotiklerini içeren nanokomplekslerin antibakteriyel etkinliği için, CLSI standardına göre broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MIC (Minimum İnhibitor Konsantrasyon) değerleri belirlendi [156]. Her iki nanokompleks için de antibiyotik içeriği 0,5 mg/mL veya eşdeğer bir kütleye ayarlandı. Serbest antibiyotik ve herhangi bir antimikrobiyal madde içermeyen bakteri ortamı kontrol grubu olarak ayrı ayrı kullanıldı. Tez çalışması kapsamında, EUCAST standardına [157] uygun olarak spesifik antibiyotik-bakteri etkileşimleri ve MIC değerleri dikkate alınarak her iki nanokompleksin antibakteriyel etkinliği araştırıldı. Buna göre VAN nanokompleksinin antibakteriyel aktivitesi *Staphylococcus aureus*, Vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA), Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve *Bacillus cereus*'a karşı test edildi. Ayrıca KO yüklü nanokompleks, *Klebsiella pneumoniae*, dirençli *K. pneumoniae* ve *E.coli*'ye karşı değerlendirildi. Kısaca, test örneklerinin stok çözeltileri MHB (Mueller Hinton Broth) ile 500-0,25 µg/mL aralığında seri dilüsyonlar yapılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plakanın ayrı ayrı kuyucuklarına 10^6 CFU/mL konsantrasyonda 100 µL bakteri kültürünün eklenmesinin ardından, her test numunesi dilüsyonundan 100 µL kuyucuklara sırayla eklendi (nihai bakteri konsantrasyonu $1-2 \times 10^5$ CFU/mL). Daha sonra plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi ve hem spektrofotometrik ölçümler hem de standart plaka sayımı metodu kullanılarak MIC değerleri belirlendi.

4.1 Hiyalüronik Asidin Modifikasyonu ve Öncül Maddelerin Sentezi

4.1.1 *tert*-Bütil 4-siyanobenzilkarbamat sentezi

Amin foksiyonlu tetrazinin (Tz-NH₂) öncül maddesinde bulunan amin grubunun tetrazin sentezindeki şiddetli koşullardan etkilenmemesi için Boc- grubu ile korunması gerekmektedir. Buna göre koruma grubunu içeren *tert*-bütil 4-siyanobenzilkarbamat molekülü sentezlenmiş ve ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir. Moleküle ait karakteristik aromatik proton ve Boc- grubuna ait proton pikleri sırasıyla 7,60 ve 7,39 ppm ile 1,45 ppm'de gözlenmiştir.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 1,45 (s, 9H, C-(CH₃)₃), 4,35 (d, 2H, -Ar-H-CH₂-NH-), 4,99 (s, H, -CH₂-NH-), 7,39 (d, 2H, Ar-H), 7,60 (d, 2H, Ar-H).

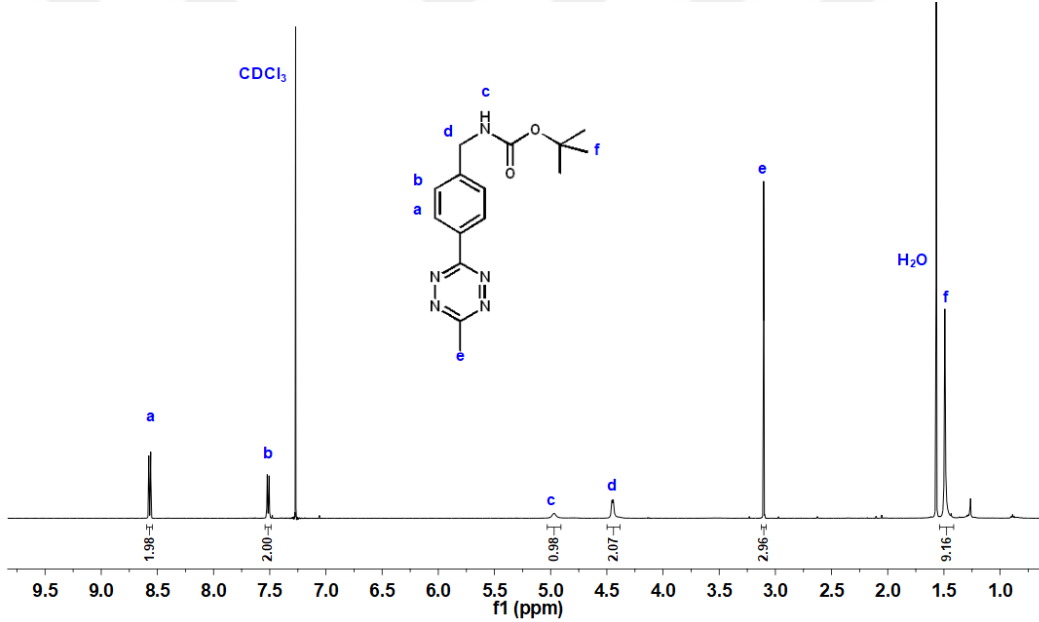


Şekil 4.1 *tert*-Bütil 4-siyanobenzilkarbamatin ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)

4.1.2 *tert*-Bütil 4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzilkarbamatın (Tz-NH-Boc) Sentezi

Koruma grubuna sahip tetrazin molekülü sentezlenmiştir. Sentezlenen yapının ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.2’de verilmiştir. Moleküle ait karakteristik aromatik protonların ve Boc- grubuna ait protonların pikleri sırasıyla 7,51 ve 8,58 ppm ile 1,49 ppm’de gözlenmiştir. Ayrıca amit proton ve metilen proton piklerinin 4,96 ppm ve 4,45 ppm’de gözlenmesi molekülün başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 1,49 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3,10 (s, 3H, tetrazine- CH_3), 4,45 (s, 2H, $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 4,96 (s, H, $-\text{NH}-\text{CO}-$), 7,51 (d, 2H, Ar-H), 8,58 (d, 2H, Ar-H).

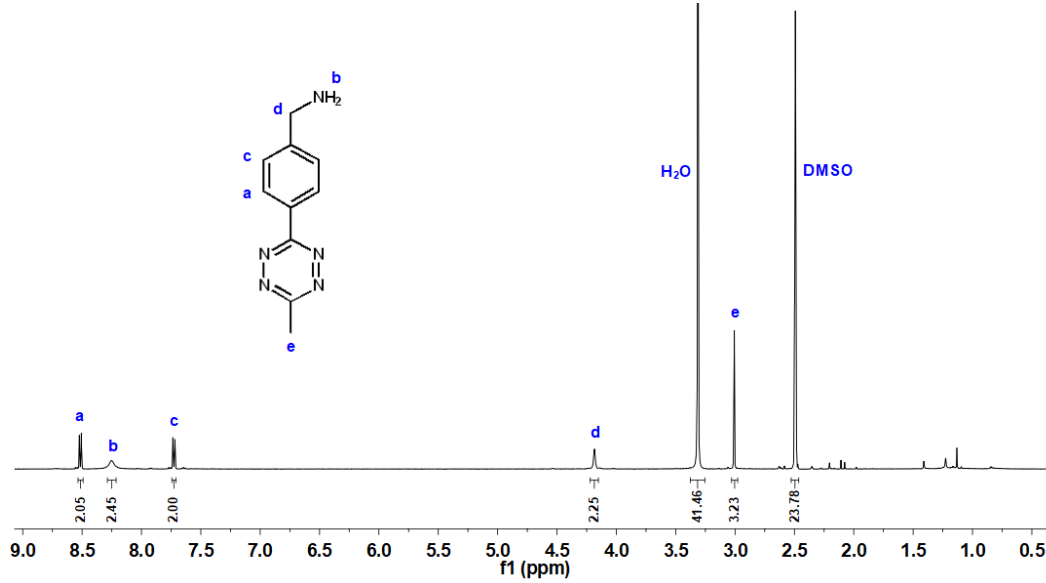


Şekil 4.2 *tert*-Bütil 4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)benzilkarbamatın (Tz-NH-Boc) ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

4.1.3 3-Benzilamino-6-metil-1,2,4,5-tetrazin (Tz-NH₂)

TFA ile hidroliz sonucu Boc- koruma grubu kaldırılan amino tetrazinin (Tz-NH₂) ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.3’te verilmiştir. Spektrumda 1,5 ppm civarındaki Boc- grubuna ait proton piklerinin tamamen kaybolması ve diğer tüm karakteristik piklerin gözlenmesi, molekülün başarı ile sentezlendiğini desteklemektedir.

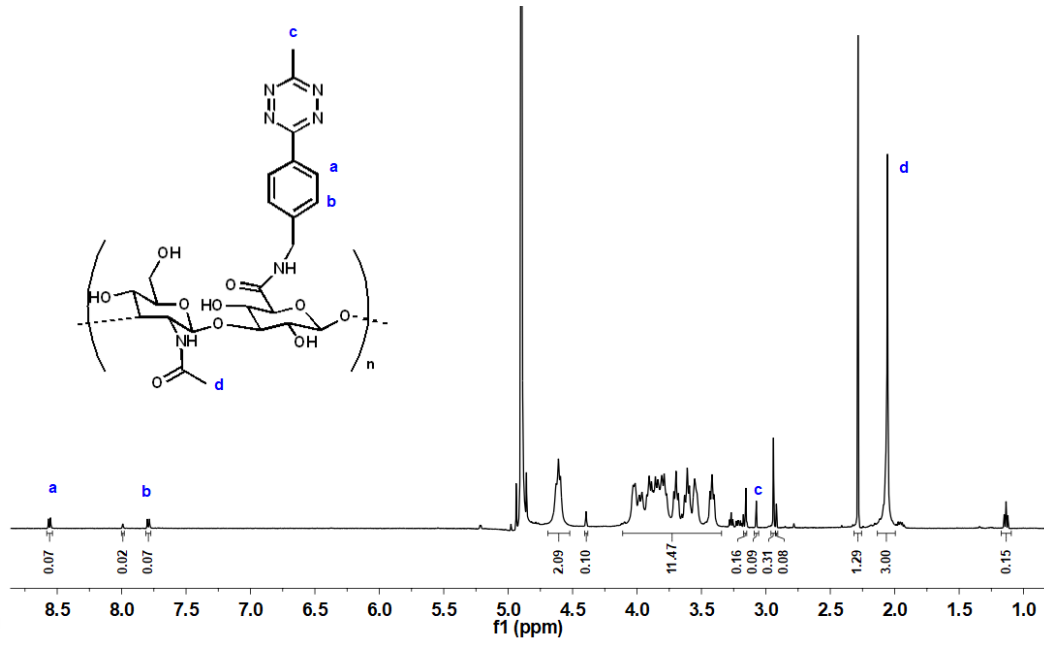
^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ (ppm)): 3,01 (s, 3H, tetrazine- CH_3), 4,18 (s, 2H, $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 7,74 (d, 2H, $\text{Ar}-\text{H}$), 8,25 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 8,51 (d, 2H, $\text{Ar}-\text{H}$).



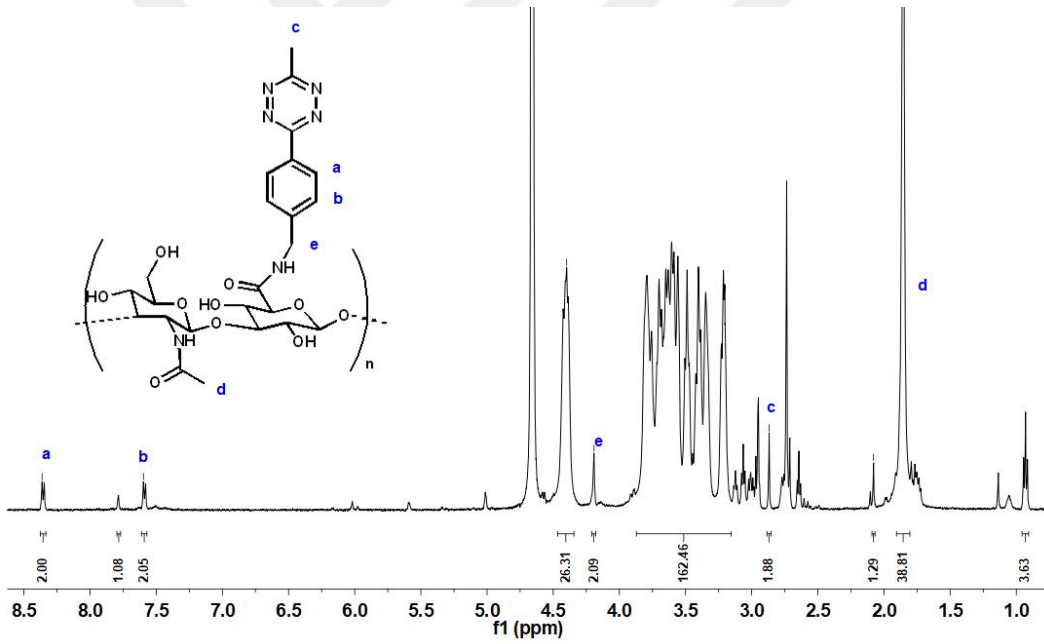
Şekil 4.3 3-Benzilamino-6-metil-1,2,4,5-tetrazinin ($\text{Tz}-\text{NH}_2$) ^1H -NMR spektrumu ($\text{DMSO}-d_6$)

4.1.4 Hiyalüronik Asit-Tetrazin (HA-Tz) Sentezi

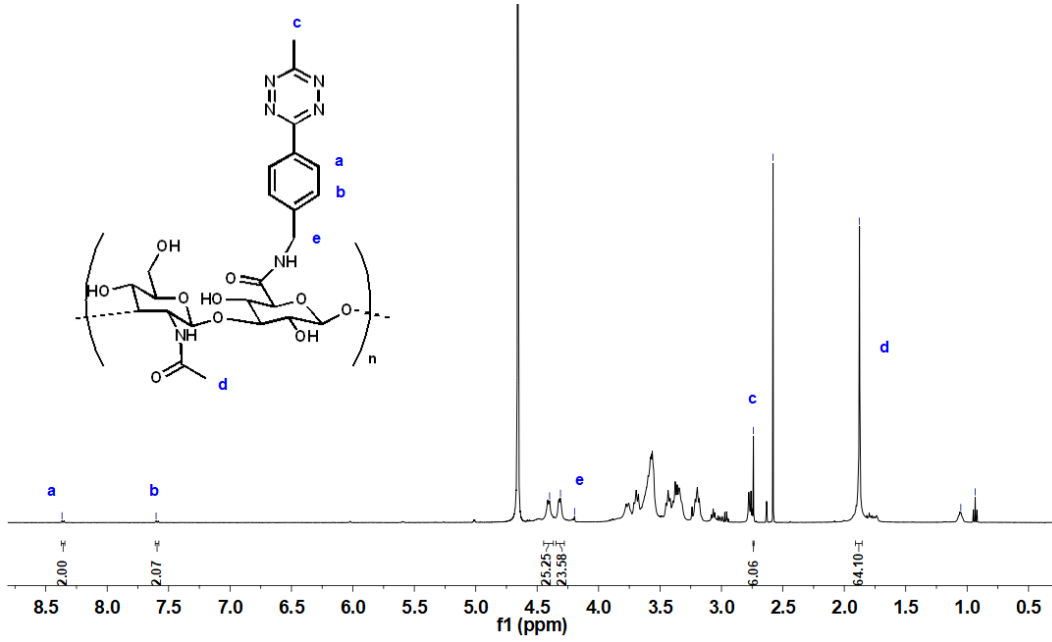
HA'ya tetrazin bağlanması için, EDC ve NHS varlığında amin fonksiyonlu tetrazin molekülü ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Yeterli oranda tetrazin bağlanmadığı ^1H -NMR spektrumundan (Şekil 4.4) tespit edilmiştir. Enzimle salım çalışmalarının sonunda elde edilen verilerle nanokapsül yapısının çapraz bağlanma derecesinin düşük olması nedeniyle daha serbest yapıda olduğu ve bu nedenle boyanın kendiliğinden, tetikleme olmadan salımın gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Bunu önlemek amacıyla, HA'ya tetrazin bağlanma reaksiyonunda $[\text{HA}]:[\text{Tz}-\text{NH}_2]$ oranı 6:1'den (GB19/1) 1:1'e (GB19/5) değiştirilmiştir. Sentezlenen maddenin ^1H -NMR spektrumuna göre (Şekil 4.5) oran değişikliğine rağmen yapıya, istenilen oranda tetrazin bağlanamamıştır. HA-Tz alternatif başka bir yöntemle yeniden sentezlenmiştir (GB54/1) [105]. Tetrazin bağlanma oranı ^1H -NMR'dan (Şekil 4.6) 1/43 olarak hesaplanmıştır. Yeni yöntemde de tetrazin bağlanma oranının yetersiz olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4 HA-Tz'nin (GB19/1) ¹H-NMR spektrumu (D₂O)



Şekil 4.5 HA-Tz'nin (GB19/5) ¹H-NMR spektrumu (D₂O)

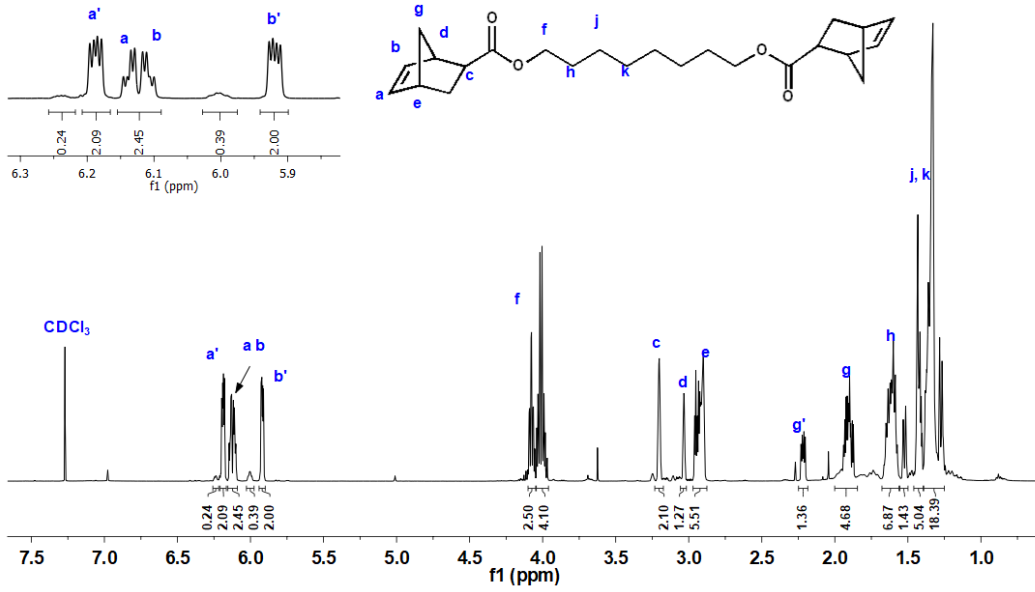


Şekil 4.6 HA-Tz'nin (GB54/1) ^1H -NMR spektrumu (D_2O)

4.1.5 Norbornen Foksiyonlu Hidrofobik Çapraz Bağlayıcı Sentezi

Bifonksiyonel norbornen çapraz bağlayıcısı sentezlenmiş ve ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.7'de verilmiştir. Molekülün NMR spektrumunda 5,80-6,25 ppm arasında norbornene ait olefinik piklerin ve oktil grubuna ait alifatik piklerin gözlenmesi molekülün başarı ile sentezlendiğini göstermektedir.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): 1,44 (m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 1,60 (m, 2H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1,89 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2,21 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2,90 (m, 1H, $=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2-$), 3,03 (s, 1H, $=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}-$), 3,20 (s, 1H, $-\text{CH}-\text{COO}-$), 4,08 (t, 2H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-$), 5,93 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 6,12 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 6,13 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 6,19 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$). (Kullanılan norbornen karboksilik asit kimyasalı, endo/ekzo karışımı olduğundan dolayı a', b', g' pikleri bulunmaktadır.)

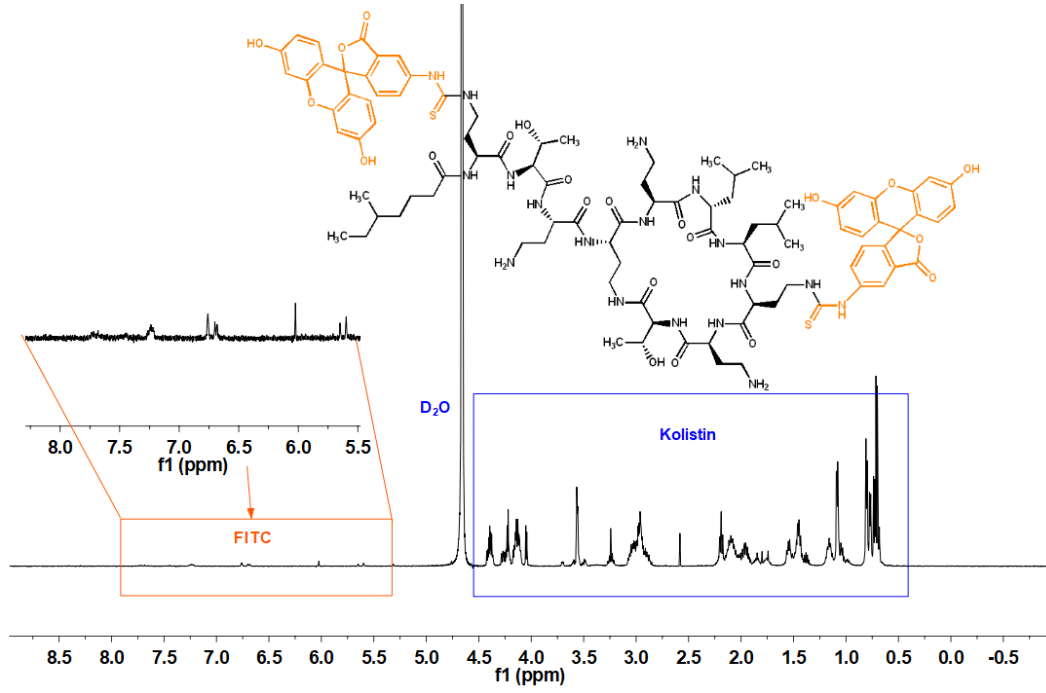


Şekil 4.7 Norbornen çapraz bağlayıcısının ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3)

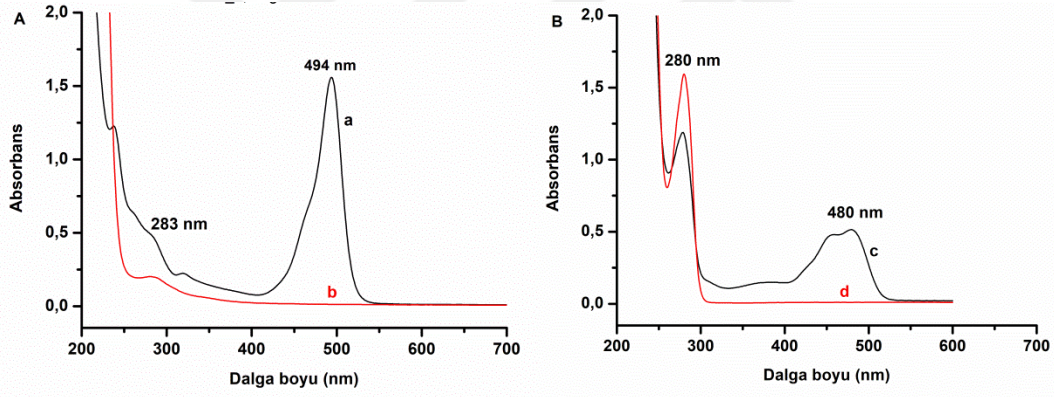
4.1.6 Kolistin Sülfat ve Vankomisin HCl'in Fluoresein İzotiyosiyanat ile İşaretlenmesi (KO-FITC, VAN-FITC)

Antibiyotiklerin nanokompleks yapılardan salımını izlemek için, hem KO hem de VAN, antibiyotiklerin amino grupları ile FITC'nin izotiyosiyanat grubu arasındaki reaksiyon yoluyla kütle %4 oranında FITC ile karıştırılarak basitçe işaretlendi. Antibiyotiklerin fazla etanolle birkaç kez yıkanmasıyla, bağlanmayan boya molekülleri uzaklaştırıldı. Antibiyotiklerin amino grupları ile FITC'nin izotiyosiyanat grubu arasındaki konjugasyon reaksiyonu, ^1H -NMR ve UV-Vis spektroskopileri ile doğrulandı. KO-FITC'nin ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.8), 7,73-5,60 ppm aralığında gözlenen pikler FITC molekülüne aitken, 4,42-0,69 ppm aralığında gözlenen pikler KO'ya aittir.

FITC molekülünün KO ve VAN'a konjugasyonu, Şekil 4.9'da gösterildiği gibi UV-Vis spektroskopisi ile de incelendi. Buna göre KO-FITC molekülünde FITC'ye ait maksimum 494 nm'de bir absorpsiyon bandı görüldü. Ayrıca VAN-FITC molekülünde pikin 480 nm'de olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, FITC'nin KO ve VAN'a konjugasyonunun başarılı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.8 KO-FITC molekülünün ^1H -NMR spektrumu (D_2O)



Şekil 4.9 KO-FITC (0,3 mg/mL) (a), KO (3,3 mg/mL) (b), VAN-FITC (0,6 mg/mL) (c) ve VAN (0,5 mg/mL) (d) sulu çözeltilerinin UV-Vis spektrumları

4.2 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Sentezi

4.2.1 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanokapsül Eldesi

Sentez işlemi, boya molekülleri içeren (GB28/5-9) ve içermeyen (GB27/4-5) nanokapsüllerin elde edilmesi üzerine gerçekleştirilmiştir. Bunun için 2 mM Sulforhodamine B (boya, SRB), PBS kullanılarak hazırlandı. Norbornen fonksiyonlu çapraz bağlayıcı kullanılarak Sulforhodamin B enkapsüle nanokapsüller sentezlendi.

Sentezlenen tüm nanoparçacıkların DLS (boyut) ve ELS (zeta potansiyel) ölçümleri Tablo 4.1’de verilmiş olup parçacıkların **60-160 nm** arasında hidrodinamik çapa sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 4.1 Nanoparçacıkların DLS ve ELS sonuçları

No	Deney Kodu	Ort. Boyut (nm)	Zeta potansiyel (mV)
1	GB27/4	160 ± 6,36	-
2	GB27/5	69 ± 0,6	-4,64 ± 0,12
3	GB28/5	159 ± 3,4	-
4	GB28/6	74 ± 1,02	-7,6 ± 0,34
5	GB28/7	124 ± 1,16	-9,7 ± 0,42
6	GB28/8	60 ± 0,73	-6,03 ± 0,38
7	GB28/9	75 ± 0,22	-4,21 ± 0,45

Enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi

Sentezlenen nanokapsüllerin içine yüklenen boya miktarının hesaplanmasında UV-Vis spektroskopisinden yararlanıldı. Bunun için, çeşitli konsantrasyonlarda ($20-0,625 \times 10^{-6}$ M aralığında) SRB sulu çözeltileri hazırlanıp ölçümler (565 nm) alındı ve elde edilen verilerle kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.10). Sentez sırasında toplanan tüm süpernatantlar için ölçüm alınıp elde edilen kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonlar hesaplanarak yüklenmeyen boya miktarları hesaplandı. Daha sonra yüklenen boya miktarına göre, sentezlenen nanokapsüllerin boya yükleme kapasiteleri (4.1) ve enkapsülasyon etkinlikleri (4.2) ilgili eşitlikler kullanılarak hesaplandı (Tablo 4.2). Tablodaki değerler, boyanın toplam kütlesi 1,16 mg ve nanopartiküllerin toplam kütlesi 25 mg olacak şekilde hesaplanmıştır. UV-Vis spektroskopisinde ölçüm yapılırken, boş olarak sentezlenen nanokapsülün (GB27/4 veya GB27/5) süpernatantları, surfaktandan kaynaklanan absorbans değerini elimine etmek amacıyla boya içeren örneklerin ölçümleri yapılırken blank olarak kullanıldı.

Boya yükleme kapasitesi (%)

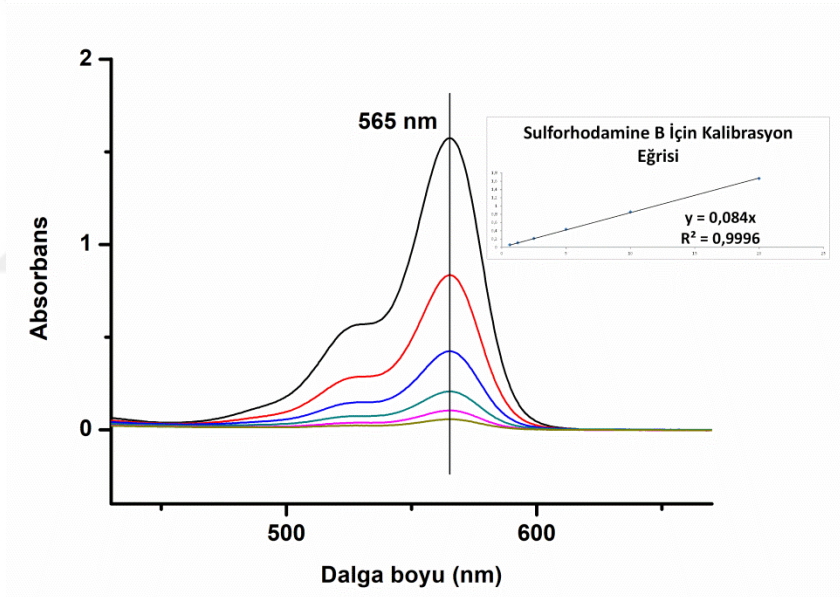
$$= \frac{\text{Boyanın top. kütlesi} - \text{Süpernatanttaki boya kütlesi}}{\text{Nanopartiküllerin top. kütlesi}} \times 100 \quad (4.1)$$

Enkapsülasyon etkinliği (%)

$$= \frac{\text{Boyanın top. kütlesi} - \text{Süpernatanttaki boya kütlesi}}{\text{Boyanın top. kütlesi}} \times 100 \quad (4.2)$$

Tablo 4.2 Süpernatantlardaki toplam boya kütlelerinin hesaplanması

No	Deney Kodu	Yüklenmeyen boya miktarı (mg)	Yüklenen boya miktarı (mg)	Enkapsülasyon etkinliği (%)	Boya yükleme kapasitesi (%)
1	GB28/5	0,42	0,74	64	3
2	GB28/6	0,36	0,8	69	3,2
3	GB28/7	0,29	0,87	75	3,5
4	GB28/8	0,5	0,66	57	2,6
5	GB28/9	0,29	0,87	75	3,5



Şekil 4.10 Sulforhodamine B'nin UV-Vis spektrumu ve kalibrasyon eğrisi

Nanokapsül sentezinde kullanılan boyanın (SRB) enzimle bozunması veya etkileşmesi nedeniyle farklı boyalarla (Eosin B ve Metilen Blue) nanokapsül sentezi gerçekleştirilmiştir, fakat olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Sentezlenen boya içeren nanoparçacıkların DLS ve ELS ölçümleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Sentezlenen nanokapsüllerin içine yüklenen boya miktarının hesaplanmasında UV-Vis spektroskopisinden yararlanılmıştır. Fakat ölçüm sırasında boş olarak sentezlenen nanokapsüllerin süpernatantları, surfaktandan kaynaklanan absorbans değerini elimine etmek amacı ile blank olarak kullanılmasına rağmen bulanıklık

ve çökmeler nedeniyle doğru sonuçlar elde edilememiştir. Bu nedenle Eosin B ve Metilen Blue ile sentezlenen nanokapsüllerin enkapsülasyon etkinlikleri hesaplanamamıştır.

Tablo 4.3 Farklı boyalarla elde edilen nanoparçacıkların DLS ve ELS sonuçları

No	Deney Kodu	Ort. Boyut (nm)	Zeta potansiyel (mV)
1	GB-S001_Eosin B	$77 \pm 0,86$	$-14,2 \pm 0,65$
2	GB-S001_boyasız	$61 \pm 1,08$	$-11,9 \pm 0,61$
3	GB-S002_Metilen Blue	$56 \pm 0,45$	-6,46
4	GB-S002_boyasız	$94 \pm 1,76$	-2,72

4.2.2 KO-FITC ve VAN-FITC Yüklü Hiyalüronik Asit-PBAE

Nanokomplekslerinin (HA-PBAE-(KO-FITC), HA-PBAE-(VAN-FITC)) Hazırlanması

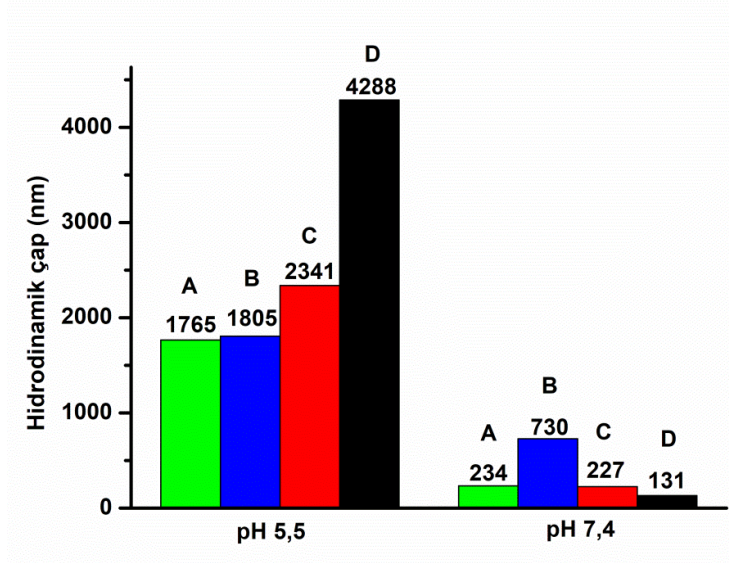
Nanokomplekslerin hazırlanmasında iki farklı moleküler kütleyle sahip HA kullanılmıştır. Bunlardan biri düşük molekül ağırlığına (5-150 kDa) sahip HA (HA_D) diğeri ise yüksek molekül ağırlığına (1500-2000 kDa) sahip HA (HA_Y)'dır. HA ve PBAE çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, polimerlerin karboksilik asit ve amino grupları arasındaki elektrostatik çekim nedeniyle nanokompleksler hemen elde edilir (Şekil 3.8). Yukarıda bahsedilen koşullar altında HA üzerindeki karboksilik asit kısımları proton salar ve HA negatif yüklü hale gelir; PBAE üzerindeki amino grupları proton alır ve PBAE pozitif yüklenir. Bu sayede, HA ve PBAE elektrostatik etkileşime girer ve nanokompleksler oluşur.

Liyofilize edilen nanokomplekslerin boyutları ve yükleri, PBS pH 7,4 ve pH 5,5 içerisinde ayrı ayrı dağıtılarak, dinamik ışık saçılması ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleri ile hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri ölçülerek belirlendi. Tablo 4.4'te verildiği üzere, farklı moleküler kütleyle sahip HA'lerden elde edilen nanokomplekslerin boyutlarının da farklılık gösterdiği ortaya konmuştur. Daha yüksek moleküler kütleyle sahip HA'dan elde edilen nanokomplekslerin boyutları pH 7,4'te daha büyük olarak görülmüştür. Buna göre; HA_D 'den elde edilen nanokomplekslerin boyutları **131-361 nm** arasında ölçülürken, HA_Y içeren nanokomplekslerin boyutları **590-730 nm** aralığında ölçülmüştür. Literatürde başka çalışma grupları tarafından, HA/kitosan bazlı nanopartiküllerin hazırlanmasında da benzer davranış gözlemlenmiştir [158].

pH'nin boyutlar üzerinde de önemli etkisi vardır; pH 7,4'ten 5,5'e düşürüldüğünde boyutların arttığı görülmüştür (Tablo 4.4 ve Şekil 4.11). PBAE'nin amino grupları 6,5 civarında pK_b değerine sahiptir; bu nedenle PBAE'ler deprotonlanma/protonlanma dönüşümü sergiler ve pH'a duyarlı ilaç salım sistemlerinde kullanılabilirler [159]. Bu çalışmada elde edilen nanokomplekslerde de PBAE zincirlerindeki amino grupları pH 5,5'te protonlanarak nanokomplekslerin şişmesine ve sonunda parçalanmasına neden olmuştur.

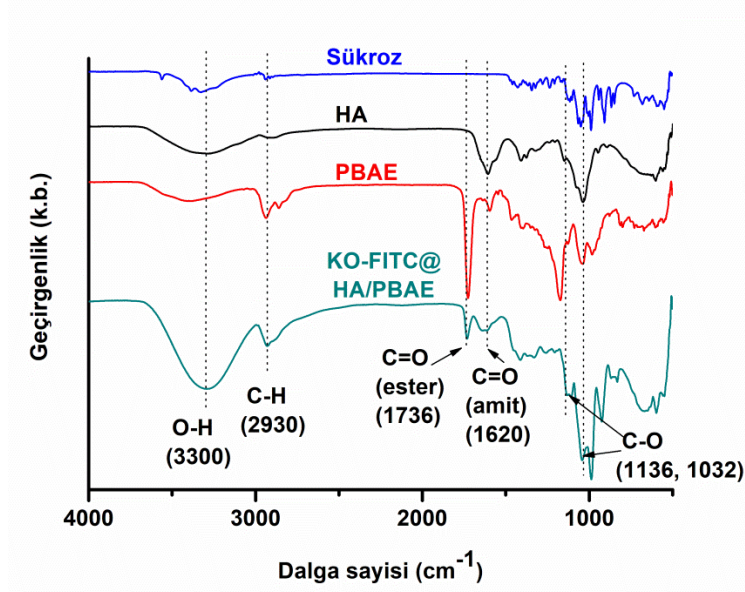
Tablo 4.4 Nanokomplekslerin boyutları ve zeta potansiyelleri

No	Deney Kodu	Ort. Boyut (nm)	pH	PDI	Zeta potansiyel (mV)
1	GB56/3	131 ± 2,0	7,4	0,16	-17,5 ± 0,8
2	GB56/3	4288 ± 1172,0	5,5	0,79	-2,4 ± 0,7
3	GB56/4	227 ± 2,0	7,4	0,25	-17,6 ± 1,6
4	GB56/4	2341 ± 580,0	5,5	1,00	-8,6 ± 0,7
5	GB59/2	590 ± 128,3	7,4	0,62	-
6	GB59/2	582 ± 205,7	5,5	0,69	-
7	GB59/3	730 ± 39,3	7,4	0,56	-21,4 ± 0,8
8	GB59/3	1805 ± 374,3	5,5	0,55	-11,1 ± 1,3
9	GB68/2	261 ± 3,5	7,4	0,34	-15,4 ± 1,0
10	GB68/3	206 ± 2,5	7,4	0,16	-16,4 ± 0,6
11	GB68/4	267 ± 6,8	7,4	0,25	-21,8 ± 1,4
12	GB69/2	271 ± 7,4	7,4	0,32	-15,2 ± 0,8
13	GB69/3	332 ± 2,1	7,4	0,37	-17,6 ± 0,8
14	GB72/1	361 ± 21,3	7,4	0,39	-21,7 ± 1,7
15	GB74/1	234 ± 3,6	7,4	0,26	-14,7 ± 1,0
16	GB74/1	1765 ± 91,8	5,5	0,64	-8,5 ± 0,5
17	GB79/1	158 ± 7,7	7,4	0,06	-13,8 ± 1,0
18	GB80/1	179 ± 3,1	7,4	0,13	-14,8 ± 0,3



Şekil 4.11 pH 7,4 ve pH 5,5'te tampon çözeltiler içerisinde dispers edilen nanokomplekslerin (A: GB74/1; B: GB59/3; C: GB56/4) hidrodinamik boyutları; D: GB56/3 hidrodinamik boyut için, pH 7,4'teki dispersiyonuna seyreltik HCl çözeltisinin eklenmesiyle pH 5,5'e değiştirildi

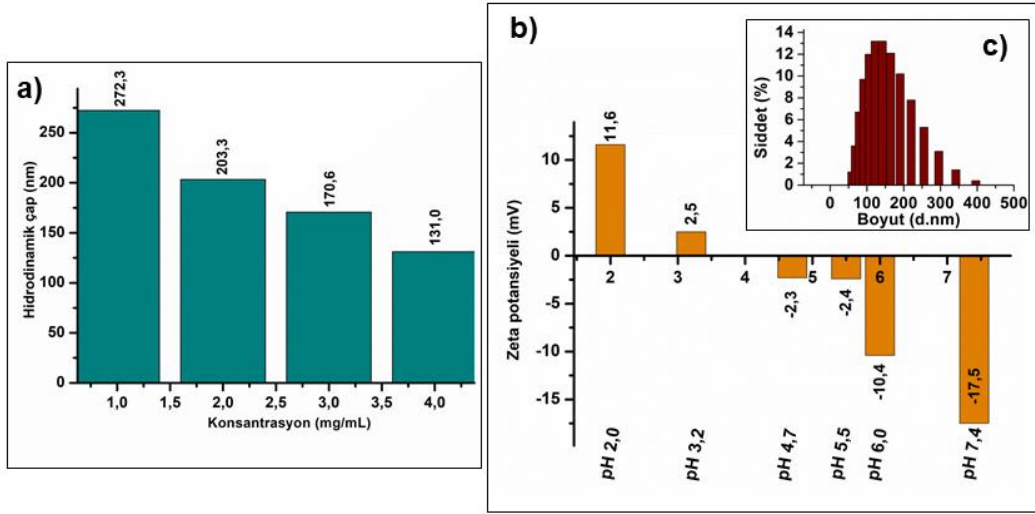
Elde edilen nanokompleksler analizler için liyofilize edildiğinden, HA ve PBAE ile nanokompleks oluşturma reaksiyonları bir kriyoprotektan olan sükroz varlığında gerçekleştirildi [12, 160]. Nanokompleks oluşumu, liyofilize numunelerde FT-IR spektroskopisi (Şekil 4.12) kullanılarak doğrulandı. Sükroz, HA, PBAE ve KO-FITC@HA/PBAE'nin hidroksil gruplarından dolayı, tüm bileşenlerin FT-IR spektrumlarında 3300 cm^{-1} 'de O-H gerilme bandı gözlemlendi. Sükroz nedeniyle nanokompleks spektrumunda O-H gerilme bandının yoğunluğu arttı. Alifatik karbonların C-H gerilmesi beklendiği gibi tüm spektrumlarda 2930 cm^{-1} 'de görüldü. Bir diğer karakteristik bant olan C-O gerilme bandı ise tüm örneklerin spektrumlarında 1136 cm^{-1} ve 1032 cm^{-1} 'de gözlemlendi. En önemlisi, 1736 cm^{-1} ve 1620 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla PBAE'nin ester grupları ve HA'nın amit grupları için C=O gerilmesine atfedilmiştir. KO-FITC@HA/PBAE'nin FT-IR spektrumunda benzer yoğunluğa sahip iki ayrı C=O gerilme bandının olması, nanokompleks yapıda hem HA hem de PBAE'nin varlığını doğrular.



Şekil 4.12 Sükroz, HA, PBAE ve KO-FITC@HA/PBAE'nin FT-IR spektrumu

Nanokompleks konsantrasyonunun ve pH'ın sırasıyla boyut ve zeta potansiyel değerleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunun için, HA_D ile hazırlanan nanokompleks (GB56/3) kullanılmıştır (Şekil 4.13). 4 mg/mL (pH 7,4) nanokompleksin hidrodinamik çapı 131 nm iken, seyreltmeyle boyut artmıştır (Şekil 4.13-a). Benzer davranış Sakulwech ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da elde edilmiştir. Bu çalışmada, HA/kitosan nanokomplekslerinin üretiminde daha yüksek polimer konsantrasyonunun daha küçük boyutlara yol açtığı sonucu elde edilmiştir [158]. Nanokomplekslerin pH değişimindeki davranışları hakkında daha fazla bilgi edinmek için zeta potansiyelleri değerlendirildi (Şekil 4.13-b). Buna göre 4 mg/mL nanokompleksin zeta potansiyeli pH 7,4'te -17,5 mV olarak ölçüldü. Parçacıkların koloidal stabilitesine katkıda bulunan bu negatif yük, nanokompleks oluşumunda yer almayan HA üzerindeki serbest negatif yüklere atfedildi. Zeta potansiyelleri, 7,4 gibi daha yüksek pH değerlerinde negatif iken, 3,2 gibi daha düşük pH değerlerinde pozitif dönmüştür. Çünkü hem PBAE (pK_b 6,5) hem de HA (pK_a 3,0-4,0) daha düşük pH değerlerinde protonlanmış ve böylece nanokompleksin genel yükü pozitif hale gelmiştir. Ayrıca kriyoprotektan ve stabilizatör olarak kullanılan sükrozun nanokomplekslerin koloidal özellikleri üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Buna göre sükroz içermeyen, KO yüklü (GB79/1) ve boş (GB80/1) nanokompleksler hazırlanıp DLS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sükroz varlığının

nanokomplekslerin boyut, zeta potansiyel ve PDI değerlerini önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür (Tablo 4.4).



Şekil 4.13 Nanokompleksin (GB56/3) (a) pH 7,4'teki konsantrasyon değişiminin boyuta etkisi; (b) pH'ın, nanokomplekslerin (4 mg/mL) zeta potansiyelleri üzerindeki etkisi; ve (c) pH 7,4'te nanokompleksin yoğunluğa göre boyut dağılımı

Nanokomplekslerin hem uzun süreli hem de kısa süreli kolloidal stabilitesinin değerlendirilmesi DLS metodu ile gerçekleştirildi. Yaklaşık bir yıl boyunca -20 °C'de pH 7,4 PBS'de dispersiyon halinde saklanan nanokompleksler, uzun süreli stabiliteyi incelemek için kullanıldı. Tablo 4.5, yaklaşık bir yıl boyunca dispersiyon formunda saklanan nanokomplekslerin kolloidal özelliklerini göstermektedir. Buna göre antibiyotik içeren tüm nanokomplekslerin boyutları 1,6-2,7 kat artmıştır. Bu kadar uzun süre suda dağılmış halde bulunan numuneler için bu artış miktarı kabul edilebilir bir değerdir. Ayrıca -20 °C'de liyofilize halde yaklaşık bir yıl saklanan numunelerin DLS ölçümleri de yapılmıştır. Liyofilize numuneler yeniden dispers edilip boyutları ve PDI değerleri dört gün boyunca izlenmiştir (Tablo 4.6). Taze olarak yeniden dispers edilen numunelerin boyutları 197 nm (GB68/3) ve 240 nm (GB72/1) olarak bulundu. Bu değerler, bir yıl önce ölçülen aynı numunelerin boyutlarına yakın olarak elde edilmiştir (Tablo 4.4, GB68/3 ve GB72/1). Bu örneklerin boyut dağılımları (PDI'ler), kolloidal stabilitenin iyi bir göstergesi olan 0,32'den daha düşük elde edilmiştir. Bu nedenle dispersiyon halde veya liyofilize tozlar halinde saklanan numunelerin uzun vadeli stabilitesinin oldukça iyi olduğu değerlendirilmiştir. Bu da taşıyıcı sistemi uzun vadeli uygulamalar için uygun hale getirmektedir. Bunun dışında, yeniden

dispersiyon sonrası dört günlük ölçülen parçacık boyutları 277 nm (GB68/3) ve 363 nm (GB72/1) olarak, PDI'ler ise sırasıyla 0,17 ve 0,31 olarak ölçüldü. Boyutlardaki ve PDI'lerdeki bu tür küçük değişiklikler, kısa vadeli yüksek kolloidal stabilitelerle ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla tez çalışmasında gerçekleştirilen PBAE bazlı taşıyıcı sistemin iyi bir potansiyel gösterdiği söylenebilir. Çünkü PBAE bazlı taşıyıcılar kolaylıkla parçalanabilen ester bağları nedeniyle genellikle düşük kolloidal stabiliteye sahip olma eğilimindedirler [161].

Tablo 4.5 Yaklaşık bir yıl sonra nanokomplekslerin dispersiyon örneklerinin kolloidal özellikleri (pH 7,4 PBS'de konsantrasyonu 4 mg/mL olan nanokomplekslerin dispersiyonu -20 °C'de yaklaşık bir yıl saklandı ve DLS ölçümleri yapıldı.)

Örnekler	Taze hazırlanan			Bir yıl sonra			
	Z-Ave (d.nm)	PDI	ζ^a (mV)	Z-Ave (d.nm)	PDI	ζ^a (mV)	t (ay)
GB56/4	227	0,25	-17,6	361	0,23	-10,4	13
GB68/3	206	0,16	-16,4	386	0,27	-11,5	12
GB74/1	234	0,26	-14,7	643	0,45	-10,8	9

^a ζ : Zeta potansiyel

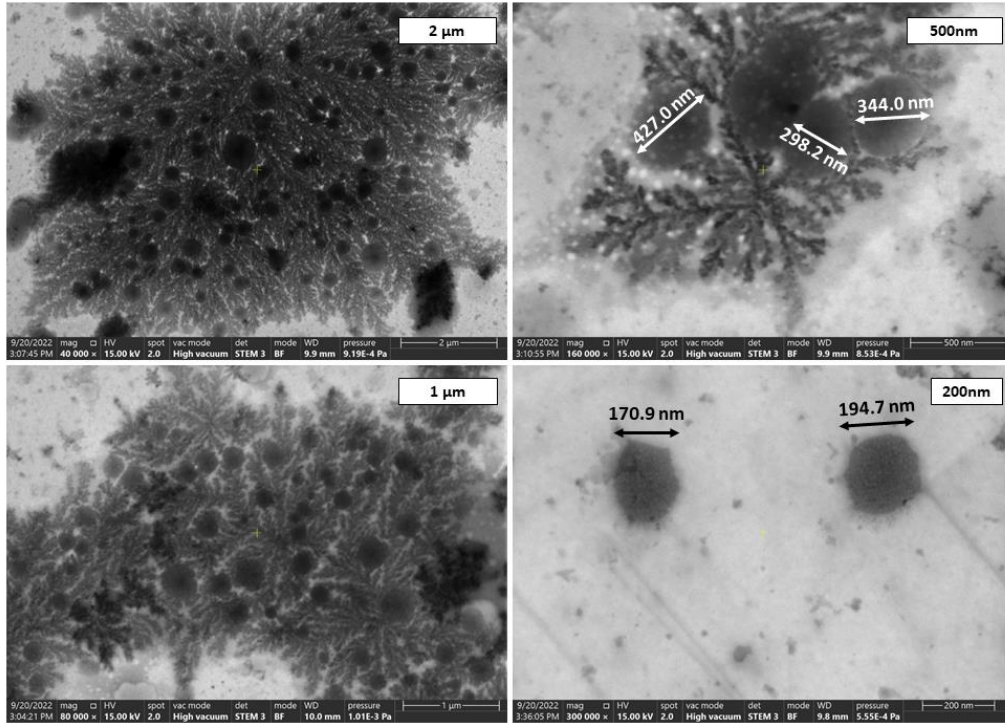
Tablo 4.6 -20 °C'de yaklaşık bir yıl boyunca saklanan liyofilize haldeki nanokomplekslerin kolloidal özellikleri (-20 °C'de saklanan liyofilize örnekler bir yıl sonra pH 7,4 PBS'de 4 mg/mL konsantrasyonda yeniden dispers edildi ve DLS ölçümleri alındı)

Yeniden dağılımdan sonraki süre	0. Gün			1. Gün		4. Gün	
	Z-Ave (d.nm)	PDI	ζ^a (mV)	Z-Ave (d.nm)	PDI	Z-Ave (d.nm)	PDI
GB68/3	197	0.25	-13.96	483	0.46	277	0.17
GB72/1	240	0.32	-14.06	374	0.37	363	0.31

^a ζ : Zeta potansiyel

HA_D ile hazırlanan nanokompleksin (GB56/3) STEM görüntüleri, taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) dedektörü kullanılarak taramalı elektron mikroskobunda alınmıştır (Şekil 4.14). PBS pH 7,4 içerisinde dağıtılan numune (1 mg/mL), karbon film kaplı Cu grid üzerine damlatıldı ve oda koşullarında kurutulduktan sonra görüntüler alındı. Nanokompleksler rastgele dağılmış küresel yapılar olarak gözlemlendi. Nanokomplekslerden bazıları, kuruduktan sonra muhtemelen PBS'nin inorganik tuzları veya sükroz nedeniyle

kristal benzeri yapılar içine gömüldü. Kurutma nedeniyle bir miktar aglomerasyon olmasına rağmen, parçacıkların çoğu 120-400 nm aralığında boyutlara sahipti.



Şekil 4.14 HA_D ile hazırlanan nanokompleksin STEM görüntüleri (PBS pH 7,4 ile dispers edilmiş)

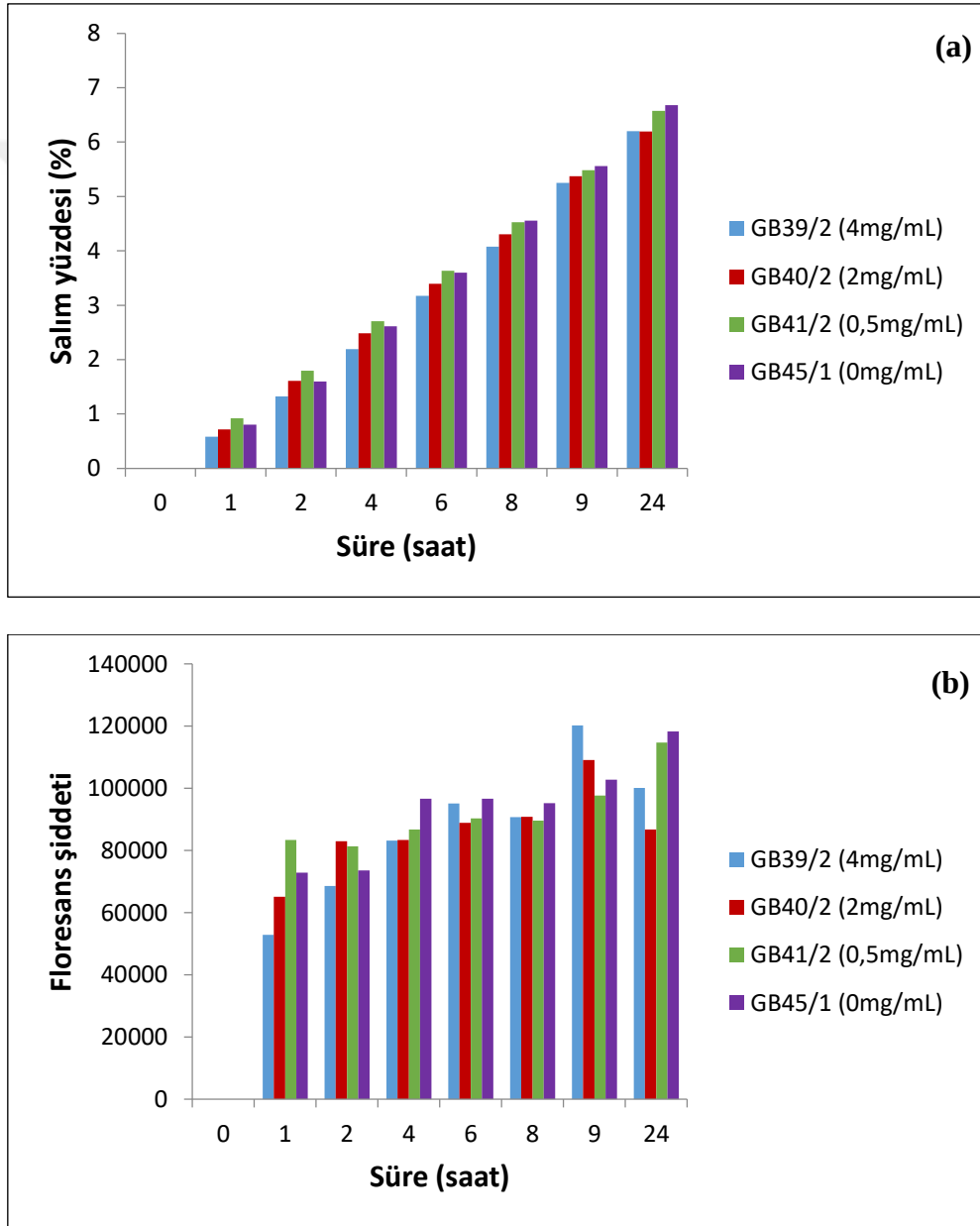
4.3 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanoparçacıkların Enzimatik Parçalanma ve Salım Davranışlarının İncelenmesi

4.3.1 Hiyalüronik Asit Esaslı Nanokapsülün Enzime Bağlı Salım Deneyleri

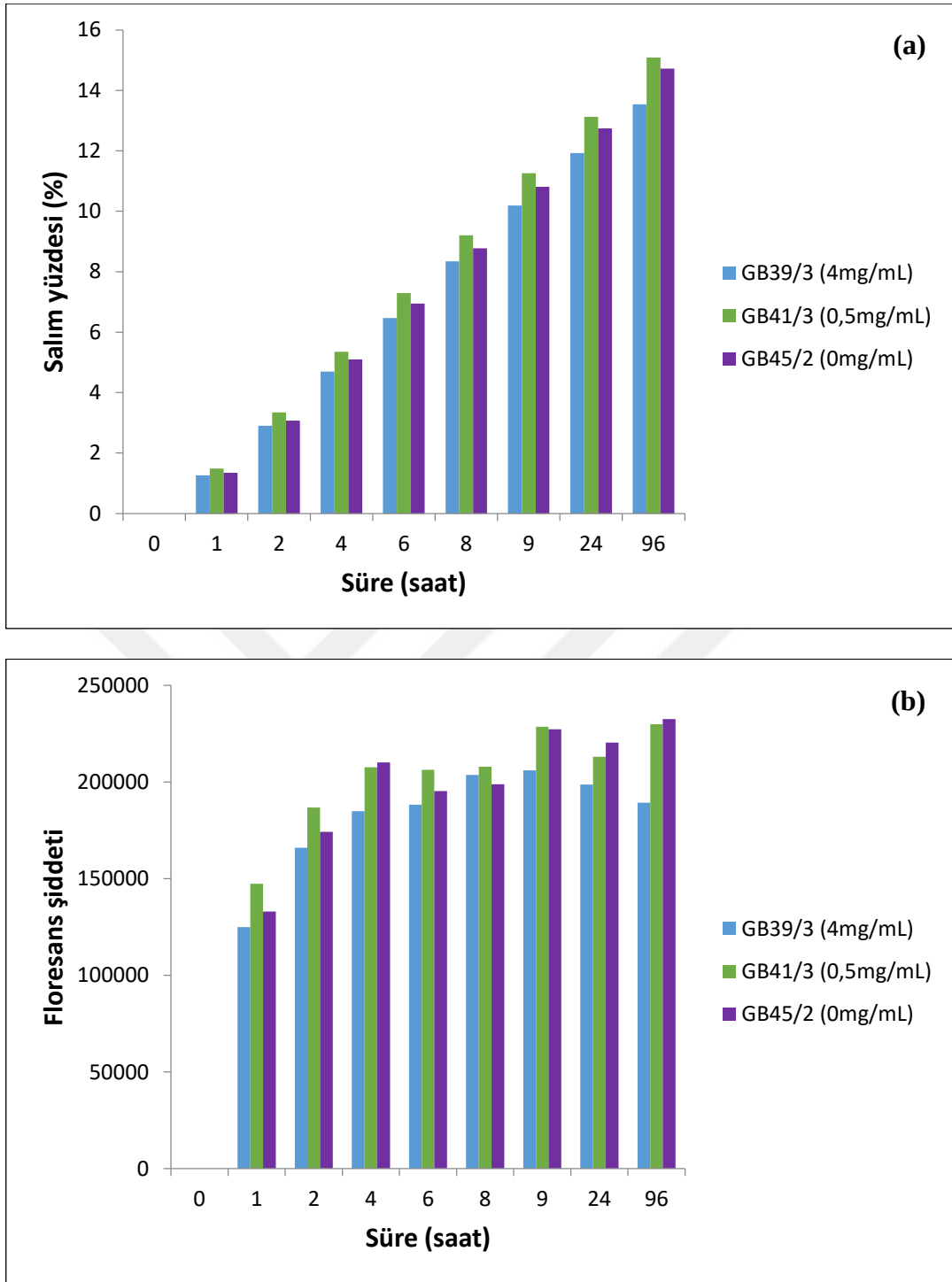
Enzimatik parçalanma ve salım deneyi norbornen çapraz bağlayıcılı, boya içeren HA nanokapsülleri (GB28/6, GB28/7) için gerçekleştirildi ve nanokapsüllerin enzim varlığında parçalanma davranışları takip edildi. Buna göre elde edilen maksimum floresans değerlerinin optimize edilmesiyle yapılan hesaplamalar sonucunda, nanokapsüllerden boyanın salım yüzdesi hesaplandı ve karşılaştırıldı (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Enzim içermeyen örneklerin, enzim içeren örneklerle hemen hemen aynı değerlere sahip olması, enzimle uyarılmanın yeterli olmadığı sonucunu ortaya koymuştur. Bunun için, nanokapsül yapısının çapraz bağlanma derecesinin düşük olması nedeniyle daha serbest bir yapıda olduğu ve bu nedenle boyanın kendiliğinden, tetikleme olmadan salınabileceği sonucuna varıldı. Bu nedenle HA-Tz molekülündeki tetrazin bağlanma oranının artırılması ve

kullanılan çapraz bağlayıcı miktarının artırılması gerekmektedir. Bu doğrultuda HA-Tz molekülü, HA'nın tüm karboksilik asit uçlarına tetrazin bağlanacak şekilde 1:1 oranında tekrar sentezlendi (GB19/5).

Enzim konsantrasyonları olarak 4, 2 ve 0,5 mg/mL olacak şekilde deneyler hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, enzim miktarının düşük geldiği düşünülüp enzim konsantrasyonlarının da artırılması gerektiği sonucu ortaya çıkmıştır. Ayrıca kümülatif yüzde salım değerlerinin çok düşük çıkması boyanın enzimle bir bozunmaya uğrama ihtimalini de düşündürmüştür.



Şekil 4.15 GB28/6 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin (a) ve floresans şiddetinin (b) grafikleri

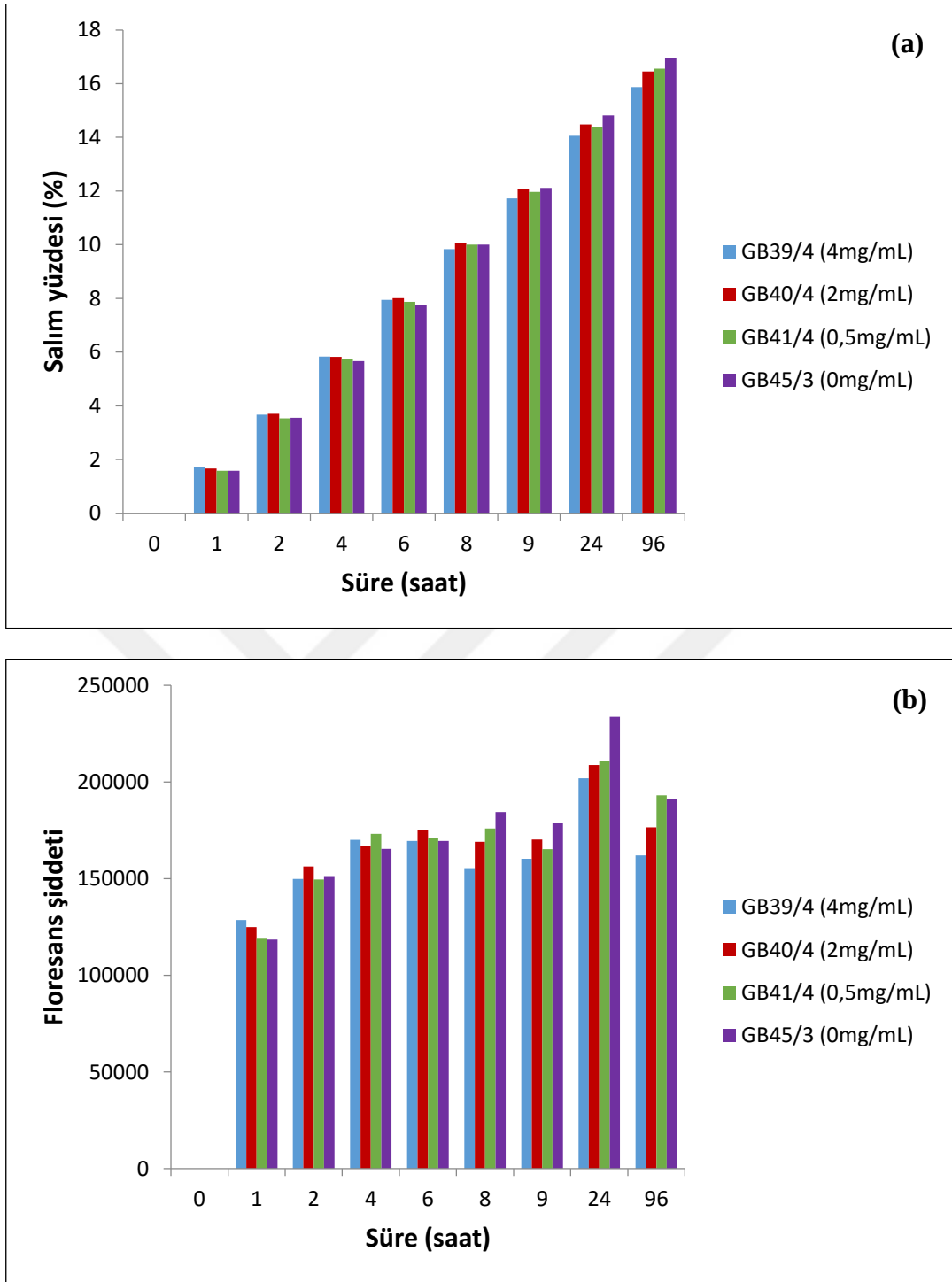


Şekil 4.16 GB28/7 nanoparçacığının çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin **(a)** ve floresans şiddetinin **(b)** grafikleri

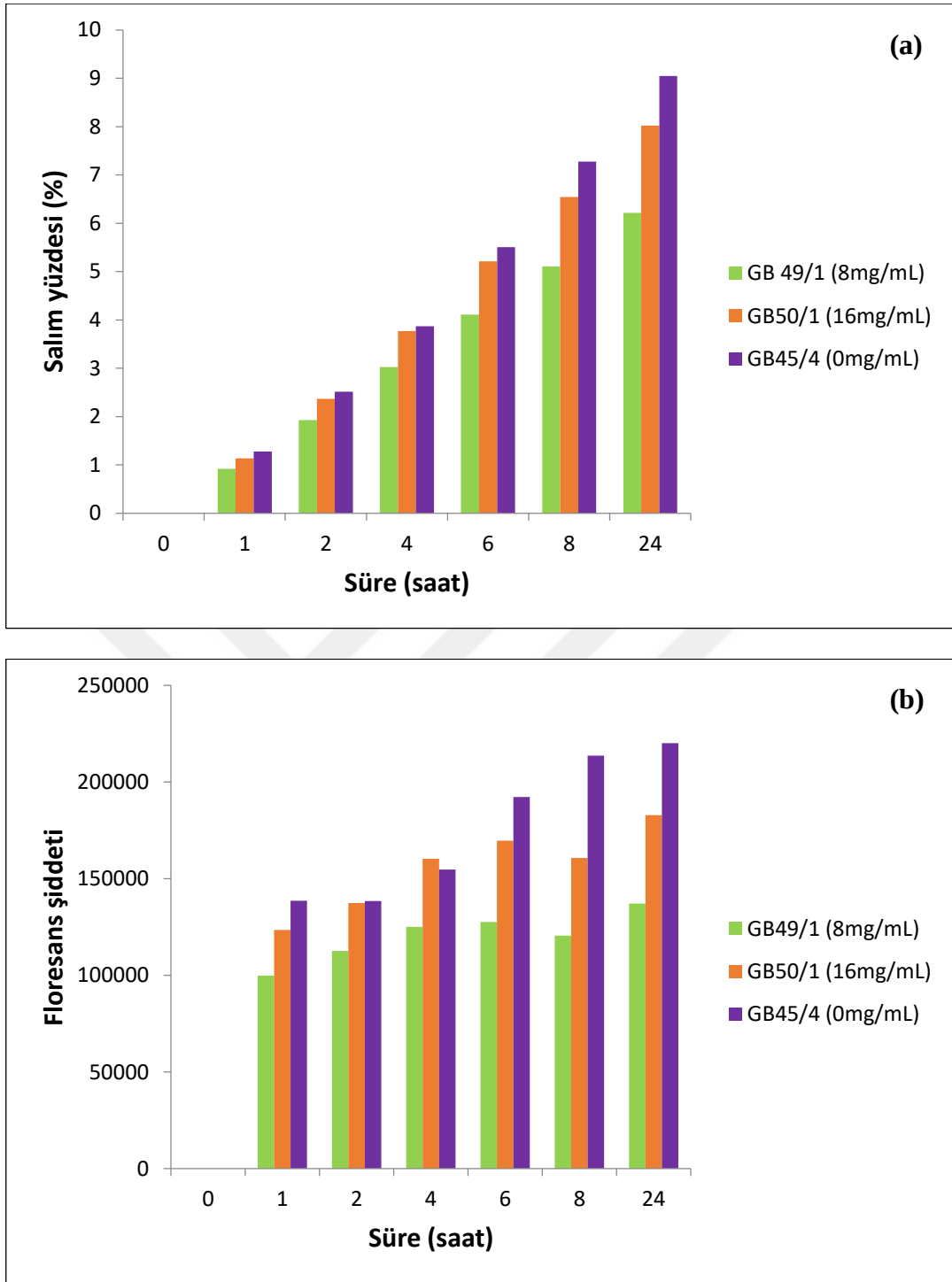
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, HA nanoparçacıkların (GB28/8, GB28/9) enzimatik parçalanma ve salım davranışlarının incelenmesi 3.4.1 numaralı başlıkta bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Buna göre GB28/8 nanokapsülü için enzim konsantrasyonları değiştirilmeden aynı şekilde (GB39/4, GB40/4, GB41/4, GB45/3) deney gerçekleştirilmiştir. Floresans ölçümleri de diyalizden alınan örneğin seyreltilmeden direkt ölçülmesiyle elde edilmiştir.

Yukarıda bahsedildiği gibi enzim miktarının az geldiği düşünülüp konsantrasyonların artırılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu yüzden GB28/9 nanokapsülü için enzim konsantrasyonları 8 mg/mL (GB49/1) ve 16 mg/mL (GB50/1) olacak şekilde artırılıp deney tekrar edilmiştir. Floresans ölçümleri de diyalizden alınan örneğin seyreltilmeden direkt ölçülmesiyle elde edilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen maksimum floresans değerlerinin optimize edilmesiyle yapılan hesaplamalar ile nanokapsüllerden boyanın salım yüzdesi hesaplanmış ve karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.17 GB28/8 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin (a) ve floresans şiddetinin (b) grafikleri

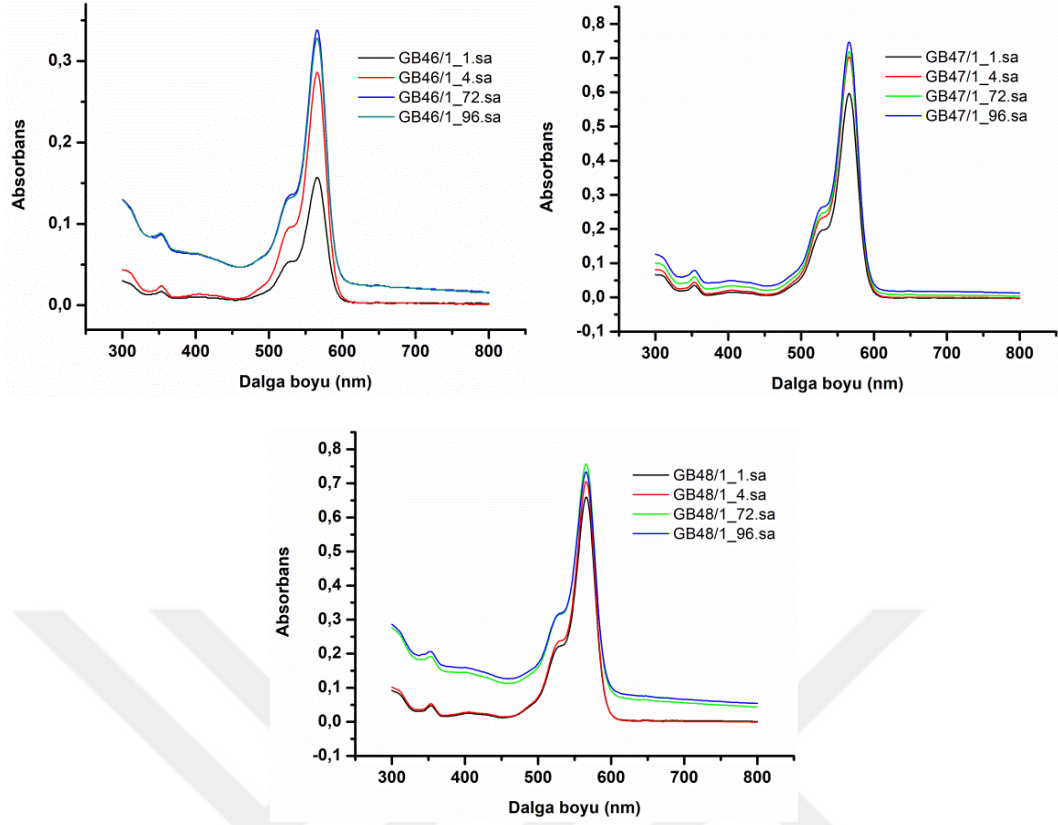


Şekil 4.18 GB28/9 nanoparçacığın çeşitli konsantrasyonlardaki enzimle parçalanmasına bağlı SRB salım yüzdesinin **(a)** ve floresans şiddetinin **(b)** grafikleri

Yapılan deneyler sonucunda kümülatif yüzde salım değerlerinin çok düşük çıkması ile boyanın hiyalüronidaz enzimiyle bir bozunmaya uğrama ihtimalinin de olabileceği değerlendirilmiştir. Bu nedenle SRB'nin enzimle (HA nanoparçacıkları olmadan) etkileşimi de incelenmiştir (Tablo 4.7). Öncelikle, enzimle parçalanma ve salım deneyinde olduğu gibi pH 5 olan ve BSA içeren bir PBS çözeltisi hazırlandı. Bu tampon çözelti kullanılarak 2×10^{-4} M SRB çözeltisi hazırlandı. Tüm deneylerde (GB46/1, GB47/1, GB48/1) bu SRB çözeltisi kullanılarak tablodaki çözeltiler hazırlandı ve 37 °C'de belirtilen işleme tabi tutuldu. 1, 4, 72 ve 96. saatlerde alınan örnekler UV-Vis spektroskopisi ile ölçüm yapıldı (Şekil 4.19). Zamanla berrak çözeltilerin giderek bulanıklaştığı ve katı halde maddelerin çöktüğü (GB47/1'de az ve GB48/1'de daha fazla) gözle de görüldü. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda zamanla enzim ve boyanın etkileşime girip bozulduğu sonucuna varıldı. Dolayısıyla kullanılan boyanın veya yöntemin, bu tür HA esaslı nanokapsüllerin salım davranışlarının incelemesinde uygun olmayacağı değerlendirildi.

Tablo 4.7 Sulforhodamine B'nin enzimle etkileşiminin incelenmesinde kullanılan madde miktarları

	GB46/1	GB47/1	GB48/1
Hiyalüronidaz enzimi	4 mg	0 mg	4 mg
Sulforhodamine B çözeltisi	2 mL	2 mL	2 mL
Açıklama	Çözeltinin diyalizi, 20 mL pH 5 olan BSA içeren PBS'e karşı gerçekleştirildi.	Çözelti 15'lik santrifüj tüpünde karıştırıldı.	Çözelti 15'lik santrifüj tüpünde karıştırıldı.



Şekil 4.19 SRB ve hiyalüronidaz enzimi etkileşimi çalışmasına ait UV-Vis spektrumları

4.3.2 HA-PBAE-(KO-FITC) ve HA-PBAE-(VAN-FITC) Komplekslerinden pH'a ve Enzime Bağlı Salım Deneyleri

Elde edilen nanokomplekslerden ilaç salımı, fizyolojik pH'a ve asidik enfeksiyon bölgelerine karşılık gelmesi amacıyla sırasıyla 7,4 ve 5,5 olmak üzere iki temel pH değerinde diyaliz yöntemiyle araştırıldı. Floresans boyanın konjuge edildiği ilaçlar, kolistin (KO-FITC) ve vankomisin (VAN-FITC), salımın floresans spektroskopisi ile izlenebilmesi amacıyla kullanıldı. İlaç salım deneyleri, hem HA_D (GB56/3) hem de HA_Y (GB59/3) ile hazırlanan nanokompleksler için 3 tekrarlı olacak şekilde eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Kümülatif salım profilleri kalibrasyon eğrileri kullanılarak elde edildi. Çeşitli konsantrasyonlarda KO-FITC çözeltileri, PBS pH 7,4 ve PBS pH 5,5'te ayrı ayrı hazırlandı ve her pH değeri için iki ayrı floresans emisyonu kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.20). HA_D nanokompleksinden pH 5,5 ortamındaki salımlarda 24 saatte ulaşılan en yüksek emisyon değerinin ortalaması alınarak normalizasyon yapıldı ve buradaki salım %100 olarak kabul edildi. Şekil 4.21, her iki nanokompleksin pH 5,5 ve 7,4'teki kümülatif salım profillerini göstermektedir. HA_D ile hazırlanan

nanokompleks, pH 5,5 ve 7,4'te 24 saatte ilacın neredeyse %100'ünü ve %53'ünü saldı. Diğer yandan HA_Y ile üretilen nanokompleks, pH 5,5 ve 7,4'te 24 saatte ilacın yalnızca %54 ve %17'sini serbest bıraktı. Bu bulgular her iki nanokompleksten ilacın pH'a duyarlı bir şekilde salındığını göstermektedir. Bilindiği üzere PBAE'nin pK_b'si 6,5 civarında olduğundan, pK_b'den daha düşük pH değerlerinde katyonik hale gelir ve nanokompleks pH 5,5'te fizyolojik pH'a göre daha sızıntılı hale gelecek şekilde bir dönüşüme uğrar. Nanokomplekslerin şişmiş durumuna atfedilen düşük pH'taki daha büyük boyutlar da bu sonuçları destekler. Bu nedenle bu sistemin pH'a duyarlı ilaç salım sistemi olarak kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca HA'nın moleküler kütlelerinin de salım profillerini değiştirdiği tespit edilmiştir. Daha yüksek moleküler kütle (Şekil 4.21-b), daha düşük salım hızıyla sonuçlanmıştır. HA_D ile hazırlanan nanokomplekslerden daha hızlı salımın gerçekleşmesi, boyutların daha küçük olmasına ve daha düşük moleküler kütlelerin olmasına bağlanmıştır. Böylece, farklı molekül kütlelerine sahip HA kullanılarak ilaç salım hızının ayarlanabildiği sonucuna varılmıştır.

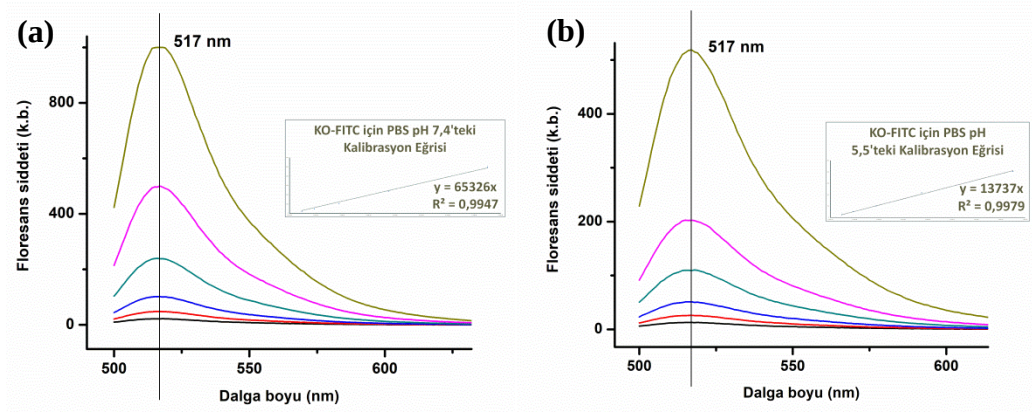
Tablo 4.8 Nanokomplekslerden ilacın 24 saatteki kümülatif salım değerleri

No	Örnek	Antibiyotik	Salım ortamı pH'ı	Hiyalüron idaz (mg/mL)	Salım ortamı hacmi (mL)	Nanokompleks konsantrasyonu (mg/mL)	Kümülatif salım (%)
1	GB56/3	Kolistin ^a	7,4	0	15	4	53
2	GB56/3	Kolistin ^a	5,5	0	15	4	100
3	GB56/4	Kolistin ^a	5,5	0,4	5	4	87
4	GB59/2	Kolistin ^a	7,4	0	5	1	24
5	GB59/2	Kolistin ^a	7,4	0	5	3	34
6	GB59/2	Kolistin ^a	5,5	0	5	1	41
7	GB59/2	Kolistin ^a	5,5	0	5	3	53
8	GB59/3	Kolistin ^a	7,4	0	15	4	17
9	GB59/3	Kolistin ^a	5,5	0	15	4	54
10	GB59/3	Kolistin ^a	5,5	4,0	5	4	21 ^c
11	GB74/1	Vankomisin ^b	7,4	0,4	5	4	33,5
12	GB74/1	Vankomisin ^b	7,4	0	5	4	39,6
13	GB74/1	Vankomisin ^b	5,5	0,4	5	4	41,5
14	GB74/1	Vankomisin ^b	5,5	0	5	4	49,5

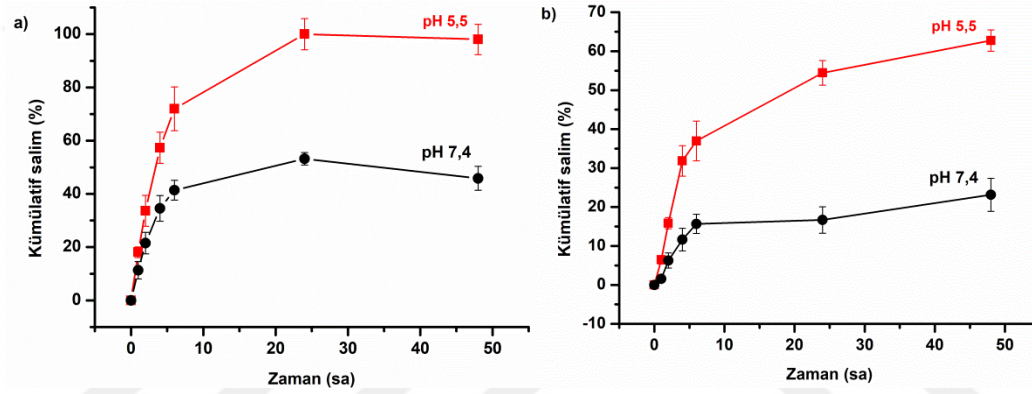
^a Kullanılan kolistinin küçük bir kısmı FITC ile işaretlendi.

^b Kullanılan vankomisin küçük bir kısmı FITC ile işaretlendi.

^c 48 saatteki kümülatif salım.



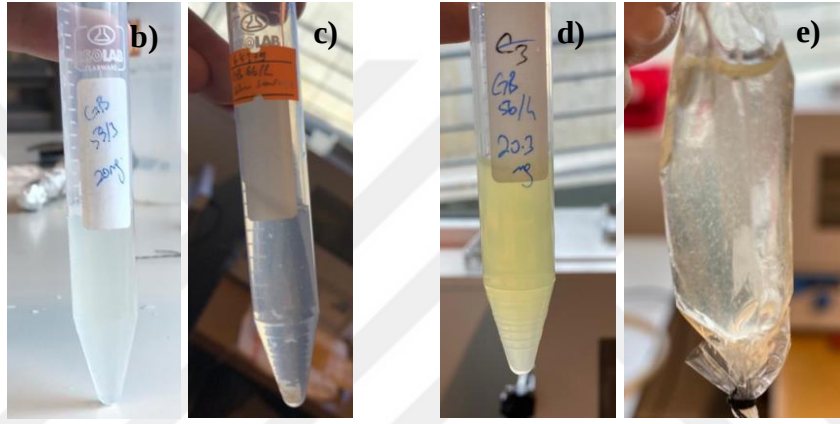
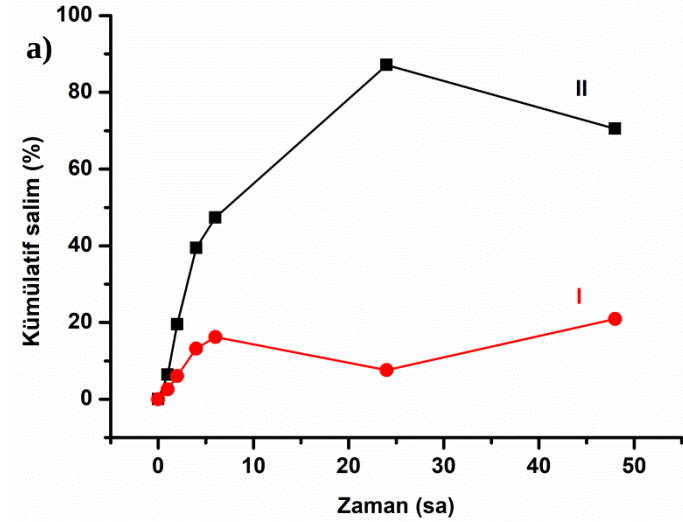
Şekil 4.20 KO-FITC'e ait PBS pH 7,4 (a) ve PBS pH 5,5'teki (b) kalibrasyon eğrileri için hazırlanan, çeşitli konsantrasyonlardaki örneklerin floresans spektrumları ve kalibrasyon eğrileri



Şekil 4.21 KO-FITC'nin nanokomplekslerinin (GB56/3, HA_D) (a) (GB59/3, HA_Y) (b) pH 7,4 ve pH 5,5 kümülatif salım grafikleri

HA'nın hiyalüronidaz enzimleri tarafından bozunması iyi bilinmektedir ve bu bozunma davranışı, hiyalüronidaz enzime duyarlı çeşitli salım sistemlerinde kullanılmıştır [1, 162]. Bu nedenle nanokomplekslerden antibiyotik salım potansiyeli, hiyalüronidaz enzimi varlığında da değerlendirildi (Tablo 4.8). Ancak enzimle gerçekleştirilen çalışmalarda çeşitli zorluklarla karşılaşıldı. Salım ortamında enzimin varlığı, muhtemelen HA, KO gibi yük taşıyan bileşenlerin enzim ile kompleksleşmesi nedeniyle büyük parçacık oluşumlarına neden olmuştur. Floresans ölçümüne göre 48 saatte enzim varlığında (4,0 mg/mL) pH 5,5'te HA_Y nanokompleksinden yaklaşık %21 KO-FITC salımı gözlemlendi (Şekil 4.22-a, Eğri I) (Tablo 4.8, No 10). Enzim varlığında daha yüksek miktarda salım beklenmesine rağmen, 24 saat sonra karışımdaki bileşenlerin çökeltiler oluşturduğu tespit edilmiş ve bu durum HA_Y nanokompleksinin (GB59/3) salım çalışmasında floresans ölçümlerinin hatalı çıkmasına neden olmuştur (Şekil 4.22-b ve 4.22-c). Bu durum, izoelektrik noktası 8,75 olan hiyalüronidaz enziminin

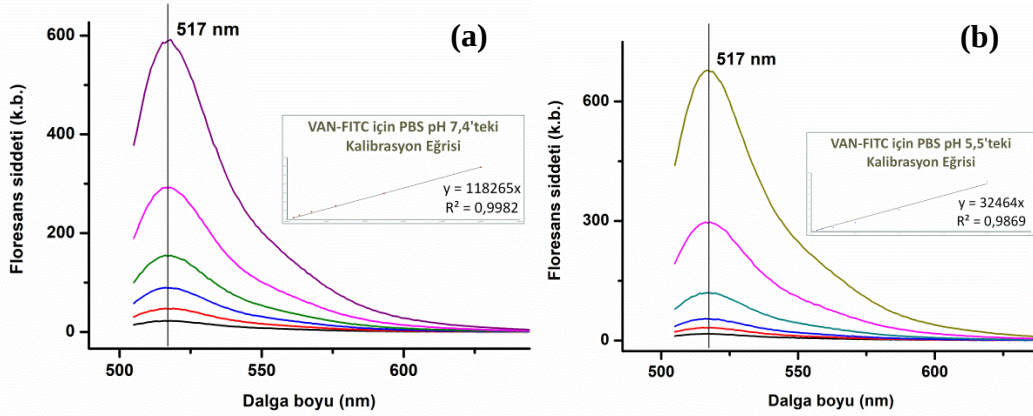
[163] pH 7’de pozitif yüklü olması ve HA’nın da negatif yüklü olmasıyla açıklanabilir. Dolayısıyla KO-FITC taşıyan HA ve enzimin, elektrostatik etkileşim yoluyla kompleksleşerek çöktüğü değerlendirilmiştir. Özellikle, daha yüksek enzim konsantrasyonu (4,0 mg/mL) ve daha yüksek molekül ağırlıklı HA kullanıldığında çökelti çok daha fazlaydı (Şekil 4.22-c ve 4.22-e). Daha az miktarda enzim (0,4 mg/mL) ve düşük molekül ağırlıklı HA (GB56/4) ile enzimatik salım gerçekleştirildiğinde kabul edilebilir bir kümülatif salım profili (24 saatte %87) gözlenmiştir (Şekil 4.22-a, Eğri II) (Tablo 4.8, No 3). Bu nedenle sonraki çalışmalarda enzim konsantrasyonları azaltılmıştır. Bu tür salım çalışmalarında çökmenin etkisini en aza indirmek için düşük miktarda enzim kullanılmasına rağmen, enzimli ve enzimsiz kümülatif salımların karşılaştırılamayacağı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle enzimle yapılan salımlar sadece kendi içerisinde değerlendirilmiştir.



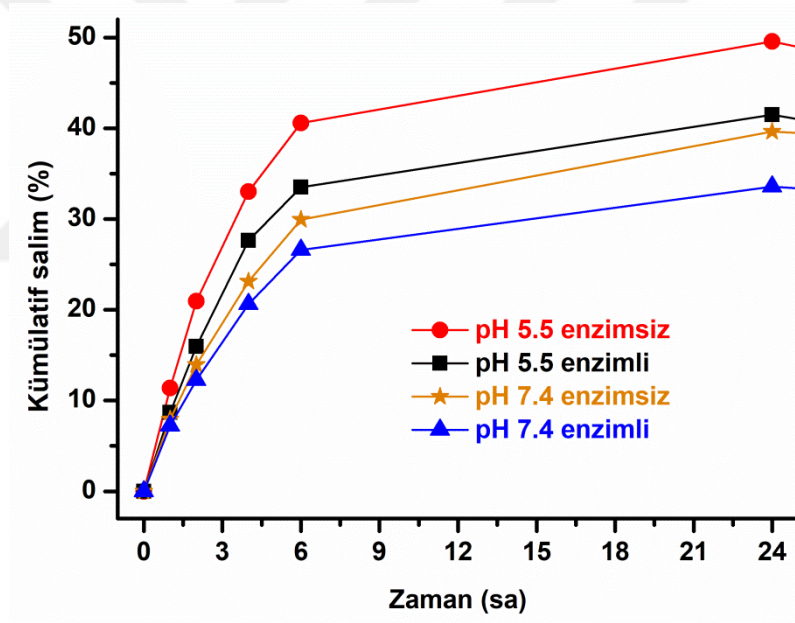
Şekil 4.22 pH 5,5'te antibiyotiğin (KO-FITC), 4,0 mg/mL hiyalüronidaz varlığında HA_Y nanokompleksinden (GB59/3) (I) ve 0,4 mg/mL hiyalüronidaz varlığında HA_D nanokompleksinden (GB56/4) (II) kümülatif salımının karşılaştırılması (a). Hiyalüronidaz enzimi (4,0 mg/mL) varlığında GB59/3'ün koloidal karışımının 48 saatlik salım öncesi (b) ve sonrası (c) görüntüsü. Hiyalüronidaz enzimi (0,4 mg/mL) varlığında GB56/4'ün koloidal karışımının 48 saatlik salım öncesi (d) ve sonrası (e) görüntüsü

Tez çalışması kapsamında ayrıca HA_D ile hazırlanan nanokompleksten (GB74/1) VAN-FITC'nin salımı da incelendi. Floresans ölçümleri, her pH değeri için oluşturulan iki ayrı kalibrasyon eğrisi kullanılarak yukarıda açıklandığı gibi gerçekleştirildi (Şekil 4.23). Buna göre ilacın yaklaşık %40 ve %50'si nanokomplekslerden 24 saatte sırasıyla pH 7,4 ve 5,5'te salınmıştır. Enzim varlığında 24 saatte pH 7,4'te %33,5, pH 5,5'te %41,5 salım elde edilmiştir (Şekil 4.24). Yukarıda belirtildiği gibi enzim ve ilaç arasındaki etkileşim, salım ortamındaki serbest ilaç konsantrasyonunu değiştirdiğinden, enzimli veya enzimsiz ilaç salımları birbiriyle karşılaştırılamamıştır. VAN'ın izoelektrik noktasının 8,3 civarında olması, KO-FITC'ye benzer şekilde VAN-FITC'nin de

kompleks oluşturmasına ve salım ortamında beklenenden daha düşük floresans yoğunluğına neden olduğu değerlendirilmiştir [164].



şekil 4.23 VAN-FITC'e ait PBS pH 7,4 (a) ve PBS pH 5,5'teki (b) kalibrasyon eğrileri için hazırlanan, çeşitli konsantrasyonlardaki örneklerin floresans spektrumları ve kalibrasyon eğrileri



şekil 4.24 Nanokompleksten (GB74/1) VAN-FITC'nin pH 7,4 ve pH 5,5'te enzimli ve enzimsiz kümülatif salım profilleri

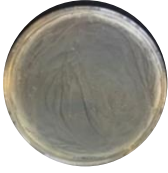
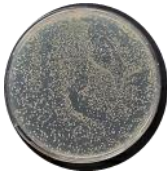
4.4 Antibiyotik Yüklü Nanokomplekslerin Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi

Tablo 3.4'te belirtilen formülasyonların antibakteriyel aktivitesi EUCAST/2023 ve CLSI standartlarına göre broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş olup, sonuçlar Tablo 4.9 ve 4.10'da sunulmuştur. Boş nanokompleks (Tablo 4.9'da GB69/2, Tablo 4.10'da GB69/3 ve Tablo 4.4) antibakteriyel analizler sırasında

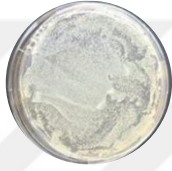
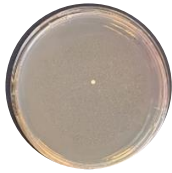
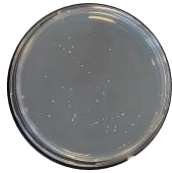
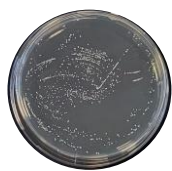
herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediğinden, süktroz veya nanokompleksin kendisi tarafından indüklenen hiçbir antibakteriyel özelliğın olmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.9’da görüldüğü gibi kolistin tedavisi uygulanan iki önemli suş üzerinde yapılan antibakteriyel çalışmada antibiyotik yüklü nanokompleksin *E. coli* suşuna karşı serbest antibiyotiğe göre anlamlı derecede daha fazla etkinlik gösterdiği ve MIC değerinin dört kat daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu güçlü antibakteriyel etki, minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) için kullanılan petri görüntülerinde belirgin bir şekilde anlaşılmaktadır. Ancak serbest antibiyotiğın, *K. pneumoniae*’nın hem duyarlı hem de dirençli suşları için nanokompleksten daha etkili olduğu bulundu. Gram-negatif organizmalar arasında LPS (lipopolisakkarit) yapısındaki ve özellikle de protein düzeyindeki farklılıkların, bu sonuçlarda çok önemli bir rol oynayabileceği değerlendirilmiştir. Ek olarak, *E. coli*’nin broth ortamında fermentasyon işlemi sırasında üretilen asidik yan ürünlerin, *K. pneumoniae* ile karşılaştırıldığında hem miktar hem de bileşim açısından farklı olabileceğini ve pH’daki bu farklılığın, pH’a duyarlı nanokompleks üzerinde potansiyel olarak olumlu bir etki yarattığı düşünülmektedir [165-167]. Ayrıca boş nanokompleks bakterilere karşı herhangi bir biyolojik aktivite göstermemiştir.

Tablo 4.9 KO ve nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesi. Petri kaplarının MIC ve MBC değeriinin belirlendiği görüntüler

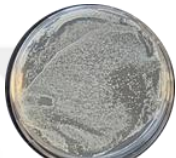
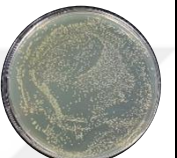
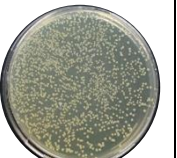
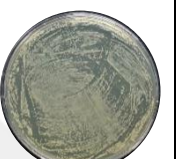
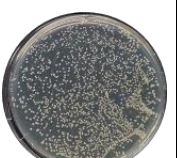
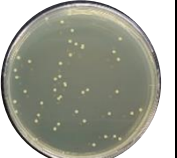
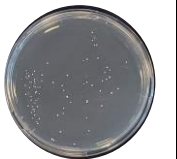
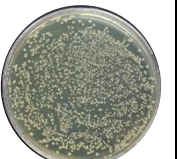
Bakteri	<i>K. pneumoniae</i>	Kolistin Dirençli <i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
	Kontrol		
Örnekler			
	MIC (µg/mL)		
Kolistin sülfat (KO)	1 	125 	2 

Tablo 4.9 KO ve nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesi. Petri kaplarının MIC ve MBC değerlerinin belirlendiği görüntüler (devamı)

Bakteri	<i>K. pneumoniae</i>	Kolistin Direnli <i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
	Kontrol		
			
rnekler			
	MIC (g/mL)		
GB69/2 (Boş nanokompleks)	>500 	>500 	>500 
GB68/4 (KO yüklü nanokompleks) (<i>E. coli</i> için GB68/2)	4 	250 	0.5 
	MBC (g/mL)		
Kolistin sülfat (KO)	2 	500 	8 
GB68/4 (KO yüklü nanokompleks) (<i>E. coli</i> için GB68/2)	8 	500 	2 

Taşıyıcı sistemin potansiyeli hakkında daha detaylı bilgi edinmek için Gram-pozitif bakterilere karşı etkinliği bilinen bir antibiyotik olan vankomisin (VAN) yüklenen nanokompleksin hem duyarlı hem de dirençli, hiyalüronidaz üreten *S. aureus* suşlarına karşı aktivitesi de incelendi (Tablo 4.10). Buna göre, VAN içeren nanokomplekslerin MIC ve MBC değerlerinin, dirençli *S. aureus* izolatlarında (VRSA ve MRSA suşları) serbest antibiyotiğe göre daha düşük olması çalışmanın en önemli sonucu olarak elde edildi. Duyarlı suşta değerler benzerdi. VRSA ve MRSA suşları için MIC değerlerinde sırasıyla iki ve dört katlık önemli azalmalar, yüksek derecede güçlü bir antibakteriyel aktiviteye işaret ederek, hiyalüronidaz duyarlı nanokompleksin etkili bir antibakteriyel ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Nanokomplekslerin dirençli *S. aureus* suşlarına karşı artan antibakteriyel etkinliği, kültür ortamında bakteriler tarafından üretilen hiyalüronidaz enzimi ile tetiklenen, antibiyotiklerin önemli ölçüde salınmasına bağlanabilir. Bu sonuç, bu enzimi üretmeyen *E. coli*'de herhangi bir aktivite görülmemesi ile desteklenmektedir. Ek olarak, antibiyotik yüklü nanokomplekslerin antimikrobiyal aktivitesinde serbest antibiyotiklere kıyasla gerçekleşen bu artış, bakteri ortamında sürekli ve kontrollü ilaç salımıyla ve biyoyararlanımın artmasıyla açıklanabilir. Elde edilen bulgular, antimikrobiyal bileşiklerin nanopartiküllerle enkapsüle edilmesine ilişkin önceki araştırmalarla uyumludur [168-171]. Ayrıca VAN antibiyotiğine duyarlı ve hiyalüronidaz enzimi üretmeyen *B. cereus* üzerinde nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesinin serbest antibiyotiğe göre daha düşük olması, enzimin ortamdaki varlığının önemini ortaya koymakta (MIC ve MBC değerleri daha yüksektir) ve nanokompleksin hiyalüronidaza duyarlılığının belirgin bir göstergesi olmaktadır. Özellikle dirençli suşlarda hiyalüronidaz enziminin belirgin şekilde daha yüksek üretimi [89, 172], bakteriyel yayılmaya karşı kritik bir bariyer olan HA'yı hızla parçalayarak enfeksiyon sürecini hızlandırır. Bu durum, bakteriyel kolonizasyonun ve yayılımın artmasına yol açar [173]. Ek olarak, serbest antibiyotiğin MIC ve MBC değerleri hem duyarlı hem de klinik izolatlar için standartla tutarlıdır (Tablo 3.1). Beklenildiği gibi klinik izolatlarda daha yüksek MIC değerleri gözlenmektedir. Bu nedenle, hiyalüronidaza duyarlı nanokomplekslerin güçlü antibakteriyel etkisinin, bu enzim tarafından tetiklenen antibiyotiklerin hızlı salımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 4.10 VAN ve nanokomplekslerin antibakteriyel aktivitesi. Petri kaplarının MIC ve MBC değerlerinin belirlendiği görüntüler

Bakteri	<i>S. aureus</i>	VRSA	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
	Kontrol				
Örnekler					
MIC (µg/mL)					
Vankomisin-HCl (VAN)	2 	8 	4 	64 	0.5 
GB69/3 (Boş nanokompleks)	>500 	>500 	>500 	>500 	>500 
GB72/1 (VAN yüklü nanokompleks)	2 	4 	1 	256 	2 
MBC (µg/mL)					
Vankomisin-HCl (VAN)	4 	16 	8 	128 	1 
GB72/1 (VAN yüklü nanokompleks)	4 	8 	2 	512 	4 

5 SONUÇ

Tez kapsamında enzim veya pH'a duyarlı, bakteri varlığında tetiklenerek ilaç salımı yapabilecek, nano yapıli polimerik ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve biyolojik etkinliğinin değeriendirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda ilk olarak HA temelli nanokapsül yapıli bir sistem tasarlanmıştır. Bu sistemin hazırlanmasında yüzeyleler arası (*interfacial*) tetrazin Diels-Alder *Click* Reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. Boya yüklü nanokapsüller sentezlenmiş ve bu yapıların enzimle salım davranışları incelenmiştir. Yapılan değeriendirmeler sonucunda, nanokapsül yapısının çapraz bağlanma derecesinin düşük olması nedeniyle daha serbest yapıda olduğu ve bu nedenle boyanın kendiliğinden, tetikleme olmaksızın salınabileceği sonucuna varılmıştır. Enzimle salım davranışlarının incelenmesi sonucunda, kümülatif yüzde salım değeriilerinin çok düşük çıkması ile boyanın enzimle bir bozunmaya uğrama ihtimalinin de olabileceği düşünölmüş ve Sulforhodamine B'nin enzimle (HA nanoparçacıkları olmadan) etkileşimi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda zamanla enzim ve boyanın etkileşime girip bozulduğu ve kullanılan yöntem veya model boyanın doğru olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca yukarıda belirtildiği gibi çapraz bağlanma derecesinin düşük olması nedeniyle boyanın kendiliğinden ve enzimle tetikleme olmaksızın salımın gerçekleşiyor olması nedeniyle alternatif yapı ve yöntemlerin geliştirilmesine karar verilmiştir.

Tez çalışmasının hedefleri doğrultusunda sistemin uyarlanması sonucu, ikinci bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Negatif yüklü HA ile pozitif yüklü ve pH'a duyarlı olan PBAE arasında fiziksel etkileşimle gerçekleştirilen, içerisinde antibiyotik yüklü olan bir nanokompleks elde edilmiştir. Elde edilen nanokomplekslerin antibiyotik salım çalışmaları enzim ve pH duyarlılığı kapsamında floresans spektroskopisi ile incelenmiş ve sistemin antibakteriyel aktivitesini tayin etmek üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Buna göre salım kinetiğinin, pH ve HA'nın molekül kütlesi ile ayarlanabileceği gösterilmiştir. HA_D ile elde edilen nanokomplekslerde boyutlar daha düşük iken, HA_Y ile elde edilen nanokomplekslerde boyutların daha büyük olduğu gösterilmiştir. Bu yapılardan ilaç salımı incelendiğinde, her iki yapı için de ilacın salımının pH 5,5'te pH 7,4'e

göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu davranış, PBAE'nin pK_b 'sinin (6,5) altındaki pH değerlerinde üzerindeki amino gruplarının protonlanmasına atfedilmiştir. Asidik ortamda nanokompleksler şişerek daha büyük bir yapıya dönüşür ve sonunda parçalanarak ilacın salınmasına neden olur. Kolistin sülfat için, pH 5,5'te 24 saatte HA_D nanokompleksinden ilacın %100'ü salınırken, HA_Y nanokompleksinden 48 saatte ilacın %63'ü salınmıştır. pH'a bağlı bu salım, bakteriyel aktiviteler nedeniyle asidik pH değerlerinin olduğu bakteriyel enfeksiyon bölgelerinde ilacı spesifik olarak salan, pH ile tetiklenen ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine olanak tanır. Ayrıca daha küçük boyutlara sahip, daha düşük moleküler kütleli HA_D ile hazırlanan nanokompleksler, daha yüksek moleküler kütleli HA_Y'den elde edilenlere göre daha hızlı ve etkili salım sağlamıştır. Bunlara ek olarak nanokomplekslerin enzimatik salım potansiyeli de değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; her ne kadar yüksek miktarda hiyalüronidaz enzimi (4,0 mg/mL), enzimin aktivitesinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için uygun deney tasarımına izin vermese de, daha düşük enzim konsantrasyonunun (0,4 mg/mL), enzimle veya enzim olmadan umut verici ancak karşılaştırılabilir olmayan salımlar sağladığı gözlenmiştir. HA_D için 24 saatte ilacın %87'si, HA_Y için 48 saatte ilacın %21'i nanokomplekslerden salınmıştır.

Çalışmanın son adımında antibiyotik yüklü nanokomplekslerin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bunun için her antibiyotiğin hedeflediği bakteri türleri seçilerek deneyler yapılmıştır. KO yüklü nanokomplekslerde, serbest antibiyotiğe kıyasla *E. coli*'ye karşı aktivitede dikkate değer bir artış gözlenerek dört kat daha etkili bir aktivite tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra *K. pneumoniae*'ye karşı azalan aktivite de nanokompleksin pH duyarlılığını vurgulamaktadır. Hiyalüronidaza duyarlı nanokomplekslerin antibakteriyel etkinliği değerlendirilirken, yüksek hiyalüronidaz enzimi üretimi ile bilinen dirençli *S. aureus* suşlarında beklendiği gibi güçlü aktivite tespit edilmiştir. Ancak bu enzimleri üretmeyen *E. coli* ve *B. cereus* suşlarında benzer etkinin görülmemesi dikkat çekici olmuştur. Bu durum HA kaplı nanokomplekslerin aktivitesinin enzim aracılı bozunmayla birlikte arttığını göstermektedir.

- [1] G. Baier, A. Cavallaro, K. Vasilev, V. Mailänder, A. Musyanovych, and K. Landfester, "Enzyme Responsive Hyaluronic Acid Nanocapsules Containing Polyhexanide and Their Exposure to Bacteria To Prevent Infection," *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 4, pp. 1103-1112, 2013, doi: 10.1021/bm302003m.
- [2] G. Baier *et al.*, "Glutathione Responsive Hyaluronic Acid Nanocapsules Obtained by Bioorthogonal Interfacial "Click" Reaction," *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 1, pp. 148-153, 2016, doi: 10.1021/acs.biomac.5b01279.
- [3] H. Ji *et al.*, "Bacterial Hyaluronidase Self-Triggered Prodrug Release for Chemo-Photothermal Synergistic Treatment of Bacterial Infection," *Small*, vol. 12, no. 45, pp. 6200-6206, 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/smll.201601729>.
- [4] S. L. Percival, "Importance of biofilm formation in surgical infection," (in eng), *The British journal of surgery*, vol. 104, no. 2, pp. e85-e94, Jan 2017, doi: 10.1002/bjs.10433.
- [5] G.-J. A. ter Boo, R. G. Richards, T. F. Moriarty, D. W. Grijpma, and D. Eglin, "Hyaluronic acid derivatives and its polyelectrolyte complexes with gentamicin as a delivery system for antibiotics," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 28, no. 10, pp. 1325-1333, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/pat.3915>.
- [6] S. Haas *et al.*, "Enzyme Degradable Polymersomes from Hyaluronic Acid-block-poly(ϵ -caprolactone) Copolymers for the Detection of Enzymes of Pathogenic Bacteria," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 3, pp. 832-841, 2015, doi: 10.1021/bm501729h.
- [7] W. L. Hynes and S. L. Walton, "Hyaluronidases of Gram-positive bacteria," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 183, no. 2, pp. 201-207, 2000, doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08958.x.
- [8] E. Montanari *et al.*, "Chasing bacteria within the cells using levofloxacin-loaded hyaluronic acid nanohydrogels," (in eng), *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, vol. 87, no. 3, pp. 518-23, Aug 2014, doi: 10.1016/j.ejpb.2014.03.003.
- [9] E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, "Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 38, pp. 6974-6998, 2009, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200900942>.
- [10] E. L. Sahkulubey Kahveci, M. U. Kahveci, A. Celebi, T. Avsar, and S. Derman, "Glycopolymer and Poly(β -amino ester)-Based Amphiphilic Block Copolymer as a Drug Carrier," *Biomacromolecules*, vol. 23, no. 11, pp. 4896-4908, 2022, doi: 10.1021/acs.biomac.2c01076.

- [11] T. An *et al.*, "Hyaluronic acid-coated poly(β -amino) ester nanoparticles as carrier of doxorubicin for overcoming drug resistance in breast cancer cells," *RSC Advances*, 10.1039/C6RA03997A vol. 6, no. 45, pp. 38624-38636, 2016, doi: 10.1039/C6RA03997A.
- [12] H. S. Park, J. E. Lee, M. Y. Cho, J. H. Hong, S. H. Cho, and Y. T. Lim, "Hyaluronic Acid/Poly(β -Amino Ester) Polymer Nanogels for Cancer-Cell-Specific NIR Fluorescence Switch," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, no. 18, pp. 1549-1555, 2012, doi: <https://doi.org/10.1002/marc.201200246>.
- [13] Q. Xu *et al.*, "Injectable hyperbranched poly(β -amino ester) hydrogels with on-demand degradation profiles to match wound healing processes," *Chemical Science*, 10.1039/C7SC03913A vol. 9, no. 8, pp. 2179-2187, 2018, doi: 10.1039/C7SC03913A.
- [14] J. Luo *et al.*, "Layer-by-layer coated hybrid nanoparticles with pH-sensitivity for drug delivery to treat acute lung infection," (in eng), *Drug Deliv*, vol. 28, no. 1, pp. 2460-2468, Dec 2021, doi: 10.1080/10717544.2021.2000676.
- [15] Y. Al Thaher, S. Latanza, S. Perni, and P. Prokopovich, "Role of poly-beta-amino-esters hydrolysis and electrostatic attraction in gentamicin release from layer-by-layer coatings," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 526, pp. 35-42, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.042>.
- [16] I. S. Chaschin *et al.*, "Chitosan/hyaluronic acid polyanion bilayer applied from carbon acid as an advanced coating with intelligent antimicrobial properties for improved biological prosthetic heart valves," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 222, pp. 2761-2774, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.056>.
- [17] R. A. Bader, "Fundamentals of Drug Delivery," in *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*, 2013, pp. 1-28.
- [18] D. S. W. Benoit, C. T. Overby, K. R. Sims Jr, and M. A. Ackun-Farmmer, "Drug Delivery Systems," in *Biomaterials Science (Fourth Edition)*, W. R. Wagner, S. E. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, and M. J. Yaszemski Eds.: Academic Press, 2020, pp. 1237-1266.
- [19] H. Rahimi, S. Davaran, H. Nosrati, and H. Danafar, "Targeted Drug Delivery: Advancements, Applications, and Challenges," in *Modeling and Control of Drug Delivery Systems*, A. T. Azar Ed.: Academic Press, 2021, pp. 195-212.
- [20] J. S. Silva, D. Marques-da-Silva, and R. Lagoa, "Towards the Development of Delivery Systems of Bioactive Compounds With Eyes Set on Pharmacokinetics," in *Modeling and Control of Drug Delivery Systems*, A. T. Azar Ed.: Academic Press, 2021, pp. 125-144.
- [21] H. Reza Rezaie, M. H. Esnaashary, A. Aref arjmand, and A. Öchsner, *A Review of Biomaterials and Their Applications in Drug Delivery* (SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology). Springer Singapore, 2018, pp. VII, 60.

- [22] S. Adepu and S. Ramakrishna, "Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions," (in eng), *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 26, no. 19, Sep 29 2021, doi: 10.3390/molecules26195905.
- [23] Q. Zhou, L. Zhang, T. Yang, and H. Wu, "Stimuli-responsive polymeric micelles for drug delivery and cancer therapy," (in eng), *International journal of nanomedicine*, vol. 13, pp. 2921-2942, 2018, doi: 10.2147/ijn.S158696.
- [24] Q. Zhou *et al.*, "Enzyme-triggered smart antimicrobial drug release systems against bacterial infections," *Journal of Controlled Release*, vol. 352, pp. 507-526, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.10.038>.
- [25] Y.-J. Zhu and F. Chen, "pH-Responsive Drug-Delivery Systems," *Chemistry – An Asian Journal*, vol. 10, no. 2, pp. 284-305, 2015, doi: <https://doi.org/10.1002/asia.201402715>.
- [26] Y. Mu, L. Gong, T. Peng, J. Yao, and Z. Lin, "Advances in pH-responsive drug delivery systems," *OpenNano*, vol. 5, p. 100031, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.onano.2021.100031>.
- [27] B. S. Pattni and V. P. Torchilin, "Targeted Drug Delivery Systems: Strategies and Challenges," in *Targeted Drug Delivery : Concepts and Design*, P. V. Devarajan and S. Jain Eds. Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 3-38.
- [28] P. Shi *et al.*, "Active targeting schemes for nano-drug delivery systems in osteosarcoma therapeutics," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1, p. 103, 2023, doi: 10.1186/s12951-023-01826-1.
- [29] H. Tiwari *et al.*, "Recent Advances in Nanomaterials-Based Targeted Drug Delivery for Preclinical Cancer Diagnosis and Therapeutics," *Bioengineering*, vol. 10, p. 760, 2023, doi: 10.3390/bioengineering10070760.
- [30] J. Li *et al.*, "Recent Advances in Targeted Drug Delivery Strategy for Enhancing Oncotherapy," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 9, p. 2233, 2023. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/9/2233>.
- [31] P. Trucillo, "Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach," *Processes*, vol. 9, no. 3, p. 470, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/3/470>.
- [32] T. Anajafi and S. Mallik, "Polymersome-based drug-delivery strategies for cancer therapeutics," *Therapeutic Delivery*, vol. 6, no. 4, pp. 521-534, 2015, doi: 10.4155/tde.14.125.
- [33] S. K. Hari, A. Gauba, N. Shrivastava, R. M. Tripathi, S. K. Jain, and A. K. Pandey, "Polymeric micelles and cancer therapy: an ingenious multimodal tumor-targeted drug delivery system," *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 13, no. 1, pp. 135-163, 2023, doi: 10.1007/s13346-022-01197-4.
- [34] M. Gumustas, C. T. Sengel-Turk, A. Gumustas, S. A. Ozkan, and B. Uslu, "Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems," in *Multifunctional Systems for Combined*

Delivery, Biosensing and Diagnostics, A. M. Grumezescu Ed.: Elsevier, 2017, pp. 67-108.

- [35] T. Wang *et al.*, "Targeted polymer-based antibiotic delivery system: A promising option for treating bacterial infections via macromolecular approaches," *Progress in Polymer Science*, vol. 116, p. 101389, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2021.101389>.
- [36] S. Manandhar, E. Sjöholm, J. Bobacka, J. M. Rosenholm, and K. K. Bansal, "Polymer-Drug Conjugates as Nanotheranostic Agents," *Journal of Nanotheranostics*, vol. 2, no. 1, pp. 63-81, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2624-845X/2/1/5>.
- [37] N. Marasini, S. Haque, and L. M. Kaminskas, "Polymer-drug conjugates as inhalable drug delivery systems: A review," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 31, pp. 18-29, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.06.003>.
- [38] P. R. Wardwell and R. A. Bader, "Challenges of Drug Delivery," in *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*, 2013, pp. 29-54.
- [39] S. Ranghar, P. Sirohi, P. Verma, and V. Agarwal, "Nanoparticle-based Drug Delivery Systems: Promising Approaches Against Infections," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 57, 2012, doi: 10.1590/S1516-89132013005000011.
- [40] O. E. Ogle and N. Byles, "Nanotechnology in dentistry today," (in eng), *The West Indian medical journal*, vol. 63, no. 4, pp. 344-8, Aug 2014, doi: 10.7727/wimj.2013.178.
- [41] N. K. Comolli and C. E. Clark, "Polymeric Microparticles," in *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*, 2013, pp. 85-116.
- [42] A. L. Vasilakes, T. D. Dziubla, and P. P. Wattamwar, "Polymeric Nanoparticles," in *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*, 2013, pp. 117-161.
- [43] B. L. Banik, P. Fattahi, and J. L. Brown, "Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine," *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 271-299, 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/wnan.1364>.
- [44] M. Stevanović, "Polymeric micro- and nanoparticles for controlled and targeted drug delivery," in *Nanostructures for Drug Delivery*, E. Andronescu and A. M. Grumezescu Eds.: Elsevier, 2017, pp. 355-378.
- [45] E. Ben-Akiva, S. Est Witte, R. A. Meyer, K. R. Rhodes, and J. J. Green, "Polymeric micro- and nanoparticles for immune modulation," (in eng), *Biomaterials science*, vol. 7, no. 1, pp. 14-30, Dec 18 2018, doi: 10.1039/c8bm01285g.
- [46] C. I. C. Crucho and M. T. Barros, "Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 80, pp. 771-784, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>.

- [47] J. Y. Lee, K. H. Bae, J. S. Kim, Y. S. Nam, and T. G. Park, "Intracellular delivery of paclitaxel using oil-free, shell cross-linked HSA – Multi-armed PEG nanocapsules," *Biomaterials*, vol. 32, no. 33, pp. 8635-8644, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.063>.
- [48] 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, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>.
- [49] O. I. Parisi, L. Scrivano, M. S. Sinicropi, and F. Puoci, "Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 36, pp. 72-77, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.08.004>.
- [50] A. Clinton and T. Carter, "Chronic Wound Biofilms: Pathogenesis and Potential Therapies," *Laboratory medicine*, vol. 46 4, pp. 277-84, 2015.
- [51] G.-J. A. ter Boo, D. W. Grijpma, T. F. Moriarty, R. G. Richards, and D. Eglin, "Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic- and trauma surgery," *Biomaterials*, vol. 52, pp. 113-125, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.020>.
- [52] V. A. Spirescu, C. Chircov, A. M. Grumezescu, and E. Andronescu, "Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An Up-To-Date Overview," (in eng), *Polymers*, vol. 13, no. 5, Feb 27 2021, doi: 10.3390/polym13050724.
- [53] S. Sarkar, N. Torres, A. Banerjee, R. Bandopadhyay, S. Rajendran, and E. Lichtfouse, "Green polymeric nanomaterials for the photocatalytic degradation of dyes: a review," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 18, 2020, doi: 10.1007/s10311-020-01021-w.
- [54] S. Gopi, A. Amalraj, N. P. Sukumaran, J. T. Haponiuk, and S. Thomas, "Biopolymers and Their Composites for Drug Delivery: A Brief Review," *Macromolecular Symposia*, vol. 380, no. 1, p. 1800114, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/masy.201800114>.
- [55] P. Raveendran, J. Fu, and S. L. Wallen, "Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 46, pp. 13940-13941, 2003, doi: 10.1021/ja029267j.
- [56] E. I. Rabea, M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1457-1465, 2003, doi: 10.1021/bm034130m.
- [57] A. Vanaamudan, M. Sadhu, and P. Pamidimukkala, "Chitosan-Guar gum blend silver nanoparticle bionanocomposite with potential for catalytic degradation of dyes and catalytic reduction of nitrophenol," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 271, pp. 202-208, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.08.136>.
- [58] N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, and G. Crini, "Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture,

- textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 17, no. 4, pp. 1667-1692, 2019, doi: 10.1007/s10311-019-00904-x.
- [59] C. Lei *et al.*, "Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 331, pp. 416-433, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.033>.
- [60] C. S. Lee *et al.*, "Targeted drug delivery nanocarriers based on hyaluronic acid-decorated dendrimer encapsulating gold nanoparticles for ovarian cancer therapy," *Materials Today Chemistry*, vol. 26, p. 101083, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101083>.
- [61] C.-P. Fu *et al.*, "Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Anticancer Drug Delivery," *Polymers*, vol. 15, no. 10, p. 2317, 2023. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/10/2317>.
- [62] P. Angsantikul *et al.*, "Coating Nanoparticles with Gastric Epithelial Cell Membrane for Targeted Antibiotic Delivery against Helicobacter pylori Infection," *Advanced Therapeutics*, vol. 1, no. 2, p. 1800016, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/adtp.201800016>.
- [63] S. Durak, T. Arasoglu, S. C. Ates, and S. Derman, "Enhanced antibacterial and antiparasitic activity of multifunctional polymeric nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 31, no. 17, p. 175705, 2020, doi: 10.1088/1361-6528/ab6ab9.
- [64] D. Da Costa *et al.*, "Surface charge modulation of rifampicin-loaded PLA nanoparticles to improve antibiotic delivery in Staphylococcus aureus biofilms," (in eng), *J Nanobiotechnology*, vol. 19, no. 1, p. 12, Jan 7 2021, doi: 10.1186/s12951-020-00760-w.
- [65] Y. Li, G. Liu, X. Wang, J. Hu, and S. Liu, "Enzyme-Responsive Polymeric Vesicles for Bacterial-Strain-Selective Delivery of Antimicrobial Agents," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 55, no. 5, pp. 1760-1764, 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201509401>.
- [66] X. Wang *et al.*, "Stimuli-Responsive Antibacterial Materials: Molecular Structures, Design Principles, and Biomedical Applications," (in eng), *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, vol. 9, no. 13, p. e2104843, May 2022, doi: 10.1002/advs.202104843.
- [67] B. Taghizadeh *et al.*, "Classification of stimuli-responsive polymers as anticancer drug delivery systems," *Drug Delivery*, vol. 22, no. 2, pp. 145-155, 2015, doi: 10.3109/10717544.2014.887157.
- [68] V. Marturano, P. Cerruti, M. Giamberini, B. Tylkowski, and V. Ambroggi, "Light-Responsive Polymer Micro- and Nano-Capsules," *Polymers*, vol. 9, no. 1, p. 8, 2017. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4360/9/1/8>.
- [69] A. Kawamura and T. Miyata, "pH-Responsive Polymer," in *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, S. Kobayashi and K. Müllen Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2021, pp. 1-9.

- [70] M. Oishi and Y. Nagasaki, "Synthesis, characterization, and biomedical applications of core-shell-type stimuli-responsive nanogels – Nanogel composed of poly[2-(N,N-diethylamino)ethyl methacrylate] core and PEG tethered chains," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 67, no. 11, pp. 1311-1329, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2007.07.009>.
- [71] A. B. Asha, S. Srinivas, X. Hao, and R. Narain, "Enzyme-Responsive Polymers: Classifications, Properties, Synthesis Strategies, and Applications," in *Smart Polymers and their Applications (Second Edition)*, M. R. Aguilar and J. San Román Eds.: Woodhead Publishing, 2019, pp. 155-189.
- [72] R. de la Rica, D. Aili, and M. M. Stevens, "Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 11, pp. 967-978, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.002>.
- [73] V. V. Komnatnyy, W.-C. Chiang, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, and T. E. Nielsen, "Bacteria-Triggered Release of Antimicrobial Agents," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, no. 2, pp. 439-441, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201307975>.
- [74] M. Xiong *et al.*, "Bacteria-Assisted Activation of Antimicrobial Polypeptides by a Random-Coil to Helix Transition," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 56, no. 36, pp. 10826-10829, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201706071>.
- [75] J. Bean *et al.*, "Triggered Release of Bacteriophage K from Agarose/Hyaluronan Hydrogel Matrixes by Staphylococcus aureus Virulence Factors," *Chemistry of Materials*, vol. 26, 2014, doi: 10.1021/cm503974g.
- [76] N. V. Rao, H. Ko, J. Lee, and J. H. Park, "Recent Progress and Advances in Stimuli-Responsive Polymers for Cancer Therapy," (in English), *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Review vol. 6, 2018-August-13 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00110.
- [77] H. F. Abed, W. H. Abuwatfa, and G. A. Hussein, "Redox-Responsive Drug Delivery Systems: A Chemical Perspective," *Nanomaterials*, vol. 12, no. 18, p. 3183, 2022. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/18/3183>.
- [78] M. Serra, A. Casas, D. Toubarro, A. N. Barros, and J. A. Teixeira, "Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review," (in eng), *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 28, no. 5, Feb 23 2023, doi: 10.3390/molecules28052084.
- [79] W. Y. Chen, E. Marcellin, J. Hung, and L. K. Nielsen, "Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in Streptococcus zooepidemicus," (in eng), *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 27, pp. 18007-14, Jul 3 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.011999.
- [80] R. C. Gupta, R. Lall, A. Srivastava, and A. Sinha, "Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory," (in English),

Frontiers in Veterinary Science, Review vol. 6, June-25 2019, doi: 10.3389/fvets.2019.00192.

- [81] R. Alipoor, M. Ayan, M. R. Hamblin, R. Ranjbar, and S. Rashki, "Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials as a New Approach to the Treatment and Prevention of Bacterial Infections," (in English), *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Review vol. 10, June-08 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.913912.
- [82] P. Pirnazar, L. Wolinsky, S. Nachnani, S. Haake, A. Pilloni, and G. W. Bernard, "Bacteriostatic effects of hyaluronic acid," (in eng), *Journal of periodontology*, vol. 70, no. 4, pp. 370-4, Apr 1999, doi: 10.1902/jop.1999.70.4.370.
- [83] I. F. Radaeva, G. A. Kostina, S. G. Il'ina, and R. N. Kostyleva, "[Antimicrobial activity of hyaluronic acid]," (in rus), *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, no. 1, pp. 74-75, 2001 Jan-Feb 2001. [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/11236512>.
- [84] A. Ardizzoni *et al.*, "Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens," (in eng), *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 22, no. 10, pp. 2329-38, Oct 2011, doi: 10.1007/s10856-011-4408-2.
- [85] F. Zamboni, C. K. Wong, and M. N. Collins, "Hyaluronic acid association with bacterial, fungal and viral infections: Can hyaluronic acid be used as an antimicrobial polymer for biomedical and pharmaceutical applications?," (in eng), *Bioactive materials*, vol. 19, pp. 458-473, Jan 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.023.
- [86] H. Jung, "Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects," (in eng), *Archives of plastic surgery*, vol. 47, no. 4, pp. 297-300, Jul 2020, doi: 10.5999/aps.2020.00752.
- [87] K. Meyer, "Hyaluronidases," in *The Enzymes*, vol. 5, P. D. Boyer Ed.: Academic Press, 1971, pp. 307-320.
- [88] M. Cavallini, R. Gazzola, M. Metalla, and L. Vaienti, "The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers," (in eng), *Aesthetic surgery journal*, vol. 33, no. 8, pp. 1167-74, Nov 1 2013, doi: 10.1177/1090820x13511970.
- [89] M. E. Hart, M. J. Hart, and A. J. Roop, "Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species," (in eng), *International journal of microbiology*, vol. 2009, p. 614371, 2009, doi: 10.1155/2009/614371.
- [90] J. H. Park, E. J. Park, and H. S. Yi, "Wound Healing and Anti-inflammatory Effects of Topical Hyaluronic Acid Injection in Surgical-Site Infection Caused by Staphylococcus aureus," (in eng), *The international journal of lower extremity wounds*, vol. 16, no. 3, pp. 202-207, Sep 2017, doi: 10.1177/1534734617714142.
- [91] S. L. Kolar *et al.*, "Group B Streptococcus Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan," (in eng), *Cell host & microbe*, vol. 18, no. 6, pp. 694-704, Dec 9 2015, doi: 10.1016/j.chom.2015.11.001.

- [92] R. Stern and M. J. Jedrzejewski, "Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action," (in eng), *Chemical reviews*, vol. 106, no. 3, pp. 818-39, Mar 2006, doi: 10.1021/cr050247k.
- [93] K. L. Goa and P. Benfield, "Hyaluronic Acid," *Drugs*, vol. 47, no. 3, pp. 536-566, 1994, doi: 10.2165/00003495-199447030-00009.
- [94] R. Uppal, G. N. Ramaswamy, C. Arnold, R. Goodband, and Y. Wang, "Hyaluronic acid nanofiber wound dressing—production, characterization, and in vivo behavior," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 97B, no. 1, pp. 20-29, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31776>.
- [95] U. Wollina and T. Karamfilov, "Treatment of recalcitrant ulcers in pyoderma gangrenosum with mycophenolate mofetil and autologous keratinocyte transplantation on a hyaluronic acid matrix," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 14, no. 3, pp. 187-190, 2000, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2000.00019.x>.
- [96] M. Yoneda, M. Yamagata, S. Suzuki, and K. Kimata, "Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture," *Journal of cell science*, vol. 90 (Pt 2), pp. 265-73, 1988, doi: 10.1242/jcs.90.2.265.
- [97] K. Y. Choi, G. Saravanakumar, J. H. Park, and K. Park, "Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: Interfacial interactions with proteins in cancer," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 99, pp. 82-94, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.029>.
- [98] Y. Jiao, X. Pang, and G. Zhai, "Advances in Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems," (in eng), *Current drug targets*, vol. 17, no. 6, pp. 720-30, 2016, doi: 10.2174/1389450116666150531155200.
- [99] S. Luan, Y. Zhu, X. Wu, Y. Wang, F. Liang, and S. Song, "Hyaluronic-Acid-Based pH-Sensitive Nanogels for Tumor-Targeted Drug Delivery," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 3, no. 10, pp. 2410-2419, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00444.
- [100] D. A. Ossipov, "Nanostructured hyaluronic acid-based materials for active delivery to cancer," (in eng), *Expert opinion on drug delivery*, vol. 7, no. 6, pp. 681-703, Jun 2010, doi: 10.1517/17425241003730399.
- [101] L. Song *et al.*, "Dually folate/CD44 receptor-targeted self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for dual-drug delivery and combination cancer therapy," *Journal of Materials Chemistry B*, 10.1039/C7TB01548H vol. 5, no. 33, pp. 6835-6846, 2017, doi: 10.1039/C7TB01548H.
- [102] R. Nordström and M. Malmsten, "Delivery systems for antimicrobial peptides," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 242, pp. 17-34, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.01.005>.
- [103] Y. Qiu *et al.*, "Hyaluronic acid conjugation facilitates clearance of intracellular bacterial infections by streptomycin with neglectable nephrotoxicity," (in eng), *Glycobiology*, vol. 27, no. 9, pp. 861-867, Sep 1 2017, doi: 10.1093/glycob/cwx061.

- [104] H. Zhang, K. T. Dicker, X. Xu, X. Jia, and J. M. Fox, "Interfacial Bioorthogonal Cross-Linking," *ACS Macro Letters*, vol. 3, no. 8, pp. 727-731, 2014, doi: 10.1021/mz5002993.
- [105] K. T. Dicker *et al.*, "Core-shell patterning of synthetic hydrogels via interfacial bioorthogonal chemistry for spatial control of stem cell behavior," *Chemical Science*, 10.1039/C8SC00495A vol. 9, no. 24, pp. 5394-5404, 2018, doi: 10.1039/C8SC00495A.
- [106] Y. Liu, Y. Li, D. Keskin, and L. Shi, "Poly(β -Amino Esters): Synthesis, Formulations, and Their Biomedical Applications," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8, no. 2, p. 1801359, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.201801359>.
- [107] N. S. Bhise, K. J. Wahlin, D. J. Zack, and J. J. Green, "Evaluating the potential of poly(beta-amino ester) nanoparticles for reprogramming human fibroblasts to become induced pluripotent stem cells," (in eng), *International journal of nanomedicine*, vol. 8, pp. 4641-58, 2013, doi: 10.2147/ijn.S53830.
- [108] S. Perni and P. Prokopovich, "Poly-beta-amino-esters nano-vehicles based drug delivery system for cartilage," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 13, no. 2, pp. 539-548, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.10.001>.
- [109] G. Tripodo, A. Trapani, M. L. Torre, G. Giammona, G. Trapani, and D. Mandracchia, "Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 97, pp. 400-416, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.032>.
- [110] B. Özkahraman, E. Tamahkar, N. İdil, A. Kılıç Suloglu, and I. Perçin, "Evaluation of hyaluronic acid nanoparticle embedded chitosan-gelatin hydrogels for antibiotic release," *Drug Development Research*, vol. 82, no. 2, pp. 241-250, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.21747>.
- [111] Y. Xu, D. Liu, J. Hu, P. Ding, and M. Chen, "Hyaluronic acid-coated pH sensitive poly (β -amino ester) nanoparticles for co-delivery of embelin and TRAIL plasmid for triple negative breast cancer treatment," (in eng), *Int J Pharm*, vol. 573, p. 118637, Jan 5 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118637.
- [112] M. Guo, Y. Meng, X. Qin, and W. Zhou, "Dopamine-Grafted Hyaluronic Acid Coated Hyperbranched Poly(β -Amino Esters)/DNA Nano-Complexes for Enhanced Gene Delivery and Biosafety," *Crystals*, vol. 11, no. 4, p. 347, 2021. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/2073-4352/11/4/347>.
- [113] W. Li *et al.*, "Hyaluronidase and pH Dual-Responsive Nanoparticles for Targeted Breast Cancer Stem Cells," (in eng), *Frontiers in oncology*, vol. 11, p. 760423, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.760423.
- [114] C. J. L. Murray *et al.*, "Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis," *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629-655, 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

- [115] L. The, "Antimicrobial resistance: time to repurpose the Global Fund," *The Lancet*, vol. 399, no. 10322, p. 335, 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(22)00091-5.
- [116] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, no. 11, pp. 2004-2021, 2001, doi: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- [117] H. C. Kolb and K. B. Sharpless, "The growing impact of click chemistry on drug discovery," *Drug Discovery Today*, vol. 8, no. 24, pp. 1128-1137, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02933-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02933-7).
- [118] M. A. Gauthier, M. I. Gibson, and H.-A. Klok, "Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 48, no. 1, pp. 48-58, 2009, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200801951>.
- [119] H. Danafar, K. Rostamizadeh, S. Davaran, and M. Hamidi, "PLA-PEG-PLA copolymer-based polymersomes as nanocarriers for delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs: preparation and evaluation with atorvastatin and lisinopril," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 40, no. 10, pp. 1411-1420, 2014, doi: 10.3109/03639045.2013.828223.
- [120] G. Ma *et al.*, "Doxorubicin-loaded micelles based on multiarm star-shaped PLGA-PEG block copolymers: influence of arm numbers on drug delivery," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 27, no. 1, p. 17, 2015, doi: 10.1007/s10856-015-5610-4.
- [121] W. H. Binder and R. Sachsenhofer, "'Click' Chemistry in Polymer and Materials Science," *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 28, no. 1, pp. 15-54, 2007, doi: <https://doi.org/10.1002/marc.200600625>.
- [122] J. M. Baskin *et al.*, "Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging," (in eng), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 43, pp. 16793-7, Oct 23 2007, doi: 10.1073/pnas.0707090104.
- [123] C. J. Hawker, V. V. Fokin, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Bringing Efficiency to Materials Synthesis: The Philosophy of Click Chemistry," *Australian Journal of Chemistry*, vol. 60, pp. 381-383, 2007.
- [124] M. L. Blackman, M. Royzen, and J. M. Fox, "Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 41, pp. 13518-13519, 2008, doi: 10.1021/ja8053805.
- [125] N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, and R. Weissleder, "Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition," (in eng), *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 48, no. 38, pp. 7013-6, 2009, doi: 10.1002/anie.200903233.

- [126] N. K. Devaraj and R. Weissleder, "Biomedical Applications of Tetrazine Cycloadditions," *Accounts of Chemical Research*, vol. 44, no. 9, pp. 816-827, 2011, doi: 10.1021/ar200037t.
- [127] N. K. Devaraj, R. Weissleder, and S. A. Hilderbrand, "Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 19, no. 12, pp. 2297-2299, 2008, doi: 10.1021/bc8004446.
- [128] F. Emmetiere *et al.*, "18F-Labeled-Bioorthogonal Liposomes for In Vivo Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 24, no. 11, pp. 1784-1789, 2013, doi: 10.1021/bc400322h.
- [129] A. T. Krueger, C. Kroll, E. Sanchez, L. G. Griffith, and B. Imperiali, "Tailoring Chimeric Ligands for Studying and Biasing ErbB Receptor Family Interactions," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 53, no. 10, pp. 2662-2666, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201307869>.
- [130] K. Lang *et al.*, "Genetic Encoding of Bicyclononynes and trans-Cyclooctenes for Site-Specific Protein Labeling in Vitro and in Live Mammalian Cells via Rapid Fluorogenic Diels–Alder Reactions," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 25, pp. 10317-10320, 2012, doi: 10.1021/ja302832g.
- [131] Z. Li *et al.*, "Tetrazine–trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of 18F labeled probes," *Chemical Communications*, 10.1039/C0CC03078C vol. 46, no. 42, pp. 8043-8045, 2010, doi: 10.1039/C0CC03078C.
- [132] C. A. Refakis, M. L. Blackman, J. M. Fox, and R. A. Mehl, "Bioorthogonal Ligation Using Site-Specific Tetrazine-Alkene Coupling On Proteins," *The FASEB Journal*, vol. 24, no. S1, pp. 912.7-912.7, 2010, doi: https://doi.org/10.1096/fasebj.24.1_supplement.912.7.
- [133] R. Selvaraj *et al.*, "Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of integrin $\alpha\beta 3$ targeted PET tracer based on a cyclic RGD peptide," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 21, no. 17, pp. 5011-5014, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.04.116>.
- [134] R. Selvaraj and J. M. Fox, "trans-Cyclooctene--a stable, voracious dienophile for bioorthogonal labeling," (in eng), *Current opinion in chemical biology*, vol. 17, no. 5, pp. 753-60, Oct 2013, doi: 10.1016/j.cbpa.2013.07.031.
- [135] W. Xi, T. F. Scott, C. J. Kloxin, and C. N. Bowman, "Click Chemistry in Materials Science," *Advanced Functional Materials*, vol. 24, no. 18, pp. 2572-2590, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201302847>.
- [136] M. Pagel, "Inverse electron demand Diels–Alder (IEDDA) reactions in peptide chemistry," *Journal of Peptide Science*, vol. 25, no. 1, p. e3141, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/psc.3141>.
- [137] H. Wu, J. Yang, J. Šečkutè, and N. K. Devaraj, "In situ synthesis of alkenyl tetrazines for highly fluorogenic bioorthogonal live-cell imaging probes," (in eng), *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 53, no. 23, pp. 5805-9, Jun 2 2014, doi: 10.1002/anie.201400135.

- [138] Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, and W. R. Liu, "Genetically encoded unstrained olefins for live cell labeling with tetrazine dyes," *Chemical communications*, vol. 50, no. 86, pp. 13085-13088, 2014.
- [139] V. M. Peterson, C. M. Castro, H. Lee, and R. Weissleder, "Orthogonal Amplification of Nanoparticles for Improved Diagnostic Sensing," *ACS Nano*, vol. 6, no. 4, pp. 3506-3513, 2012, doi: 10.1021/nm300536y.
- [140] M. Liong *et al.*, "Specific Pathogen Detection Using Bioorthogonal Chemistry and Diagnostic Magnetic Resonance," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 22, no. 12, pp. 2390-2394, 2011, doi: 10.1021/bc200490r.
- [141] B. L. Oliveira, Z. Guo, and G. J. L. Bernardes, "Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology," *Chemical Society Reviews*, 10.1039/C7CS00184C vol. 46, no. 16, pp. 4895-4950, 2017, doi: 10.1039/C7CS00184C.
- [142] J. Y. Heo *et al.*, "An injectable click-crosslinked hydrogel that prolongs dexamethasone release from dexamethasone-loaded microspheres," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 9, p. 438, 2019.
- [143] H. Zhu, H. Wu, M. Wu, and Q. Gong, "Tetrazine Bioorthogonal Reaction: A Novel Scheme for Polymer and Biomaterials," *Current Organic Chemistry*, vol. 20, no. 17, pp. 1756-1767, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1385272820666151102212821>.
- [144] M. M. Lorenzo, C. G. Decker, M. U. Kahveci, S. J. Paluck, and H. D. Maynard, "Homodimeric Protein–Polymer Conjugates via the Tetrazine–trans-Cyclooctene Ligation," *Macromolecules*, vol. 49, no. 1, pp. 30-37, 2016, doi: 10.1021/acs.macromol.5b02323.
- [145] S. S. Kara, M. Y. Ateş, G. Deveci, A. Cetinkaya, and M. U. Kahveci, "Direct synthesis of tetrazine functionalities on polymer backbones," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol. 57, no. 6, pp. 673-680, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/pola.29308>.
- [146] G. Bakirdogen, E. L. Sahkulubey Kahveci, and M. U. Kahveci, "Fast and efficient preparation of three-arm star block copolymers via tetrazine ligation," *European Polymer Journal*, vol. 140, p. 110027, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110027>.
- [147] A. Famili and K. Rajagopal, "Bio-Orthogonal Cross-Linking Chemistry Enables In Situ Protein Encapsulation and Provides Sustained Release from Hyaluronic Acid Based Hydrogels," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 14, no. 6, pp. 1961-1968, 2017, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00067.
- [148] H. S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, and M. G. Bawendi, "Development of a bioorthogonal and highly efficient conjugation method for quantum dots using tetrazine-norbornene cycloaddition," (in eng), *J Am Chem Soc*, vol. 132, no. 23, pp. 7838-9, Jun 16 2010, doi: 10.1021/ja101677r.
- [149] R. Rossin *et al.*, "Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice," *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, p. 1484, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03880-y.

- [150] M. Handula, K. T. Chen, and Y. Seimbille, "IEDDA: An Attractive Bioorthogonal Reaction for Biomedical Applications," (in eng), *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 26, no. 15, Jul 30 2021, doi: 10.3390/molecules26154640.
- [151] Y. Basel and A. Hassner, "Di-tert-butyl Dicarboxate and 4-(Dimethylamino)pyridine Revisited. Their Reactions with Amines and Alcohols1," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 65, no. 20, pp. 6368-6380, 2000, doi: 10.1021/jo000257f.
- [152] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, and N. K. Devaraj, "Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, no. 21, pp. 5222-5225, 2012, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201201117>.
- [153] S. Y. Vafaei, M. Esmaeili, M. Amini, F. Atyabi, S. N. Ostad, and R. Dinarvand, "Self assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential carrier for targeting the inflamed intestinal mucosa," *Carbohydrate Polymers*, vol. 144, pp. 371-381, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.026>.
- [154] J. J. Aguilera-Correa *et al.*, "Arabic gum plus colistin coated moxifloxacin-loaded nanoparticles for the treatment of bone infection caused by *Escherichia coli*," *Acta Biomaterialia*, vol. 137, pp. 218-237, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.014>.
- [155] D. Crespy, M. Stark, C. Hoffmann-Richter, U. Ziener, and K. Landfester, "Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets," *Macromolecules*, vol. 40, no. 9, pp. 3122-3135, 2007, doi: 10.1021/ma0621932.
- [156] CLSI, "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement," vol. M100-S23, ed: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [157] *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 13.1*, EUCAST, 2023. [Online]. Available: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf
- [158] S. Sakulwech *et al.*, "Nanocomplex of quaternized cyclodextrin grafted chitosan and hyaluronic acid for a skin delivery," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 220, p. 112920, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112920>.
- [159] C. Y. Zhang *et al.*, "Self-assembled pH-responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) block copolymer micelles for anticancer drug delivery," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 6273-6283, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.025>.
- [160] C. Haeuser, P. Goldbach, J. Huwyler, W. Friess, and A. Allmendinger, "Excipients for Room Temperature Stable Freeze-Dried Monoclonal Antibody Formulations," (in eng), *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 109, no. 1, pp. 807-817, Jan 2020, doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.016.

- [161] J. Karlsson, K. R. Rhodes, J. J. Green, and S. Y. Tzeng, "Poly(beta-amino ester)s as gene delivery vehicles: challenges and opportunities," (in eng), *Expert opinion on drug delivery*, vol. 17, no. 10, pp. 1395-1410, Oct 2020, doi: 10.1080/17425247.2020.1796628.
- [162] C. Yang, X. Wang, X. Yao, Y. Zhang, W. Wu, and X. Jiang, "Hyaluronic acid nanogels with enzyme-sensitive cross-linking group for drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 205, pp. 206-217, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.008>.
- [163] J.-H. Ozegowski, E. Günther, and W. Reichardt, "Purification and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*," *Zentralblatt für Bakteriologie*, vol. 280, no. 4, pp. 497-506, 1994, doi: [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80509-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80509-8).
- [164] K. Takács-Novák, B. Noszál, M. Tóké-Kövesdi, and G. Szász, "Acid-base properties and proton-speciation of vancomycin," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 89, no. 3, pp. 261-263, 1993, doi: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90252-B](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90252-B).
- [165] L. Mitrea and D. C. Vodnar, "Klebsiella pneumoniae-A Useful Pathogenic Strain for Biotechnological Purposes: Diols Biosynthesis under Controlled and Uncontrolled pH Levels," (in eng), *Pathogens (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 4, Dec 11 2019, doi: 10.3390/pathogens8040293.
- [166] J. H. Cho, C. Rathnasingh, H. Song, B. W. Chung, H. J. Lee, and D. Seung, "Fermentation and evaluation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* on the production of 2,3-butanediol," (in eng), *Bioprocess and biosystems engineering*, vol. 35, no. 7, pp. 1081-8, Sep 2012, doi: 10.1007/s00449-012-0691-7.
- [167] K. A. Presser, D. A. Ratkowsky, and T. Ross, "Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration," (in eng), *Applied and environmental microbiology*, vol. 63, no. 6, pp. 2355-60, Jun 1997, doi: 10.1128/aem.63.6.2355-2360.1997.
- [168] Y. Abo-Zeid, A. Amer, M. R. Bakkar, B. El-Houssieny, and W. Sakran, "Antimicrobial Activity of Azithromycin Encapsulated into PLGA NPs: A Potential Strategy to Overcome Efflux Resistance," (in eng), *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 11, Nov 14 2022, doi: 10.3390/antibiotics11111623.
- [169] D. A. Oliveira, M. Angonese, S. R. S. Ferreira, and C. L. Gomes, "Nanoencapsulation of passion fruit by-products extracts for enhanced antimicrobial activity," *Food and Bioprocess Processing*, vol. 104, pp. 137-146, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.05.009>.
- [170] M. RAVICHANDRAN, N. S. HETTIARACHCHY, V. GANESH, S. C. RICKE, and S. SINGH, "ENHANCEMENT OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF NATURALLY OCCURRING PHENOLIC COMPOUNDS BY NANOSCALE DELIVERY AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN BROTH AND CHICKEN MEAT SYSTEM," *Journal of Food Safety*, vol. 31, no. 4, pp. 462-471, 2011, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00322.x>.

- [171] P. Walvekar, R. Gannamani, M. Salih, S. Makhathini, C. Mocktar, and T. Govender, "Self-assembled oleylamine grafted hyaluronic acid polymersomes for delivery of vancomycin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 182, p. 110388, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110388>.
- [172] Q. Yuan, Y. Zhao, Z. Zhang, and Y. Tang, "On-Demand Antimicrobial Agent Release from Functionalized Conjugated Oligomer-Hyaluronic Acid Nanoparticles for Tackling Antimicrobial Resistance," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 13, no. 1, pp. 257-265, 2021, doi: 10.1021/acsami.0c19283.
- [173] C. B. Ibberson *et al.*, "Staphylococcus aureus hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor," (in eng), *Infection and immunity*, vol. 82, no. 10, pp. 4253-64, Oct 2014, doi: 10.1128/iai.01710-14.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. G. Bakirdogen, S. Derman, T. Arasoglu, M.U. Kahveci, “Enzime Duyarlı Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi”, 32. Ulusal Kimya Kongresi, s. 54, 2020.

Makaleler

1. G. Bakirdogen, E. Selcuk, E. L. Sahkulubey Kahveci, T. Ozbek, S. Derman, and M. U. Kahveci, "Fabrication of poly(β -amino ester) and hyaluronic acid based pH responsive nanocomplex as an antibiotic release system," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 258, p. 129060, 2024, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.129060>.

Projeler

1. Enzime Duyarlı Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Biyolojik Etkinliğinin İncelenmesi, ITU-BAP, TGA-2019-42288, Doç Dr. Muhammet Ü. Kahveci (Yürütücü), Prof Dr. Serap Derman (Araştırmacı), Prof Dr. Tülin Özbek (Araştırmacı), Gülşah Bakırdöğen (Araştırmacı), 08-10-2019/08-01-2023.