



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RADYOİŞARETLİ ANTİBİYOTİK YÜKLÜ KİTOSAN
NANOPARÇACIKLARIN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN *IN VITRO* İNCELENMESİ**

Derya ÖZEL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 09.08.2018

Bornova-İZMİR

2018

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RADYOİŞARETLİ ANTİBİYOTİK YÜKLÜ KİTOSAN
NANOPARÇACIKLARIN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ**

Derya ÖZEL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 09.08.2018

Bornova, İZMİR

2018

Derya ÖZEL tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “**Radyoışaretli Antibiyotik Yüklü Kitosan Nanoparçacıkların Antibakteriyel Etkilerinin *İn Vitro* İncelenmesi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı :Prof.Dr. Fatma YURT ONARAN
Raportör Üye :Doç. Dr. Kübra DURKAN
Üye :Prof. Dr. Osman YILMAZ

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi sunduğum “**Radyoişaretli Antibiyotik Yüklü Kitosan Nanoparçacıkların Antibakteriyel Etkilerinin *in vitro* İncelenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09 /08 /2018



Derya ÖZEL

ÖZET**RADYOİŞARETLİ ANTİBİYOTİK YÜKLÜ KİTOSAN
NANOPARÇACIKLARIN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN *İN*
VİTRO İNCELENMESİ**

ÖZEL, Derya

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN

Ağustos 2018, 59 sayfa

Antibiyotiklerin yaygın kullanımı bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olmuştur. Bu nedenle, antibiyotiklerin etkinliğini arttıran yeni “yetenekli ajanlar” geliştirmek gerekmektedir. Sefpodoksim Proksetil (CP), üçüncü kuşak sefalosporin grubu geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Kitosan; biyouyumlu, antibakteriyel, mukoadezif, katyonik, doğal bir polimer olması gibi özellikleri sayesinde ideal bir biyomalzemedir. Araştırmalar, mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ilaçların etkilerinin kitosan nanoparçacıklarına yüklenerek arttırılabileceğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, radyoışaretili sefpodoksim proksetil yüklü kitosan nanoparçacığının gram pozitif *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve gram negatif *Escherichia coli* (*E. coli*) bakteriyel enfeksiyonlarının saptanmasında nükleer bir görüntüleme ajanı olarak kullanılma potansiyelini araştırmaktır. Kitosan (CS) nanoparçacıkları ve Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan (CP-CS) nanoparçacıkları iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı. Nanoparçacıklar, Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) teknikleri ile karakterize edildi. CP-CS nanoparçacık üzerine yüklenen Sefpodoksim Proksetil miktarı ultraviyole-görünür (UV-Vis) spektroskopisi ile belirlendi.

Sefpodoksim Proksetil ve Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları, 100 µg SnCl₂ kullanılarak 37 MBq sodyum perteknetat ile radyoişaretlenmiştir. Radyoişaretli Sefpodoksim Proksetil (^{99m}Tc-CP) ve radyoişaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların (^{99m}Tc-CP-CS) işaretleme verimi TLRC yöntemi ile belirlendi ve sırasıyla verimler % 89±3 ve % 94±2 olarak tespit edildi.

S. aureus için ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacıkların tutulum verimi 1 saatte % 99.3 iken; 2 saatte % 68.9; 4 saatte % 76.9, ^{99m}Tc-CP'nin bağlanma verimi 1 saatte % 7.2 idi; 2 saatte % 9.3; 4 saatte % 9.5 olarak belirlendi. *In vitro* tutulum çalışması, *S. aureus*'da ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacıklarının tutulum veriminin ^{99m}Tc-CP'ninkinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. *E. coli* için tutulum verimi ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacıklarının (1. saat % 91.2; 2 saatte % 77.9; 4 saatte % 58.3), ^{99m}Tc-CP'den (1. saat % 6.6; 2. saatte % 8.1; 4. saatte % 10.3) daha yüksek bulunmuştur.

Bu sonuçlar ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacıklarının enfeksiyon nükleer görüntüleme potansiyeli için bir umut vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, nanoparçacık, Sefpodoksim Proksetil, antibakteriyel etki, ^{99m}Tc, *S. aureus*, *E. Coli*.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL EFFECT AS *IN VITRO* OF
RADIOLABELED ANTIBIOTIC LOADED CHITOSAN
NANOPARTICLES**

ÖZEL, Derya

MSc Thesis, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN

August 2018, 59 pages

The widely use of antibiotics has caused to develop resistance to antibiotics of the bacteria. For this reason, it is necessary to develop new "talented agents" which increase on the effectiveness of antibiotics. Cefpodoxime Proxetil, third generation cephalosporin group, is a broad spectrum antibiotic. Chitosan is an ideal biomaterial because of its properties such biocompatible, cationic, antibacterial, mucoadhesive, natural polymer. The investigations show that the effects of antibacterial drug against microorganisms can be increased by loading them into chitosan nanoparticles.

The aim of this work is to investigate on useful potential as a nuclear imaging agent of radiolabeled cefpodoxime proxetil loaded chitosan nanoparticle in the detection of gram-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and gram-negative *Escherichia coli* (*E. coli*) bacterial infections. Chitosan (CS) nanoparticles and Cefpodoxime Proxetil loaded chitosan (CP-CS) nanoparticles were prepared by using ionic gelation method. The nanoparticles were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Scanning Electron Microscope (SEM) techniques. The amount of loaded Cefpodoxime Proxetil onto CP-CS nanoparticle was determined by ultraviolet–visible (UV-Vis) spectroscopy.

Cefpodoxime Proxetil and Cefpodoxime Proxetil loaded chitosan nanoparticles were radiolabeled with 37 MBq sodium pertechnetate by using 100

μg SnCl_2 . Radiolabeling yields of radiolabeled Cefpodoxime Proxetil ($^{99\text{m}}\text{Tc-CP}$) and radiolabeled Cefpodoxime Proxetil loaded chitosan nanoparticles ($^{99\text{m}}\text{Tc-CP-CS}$) were determined by TLRC method and were found as to be $89\pm 3\%$ and $94\pm 2\%$ respectively.

While binding efficiency of $^{99\text{m}}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparticles for *S. aureus* was 99.3% at 1h; 68.9% at 2h; 76.9% at 4h, binding efficiency of $^{99\text{m}}\text{Tc-CP}$ was 7.2% at 1h; 9.3% at 2h; 9.5% at 4 h. *In vitro* binding study results indicate that binding efficiencies of $^{99\text{m}}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparticles in *S. aureus* was higher than that of $^{99\text{m}}\text{Tc-CP}$. It was found that binding efficiencies of $^{99\text{m}}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparticles for *E. coli* (91.2% at 1 h; 77.9% at 2h; 58.3% at 4h) were higher than $^{99\text{m}}\text{Tc-CP}$ (6.6% at 1 h; 8.1% at 2h; 10.3% at 4 h)

These results promise that $^{99\text{m}}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparticles might be an agent for infection nuclear imaging potential.

Keywords: Chitosan, nanoparticle, Cefpodoxime Proxetil, antibacterial effect, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, *S. aureus*, *E.coli*.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde değerli bilgileri ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren, benden desteğini ve yardımlarını esirgemeyen öğrenim hayatımın yanında sosyal hayatımda da desteğini hissettiğim sevgili danışman hocam aynı zamanda eğitimim süresince enstitümüz laboratuvarlarında her türlü imkanı sağlayan Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü çok değerli hocam Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda antibiyotik etken maddemi hediye eden Deva Holding'e, Nükleer Teknoloji Ana Bilim Dalı'nda çalışmalarımın UV spektroskopi ölçümlerini gerçekleştiren Prof. Dr. Mahmoud ASLANI'ye FTIR analizlerini gerçekleştiren Doç. Dr. Süleyman İNAN'a ve, Eczacılık Fakültesi Farmasotik Mikrobiyoloji'de bakteri sağlamada yardımcı olan Arş. Gör. İsmail ÖZTÜRK'e, çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşım Ayça TUNÇEL'e, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve bana katkılarından dolayı kendimi şanslı hissettiğim Doç. Dr. Kübra DURKAN'a, Doç.Dr. Çiğdem İÇHEDEF'e, Dr. Özge KOZGUŞ GÜLDÜ'ye, desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Burcu AYDIN ve tüm öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince varlıklarıyla beni var eden çok değerli eşime ve canım çocuklarıma, hayatımın her aşamasında olduğu gibi verdikleri destek ile beni güçlendiren geniş aileme ve sevgili arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Sefpodoksim Proksetil	4
2.2 Kitosan	7
2.2.1 Kitosanın fiziksel özellikleri	9
2.2.2 Kitosanın kimyasal özellikleri	10
2.2.3 Kitosanın biyolojik özellikleri	10
2.3 Kitosanın Kullanım Alanları	11
2.4 Nanoparçacıklar	12
2.5 Kitosan Nanoparçacıkları	13

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.1 Kitosan nanoparçacık hazırlama yöntemleri.....	14
2.5.2 Kitosanın nanoparçacıkların antibakteriyal aktivitesi.....	15
2.6 Enfeksiyon Tespitinde Nükleer Görüntüleme Yöntemleri ve Kullanılan Radyofarmasötikler.....	16
2.7 Teknesyumun Kimyası	18
2.7.1 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	21
3.1.1 Kullanılan kimyasallar	21
3.1.2 Kullanılan cihazlar	22
3.2 Antibiyotik Stok Çözeltisinin Hazırlanması	23
3.3 Nanoparçacıkların Sentezi	23
3.3.1 Kitosan (CS) nanoparçacıkların sentezi	23
3.3.2 Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan (CP-CS) nanoparçacıkların hazırlanması	24
3.4 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	25
3.4.1 DLS ve zeta potansiyeli analizi.....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4.2 FT-IR analizi.....	25
3.4.3 SEM analizi	25
3.5 İlacın Kapsüllenme Veriminin ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması	26
3.6 Radyoışaretleme Çalışmaları	26
3.6.1 Sefpodoksim Proksetilin radyoışaretlenmesi.....	26
3.6.2 Sefpodoksim Proksetil yüklü nanoparçacıkların radyoışaretlenmesi	27
3.7 Kalite Kontrol Çalışmaları.....	27
3.7.1 İnce tabaka radyokromatografi yöntemi (TLRC).....	27
3.7.2 <i>In vitro</i> stabilite çalışması	28
3.8 <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> bakterilerinde <i>in vitro</i> Tutulum Çalışması.....	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	30
4.1 DLS, FTIR and SEM çalışmaları sonuçları	30
4.1.1 Parçacık boyutu ve Zeta sonuçları.....	30
4.1.2 FT-IR analiz sonuçları	34
4.1.3 SEM sonuçları	36

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2 Kitosan Nanoparçacıkların Sefpodoksim Proksetil Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	39
4.3 Kalite Kontrol Sonuçları	41
4.3.1 ^{99m} Tc-CP ve ^{99m} Tc-CP-CS nanoparçacıkların TLRC sonuçları.....	41
4.4 <i>In vitro</i> Stabilite Sonuçları	46
4.5 <i>In vitro</i> Tutulum Deneşleri Sonuçları	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR DİZİNİ	50
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Sefpodoksim Proksetil'in kimyasal yapısı.....	4
2.2 Kitinden kitosan üretimi	9
2.3 ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc jeneratörü	19
2.4 TLRC şeridi ve R _f değerinin hesaplanması.....	20
3.1 Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıklarının sentez aşamalarının şematik gösterimi	24
4.1 CS nanoparçacıkların boyut dağılımı	30
4.2 CP-CS nanoparçacıkların boyut dağılımı	31
4.3 CS nanoparçacıkların zeta potansiyel dağılımı.....	33
4.4 CP-CS nanoparçacıkların zeta potansiyel dağılımı.....	33
4.5 CP antibiyotiğinin FT-IR spektrumu.	35
4.6 CS nanoparçacıkların FT-IR spektrumu.	35
4.7 CP-CS nanoparçacıklarının FT-IR spektrumu.....	36
4.8 Kitosan nanoparçacıkların SEM görüntüsü	37
4.9 (a) ve (b) Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları SEM görüntüsü	38
4.10 Sefpodoksim Proksetil kalibrasyon eğrisi.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11 ^{99m} Tc ile işaretli Sefpodoksim Proksetilin Aseton banyosundaki TLRC kromotogramı.....	42
4.12 ^{99m} Tc ile işaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların Aseton banyosundaki TLRC kromotogramı.....	43
4.13. İndirgenmiş ^{99m} Tc Aseton banyosundaki TLRC kromotogramı.....	43
4.14 ^{99m} Tc işaretli Sefpodoksim Proksetil'in PAS banyosundaki TLRC kromotogramı.....	44
4.15 ^{99m} Tc işaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların PAS banyosunda TLRC kromotogramı.....	44
4.16 Na ^{99m} TcO ₄ 'ın PAS banyosunda TLRC kromotogramı.....	45
4.17 İndirgenmiş ^{99m} Tc PAS banyosunda TLRC kromotogramı.....	45
4.18 ^{99m} Tc-CP ve ^{99m} Tc-CP-CS nanoparçacıkların <i>in vitro</i> stabilitesinin zamana göre değişimi.....	46
4.19 ^{99m} Tc-CP-CS, ^{99m} Tc-CP ve Na ^{99m} TcO ₄ 'un E. coli bakterisinde tutulumu.....	47
4.20 ^{99m} Tc-CP-CS, ^{99m} Tc-CP ve Na ^{99m} TcO ₄ 'un S. aureus bakterisinde tutulumu.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

4.1 Rf değerleri 41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
Cd(Te)	Kadmiyum tellür
CP	Sefpodoksim Proksetil
CP- CS	Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacık
CS	Kitosan
CSCP	Kitosan nanoparçacık
DD	Deasetilasyon derecesi
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi
MİK	Minumum İnhibitör Konsantrasyon
MW	Molekül ağırlığı
Na ^{99m} TcO ₄	Teknesyum Perteknatat
PAS	Piridin-Asetik asit-Su
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PI	Polidispersite İndeksi
Rf	Alıkonma mesafesi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
^{99m} Tc-CP-CS	Teknesyumla radyoişaretleli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacık
^{99m} Tc-CP	Teknesyumla radyoişaretleli Sefpodoksim Proksetil
TLRC	İnce Tabaka Radyokromatografisi
TPP	Tripolifosfat

1. GİRİŞ

Antibiyotiklerin keşfiyle birlikte artan kullanımı hızlı bir şekilde antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine neden olmuştur. Bu durum “antibiyotik paradoksu” olarak adlandırılmıştır. Bu nedenle antibiyotiklerin enfeksiyona bağlı hastalıkların üstesinden gelebileceğine dair inanç zayıflamaktadır. Yeni üretilmiş antibiyotiklere veya var olan antibiyotiklerin etkisini arttıran yeni “yetenekli ajanların” geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Nanoparçacıklar, antibakteriyel, aniviral, antifungal ve antiparazitik gibi antienfeksiyon ilaçları taşıyabilirler. Boyutları 1-1000 nm'ye kadar olduklarından kanda uzun süre kalabilirler ve vücutta bulunan birçok biyolojik bariyeri aşabilmektedirler. Bu özellikleri ile vücuda alınan ilacın hedef bölgede kontrollü salınımını sağlamaktadırlar (Uhrich et al., 1999; Tran et al., 2009). Nanoparçacıklar, mikrobiyel direncin daha az gelişme şansı olan yeni antimikrobiyel ajanlar olarak kullanılabilirler (Huh ve Kwon 2011). Ayrıca, antimikrobiyellerin terapötik etkisi, serbest ilaç muadillerinin aksine, nanoparçacık bazlı taşıyıcılar üzerine ilaçların yüklenmesiyle arttırılmaktadır. Antimikrobiyellerin salınımında nanoparçacıkların kullanımı, ilacın serum çözünürlüğünü önemli derecede arttıracak, ilacın sistemik dolaşımın ömrünü uzatacak, hedef dokularda ilaç salınımını sürdürecektir ve aynı hedef hücreye birden fazla ilaç vererek kombine terapiden faydalanacaktır (Zhang et al., 2016).

Kitosan, toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olması ve vücut içerisinde, tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanmasından dolayı herhangi bir yan etkisi de bulunmamaktadır. Ayrıca biyoyumluluğu, hemostatik, antitümör, antioksidant, antibakteriyel, antifungal ve antimikrobiyal aktivitesi, negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşimi, diğer materyallerle kompozit oluşturabilmesi, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlaması gibi özellikleri sayesinde ideal bir maddedir. Kitosanın bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonları tedavi etme etkinliği ortaya konulmuştur (Rabea et al., 2003). Kitosanın moleküler ağırlığı ve bakteriyel hücre yüzeylerinin doğası kitosanın antimikrobiyel etkisini etkilemektedir (Fernandes et al., 2008). İlaça dirençli *P. aeruginosa*'yı tedavi

etmek için kitosan antibiyotik sülfametoksazol ile antimikrobiyal tedavide büyük bir öneme sahiptir (Tin et al., 2009). Kitosanın antibiyotik dirençli enfeksiyonları tedavi etmedeki etkisi, klinik uygulamalar için büyük umut vaat etmektedir. Kitosanın antimikrobiyal etkisi kitosanın negatif yüklü bakteriyel hücre yüzeylerine bağlanması, hücre içi bileşenlerin sızmasıyla mikrobik hücre duvarı geçirgenliğini arttırması gibi çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır (Qi et al., 2004). Kitosan enzim aktivitelerini ve mikrobiyal büyümeyi de inhibe edebilmektedir (Cureo et al., 1991).

Nükleer görüntüleme yöntemleri ile vücutta enfeksiyonun yerinin tespiti ve enfeksiyonun enflamasyondan ayırt edilebilmesi mümkündür. Nükleer tıpın araştırma alanlarından biri de insanlarda enfeksiyon ve inflamasyonun görüntülenmesi için yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesidir (Yurt Lambrecht, 2010). Nükleer tıpta günümüzde birçok hastalığı teşhis etmede ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan 100'e yakın radyofarmasötik bulunmaktadır. Radyofarmasötikler kullanılarak yapılan nükleer tıp çalışmaları, pek çok klinik vakaların aydınlatılmasında önemli role sahiptir (Gündoğdu, 2018). Bu nedenle yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar önem kazanmaktadır. Antibiyotikler, kanser ilaçları, antikolar, lökositler, antimikrobiyal peptidler ve kemotaktik peptidler ^{68}Ga , ^{13}N , ^{11}C , ^{15}O , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{18}F , ^{131}I , ^{123}I , ^{201}Tl gibi farklı radyonüklidlerle işaretlenmiş ve yeni radyofarmasötiklerin görüntüleme potansiyelleri araştırılmıştır (Yurt Lambrecht, 2010).

Bu çalışmada Sefpodoksim Proksetil antibiyotiği, Teknesyum-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) radyonüklidi ile işaretlenerek enfeksiyon görüntüleme potansiyeli *in vitro* olarak araştırılmıştır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$; 6.01 saatlik yarı ömrü, 140 keV'lik gama enerjisi sebebiyle sintigrafik görüntülemeler için ideal bir radyonükliddir. Bu özelliklerinden dolayı $^{99\text{m}}\text{Tc}$, nükleer tıpta en yaygın olarak kullanılan görüntüleme radyonüklitidir.

Antibiyotiklerin geliştirdikleri direnç mekanizmaları sebebiyle antibakteriyel çalışmalar daha fazla ivme kazanmıştır. Bu amaçla araştırmalarda etkili adaylar polimer malzemeler olarak düşünülmektedir. Fakat bu malzemeler, mikroorganizmalar enfeksiyonlara karşı direnebildiklerinde sentetik polimerlerse

kirlilik kaynağı oluşturabilmektedirler. Kitosanın doğal polimer olması ve nano büyüklükteki avantajları, kitosan üzerine olan ilgiyi arttırmakta ve yeni uygulama alanları ortaya çıkarmaktadır.

Nanoparçacık üretimi üzerine yapılan çalışmalar parçacık büyüklüğünün azalmasıyla kitosanın sahip olduğu özelliklerde artış meydana geldiğini göstermiştir. Literatürde, kitosan nanoparçacıkların antibakteriyel etkileri geliştirdiği, enfeksiyonları iyileştirdiği ve hücre büyümesini teşvik ederek iyileşme sürecini de hızlandırdığına dair sonuçlar bulunmaktadır

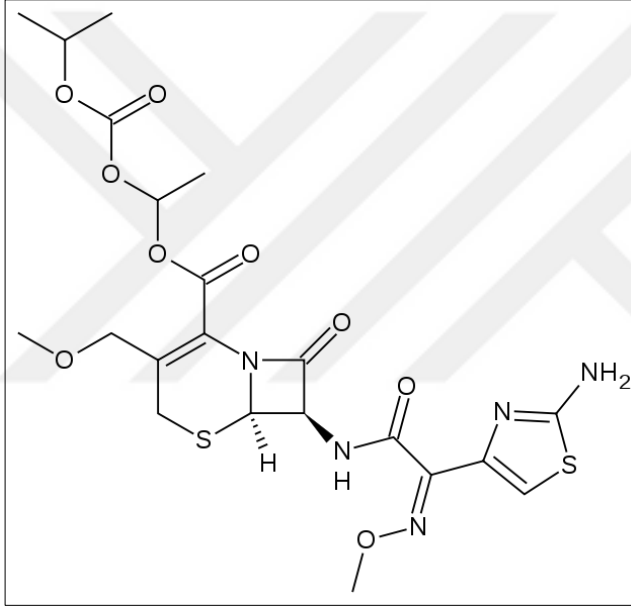
Yapılan literatür taramasında Sefazolin yüklü kitosan nanoparçacıkların çoklu ilaç dirençli Gram-negatif bakterilerle yapılan çalışmada kitosanın, antimikrobiyel aktivitesi ve biyoyumluluğuna bağlı olarak antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaları hedef alabilen potansiyel bir taşıyıcı sistem olabileceği gösterilmiştir (Jamil et al., 2016).

Tez çalışmamızda, ilaç taşıyıcı sistemlerden birisi olan kitosan nanoparçacıkları iyonik jelasyon yöntemiyle sentezlenmiş ve enfeksiyon tedavi edici etkisi bilinen Sefpodoksim Proksetil antibiyotiği kitosan nanoparçacıklarına yüklenmiş ve ^{99m}Tc ile işaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacıkların karakterizasyon çalışmaları DLS, SEM ve FT-IR ile gerçekleştirilmiştir. İlaç yükleme verimi UV spektroskopisi ile belirlenmiştir. Nanoparçacıkların fosfat tamponunda stabilite çalışması yapılmıştır. Radyoişaretli antibiyotik yüklü kitosan nanoparçacıkların *in vitro* bakteri tutulumu Gram pozitif *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve Gram negatif *Escherichia coli* (*E. coli*) standart suşlarında çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre radyoişaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların enfeksiyon tespitinde potansiyel bir nükleer görüntüleme ajanı olabileceği görülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sefpodoksim Proksetil

Sefpodoksim Proksetil (CP), oral olarak kullanılan geniş spektrumlu, yarı-sentetik üçüncü kuşak sefalosporin grubu bir antibiyotiktir. Kimyasal adı (RS) -1 (izopropoksi karbonil oksi) etil (+) - (6R, 7R) -7- [2- (2-amino-4-tiyazolil) -2 - {(Z) metoksimino} asetamido] -3 -metoksimetil-8-okso-5-tiya-1-azabisiklo [4.2.0] okt-2-en-2-karboksilat dır. Moleküler formülü $C_{21}H_{27}N_5O_9S_2$ ve yapısal formülü Şekil 2.1 deki gibidir.



Şekil 2.1 Sefpodoksim Proksetil'in kimyasal yapısı

Sefpodoksim proksetil bir ön ilaç olup aktif metaboliti sefpodoksimidir (Borin,1991). Sefpodoksim proksetil, ön-ilaç esteri, aktif metabolitine *in vivo* hidrolize edilmesine rağmen, sefpodoksim ana molekül sefpodoksim asidinin geçirgenliğini ve dolayısıyla biyoyararlanımını geliştirmek için tasarlanmıştır. Bu ön ilaç oral yolla kullanıldığında sefpodoksime hidrolize edilir. İnsanda Sefpodoksime hidrolize ediliyor olmasına rağmen CP'nin maksimum biyoyararlanımı 130 mg'lık bir tablet (eşdeğer 100 mg Sefpodoksim) için maksimum % 50'dir (Patil and Talele, 2014).

Çözünürlük ve geçirgenlik özellikleri, biyoyararlanımı etkileyen en önemli parametrelerdir. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS), suda çözünebilirliklerine ve bağırsak geçirgenliğine bağlı olarak ilaç maddelerinin sınıflandırılması için bilimsel bir çerçevedir. Sefpodoksim Proksetil, suda zayıf bir çözünürlüğe ve düşük geçirgenliğe sahip BCS IV. sınıf bir ilaçtır (Sugimoto et al., 1998). Suda çözünürlüğü az olan ilaçlar, oral yoldan verildiğinde düşük biyoyararlanım gösterirler. CP'nin çözünürlüğü ise bulunduğu ortamın pH değerine bağlı olarak değişmektedir. Sefpodoksim Proksetil'in düşük oral biyoyararlanımının nedenleri esas olarak suda düşük çözünürlüğü (400 µg/ml), özellikle asidik ortamlarda) Sefpodoksim Proksetil'in tipik jelleşme meydana gelmesi olarak görülmektedir (Khan et al., 2010). Sefpodoksim Proksetil, asidik pH'da yüksek çözünürlüğe sahipken ortamın pH değeri arttıkça çözünürlüğü azalmaktadır (Kakumanu et al., 2006).

Sefpodoksim Proksetil, insanlarda minimal metabolizmaya uğrar. Emilmeyen ilaç vücuttan dışkı yoluyla dışarı atılır (Borin,1991). CP, hızlıca absorbe olmakta ve kanda maksimum derişime 1.5-4.0 saat arasında erişmektedir. Sefpodoksim, serumda % 22 ila % 33 ve plazmada % 21 ila % 29 arasında gibi düşük miktarlarda proteinlere bağlanmaktadır (İnfex ilaç prospektüsü, 2018). Bu durumda CP'in kılcal damarlar arasında kolaylıkla dokulara aktarılması gerektiğini düşündürmektedir.

Sefpodoksim Proksetil birçok Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı etkilidir. Sefpodoksim Proksetil hücre duvarı sentezinin inhibisyonu yoluyla bakterisid etki gösterir ve beta-laktamazlara karşı oldukça dayanıklıdır (Löbenberg and Amidon, 2000). Sefpodoksim, penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanarak hücre duvarı stabilitesinden sorumlu trans peptidaz enziminin aktivitesini bloke eder, böylece hücre duvarı sentezi yapılamayan bakteri ölür (Yokota et al., 1988). CP'in vücutta, *in vitro* ve klinik enfeksiyonlarda aşağıdaki mikroorganizmalara karşı aktif olduğu gösterilmiştir (İnfex ilaç prospektüsü, 2018).

Gram-pozitif bakteriler:

Staphylococcus aureus (penisilinaz üretenler de dahil olmak üzere metisiline duyarlı suşlar)

Staphylococcus saprophyticus

Streptococcus pneumoniae (penisilin dirençli izolatlar hariç)

Streptococcus pyogenes

Gram-negatif bakteriler:

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Proteus mirabilis

Haemophilus influenzae (beta laktamaz üreten izolatlar dahil)

Moraxella catarrhalis

Neisseria gonorrhoeae (penisilinaz üreten izolatlar dahil)

CP, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 izolatlarına karşı 0.25 ila 1 µg/mL, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213 izolatlarına karşı 1 ila 8 µg/mL değerlerinde minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) sergilemektedir (Wiedemann et al., 1991). Genellikle deri, solunum yolu, idrar yolu ve sistemik enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonların tedavisinde ve ayrıca orta kulak iltihabı, farenjit ve sinüzitin tedavisinde de kullanılır. Türkiyede CP etken maddesi içeren antibiyotikler Seftech, İnfex, Texef, Sefpotec, Sefbitor, Sefsidal, Sedox, Orelox, Cruter, Dokselin, Ecsery'dir.

Antimikrobiyal aktiviteyi korumak için, kısa yarı ömürlü geleneksel antibiyotik formülasyonlarının sık uygulanması gereklidir. Aksi halde, anti-enfektif tedavi sırasında antibiyotik direncini uyararak MİK altında konsantrasyon sıklıkla görülür. Uzun bir süre boyunca MİK üzerinde sabit bir plazma ilaç konsantrasyonunu koruyarak, uzatılmış salımlı dozaj formları, antibiyotiklerin antibiyotik direncini en aza indirirken terapötik etkisini en üst düzeye çıkarır. Uzatılmış salımlı formülasyonun bir başka avantajı, hasta uyumluluğunun iyileştirilmesidir. Sefpodoksim Proksetil'in etkinliğini arttırmak için doz sıklığını tek bir doz olarak azaltan ve hasta uyumunu arttıran, sürekli ve uzatılmış bir salım dozaj formunu formüle etmeye yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

2.2 Kitosan

İlk olarak kitosan, 1859 yılında Rouget tarafından doğal bir polimer olan kitinin deasetillenmiş şekli olarak keşfedilmiştir (Raafat, 2009). 1950'de kitosan, glukosamin polimeri olduğu tespit edilmiş ve kitin yapısı incelendiğinde selüloz modeline benzer yapıda olduğu ortaya konulmuştur (Muzzarelli, 1977). 1960'lı yılların başlarında kitosanın kırmızı kan hücrelerine bağlama kapasitesi çalışmaları yapılmıştır. 1990'lı yıllarda boyut küçültme çalışmaları ile mikro ve nano boyutta kitosan elde edilmiştir. Araştırmacıların ve sanayicilerin, kitosanın yeni bir terapötik sistem oluşturma konusunda ortaya koyduğu yararları dikkatlerini çekmiş ve kitosan ilaç alanına girmiştir (Akbar and Shakeel, 2018). Kitosanın ortaya koyduğu yararlar, kitosan çalışmalarına olan ilgiyi arttırmıştır.

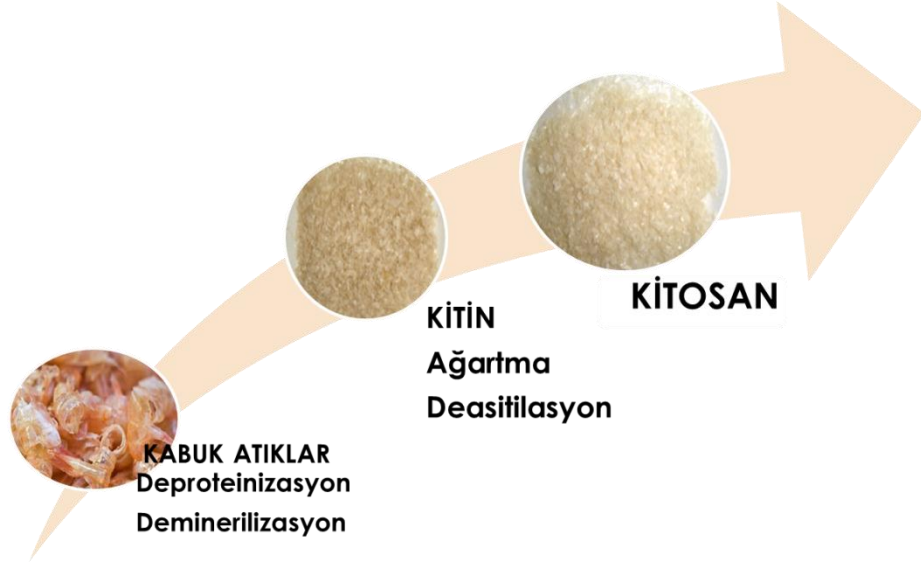
Başlangıçta kitosan genellikle yara pansumanı, zayıflama ve doku mühendisliği gibi medikal uygulamalarda kullanılmıştır. Ancak kitosan ilaç taşıyıcı sistemi olarak da önde gelen adaylardan biri olmaktadır. Kitosan, toksik olmayan yenilenebilir kaynaklardan türetilmiştir. Biyouyumlu ve etkili bir malzemedir. Kitosan; antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, düşük immünojenitesi, olağanüstü biyouyumluluğu ve biyo-bozunabilirliği sebebiyle birçok alanda gelişmelere fırsat sağlamıştır (Akbar and Shakeel, 2018). Kitosanın muko-yapışkanlık özelliği gibi diğer biyolojik özellikleri, kontrollü ilaç verme, gen transferi, efflux pompa inhibisyonu vb amin grubunun varlığının sonucudur. Amino gruplarının olması kitosanı modifikasyon için uygun hale getirir. Biyolojik

yapışkanlık gibi özelliği, polimerin ortopedi, diş hekimliği, oftalmoloji ve cerrahi yöntemlerde birçok uygulamada yer almakta ve yumuşak/sert dokuların yapışmasını sağlamaktadır (Magetsari et al., 2014; Needleman et al., 1997; Felt et al., 1999).

Kitosan, dünyada selülozdan sonra en bol biyopolimer olan kitin'den üretilir. Kitin, deniz yosunları, eklem bacaklılar, solucan, bakteri, mantar, böcekler, yengeç, ıstakoz, karides ve benzeri kabuklu deniz canlılarından üretilen, yapısı selüloza benzer yapıya sahip yenilenebilir bir maddedir.

Selülozun yapısında OH (hidroksil) grubunun yerine, kitinde asetemido grubu (NHCH₃CO) yer alırken, kitosanda NH₂ amin grubu bulunmaktadır. Amin grupları, kitosani kimyasal modifikasyon için uygun hale getirir. Kitinin çözünürlüğü oldukça sınırlıdır. Kuvvetli çözücülerle ancak çözünebilmekte ve toksik etki gösterebilmektedir. Kitosan ise formik, sitrik veya asetik asitin seyreltik çözeltilerinde çözünür. Çalışmalarda daha çok asetik asit çözeltisi kullanılmış ve toksik etki göstermediği saptanmıştır (Rao et al.,2005-2006).

Deniz canlılarının atık kabuklarında bulunan kitinin uzaklaştırılması ile kitinden kitosan üretimi yapılmaktadır. Deproteinizasyon işleminde sodyum hidroksit (NaOH) ile proteinler uzaklaştırılmakta, demineralizasyon aşamasında hidroklorik asit (HCl) ile kalsiyum karbonat (CaCO₂) kalsiyum klorür (CaCl₂) oluşturulmaktadır. Aseton ile ağartma işlemi sonucu beyaz kitin tozları elde edilebilmektedir. Deasetilasyon ise kitinin yapısındaki aminoasetil gruplarından asetil grubunun sodyum hidroksit (NaOH) ve potasyum hidroksit (KOH) ile uzaklaştırılarak kitosana dönüştürülmektedir (Gökçe, 2008).



Şekil 2.2 Kitinden kitosan üretimi

2.2.1 Kitosanın fiziksel özellikleri

Kitosan, kitinden deasetillenmesi işlemi ile elde edilmesinin sonucu olarak % 40-100 aralığında değişen deasetilasyon dereceleri (DD) farklılık gösterebilmektedir. Kitin, serbest amin formunun yaklaşık % 50'sine deasetillenmesi sonucunda kitosan olarak adlandırılır. Kitosanın özellikleri büyük ölçüde kompozisyonu ve moleküler ağırlığı tarafından etkilenmiştir (Ruel Gariepy et al, 2006).

Kitosan, molekül ağırlığı 50–2000 kDa arasında değişmekte ve molekül ağırlıklarına göre düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan diye sınıflandırılmaktadırlar. Molekül ağırlığı 50-150 kDa olanlar düşük molekül ağırlıklı (LMW), 150-700 kDa olanlar orta molekül ağırlıklı (MMW) ve 700-2000 kDa olanlar ise yüksek molekül ağırlıklı (HMW) olarak sınıflandırılmaktadırlar. (Gökçe, 2008).

Guo et al, (2008), yaptıkları çalışmada; yüksek molekül ağırlıklı kitosanın hücre duvarı üzerine adsorbe olarak inhibitör etki gösterdiğini, düşük moleküler ağırlıklı kitosanın ise hücre içine girerek inhibitör etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ancak kitosanın bakterisidal aktivitesi ile kitosanın molekül ağırlığı arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiş olsada

sonuç olarak düşük moleküler ağırlıklı kitosanların (<10 kDa) bakteri, maya ve küflere karşı inhibitör aktivitesinin daha iyi olduğu kabul edilmiştir (Tikhonov et al., 2006; Aider, 2010).

Viskozitesi 2000 cP (centi poise)'den küçüktür (LMW 20-300 cP, MMW 300-800 cP- HMW 800-2000 cP). Yüksek yağ ve su bağlama kapasitesine sahiptir. Yağ bağlama kapasitesi % 314-535 ve su bağlama kapasitesi % 450-1150 aralığındadır. Kitosanın rengi donuk sarı-beyazdır.

2.2.2 Kitosanın kimyasal özellikleri

Çoğu kitosan türü nötral ve alkali pH daki, sulu çözücülerde çözünmez. Ancak pH <6.5 olan asidik sulu çözeltilerde çözülebilir. Çözünürlük deasetilasyon derecesine (DD), molekül ağırlığına, asitin cinsine çözücünün derişimine ve pH'ye bağlı olarak değişmektedir. DD arttıkça ve MW azaldıkça çözünürlük artmaktadır. Asit derişiminin artması ile çözünürlük artmaktadır.

Kitosanın; kitin ve selülozdan farklı olarak sahip olduğu amin grubu çözünme sırasında protonlanır (Lee et al., 2004). Böylece pH değeri 6.5'dan küçük olması durumunda kitosan pozitif yüklenir ve çeşitli negatif yüklü diğer yüzeylerle etkileşime girebilir. Bu özellik kitosanın katyonik polisakkarit olduğunu göstermektedir. Kitosan ayrıca, özelliklerini değiştirmek için kullanılabilir hem amino hem de hidroksil gruplarına sahiptir (Ruel Garipey et al, 2006). Kitosanın modifikasyonunu uygun hale getiren amino gruplarına sahip olması ve pozitif yüklü hidrofilik bir polimer olması onu diğer polimerlerden ayıran öne çıkaran özelliklerindedir. Pozitif yüklü kitosan, negatif yüklü metal iyonlara, proteinlere, makro moleküllere, yağlara, lipidlere ve kolestrole bağlanabilir. Negatif yüklü polimerlerle matris oluşumu gerçekleştirebilir. Nanoparçacık hazırlamak kolay olabilmektedir.

2.2.3 Kitosanın biyolojik özellikleri

Kitosan, toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanmayan, vücut içerisinde zararsız ürünlere parçalanmayan, herhangi bir yan

etki göstermeyen biyouyumlu, biyobozunur, hemostatik, antitümör, antiülser, antikolestromik, antioksidant, antibakteriyel, antifungal ve antimikrobiyal etkisi olan, mukoadheziv, yenilenebilir özellikte doğal bir polimerdir.

Tüm bu özellikleri ile birlikte katyonik polimer olup negatif yüklü yüzeyler ile kolayca etkileşim yapabilmesi, diğer materyallerle kompozit oluşturabilmesi, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlaması, çözünmesi için zararlı organik çözücülere gerek duyulmaması, kolay mikro ve nanoparçacık hazırlanabilme gibi özellikleriyle birçok endüstriyel uygulamada kullanıma sahiptir.

2.3 Kitosanın Kullanım Alanları

Biyomedikal alanda, ilaç salım sistemleri, antitümör özelliğiyle kanser tedavi uygulamaları, cerrahi dikişler, kemik iyileştirici, yara iyileştirici, hemostatik özelliğiyle ise pıhtılaşma etki çalışmaları yapılmaktadır. Kitosanın yara iyileştirici özeliğide vardır. Kitosan, negatif yüklü heparin ile boncuk, jel, film ve fiber oluşturarak kararlı bir bileşik oluşturur. Bu şekilde hazırlanan sargı bezi veya yara bandı gibi ürünler epitel dokunun iyileşme sürecini hızlandırarak medikal alanda kullanılmaktadır. CS'nın biyolojik olarak uyumlu olması nedeniyle, bu tür inorganik kompozit materyaller optik sensörlerin, biyo etiketlemenin, biyo-görüntülemenin ve kanser araştırmalarında etkin bir şekilde kullanılabilir (Agrawal et al., 2010).

Van der Lubben (2001) ve arkadaşları, kitosanın muko-yapışkan olma özelliğini değerlendirerek moleküllerle sıkı bağlar kurabilen aşuların mukozal yoldan iletilmesini sağlayan çalışımlar yapmışlar (Van der Lubben et al., 2001). Daha yakın zamanlarda, Feng ve arkadaşları (2015), kitosan/TPP nanoparçacıklarının mukozaya yapışabilmesinin, mukozal bir yüzey üzerinde doksorubisin (DOX) gibi ilaçların yüklenmesine yardımcı olduğunu göstermiştir (Feng et al., 2015). DNA plazmidleri ile yüklü kitosan mikroparçacıkların farelerde koruyucu bağışıklık tepkileri oluşturduğu bildirilmiştir (Roy et al., 1999; Kumar et al, 2002). Kitosan nanoparçacıkları ilaç taşıyıcı sistem olarak sentezlenmiştir (Janes et al., 2001; De Campos et al., 2001; Xu et al., 2003).

İnsülin yüklü kitosan nanoparçacıkların insülinin bağırsak emilimini artırarak farmakolojik biyoyararlanımını arttırabildiği görülmüştür (Pan et al., 2002). Kitosan nanoparçacıkları hücrelerde gen transfer verimliliğini arttırmak için bir gen taşıyıcı sistem olarak da kullanılmıştır (Mao et al, 2001; Kim et al, 2004). Kitosan mikroküreleri, mide ilacı dağıtımı için kullanılmıştır ve mide boşluğunda amoksisilin ve metronidazol gibi aktif antimikrobiyal maddelerin kontrollü salımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Portero et al., 2002).

Biyoteknoloji alanında hücre immobilizasyonu, enzim immobilizasyonu, protein ayrılması çalışmaları yapılmıştır.

Gıda endüstrisinde, antibakteriyal, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, film oluşturma, su bağlama kapasitesi, yağ bağlama kapasitesi gibi aranan özellikleriyle kitosan geniş yer almaktadır. İçeceklerin durultulması, besin koruması, besleyici ilaç, boyar maddenin uzaklaştırılması uygulamaları yapılmaktadır. Gıda kaplama uygulamalarında kitosan film oluşturarak hücre dışı solunumu yavaşlatarak ve besinlerin raf ömrü uzatılmaktadır. Yağ tutma kapasitesi ile anti kolesterol özelliği, karaciğerden ve kandan yağları kolesterolü uzaklaştırmakta aynı zamanda kilo kontrol amaçlı diyet ilacı olarak kullanılmaktadır (Muzarelli, 1996).

Metal iyonlarının uzaklaştırılması, protein, boya, aminoasit, organik bileşikler tutulması ile atık su iyileştirme alanında kullanılmaktadır (Gökçe, 2008).

Kitosanın yapısında bulunan amino ve karboksilik grupları, nükleer atıklardan uranyumu adsorplayarak radyoaktif atıklar uzaklaştırılmakta ve böylece zararlı etkilerin azaltılması ve çevrenin korunması sağlanmaktadır (Işık, 2017).

2.4 Nanoparçacıklar

Çapı 10-1000 nm arasında değişen parçacıklar nanoparçacık olarak adlandırılmaktadır. Nanoparçacıklar, birçok ilacı küçük boyutları ve gözenekli yapıları nedeniyle adsorbe edebilmektedir (Garg et al., 2011).

Farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerini değiştirerek küçük ve büyük moleküllerin taşınması için hedefli dağıtım sistemi olarak kullanılmaktadırlar. Nanoparçacıklar, ilaç taşınımı, doku hedefleme, kanser tedavisi, teşhis ve görüntüleme ajanı amacı gibi çeşitli faydalı amaçlar için araştırılmış ve formüle edilmiştir. Terapötik etkiye sahip olan ve yan etkiyi azaltan farklı polimerlerden hazırlanmıştır (Garg et al., 2011). Hidrofobik ilaçların çözünürlüğünün artırılması, ilacın tümör bölgesinde artan konsantrasyonda taşınımını ve immünojenisitenin azaltılması gibi çeşitli avantajlar sergilediği bilinmektedir.

Birçok araştırmacı, mevcut nanoparçacık sentez yöntemlerinin en büyük dezavantajının, toksisiteyi arttıran kimyasal indirgeme ve dengeleyici ajanlar kullanımı olduğuna değinmektedirler (Huang and Yang, 2004). Bu dezavantaj çevre dostu kitosan kullanımı ile aşılmaktadır. Kitosan, kimyasal indirgeme yöntemlerinden tercih edilen “Yeşil Sentez” prensipleri içerisinde olup diğer sert kimyasalların indirgeyici ve stabilize edici ajanların kullanılması önlenmiş olur. (Huang and Yang, 2004). Kitosanın biyopolimer yapısı ve biyoyumluluğu nanoteknoloji alanında çok dikkat çekmiştir.

2.5 Kitosan Nanoparçacıkları

Araştırmacılar, doğada bol miktarda bulunan doğal polimer kitosanın sahip olduğu üstün özelliklerinden en verimli şekilde yararlanabilmek için boyut küçültme çalışmalarına yönelmişlerdir. Kitosan parçacıklarının boyutu küçüldükçe sahip olduğu antibakteriyel etki, adsorpsiyon kapasitesi, ilaç salım kapasitesi, antitümör etkisi, biyodağılım gibi özelliklerinde artış gözlemlenmiştir.

Hu ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan çalışmalarında, 10-100 nm aralığında kitosan nanoparçacıkları (CSNP) sentezlemişler ve bu nanoparçacıkları, adsorplayıcı olarak kullanmışlardır. Nanoparçacıklardaki adsorplama kapasitesinin, mikroboyutlu kitosana göre oldukça fazla olduğunu vurgulamışlardır (Hu e al., 2006).

Kitosan nanoparçacıklar, makro ölçekli kitosana kıyasla daha yüksek yüzey alanı nedeniyle üstün antibakteriyel aktivite sergilemektedir (Neves et al., 2014).

Qi ve arkadaşları, CSNP'nin antibakteriyel özelliklerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışma CSNP'in ve bakır yüklü CSNP'in, çeşitli mikroorganizmaların gelişimini belirgin bir şekilde inhibe edebildiğini ve kitosanın kendisinden veya doksisisiklin'den daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterebildiğini göstermektedir. Kitosan nanoparçacıklarının yüksek antibakteriyel aktiviteleri ve kabul edilebilir biyolojik uyumlulukları ile tıpta antimikrobiyal ajanlar olarak geniş ölçüde uygulanabileceğini bildirmişlerdir (Qi et al., 2004).

Jamil ve arkadaşları, 2016 yılında yaptıkları çalışmalarında *Escherichia coli*'ye karşı sefazolin yüklü CSNP'lerin yüksek antimikrobiyal potansiyel gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kitosanın yüksek antimikrobiyal aktivitesi ve biyoyumluluğu nedeniyle Gram-negatif patojenlerin neden olduğu dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için mikroorganizmaları hedef alabilen potansiyel bir taşıyıcı sistem olabileceğini doğrulanmıştır (Jamil et al., 2016).

2.5.1 Kitosan nanoparçacık hazırlama yöntemleri

CSNP sentezi, iyonik jelasyon, ters misel yöntemi, spreylendirme yöntemi, emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi, çöktürme/toplanma yöntemi, emülsiyon damlacık birleşme yöntemi gibi farklı yöntemler ile gerçekleştirilmektedir.

2.5.1.1 İyonik jelasyon yöntemi

Birçok araştırmacı, tripolifosfatın (TPP) jelleştirici ajan olarak kullanıldığı boyut ayarlanabilen CSNP'ler yapmak için iyonik jelasyon yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem kimyasalların toksik etkileri ve diğer istenmeyen etkilerinden kaçınmak için kimyasal çapraz-bağlayıcılar yerine, kitosan ile elektrostatik etkileşimler ile fiziksel bağlanan çapraz-bağlayıcıların genellikle TPP'nin kullanıldığı uygulaması kolay bir yöntemdir. Deneysel olarak, bu yöntemde CSNP'ler asidik bir kitosan çözeltisi ile bir bazik TPP çözeltisi ilave edilerek sentezlenir. Çözeltilerin karıştırılmasından sonra, CSNP'ler, TPP

fosfatları ve CS amino grupları arasında oluşturulan inter ve intra moleküler bağlar yoluyla hemen oluşur (Gökçe, 2008).

2.5.2 Kitosanın nanoparçacıkların antibakteriyel aktivitesi

Hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımında belirgin bir artış olmuş ve antibiyotiğe dirençli bakterilerin artmasına neden olmuştur. Bu nedenle, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi antibiyotiklere direnç gelişmesinden kaçınan, antibakteriyel etki gösteren sistemler, yüksek talep görmektedir.

Kitosanın en önemli özelliklerinden biri, polikasyonik doğasına ve antibakteriyel davranışlarına dayanmaktadır. Kitosanın, biyopolimer olması diğer antibakteriyel ajanlara kıyasla oldukça cazip hale getirir (Marpu et al, 2018). Kitosan, çok çeşitli bakterilerin büyümesini inhibe eder (Fei et al, 2001). Diğer dezenfektanlarla karşılaştırıldığında, kitosan, daha geniş aralıktaki bakteri çeşidini öldürme, daha yüksek ölüm oranları ve memeli hücrelerine karşı daha düşük toksisite gibi birçok avantaj sergiler (Fei et al, 2001).

Kitosanın antibakteriyel aktivitesi için önerilen birkaç mekanizma vardır. Bunlardan ilki bakterilerin hücre yüzeyindeki (Sudarshan et al, 1992; Fei et al, 2001) makromoleküllerin negatif yüklü kalıntılarına müdahale eden kitosanın polikasyonik doğasını içerir. Diğer mekanizma ise kitosan ile DNA'nın bağlanarak mRNA sentezini inhibe etmesidir (Sudarshan et al, 1992). Pek çok araştırmacı, molar kütlesi, pozitif yük yoğunluğu, hidrofilitik/hidrofobiklik, iyonik güç, zaman ve sıcaklık gibi diğer faktörlerin de kitosanın antibakteriyel aktivitesini etkilediğine karar vermiştir (Kong et al, 2010).

Çoğu bakteriyel ajan, antibakteriyel davranışı sergilemek için suya ihtiyaç duyduğundan hidrofilitik özelliğe sahip olması antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde öneme sahiptir. Kitosanın suda zayıf çözünürlüğü kullanılmasını kısıtlayabilir. Bu nedenle, kitosanı kimyasal olarak suda daha fazla çözünür hale getirmek için yapılan çalışmalar, antibakteriyel ajan olarak kullanımını genişletmektedir. Kitosanın antibakteriyel davranışının da pH ve iyonik güçten etkilendiği bulunmuştur (Kong et al, 2010).

Antibakteriyel aktivite kitosan, kitosan tipini, kitosan polimerizasyonunun derecesini ve diğer fizikokimyasal özelliklerinin bazılarını içeren bir dizi faktörden etkilenir (Qi, 2004). Kitosanın antibakteriyel aktivitesi de moleküler ağırlığına ve çözeltisine bağlıdır (Jia et al., 2001). Bununla birlikte daha düşük pH değerlerinde daha yüksek antibakteriyel aktivite göstermektedir (No et al., 2002).

Kitosan çözeltileri, genellikle polimerin katyonikliğine atfedilen, bakterisidal ve bakteriyostatik özellikler sergilerler. Pozitif yüklü polimerik zincirler, membran duvar geçirgenliğindeki değişiklikleri indükleyerek bakteri yüzeyine yapışarak mikroorganizmaların büyümesine engel olurlar (Goy et al., 2009). Nanoparçacıkların küçük boyutları kitosan nanoparçacıkların daha üstün aktiviteler göstermesini sağlayabilir. Son zamanlarda, sayısız araştırmacının dikkati antibakteriyel özelliklere sahip kitosan nanoparçacıklar sentezlemek yönünde artmıştır ve bu özelliklerin, nanoparçacıklar kullanıldığında korunup korunmadığını doğrulamak için çeşitli çalışmalar yapmışlardır.

Wazed ve arkadaşları, 2010 yılında yaptıkları çalışmada *S. aureus* bakterisine karşı iyonik jelyasyon yöntemiyle kitosan nanoparçacıkları hazırlayarak antimikrobiyal aktivitesinin, kitosanın antimikrobiyal aktivitesinden çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Wazed ve arkadaşları nanoparçacık büyüklüğünün antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkisini incelemişler ve en küçük nanoparçacıkların (yaklaşık 100 nm) pH 5.5–6.0 değerlerinde maksimuma çıktığını göstermişlerdir (Wazed et al., 2010).

2.6 Enfeksiyon Tespitinde Nükleer Görüntüleme Yöntemleri ve Kullanılan Radyofarmosötikler

Antibiyotiklerin geliştirdikleri direnç mekanizmaları sebebiyle antibakteriyel çalışmalar daha fazla ivme kazanmıştır. Mikroorganizmaların kazandıkları direnç sebebiyle araştırmacılar bakteriyel enfeksiyonların teşhis ve tedavisi için daha etkili yeni bileşiklerin tasarlanması ve sentezlenmesi çalışmalarına yönelmektedir.

Nükleer görüntüleme yöntemleri ile vücutta enfeksiyonun yerinin tespiti ve enfeksiyonun enflamasyondan ayırt edilebilmesi mümkündür. Nükleer tıp alanındaki araştırma alanlarından biri, insanlarda enfeksiyon ve inflamasyonun görüntülenmesi için yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesidir (Yurt Lambrechth, 2010).

Nükleer tıpta teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan yapısında radyoaktif bir izotop ve biyoaktif molekül (farmasötik) içeren kimyasal maddelere radyofarmasötik denir. Nükleer tıpta 100'e yakın radyofarmasötik bulunmaktadır. Radyofarmasötiklerin % 95'i teşhis amaçlı kullanılırken % 5'i tedavi için kullanılmaktadır. Hastaya verilen radyofarmasötiklerin radyoizotop (radyonüklid) kısmı yayınladığı radyasyon ile vücut dışından izlenebilmesini veya vücut içinde bulunduğu dokuyu tedavi edilmesini, biyoaktif molekül kısmı ise bileşiğin hedeflenen organ ya da dokuya giderek tutulumunu sağlamaktadır (Yurt Lambrechth, 2010).

Radyofarmasötikler kullanılarak yapılan nükleer tıp çalışmaları, pek çok klinik vakaların aydınlatılmasında önemli role sahiptir (Gündoğdu, 2018). Bu nedenle nükleer görüntüleme yöntemlerinin avantajlarını daha fazla uygulayabilmek için yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar önem kazanmaktadır.

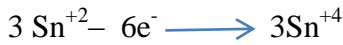
Teşhis amaçlı kullanılan radyonüklidler, pozitron veya gama fotonu yayınlamalarıdır. Antibiyotikler, kanser ilaçları, antikorlar, lökositler, antimikrobiyal peptidler ve kemotaktik peptidler (^{68}Ga , ^{13}N , ^{11}C , ^{15}O , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{18}F , ^{131}I , ^{123}I , ^{201}Tl gibi) farklı radyonüklidlerle işaretlenerek yeni radyofarmasötiklerin görüntüleme potansiyelleri ile ilgili araştırmalar yapılmıştır. Uygun özelliklere sahip olması nedeniyle $^{99\text{m}}\text{Tc}$ teşhis amaçlı kullanılan başlıca radyonüklidlerden biridir (Alberto et al., 1999; Yurt Lambrechth, 2010).

Enfeksiyonun vücudun hangi kısmında lokalize olduğunu ayırt edebilmek hayat kurtarıcı öneme sahiptir. Aynı zamanda hastalığın erken aşamasında, enfeksiyonun tanımlanması iyi bir sonuç için önemlidir. Radyoışaretli antibiyotikler belirli bir bakteriyel bileşene hızlı bir şekilde bağlanabilen,

enfeksiyon lezyonların saptanması için gelecek vaat eden bir tanı radyofarmasötiği olarak ortaya çıkmaktadırlar (Singh et al., 2005 ; Yurt Lambrecht, 2010). Enfeksiyon görüntülemesinde de ^{99m}Tc işaretli antibiyotikler yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir.

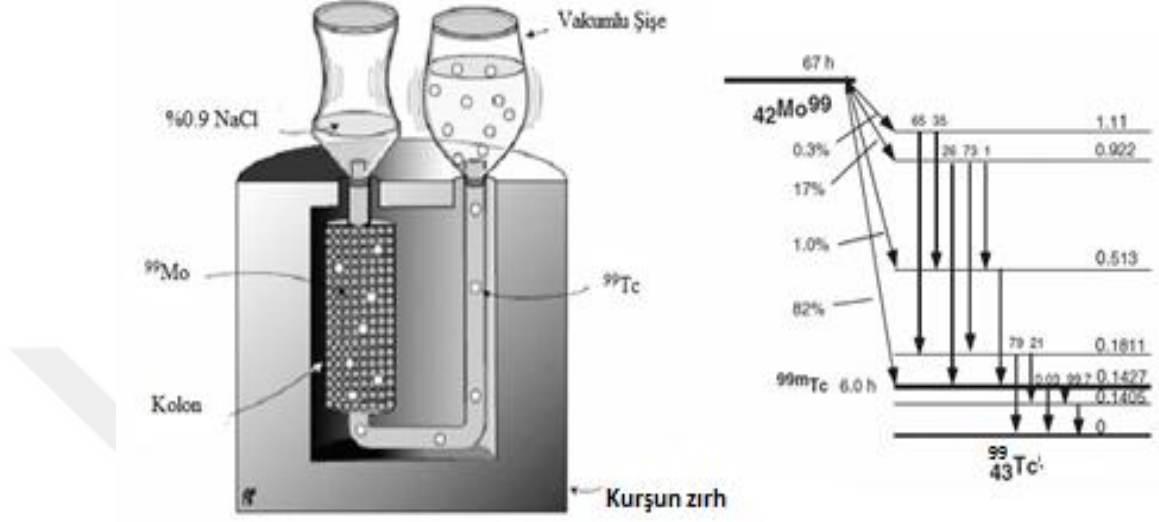
2.7 Teknesyumun Kimyası

Teknesyum, 1937 yılında İtalyan bilim adamları Carlo Perrier ve Emilio Segrè tarafından Molibdenin siklotron molibdenin döteryum ile ışınlanması sonucu elde edilmiştir. ^{98}Mo bir nötron yakalayarak ^{99}Mo 'a dönüşür. ^{99}Mo , beta (β^-) ve gama (γ) ışınması bozunumunu yaparak, Teknesyum-99m (^{99m}Tc)'e dönüşür. Teknesyum, gümüş-gri renkte olan yapay bir elementtir. Teknesyum elementi 43 atom numarasıyla periyodik cetvelde VII B grubunda yerini almaktadır. Teknesyumun -1'den +7'ye kadar 8 yükseltgenme basamağı bulunmaktadır. Tc +7 ve +4 değerliği en stabil hali olup, düşük oksidasyon durumları -1, +1, +2 ve +3 değerleride normalde stabildir. Teknesyumun genel olarak perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) şeklinde bulunan yapısında +7 değerliklidir (Campbell et al., 1959 ; Abram and Alberto, 2006). +7 yükseltgenme basamağında ligandlarla kompleks oluşturamayan sodyum perteknetatın daha düşük oksidasyon düzeylerine indirgenmesi gerekmektedir. Bunun için kalay klorür, kalay sitrat, kalay tartarat, konsantre HCl, sodyum borhidrit, ditionit, demir sülfat gibi indirgen ajanlar kullanılır (Maina et al., 1994). İndirgen ajan olarak en çok kalay klorür kullanılmaktadır. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 'in kalay klorür ile asidik ortamda indirgenmesi aşağıdaki reaksiyonda gösterilmektedir.



^{99}Mo 'in beta (β^-) bozunma ürünü olan ^{99m}Tc , sodyum perteknetat ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) formunda $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratöründen steril ve ajirojen olarak kolaylıkla sağlanmaktadır. Sahip olduğu 6,02 saatlik kısa yarı ömrü ve 140 keV'lik

uygun gama enerjisiyle sintigrafik görüntülemeler için uygun rezülasyona sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı klinik çalışmalarda en çok tercih edilen radyonüklid olmuştur (Abram and Alberto, 2006).



Şekil 2.3 $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü

2.7.1 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü

2.7.1.1 İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC)

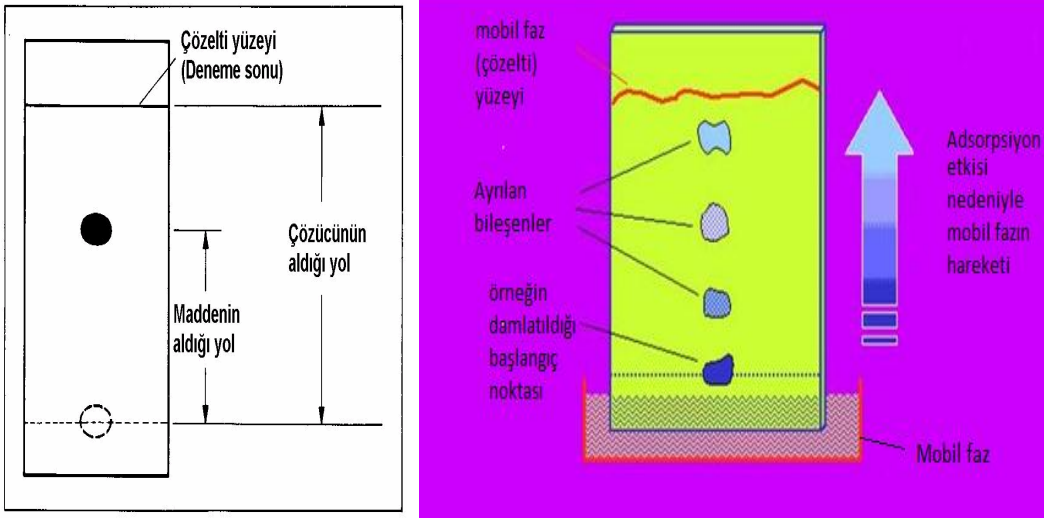
Radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığını, radyofarmasötüğün uygulanmasından sonra biyolojik davranışlarını saptayabilmek ve bununla beraber araştırmanın başarısı ve hastaya verilen doz açısından oldukça önemlidir. TLRC, radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığın saptanması için çok kullanılan bir kalite kontrol yöntemidir.

Kromatografi, bir karışımda analiz edilecek bileşenlerin birbirinden ayırmak veya saflaştırılmak için biri sabit (durgun) diğeri hareketli (mobil) faz kullanılan bir yöntemdir (Dekker and Jonsson, 1987). Burada çözgen hareketli, absorban ise sabit fazdır. TLRC için destek maddesi alüminyum, plastik, cam, absorban maddesi de selüloz, silika jel ve alüminyum oksitler olabilen tabakalar kullanılır. Hareketli faz olarak asetik asit, su, metanol, aseton, dietil eter, kloroform, metilen

klorür, hekzan, nbütanol, asetonitril, izopropil alkol gibi organik çözümler kullanılır. Bu tabakaya alttan 1 cm den noktaya örnek damlatılır. Bu şerit içinde uygun bir çözümler bulunan tank içerisine batırılır. Burada tabaka, sabit faz ve plakanın daldırıldığı tabakayı kılcal hareketle yukarı doğru hareket ettiren çözümler hareketli fazdır. Çözümler, çözümlenebilen radyofarmasötiklerin absorban boyunca ilerlemesini sağlarken, sabit fazın elektrostatik çekim kuvvetleri ise çeşitli radyokimyasal özelliklerin ilerlemesini geçiktirir. Radyokimyasallar farklı çözümlenebilirliğe sahip olmasından dolayı hareketli fazda farklı hızlarda ilerlerler. Böylece saf radyofarmasötik ve radyokimyasal safsızlıklar ayrılmış olur. Tanktaki çözümlerinin tabakanın yaklaşık % 90 kadar ilerlemesinden sonra çıkarılır. Çözümlerden, çıkarılan tabakalar oda sıcaklığında kurutularak gazlı dedektörde veya TLRC scanner da sayılır (Jork, et al., 1990).

TLRC tabakalar üzerine uygulanan her bir bileşenin taşınım mesafesi R_f (relative front) değeriyle ifade edilir. R_f değeri, radyokimyasal bileşenin ilerlediği uzaklığın çözümlerinin ilerlediği uzaklığa oranı ile bulunur. R_f değeri radyofarmasötüğün radyokimyasal saflığının hesaplanması açısından önemlidir. R_f değeri hareketli fazlara bağlı ve her madde için sabit olan ayırt edici bir özelliktir.

$$R_f = \frac{\text{radyokimyasal bileşenin uygulama noktasına olan uzaklığı}}{\text{çözümlerinin orjinden ilerlediği uzaklık}}$$



Şekil 2.4 TLRC şeridi ve R_f değerinin hesaplanması.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- Kitosan (Sigma)
- Sefpodoksim Proksetil (Deva)
- Tri poli fosfat (Sigma)
- Asetik Asit (Merck)
- Aseton (Sigma)
- Sodyum perteknetat ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) (Eczacıbaşı Monrol)
- Kalay klorür (SnCl_2) (Merck)
- ITLC-SG Silika kaplı alüminyum şeritler (Merck-10554)
- Piridin (Merck)
- Amonyak (Merck)
- Sodyum Hidroksit (Sigma)
- Fosfat Tampon Çözeltisi PBS (Amresco)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- Milipore filtre (0.45 μm)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı (Yellow Line, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Homojinazatör (Bandelin HD 2070 model, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetler (Sigma, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC Scanner (Bioscan AR-2000, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gama sayım sistemi (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Doz Kalibratörü (Atomlab TM 100 Plus, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Memmert, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Santrifüj Cihazı (Nüve, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Şırınga Pompası (Pikolab, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Zeta potansiyel ölçümleri ve parçacık boyutu analiz cihazı (MALVERN ZETASIZER NANO ZS MODEL DLS) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Fourier Transform Infrared (FT-IR) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)

- Liyofilizatör Cihazı (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Mikroskopy, SEM) (Zeiss Supra 55, Mersin Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma ve Uygulama Merkezi)
- UV Vis Spektrofotometre (Shimadzu, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)

3.2 Antibiyotik Stok Çözeltisinin Hazırlanması

10 mg Sefpodoksim Proksetil, % 3'lük asetik asit çözeltisi içerisinde çözülerek 10 ml stok çözelti hazırlandı. Sefpodoksim Proksetil çözünürlüğü düşük bir antibiyotik olması sebebiyle antibiyotiğin tamamının çözünmesi için 30 dakika ultrasonik banyoda soniklendi.

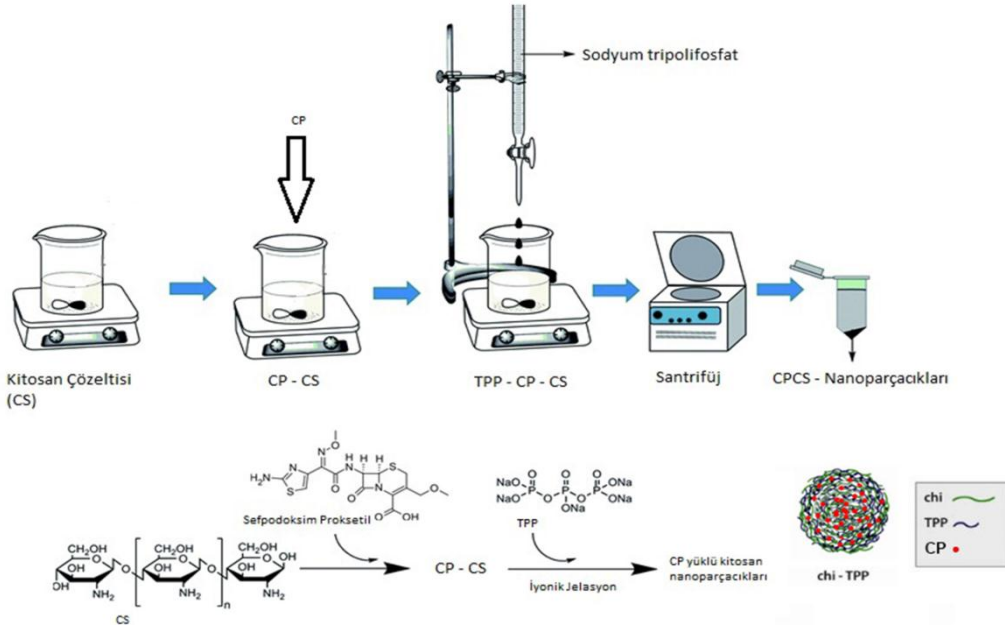
3.3 Nanoparçacıkların Sentezi

3.3.1 Kitosan (CS) nanoparçacıkların sentezi

Calvo et al. (1997) tarafından ilk kez iyonik jelasyon yöntemi ile kitosan nanoparçacıkları sentezlenmiştir. CS nanoparçacıkları, Jamil et al., (2016), Du et al. (2009), Riberio et al. (2014) araştırmacıların kullandıkları iyonik jelasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Çalışmamızda CS nanoparçacıklarının sentezi için iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır (Jamil et al., 2016). % 1'lik asetik asit çözeltisi içinde 20 mg kitosan, manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılarak % 0.3 (w/v)'lük kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. 1 N amonyum hidroksit (NH₄OH) ile pH 4.6-4.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra 0.55 mg/ml hazırlanan 8 ml tripolifosfat (TPP) çözeltisi, 480 rpm'de manyetik karıştırma altında, kitosan çözeltisine 20 dakikada şırınga pompasıyla yavaş yavaş damlatılarak eklenmiştir. Çözelti, oluşan agretasyonları önlemek için 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda soniklenmiştir. Daha sonra bu çözelti 30 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Pellet olarak oluşan nanoparçacıklar, ultra damıtılmış su ile yıkanarak (2-3 kez 30 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlenerek) üst faz ayrılmıştır (n=7). Liyofilizatörde kurutulmuştur.

3.3.2 Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan (CP-CS) nanoparçacıklarının hazırlanması

Sefpodoksim Proksetil (1 mg/ml) % 3'lük asetik asit içerisinde hazırlanan antibiyotik stok çözeltisi 30 dakika boyunca ultrasonik su banyosunda soniklenmiştir. Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan (CP-CS) nanoparçacıkları hazırlamak için Sefpodoksim Proksetil stok çözeltisinden 20 mg antibiyotik kitosan solüsyonuna eklenmiştir. pH, 1N amonyum hidroksit (NH₄OH) ile 4.6-4.8'e ayarlanmıştır. Daha sonra tripolifosfat (TPP) çözeltisi, CP-CS nanoparçacıklarını hazırlamak için kullanılan yöntemdeki gibi manyetik karıştırıcıda karıştırarak 20 dakikada şırınga pompasıyla damlatılmıştır (Ribeiro et al. 2014; Jamil et al., 2016). 30 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlendi. Pellet olarak oluşan CP-CS nanoparçacıkları ultra damıtılmış su ile (2-3 kez 30 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlenerek) yıkanmıştır. Üst faz, ilaç yükleme verimi çalışmaları yapılmak üzere ayrılmış ve dolapda saklanmıştır. Elde edilen nanoparçacıklar ise karakterizasyon işlemi yapılmak için liyofilizatörde kurutulmuştur.



Şekil 3.1 Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıklarının sentez aşamalarının şematik gösterimi

3.4 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

İyonik jelleşme yöntemi ile sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonları; yapısal, büyüklük ve morfolojik olarak yapılmıştır. Nanoparçacıklar, Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Zeta Potansiyeli ölçümü (ZP), Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi (FT-IR) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri ile karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 DLS ve zeta potansiyeli analizi

DLS analizleri, nanoparçacıkların agregasyonunu önlemek amacıyla hazırlanan örnekler dondurularak kurutulmadan önce analizleri gerçekleştirilmiştir. Pellet şeklinde olan nanoparçacıklar saf su ile çözülmüştür. Parçacıklarda olabilecek agregasyonları dağıtmak için homojenizatörde maksimum gücün % 50'si kullanılarak 5 dakika boyunca homojenize edilmiştir. 2 ml örnek 0.45 µm enjektör filtresinden geçirilerek ölçüm yapılacak kapiler zeta hücre kuvvet içerisine doldurulmuş parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1'de detaylı olarak verilmiştir.

3.4.2 FT-IR analizi

Sentezlenen kitosan nanoparçacıkları, Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları, saf Sefpodoksim Proksetil ve kitosanın, FT-IR analizi, oda sıcaklığında ve $350-6000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda (Perkin-Elmer Spectrum 100) Fourier Transform Infrared Spektrometresinde yapılmıştır. Antibiyotik ve kitosan polimer arasındaki bağlar FT-IR spektrometresi ile incelenmiştir.

3.4.3 SEM analizi

Parçacık boyutu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri, nano ölçekli örneklerin morfolojik yapısı ve parçacık yapısı hakkında bilgi vermektedir. SEM analizi bir Zeiss Supra 55 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5 İlacın Kapsüllenme Veriminin ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Kapsülleme verimi (% EE) ve sentezlenen CP-CS nanoparçacıklarına yüklenebilen ilaç miktarı UV-Vis spektrofotometrik analiz ile belirlenmiştir. Sefpodoksim Proksetilin absorbansı 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Khan et al., 2010). 40-200 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda Sefpodoksim Proksetil çözeltileri için hazırlanmış. UV-Vis spektroskopisi ile de absorbansları ölçülmüş ve kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Santrüfuj sonrası nanoparçacıkların üstünde kalan üst faz olarak adlandırdığımız sıvı, yüklenmeyen antibiyotik miktarını belirlemek amacıyla ayrılmıştır. Antibiyotik yüklü kitosan nanoparçacıklarına eklenen toplam antibiyotik miktarı (CP_t), yüklenmemiş antibiyotik miktarı (CP_u) olmak üzere arasındaki farkın belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Üst fazda CP_u'da serbest antibiyotik, 260 nm'de spektrofotometre ile belirlenmiştir. Üst fazdaki antibiyotik konsantrasyonu, kalibrasyon eğrisinden elde edilen lineerlik grafiğinden faydalanılarak hesaplanmıştır (n=3). Antibiyotiğin kapsüllenme verimi % EE ve yüklenen antibiyotik miktarı aşağıdaki denklemlerle hesaplanmıştır (Ribeiro et al., 2014).

$$(\%)EE = \frac{(CP_t)\text{kütlesi} - (CP_u)\text{kütlesi}}{(CP_t)\text{ kütlesi}} \times 100$$

$$\left(\% \frac{w}{w}\right)CP \text{ Yükleme} = \frac{(CP_t)\text{kütlesi} - (CP_u)\text{kütlesi}}{\text{Kitosanın kütlesi}}$$

3.6 Radyoışaretleme Çalışmaları

3.6.1 Sefpodoksim Proksetilin radyoışaretlenmesi

Sefpodoksim Proksetil stok çözeltisi oda sıcaklığında 30 dakika ultrasonik banyoda çözülmek üzere bırakılmış. Çözülmüş Sefpodoksim Proksetil stok çözeltisinin 0,5 ml'si (0,5 mg) ependorfa alınmış ve çözelti hacmi 1ml'ye bidistile su eklenerek seyreltilmiştir. pH değeri 1N NH₄OH çözeltisi eklenerek 8.5'e ayarlanmıştır. Ependorfa 100 µl SnCl₂.2H₂O (1 mg/ml) indirgeyici madde eklenmiştir. Bundan sonra, bileşiğe 37 MBq (1 mCi) Na^{99m}TcO₄ ilave edilerek

karışım, 35 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (n=5). Radyoişaretlemenin kalite kontrolü TLRC kromatografisi ile yapılmıştır.

3.6.2 Sefpodoksim Proksetil yüklü nanoparçacıkların radyoişaretlenmesi

Sentezlenen +4°C'de saklanan CP-CS nanoparçacıkları bidistile su ile 1mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 5 dakika süresince homojenizatörle homojenize edilmiştir. CP-CS nanoparçacıklarının radyoişaretlenmesi Sefpodoksim Proksetilin (CP) işaretleme prosedürün aynısı uygulanarak gerçekleştirilmiştir (n=5).

Radyoişaretlenen antibiyotik CP ve antibiyotik yüklü kitosan CP-CS nanoparçacığının inkübasyon süresi sonunda kalite kontrol çalışmaları TLRC (İnce Tabaka Radyo Kromatografisi) yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

3.7 Kalite Kontrol Çalışmaları

3.7.1 İnce tabaka radyokromatografi yöntemi (TLRC)

^{99m}Tc-CP antibiyotiğin ve ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacığının radyoişaretleme verimi, İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Sabit faz olarak (1.5 x 10 cm boyutlarında; Merck) silika-jel kaplı alimünyum şeritler kullanılmıştır. Hareketli faz olarak (1) % 100 aseton ve (2) bir çözelti karışım PAS [piridin-asetik asit su (3: 5: 1,5)] olmak üzere iki çözelti sistemi kullanılmıştır. 35 dakikalık inkübasyondan sonra, radyoişaretleli ^{99m}Tc-CP ve ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacıkları, silika-jel kaplı şeritler üzerinde yürütülmüştür. TLRC şeritlerine damlatılan örnekler kuruduktan sonra hareketli fazların bulunduğu TLRC tanklarına yerleştirilmiştir. Tanklar içerisinde bulunan çözeltilerin şeritler üzerinde yürümesi beklenmiştir. Silika şeritler hareketli fazlardan uzaklaştırılmış ve kurummasına izin verilmiştir. Kuruyan şeritlerin üzeri şeffaf bantla kaplanmıştır. Her birinin radyokromatogramı Bioscan AR-2000 TLRC tarayıcı kullanılarak taranmıştır. Elde edilen kromatogramlar sonucunda radyoaktif örneklerin taşındığı R_f değerleri bulunmuş ve radyoişaretleme verimleri saptanmıştır.

3.7.2 *In vitro* stabilite çalışması

In vitro stabilite çalışması radyoışaretli bileşiğin raf ömrünü belirlemek amacıyla yapılmıştır. İşaretli bileşikten oda sıcaklığında 30. dakika, 1. saat, 2. saat, 4. saat ve 24. saatte örnekler alınarak TLRC yöntemi ile işaretli bileşiğin verimi belirlenmiştir.

^{99m}Tc-CP antibiyotiğin ve ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacığının radyoışaretleme prosedürü uygulanmıştır. 500 µl fosfat tamponuna (PBS), 300'er µl işaretli bileşiklerden eklenmiştir. İşaretlemenin hemen ardından 0. dakikada örneklerden silika şeritlere damlatma yapılmıştır. Damlatma yapılan şeritler çözelti içeren tanklara daldırılmıştır. Tanktan çıkarılan TLRC'ler kurutulduktan sonra Bioscan AR-2000 ile sayımı yapılmıştır. Daha sonraki 30. dakika, 1. saat, 2. saat, 4. saat ve 24. saat inkübasyon süresinde de aynı işlemler tekrarlanarak verimleri tespit edilmiştir. Elde edilen kromatogramlar sonucunda radyoaktif örneklerin taşındığı R_f değerleri ve radyoışaretleme verimleri saptanmıştır. Zamana bağlı radyoışaretleme verimi dağılım grafiği çizilmiştir.

3.8 *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerinde *in vitro* Tutulum Çalışması

In vitro bakteriyel bağlanma çalışmaları, hem radyoaktif işaretli CP hem de CP-CS nanoparçacıkları ve kontrol grubu olarak serbest ^{99m}Tc için *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 bakteriyel suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriler Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden alınmıştır. Steril PBS (pH 7.4) içerisinde süspansiyon edilmiştir. *S. aureus* ve *E. coli* suşları $1,5 \times 10^9$ CFU ml⁻¹ olacak şekilde her bir bakteri suşu için 3 tekrarlı yapmak üzere 54 adet tüpe alınmıştır. Radyoaktif işaretli CP, radyoaktif CP-CS nanoparçacıkları ile serbest ^{99m}Tc olmak üzere 3 madde için 3 tekrarlı olarak *S. aureus* ve *E. coli* için ayrı ayrı hazırlanmıştır. *S. aureus* ve *E. coli*'nin literatürde belirtilen MİK değerleri, CP için 4 (1-8) µg/ml ve 0,6 (0,25-1) µg/ml olarak belirlenmiştir (Wiedemann et al., 1991). Tüp başına 0.37 MBq (10 µCi) içeren ^{99m}Tc ve geçerli MİK değerine uygun hesaplanan miktarda antibiyotik *S. aureus* ve *E. coli* tüplerine eklenmiştir (Alexander et al., 2005; Tuncel, 2016). Her bir tüp Cd (Te) detektörü ile 10 saniye boyunca sayılarak (n=3) ilk sayımlar (A₀),

radioaktif işaretli CP, radyo-işaretli CP-CS nanoparçacıkları ile serbest ^{99m}Tc için alınmıştır. 1, 2 ve 4 saat 37 °C'de inkübasyon sürelerinden sonra, tüpler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin üst fazları ayrıldıktan sonra tüplerde bakterilerin olduğu pelletler iki kez 1 ml soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Her bir yıkamadan sonra PBS ilavesi ile tüpler ilk hacmine getirilmiştir. Aktivite değeri 1. 2. ve 4. saatin sonunda tekrar detektörde sayılmış ikinci sayımlar (A_1) olarak alınmıştır. Birinci sayım A_0 ve ikinci sayım A_1 değerlerini kullanarak, bakteri suşlarındaki yüzde (%) bakteri tutulum miktarı ($A_1/A_0 \times 100$) bağıntısı kullanılarak hesaplanmıştır (n=3).

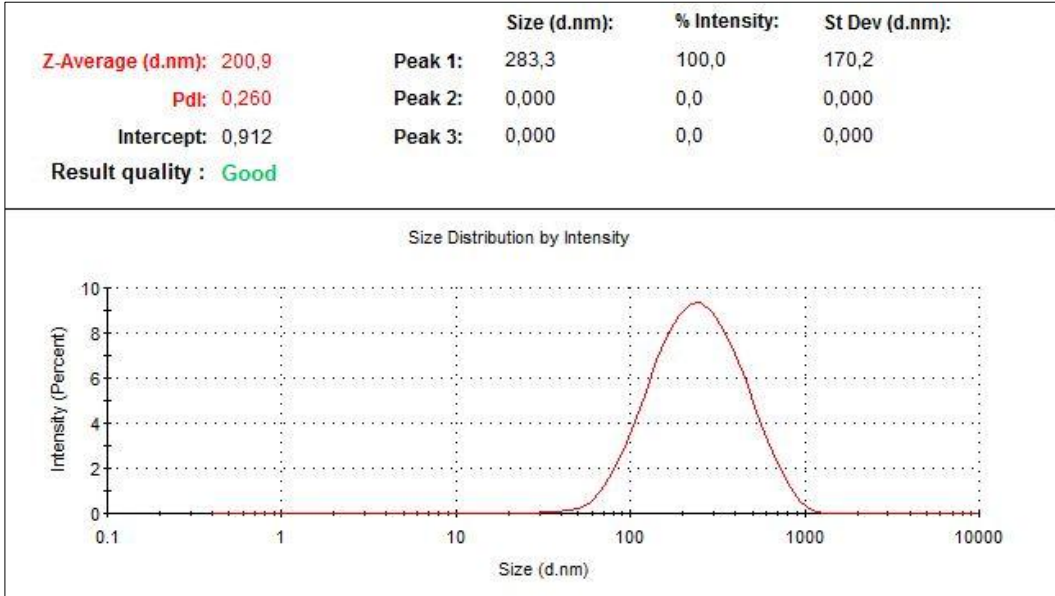


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 DLS, FTIR and SEM çalışmaları sonuçları

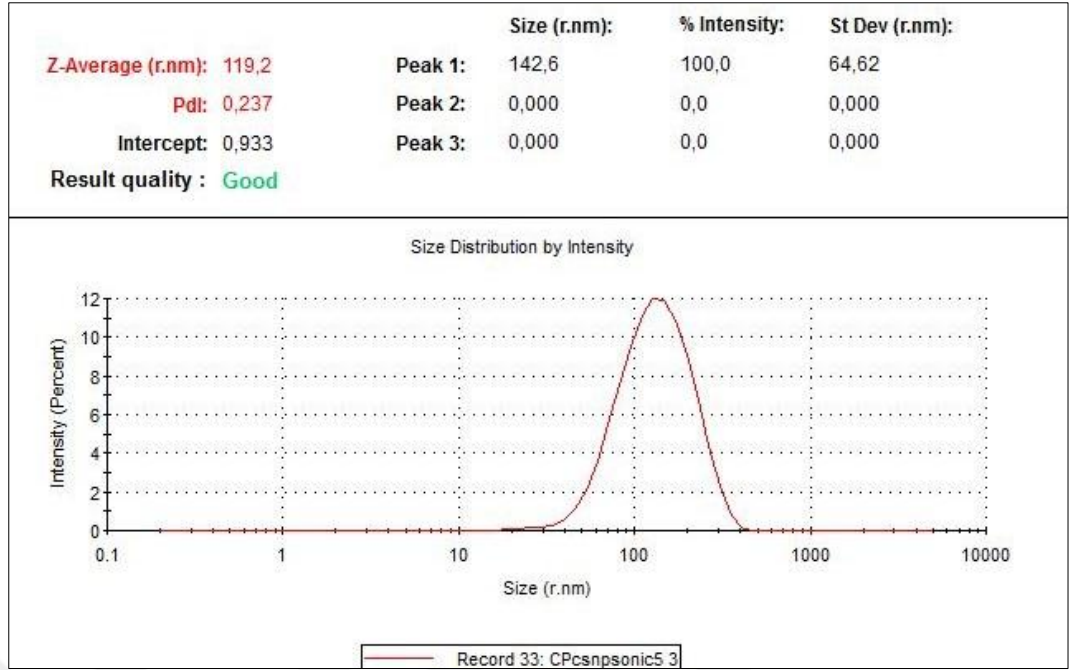
4.1.1 Parçacık boyutu ve Zeta sonuçları

Bölüm 3.3.1’de değinilen yöntemle sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının boyut ölçümü Malvern Zetasizer Nano ZS cihazında Bölüm 3.4.1’de anlatılan DLS tekniği ile yapılmıştır. Elde edilen boyut dağılım grafiği Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 CS nanoparçacıkların boyut dağılımı

Sentezlenen Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların boyut ölçümü de aynı cihazla DLS tekniğiyle gerçekleştirilmiş ve CP-CS nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği ise Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 CP-CS nanoparçacıkların boyut dağılımı

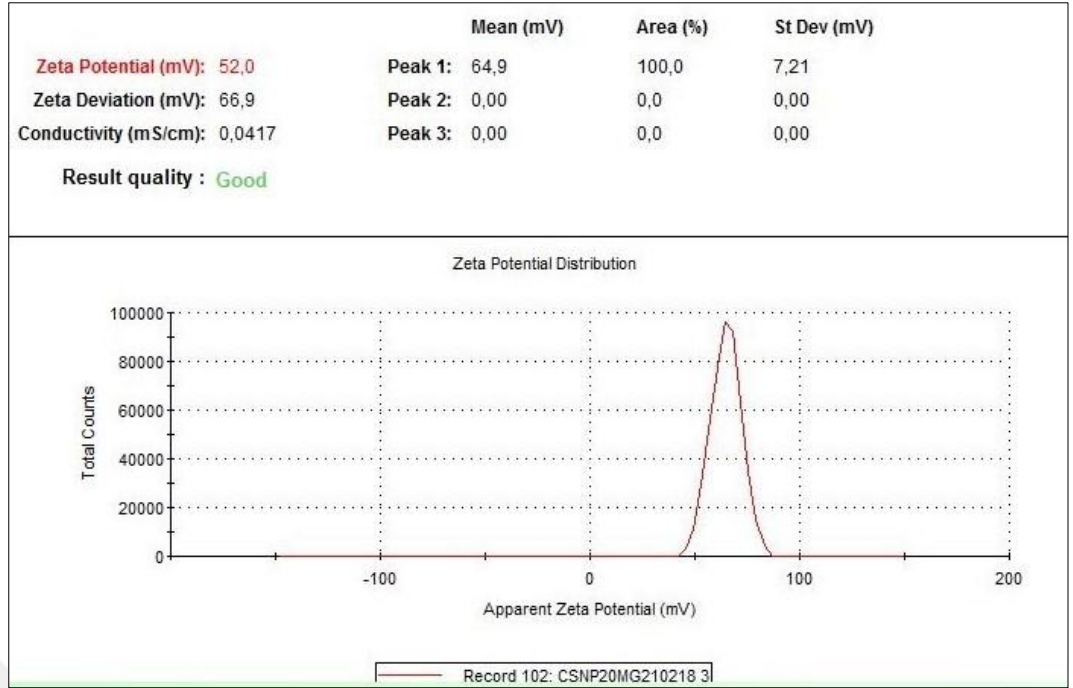
Elde edilen sonuçlara göre, CS nanoparçacıkların boyutu 200,9 nm, PI değeri 0,260 (Şekil 4.1) ve CP-CS nanoparçacıklarının boyutu 119,2 nm, PI değeri 0,237 (Şekil 4.2) olarak istenilen boyutlara ve iyi bir dağılıma sahip oldukları görülmektedir.

Kitosan nanoparçacıklarla yapılan çalışmalarda 10-1000 nm arasında değişen boyutlarda nanoparçacık elde edilmiştir (Calvo et al., 1997; Hu et al., 2006). Nanoparçacıkların boyut dağılımını kalitesini gösteren polidispersite indeksi (PI) değeri genellikle 0-1 arasında değişmektedir. PI değerinin sıfıra yakın olması beklenir. $PI \leq 0,1$ olan nanoparçacıklar yüksek dağılım kalitesini gösterirken $PI \leq 0,5$ olan nanoparçacıklar ise iyi bir dağılıma sahip olduğu kabul edilmektedir.

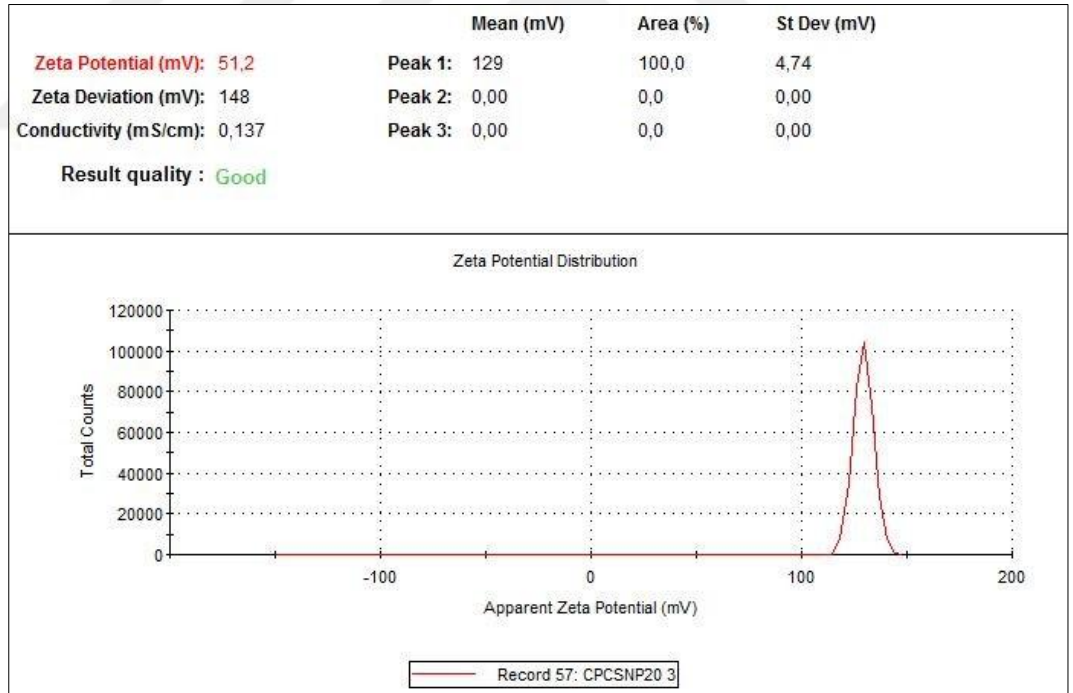
Kitosan nanoparçacıkların boyut analizi ve zeta analizi ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Qi et al, CS nanoparçacıkların boyutları 40 nm, bakır yüklü CS nanoparçacıkların 257 nm olarak bulmuşlardır (Qi et al., 2004). Ribeiro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada CS nanoparçacıkların boyutları 79 nm ve $PI < 0,2$, Amphotericin yüklü CS nanoparçacıkların boyutları ise 136 nm, $PI < 0,2$ bulmuşlardır (Ribeiro et al., 2014).

Zeta potansiyeli, yani yüzey yükü, parçacıklar arasındaki elektrostatik itme ile süspansiyondaki parçacık stabilitesini büyük ölçüde etkiler ve süspansiyonların uzun süreli stabilitesinin bir göstergesidir. Aynı zamanda *in vivo* olarak nanoparçacık etkileşimini, genellikle negatif yüklü olan bakteri hücre membranı ile de belirlenebilir (Qi et al., 2004). +10 mV ve -10 mV arasında bir zeta potansiyeline sahip nanoparçacıklar yaklaşık nötr olarak kabul edilirken +30 mV'den daha büyük ya da -30 mV'den daha düşük zeta potansiyeline sahip nanoparçacıklar, sırasıyla kuvvetli katyonik ve kuvvetli anyonik olarak kabul edilirler (Clogston and Patri, 2011) ve itici kuvvetler daha güçlü hale geldikçe daha az agregasyon olacağından kararlı bir formülasyonu temsil ederler (Gazori et al., 2009).

Qi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda CS nanoparçacıkların yüzeylerinin yaklaşık 51 mV, bakır yüklü CS nanoparçacıkları 96 mV olarak bulmuşlar (Qi et al., 2004). Birçok araştırmacı tarafından 21–45 mV aralığında pozitif zeta potansiyeli bildirilmiştir. (De Campos et al., 2001; Miladi et al., 2015; Zhang et al., 2016). Sonuçlara göre, CS nanoparçacıklar (52 mV), ilaç yüklü CP-CS nanoparçacıklar (51.2 mV) +50 mV'den yüksek pozitif zeta potansiyeli sergilemektedir (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4) Bu sonuçlar ilaç yüklü nano sistemlerin stabiliteilerinin uzun olacağına göstergesidir.



Şekil 4.3 CS nanoparçacıkların zeta potansiyel dağılımı



Şekil 4.4 . CP-CS nanoparçacıkların zeta potansiyel dağılımı

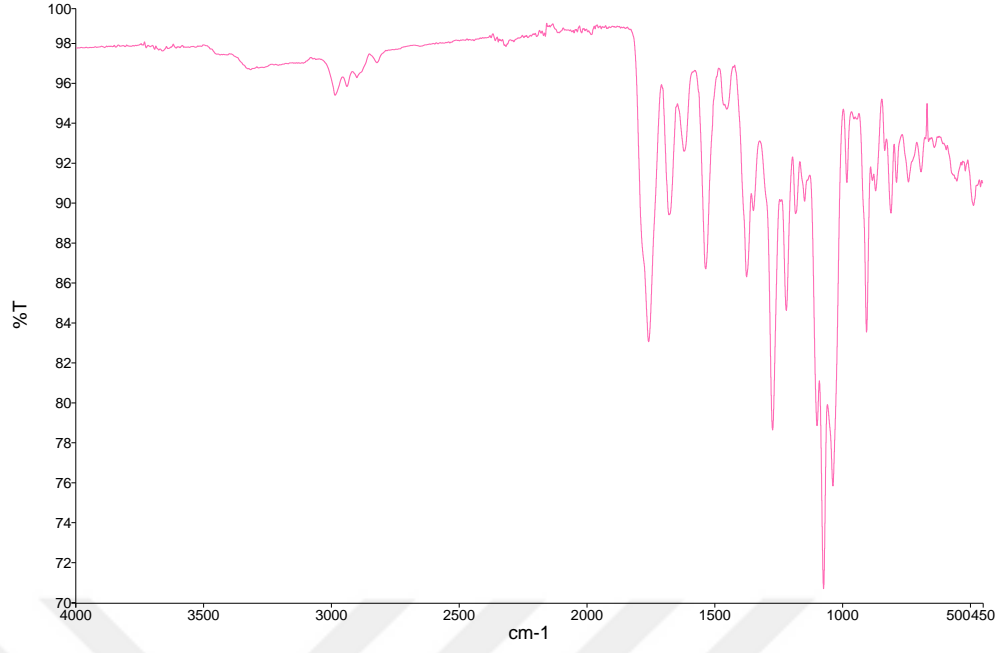
4.1.2 FT-IR analiz sonuçları

Antibiyotik ve kitosan polimer arasındaki bağlar FT-IR spektrometresi ile incelenmiştir. Saf Sefpodoksim Proksetil, boş kitosan nanoparçacıkları ve Sefpodoksim Proksetil, yüklü kitosan nanoparçacıkların FT-IR spektrumları Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 de gösterilmiştir.

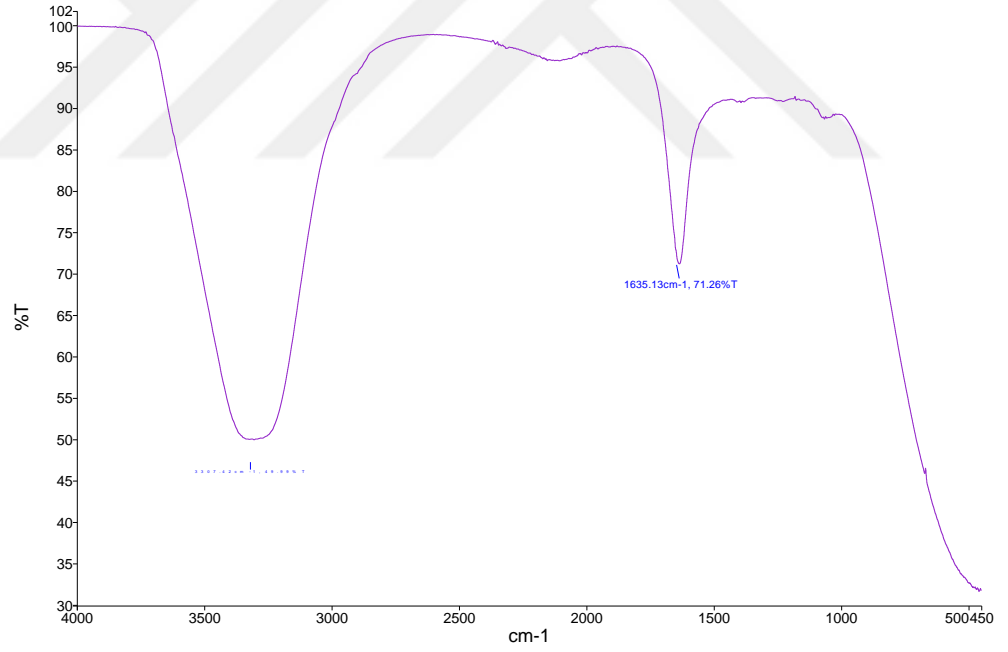
Literatürde saf kitosanda 3419 cm^{-1} 'deki bir bant, NH_2 ve COOH grubundan su ayrılmaalarına ait piklere karşılık gelen, 1657 cm^{-1} 'deki bant, CONH grubuna ait olduğu bulunmuştur (Qi et al., 2004).

Çalışmamızda Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları 3419 cm^{-1} piki, 3325 cm^{-1} 'e değişim göstermiştir. Saf kitosanda bilinen 1657 cm^{-1} (CONH) bandın yoğunlukları, 1635 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu amonyum gruplarının tripolifosfat molekülleri ile çapraz bağlandıklarını göstermektedir (Knaul et al., 1999). Bu nedenle, sodyum polifosfatın polifosforik gruplarının, kitosan nanoparçacıklarında moleküller arası etkileşimi arttırmaya hizmet eden, amonyum kitosan gruplarıyla etkileştiği varsayılmaktadır. Önceki çalışmalarda bizim çalışmalarımızdakine benzer sonuçlar gözlemlenmiştir (Knaul et al., 1999; Qi et al., 2004). Kitosan nanoparçacıklarının spektrumunda ise pik 3419 cm^{-1} 'den 3307 cm^{-1} e değişmiştir. 1657 cm^{-1} (CONH_2) pikleri 1635 cm^{-1} 'e kaymaktadır.

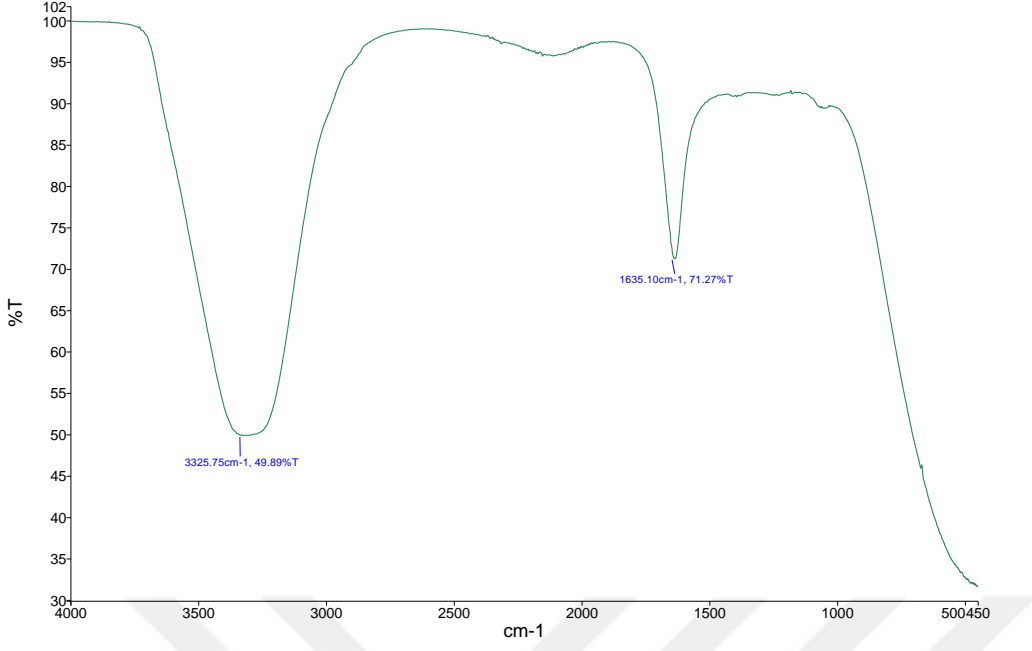
Jamil ve arkadaşlarının 2016 yılındaki çalışmasında ise CS nanoparçacıklarıyla, Sefazolin yüklü kitosan nanoparçacıklarının pikleri 3406 ve 1644 cm^{-1} 'de aynı yerde kitosanla benzer yerlerde çıkmıştır (Jamil et al., 2016). Ribeiro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Amfoterisin yüklü CSNP spektrumlarında, CSNP spektrumları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (Ribeiro et al., 2014). Bizim çalışmamızda da CS nanoparçacıkları ile CP-CS nanoparçacıkları benzer yerlerde çıkmıştır. Elde edilen FT-IR sonuçlarımız literatür ile uyumlu çıkmıştır.



Şekil 4.5 CP antibiyotiginin FT-IR spektrumu.



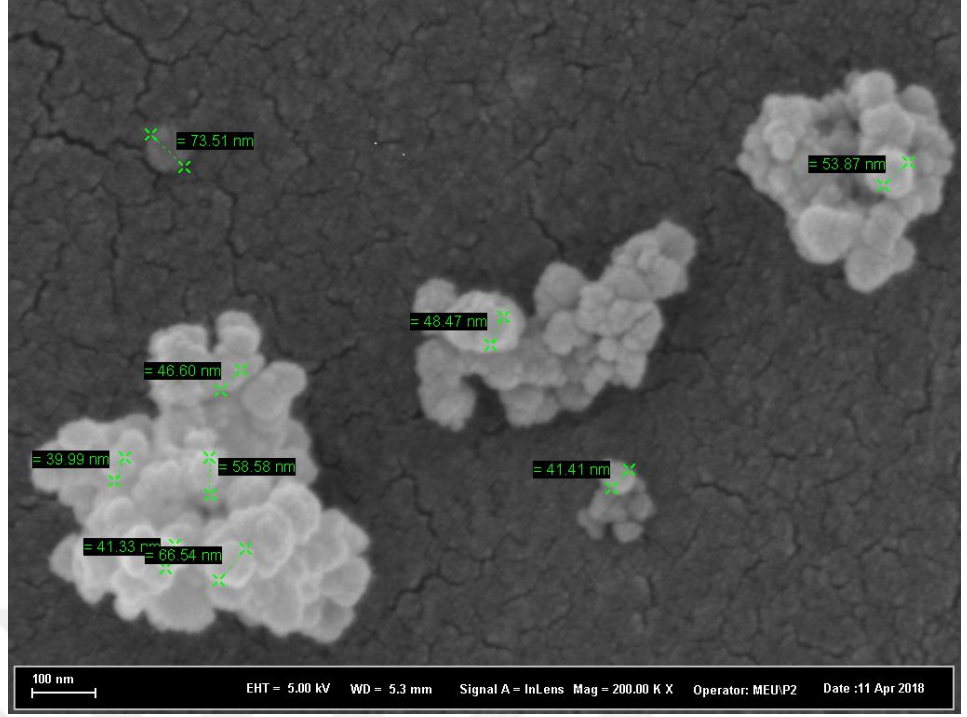
Şekil 4.6 CS nanoparçacıkların FT-IR spektrumu.



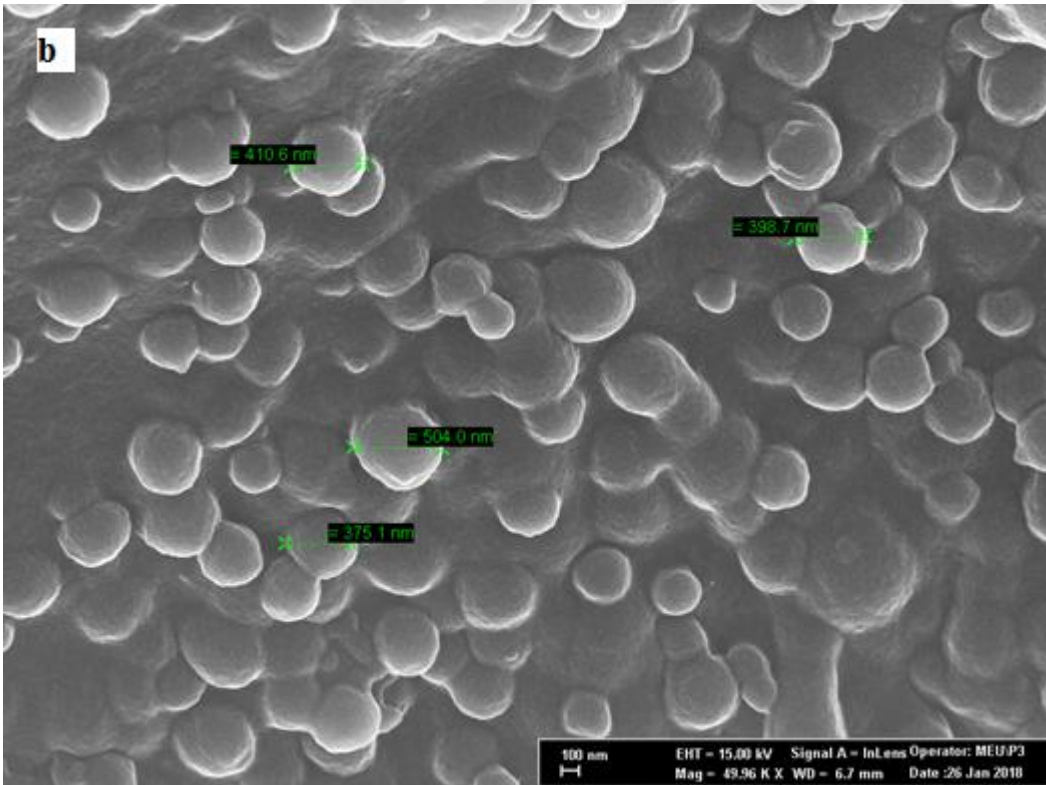
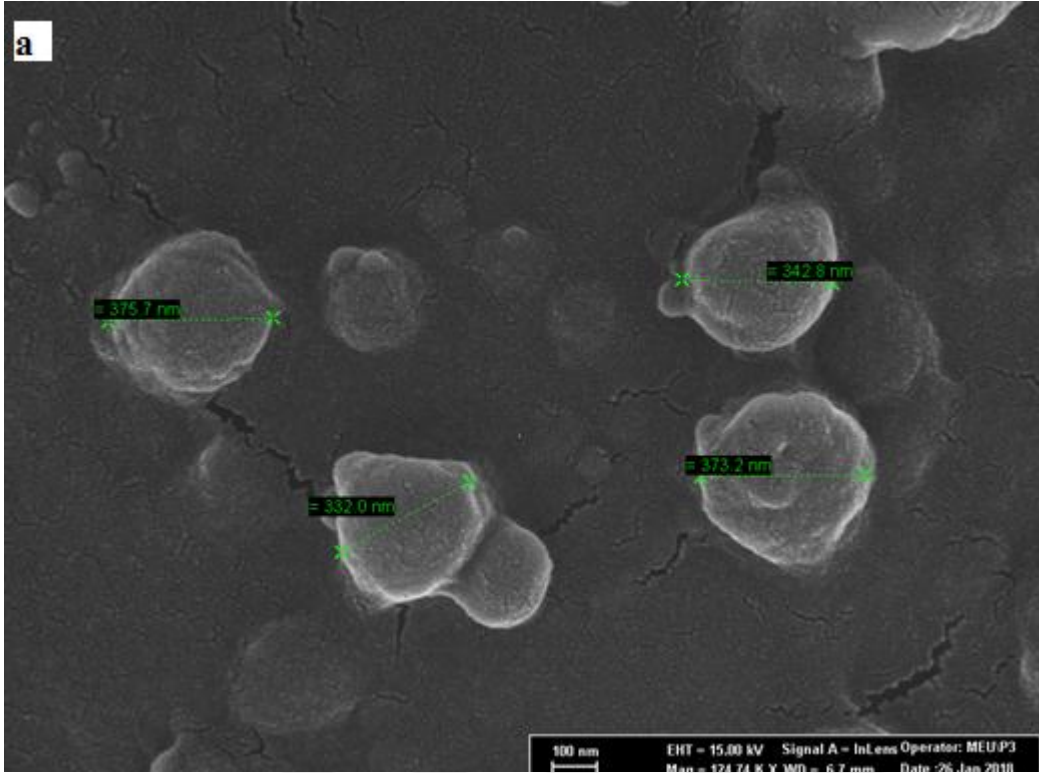
Şekil 4.7 CP-CS nanoparçacıklarının FT-IR spektrumu.

4.1.3 SEM sonuçları

Nanoparçacıkların morfolojisi SEM ile incelendi ve sonuçlar, tek tek parçacıkların düzgün bir yüzeye sahip tekdüze küresel şekle sahip olduğu homojen dağılım gösterdiği saptandı. SEM görüntüsü kitosan nanoparçacıkları Şekil 4.8’de 41 nm, Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıklarınki ise Şekil 4.9’da 332 nm olarak verilmiştir.



Şekil 4.8 Kitosan nanoparçacıkların SEM görüntüsü

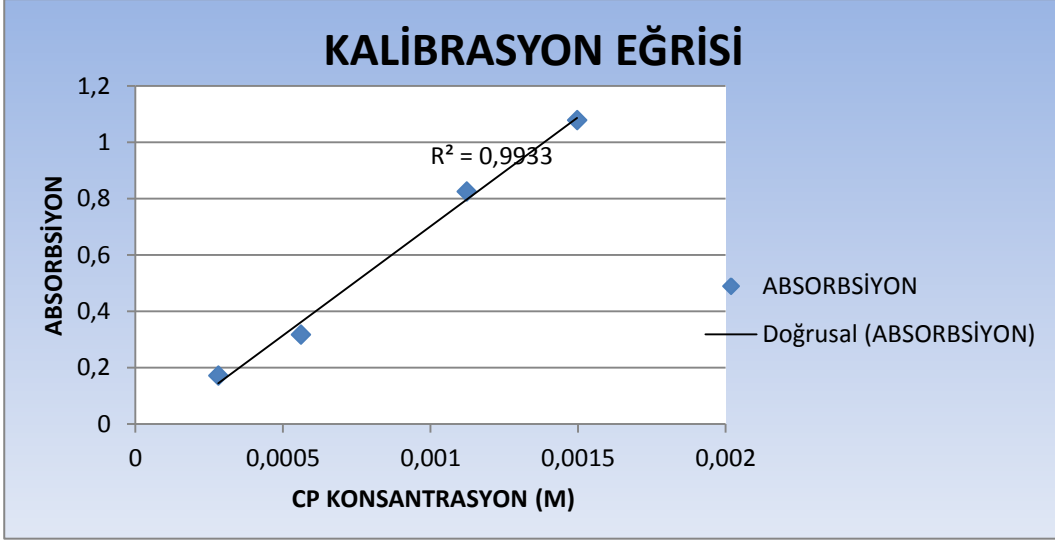


Şekil 4.9(a) ve (b) Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları SEM görüntüsü.

Thandapani ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kurutma yönteminin kitosan nanopartiküllerinin büyüklüğü üzerindeki etkisini incelenmiş ve sonuçlar, kurutma yönteminin kitosan nanoparçacıklarının parçacık büyüklüğünü etkileyen önemli bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır. Parçacık boyutlarının, dondurarak kurutma işlemi sırasında, hava ile kurutma işleminden çok büyük ölçüde azaldığı sonucuna varılmıştır. (Thandapani et al., 2017) SEM ile elde edilen boyut sonucu DLS sonucundan daha küçük olması beklenmektedir. Ancak CP-CS nanoparçacıkların SEM boyutu DLS sonucundan daha büyük çıkmıştır. Bunun nedeni olarak CP-CS nanoparçacıkların hava ile kurutulmuş olması CS nanoparçacıkları ise liyofilizatörde kurutulmuş olması olabilir. Mujtaba ve arkadaşları Sefpodoksim proksetilin uzatılmış ilaç salımı için kitosan-alginat boncuklarını iyonik jelyasyonla geliştirmişler ve 1236 µm boyutlarında parçacıklar elde edebilmişler (Mujtaba et al., 2014). Çalışmamızda daha küçük boyutlu Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları elde edilmiştir. Ayrıca CP-CS nanoparçacıkları ilaç yüklü olduğu için elde edilen 332 nm boyutuyla, 41 nm boyutunda bulunan CS nanoparçacıklarına göre daha büyük çıkmaktadır. Qi ve arkadaşları CS nanoparçacıklarını ortalama 40 nm, bakır yüklü CS nanoparçacıkları ortalama 257 nm olarak tespit etmişlerdir (Qi et al., 2004). SEM sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur.

4.2 Kitosan Nanoparçacıkların Sefpodoksim Proksetil Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi

40-200 µg/mL arasında değişen farklı konsantrasyonlarda Sefpodoksim Proksetil örnekleri hazırlanmış ve UV-Vis spektroskopisi Sefpodoksim Proksetilin absorbans değerinde (260 nm dalga boyunda) tespit edilmiştir. Bu absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.10'da görülmektedir. CP'nin kalibrasyon grafiğinden lineerite $r^2 = 0,9933$ bulunmuştur.



Şekil 4.10 Sefpodoksim Proksetil kalibrasyon eğrisi.

Elde edilen kalibrasyon eğrisine ilişkin doğru denklemi ile kitosan nanoparçacıklarına yüklenen Sefpodoksim Proksetil miktarı bulunmuştur. Nanoparçacıkların ilaç kapsülasyon verimi aşağıdaki formül ile bulunmuştur.

EE: Kapsüle edilen etken madde yüzdesi

CP_t nanoparçacığa yüklenen ilaç miktarı

CP_U süpernetantta kalan ilaç miktarı

$$(\%)EE = \frac{(CP_t)\text{kütlesi} - (CP_U)\text{kütlesi}}{(CP_t)\text{ kütlesi}} \times 100$$

$$\left(\% \frac{w}{w}\right) CP \text{ Yükleme} = \frac{(CP_t)\text{kütlesi} - (CP_U)\text{kütlesi}}{\text{Kitosanın kütlesi}}$$

Kapsülasyon verimi, 20 mg/ml CP konsantrasyonu için % 82 olarak hesaplandı. 20 mg kitosana 20 mg ilaç 1:1 (w/w) kitosan/ilaç oranında yükleme gerçekleştirilmiştir. CP'nin kitosan üzerine yüklenmesi, 20 mg/ml'lik CP konsantrasyonunda 16,38 mg bulunmuştur.

Sobhani ve arkadaşları, Siproflaksin yüklü kitosan nanoparçacıkları 1:0.5 (w/w) kitosan/ilaç oranında hazırlamışlar ve enkapsülasyon verimliliği % 23 bulmuşlardır. Nanoparçacık formülasyonlarının ortalama ilaç tuzak veriminin, polimerdeki ilaç miktarının artırılması ile hafifçe arttığını bulmuşlardır (Sobhani et al., 2017). Benzer bir çalışmada Jamil ve arkadaşları tarafından yapılmış ve 200 µg/ml'de % 28; 800 µg/ml'de % 39 ve 2000 µg/ml konsantrasyonunda % 62 olarak bulmuşlardır. EE'nin ilaç konsantrasyonundaki artışla arttığını belirtmişlerdir (Jamil et al., 2016). Diğer bir çalışmada CP yüklü kitosan aljinat tanecikleri hazırlanmış ve sonuçlar, polimer miktarının, ilaç salımını, partikül büyüklüğünü (1236 µm- 1526 µm) ve kapsülleme verimliliğini (% 72.6- 94.9) etkileyen önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuşlardır (Mujtaba et al., 2014).

4.3 Kalite Kontrol Sonuçları

4.3.1 ^{99m}Tc-CP ve ^{99m}Tc-CP-CS nanoparçacıkların TLRC sonuçları

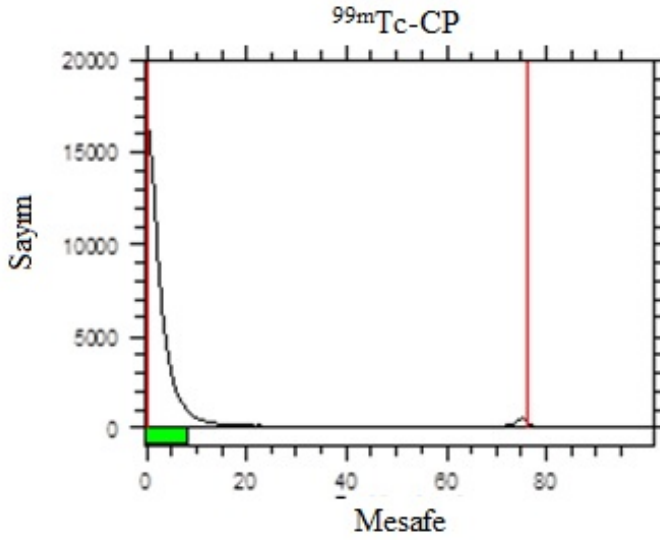
Bölüm 3.6.1'de ve 3.6.2'de değinilen radyoişaretleme koşullarında Aseton ve PAS banyoları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmanın ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre elde edilen R_f değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 R_f değerleri

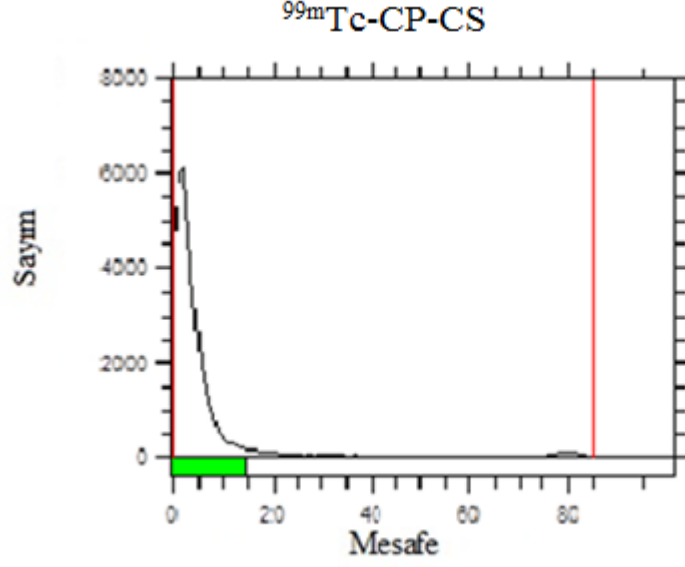
Banyolar	R _f değerleri			
	^{99m} Tc-CP	^{99m} Tc-CP-CS	Na ^{99m} TcO ₄	İnd ^{99m} Tc
Aseton	0,03	0,03	1,00	0,08
PAS [PiridinAsetik asit-Su (3:5:1.5)]	0,90	0,02	0,80	0,00

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi Aseton banyosunda indirgenmiş ^{99m}Tc ’in R_f değeri ile işaretli Sefpodoksim Proksetil aynı yerde çıkmaktadır. Ayırt edici olarak PAS banyosu kullanılmıştır. Bu banyoda indirgenmiş ^{99m}Tc başta ($R_f= 0,00$) çıkmaktadır. Radyoişaretli Sefpodoksim Proksetil sonda ($R_f= 0,90$) çıkmaktadır. PAS banyosu Sefpodoksim Proksetilin işaretlenmesinin tespitinde ayırt edici olmuştur. Kalite kontrol sonucuna göre ^{99m}Tc -Sefpodoksim Proksetil % 89 ± 3 verimle işaretlendiği tespit edilmiştir ($n=5$). Radyoişaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıklar ise % 94 ± 2 verimle işaretlendiği tespit edilmiştir ($n=5$).

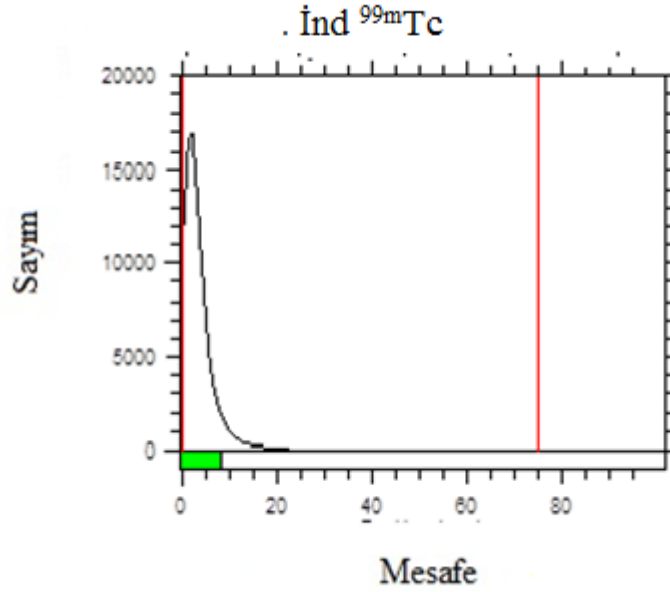
^{99m}Tc -CP, ^{99m}Tc -CP-CS nanoparçacıkların ve indirgenmiş ^{99m}Tc için Aseton çözeltisi kullanılarak yapılan TLRC kromotogramları Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.11 ^{99m}Tc ile işaretli Sefpodoksim Proksetilin Aseton banyosundaki TLRC kromotogramı

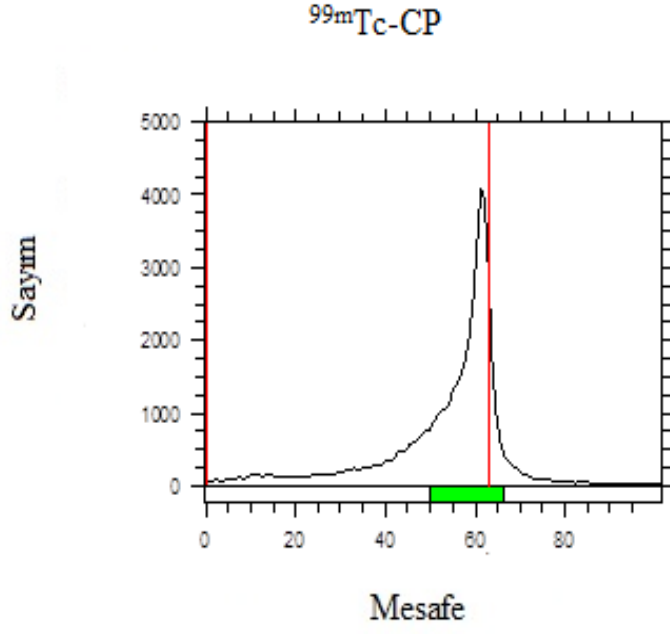


Şekil 4.12 ^{99m}Tc ile işaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların Aseton banyosundaki TLRC kromotogramı

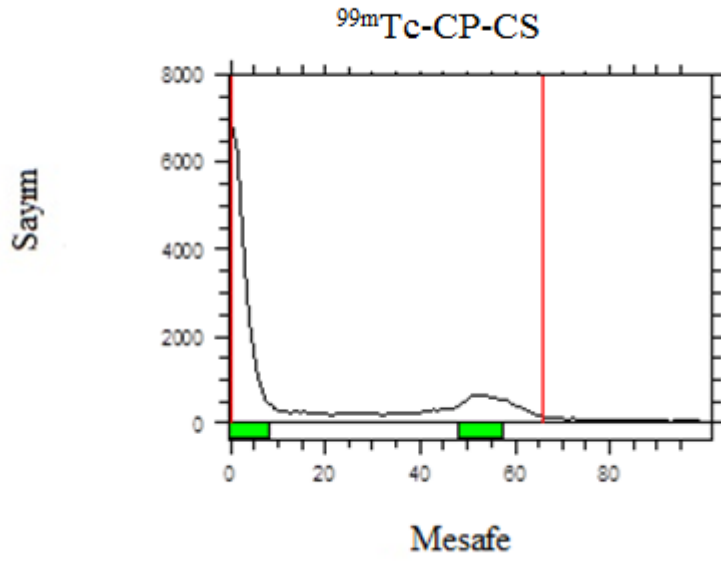


Şekil 4.13. İndirgenmiş ^{99m}Tc Aseton banyosundaki TLRC kromotogramı.

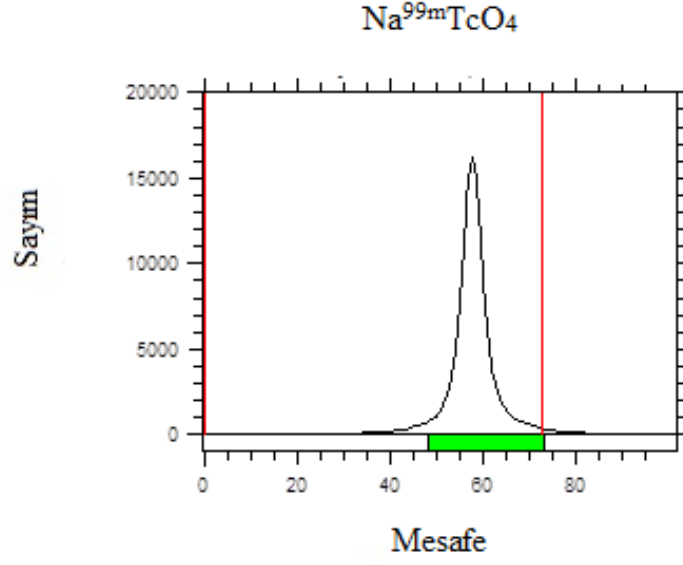
$^{99m}\text{Tc-CP}$, $^{99m}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparçacıkların, $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ve ind ^{99m}Tc için PAS (pidin/asetik asit/su) (3:5:1,5) çözeltisi kullanıldığında elde edilen TLRC kromotogramları Şekil 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.



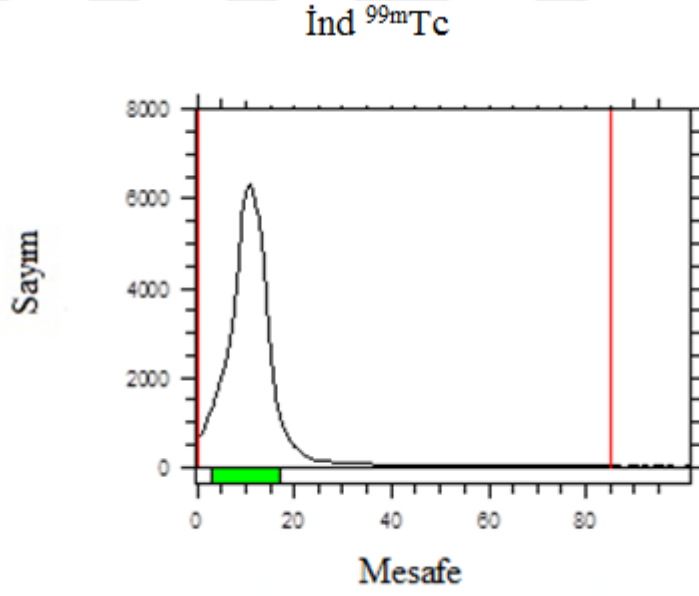
Şekil 4.14 ^{99m}Tc işaretli Sefpodoksım Proksetil'in PAS banyosundaki TLRC kromotogramı.



Şekil 4.15 ^{99m}Tc işaretli Sefpodoksım Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların PAS banyosunda TLRC kromotogramı.



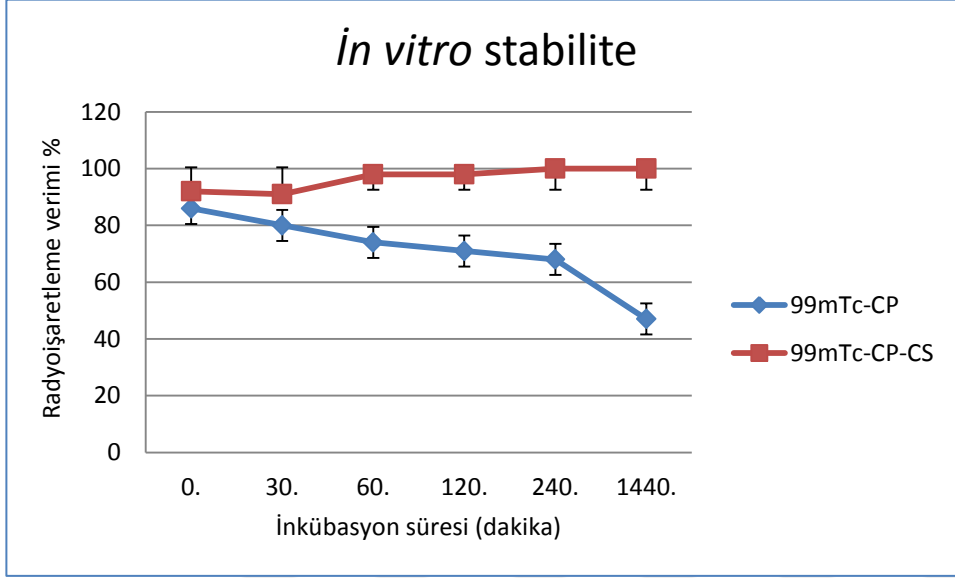
Şekil 4.16 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 'ın PAS banyosunda TLRC kromotogramı



Şekil 4.17 İndirgenmiş $^{99\text{m}}\text{Tc}$ PAS banyosunda TLRC kromotogramı

4.4 *In vitro* Stabilite Sonuçları

^{99m}Tc -CP ve ^{99m}Tc -CP-CS nanoparçacıkların bileşiklerinin raf ömrünün saptanması için yapılan *in vitro* stabilite çalışması sonuçları Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18 ^{99m}Tc -CP ve ^{99m}Tc -CP-CS nanoparçacıkların *in vitro* stabilitesinin zamana göre değişimi

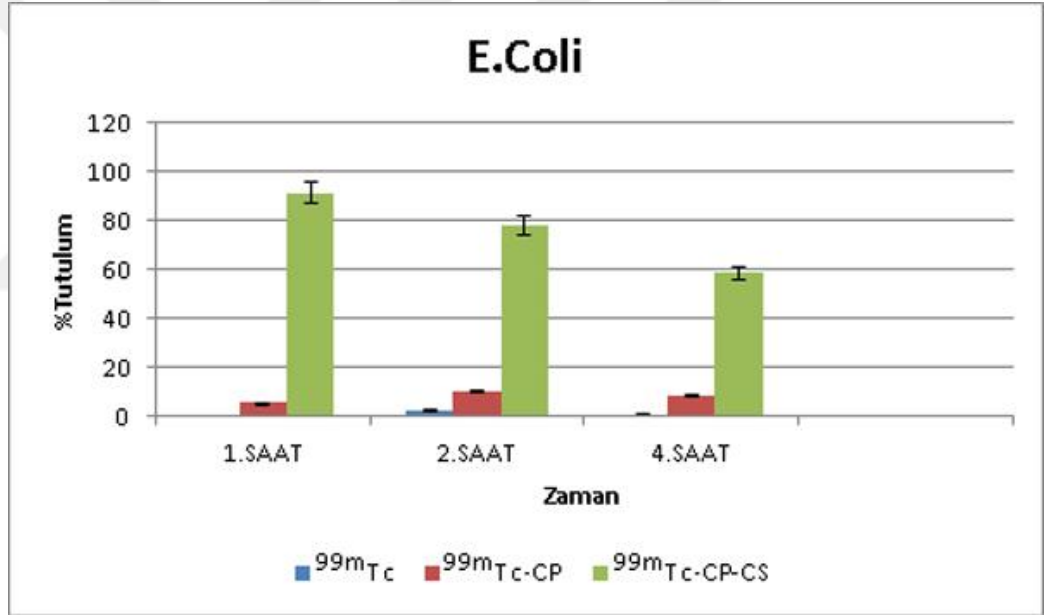
Radyoişaretli CP'nin 240. dakika boyunca stabil olduğu görülmüştür. Radyoişaretli CP-CS nanoparçacıkların ise stabilitesi artmış görünmektedir. Bunun sebebi kitosan nanoparçacıkların kararlılığının yüksek olması ve Sefpodoksim Proksetilin yüklü kitosan nanoparçacığında stabil olduğu görülür. Literatürde farklı polimerik (metilselüloz, sodyum alginat, ve kitosan) mikroparçacıklar kullanılarak Sefpodoksim Proksetilin biyoyararlanımının artırılması ve çözünme çalışmaları yapmışlar ve polimerler saf ilaçla karşılaştırıldığında çözünme hızında belirgin bir artış olduğunu göstermektedirler. Sefpodoksim proksetil mikroparçacıkların çözünme hızında görülen önemli bir gelişme ilaç parçacıkların polimer ıslatma etkisi, değişen yüzey morfolojisi ve mikroparçacık yapısına atfedilmiştir (Khan et al., 2010). Optimize edilmiş mikroparçacıkların, depolamada mükemmel stabilite sergilediği tespit edilmiş ve ilacın maksimum çözülmesinin kitosan parçacıkları ile gerçekleştiği bulunmuştur (% 96,051± 3,6) (Khan et al., 2010). Hidrofobik

ilaçların nanoparçacıklarla hedefe taşınımı sağlandığı gibi çözünürlüğünün arttırılmasında ayrı önem arz etmektedir.

Deney sonuçları değerlendirildiğinde radyoişaretle bileşiklerin raf ömrünün *in vivo* çalışma için yeteri kadar uzun olduğu saptanmıştır.

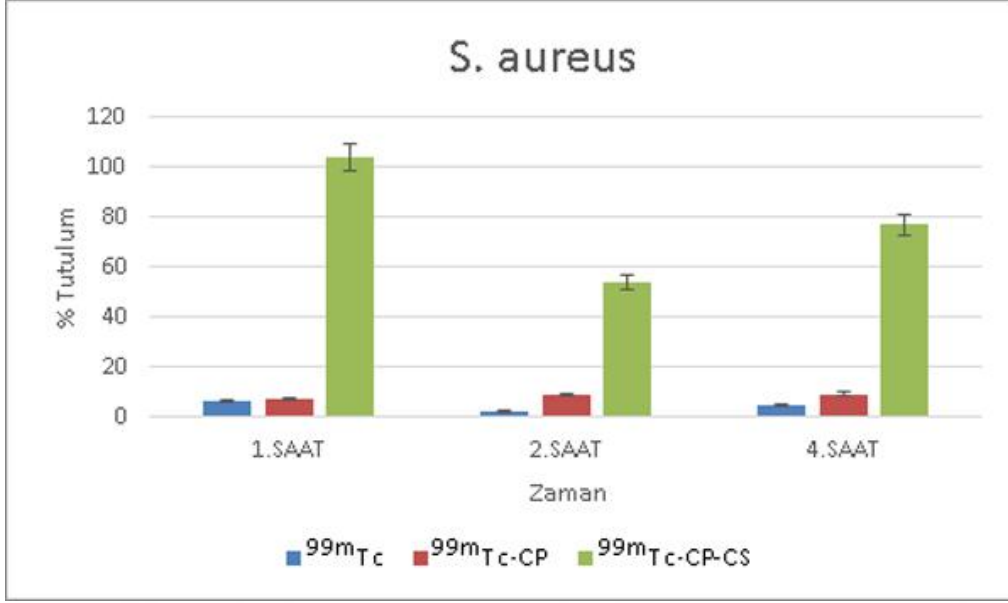
4.5 *In vitro* Tutulum Deneyleri Sonuçları

E. coli'de ^{99m}Tc -CP-CS nanoparçacıklarının bağlanma verimleri (1. saat % 91,2; 2. saatte % 77,9 ; 4. saatte % 58,3), ^{99m}Tc -CP'de ise (1. saat % 6,6; 2. saatte % 8,6; 4. saatte % 10,3), ^{99m}Tc bağlanma verimleri 1. saat % 0,20; 2. saatte % 0,24; 4. saatte % 0,52 olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.19)



Şekil 4.19 $^{99m}\text{Tc-CP-CS}$, $^{99m}\text{Tc-CP}$ ve $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 'un *E. coli* bakterisinde tutulumu

Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu *in vitro* tutulum çalışması sonuçlarına göre (Şekil 4.20) *S. aureus* için $^{99m}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparçacıkların bağlanma verimi 1. saatte % 99,3 iken; 2. saatte % 68,9; 4. saatte % 76,9, $^{99m}\text{Tc-CP}$ 'nin bağlanma verimi ise 1. saatte % 7,2 idi; 2. saatte % 9,3; 4. saatte % 9,5, ^{99m}Tc bağlanma verimleri 1. saat % 7; 2. saatte % 3; 4. saatte % 5 bulunmuştur.



Şekil 4.20 $^{99m}\text{Tc-CP-CS}$, $^{99m}\text{Tc-CP}$ ve $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 'un *S. aureus* bakterisinde tutulumu

In vitro tutulum çalışması sonuçları *S.aureus*'ta $^{99m}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparçacıklarının tutulum veriminin $^{99m}\text{Tc-CP}$ 'den daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Elde edilen veriler sonucunda $^{99m}\text{Tc-CP-CS}$ nanoparçacıklar, $^{99m}\text{Tc-CP}$ 'den daha iyi tutulum göstermiştir. Bu kitosanın antibakteriyel etkiye sahip olmasının ve aynı zamanda nanoparçacıkların gözenekli yapıları ve artan yüzey alanları nedeniyle ilacı adsorbe edebilme kapasitelerinin artmasının sonucudur. Nanoparçacığın ilaç taşıyıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır.

Mujtaba ve arkadaşları, Sefpodoksim Proksetil'i, kitosan alginat boncuklarına yüklemişler. Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan-aljinat taneciklerinin antimikrobiyel etkinliğinin, artan inkübasyon süresi ve artan ilaç konsantrasyonu ile arttığını belirlemişlerdir (Mujtaba et al., 2014).

Yapılan çalışmalar sonucunda CP-CS nanoparçacıkların MRSA bakterilerde umut vaat eden bir antibakteriyel etki göstermekte olduğu ve işaretli CP-CS nanoparçacıkların enfeksiyon görüntüleme ve teşhisinde potansiyel bir nükleer görüntüleme ajanı olabileceği görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında Sefpodoksim Proksetil kitosan nanoparçacıklarına yüklenerek radyoişaretlenmesi ^{99m}Tc ile gerçekleştirilmiş ve antibakteriyel aktivitesi *in vitro* olarak incelenmiştir. Radyoişaretli Sefpodoksim Proksetil ve Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların kalite kontrol çalışması TLRC yöntemi ile yapılmış ve radyoişaretleme veriminin sırasıyla % 89 ± 3 ve % 94 ± 2 olduğu saptanmıştır.

Kitosan nanoparçacıkların ve Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkların karakterizasyonu boyut ve zeta potansiyeli ölçülerek nanoparçacıkların sırasıyla 41-200.9 nm; 119.2-332 nm arasında boyuta ve zeta potansiyelleri ise yaklaşık olarak +52 mV ; +51.2 mV olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, uygun boyutlara sahip ve zeta potansiyelleriyle uzun vadeli stabiliteye sahip nanoparçacıklar sentezlendiğini göstermektedir.

Sefpodoksim Proksetil kitosan nanoparçacıklarına % 82 ± 2 gibi yüksek verimle yüklenmiştir. 20 mg kitosana 20 mg oranında ilaç ekleyerek çalışma gerçekleştirilmiştir ve 16.38 mg ilaç yüklendiği hesaplanmıştır.

Yapılan *in vitro* stabilite sonucunda radyoişaretli CP-CS nanoparçacıklarının daha uzun süre stabil kaldığı görülmektedir. Enfeksiyon görüntüleme için radyoişaretli CP-CS nanoparçacıkların yeterli raf ömrüne sahip olduğu tespit edilmiştir.

In vitro tutulum çalışmaları, ^{99m}Tc -CP-CS nanoparçacıklarının *E. coli*'de bağlanma etkinlikleri 1. saatte % 91.2 ile *S. aureus* için ise en yüksek tutulum 1 saatte % 99.3 olmuştur. ^{99m}Tc -CP nanoparçacıklarının *E. coli*'de bağlanma etkinlikleri 4. saatte % 10.3 ile *S. aureus* için ise tutulum 4. saatte % 9.5 olduğu tespit edilmiştir. ^{99m}Tc -CP-CS nanoparçacıkların, ^{99m}Tc -CP'den daha iyi tutulum göstermiştir. İşaretli Sefpodoksim Proksetil yüklü kitosan nanoparçacıkları her iki bakteride antibakteriyel etki göstermekte ve işaretli Sefpodoksim yüklü kitosan nanoparçacıkların enfeksiyon teşhisinde ve görüntülenmesinde nükleer görüntüleme ajanı olarak umut vaat etmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abram, U. and Alberto, R.**, 2006, Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications, Journal of Brazilian Chemical Society, 17(8):1486-1500pp.
- Agrawal, P., Strijkers, G.J. and Nicolay K.**, 2010, Chitosan-based systems for molecular imaging. Adv Drug Deliv Rev., 62(1):42-58 pp.
- Aider, M.**, 2010, Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review, LWT - Food Science and Technology, 43(6):837-842pp.
- Akbar, A. and Shakeel A.**, 2018, A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery, International Journal of Biological Macromolecules, 109: 273-286 pp.
- Alberto, R., Schibli, R., Egli, A. and Schubiger, A.P.**, 1999, First application of *fac* [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] $^+$ in bioorganometallic chemistry: Desing, structure and invitro affinity of a 5-HT_{1A} receptor ligand labeled with ^{99m}Tc , J. Am. Chem. Soc., 121:6076-6077pp.
- Alexander, K., Drost, W. T., Mattoon, J. S., Kowalski, J. J., Funk, J. A., and Crabtree, A. C.**, 2005, Binding of ciprofloxacin labelled with technetium Tc 99m versus ^{99m}Tc -pertechnetate to a live and killed equine isolate of *Escherichia coli*, Canadian Journal of Veterinary Research, 69(4), 272–277.
- Borin, M.T. A.**, 1991, Review of the pharmacokinetics of cefpodoxime proxetil. Drugs., 42 Suppl 3:13-21pp.
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L. and Alonso, M.J.**, 1997, Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers, Journal of Applied Polymer Science, 63:125-132.
- Campbell, I. E., Rosenbaum, D. M., and Gonser, B. W.**, 1959, The availability, recovery and properties of rhenium metal. Journal of the Less Common Metals, 1(3):185-191.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clogston J.D. and Patri, A.K.**, 2011, Zeta potential measurement, *Methods Mol Biol.* 697:63-70pp.
- Cureo, R.G., Osuji, G., Washington, A.**, 1991., N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc, *Biotechnol. Lett.* 13: 441-444pp..
- De Campos, A.M., Sánchez, A. and Alonso, M.J.**, 2001, Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm*, 224(1-2):159-168pp.
- Dekker, M. and Jonsson, J.A.**, 1987, *Chromatographic Theory and Basic Principles*, New York,
- Fei L.X., Lin, G.Y., Zhi, Y.D., Li, Z. and De Y.K.**, 2001, Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *J. Appl. Polym. Sci.*, 79:1324-1335pp.
- Felt, O., Furrer, P., Mayer, J.M., Plazonnet, B., Buri, P. and Gurny, R.**, 1999, Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention., *Int J Pharm.*, 180(2):185-193.
- Feng, C., Li, J., Kong, M., Liu, Y., Cheng, X.J. and Li, Y.**, 2015, Surface charge effect on mucoadhesion of chitosan based nanogels for local anti-colorectal cancer drug delivery, *Colloids Surf B*, 128:439-447pp.
- Fernandes, J.C., Tavaría, F.K., Soares, J.C., Ramos, O.S., João Monteiro, M., Pintado, M.E. and Xavier Malcata, F.**, 2008, Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems, *Food Microbiol.*, 25:922-928pp.
- Garg, A., Visht, S., Sharma, P. K. and Kumar, N.**, 2011, Formulation, characterization and application on nanoparticle: a review, *Der Pharmacia Sinica*, 2(2):10p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gazori, T., Khoshayand, M. R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A. and Haririan, I.**, 2009, Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: formulation, optimization and *in vitro* characterization, *Carbohydr. Polym.*, 77:599–606pp.
- Goy, R.C., Britto, D. And Assis, O.B.G.**, 2009, A review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polímeros*, 19(3):241-247pp.
- Gökçe, Y.**, 2008, Kitosan nanoparçacıklarının sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L. and Li, P.**, 2008, The Influence of Molecular Weight of Quaternized Chitosan on Antifungal Activity, *Carbohydr. Polym.*, 71:694-697pp.
- Gündoğdu, E.A., Özgenç E., Ekinci M., Özdemir, D.İ. ve Aşıkoğlu, M.**, 2018, Nükleer Tıpta Görüntüleme ve Tedavide Kullanılan Radyofarmasötikler, *J. Lit. Pharm Sci.*, 7(1):24-34s.
- Huang, H. and Yang, X.** 2004, Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method, *Carbohydr. Res.*, 339(15):2627-2631pp.
- Huh, A.J. and Kwon, Y.J.**, 2011, Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotic resistant era, *J. Control. Release*, 156:128-145pp.
- Işık B.**, 2017, Polimer-metal oksit kompozitleri kullanarak radyoaktif iyon uzaklaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi
- İnfex İlaç Prospektüsü.** “Infex 200 Mg 20 Film Tablet Farmokokinetik Özellikleri”, <https://www.ilacprospektusu.com/ilac/442/infex-200-mg-20-film-tablet>İnfex ilaç prespektüsü (Erişim tarihi: 8 Haziran 2018)
- Jamil, B., Habib, H., Abbasi, S., Nasir, H., Rahman, A., Rehman, A., Bokhari, H. and Imran, M.**, 2016, Cefazolin loaded chitosan nanoparticles to cure multi drug resistant Gram-negative pathogens. *Carbohydr Polym*, 136:682-691pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Janes, K.A., Fresneau, M.P., Marazuela, A., Fabra, A. and Alonso, M.J.,** 2001, Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin, *J. Control Release*, 73(2-3):255-267pp.
- Jia, Z., Shen, D. and Xu, W.,** 2001, Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan, *Carbohydr Res.* 333(1):1-6pp.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., and Burns, D. T.,** 1990, Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods. Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I. Volume 1a: VCH, Weinheim, *Analytica Chimica Acta*, 237:511-512pp.
- Kakumanu, V.K., Arora, V. and Bansal, A.K.,** 2006, Investigation of factors responsible for low oral bioavailability of cefpodoxime proxetil., *Int J Pharm.*, 317(2):155-160pp.
- Khan, F., Katara, and R., & Ramteke, S.** 2010. Enhancement of Bioavailability of Cefpodoxime Proxetil Using Different Polymeric Microparticles. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1368–1375 pp.
- Kim, T.H., Park, I.K., Nah, J.W., Choi, Y.J. and Cho, C.S.,** 2004, Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. *Biomaterials*, 25(17):3783-92pp.
- Knaul, J. Z., Hudson, S. M. and Creber, K. A.,** 1999, Improved mechanical properties of chitosan fibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 72: 1721-1732 pp.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. and Park, H.J.,** 2010, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *Int. J. Food Microbiol.*, 144(1):51-63.
- Kumar, M., Behera, A.K., Lockey, R.F., Zhang, J., Bhullar, G., De La Cruz, C.P. Chen, L.C., Leong, K.W., Huang, S.K., and Mohapatra, S.S.,** 2002, Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection, *Hum Gene Ther.*, 13(12):1415-1425.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, D.W., Powers, K. and Baney, R.,** 2004, Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 58(4):371-377 pp.
- Löbenberg, R, Amidon, G.L.,** 2000, Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards., *Eur J Pharm Biopharm.*, 50(1):3-12pp.
- Magetsari, R., Dewo, P., Saputro, B.K. and Lanodiyu, Z.,** 2014, Cinnamon oil and chitosan coating on orthopaedic implant surface for prevention of staphylococcus epidermidis biofilm formation., *Malays Orthop J.*, 8(3):11-14 pp.
- Maina, T., Stolz, B., Albert, R. et al.,** 1994, Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219–387) labelled with technetium-99m, *European Journal of Nuclear Medicine*. 21: 437-444pp.
- Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Wang, Y., August, J.T. and Leong, K.W.,** 2001, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency, *J Control Release*. 70(3):399-421pp.
- Marpu, S.B. and Benton E.N.,** 2018, Shining Light on Chitosan: A Review on the Usage of Chitosan for Photonics and Nanomaterials Research., *Int. J. Mol. Sci.*, 19(6)p.
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H. and Elaissari, A.,** (2015). Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 30:391–396pp.
- Mujtaba, A., Ali M., and Kohli K.,** 2014, Formulation of extended release cefpodoxime proxetil chitosan-alginate beads using quality by design approach., *Int J. Biol. Macromol.*, 69:420-429 pp.
- Muzarelli R.A.A.,** 1977, *Chitin*, Pergamon Press, Oxford,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muzarelli, R.A.A.**, 1996, Chitosan-based dietary foods, *Carbohydrate Polymers*, 29, 309-316 pp.
- Needleman, I.G., Smales, F.C. and Martin, G.P.**, 1997, An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery., *J Clin Periodontol.*, 24(6):394-400.
- Neves, A.L.P, Milioli, C.C., Müller, L., Riella, H.G., Kuhnen, N.C., and Stulzer, H.K.**, 2014, Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445:34-39pp,
- No, H.K., Park, N.Y, and Lee S.H.**, 2002, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol.* 74(1-2):65-72 pp.
- Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G., Hao, J.S., Cui, F.D.**, 2002, Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo, *Int J Pharm*, 249(1-2):139-147pp
- Patil, S.H. and Talele, G.S.**, 2014, Natural gum as mucoadhesive controlled release carriers: evaluation of Cefpodoxime Proxetil by D-Optimal design technique, *Drug Delivery*, 21:2, 118-129pp.
- Portero, A., Remuñán-López, C., Criado, M.T. and Alonso, M.J.**, 2002 Reacetylated chitosan microspheres for controlled delivery of anti-microbial agents to the gastric mucosa, *J. Microencapsul*, 19(6):797-809pp.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou, X.**, 2004, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles *Carbohydr Res*, 339:2693-2700pp.
- Raafat, D., and Sahl H.G.**, 2009, Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey., *Microb Biotechnol.*, 2(2):186-201pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rabea, E.I., Badawy, M.E., Stevens, C.V., Smaghe, G., Steurbaut, W.,** 2003, Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4:1457-1465pp.
- Rao, M.S., Kanat, S.R., Chander, R. and Sharma, A.** Dec 2005-Jan 2006. What makes radiation processed chitosan a novel food preservative, *Times Food Processing Journal*.
- Ribeiro, T. G., Chávez-Fumagalli, M. A., Valadares, D. G., França, J. R., Rodrigues, L. B., Duarte, M. C. and Faraco, A.A,** 2014, Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 9:877–890.
- Roy, K., Mao H.Q., Huang S.K. and Leong, K.W.,** 1999, Oral gene delivery with chitosan—DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med*, 5(4):387-391pp.
- Ruel-Gariépy, E. and Leroux, J.,** Chitosan: 2006, A Natural Polycation with Multiple Applications; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 243–259pp.
- Singh, B., Mittal, B. R., Bhattaghyra, A., Aggarwal, A., Nagi, O. N., and Singh, A. K.,** 2005, Technetium- 99m ciprofloxacin imaging in the diagnosis of postsurgical bony infection and evaluation of the response to antibiotic therapy: A case report, *Journal of Orthopaedic Surgery*, 13:190-194pp.
- Sobhani, Z., Mohammadi Samani, S., Montaseri, H., and Khezri, E.,** 2017, Nanoparticles of Chitosan Loaded Ciprofloxacin: Fabrication and Antimicrobial Activity, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(3):427–432.
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G. and Knorr, D.,** 1992, Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnol*, 6, 257–272pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sugimoto, M., Okagaki T., Narisawa S., Koida Y., and Nakajima K.,** 1998, Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of poorly water-soluble drugs by novel cogrinding method using water-soluble polymer., *Int. J. Pharm.*, 160:11–19pp.
- Thandapani, G, P, S.P., P., N., S., Sukumaran, A.,** 2017, Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles, *Int J Biol Macromol.* 104(Pt B):1794-1806pp.
- Tikhonov, V.E, Stepnova, E.A, Babak, V.G, Yamskov I.A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H.B, Llorca, L.V.L, Salinas, J., Gerasimenko, D.V., Avdienko, I.D., and Varlamov, V.P.,** 2006, Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives, *Carbohydrate Polymers*, 64:66-72pp.
- Tin, S., Sakharkar, K.R., Lim, C.S. and Sakharkar, M.K.,** 2009, Activity of chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. Biol. Sci.* 5:153-160pp.
- Tran, P. A., Zhang, L. and Webster, T.J.,** 2009, Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine, *Advanced drug delivery reviews*, 61(12):1097-114pp.
- Tuncel. A.,** 2016, İmidazolyum bileşiğinin I-131 ile işaretlenmesi, enfeksiyon dedeksiyon potansiyelinin değerlendirilmesi, Yüksek lisans tezi, Ege üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., and Shakesheff, K. M.,** 1999, Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*, 99(11):3181-3198pp.
- van der Lubben, I.M., Verhoef J.C., Borchard G. and Junginger H.E.,** 2001, Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 52(2):139-44pp.
- Wazed, A., Joshi, M. And Rajendran, S.,** 2010, Modulation of Size, Shape and Surface Charge of Chitosan Nanoparticles with Reference to Antimicrobial Activity, *Advanced Science Letters*, 3:452-460pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wiedemann, B, Luhmer, E, and Zühlsdorf, M.T.,** 1991, Microbiological evaluation of cefpodoxime proxetil. *Drugs.*, 42 Suppl 3:6-12pp.
- Xu, Y. and Du, Y.,** 2003, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *Int J Pharm.* 250(1):215-226pp.
- Yokota T¹, Suzuki E, Arai K.,** 1988, Cefpodoxime proxetil, its in vitro antibacterial activity, affinity to bacterial penicillin-binding proteins, and synergy of bactericidal activity with serum complement and mouse-cultured macrophages, *Drugs Exp Clin Res.* 14(8):495-500.
- Yurt Lambrecht, F.,** 2010, Evaluation of ^{99m}Tc-labeled antibiotics for infection detection, *Ann. Nucl. Med.*, 25:1–6 pp.
- Zhang, H., Jung, J. and Zhao, Y.,** 2016, Preparation, characterization and evaluation of antibacterial activity of catechins and catechins-Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles of different particle sizes, *Carbohydr. Polym.* 137:82–91pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Derya ÖZEL

Doğum Yeri: İZMİR

Doğum Yılı: 26.06.1981

Öğrenim Durumu:

Lisans: Dokuz Eylül Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

Tezsiz Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği