

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİ(D,L-LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) ENKAPSÜLE JUGLON
NANOPARTİKÜLLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

BÜŞRA GÜMÜŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. TÜLİN ARASOĞLU**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİ(D,L-LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) ENKAPSÜLE JUGLON
NANOPARTİKÜLLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

Büşra GÜMÜŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 19.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

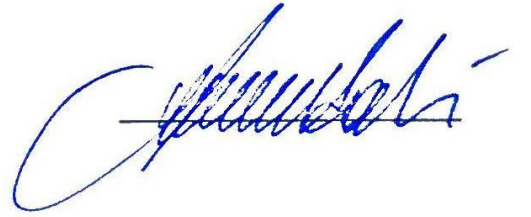
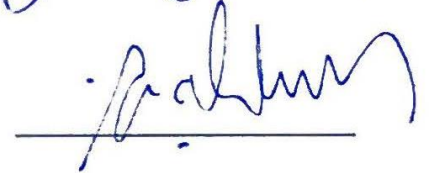
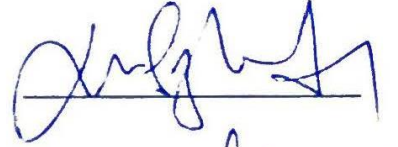
Yrd. Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN
Yeditepe Üniversitesi



ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her zaman bana yol gösteren ve destek olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Tülin Arasoğlu'na;

Bilgi ve fikirleriyle sürekli yanımda olan Doç. Dr. Serap Derman'a;

Bana sabırla yardımcı olan ve yorumlarıyla çalışmalarımı katkıda bulunan Tayfun Acar'a;

Aynı laboratuvarında çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşlarım Büşra Koçyiğit ve Tuğba Atabey'e;

Konfokal mikroskopi analizlerini gerçekleştirmeme olanak tanıyan Prof. Dr. Fikrettin Şahin'e;

Tez yazım sürecinde sahip olabileceğim en iyi ev arkadaşı olan Hilal Efe'ye ve ailesine;

En büyük moral kaynağım, yeğenim Mete Karataş başta olmak üzere tüm aileme desteklerinden dolayı içtenlikle teşekkür ederim.

Aralık, 2017

Büşra GÜMÜŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin amacı.....	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Nanoteknoloji.....	4
2.2 İlaç Taşıyıcı Nanopartiküler Sistemler	5
2.3 Polimerik Nanopartiküller	6
2.4 Nanopartikül Üretimi	7
2.4.1 Kullanılan Polimerler	7
2.4.1.1 PLGA.....	8
2.4.2 Yöntemler	9
2.4.2.1 Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi	9
2.4.2.2 Tekli Emülsiyon (w/o) Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi	9
2.4.2.3 İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi ...	9
2.4.2.4 Salting-Out Yöntemi	10
2.4.2.5 Nanoçöktürme Yöntemi	10
2.4.2.6 Diyaliz.....	10
2.4.2.7 Süperkritik Sıvı Teknolojisi	10
2.5 Nanopartiküllerin kullanım alanları ve antimikrobiyal etkisi	11

2.6 Allelopati ve allelokimyasallar.....	12
2.6.1 Ceviz ağacı ve juglon.....	13
2.6.1.1 Ceviz ağacı ekstraktları ve juglonun antimikrobiyal etkisi.....	15
2.7 <i>Candida albicans</i>	16
2.8 Biyofilm yapısı ve oluşumu.....	17
2.9 <i>Candida albicans</i> biyofilm oluşumunun genetik kontrolü	22
2.10 <i>Candida albicans</i> biyofilmlerinde antifungal direnç mekanizmaları.....	24

BÖLÜM 3

DENEYSSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1 Kullanılan Cihazlar	26
3.2 Kullanılan Kimyasallar	27
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması.....	28
3.4 Metotlar	30
3.4.1 Juglon-PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	30
3.4.1.1 Juglonun UV Standart Eğrisi	30
3.4.1.2 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi.....	32
3.4.1.3 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması	32
3.4.1.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması.....	32
3.4.1.5 Etken Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması	33
3.4.1.6 Zeta Sizer Analizi.....	33
3.4.1.7 SEM Analizi	33
3.4.1.8 FT-IR Analizi	33
3.4.1.9 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salımı.....	33
3.4.2 Antibiyofilm Çalışmalar	34
3.4.2.1 <i>Candida albicans</i> süspansiyonunun hazırlanması	34
3.4.2.2 Juglon ve Juglon-PLGA Nanopartikülleri Solüsyonlarının Hazırlanması.....	34
3.4.2.3 Juglon ve Juglon-PLGA Nanopartiküllerinin Biyofilm Oluşumu Ve Önceden Oluşturulmuş Biyofilmler Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	35
3.4.2.3.1 XTT Analizi	36
3.4.2.3.2 Kristal Viyole Analizi.....	37
3.4.2.3.3 Standart petri sayımı çalışması	37
3.4.2.3.4 Konfokal mikroskop ile görüntüleme.....	38
3.4.3 Membran depolarizasyon analizi	38

BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI.....	41
4.1 Juglon-PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu	41
4.1.1 Reaksiyon verimi	42
4.1.2 Enkapsülasyon etkinliği	42
4.1.3 İlaç yüklenme verimi	42
4.1.4 Boyut (Z-Ave).....	42
4.1.5 Çoklu dağılım indeksi (PDI).....	42
4.1.6 SEM analizi	44
4.1.7 FT-IR analizi.....	44

4.1.8 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salımı	45
4.2 Antibiyofilm Çalışmalar	46
4.2.1 XTT analizi.....	46
4.2.2 Kristal viyole analizi	49
4.2.3 Standart petri sayımı	51
4.2.4 Konfokal mikroskop ile görüntüleme	54
4.3 Membran depolarizasyon analizi	60
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGE LİSTESİ

°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
g	Gram
kV	Kilovolt
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
nm	Nanometre
rpm	Dakikada dönme hızı
W	Watt
x g	Yerçekimi ivmesi ile çarpım
λ	Dalgaboyu

KISALTMA LİSTESİ

CFU	Colony forming unit
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DCM	Diklorometan
DL	Drug loading
ECM	Extracellular matrix
EE	Encapsulation efficiency
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier transform infrared
KCl	Potasyum klörür
MBİK	Minimum biyofilm inhibitör konsantrasyonu
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
PBS	Fosfat tamponu
PDI	Particle distribution index
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
QSM	Quorum sensing molekülü
RESS	Rapid expansion of supercritical solution
RY	Reaction yield
SAS	Supercritical anti-solvent
SEM	Scanning electron microscopy
UV	Ultraviolet
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 İlaç taşınmasında kullanılan nanopartiküller. (a) Lipozom, (b) polimerik nanopartikül, (c) katı lipid nanopartikül, (d) dendrimer. Hidrofobik ilaçlar, hidrofilik ilaçlar, hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar [35].....	5
Şekil 2.2 Nanopartikül çeşitleri; (a) nanokapsül, (b) nanoküre [38]	7
Şekil 2.3 PLGA'nın kimyasal yapısı (m: laktik asit sayısı, n: glikolik asit sayısı) [16].....	8
Şekil 2.4 PLGA'nın laktik ve glikolik aside degradasyonu [16]	9
Şekil 2.5 Juglonun yapısı	14
Şekil 2.6 (a) Maya, (b) psödohif ve (c) hif yapıları [62]	17
Şekil 2.7 <i>C. albicans</i> biyofilm modeli [65]	19
Şekil 2.8 Farklı yüzeylerde <i>C. albicans</i> biyofilminin oluşum evreleri [66].....	20
Şekil 2.9 <i>C. albicans</i> biyofilminde SEM ile görüntülenen su kanalları [2]	21
Şekil 3.1 Juglonun UV-Vis Spektrumu	30
Şekil 3.2 Juglonun kalibrasyon eğrisi	31
Şekil 3.3 Biyofilm çalışmaları planı.....	36
Şekil 3.4 Farklı konsantrasyonlardaki DiSC3(5) solüsyonlarının floresans ölçüm sonuçları	39
Şekil 4.1 JB-1'e ait boyut dağılım grafiği	43
Şekil 4.2 JB-2'ye ait boyut dağılım grafiği	43
Şekil 4.3 JB-3'e ait boyut dağılım grafiği	43
Şekil 4.4 JB-1 nanopartiküllerine ait 10.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü	44
Şekil 4.5 FT-IR analiz sonuçları	45
Şekil 4.6 JB-1, JB-2 ve JB-3'ün saatlere göre salım grafiği.....	45
Şekil 4.7 JB-1, JB-2 ve JB-3'ün günlere göre salım grafiği	46
Şekil 4.8 XTT analizine göre juglon ve Fluconazole'un biyofilm oluşumu üzerine etkisi	48
Şekil 4.9 XTT boyaması öncesi kuyucuklar	48

Şekil 4.10 Kristal viyole analizine göre juglon ve Fluconazole'un biyofilm oluşumu üzerine etkisi	49
Şekil 4.11 6 saatlik <i>C. albicans</i> biyofilmleri için etken madde dozuna bağlı % inhibisyon değerleri.....	50
Şekil 4.12 Juglonun renginin kristal viyole analizine etkisi. (a) yıkama sonrası kuyucuklarda kalan juglon, (b) absorban ölçümü öncesi kuyucuklar.	51
Şekil 4.13 Su çözücü kontrolü (dilüsyon faktörü: 10)	52
Şekil 4.14 Su (dilüsyon faktörü: 10 ²) ve etanol (direkt ekim) çözücü kontrolleri	52
Şekil 4.15 Suda çözülen juglonun etkisi (0.625 mg/ml) (dilüsyon faktörü: 10)	53
Şekil 4.16 10 mg Fluconazole'un etkisi (dilüsyon faktörü: 10 ²)	54
Şekil 4.17 Biyofilm oluşumu çalışmasında su ve etanol çözücü kontrolleri	55
Şekil 4.18 Fluconazole'un biyofilm oluşumuna etkisi	55
Şekil 4.19 Suda çözülen juglonun biyofilm oluşumuna etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)	56
Şekil 4.20 Etanolde çözülen juglonun biyofilm oluşumuna etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)	56
Şekil 4.21 Juglon-PLGA nanopartiküllerinin biyofilm oluşumuna etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml'ye eşdeğer konsantrasyonlar)	57
Şekil 4.22 6 saatlik biyofilmlerde su ve etanol çözücü kontrolleri.....	57
Şekil 4.23 10 mg/ml ve 5 mg/ml Fluconazole'un 6 saatlik biyofilmlere etkisi.....	58
Şekil 4.24 Suda çözülen juglonun 6 saatlik biyofilmlere etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)...	58
Şekil 4.25 Etanolde çözülen juglonun 6 saatlik biyofilmlere etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)	59
Şekil 4.26 Juglon-PLGA nanopartiküllerinin 6 saatlik biyofilmlere etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml'ye eşdeğer konsantrasyonlar)	59
Şekil 4.27 Farklı konsantrasyonlarda DiSC3(5) kullanılarak hazırlanan örneklerin 0. saatteki floresans yoğunlukları	60
Şekil 4.28 0.0025 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 1. saat floresans ölçüm sonuçları.....	61
Şekil 4.29 0.0025 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 3. saat floresans ölçüm sonuçları.....	61
Şekil 4.30 0.0025 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 24. saat floresans ölçüm sonuçları.....	62
Şekil 4.31 0.00125 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 1. saat floresans ölçüm sonuçları.....	62
Şekil 4.32 0.00125 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 3. saat floresans ölçüm sonuçları.....	63

Şekil 4.33 0.00125 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 24. saat floresans ölçüm sonuçları.....	63
Şekil 4.34 0.0005 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 1. saat floresans ölçüm sonuçları.....	64
Şekil 4.35 0.0005 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 3. saat floresans ölçüm sonuçları.....	64
Şekil 4.36 0.0005 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 24. saat floresans ölçüm sonuçları.....	65

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Juglonun farklı konsantrasyonlardaki absorbanans değerleri (424 nm'de).....	31
Çizelge 4.1 Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyon verileri	41

**POLİ(D,L-LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT) ENKAPSÜLE JUGLON
NANOPARTİKÜLLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

Büşra GÜMÜŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Bu tezde, antimikrobiyal aktiviteye sahip bir sekonder metabolit olan juglon molekülü, tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) içine enkapsüle edilerek nanopartiküler sistemler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Üretilen nanopartiküllerin *Candida albicans* biyofilmi üzerindeki etkisi; XTT, kristal viyole, standart Petri sayımı, konfokal mikroskopi ve membran depolarizasyon analizleri gerçekleştirilerek serbest juglon ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; turuncu-kahverengi bir boyar madde olan juglonun, XTT ve kristal viyole analizlerinin sonuçlarında sapmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Standart Petri sayımı ve konfokal mikroskopi çalışmalarında ise anlamlı ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Serbest juglon ve juglon enkapsüle PLGA nanopartiküler sistemlerinin, uygulanan tüm dozlarda, *C. albicans* biyofilminin oluşumunu ve önceden oluşturulmuş 6 saatlik biyofilmleri yüksek oranda (%98 - 100) inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, membran depolarizasyon analizi ile juglon ve juglon-PLGA nanopartiküllerinin *C. albicans* membran yapısı üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Juglon-PLGA nanopartiküllerinin antibiyofilm etkisinin aynı konsantrasyonda kullanılan juglon ile benzer olması; kontrollü salıma bağlı olarak çok daha az etken madde kullanılarak benzer etkinin sağlanmış olması ve literatüre göre PLGA nanopartiküler sistemin toksisiteyi

azaltmasından dolayı son derece önemlidir. İlaveten; bu çalışma, diğer antimikrobiyal etken maddelerin biyofilm üzerindeki etkisinin araştırılmasında faydalı bir model olabilir.

Anahtar kelimeler: juglon, PLGA, nanopartikül, antibiyofilm aktivite

EXAMINATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLY(D,L-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) ENCAPSULATED JUGLONE NANOPARTICLES

Büşra GÜMÜŞ

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Tülin ARASOĞLU

In this thesis, nanoparticulate systems were prepared by encapsulating juglone molecule, a secondary metabolite with antimicrobial activity, into poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by single emulsion solvent evaporation method and then characterized. The effect of the produced nanoparticles on *Candida albicans* biofilm was investigated in comparison with free juglone by performing XTT, crystal violet, standard plate count, confocal microscopy and membrane depolarization analyzes. As a result; juglone, an orange-brown dye, was found to cause deviations in the results of XTT and crystal violet analyzes. Significant and consistent results were obtained in the standard plate count and confocal microscopy studies. Juglone encapsulated PLGA nanoparticulate systems and free juglone were found to inhibit the formation of *C. albicans* biofilm and pre-formed 6-hour biofilms (98-100%) at all doses applied. Furthermore, membrane depolarization analysis showed that juglone and juglone-PLGA nanoparticles were effective on *C. albicans* membrane structure. It is extremely important that the antibiofilm effect of the juglone-PLGA nanoparticles is similar to that of the juglone used at the same concentration, since similar effect is provided by using less active substance due to controlled release and the PLGA nanoparticulate system

reduces toxicity according to the literature. Additionally, this work may be a useful model for investigating the effect of other antimicrobial agents on biofilm.

Keywords: juglone, PLGA, nanoparticle, antibiofilm activity

1.1 Literatür Özeti

Hareketsiz veya biyolojik yüzeylere tutunarak kümelenen ve kendi ürettikleri ekstrasellüler matriks ile kaplanan hücrelerden oluşan biyofilm, besin maddelerinin ve oksijenin iç katmanlara taşınmasını sağlayan su kanallarını da içeren oldukça kompleks bir yapıdır [1], [2]. Tüm mikrobiyal enfeksiyonların büyük bir kısmını oluşturan biyofilm enfeksiyonları, özellikle kalıcı tıbbi cihazlardan kaynaklanan enfeksiyonların artışıyla son yıllarda önem kazanmıştır. Bu tip enfeksiyonların en yaygın sorumlusu fungal bir patojen olan *Candida albicans*'tır [2], [3]. Fungal biyofilm hücreleri antifungal ajanlara karşı, bir yüzeye tutunmayan ve serbest yüzen planktonik hücrelere kıyasla 2000 kata kadar daha dirençli olduğundan, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi oldukça zor olmakta ve genellikle cerrahi müdahale gerektirmektedir [2], [4]. Morbidite ve mortalite oranlarının giderek artmasına sebep olan antifungal direnç mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, ekstrasellüler matriks ve biyofilm yapısı içinde bulunan ve persister hücreler olarak adlandırılan antimikrobiyal direnci yüksek hücrelerin varlığı, direnç genlerinin ekspresyonu ve değişen büyüme hızı gibi parametrelerin direnç gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir [5], [6], [7], [8], [9]. Antifungal direnç sebebiyle, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisi için gereken ilaç dozu, terapötik olarak kullanılacak en yüksek konsantrasyonun çok üzerinde olabilmektedir [10]. Bu sebeple, yeni ve etkili antifungal ajanların geliştirilmesi gerekmektedir.

Ceviz bitkisi (*Juglans* sp.), geleneksel tıpta deri ve tırnaktaki fungal enfeksiyonlar başta olmak üzere bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [11], [12]. Juglon molekülü (5-hidroksi-1,4-naftakinon) cevizin biyolojik aktivitesinden sorumludur [13]. Ancak suda çözünürlüğünün düşük olması ve toksik etkisi juglonun biyolojik sistemlerdeki kullanımını engellemektedir [14].

Sudaki çözünürlüklerinin düşük olması, sitotoksisite ve kimyasal kararsızlık gibi özellikleri sebebiyle verimli olarak kullanılamayan juglon ve benzeri birçok antimikrobiyal maddenin kullanımının sağlanmasında ümit vadeden bir strateji olan nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, son yıllarda oldukça fazla ilgi görmekte ve bu konuda birçok çalışma yapılmaktadır [15], [16]. Özellikle polimerik nanopartiküller, biyoyumlu ve biyobozunur yapıları ve içerdikleri etken maddenin kontrollü salımını yapabilme özellikleri sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedirler [15], [17]. Biyobozunur polimerlerin vücutta parçalanmasıyla ortaya çıkan ürünlerin, normal yollar vasıtasıyla metabolize edilebilmesi ve böylece herhangi bir yan etkiye sebep olmamaları büyük bir avantajdır [16], [18]. Nanopartiküler sistemlerin kullanımı, kontrollü salım sayesinde daha az miktarda etken madde kullanımına olanak tanımaktadır ve özellikle PLGA (poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit)) ile hazırlanan polimerik nanopartiküller, içerdikleri etken maddenin antimikrobiyal aktivitesini arttırmaktadır [19], [20]. Arasoğlu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen antifungal çalışmada, juglon molekülünün PLGA'ya enkapsülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin *C. albicans* hücrelerinde etkili olarak kullanılması sağlanmış ve juglonun serbest formuna kıyasla 4 kat yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [21].

1.2 Tezin amacı

Bu tez çalışmasında, antifungal özelliği bilinen juglon molekülünün PLGA içine enkapsülasyonu ile nanopartiküler sistemlerin hazırlanması ve karakterizasyonu, üretilen nanopartiküllerin *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumu ve önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkisinin serbest juglonla karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmaktadır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, juglon maddesinin nanopartiküler sistemlere yüklenmesi ile antibiyofilm aktivitesinin arttırılması hedeflenmektedir. Hazırlanan juglon nanopartiküllerinin, kontrollü salım ve biyouyumluluk özellikleri sebebiyle, biyofilmlerin oluşması ve bertarafında serbest juglona kıyasla daha etkili olacağı düşünülmektedir. Ayrıca gerçekleştirilen antibiyofilm çalışmaların, farklı antimikrobiyal etken maddelerin antibiyofilm aktivitelerinin incelenmesinde örnek teşkil edeceği ve ilaç sanayisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

“Nano” ön eki, Yunanca cüce manasına gelen “nanos” (Latince “nanus”) kelimesinden türemiştir ve bilimsel olarak bir büyüklüğün milyarda birini ifade eder [22].

Nanobilim, ilk olarak 1959 yılında, Richard Feynman’ın Amerikan Fizik Derneği’ne verdiği derste gündeme gelmiştir. Feynman konuşmasında çok küçük boyutta yapılacak çalışmalar ve imalatların faydalarını ön plana çıkarmış ve DNA moleküllerini okuyarak gen dizileyebilecek makinalardan elektron mikroskobuna kadar çeşitli fikirlerini açıklamıştır. O gün, o derste yapılan tahminlerin birçoğu günümüzde gerçekleşmiş olup; bugün “nanoteknoloji” diye adlandırdığımız bilim dalına dahildir [23]. “Nanoteknoloji” terimi ise Feynman tarafından değil, 1974’te Norio Taniguchi tarafından ortaya atılmıştır [24].

Nanoteknoloji, boyutları 1-100 nm aralığında değişen ve çok küçük boyutta olmalarının yanı sıra; büyük yüzey/kütle oranına sahip olmaları, yüksek reaktivite göstermeleri ve biyolojik sistemlerle benzersiz interaksyonlar kurabilmeleri gibi önemli ve eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahip olan maddelerle ilgilenen bir bilimdir [25]. Öncelikli olarak, mühendislik yöntemlerinden yararlanarak yeni özelliklere ve fonksiyonlara sahip materyaller, cihazlar ve sistemler yaratmayı amaçlar [26].

Nanoteknoloji; tekstilde [27], atık su arıtmasında [28], otomotiv endüstrisinde [29], elektronikte [30], gıda sektöründe [31], uzay çalışmalarında [32], adli tıpta [33], tarımda [34] ve ilaç endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır.

2.2 İlaç Taşıyıcı Nanopartiküler Sistemler

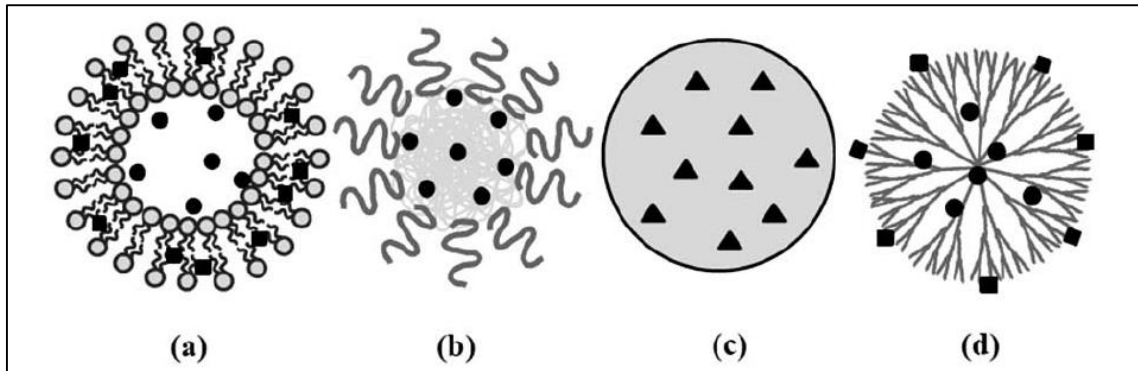
Farmasötik amaçla kullanılan nanopartiküller, boyutları 10 nm ile 1000 nm arasında değişen partiküllerdir. İlaç ya da etken madde nanopartikül içinde çözülür, enkapsüle edilir, yüzeyine adsorbe edilir veya bağlanır [17].

Lipozomlar, polimerik nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller (SLNs) ve dendrimerler ilaç taşınmasında en sık kullanılan sistemlerdir.

Lipozomlar, küresel ve çift tabakalı membran yapısına sahip olup hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçların taşınmasında kullanılabilirler. En önemli özellikleri ise, hücre zarını taklit eden yapıları sayesinde bakteriyel membranlarla kaynaşabilmeleri ve taşıdıkları ilacı direkt olarak membrana ya da hücre içine salabilmeleridir.

Katı lipid nanopartiküller, oda sıcaklığında katı halde bulunan lipidlerden oluşurlar. Hazırlanmaları için herhangi bir organik çözücü gerekmeyen bu partiküller, özellikle deri yüzeyinde ince bir film tabakası oluşturdukları ve uzun süre kalabildikleri için lokal uygulamalarda kullanılmak için idealdir.

Dendrimerler ise; bir çekirdek, etrafında dallanmış tekrarlı birimler ve son olarak da en dışta fonksiyonel gruplardan oluşan bir yapıya sahiptir. Dallanmış yapıları sayesinde yüzey alanları çok büyüktür ve katyonik yapıda olmaları da patojenlerle etkileşimlerini artırmaktadır [35].



Şekil 2.1 İlaç taşınmasında kullanılan nanopartiküller. (a) Lipozom, (b) polimerik nanopartikül, (c) katı lipid nanopartikül, (d) dendrimer. ● Hidrofobik ilaçlar, ■ hidrofilik ilaçlar, ▲ hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar [35].

Nanopartiküler sistemlerin kullanılmasıyla; ilaçların hedef bölgeye taşınması, biyoyararlanımlarının ve çözünürlüklerinin artırılması, kontrollü salımları ve enzimatik degradasyondan korunmaları mümkün olabilmektedir [15], [17].

İntravenöz taşınma açısından düşünüldüğünde, ilaç taşıyıcı partiküllerin kümelenme dolayısıyla damar tıkanıklığına yol açmaması büyük önem taşımaktadır. Bu yüzden, nanoboyutlu taşıyıcılar intravenöz taşınmaya mikropartiküllerden daha uygundur [17]. Ayrıca yine küçük boyutları ve mobiliteleri sayesinde, hücre içine alınma oranları daha yüksektir. Desai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 100 nm boyuttaki partiküllerin kolon adenokarsinoma epitel hücreleri içine alınma oranınının 1 µm partiküllere kıyasla 2.5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [36].

Yapılan çalışmalarla partikül boyutunun ilaç salımını da etkilediği gösterilmiştir. Partikülün boyutu küçüldükçe yüzey/hacim oranı artar; bu da demektir ki, ilaç veya etken maddenin daha büyük bir kısmı yüzeye yakın konumlanmış durumdadır. Bu sebeple salım daha hızlı bir şekilde gerçekleşir. Büyük boyutlu partiküllerde ise, etken maddenin kat etmesi gereken mesafe daha fazla olduğundan salım daha yavaş gerçekleşir [17].

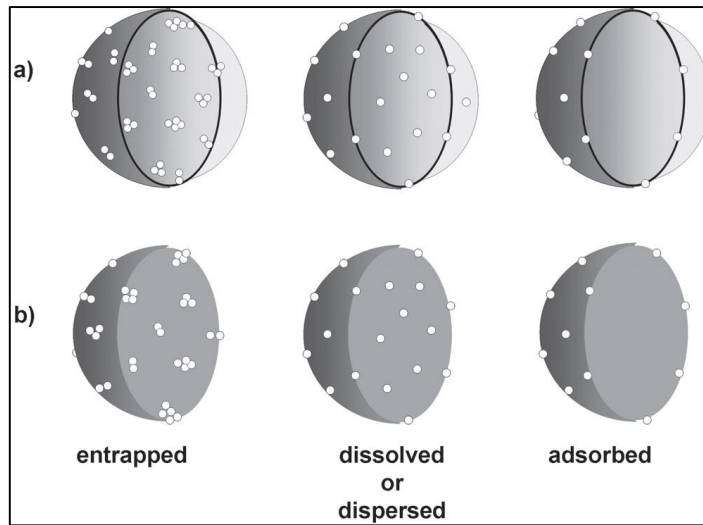
İntravenöz uygulamada nanopartiküller, immün sistem tarafından algılanıp fagositler tarafından temizlenebilirler. Bu açıdan, partiküllerin hidrofobisitesi büyük önem taşımaktadır. Oponizasyonu azaltmak ve ilaç taşıyıcı sistemin canlı içindeki sirkülasyonunu sağlayabilmek amacıyla nanopartiküllerin yüzeyi hidrofilik yapıda maddeyle kaplanmalı veya hidrofilik özellikte polimer kullanarak nanopartikül hazırlanmalıdır [17], [37].

Ayrıca ilaç taşıyıcı partiküllerin katyonik yüzey yüküne sahip olmaları hücrelerle etkileşimlerini artıracığından hücre içine alım oranını da artırır [37].

2.3 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller yapılarına göre nanokapsül veya nanoküre ismini alabilirler. Nanokapsüller etrafı polimerik bir membranla sarılmış bir kavite formunda iken, nanoküreler matriks sistemlerdir [17].

Polimerik nanopartiküller çok efektif olmalarının yanı sıra; doğal veya sentetik birçok farklı polimer ile tasarlanabildiklerinden, amaca yönelik sistemin tasarlanması konusunda esneklik sağlarlar. Polimerin moleküler ağırlığı, hidrofobisitesi, kristalliliği ve polidispersite indeksi gibi özelliklerine göre ilaç salımı kontrol edilebilir. En sık kullanılan polimerler poli (d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polilaktik asit (PLA), kitosan ve dekstrandır [16]. Biyobozunur polimerlerin kullanılmasıyla ortaya çıkan ürünlerin herhangi bir yan etkiye sebep olmadan vücuttaki normal yollar vasıtasıyla metabolize edilerek ortadan kaldırılabilmesi de önemli bir avantajdır [16], [18].



Şekil 2.2 Nanopartikül çeşitleri; (a) nanokapsül, (b) nanoküre [38]

Birçok antimikrobiyal madde; sudaki çözünürlüklerinin düşük olması, kimyasal kararsızlık, sitotoksisite ve intrasellüler patojenlere karşı düşük aktivite göstermeleri sebebiyle verimli olarak kullanılamamaktadır [15], [16]. Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler ise bu kısıtlamaların üstesinden gelen özellikleri sayesinde, bu terapötik ajanların kullanılabilmesini sağlamakta ve enfeksiyöz hastalıklar da dahil olmak üzere, kanser, tüberküloz, AIDS, diyabet, prion hastalığı vb. tedavisi zor olan çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde ümit vadetmektedirler [37].

2.4 Nanopartikül Üretimi

2.4.1 Kullanılan Polimerler

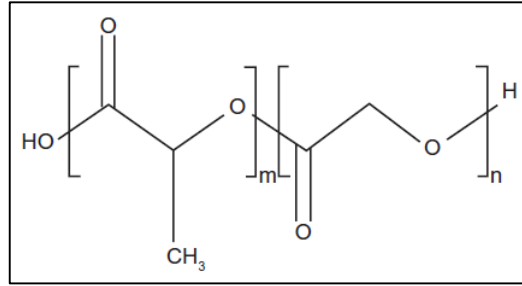
Nanopartiküllerin üretilmesinde kullanılan polimerler doğal veya sentetik olanlar, ya da biyobozunur olanlar veya olmayanlar olarak sınıflandırılabilirler. Doğal polimerlerin

kimyasal bileşimleri ve fiziksel özellikleri değişken olabilirken, sentetik polimerlerin kimyasal bileşimleri hassas ve kesin olarak belirlenebilmekte ve böylece daha öngörülebilir fiziksel özelliklere sahip olmaları sağlanabilmektedir [38].

2.4.1.1 PLGA

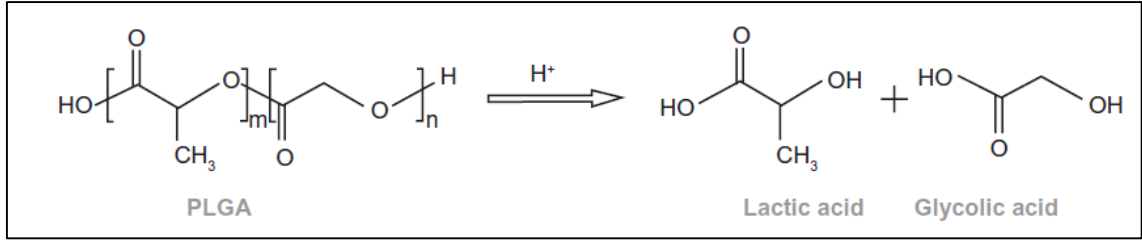
Polilaktik asit (PLA), laktik asitten türemiş bir halkasal dimer olan laktitin polimerizasyonu ile oluşan kiral bir moleküldür. L, D veya rasemik D,L formunda üretilebilir ve organik çözücülerde çözünür. Poliglikolik asit (PGA) ise en basit, lineer alifatik poliesterdir. Kristalli yapıda olduğundan dolayı organik çözücülerdeki çözünürlüğü düşüktür [18].

PLGA, PLA ve PGA'dan oluşan bir kopolimerdir ve biyoyumluluk, biyobozunurluk, sürdürülebilir salım ve güvenlik gibi avantajları sayesinde nanopartikül üretiminde kullanılan diğer polimerler arasından sıyrılmaktadır. Ayrıca ilaç endüstrisinde insan uygulamaları için FDA onayı almış olması en önemli özelliklerinden biridir [15].



Şekil 2.3 PLGA'nın kimyasal yapısı (m: laktik asit sayısı, n: glikolik asit sayısı) [16]

PLGA'nın mekanik gücü ve bozunma oranı direkt olarak polimerin kristalliliğine, bu da laktik asit ve glikolik asit oranına bağlıdır. Laktik asit glikolik asite kıyasla daha hidrofobik olduğundan laktik asit oranı yüksek olan PLGA kopolimerleri daha yavaş degrade olurlar [16]. PLGA'nın biyodegradasyonu toksisiteye yol açmaz. Degradasyon ürünlerinden laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girerek karbondioksit ve su olarak vücuttan atılırken; glikolik asit de aynı şekilde karbondioksit ve suya metabolize edilerek veya direkt olarak böbreklerden atılır [18].



Şekil 2.4 PLGA'nın laktik ve glikolik aside degradasyonu [16]

2.4.2 Yöntemler

Önceleri nanopartikül üretimi amaçlı monomerlerin polimerizasyonuna dayanan farklı yöntemler kullanılmış olsa da, günümüzde karakterizasyonu tamamlanmış polimerlerin kullanıldığı yöntemler ön plandadır [39].

2.4.2.1 Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi

Polimerik nanopartiküllerin üretiminde en sık kullanılan yöntem çözücü difüzyon/evaporasyon yöntemidir. Bu yöntemde, kullanılan etken maddenin suda çözünürlük özelliğine göre tekli veya ikili emülsiyonun hazırlanması ve homojenizasyon ya da ultrasonikasyonu takiben çözücünün uçurulması ile nanopartikül süspansiyonu hazırlanır [39].

2.4.2.2 Tekli Emülsiyon (w/o) Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi

Hidrofobik etken maddeler için tercih edilen yöntemdir. Kullanılacak etken madde ve polimer tespit edilen ortak bir organik çözücü içinde çözülür ve ardından yüzey aktif madde içeren (polivinil alkol (PVA) vb.) sulu ortama karıştırılarak nanopartiküllerin oluşması sağlanır [39], [40].

2.4.2.3 İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Difüzyon/Evaporasyon Yöntemi

Hidrofilik moleküller ile oluşturulacak nanopartiküller için kullanılan yöntemdir. Etken maddenin sulu çözeltisi, organik çözücü içinde çözündürülmüş olan polimer ile karıştırılarak su/yağ (w/o) emülsiyonu oluşturulur. Daha sonra bu emülsiyon dış sulu faz ile birleştirilerek su/yağ/su (w/o/w) ikili emülsiyonu oluşturulur ve çözücü uzaklaştırıldıktan sonra nanopartikül süspansiyonu elde edilmiş olur [39], [40].

Her iki stratejide de, oluşturulan nanopartikül süspansiyonu santrifüjlenerek nanopartiküller toplanır. Stabilizatör kalıntılarını ve serbest etken maddeyi uzaklaştırmak için su ile yıkama yapıldıktan sonra nanopartiküller liyofilize edilerek kullanıma hazır hale getirilir ve dondurularak saklanır [16], [39].

2.4.2.4 Salting-Out Yöntemi

Bu yöntemde; etken madde, polimer, klor içermeyen çözücü (ör: aseton), tuz (ör: magnezyum asetat tetrahidrat) ve stabilizatör (ör: polivinilalkol) içeren bir su/yağ emülsiyonu oluşturulur. Su eklenmesiyle birlikte asetonun suya difüzyonu gerçekleştirilir ve böylece nanopartiküller oluşur [40], [41].

2.4.2.5 Nanoçöktürme Yöntemi

Nanoçöktürme yönteminde, polimer ve etken madde buharlaşma ile ortadan kaldırılabilen, suda çözünür bir organik çözücü - genellikle aseton - içerisinde çözündürülür ve stabilizatör (ör: Pluronic F68) içeren sulu çözelti içine eklenir. Vakum altında ve uygun sıcaklıkta aseton buharlaştırılarak etken maddenin polimer içine enkapsüle edildiği nanopartiküller elde edilir [16], [40], [41].

2.4.2.6 Diyaliz

Diyaliz yöntemi ile nanopartikül üretiminde, organik çözücüde çözündürülen polimer diyaliz tüpüne alınır ve çözücünün diyalize bağlı olarak yer değiştirmesi sağlanır. Çözücü yer değiştirdikçe, polimerin çözünürlüğü gitgide azalır ve kümelenme meydana gelir. Böylece, basit ve etkili bir şekilde homojen nanopartikül süspansiyonu elde edilmiş olur [42].

2.4.2.7 Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Geleneksel yöntemler ile nanopartikül üretiminde sıklıkla toksik çözücü veya yüzey aktif maddelerin kullanılması ve buna bağlı olarak ilave pürifikasyon aşamalarının gerekmesi araştırmacıları daha güvenli yöntemler konusunda çalışmaya itmiştir. Böylece çözücü kalıntısı içermeyen, yüksek saflıkta ürünler elde etmeyi sağlayan süperkritik sıvılar kullanılmaya başlanmıştır. En sık kullanılan yöntemler süperkritik çözeltinin ani

genleşmesi (Rapid Expansion of Supercritical Solution - RESS) ve süperkritik anti-çözücü (Supercritical Anti-Solvent - SAS) yöntemleridir. RESS yönteminde, etken madde ve polimer süperkritik çözücüde çözülür ve çözelti enjektör aracılığıyla genişletilir. Böylece süperkritik sıvının çözücülüğü azalır ve nanopartikül çökeltisi oluşur. Ancak birçok polimer - özellikle molekül ağırlığı yüksek olanlar - süperkritik sıvılar içinde çözünmez veya çok az çözünür, bu da yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır. SAS yönteminde ise, polimer solüsyonu öncelikle organik bir çözücü ile hazırlanır ve daha sonra süperkritik sıvı ile buluşturulur. Organik fazın süperkritik sıvı içinde hızlıca çözünmesi sonucunda nanopartikül çökeltisi oluşur [39], [43].

2.5 Nanopartiküllerin kullanım alanları ve antimikrobiyal etkisi

Nanopartiküller eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde bilgisayar teknolojilerinde, çevresel iyileştirmede, tıp ve farmakoloji alanında, malzeme biliminde, elektronikte, enerji temelli araştırmalarda ve mekanik endüstrisinde kullanılabilirler [44]. Nanopartiküllerin tüm bu alanlardaki kullanımı, son yıllarda kayda değer biçimde artmıştır ve özellikle tıbbi ve farmasötik amaçlarla kullanımlarına dair birçok çalışma yapılmaktadır.

Yapılan antimikrobiyal çalışmalarda, nanopartiküllerin patojen mikroorganizmalara karşı oldukça etkili olduğu görülmüş ve özellikle antimikrobiyal ajanlara karşı direncin büyük oranda arttığı bu dönemde, nanopartiküler sistemlerin umut vadeden bir tedavi yöntemi olabileceği raporlanmıştır. Söz konusu direncin gelişmesi, özellikle tedavisi fazlasıyla güç olan biyofilm enfeksiyonlarında mortalite oranlarının giderek artmasına yol açmıştır. Nanopartiküler sistemlerin planktonik hücrelere karşı gösterdiği antimikrobiyal başarıdan yola çıkılarak; bu sistemler, biyofilm oluşumunu engelleme ve önceden oluşturulmuş biyofilm yok etme amaçlarıyla da değerlendirilmeye başlanmıştır.

Esmaeili ve ekibi tarafından Rifampicin yüklü PLGA nanopartikülleri ile yapılan bir çalışmada; halihazırda Rifampicin'e dirençli olduğu bilinen *Pseudomonas aeruginosa* için bir etki gözlemlenmemiş, düşük duyarlılık gösterdiği bilinen *Escherichia coli* ve Gram pozitif *Bacillus subtilis* için ise nanopartikül formunun ilacın aktivitesinde değişiklik yaratmadığı tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve metisilin dirençli *S. aureus* söz konusu olduğunda ise, nanopartiküler sistemin Rifampicin'in etkinliğini 4 kat arttırdığı

belirlenmiş ve bu etkinin nanopartiküllerin bakteri hücrelerine penetrasyonunun ve etki alanına iletiminin daha iyi olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir [19].

Martinez-Gutierrez ve ekibi; gümüş nanopartiküllerin gram negatif *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa*, gram pozitif *Streptococcus mutans* ve metisilin dirençli *S. aureus* bakterileri ve maya olarak da *C. albicans* biyofilmleri üzerindeki etkisini incelemiştir. 500 mg/ml gümüş nanopartikülleri, *P. aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunda yaklaşık 4 log (CFU) azalma sağlamış, doz iki katına çıktığında ise 6 log azalma gözlenmiştir. *A. baumannii* için 250-1000 mg/ml gümüş nanopartikülü 3.5-4 log azalma sağlamış, diğer mikroorganizmalar içinse bu değer en fazla 1 log olmuştur. Önceden oluşturulmuş biyofilmlerinde ise en güçlü etki *P. aeruginosa* için 2 log olarak kaydedilmiştir [45].

Sathyanarayanan ve arkadaşları ise; altın ve demir oksit nanopartiküllerinin 4 saatlik *S. aureus* ve *P. aeruginosa* biyofilmleri için etkisini araştırmış ve çalışılan dozlarda (0.01 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.10 mg/ml ve 0.15 mg/ml) altın nanopartiküllerinin *S. aureus*'da ~ %70 ve *P. aeruginosa*'da ~ %75, demir oksit nanopartiküllerinin ise sırasıyla ~ %35 ve ~ %45 azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir [46].

Bir diğer çalışmada ise nitrik oksit salan silika nanopartiküllerinin uygulanan en yüksek doz olan 8 mg/ml'de *P. aeruginosa* ve *E. coli* biyofilmlerinde ≥ 5 log (CFU), *C. albicans* biyofilmlerinde ise 3 log azalma sağladığı rapor edilmiştir. Gram pozitif *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* içinse daha az etki görülmüş, ~ 2 log azalma kaydedilmiştir [47].

Polimerik nanopartiküller ile yapılan çalışmalardan birinde ise, Cheow ve arkadaşları Levofloxacin yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamış ve planktonik *E. coli* hücreleri için MİK, *E. coli* biyofilmleri için ise MBİK (minimum biofilm inhibitory concentration) değerlerini sırasıyla 0.03 ve 0.15 µg/ ml olarak belirlemiştir [20].

2.6 Allelopati ve allelokimyasallar

Allelopatik etkilerin gözlemlenmesi MÖ 300'lü yıllara dayansa da, allelopati terimi ilk olarak 1937'de Molisch'in Yunanca "karşılıklı zarar" anlamına gelen "allelo" ve "pathy" kelimelerini birleştirmesiyle ortaya çıkmıştır ve organizmalar arasındaki hem yararlı hem

de zararlı biyokimyasal etkileşimleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bazı araştırmacıların bu terimi hatalı bulmasını takiben; Muller allelopatiyi, bitkinin toksik bileşikleri çevreye saldığı ve aynı yaşam alanını paylaşan komşu bitkiler üzerinde zararlı bir etki yarattığı süreç olarak tanımlamıştır. Söz konusu toksik bileşikler ise allelokimyasallar olarak adlandırılmaktadır [48], [49].

Buharlaştırma, yaprak ve köklerden sızma ve topraktaki bitki kalıntılarının ayrışması vasıtasıyla çevreye salınan allelokimyasallar, bitkilerin en çok yaprak ve köklerinde olmak üzere tüm bölümlerinde bulunabilmektedir [14], [48]. Temel olarak enzim aktivitesi inhibisyonu ile fotosentez, solunum vb. süreçleri etkileyerek komşu bitkilerin çimlenmesini ve büyümesini engellerler [50].

İkincil metabolizmanın ürünleri olan allelokimyasallar yapı ve özelliklerine göre 10 kategoriye ayrılırlar [50]:

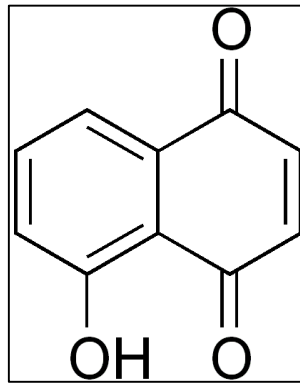
- suda çözünebilen organik asitler, düz zincirli alkoller, alifatik aldehitler ve ketonlar
- basit doymamış laktonlar
- uzun zincirli yağ asitleri, poliasetilenler
- kinonlar (benzokinon, antrokinon ve kompleks kinonlar)
- fenolikler
- sinnamik asit ve türevleri
- kumarinler
- flavonoidler
- taninler
- steroidler ve terpenoidler (seskiterpen laktonlar, diterpenler ve triterpenoidler)

2.6.1 Ceviz ağacı ve juglon

Kinonlar doğada yaygın olarak bulunurlar ve meyve ve sebzeler kesildiğinde gerçekleşen kararmadan sorumludurlar. Kinonların alt gruplarından biri olan naftakinonlar içerisinde

yer alan juglon (5-hidroksi-1,4-naftakinon), plumbagin (5-hidroksi-2-metil-1,4-naftakinon), lawsone (2-hidroksi-1,4-naftakinon) vb. bileşiklerin biyolojik aktiviteleri hem ökaryotlar hem de prokaryotlar üzerinde incelenmiş ve antimikrobiyal özellikte oldukları tespit edilmiştir [49], [51].

Juglon, *Juglans nigra* (siyah ceviz), *Juglans regia* (adi ceviz), *Juglans cinerea* (akceviz) ve *Carya illinoensis* (pikan cevizi) gibi Juglandaceae ailesi üyelerinin kök, yaprak, gövde ve kabuklarında bulunabilen kehribar renki bir pigmenttir [11], [49], [52]. Cevizde en yüksek konsantrasyonda bulunan allelokimyasaldır ve cevizin biyolojik aktivitesinden sorumludur [13].



Şekil 2.5 Juglonun yapısı

Cevizin bitkisel preparatları geleneksel tıpta fungal enfeksiyonlar başta olmak üzere, bakteriyel, viral ve helmintik enfeksiyonlar, hipoglisemi, hipotansiyon, diyare, saçkıran ve hatta kanser tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır [11], [12]. Ayrıca juglon, gıda katkı maddesi, boyar madde, ahşap koruyucu olarak da kullanılabilir [13].

Juglon çok toksik bir madde olduğundan, bitki hücrelerinde hidrojuglon adı verilen, indirgenmiş bir formda bulunur. Hidrojuglon toksik olmayan, renksiz bir maddedir ve hava veya oksitleyici bir maddeye maruz kaldığında juglona dönüşür. Böylece, bitkinin kendini koruma amaçlı ürettiği bir madde olan juglon, herhangi bir yaralanma sırasında hızlıca ortaya çıkar. Juglon yapraklardan yağmurla yıkanarak, düşen yapraklar ve kabuklar veya kökler vasıtasıyla toprağa karışabilir. Suda çözünürlüğü az olmasına rağmen juglonun küçük miktarları bile çevrede yetişen bitkileri etkilemeye yeterli olmaktadır [13], [14]. Bitkilerde solunumla enerji üretilmesi için elzem olan hidrojen iyonu transferini inhibe ederek etki gösteren juglon; 3 µM'ın altındaki

konsantrasyonlarda elektron taşıma sistemini bozabilirken, daha yüksek konsantrasyonlarda oksidatif fosforilasyonu inhibe edebilmektedir [13].

2.6.1.1 Ceviz ağacı ekstraktları ve juglonun antimikrobiyal etkisi

Halk arasında enfeksiyonları tedavi etme amacıyla kullanılan ceviz özütlerinin antimikrobiyal etkisi uzun yıllardır bilinmektedir ve literatürde bu temele dayanarak gerçekleştirilen, çeşitli ekstraktların ve juglon da dahil olmak üzere izole edilen aktif bileşenlerin antimikrobiyal etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır.

Örneğin; 1990 yılında Clark ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, juglonun MİK değeri çeşitli bakteri, küf ve maya türleri için belirlenmiş ve en yüksek aktivite maya türlerine karşı görülmüştür. Söz konusu çalışmada, *C. albicans* için MİK değeri 0.78 µg/ml olarak bulunmuştur ve juglonun piyasada bulunan antifungal ilaçlar kadar etkili olduğu rapor edilmiştir [52].

Yedi farklı oral patojenle yapılan disk difüzyon çalışmasında, Jeon ve arkadaşları juglonun 1 mg/disk konsantrasyonda *Actinobacillus viscosus*, *S. Sobrinus* ve *S. Salivarius*; 2 mg/disk konsantrasyonda ise *Porphyromonas spp.* ve *Streptococcus mutans* üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada ayrıca 7 farklı 1,4-naftakinon türevi de analiz edilmiş ve içlerinde en yüksek inhibisyonu juglonun gösterdiği belirtilmiştir [53].

Juglonun antibakteriyel aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, Chuan Tan ve ekibi *Bacillus cereus*, *E. coli* ve *Klebsiella pneumonia* için MİK değerini 0.36 mM, *S. aureus* içinse 0.72 mM olarak rapor etmişlerdir [54].

Sánchez-Calvo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, 50 adet 1,4-naftakinon türevi sentezlenmiş ve *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Candida krusei*, *C. parapsilosis* and *Cryptococcus neoformans* üzerindeki antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir. En duyarlı mikroorganizmaların *Candida* türleri olduğu tespit edilen çalışmada juglonun *C. albicans* ve *C. parapsilosis* için MİK değerleri sırasıyla 32 ve 128 µg/ml olarak bulunmuştur [55].

Noumi ve grubunun *Juglans regia* L.'nin metanol, etil asetat ve seyreltilmiş aseton ekstraktları ile gerçekleştirdiği çalışmada ise; *C. albicans* dahil 15 *Candida* türüne ait 48

oral izolat kullanılmış ve disk difüzyon ve mikrodilüsyon metodları kullanılarak antifungal aktivite değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre 0.006 ile 0.195 mg/ml arasında değişen MİK değerleri bulunmuş ve en duyarlı türün *C. albicans* olduğu kaydedilmiştir. Ekstraktlar arasında ise en güçlü etkiyi etil asetat ekstraktı sağlamıştır [56].

Aynı ekibin 2014 yılında yayınlanan bir diğer çalışmasında, yine *J. regia* L. ekstraktları ile 28'i vajinal izolat olmak üzere 34 farklı suş kullanılmış ve vajinal *C. albicans*'ın en duyarlı suş olduğu tespit edilmiştir. Disk difüzyon metoduyla en etkili ekstrakt olduğu tespit edilen metanol ekstraktı için mikrodilüsyon çalışması yapılmış ve neredeyse tüm suşlar için MİK değeri 0.012 mg/ml olarak bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan Amphotericin B için ise bu değer 0.097 mg/ml olduğu görülmüştür [57].

2.7 *Candida albicans*

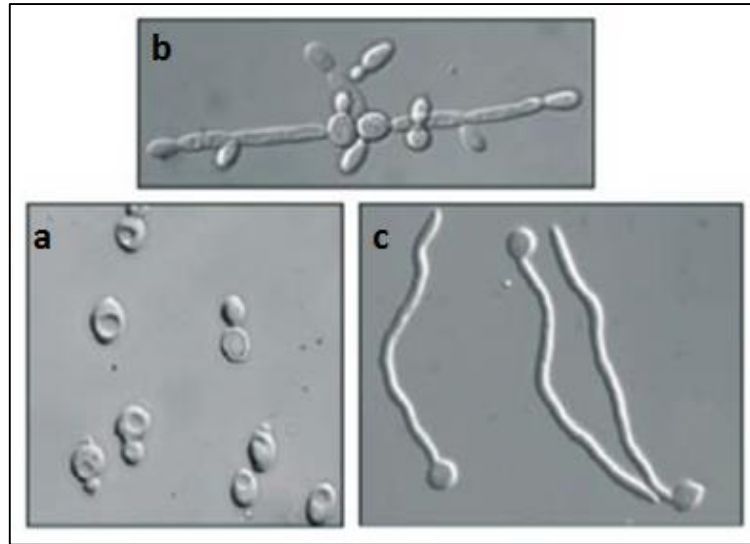
Candida insan vücudunda –ağız boşluğunda, gastrointestinal kanalda, vajinada ve deride- kommensal bir organizma olarak zararsız şekilde yaşar. Ancak bazı durumlarda, ölümcül sistemik hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli tipte enfeksiyonlara sebep olurlar. AIDS/HIV ve organ nakli hastaları, kalıcı medikal cihaz kullanan veya yoğun bakımda uzun süre kalan hastalarda sıklıkla enfeksiyonlar görülür. Bu enfeksiyonların sebebi, bazı yaygın bakteriyel patojenlerden bile daha yüksek oranda enfeksiyona yol açan *Candida* türleri, özellikle de *C. albicans*'tır. *Candida* enfeksiyonu geçiren hastaların mortalite oranları, gelişen antimikrobiyal direnç sebebiyle, antifungal tedaviye rağmen gitgide artmaktadır [2], [58].

Candida enfeksiyonlarının bu denli ciddi bir tehlike yaratmasının sebeplerinden biri de, *C. albicans* da dahil olmak üzere *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* gibi türlerin biyofilm oluşturabiliyor olmasıdır ve yüksek ölüm oranlarına sebep olan enfeksiyonlar genellikle biyofilm enfeksiyonlarıdır [59]. Biyofilm büyüme modu antimikrobiyal direnci 1000 kata kadar arttırdığı için, bu tip enfeksiyonların tedavisi oldukça güç olmaktadır [9], [10].

Chandra ve arkadaşları; *C. albicans* biyofilmlerinin dört farklı antifungal ilaca olan duyarlılığını planktonik hücrelere kıyaslayarak değerlendirmek amacıyla, metabolik aktivitede %50 düşüş sağlayan ilaç konsantrasyonlarını belirlemiştir [60]. Planktonik hücreler için tespit edilen Amphotericin B, Nystatin, Chlorhexidine ve Fluconazole

konsantrasyonları sırasıyla 0.25, 1.0, 4.0 ve 0.5 µg/ml iken, biyofilmler için 8, 16, 128, ve >64 µg/ml'dir. Bu çalışma, literatürdeki daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak [4], [61], biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç gösterdiğini ispatlamaktadır.

8 kromozoma sahip diploit bir organizma olan *C. albicans*'ın en önemli özelliklerinden biri üç farklı morfolojik yapıda büyüebilmesidir: maya, psödohif ve hif. Maya hücreleri tomurcuklanarak büyürler. Psödohiflerin oluşması, tomurcukların uzaması ancak ana hücreden ayrılmaması şeklinde gerçekleşir. Bu tip büyümede; "septal junction" adı verilen, hiflerin enine bölündüğü bölgelerde ve anne hücre ile tomurcuk arasındaki bölgede sıkışma/daralma meydana gelir. Önemli virülans faktörlerinden olduğu düşünülen gerçek hif büyümesinde ise bu daralmalar yoktur ve iki yanı birbirine paralel, uzun, boru şeklinde yapılar oluşur. Sıcaklığın 30°C, pH'ın ise asidik (pH 4.0) olduğu durumlarda maya formu tercih edilirken; 37°C'lik sıcaklık, nötr pH, yüksek karbondioksit ve serum varlığı gibi etkenler hifal büyümeyi destekler. Psödohifler ise 35°C büyüme sıcaklığı ve pH 5.5 gibi maya formundan hife geçişin gerçekleşebileceği ara koşullarda oluşurlar [62], [63].



Şekil 2.6 (a) Maya, (b) psödohif ve (c) hif yapıları [62]

2.8 Biyofilm yapısı ve oluşumu

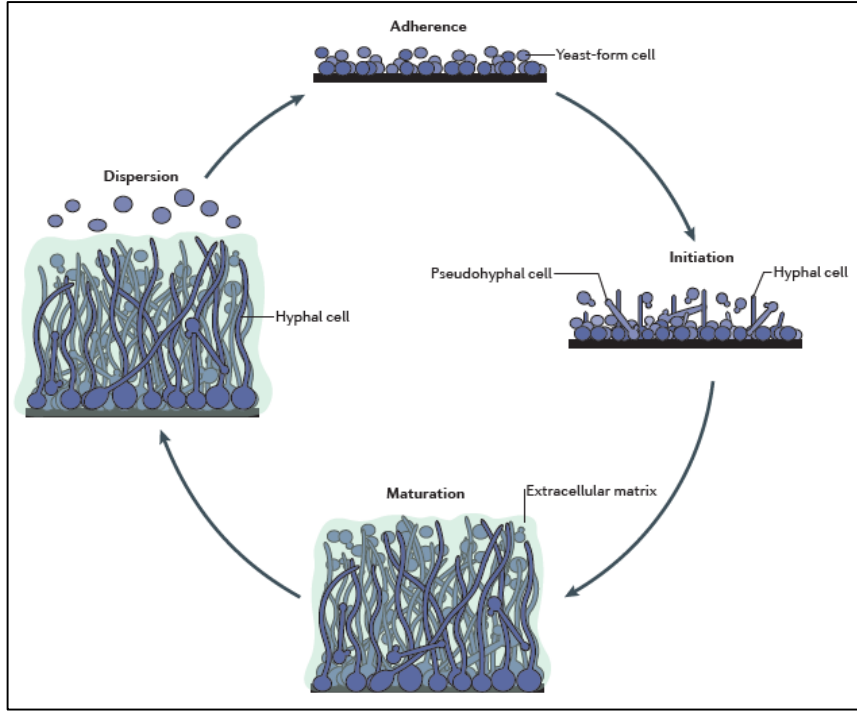
Biyofilm, doğada en sık görülen mikrobiyal büyüme modudur. Bir yüzeye tutunan ve kendi ürettikleri bir ekstrasellüler polimerik matriksle kaplanan hücrelerden

oluşmaktadır [3]. Biyofilm yapısı içinde bulunan hücreler planktonik hücrelere kıyasla farklı fenotipik özellikler gösterirler ve tüm mikrobiyal enfeksiyonların büyük bir kısmı biyofilm enfeksiyonudur [2].

Mikrobiyal biyofilmler, son zamanlarda özellikle kalıcı tıbbi cihazlardan kaynaklanan enfeksiyonların artmasıyla önem kazanmıştır ve bu tip enfeksiyonlarda en yaygın görülen fungal patojen *C. albicans*'tır. Medikal cihazlar gibi abiyotik yüzeyler dışında; diş ve diş etleri, solunum ve idrar yolları ve göz gibi dokularda da biyofilmler oluşabilir. Dokuda oluşan biyofilmler daha çok bakteri kaynaklı olsa da, *Candida* türleri de bu tür biyofilmler oluşturabilmektedir [3].

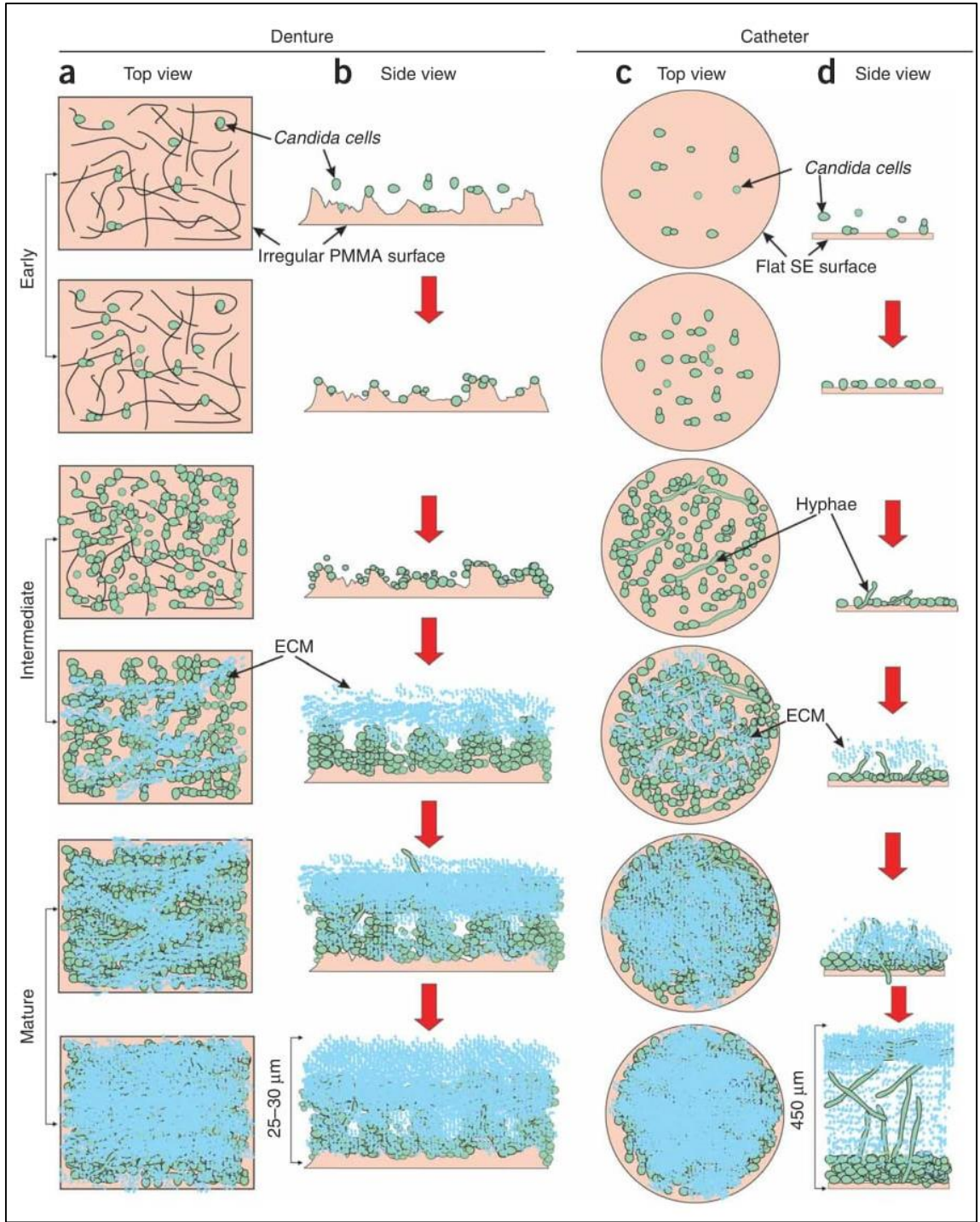
Biyofilm yapısı temel olarak dört adımda oluşur [2], [64]:

- Adhezyon: Serbest yüzen hücrelerin bir yüzeye tutunmasıyla gerçekleşir. Genellikle 1-2 saat sürer. Hücreler ve tutunacakları yüzey arasındaki nonspesifik etkileşimler ile sağlanır ve daha sonra özel adhezyon moleküllerinin salgılanmasıyla daha güçlü tutunma gerçekleşir.
- Mikrokoloni oluşumu ve hücrelerin organizasyonu (Başlangıç): Bu aşamada, maya hücreleri mikrokolonileri oluşturur ve hif modu büyüme başlar. Ayrıca hif ve mayaları kaplayan EPS salgısı da bu aşamada başlar.
- Olgunlaşma: Farklı morfolojik yapıdaki hücrelerin EPS ile tamamen kaplandığı ve su kanallarını da içeren olgun biyofilmin oluştuğu adımdır.
- Yavru hücrelerin yayılması

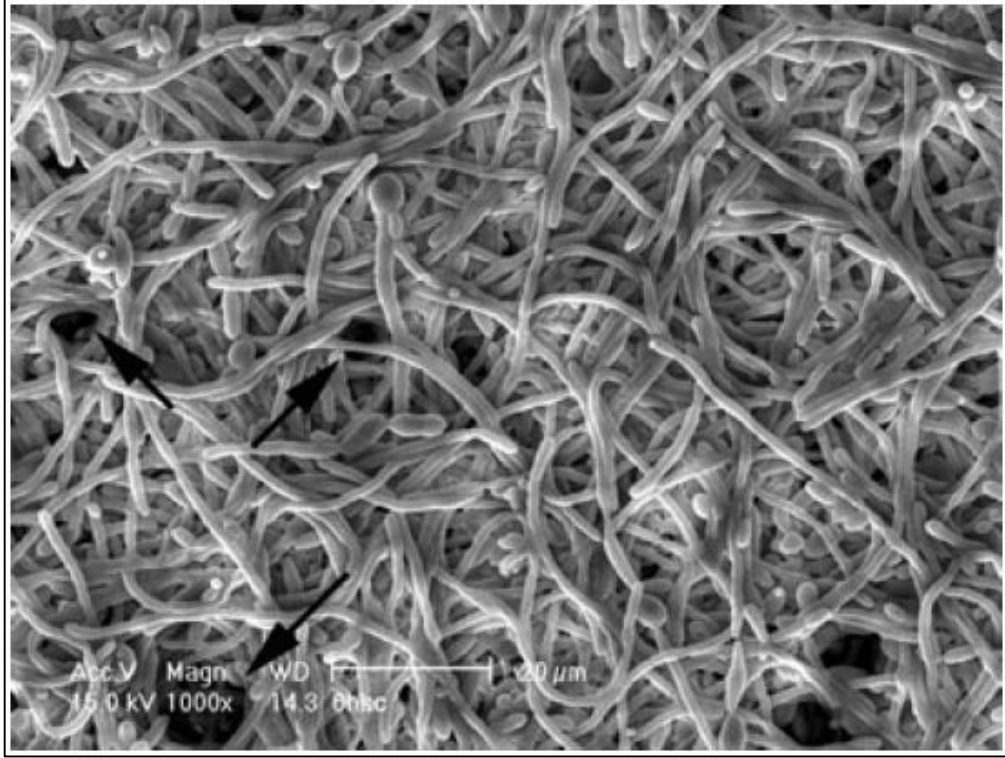


Şekil 2.7 *C. albicans* biyofilm modeli [65]

Chandra ve arkadaşları tarafından yayınlanan çalışmada, *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumunun üç gelişim evresinde gerçekleştiği rapor edilmiştir: (0-11. saat) erken faz, (12-30. saat) ara faz ve (38-72. saat) olgunlaşma [58]. Erken fazda blastosporlar yüzeye tutunup mikrokolonileri oluştururken, ara fazda farklı morfolojik yapılar bir arada görülür ve EPS üretimi mevcuttur. Olgunlaşma safhasında ise mayalar, psödohipler ve hifler EPS'e tamamen gömülerek kalın bir tabaka oluşturur [2], [58]. Chandra ve ekibi tarafından yayınlanan bir başka çalışmada ise; farklı yüzeylerde oluşturulan *C. albicans* biyofilmi, floresan ve konfokal mikroskoplar ile görüntülenmiş ve elde edilen görüntüler kullanılarak biyofilm oluşum aşamaları şematize edilmiştir [66]. Şekil 2.8'de verilen şemada, diş protezi (polimetilmetakrilat) ve kateter (silikon elastomer) yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin yukarıdan ve yandan görüntüsü verilmiştir. Ayrıca biyofilm yapısında besinlerin alt katmanlara iletilmesini ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları da bulunmaktadır (Şekil 2.9) [1], [2].



Şekil 2.8 Farklı yüzeylerde *C. albicans* biyofilminin oluşum evreleri [66]



Şekil 2.9 *C. albicans* biyofilminde SEM ile görüntülenen su kanalları [2]

Candida biyofilmlerinin oluşumunu etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır [2], [3]:

- **Yüzey tipi:** Birçok farklı materyal kullanılarak gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda, yüzeye bağlı olarak biyofilm yapısında farklılıklar olduğu ve yüzeyin pürüzlülüğü azaldıkça biyofilm oluşumunun da azaldığı belirtilmiştir.
- **Karbon kaynağı:** Karbon kaynağı değişikliğinin biyofilm oluşumunu etkilediği gösterilmiş olsa da, yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.
- **Vücut sıvıları:** Özellikle tükürükle temas edecek şekilde vücuda yerleştirilen implantlarda, tükürüğün cihaz yüzeyini kapladığı ve biyofilm oluşumunu artırdığı belirtilmiştir. *In vitro* çalışmalarla desteklenen bu durum için, tıpkı karbon kaynağı konusunda olduğu gibi çelişkili sonuçlar da rapor edilmiştir.
- **Oksijen:** Hem aerobik hem de anaerobik koşullarda yaşadığı bilinen *Candida* için gerçekleştirilen biyofilm çalışmalarında, anaerobik koşullarda biyofilm oluşumuyla alakalı olarak farklı *Candida* türleri için farklı sonuçlar alınmıştır.
- **EPS:** Fagositik hücrelere karşı savunma, ilaç difüzyonunu sınırlama ve biyofilm bütünlüğünü koruma gibi görevleri olduğu düşünülen EPS'in miktarı ve içeriği, tür, karbon kaynağı, besiyerinin akış hızı gibi faktörlere göre değişmektedir.

- **Candida türü:** Farklı türlere ve hatta aynı türe ait farklı suşlara ait biyofilmler; morfoloji, EPS içeriği ve antifungal direnç açısından farklılık göstermektedir.
- **Metal iyonları:** İnhibisyona yol açmayacak konsantrasyonda farklı metal iyonları içeren ortamlarda oluşturulan *Candida* biyofilmlerinin yapılarında farklılıklar gözlenmiş; ayrıca, bununla bağlantılı olarak, metal iyonlarının antifungal duyarlılığı da etkileyebileceği belirtilmiştir.

2.9 *Candida albicans* biyofilm oluşumunun genetik kontrolü

Son yıllarda yapılan çalışmalar, *C. albicans* biyofilminin oluşmasını ve eşsiz biyofilm fenotiplerinin edinilmesini sağlayan mekanizmaları açıklığa kavuşturmaya başlamıştır.

Quorum sensing, hücre yoğunluğuna bağlı bir iletişim mekanizmasıdır ve quorum sensing molekülleri olarak adlandırılan hormon benzeri moleküllerin sürekli salımı ve izlenmesi ile bakterilerde virülans, biyoluminesans ve biyofilm oluşumu gibi olayları düzenlemektedir [67], [68]. QSM'lerin konsantrasyonu hücre yoğunluğuyla orantılı olarak artar ve belirli bir seviyeye ulaştıklarında hedef genlerin ekspresyonu veya baskılanmasına yol açarlar [67].

Yakın zamanda, *C. albicans*'ta da benzer sistemler bulunmuştur. Hornby ve arkadaşları tarafından tanımlanan bir QSM olan farnesol, durağan fazdaki (stationary phase) hücrelerde hif oluşumunu inhibe etmektedir [69]. Chen ve arkadaşları ise, gecikme fazını (lag phase) kısaltan, hif ve biyofilm oluşumunu destekleyen bir QSM olan tirozolü tanımlamışlardır [70]. Tirozolün etkileri farnesol varlığında baskılanmaktadır. Ayrıca, tirozolün nötrofillere karşı da inhibisyon etki gösterdiği bulunmuştur [67].

C. albicans polimorfizminin biyofilm yapısındaki önemi sebebiyle, farnesolün biyofilm oluşumundaki etkisi araştırılmış ve inhibe edici etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak farnesol filament oluşumu başladıktan sonra eklendiğinde bu etki gözlenememiştir. Hif oluşumu ile ilgili genler dışında farnesolün ilaç direnci, hücre duvarı korunması gibi olaylarla alakalı genleri de etkilediği bulunmuştur [67]. Bir hifal hücre duvarı proteinini kodlayan *HWP1*'in ekspresyonunu azaltan farnesol, aynı zamanda hifal gelişim genleri *TUP1* ve *CRK1*, hücre yüzey hidrofobisite genleri ve ilaç direncinde rol alan *FCR1* ve *PDR16* genlerinde de yanıt oluşturmaktadır [71].

QSM maruziyeti sonucu regüle olan genlere ilaveten, hif oluşumu için gerekli olan genler başta olmak üzere birçok farklı işlevsel kategoriye dahil olan genin biyofilm yapısının oluşmasında etkili olduğu raporlanmıştır [72].

EFG1 ve *CPH1* transkripsiyon faktör genleri hif oluşumunda görev yapmaktadır ve ikili mutantların hif ve biyofilm oluşturamadığı tespit edilmiştir [72]. Ayrıca, *NRG1* ve *UME6* gibi morfogenez regülatörlerinin de biyofilm büyümesi sırasında ekspresyonlarının değiştiği bulunmuştur [71]. İlaveten, yine hif oluşumu için gerekli olan *KEM1*, *MDS3*, *NUP85* ve *SUV4* genlerinin *in vitro* biyofilm oluşumu için de gerekli olduğu ve hif oluşumunu regüle eden *TEC1*'in biyofilm oluşumunu da regüle ettiği tespit edilmiştir [71], [72].

BCR1 transkripsiyon faktör geninin ise hif hücrelerinin yüzey özelliklerini düzenlediği bulunmuş ve hif adhezyonunun da biyofilm oluşumunda önemli olduğu düşünülmüştür. Bu transkripsiyon faktörüne bağlı biyofilm adezin genleri de tanımlanmış ve *bcr1/bcr1* mutantlarının biyofilm oluşturamamalarına rağmen hif oluşturabildikleri raporlanmıştır [72].

Amino asit biosentetik genlerinin biyofilm oluşumu sırasında upregüle olduğu ve amino asit gen aktivatörü *GCN4*'ün mutasyonunun biyofilm kütlelerinde azalmaya sebep olduğu bulunmuştur. Bu genlerin artan ekspresyonunun biyofilm oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir [72].

MAP kinaz *Mkc1*'in aktivasyon seviyesi yüzeye tutunmuş olarak büyüyen hücrelerde planktoniklere kıyasla daha yüksektir. Bu kinaz *C. albicans* hücre duvarı bütünlüğü yolağının downstream hedeflerinden biridir ve buradan yola çıkılarak yüzeye tutunma sensörü görevi yapıyor olabileceği düşünülmüştür [72].

Maya formundaki hücrelerde bulunan bir hücre duvarı proteinini kodlayan *YWP1*'in overekspresyonu hücrelerin adhezyonunu inhibe etmektedir. Bu proteinin hücredeki adezin ligandlarına bağlandığı tahmin edilmektedir [72].

ALS (agglutinin-like sequence) gen ailesinin bir üyesi olan *ALS3*'ün hif oluşumu sırasında upregüle olduğu bilinmektedir. *ALS1* ve diğer üyelerinin ekspresyonunun ise *in vitro* biyofilm oluşumu sırasında arttığı tespit edilmiştir. Bu etkinin hif oluşumundan bağımsız olduğu, söz konusu genlerin *efg1/efg1 cph1/cph1* mutant suştan oluşturulan ve böylece

yalnızca maya formunda hücrelerin mevcut olduğu biyofilmlerde de upregüle olduğunun tespiti ile anlaşılmıştır. Ayrıca bir diğer adezin geni olan ve hif oluşumu sırasında ekspresyonunun arttığı bilinen *HWP1*'in overekspresyonunun, biyofilm oluşturmamayan *bcr1/bcr1* mutantlarında biyofilm oluşturma özelliğinin yeniden kazanılmasını sağladığı bulunmuştur. *Eap1* biyofilm adezinini kodlayan ve *Efg1* transkripsiyon faktörüne bağlı olan *EAP1*'in overekspresyonu ise *efg1/efg1* mutantlarının dahi biyofilm oluşturmalarını sağlamaktadır [72], [73].

2.10 *Candida albicans* biyofilmlerinde antifungal direnç mekanizmaları

Biyofilm formunda büyüyen *Candida* hücrelerinin antifungal ajanlara olan direncinin planktonik olanlara kıyasla büyük oranda arttığı çeşitli çalışmalarla belgelenmiştir. Bu konuda ilk olarak Hawser ve Douglas tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kateter materyalinden küçük diskler üzerinde 48 saatlik *C. albicans* biyofilmleri oluşturulmuş ve Amphotericin B, Flucytosine, Fluconazole, Itraconazole ve Ketoconazole'un etkisi planktonik hücrelerle kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Biyofilm hücrelerinin antifungal ajanlara 30 ile 2000 kat daha dirençli olduğu rapor edilmiştir [4].

C. albicans biyofilmindeki giderek artan antifungal direncin; değişen büyüme hızı, direnç genlerinin ekspresyonu, ekstraselüler matriks ve persister hücrelerin varlığı gibi sebeplerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Büyüme hızının *C. albicans* biyofilmindeki etkisinin anlaşılabilmesi için, Baillie ve Douglas farklı büyüme hızlarında biyofilm oluşturmuş ve Amphotericin B'ye olan duyarlılıklarını planktonik hücrelerle karşılaştırmıştır [5]. Biyofilmin tüm büyüme hızlarında Amphotericin B'ye direnç gösterebildiği tespit edilirken, planktonik hücreler sadece düşük büyüme hızında direnç göstermiştir.

Ekstraselüler matriks ise, antimikrobiyal ajanların özellikle alt katmanlardaki biyofilm hücrelerine ulaşımını engelleyerek etki eder. İlacın fizikokimyasal özellikleri ve ECM'nin miktarı ve içeriği önemlidir [9]. Al-Fattani ve arkadaşları ECM üretiminin fazla olduğu durumda, Amphotericin B'ye karşı direncin de arttığını rapor ederken [74], Baillies ve Douglas ise ECM miktarının ilaç direnciyle alakasız olduğunu bildirmişlerdir [75].

C. albicans hücre duvarının ve biyofilm matriksinin ana bileşenlerinden olan β -1,3 glukan miktarının, biyofilm oluşması sırasında değiştiği tespit edilmiştir ve bu değişim antifungal dirençle ilişkilendirilmiştir. Nett ve arkadaşları [7] Fluconazole'un, Vedyappan ve arkadaşları [76] ise Amphotericin B'nin β -1,3 glukana bağlandığını tespit etmiştir. Bu bağlanmaların, söz konusu antifungal ilaçlara karşı var olan direncin açıklamalarından biri olabileceği belirtilmektedir.

Antifungal dirençte rol oynayan bir diğer faktör de gen ekspresyonudur. Planktonik *C. albicans* hücrelerinin azol direncinde iki farklı membran lokalize atılım pompası etkili olmaktadır: CDR genleri tarafından kodlanan adenosin trifosfat bağlayıcı kaset taşıma proteinleri (ATP binding cassette transporters) ve MDR genleri tarafından kodlanan major fasilitörler (major facilitators). Biyofilm oluşumu ve gelişimi sırasında MDR1, CDR1 ve CDR2 genlerinde upregülasyon görülür. Fakat bu genlerde delesyon olduğunda planktonik hücrelerde Fluconazole duyarlılığı artsa da, biyofilmin antifungal direncinde değişme gözlenmemiştir [6], [8].

Ayrıca azoller, ERG11 tarafından kodlanan 14α -lanosterol demetilaz enzimini hedef alarak ergosterol biyosentezini engeller. Membranlardaki ergosterolün tükenmesine bağlı olarak, toksik sterol yolağı ara ürünleri birikir ve bu da büyüme inhibisyonuna yol açar. Nokta mutasyonlar veya genin overekspresyonu direnç gelişiminde rol oynamaktadır [10].

Antimikrobiyal tedavi sonrası, tedaviye yüksek tolerans gösteren ve hayatta kalan persister hücrelerin yeniden inokülasyonu yeni bir biyofilm ve yeni bir persister hücre grubunun oluştuğu görülmüş ve persister hücrelerin mutant değil, kalıtsal genotipli varyantlar olduğu tespit edilmiştir [9], [10].

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, oldukça kompleks bir yapı olan biyofilmin direnç mekanizmaları da karmaşık ve çok yönlüdür. Bu konunun tamamen aydınlatılabilmesi için yeni ve detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi - Shimadzu
- Sonikatör – Bandelin Sonoplus
- Çoklu manyetik karıştırıcı – IKA
- Manyetik karıştırıcı – Heidolph MR Hei-Mix S
- pH metre – Mettler Toledo Seven Compact / Ion S220
- Santrifüj cihazı – Beckman Coulter Allegra X-30R
- UV-Vis spektrofotometre – Shimadzu UV-1800
- Zeta potansiyel ve parçacık ölçüm cihazı – Malvern ZEN 3600 Nano ZS
- SEM – Zeiss – EVO LS 10
- FT-IR – Shimadzu IR-Prestige
- İnkübatör – Biosan ES 20
- Ultrasonik su banyosu – Bandelin Sonorex
- Milipore - Q Gradient Su Cihazı
- Vortex – IKA V1 S000
- Buzdolabı – Arçelik Altus
- Etüv – Memmert UN55
- UV Spektrofotometre – Shimadzu UV 1800
- Kabin – ESCO Class II
- Multiwell plate reader – Biotek Powerwave XS2

- -80°C dondurucu – Thermo Scientific FORMA 702
- Işık mikroskobu – Nikon Eclipse E100
- Lazer taramalı konfokal mikroskop – ZEISS LSM 700
- Floresan spektrofotometre – Photon Technology International QM-4/2003

3.2 Kullanılan Kimyasallar

- Juglon (5-hidroksi-1, 4-naftakinon) – Sigma Aldrich H47003
- *Poli(laktik-ko-glikolik asit)* (PLGA) – Sigma Aldrich 719900
- Polivinil alkol (PVA)
- Diklorometan (DCM)
- Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- Sabouraud Dextrose Broth (SDB)
- RPMI 1640
- MOPS Free acid
- PBS
- Etanol
- Fluconazole
- XTT
- Menadione
- Aseton
- Kristal viyole
- HEPES
- Glikoz
- EDTA
- Potasyum klorür (KCl)
- DMSO
- DiSC3(5)
- LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit – Invitrogen L7012

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

- **Juglon Çözeltileri**

1 mg juglon 10 ml DCM içerisinde çözülerek 0.1 mg/ml konsantrasyonda bir stok çözelti hazırlandı. Ardından bu stok çözelti seyreltilerek 0.09 mg/ml - 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında 18 çözelti daha hazırlandı.

- **Polivinil alkol (PVA) Çözeltileri**

%3'lük polivinil alkol çözeltisi hazırlamak için; 15 g polivinil alkol üzerine 500 ml ultra saf su eklendi, çözelti homojen hale gelene kadar 60-70°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve filtreden geçirildi.

%0.1'lik polivinil alkol çözeltisi hazırlamak için; 0.7 g polivinil alkol üzerine 700 ml ultra saf su eklendi, çözelti homojen hale gelene kadar 60-70 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve filtreden geçirildi.

- **Fosfat Tamponu (PBS) (pH=7.4)**

1 PBS tableti 200 ml ultra saf su içinde çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandı ve otoklavlandı.

- **Sabourad Dextrose Agar**

65 g agarın üzerine 1000 ml ultra saf su ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra otoklavlandı. Yeterince soğuduğunda petrilere döküldü.

- **Sabouraud Dextrose Broth**

15 g besiyeri 500 ml ultra saf su ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve otoklavlandı.

- **MOPS (165 mM)**

1.726 g MOPS 50 ml ultra saf su içinde çözüldü.

- **RPMI 1640 (pH=7)**

2.6 g besiyeri 250 ml ultra saf su içinde çözüldü, 165 mM MOPS kullanılarak pH'ı 7'ye ayarlandı ve filtreden geçirildi.

- **XTT**

0.05 g XTT 100 ml PBS içinde çözüldü, filtreden geçirildi ve -80°C'de saklandı.

- **Menadione (10mM)**

0.86 g menadione %100'lük aseton içinde çözüldü ve -80°C'de saklandı.

- **Kristal viyole (%1 w/v)**

0.1 g kristal viyole 10 ml PBS içinde çözüldü.

- **Farklı konsantrasyonlarda DiSC3(5) solüsyonları**

0.1 mg boya 2 ml DMSO içinde çözülerek 0.05 mg/ml konsantrasyonda solüsyon elde edildi. Ardından bu çözelti seyreltilerek 0.025 mg/ml ile 0.0005 mg/ml arasında 6 farklı konsantrasyonda solüsyon hazırlandı.

- **HEPES tamponu (5mM HEPES, pH=7.2 ve 5 mM glikoz)**

10 mM HEPES hazırlamak için; 0.5 ml 1M HEPES ultra saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

10 mM glikoz hazırlamak için; 90 mg glikoz son hacim 50 ml olacak şekilde ultra saf su içinde çözüldü.

10mM HEPES ve 10mM glikoz çözeltileri eşit hacimde karıştırıldı ve pH'ı 7.2'ye ayarlandı.

- **0.2 mM EDTA içeren HEPES tamponu**

5.8 g EDTA 50 ml ultra saf su içinde pH'ı 8'e ayarlanarak çözüldü. Ardından 90 mg glikoz ve 0.5 ml 1 M HEPES ilave edildi ve solüsyon 100 ml'ye tamamlandı.

- **KCl stok çözeltisi (6.8 M)**

3 g KCl 6 ml ultra saf su içinde çözüldü ve filtreden geçirildi.

- **DiSC3(5) stok çözeltisi (1.8 mM)**

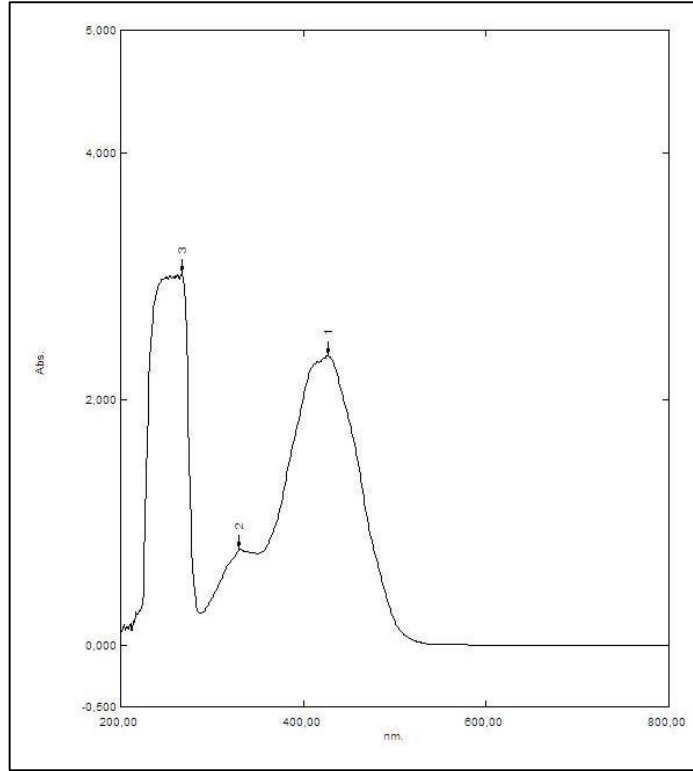
0.4 mg boya 400 µl DMSO içinde çözüldü.

3.4 Metotlar

3.4.1 Juglon-PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

3.4.1.1 Juglonun UV Standart Eğrisi

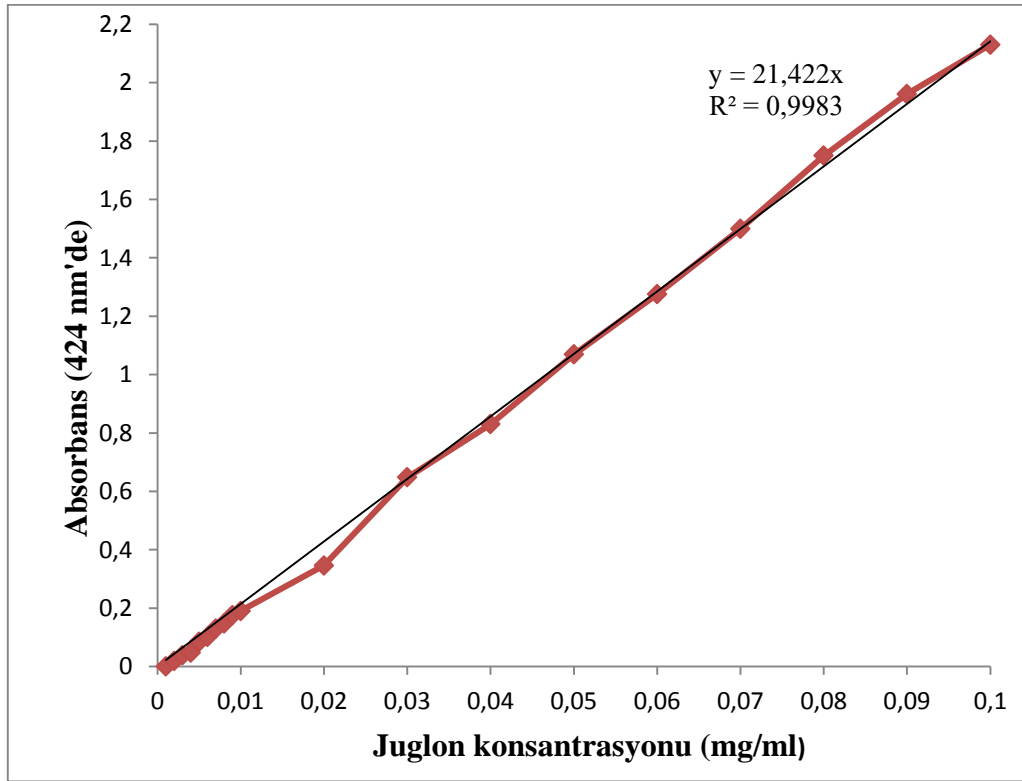
1 mg juglon 10 ml DCM içerisinde çözülerek 0.1 mg/ml konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Daha sonra bu stok çözelti kullanılarak 0.09 mg/ml - 0.001 mg/ml konsantrasyonları arasında 18 çözelti daha hazırlandı. İlk hazırlanan stok çözeltinin UV-Vis spektroskopisinde spektrumu alındı ve λ_{\max} değeri 424 nm olarak bulundu (Şekil 3.1). Ardından diğer çözeltilerin bu λ_{\max} değerindeki UV absorbanları ölçülerek (Çizelge 3.1) kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.2).



Şekil 3.1 Juglonun UV-Vis Spektrumu

Çizelge 3.1 Juglonun farklı konsantrasyonlardaki absorbans değerleri (424 nm'de)

Konsantrasyon (mg/ml)	Absorbans
0,001	0
0,002	0,019
0,003	0,038
0,004	0,047
0,005	0,084
0,006	0,101
0,007	0,129
0,008	0,147
0,009	0,175
0,01	0,19
0,02	0,346
0,03	0,648
0,04	0,83
0,05	1,069
0,06	1,275
0,07	1,499
0,08	1,75
0,09	1,961
0,1	2,13



Şekil 3.2 Juglonun kalibrasyon eğrisi

3.4.1.2 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi

Juglon molekülü hidrofobik yapıda olduğundan, nanopartikül sentezleri tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi [77] ile gerçekleştirildi.

Başlangıç juglon miktarı 35 mg, 45 mg ve 55 mg olan üç farklı juglon-PLGA nanopartikülü (sırasıyla JB-1, JB-2 ve JB-3) ve bir adet de boş nanopartikül sentezi yapıldı. Her bir nanopartikül için 100 mg PLGA kullanıldı. Juglonlar 1,5 ml DCM içinde çözüldükten sonra 1 ml DCM içinde çözülmüş olan PLGA'nın içine ilave edildi. Boş nanopartikül için ise PLGA 2.5 ml DCM içinde çözüldü. Oluşan organik fazlar enjektörle alınarak buz banyosu içinde 4 ml %3'lük PVA çözeltisine damla damla eklendi ve bu sırada 90 sn boyunca %80 power'da sonikasyon gerçekleştirildi. Oluşan emülsiyon hiç beklemeden temiz bir enjektörle alınıp manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan 35 ml %0,1'lik PVA çözeltisine damla damla eklendi. Elde edilen emülsiyonun etrafı alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra çözücünün uçabilmesi için üzerine delikler açıldı ve gece boyunca manyetik karıştırıcıda bırakıldı. Süre sonunda örneklerden boyut ölçümü için 750 µl ayrı bir tüpe aktarıldıktan sonra geriye kalan kısmı 9000 rpm'de 40 dk santrifüj edildi. Üst faz ayrıldıktan sonra pellet üç defa ultra saf su ile yıkandı ve liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen nanopartiküller -20°C'de saklandı.

3.4.1.3 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması

Reaksiyon verimi; sentezlenen nanopartikül miktarının başlangıçta kullanılan juglon ve PLGA miktarları toplamına oranı hesaplanarak tespit edildi (3.1).

$$\text{Reaksiyon Verimi } \% = \frac{\text{Nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Juglon+PLGA (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4.1.4 Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Nanopartiküllerin içine enkapsüle olan juglon miktarlarını hesaplamak için, nanopartiküllerin üretimindeki yıkama aşamasında üst fazlar toplanarak spektrumlar alındı. Daha sonra 424 nm'deki UV absorbans değerleri alınarak kalibrasyon eğrisine göre nanopartiküle yüklenmemiş olan juglon miktarları hesaplandı. Başlangıç juglon miktarlarından bu değerler çıkarılarak enkapsüle olan miktarlar tespit edildi ve verim hesaplandı (3.2).

$$\text{Enkapsulasyon Verimi } \% = \frac{\text{Enkapsüle olan etken madde miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç etken madde miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.4.1.5 Etken Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Etken yükleme verimi, nanopartikül içerisindeki juglon miktarı ve katı olarak elde edilen nanopartikül miktarı kullanılarak hesaplandı (3.3).

$$\text{Etken Yükleme Verimi } \% = \frac{\text{Nanopartikül içindeki etken (mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.4.1.6 Zeta Sizer Analizi

Üretilen nanopartiküllerin boyut analizleri “dinamik ışık saçılması” yöntemiyle 4,0 mV He-Ne lazer lamba (633 nm) ile donatılmış Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazında 25°C’de ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) gerçekleştirildi. Tüm analizler otomatik modda ve 3 tekrar ile yapıldı. Zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler kuvvetlerde M3-PALS (faz analiz ışık saçılması) tekniği kullanılarak, yine 25°C’de ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.4.1.7 SEM Analizi

Juglon enkapsüle PLGA nanopartiküllerinin morfolojileri ve boyut dağılımları SEM ile incelendi. Nanopartiküllerin yüksek çözünürlüklü SEM (HR-SEM) görüntüleri, Field Emission JEOL SEM 7001F ile 7 kV hızlandırma gerilimi uygulanarak alındı. Şarj etkisini önlemek amacıyla, örnekler DC Sputter kullanılarak 7 nm altın ile homojen olarak kaplandı [78].

3.4.1.8 FT-IR Analizi

Nanopartiküllerdeki fonksiyonel grupların kimyasal analizi IR-Prestige 21 FT-IR spektrofotometre kullanılarak ATR (universal attenuation total reflectance) modunda gerçekleştirildi. FT-IR spektrumu, örnek başına 4000 ile 750 cm^{-1} arasında değişen 16 tarama ile 4 cm^{-1} çözünürlükte elde edildi [79].

3.4.1.9 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı

In vitro salım çalışması JB-1, JB-2 ve JB-3 nanopartikülleri kullanılarak gerçekleştirildi. Nanopartiküllerden 10’ar mg tartılarak üzerlerine 4 ml PBS (pH= 7.4) eklendi ve 37°C’de

220 rpm'de yatay çalkalayıcıda bırakıldı. Örnekler belirli aralıklarla 9000 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edildi, üst faz alındı ve 424 nm dalga boyunda UV absorbans değeri ölçülerek salınan juglon miktarı hesaplandı. Pelletin üzerine tekrar 4 ml PBS eklenerek çalkalayıcıya konuldu. Ölçümlere 60 gün boyunca devam edildi.

3.4.2 Antibiyofilm Çalışmalar

3.4.2.1 *Candida albicans* süspansiyonunun hazırlanması

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerinde bulunan stok kültürden bir koloni swap yardımıyla alınarak yeni bir SDA petrisine yayıldı ve çalışma kültürü olarak kullanıldı. Çalışma kültüründen bir koloni Sabouraud Dextrose Broth (SDB) içeren tüpe aktarıldı ve gece boyu 37°C, 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası 3000 x g'de 5 dk santrifüj ile hücreler toplandı, 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra RPMI 1640 besiyeri kullanılarak pellet çözüldü. Hazırlanan bu kültürden 10 µl alınarak RPMI 1640 besiyeri ile 1:10 oranında seyreltildi ve ardından 10 µl'si thoma lamına yüklendi. Aşağıdaki formüle göre (3.4) mililitredeki hücre sayısı hesaplandı. RPMI 1640 besiyeri kullanılarak süspansiyonun konsantrasyonu 10⁷ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.

$$\text{hücre sayısı / ml} = A \times 10^4 \times SF \quad (3.4)$$

Burada;

A: 16 karedeki toplam hücre sayısı

SF: seyreltme faktörü

10⁴: 0,1 mm³'teki hücre sayısını 1 ml'deki sayıya dönüştürmek için kullanılan değer

3.4.2.2 Juglon ve Juglon-PLGA Nanopartikülleri Solüsyonlarının Hazırlanması

Arasoğlu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *C. albicans* için serbest juglonun MİK değeri 125 µg/ml olarak bulundu [21]. Literatürde ise fungal biyofilmlerin antifungal ajanlara planktonik hücrelere kıyasla 10-1000 kat kadar daha dirençli oldukları rapor edilmiş olduğundan [10], [80], çalışmalarda test edilecek en yüksek serbest juglon konsantrasyonu, çözücü olarak kullanılacak olan etanoldeki maksimum çözünürlük olan

10 mg/ml olarak seçildi. Nanopartikül konsantrasyonunu belirlemek için ise 10 mg/ml juglona eşdeğer nanopartikül miktarı aşağıda formüle (3.5) göre hesaplandı:

$$\mathbf{10\ mg\ juglona\ eşdeğer\ nanopartikül\ miktarı =} \frac{\text{sentezlenen nanopartikülün toplam miktarı} \times 10}{\text{nanopartikül üretiminde kullanılan serbest juglon miktarı} \times \text{enkapsülasyon verimi}} \quad (3.5)$$

Maddeler tartıldıktan sonra juglon nanopartikülleri steril su içinde, serbest juglon ise hidrofobik yapısı sebebiyle etanol içinde çözüldü. Maddelerin iyi çözünmesini sağlamak amacıyla, solüsyon tüpleri 20-30 dk boyunca ultrasonik su banyosu içinde tutuldu.

3.4.2.3 Juglon ve Juglon-PLGA Nanopartiküllerinin Biyofilm Oluşumu Ve Önceden Oluşturulmuş Biyofilmler Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Biyofilm oluşumu üzerindeki etkinin incelenmesi için; 24 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna hazırlanan 10^7 hücre/ml konsantrasyonundaki *C. albicans* süspansiyonundan 1 ml koyuldu. Yalnızca son kuyucuk boş bırakıldı. Daha sonra test maddeleri aşağıda şematize edildiği şekilde ilave edildi (Şekil 3-3). Suda ve etanolde çözülen serbest juglon ve Fluconazole 10 mg/ml konsantrasyondan başlanarak yarı yarıya azalan 5 doz halinde uygulandı. Su ve etanol için çözücü kontrol kuyucukları oluşturuldu. Zamana bağlı mikroorganizmanın büyüme ve gelişmesinin gözlenmesi ve çözücülerin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, yalnızca besiyeri ve mikroorganizma içeren büyüme kontrol kuyucukları oluşturuldu. Plaka 6 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. 6 saatin sonunda, tüm sıvılar biyofilm tabakasına zarar vermemeye dikkat edilerek çekildi ve kuyucuklar 2'şer kez PBS ile yıkandı.

	1	2	3	4	5	6
Juglon (suda)	A 10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	0.625 mg/ml	Büyüme kontrolü
Juglon (etanolde)	B 10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	0.625 mg/ml	Büyüme kontrolü
Fluconazole	C 10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	0.625 mg/ml	Büyüme kontrolü
D	Su kontrolü	Su kontrolü	Etanol kontrolü	Etanol kontrolü	Etanol kontrolü	XTT+ menadione kontrolü

Şekil 3.3 Biyofilm çalışmaları planı

Önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkinin incelenmesi için ise; plaka C. *albicans* süspansiyonu koyulduktan hemen sonra 6 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi ve inkübasyon sonrası besiyeri çekilerek biyofilm tabakası 2’şer defa PBS ile yıkandı. Ardından biyofilm üzerine 1’er ml RPMI 1640 besiyeri koyuldu ve test maddeleri yukarıda belirtildiği şekilde eklendi (Şekil 3-3). 37°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklar yıkandı.

3.4.2.3.1 XTT Analizi

XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında hücre canlılığını tespit etmek amacıyla sıklıkla tercih edilen bir analiz metodudur. Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü sırasında oluşan NADH’ın, elektronları plazma membranından geçirmesi ve menadione vb. bir elektron bağlama ajanını indirgemesini takiben, elektron bağlama ajanının da XTT’yi renkli formazan türevine indirgemesi temeline dayanır. Böylece, spektrofotometrik ölçüm yapılarak hem hücrelerin miktarı hem de aktivitesi hakkında bilgi edinilebilir [81].

Bu tez çalışmasında, Pierce ve arkadaşları tarafından yayınlanan XTT analiz metodu minör revizyonlar yapılarak uygulandı [82].

-80°C'de saklanan XTT solüsyonu içeren tüplerden gerektiği kadarı çözülüp, içine her 10 ml XTT solüsyonu için 1 µl menadione stok solüsyonundan eklenerek 1 µM son konsantrasyona sahip XTT/menadione solüsyonu hazırlandı. Yıkanan biyofilm üzerine hazırlanan XTT/menadione solüsyonundan 500 µl eklendi. Başlangıçta boş bırakılmış olan kuyucuğa da bu solüsyondan eklendi. Plaka alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 2-3 saat boyunca, 37°C'de ve karanlıkta inkübe edildi. Ardından, tüm kuyucuklardaki sıvıdan ~ 400 µl çekilerek yeni bir 24 kuyucuklu plakaya aktarıldı ve microtiter plate reader ile 490 nm'de ölçüm alınarak % inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı (3.6).

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{OD_{negatif kontrol} - OD_n}{OD_{negatif kontrol}} \times 100 \quad (3.6)$$

$OD_{negatif kontrol}$: Etken madde içermeyen solüsyon değeri

3.4.2.3.2 Kristal Viyole Analizi

Krisyal viyole analizi Qin ve arkadaşları tarafından uygulanan protokole göre yapıldı [83]. Yıkanan biyofilm üzerine 100 µl %1 (w/v) kristal viyole içeren 1 ml PBS solüsyonu koyuldu ve 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuklara 1 ml %95 (v/v) etanol koyuldu ve 15 dk boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra kuyucuklardaki sıvı yeni bir plakaya aktarıldı ve 570 nm'de absorbans ölçümü alındı.

3.4.2.3.3 Standart petri sayımı çalışması

Hetrick ve arkadaşları tarafından uygulanan yöntemin [47] modifiye edilerek kullanıldığı bu çalışmada; biyofilm tabakası 24 kuyucuklu plaka yerine 10 ml'lik cam kültür tüplerinde oluşturuldu. *C. albicans* hücre sayısı ve test madde konsantrasyonları 3.4.2.3. maddesinde belirtildiği şekilde hazırlandı. Bu çalışmada, XTT ve kristal viyole analizlerinde incelenen juglon antibiyofilm aktivitesine ilaveten juglon-PLGA nanopartiküllerinin biyofilm üzerindeki aktivitesi de değerlendirildi. Biyofilm oluşumundaki etkinin gözlenmesi için gerçekleştirilen çalışmada JB-1, önceden oluşturulmuş biyofilmin kullanıldığı çalışmada ise JB-2 kodlu nanopartiküller kullanıldı. Biyofilm tabakaları yıkayıp analize hazır hale getirildikten sonra, her bir tüpe 2 ml PBS koyuldu ve tüpler 120W ultrasonik su banyosunda 30 dk boyunca sonikasyona tabi

tutuldu. Böylece tutunan hücrelerin cam yüzeyden ayrılması sağlandı. 30 dakikanın sonunda, elde edilen süspansiyonlardan seri dilüsyonlar hazırlandı ve 100'er µl SDA besiyeri üzerine yayıldı. 37°C'de gece boyu inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayıldı.

3.4.2.3.4 Konfokal mikroskop ile görüntüleme

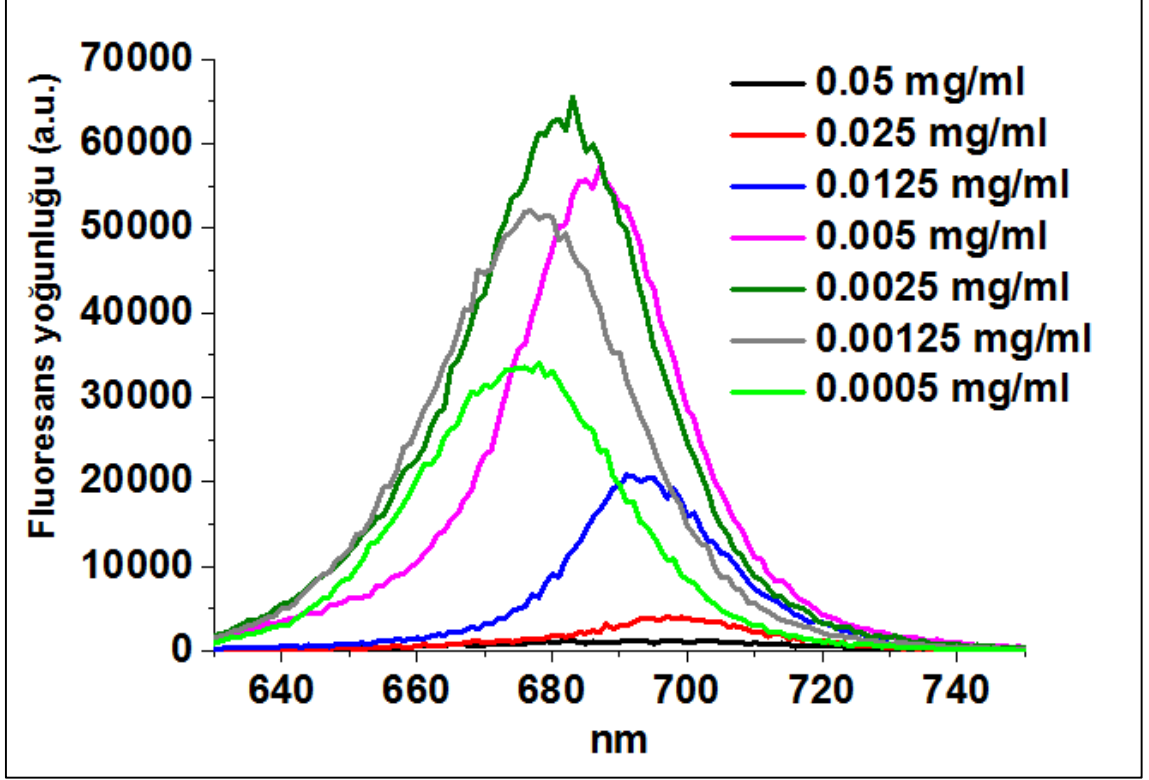
Görüntüleme için biyofilmler hazırlanmadan önce, 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 12 mm'lik bir yuvarlak lamel yerleştirildi ve daha sonra çalışma 3.4.2.3'te anlatıldığı şekilde yapıldı. Biyofilm oluşumundaki etkinin incelenmesi için gerçekleştirilen çalışmada, serbest juglon ve Fluconazole'e ek olarak JB-2 nanopartikülleri; önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkinin değerlendirildiği çalışmada ise JB-3 nanopartikülleri kullanıldı. Juglon, juglon-PLGA nanopartikülleri veya Fluconazole ile muamele edilen biyofilm tabakası yıkandıktan sonra LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit içinde temin edilen propidium iodide ve SYTO 9 boya kullanılarak boyandı. Her kuyucuk için 1 ml steril su içine 3 µl propidium iodide ve 3 µl SYTO 9 eklenip karıştırıldı ve kuyucuklara koyuldu. Plaka 15 dk karanlıkta bekletildikten sonra boya uzaklaştırıldı ve kuyucuklar steril su ile yıkandı. Bu aşamadan sonra başlangıçta kuyucuklara yerleştirilen lameller pens yardımıyla çıkarıldı ve ters çevrilerek lam üzerine yerleştirildikten sonra görüntüleme yapıldı.

3.4.3 Membran depolarizasyon analizi

Juglon, juglon nanopartikülleri ve Fluconazole'un *C. albicans* membranı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla membran potansiyeline duyarlı katyonik bir boya olan DiSC3(5) kullanıldı. DiSC3(5), çift tabakalı fosfolipitten oluşmuş hücre membranından hidrofobik yapısı sayesinde kolaylıkla geçebilen floresan bir boya olduğundan polarize hücrelerde (dinlenme halindeki hücre) sitoplazma içinde birikir. Bundan dolayı mikroorganizma içeren süspansiyon içerisindeki boya konsantrasyonunun düşmesine bağlı olarak floresans sönümlenir. Polarize hücrenin depolarize duruma geçişi (uyarılma halindeki hücre) ile sitoplazmada akümüle olmuş DiSC3(5) membran dışına çıkarak floresans yoğunluğunda artışa sebep olur [84], [85].

Membran depolarizasyon testinde kullanılacak DiSC3(5) konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, öncelikle 0.1 mg DiSC3(5) 2 ml DMSO içinde çözülerek 0.05 mg/ml

konsantrasyonda stok solüsyon elde edildi. Bu stok çözelti seyreltilerek 6 farklı konsantrasyonda solüsyon hazırlandı ve örneklerin floresans yoğunluğu 622 nm eksitasyon ve 670 nm emisyon dalga boyunda ölçüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Farklı konsantrasyonlardaki DiSC3(5) solüsyonlarının floresans ölçüm sonuçları. Sonuçlar değerlendirildiğinde; 0.0025 mg/ml, 0.00125 mg/ml ve 0.0005 mg/ml konsantrasyonlarda floresans yoğunluğunun boya konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği tespit edildi ve bu üç konsantrasyon membran depolarizasyon analizinde son boya konsantrasyonu olarak kullanıldı. Diğer konsantrasyonlar ise, emisyon dalga boyunda belirgin bir kaymanın varlığı ve boya artışı ile ters orantılı bir floresans şiddetinin gözlenmesinden dolayı tercih edilmemiştir.

Bu testte kullanılacak olan etken konsantrasyonları, Arasoglu ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yayınlanan çalışmadaki MİK değeri (125 µg/ml) baz alınarak hesaplandı [21]. Buna göre, 1.25 mg/ml'lik juglon ve fluconazole çözeltileri hazırlandı. Ayrıca çalışmada kullanılacak olan JB-3 nanopartikülleri de serbest juglonla eşdeğer konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı.

Gece boyu büyütülen *C. albicans* kültürü, 3000 x g'de 5 dk santrifüjlendi ve supernatant atıldı. Pellet HEPES tamponu (5mM HEPES ve 5 mM glikoz, pH=7.2) ile iki defa yıkandı ve en son 0.2 mM EDTA eklenmiş HEPES tamponu ile çözüldü. Thoma lamında sayım yapılarak hücre süspansiyonunun konsantrasyonu belirlendi ve 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde seyreltildi. 10 ml'lik cam kültür tüplerine hazırlanan hücre süspansiyonundan 2 ml olacak şekilde dağıtıldı. Üzerlerine 1,8 mM olarak hazırlanan DiSC3(5) stok solüsyonundan 5 µl eklenerek 0.0025 mg/ml final DiSC3(5) konsantrasyonu elde edildi. 0.00125 µg/ml ve 0.0005 µg/ml son konsantrasyonu elde etmek amacıyla ise, stok solüsyon seyreltilerek kullanıldı. Ardından tüpler karanlıkta, 30°C'de ve 150 rpm'de 30 dk boyunca inkübe edildi ve floresan spektrofotometre ile 622 nm eksitasyon ve 670 nm emisyon dalgaboyunda 0. saat ölçümü alındı. Daha sonra tüm tüplere KCl stok solüsyonundan 30 µl ilave edildi ve KCl son konsantrasyonu 0.1 M olarak ayarlandı. 100 µl juglon, JB-3 nanopartikülü ve Fluconazole çözeltisi eklenerek her tüpte 125 µg veya eşdeğer miktarda (nanopartikül için) etken olması sağlandı. Kontrol tüplerine ise yalnızca etken madde çözücüsü olarak kullanılan su eklendi. Tüpler yeniden çalkalamalı etüve alındı ve 1., 3. ve 24. saatlerde ilgili tüpler çıkarılarak ölçüm yapıldı.

BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI

4.1 Juglon-PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (s/y) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller için reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE), ilaç yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyon verileri

NP	Juglon miktarı (mg)	Boyut (Z-ave)	İlaç Yüklenme Verimi %	Enkapsülasyon Etkinliği %	Reaksiyon Verimi %	Çoklu Dağılım İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
JB-1	35	207,9	45,39	86,08	49,16	0,132	-28,6
JB-2	45	208,3	50,49	89,76	55,17	0,129	-22,9
JB-3	55	206,6	53,92	91,21	60,02	0,183	-25,5

Yelkenci (2015) tarafından yapılan çalışmada, juglon-PLGA nanopartiküllerinin sentezi ile ilgili parametreler ayrı ayrı değerlendirilmiş ve en önemli parametrenin juglon miktarı olduğu tespit edilmiştir [77]. Bu veri baz alınarak yapılan 3 adet juglon nanopartikülü

sentezinde, söz konusu tezde çalışılmamış 3 farklı etken miktarı (35 mg, 45 mg ve 55 mg) kullanılmıştır.

4.1.1 Reaksiyon verimi

Gerçekleştirilen üretimler için reaksiyon verimlerinin %49,16 ile %60,02 arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.1). Juglon miktarının artışı, üretimlerdeki madde kaybının azalmasına ve böylece reaksiyon veriminin artmasına sebep olmuştur.

4.1.2 Enkapsülasyon etkinliği

Juglon miktarındaki artış, enkapsülasyon etkinliğini de olumlu yönde etkilemiştir. 35 mg juglon kullanılarak yapılan sentez için enkapsülasyon etkinliği %86,08 olarak hesaplanırken; madde miktarı 45 mg olduğunda bu değer %89,76'ya, 55 mg olduğunda ise %91,21'e kadar yükselmiştir (Çizelge 4.1).

4.1.3 İlaç yüklenme verimi

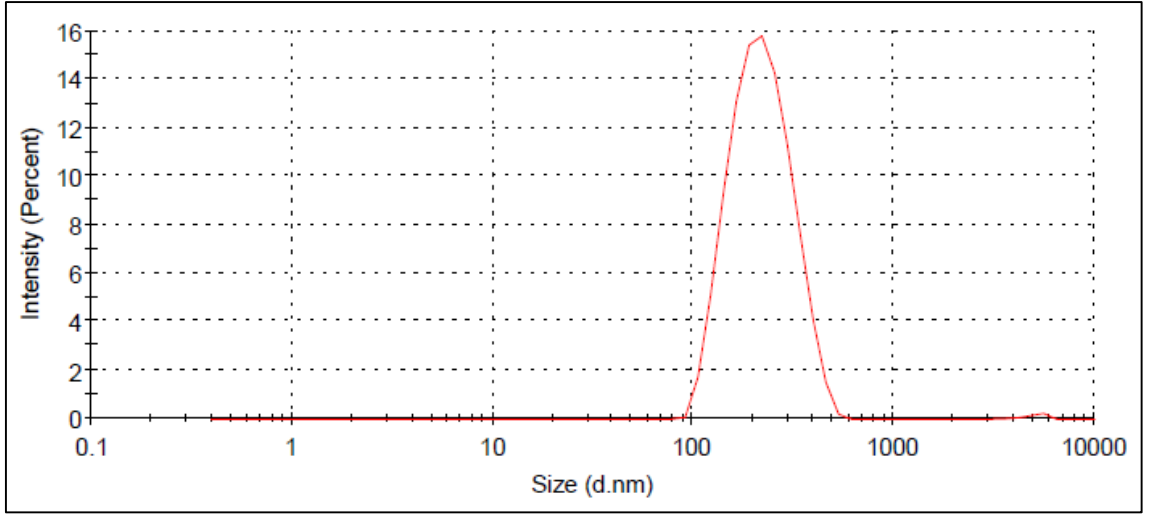
Reaksiyon verimi ve enkapsülasyon etkinliğinde olduğu gibi, ilaç yüklenme verimi de juglon miktarıyla artmış ve %45,39'dan %53,92'ye yükselen değerler bulunmuştur (Çizelge 4.1).

4.1.4 Boyut (Z-Ave)

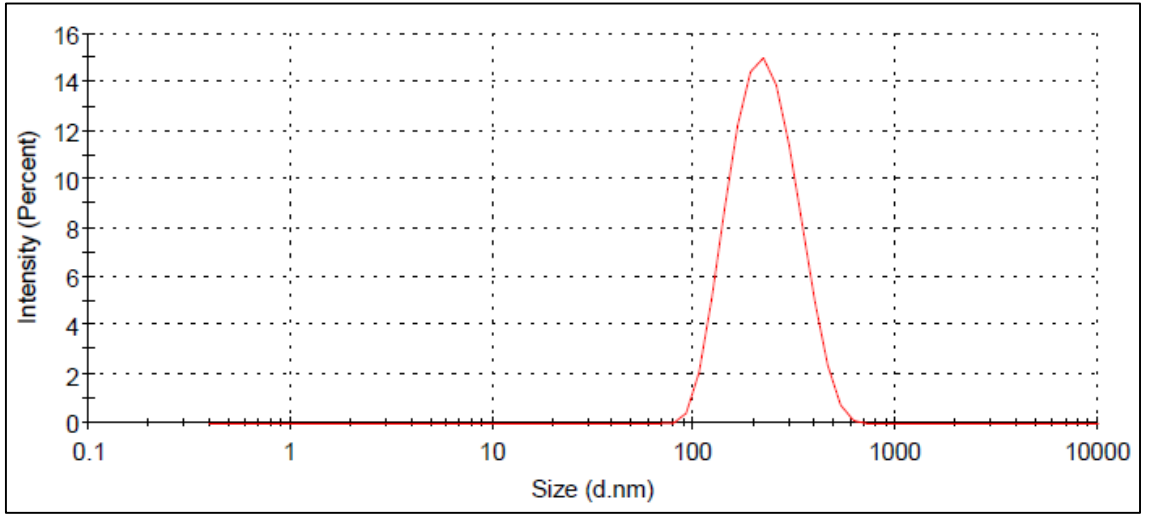
Üretilen 9 nanopartikül için Zeta sizer ile boyut ölçümü yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. 206,6 nm ile 207,9 nm arasında değişen boyutlar, juglon miktarının nanopartikül boyutunda anlamlı bir etki yaratmadığını göstermiştir.

4.1.5 Çoklu dağılım indeksi (PDI)

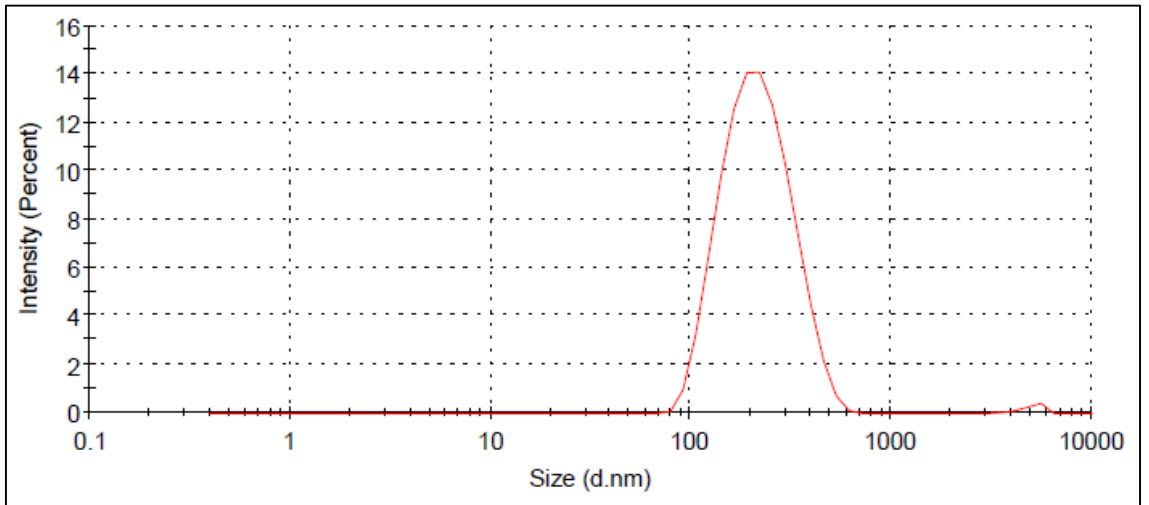
Çoklu dağılım indeksinin düşük olması, üretilen nanopartikül için boyut dağılımının dar olduğu anlamına gelmektedir. Çizelge 4.1'de verilen PDI değerleri incelendiğinde, 35 ve 45 mg juglon kullanılarak yapılan üretimlerdeki boyut dağılımlarının birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. 55 mg juglon kullanılması ise daha geniş bir boyut dağılımı olmasına yol açmıştır. Nanopartiküllere ait boyut dağılım grafikleri Şekil 4-1, 4-2 ve 4-3'te verilmiştir.



Şekil 4.1 JB-1'e ait boyut dağılım grafiği



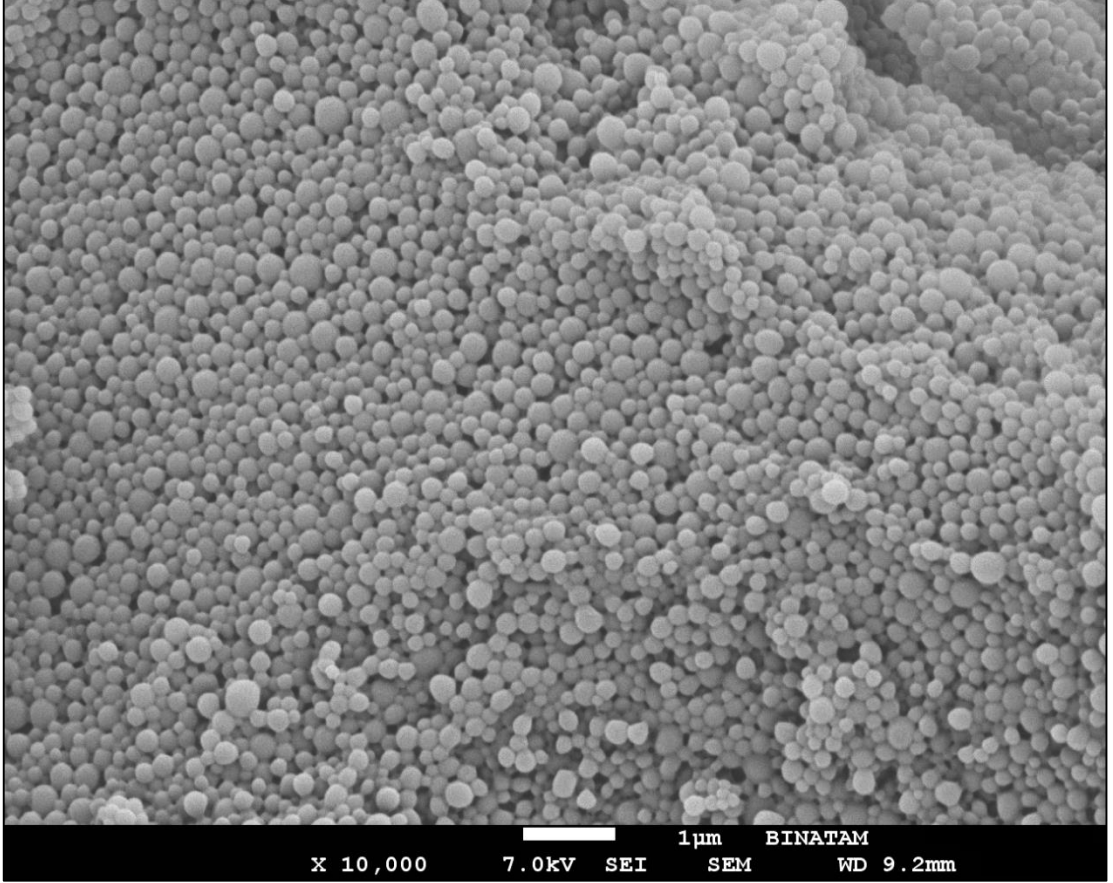
Şekil 4.2 JB-2'ye ait boyut dağılım grafiği



Şekil 4.3 JB-3'e ait boyut dağılım grafiği

4.1.6 SEM analizi

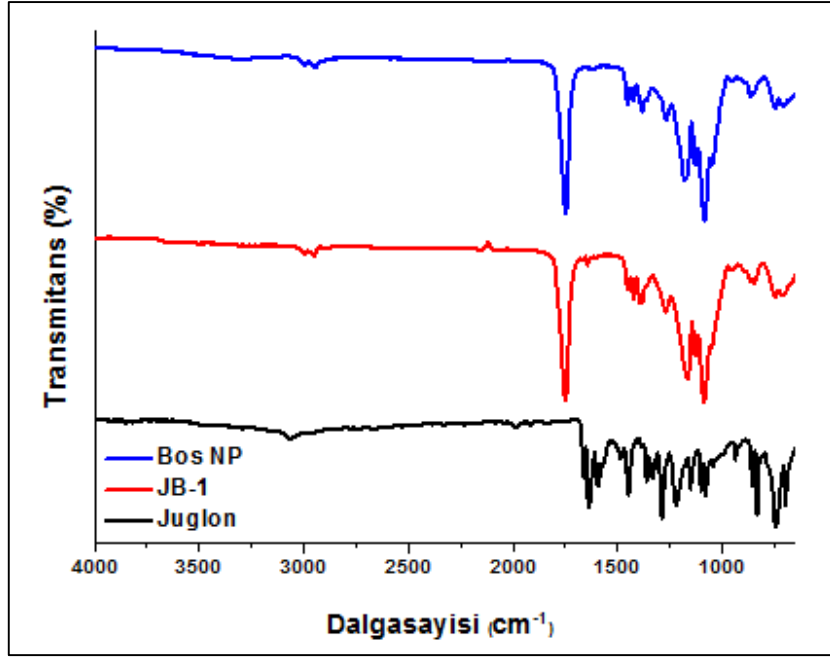
Nanopartiküllerin morfolojik yapılarını incelemek amacıyla gerçekleştirilen SEM analizi sonuçları değerlendirildiğinde, boyutu yaklaşık 200 nm civarında olan küresel yapıdaki nanopartiküllerin homojen bir dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.4 JB-1 nanopartiküllerine ait 10.000 kat büyütülmüş SEM görüntüsü

4.1.7 FT-IR analizi

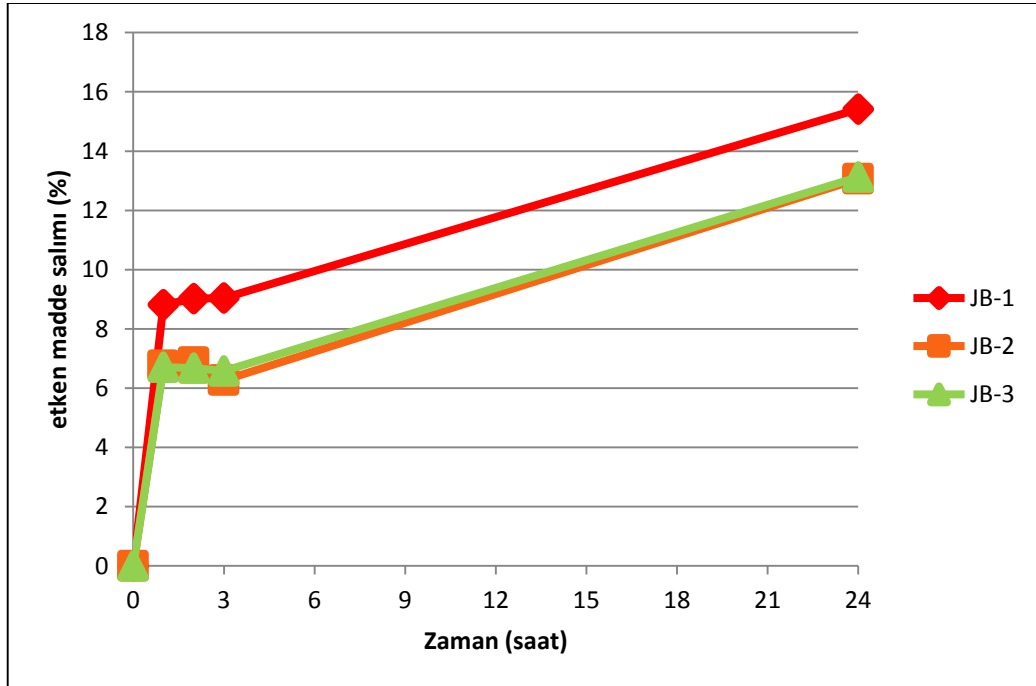
Juglonun, boş nanopartikülün ve JB-1'in FT-IR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.5'te verilmiştir. Sonuçlara göre; JB-1'de juglona ait bantların da mevcut olduğu görülmekte, bu da az miktarda juglonun nanopartikülün yüzeyine adsorbe olduğunu göstermektedir.



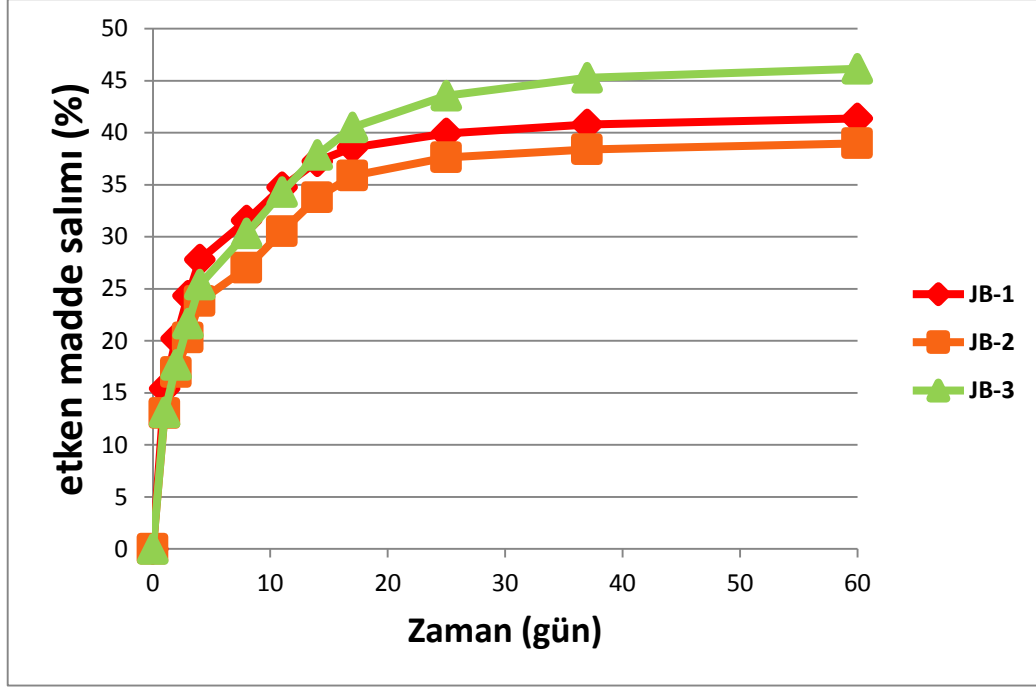
Şekil 4.5 FT-IR analiz sonuçları

4.1.8 Juglon Yüklü PLGA Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı

JB-1, JB-2 ve JB-3 nanopartikülleri kullanılarak 60 gün süre ile gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmasının sonuçları zamana bağlı olarak yüzde etken salım miktarının gösterildiği grafiklerde (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7) verilmiştir.



Şekil 4.6 JB-1, JB-2 ve JB-3'ün saatlere göre salım grafiği



Şekil 4.7 JB-1, JB-2 ve JB-3'ün günlere göre salım grafiği

Sonuçlara göre, madde salımının birinci saat içinde hızlı bir şekilde başladığı ve azalarak devam ettiği gözlenmiştir. Çalışmanın başındaki hızlı salım, nanopartikül yüzeyine yakın juglonun difüzyonundan kaynaklanmaktadır.

Farklı miktarlarda juglon kullanılarak hazırlanan JB-1, JB-2 ve JB-3 nanopartiküllerinin salımı genel olarak birbirine benzemekle birlikte en fazla salım 60. günde %46,16'ya ulaşan ve 55 mg juglon ile hazırlanan JB-3'te görülmüştür. Aynı sürede; 45 mg juglon ile hazırlanan JB-2 %38,98, 35 mg juglon ile hazırlanan JB-1 ise %41,37 oranında salım yapmıştır.

4.2 Antibiyofilm Çalışmalar

4.2.1 XTT analizi

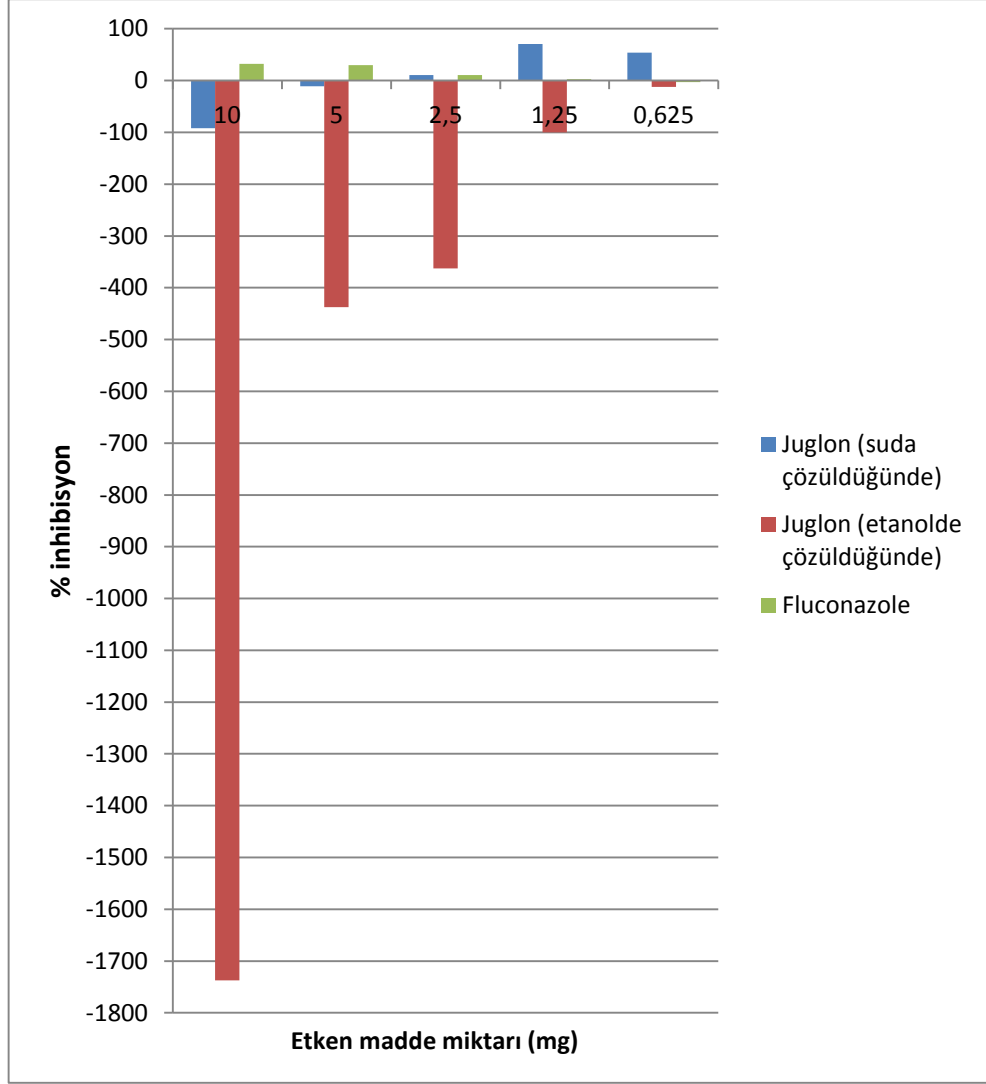
C. albicans biyofilmleri ile yapılan XTT analizinde Pierce ve arkadaşları tarafından yayınlanan metot [82] minör revizyonlar yapılarak uygulanmıştır. 96 kuyucuklu plakalar kullanıldığında, yıkama aşamalarında biyofilme zarar verildiği görüldüğü için daha geniş yüzey alanına sahip olan 24 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, gözle görülebilecek ve boyamalarda net sonuç verebilecek miktarda biyofilm oluşturabilmek için 10^7 hücre/ml konsantrasyonda *C. albicans* kültürü

kullanılmasına ve inkübasyon süresinin 6 saat olmasına karar verilmiştir. Ayrıca hidrofobik bir madde olan juglonun çözücüsü olarak, nanopartikül sentezi sırasında da kullanılan diklorometan ve bir diğer organik çözücü olan kloroform kullanılmış; ancak bu çözücüler plakaların yapısına zarar verdiği için, çalışmalara etanol kullanılarak devam edilmiştir.

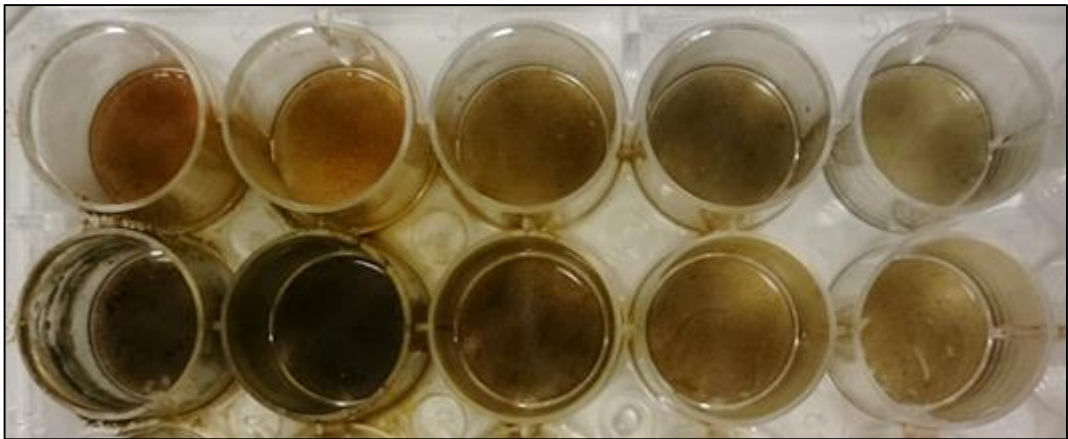
Juglon ve Fluconazole için gerçekleştirilen XTT analizinde elde edilen sonuçlar % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Hesaplama yapılırken öncelikle yalnızca XTT/menadione solüsyonu koyulan kuyucuğa ait absorbans değeri ölçülen diğer tüm değerlerden çıkarılmış, ardından etken maddeye maruz bırakılan kuyucuklar için % inhibisyon değerleri kontrol kuyucuğuna kıyaslanarak hesaplanmıştır.

Biyofilm oluşumu üzerindeki etkinin değerlendirilmesini amaçlayan çalışmada; sırasıyla 10, 5 ve 2.5 mg Fluconazole, *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumunu yaklaşık olarak %32, %30 ve %11 oranında inhibisyon ile engellemiştir. Serbest juglon uygulamasında ise beklenenden oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Juglon ile muamele edilen hücrelerin bulunduğu kuyucuklar için çok yüksek ve juglon konsantrasyonuyla birlikte artış gösteren absorbans değerleri okunmuştur (Şekil 4.8). Bu durum juglonun biyofilm oluşumunu artıran bir etki göstermiş olması olarak açıklanabilir olsa da; deneyler sırasında yapılan gözlemler, asıl problemin analiz yönteminin uyumsuzluğu olduğunu ortaya koymaktadır. Turuncu-kahverengi bir boyar madde olan juglon; açık sarı renkteki tetrazolium tuzu XTT'nin, canlı hücreler tarafından turuncu formazan maddesine dönüştürülmesi prensibine dayanan bu kolorimetrik analizin sonuçlarının sapmasına sebep olmuştur. Yüksek konsantrasyonda juglonla muamele edilen kuyucuklarda daha az canlı hücre kalmış olması ve daha düşük absorbans değeri ölçülmesi beklenirken, kuyucuklarda kalan juglonun rengi ölçülen değeri artırmıştır (Şekil 4.9). Dolayısıyla juglona ait XTT analizi sonuçları yanlış negatif olarak değerlendirilmiştir.

Önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkinin incelenmesini amaçlayan çalışmada da aynı problem yaşandığından benzer sonuçlar alınmış ve yanlış negatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8 XTT analizine göre juglon ve Fluconazole'un biyofilm oluşumu üzerine etkisi

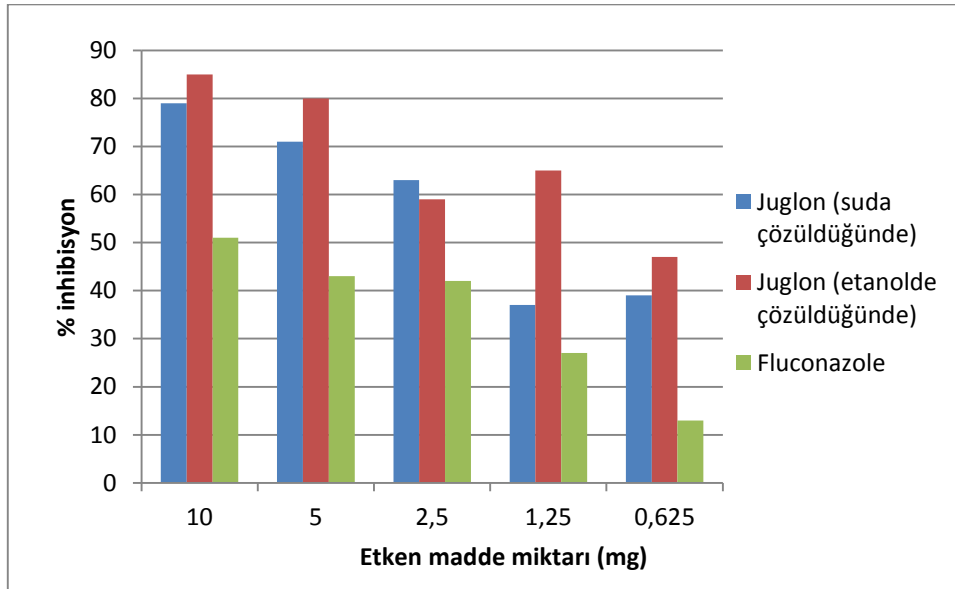


Şekil 4.9 XTT boyaması öncesi kuyucuklar

4.2.2 Kristal viyole analizi

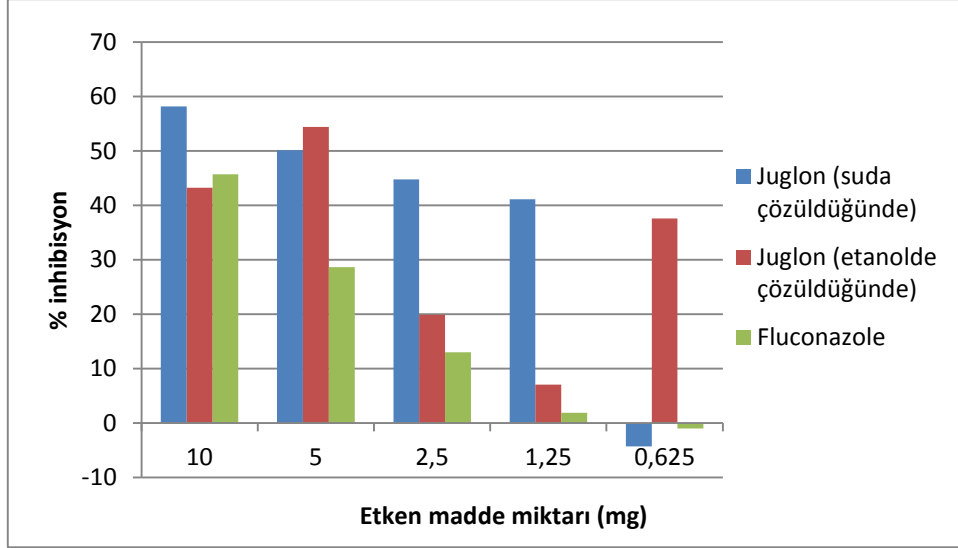
Kristal viyole analizi sonuçları, her bir etken dozu için yüzde inhibisyon olarak hesaplanmıştır.

Biyofilm oluşumu üzerindeki etkinin değerlendirilmesini amaçlayan çalışmada; suda çözüldüğünde ve en yüksek dozda (10 mg/ml) uygulandığında, juglonun biyofilm oluşumunu %79 inhibe ettiği bulunmuştur. Etanolde çözüldüğünde, aynı konsantrasyon için bu değer %85'e çıkmıştır. Bu fark juglonun sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Fluconazole'un ise juglondan daha az etkili olduğu bulunmuş, 10 mg/ml konsantrasyonun biyofilm oluşumunda %51 inhibisyona yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Kristal viyole analizine göre juglon ve Fluconazole'un biyofilm oluşumu üzerine etkisi

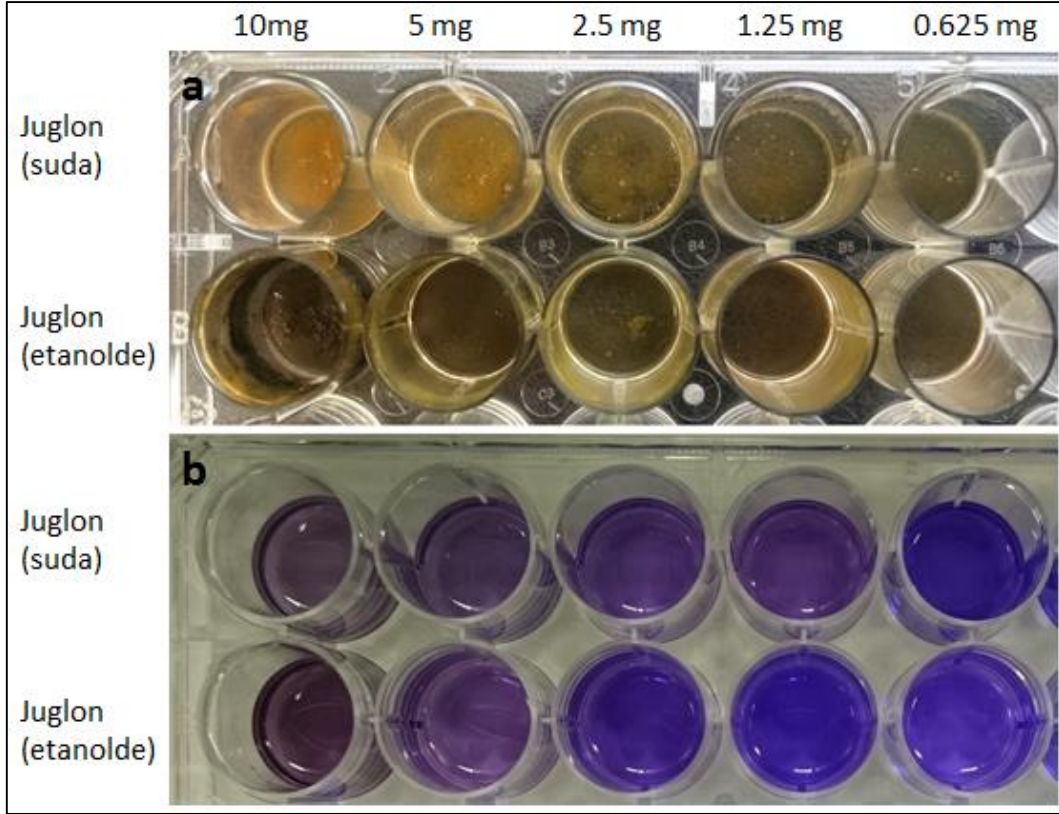
Önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkinin incelenmesini amaçlayan çalışmada; etken madde miktarı arttıkça artması beklenen yüzde inhibisyon değerleri, suda çözülen juglon ve Fluconazole için ilk dört dozda beklenildiği gibi olsa da, etanolde çözülen juglon için madde miktarıyla uyumsuz bir grafik vermiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 6 saatlik *C. albicans* biyofilmleri için etken madde dozuna bağılı % inhibisyon değerleri

Tüm değerler incelendiğinde; XTT analizi gibi kolorimetrik bir analiz olan kristal viyole analizinin de, yapılan çalışmada hatalı negatif sonuçlar verdiği görölmüştür. Bu durum, yine XTT analizinde olduğu gibi, kuyucukların renkli etken maddeden tamamen arındırılmaması nedeniyle kristal viyolenin beklenenden farklı renk vermesi sonucu gerçekleşmiştir (Şekil 4.12). Renge bağılı olarak, spektrofotometre ölçümünde sapmalar meydana gelmiş ve sonuçlar hatalı negatif olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca, kristal viyole boyaması sonrası gerçekleştirilen yıkama aşamasında, boyanın giderilmesinde yaşanan sıkıntıdan dolayı kuyucuk kenarlarında kalan kristal viyolenin absorban ölçümünde yüksek verilerin alınmasına sebep olduğu tespit edilmiştir ve bu durumun da sonuçlarda yanlış negatifliğe yol açtığı belirlenmiştir. Boya konsantrasyonunun azaltılması ile kristal viyoleden gelen bu yüksek sapma giderilmiştir. Ancak, juglondan kaynaklanan ve hatalı negatif sonuçlara sebep olan absorbanstaki yüksek sapma giderilemediğinden bu yöntemin juglon gibi renkli bileşiklerin aktivitesinin değerlendirilmesi için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

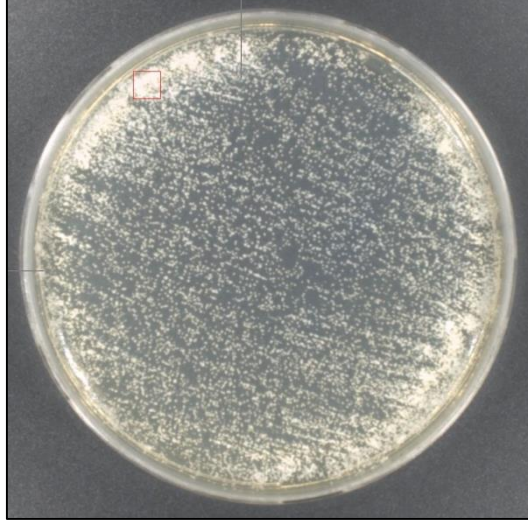


Şekil 4.12 Juglonun renginin kristal viyole analizine etkisi. (a) yıkama sonrası kuyucuklarda kalan juglon, (b) absorbans ölçümü öncesi kuyucuklar.

4.2.3 Standart petri sayımı

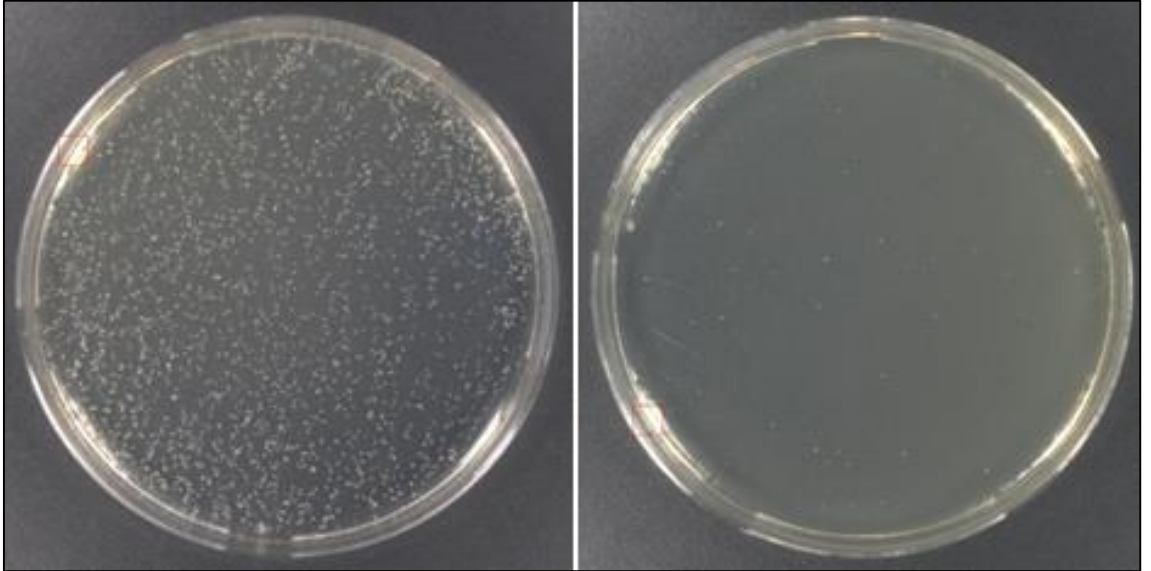
10 ml'lik cam kültür tüplerinde oluşturulan biyofilmler ile gerçekleştirilen çalışmada, seri dilüsyonlar halinde SDA besiyerine ekim yapılmış ve inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılmıştır.

Biyofilm oluşumu üzerindeki etkinin incelenmesi için gerçekleştirilen çalışmada, *C. albicans* hücre süspansiyonu ile test maddeleri başlangıç anında tüplere koyulmuş ve 6. saatlik inkübasyon sonunda 3.4.2.3.3'te anlatılan aşamaları takiben SDA besiyerine ekimler yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, su çözücü kontrolü hariç hiçbir petride koloni oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.13). Hem test maddelerinin (serbest juglon, juglon nanopartikülleri ve Fluconazole) hem de çözücü olarak kullanılan etanolün, çalışılan dozlar, süre ve hücre konsantrasyonu için biyofilm oluşumunu tamamen engellediği tespit edilmiştir.

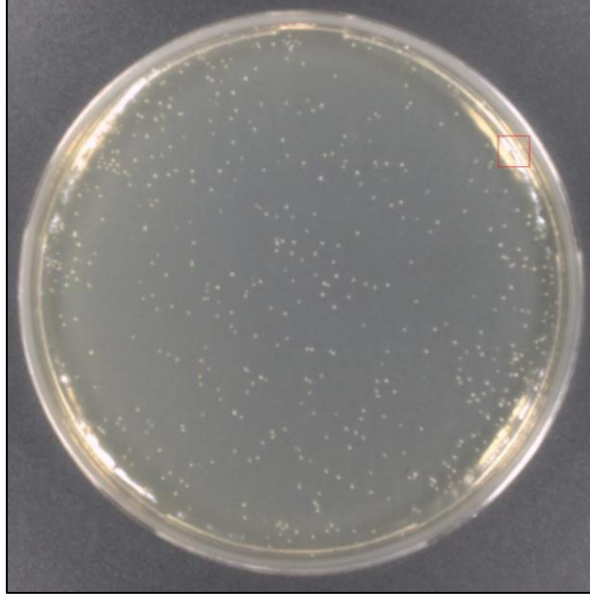


Şekil 4.13 Su çözücü kontrolü (dilüsyon faktörü: 10)

Önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkinin incelenmesini amaçlayan çalışmada; test maddeleri 6. saatte tüplere eklenmiş ve 24 saat inkübasyondan sonra ekimler yapılmıştır. Çözücü kontrol petrileri değerlendirildiğinde, sadece suyun kullanıldığı kontrolde birçok koloninin olduğu görülmüş, etanol kullanılarak yapılan çözücü kontrolünün ise biyofilmlerde anlamlı bir inhibisyona yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

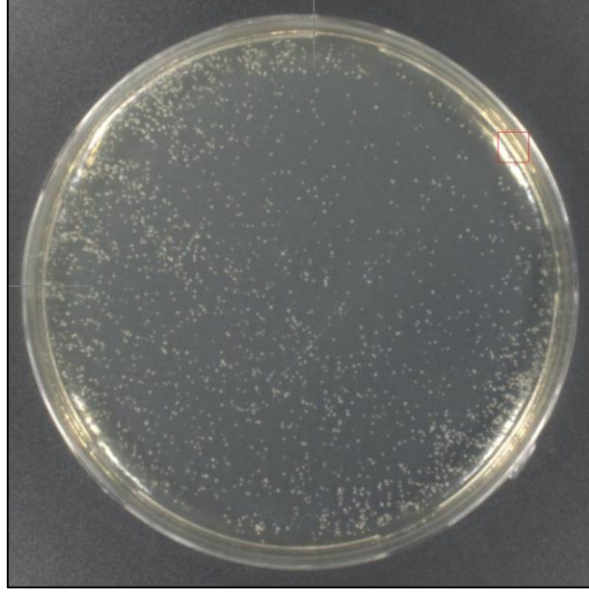


Şekil 4.14 Su (dilüsyon faktörü: 10^2) ve etanol (direkt ekim) çözücü kontrolleri



Şekil 4.15 Suda çözülen juglonun etkisi (0.625 mg/ml) (dilüsyon faktörü: 10)

Suda çözülen serbest juglon için yalnızca en düşük doz olan 0.625 mg/ml'de koloni oluşumu görülmüştür (Şekil 4.15). Koloniler sayılmış ve çözücü kontrolündeki koloni sayısı ile karşılaştırılarak yüzde inhibisyon hesaplanmıştır. Buna göre; suda çözülen serbest juglon için 0.625 mg/ml'lik dozun, 6 saatlik *C. albicans* biyofilminde %98.25 inhibisyon sağladığı tespit edilirken suda çözülen juglon nanopartiküllerinde ise koloni oluşumu çalışılan hiçbir dozda gözlenmemiştir. Bu yüzden juglon enkapsüle PLGA nanopartiküllerin bu metotta çok daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çözücü olarak kullanılan etanolün hem biyofilm oluşumu hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakası üzerinde inhibisyon etki göstermesi nedeniyle, juglon için etanolün çözücü olarak kullanıldığı çalışmaların sonuçları dikkate alınmamıştır.



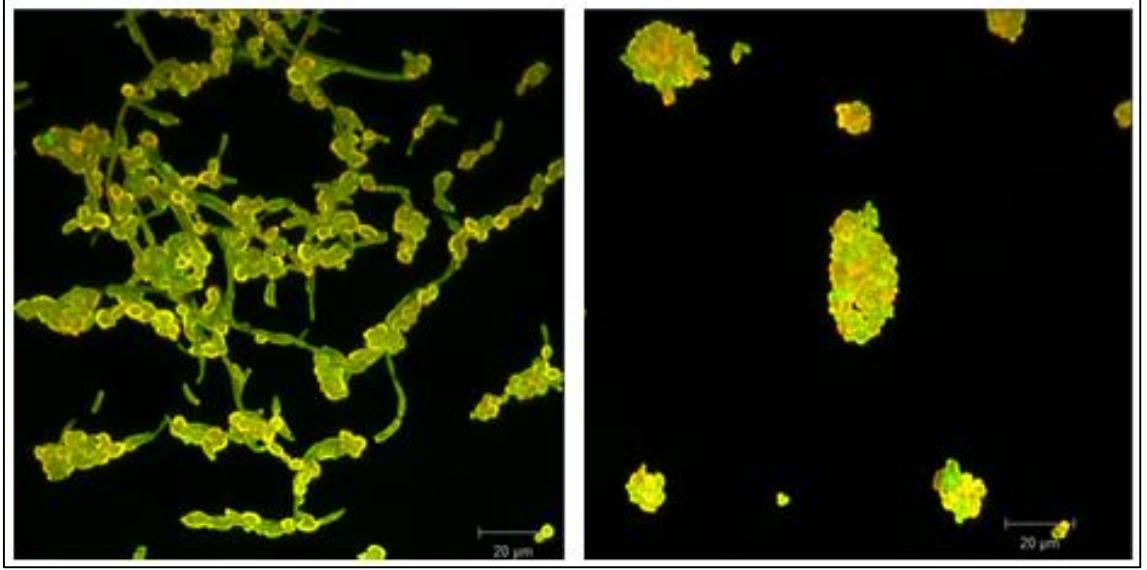
Şekil 4.16 10 mg Fluconazole'un etkisi (dilüsyon faktörü: 10^2)

Fluconazole çalışılan tüm dozlarda biyofilm oluşumunu engellemiş olsa da, 6 saatlik biyofilmlere uygulandığında, 10 mg/ml konsantrasyonda dahi anlamlı bir etki gösterememiştir (Şekil 4.16).

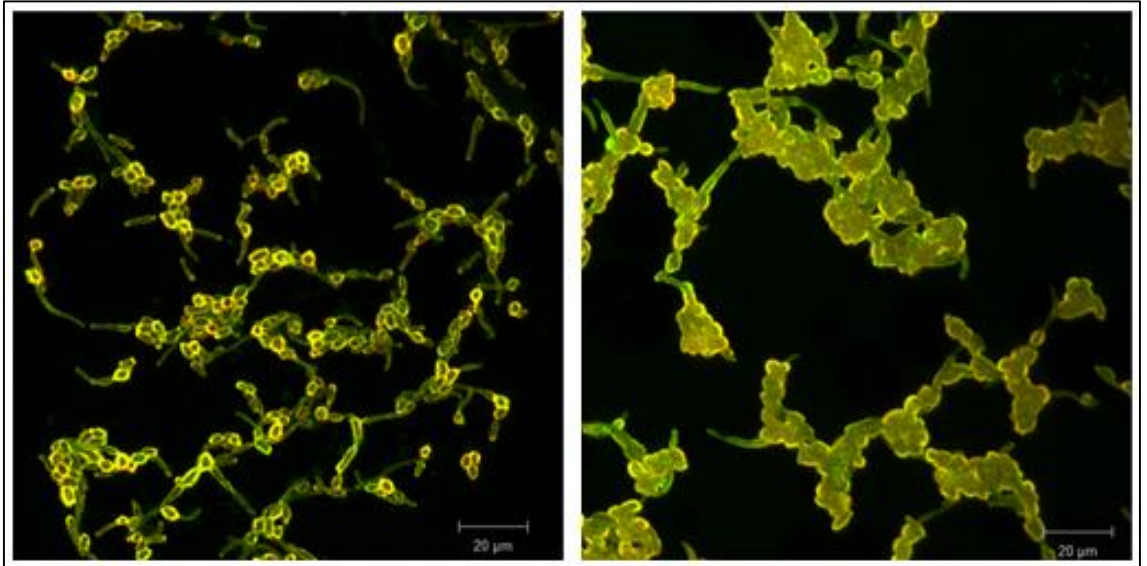
4.2.4 Konfokal mikroskop ile görüntüleme

Konfokal mikroskop ile görüntüleme öncesinde, hazırlanan biyofilmler SYTO 9 ve propidium iodide ile boyanmıştır. SYTO 9 hem sağlıklı hücreleri hem de membran yapısı zarar görmüş hücreleri boyarken, PI yalnızca hasarlı hücrelere nüfuz edebilmektedir. Hücrelerin canlılığı ve membran bütünlüğü hakkında bilgi edinilmesini sağlayan bu teknikte, yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölü hücreleri göstermektedir.

Biyofilm oluşumu üzerindeki etkinin incelenmesi için gerçekleştirilen çalışmada; su çözücü kontrolüne ait görüntü incelendiğinde, canlı ve farklı morfolojik yapılarıdaki *C. albicans* hücrelerinin kümelenerek biyofilm yapısını oluşturduğu görülmüştür. Etanole maruz bırakılan biyofilimde ise, yalnızca maya formunda hücreler tarafından oluşturulmuş mikrokoloniler gözlemlenmiş ve bu hücrelerin bir kısmının ölü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.176).

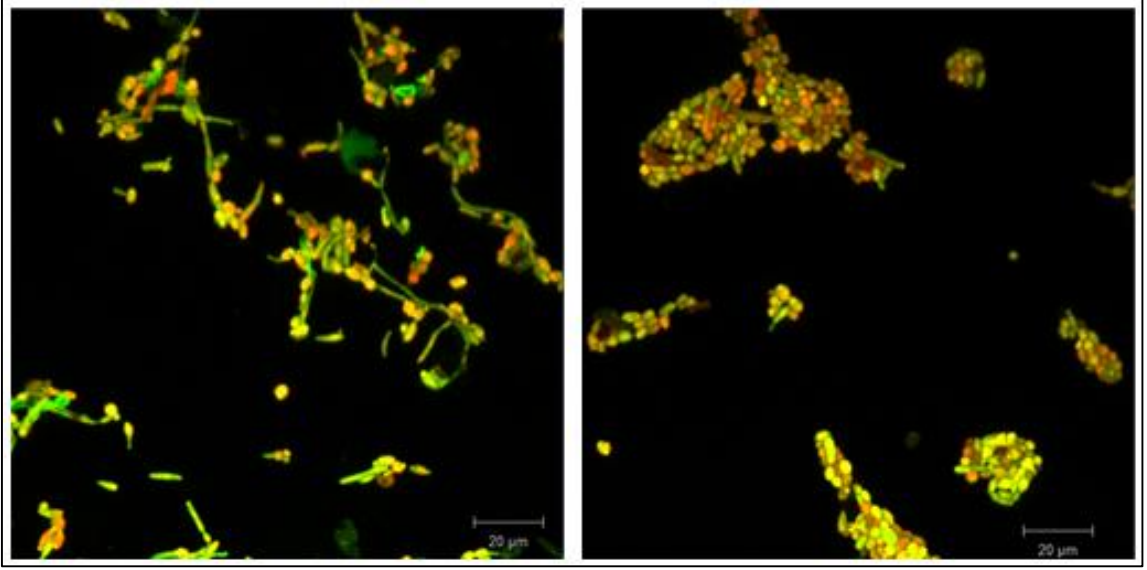


Şekil 4.17 Biyofilm oluşumu çalışmasında su ve etanol çözücü kontrolleri 10 mg ve 5 mg Fluconazole ile muamele edilen hücrelerde ise, su çözücü kontrolüne kıyasla anlamlı bir inhibisyon gerçekleşmemiştir (Şekil 4.18).

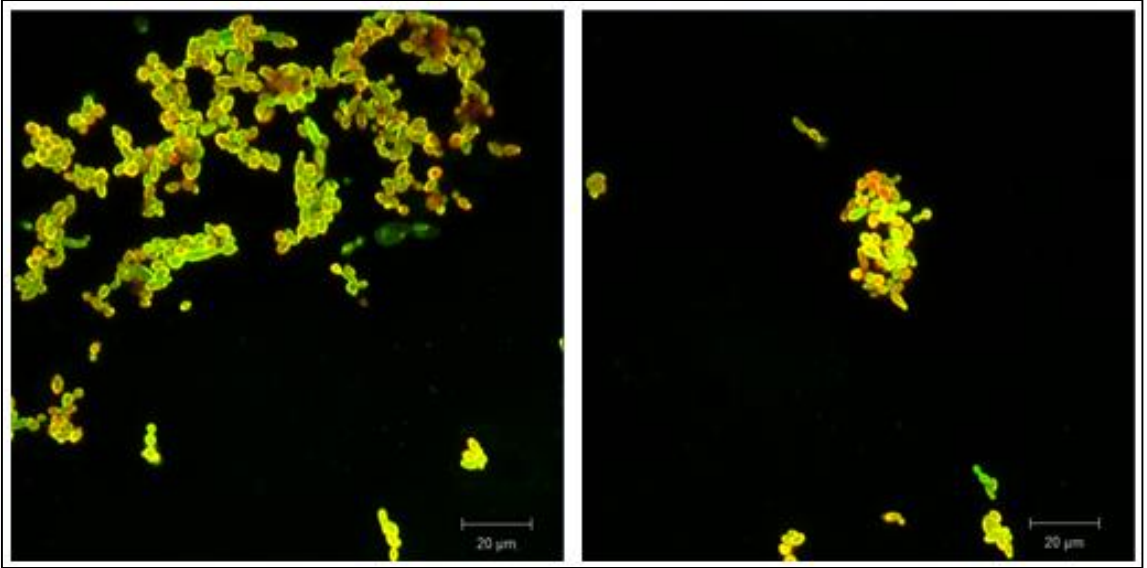


Şekil 4.18 Fluconazole'un biyofilm oluşumuna etkisi

Serbest juglonun su ile çözüldüğü durumda, juglonun inhibe edici etkisi çalışılan her iki dozda da (1.25 mg/ml ve 0.625 mg/ml) açıkça görülmüştür. Kontrolle kıyaslandığında, yüzeye daha az hücrenin tutunabildiği ve yeşil floresans yoğunluğunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Juglon çözücüsü olarak etanol kullanıldığında ise, etanol çözücü kontrolünde olduğu gibi yalnızca maya formunda hücreler gözlemlenmiş ve canlılığın oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20).

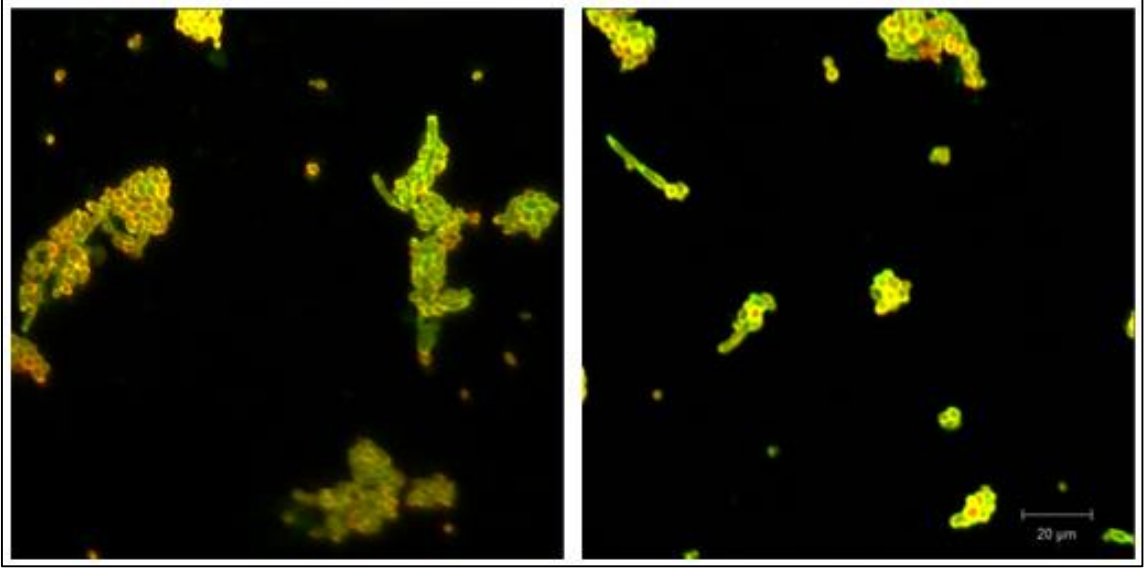


Şekil 4.19 Suda çözülen juglonun biyofilm oluşumuna etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)



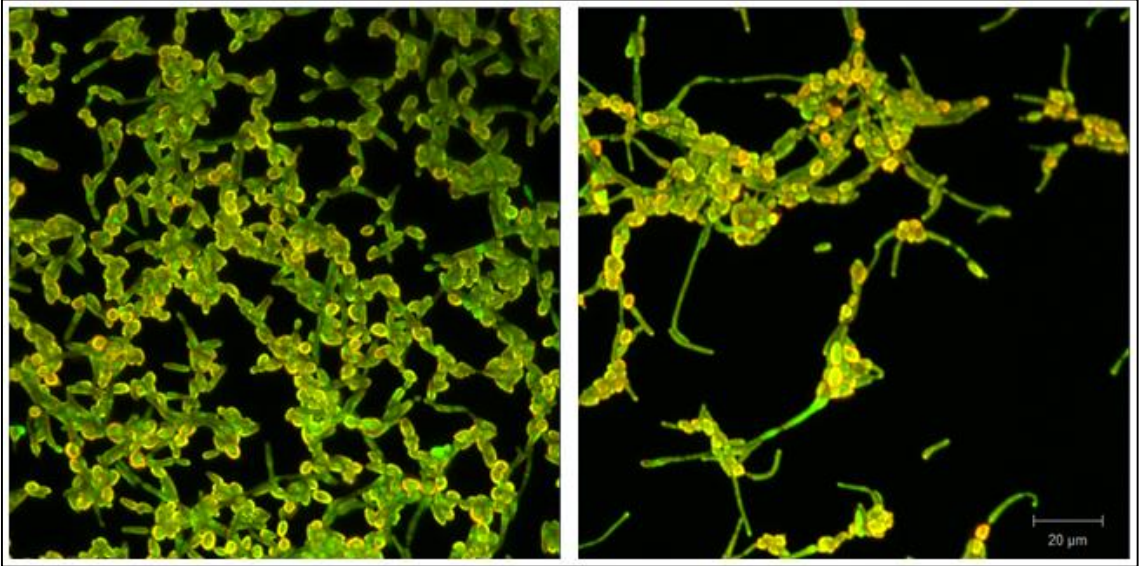
Şekil 4.20 Etanolde çözülen juglonun biyofilm oluşumuna etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)

Juglon-PLGA nanopartikülleri, serbest juglona benzer bir inhibisyona yol açmıştır. Maya formundaki hücrelerin baskın olduğu mikrokolonilerin bulunduğu ve birçok hücrenin membran bütünlüğünün bozuk olduğu görülmüştür (Şekil 4.21).



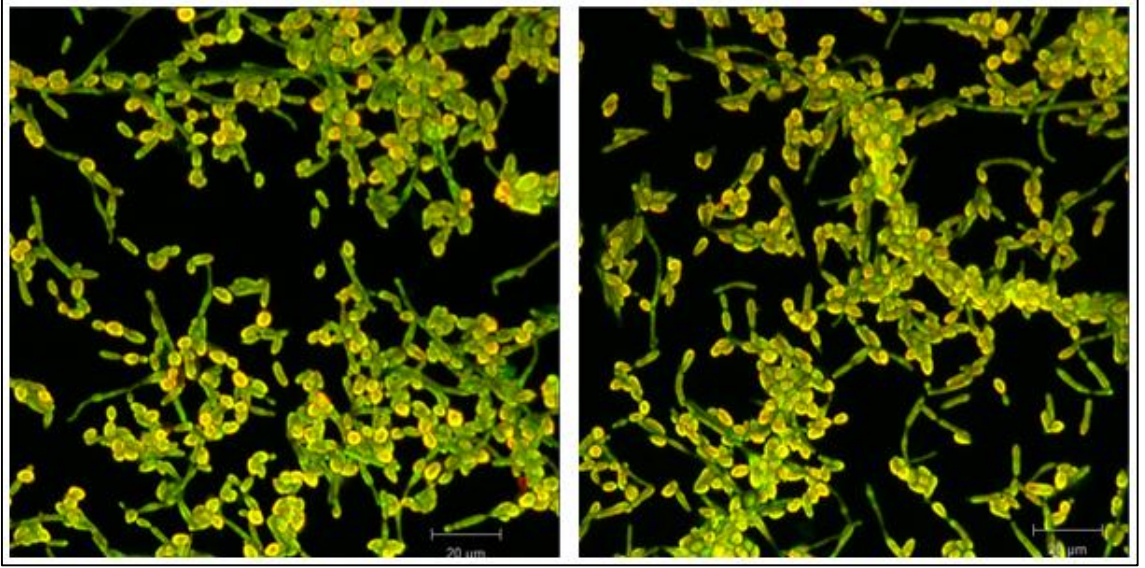
Şekil 4.21 Juglon-PLGA nanopartiküllerinin biyofilm oluşumuna etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml'ye eşdeğer konsantrasyonlar)

Önceden oluşturulmuş biyofilmler üzerindeki etkinin incelendiği çalışmada ise; su çözücü kontrolünde yüzeyi büyük ölçüde kaplamış, canlı hücrelerden oluşan biyofilm yapısı gözlenmiştir. Etanol çözücü kontrolünde ise, oluşturulmuş olan 6 saatlik biyofilmin büyük kısmının parçalanarak yüzeyden ayrıldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



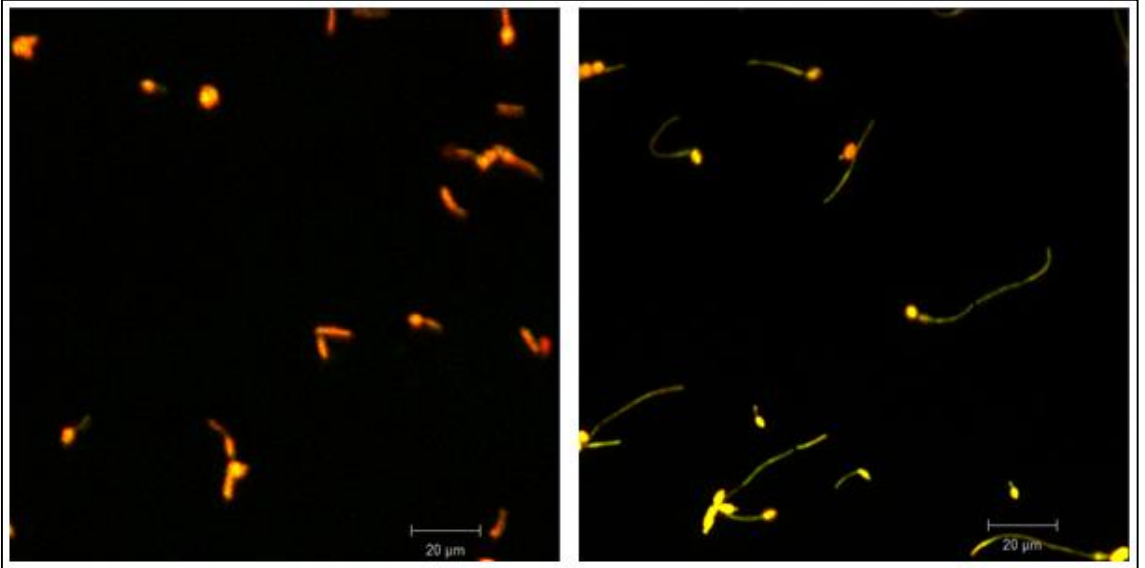
Şekil 4.22 6 saatlik biyofilmlerde su ve etanol çözücü kontrolleri

Kontrolle kıyaslandığında, 10 mg/ml ve 5 mg/ml konsantrasyonda uygulanan Fluconazole'un anlamlı bir antibiyofilm etki göstermediği görülmüştür (Şekil 4.23).

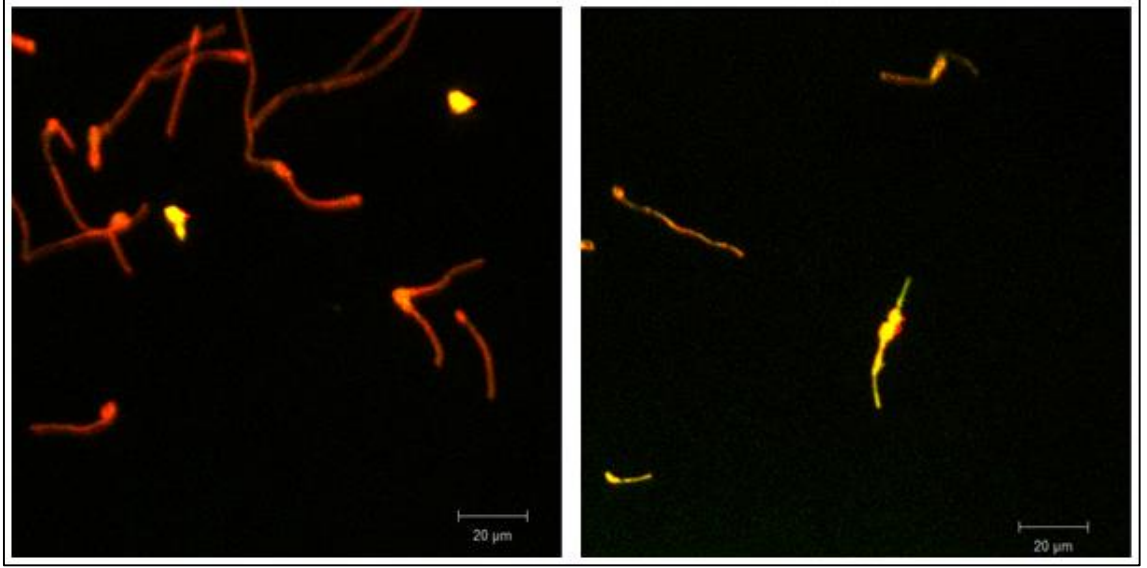


Şekil 4.23 10 mg/ml ve 5 mg/ml Fluconazole'un 6 saatlik biyofilmlere etkisi

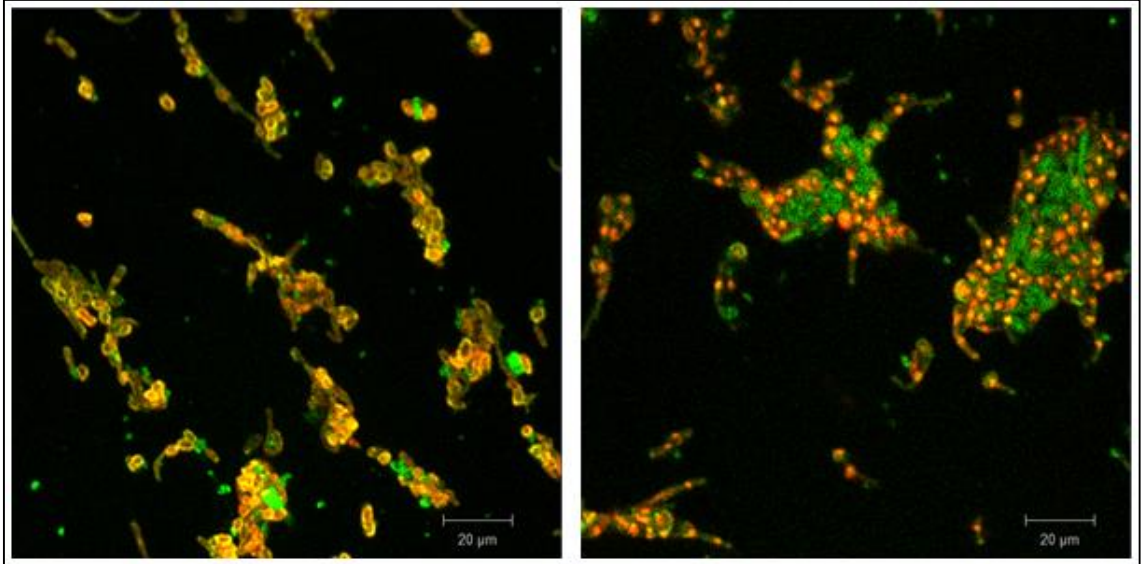
Serbest juglon ise, hem su hem de etanolla çözüldüğü durumda, oluşan biyofilmin neredeyse tamamını yok etmiştir. Yüzejde kalan az sayıdaki hücrenin çoğunun hif modunda büyüyen hücreler olduğu görülmektedir (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25).



Şekil 4.24 Suda çözülen juglonun 6 saatlik biyofilmlere etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml)



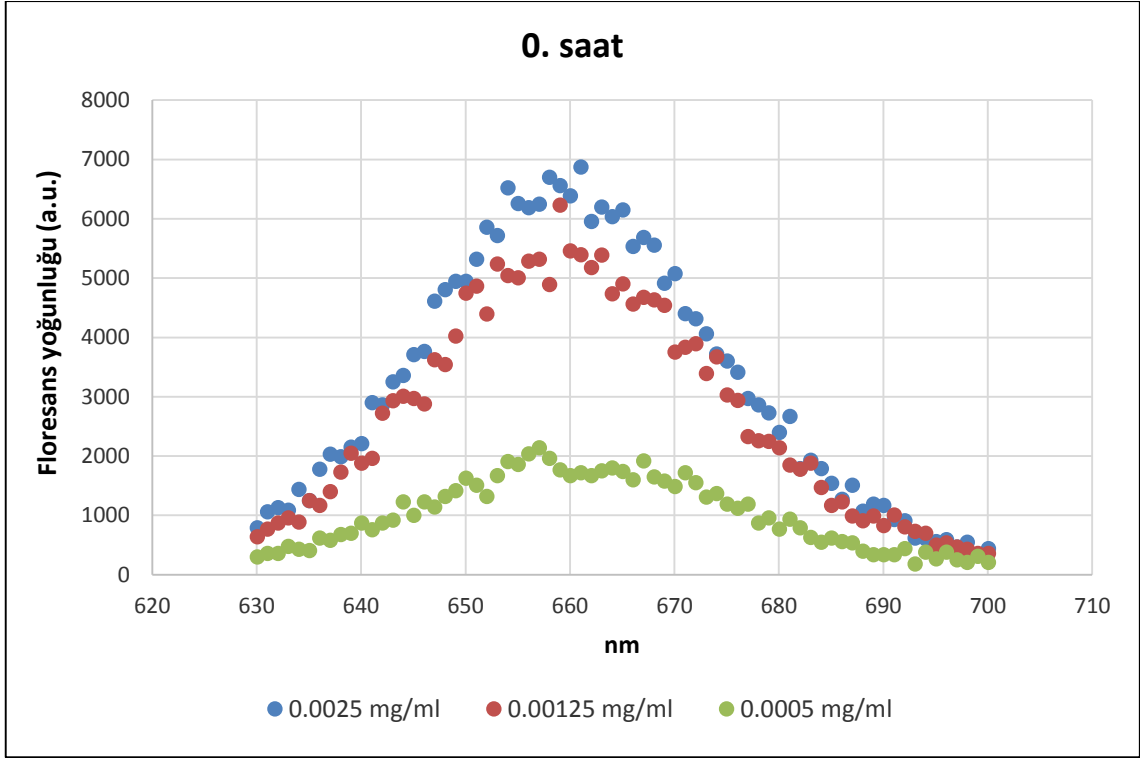
Şekil 4.25 Etanolde çözülen juglonun 6 saatlik biyofilmlere etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml) Juglon-PLGA nanopartikülleri, önceden oluşturulan biyofilmlerde güçlü bir inhibisyona yol açmıştır. Görüntüler incelendiğinde yüzeye tutunmuş birçok hücre görülse de, özellikle 1.25 mg/ml'lik dozun uygulandığı durumda, yüksek miktarda kırmızı floresans görülmüş ve bu hücrelerin büyük çoğunluğunun ölü olduğu tespit edilmiştir. Canlı kalan hücrelerin ise biyofilmin alt katmanlarında bulunan hücreler olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Juglon-PLGA nanopartiküllerinin 6 saatlik biyofilmlere etkisi (1.25 ve 0.625 mg/ml'ye eşdeğer konsantrasyonlar)

4.3 Membran depolarizasyon analizi

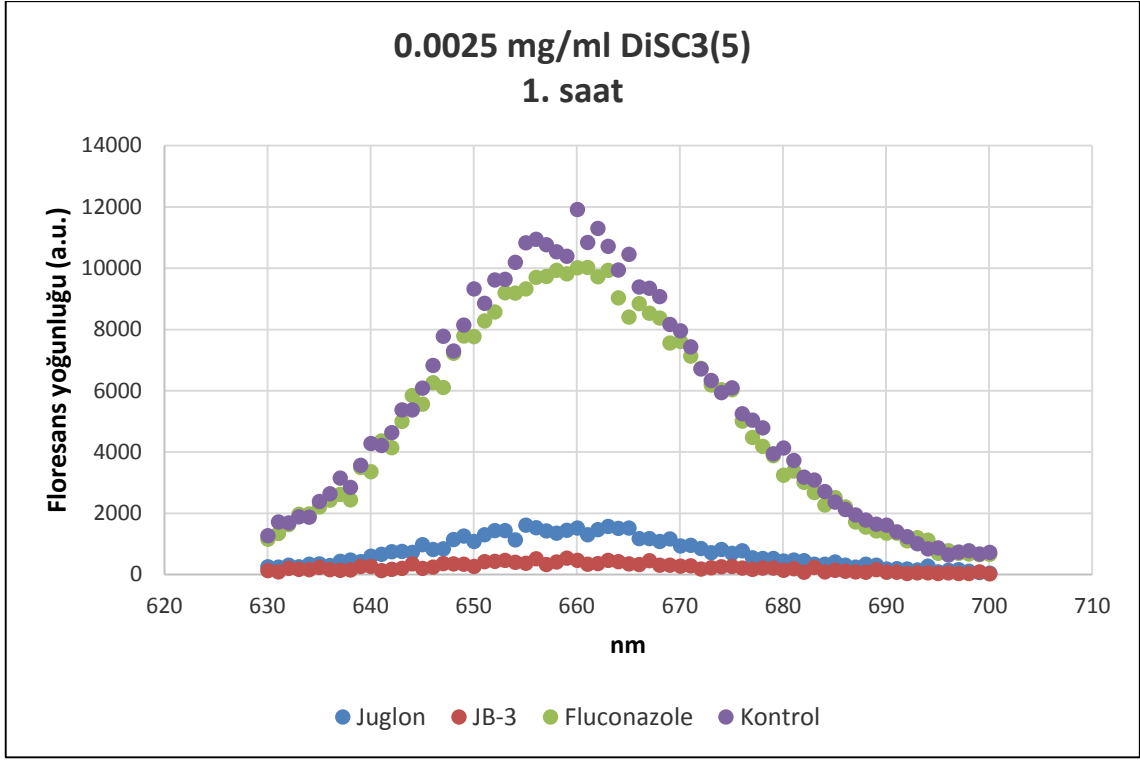
Juglon, juglon nanopartikülleri ve Fluconazole'un membran üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışmada, öncelikle seçilen 3 farklı konsantrasyonda DiSC3(5) ile *C. albicans* hücreleri bir araya getirilmiş ve 30 dk inkübasyon sonrasında floresans ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.27'da verilmiştir.



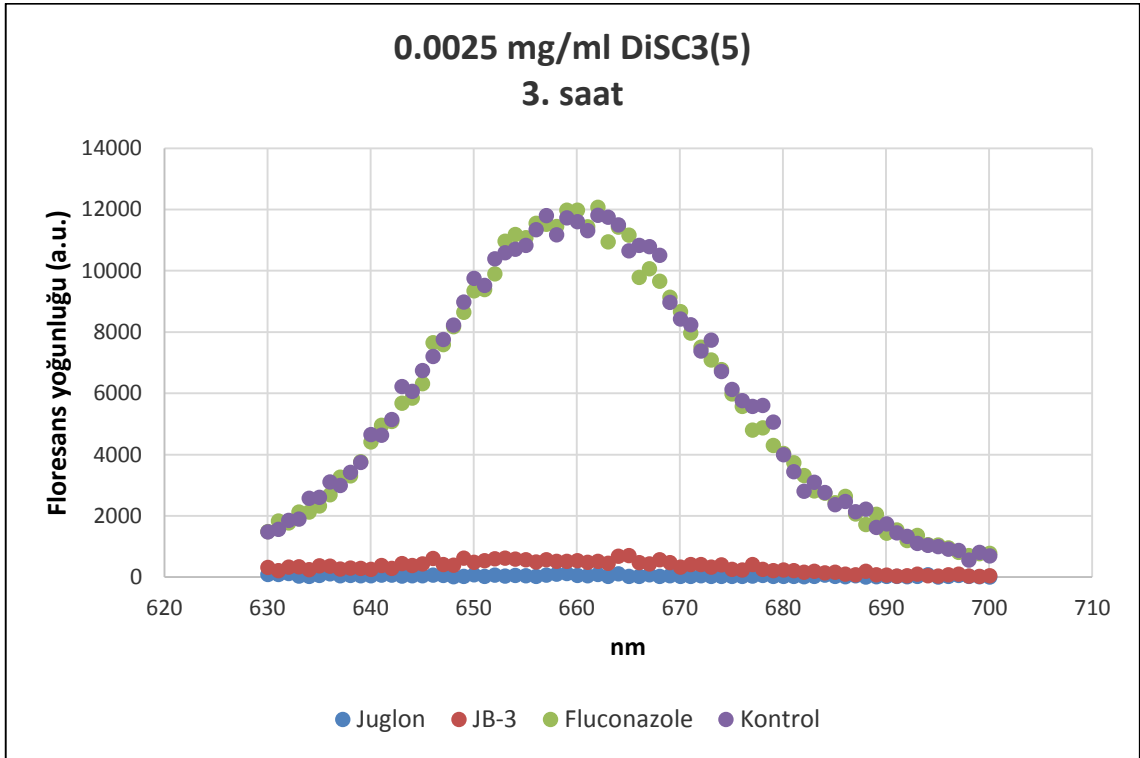
Şekil 4.27 Farklı konsantrasyonlarda DiSC3(5) kullanılarak hazırlanan örneklerin 0. saatteki floresans yoğunlukları

Şekil 3.4'te verilen ve 0.0025 mg/ml, 0.00125 mg/ml ve 0.0005 mg/ml DiSC3(5) için ölçülen floresans değerleri ile aynı konsantrasyonlarda boya ile *C. albicans* hücrelerinin inkübasyonunu takiben yapılan 0. saat ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında; beklenildiği üzere DiSC3(5)'in hücre içine alındığı ve buna bağlı olarak floresans yoğunluğunun yaklaşık %90- 95 oranında düştüğü görülmüştür.

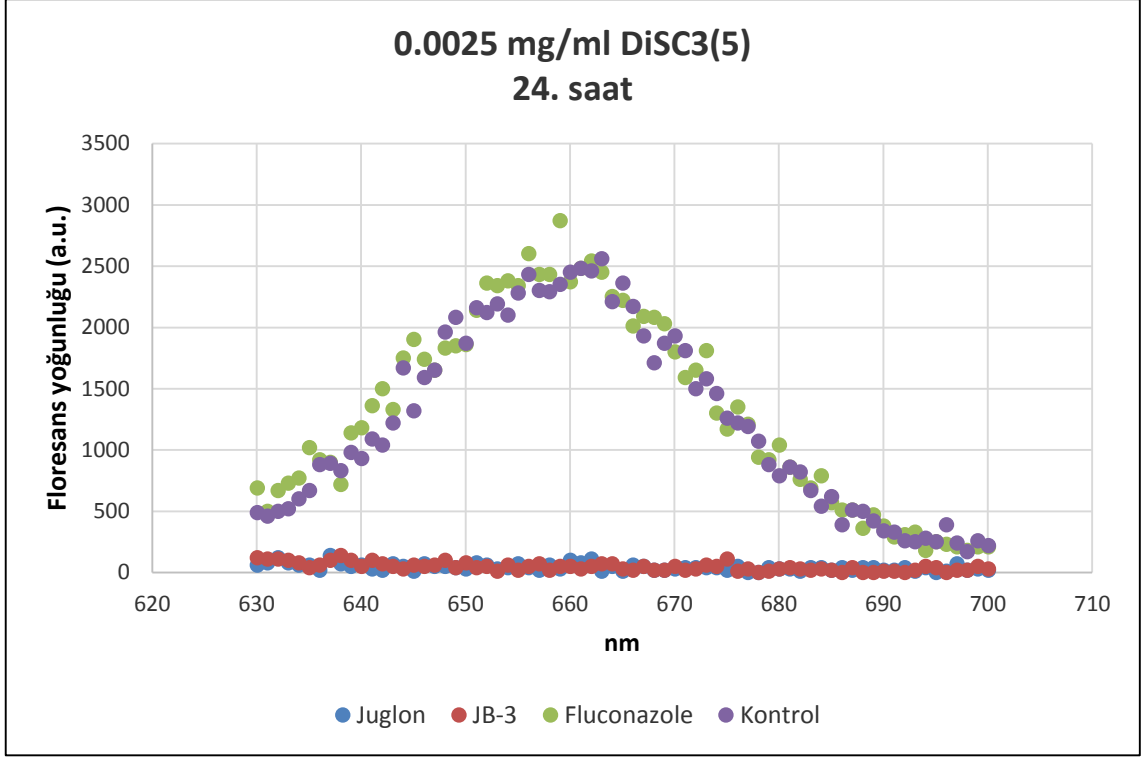
Farklı konsantrasyonda DiSC3(5) ile muamele edilen *C. albicans* hücrelerine etken maddelerin ilavesi sonrasında yapılan 1., 3. ve 24. saat ölçüm sonuçları, her bir boya konsantrasyonu için ayrı ayrı olarak Şekil 4.28 ile Şekil 4.36 arasında verilen grafiklerde gösterilmiştir.



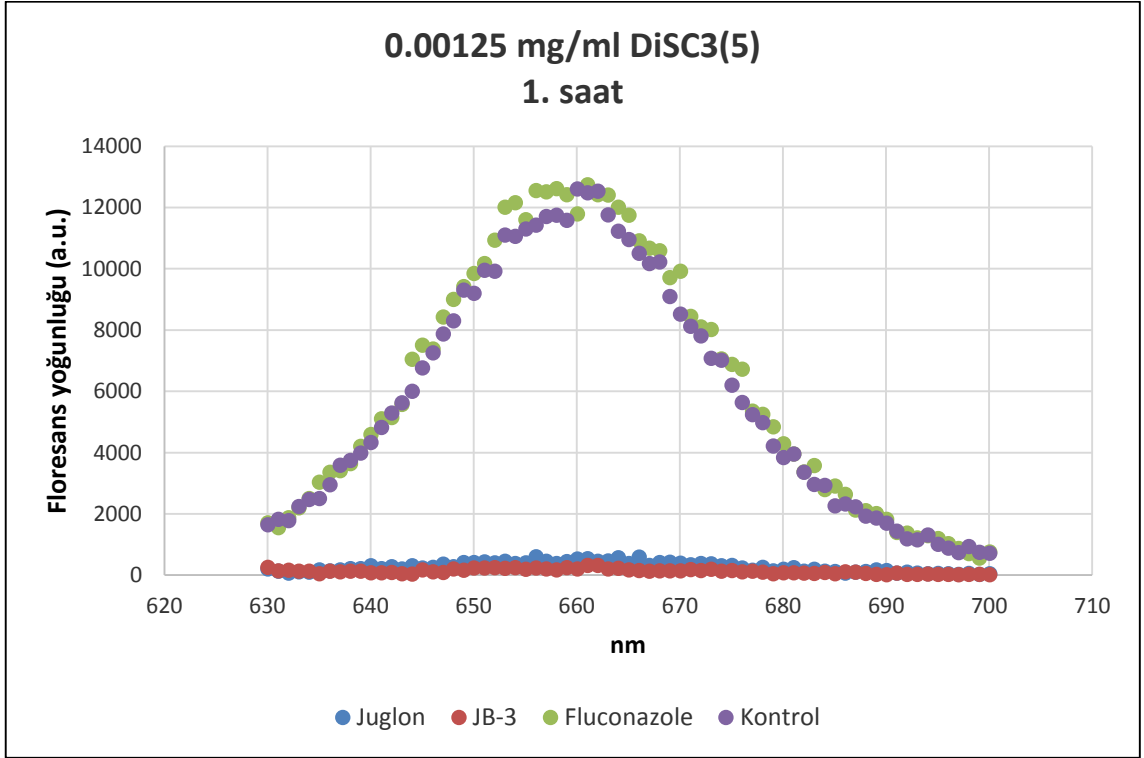
Şekil 4.28 0.0025 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 1. saat floresans ölçüm sonuçları



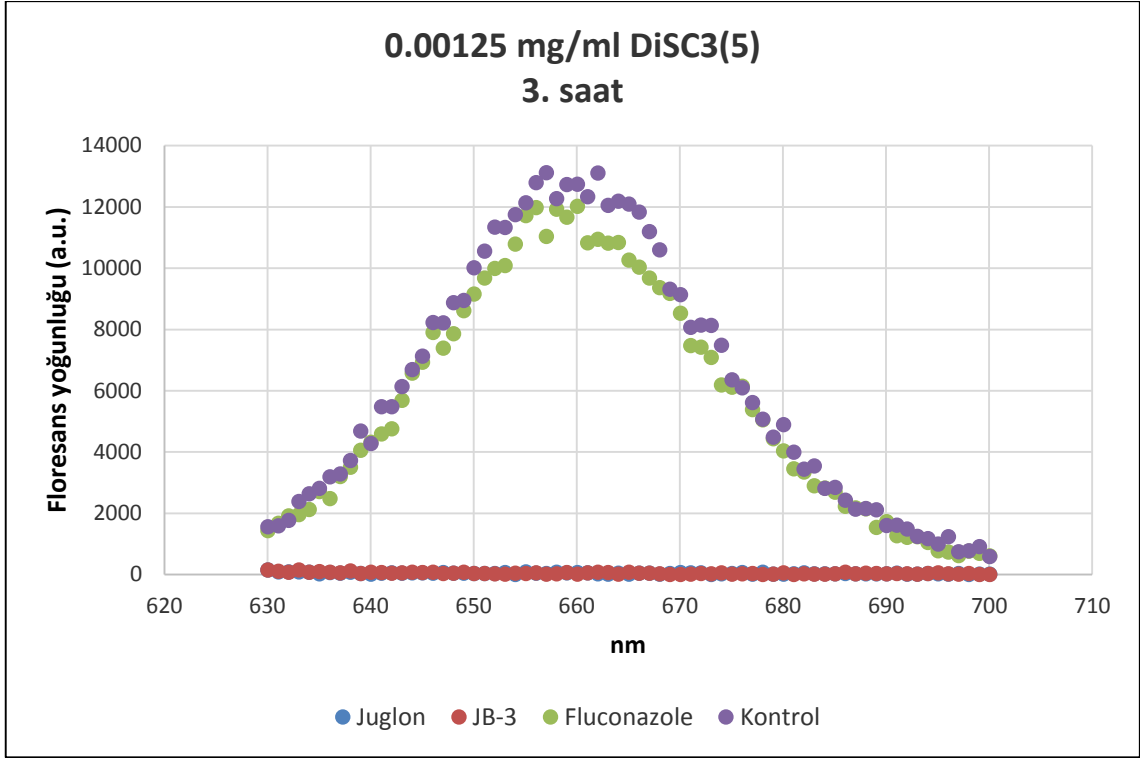
Şekil 4.29 0.0025 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 3. saat floresans ölçüm sonuçları



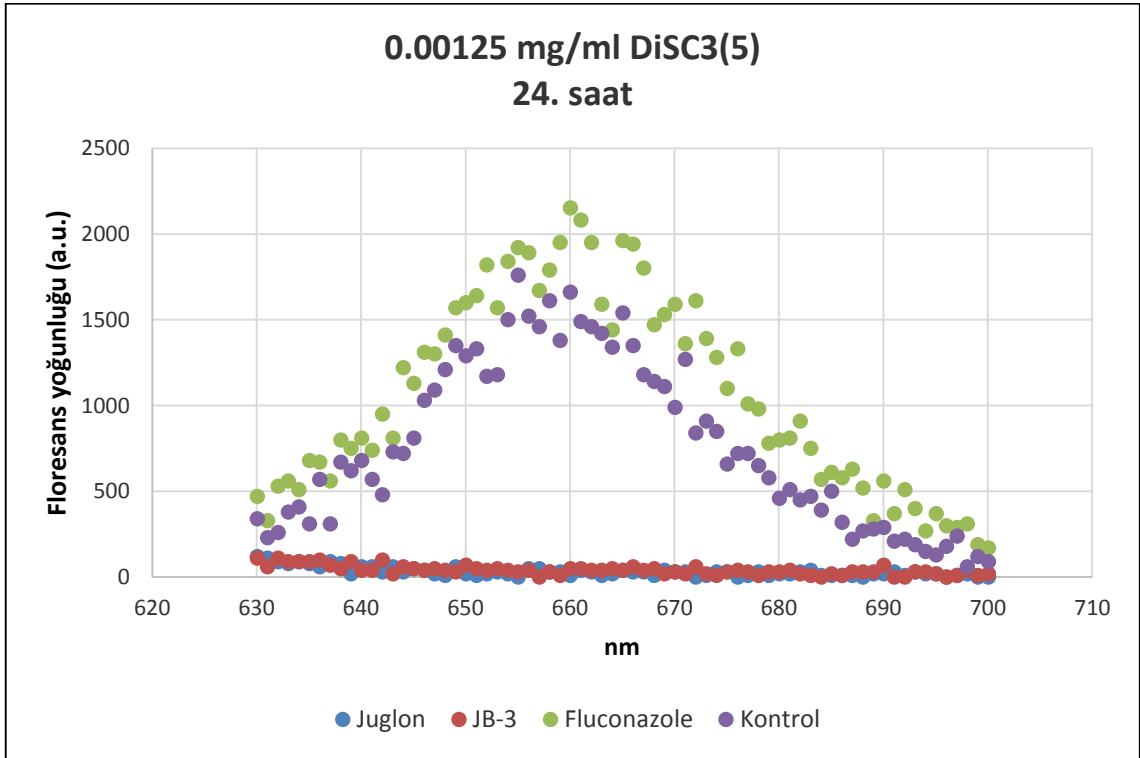
Şekil 4.30 0.0025 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 24. saat floresans ölçüm sonuçları



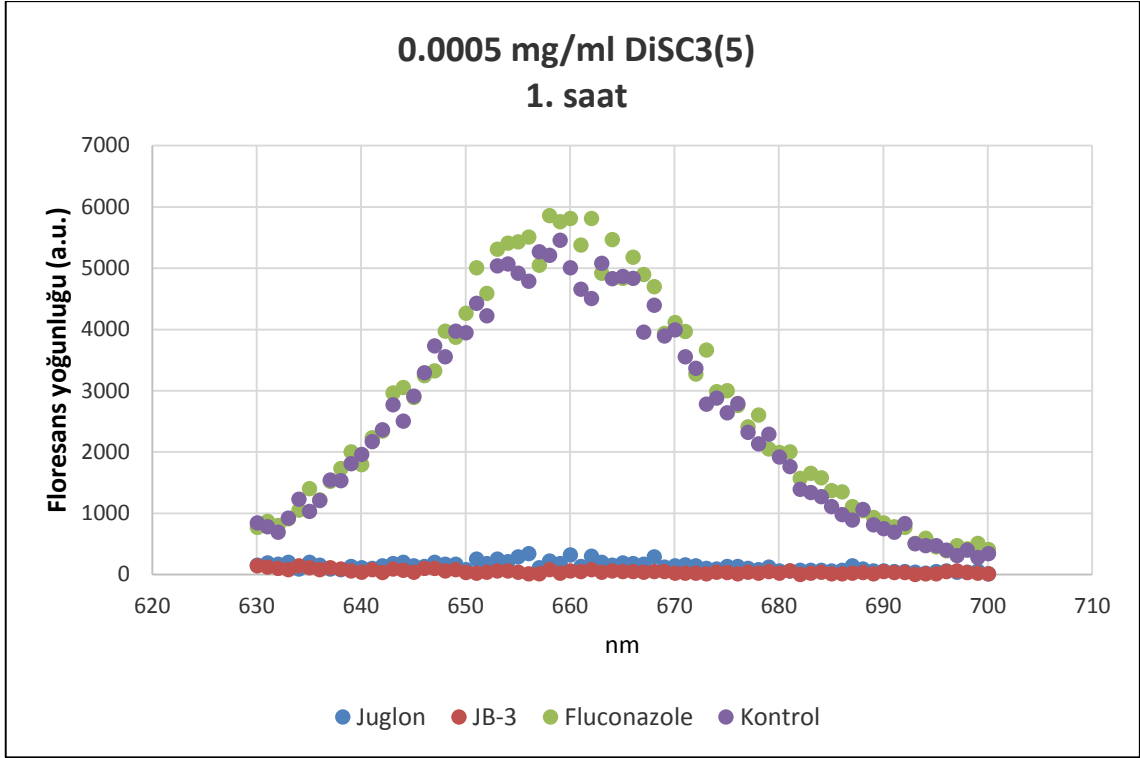
Şekil 4.31 0.00125 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 1. saat floresans ölçüm sonuçları



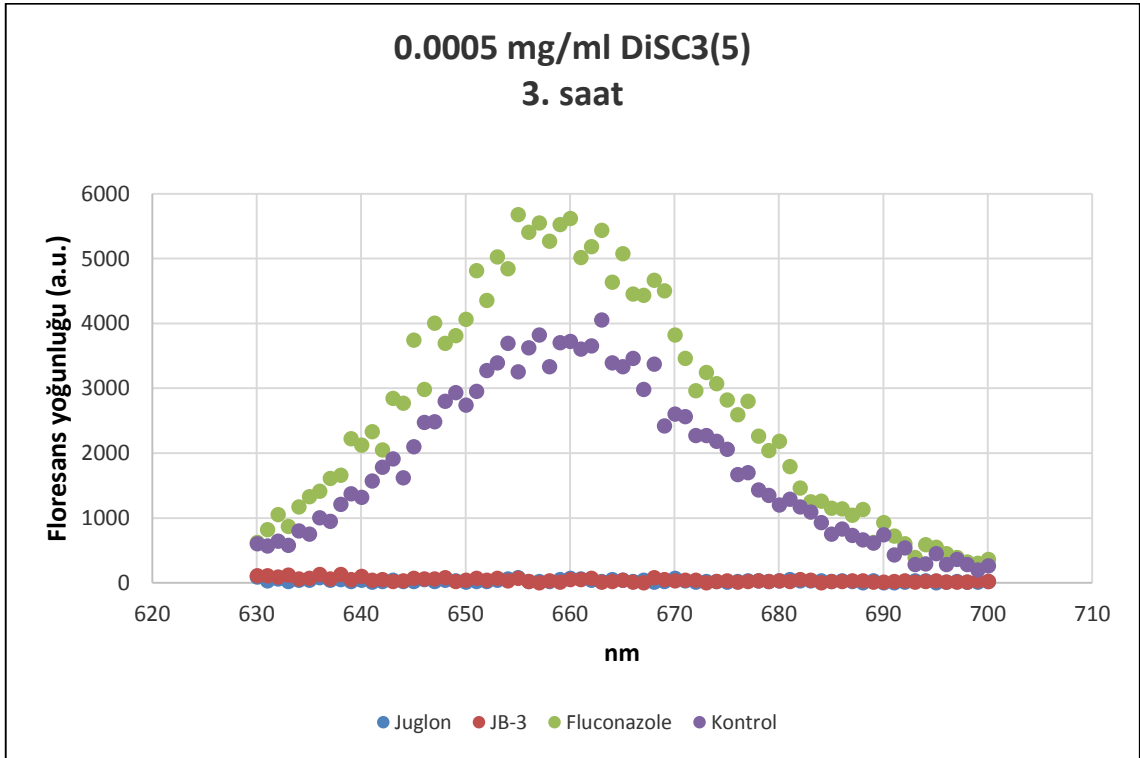
Şekil 4.32 0.00125 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 3. saat floresans ölçüm sonuçları



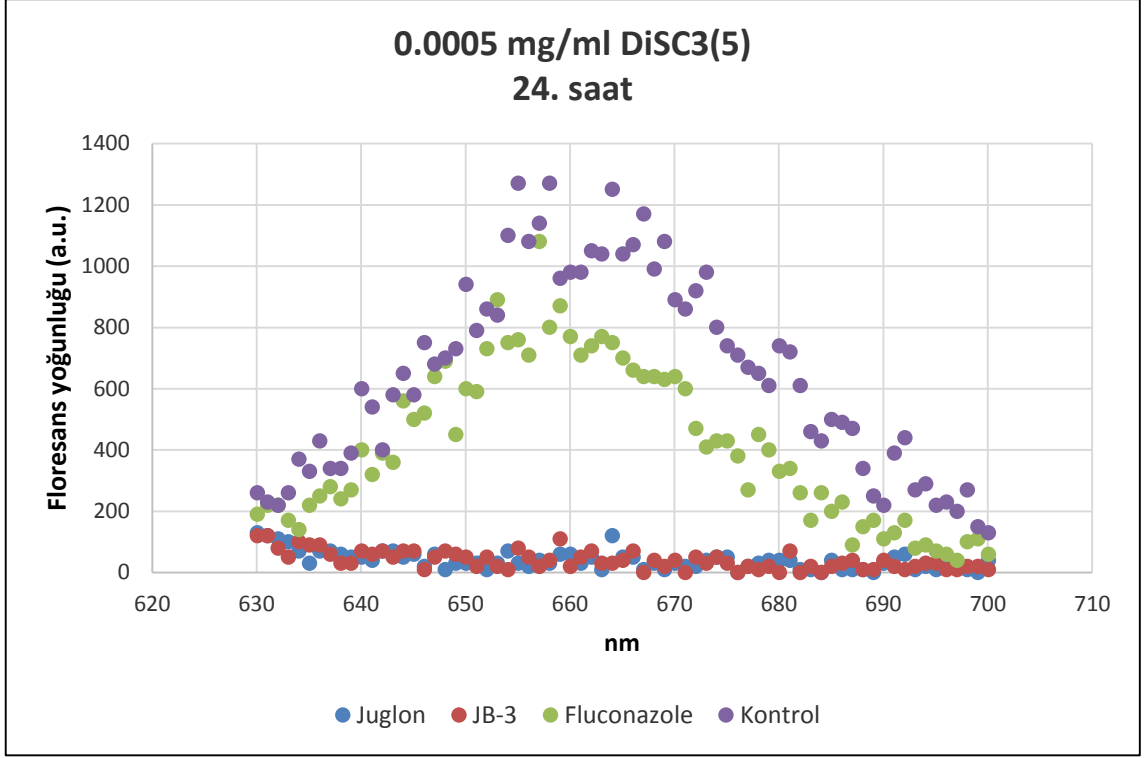
Şekil 4.33 0.00125 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 24. saat floresans ölçüm sonuçları



Şekil 4.34 0.0005 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 1. saat floresans ölçüm sonuçları



Şekil 4.35 0.0005 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 3. saat floresans ölçüm sonuçları



Şekil 4.36 0.0005 mg/ml DiSC3(5) kullanılarak yapılan çalışmada 24. saat floresans ölçüm sonuçları

Membran depolarizasyon analizi sonuçları değerlendirildiğinde, üç farklı boya konsantrasyonu kullanılarak yapılan çalışmalar arasında boya konsantrasyonuna bağlı belirgin bir fark gözlenmemiştir. Fluconazole ve kontrol (sadece çözücü içeren) için birbirine yakın değerler ölçülmüş ve aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Sonuçlar 0. saat ölçümüyle kıyaslandığında; 1. ve 3. saatte floresans yoğunluğunda artış saptanmış, ancak 24. saate gelindiğinde düşüş gözlenmiştir. Juglon ve juglon nanopartikülleri için ise floresans yoğunluğu ilk saatten itibaren oldukça düşük ölçülmüş ve 24. saatte sifıra yakın bulunmuştur.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğada birçok mikroorganizma biyofilm yapısı içinde bulunmaktadır. Biyofilm; özellikle klinikte, her yıl 2 milyondan fazla enfeksiyon, uzun süreli ve zorlayıcı tedavi, yüksek sağlık harcamaları gibi etkilerinden dolayı çözülmeye çalışılan bir sorun olarak önemini korumaktadır. İnsanlarda biyofilm enfeksiyonlarının en büyük sorumlusu *C. albicans*'tır [2], [3]. *C. albicans* kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları kandidemi olarak bilinir ve kanser veya immün sistemi baskılayıcı tedaviler sebebiyle nötrofil sayısı düşen hastalarda sıklıkla görülmektedir. Ağız boşluğunda, gastrointestinal kanalda, vajinada ve deride kommensal olarak yaşayan *C. albicans*'ın yayılmasına sebep olan ameliyatlar veya stent, şant, implant, kalp pili ve kateter gibi medikal cihazların kullanımı kandidemiye yol açabilmektedir. Semptomları sepsise çok benzediğinden tanı gecikebilmekte ve bu da hastanın kaybına sebep olabilmektedir. Bu durumu önlemek için, risk taşıyan hastalara kandidemi gelişmeden önce antifungal tedavi uygulanmaya başlanmaktadır [62]. Ancak söz konusu dirençli bir enfeksiyon olduğunda, antifungal tedavi hangi aşamada yapılırsa yapılsın başarısız olmaktadır. Candida biyofilminin, planktonik hücrelere kıyasla, antifungal ajanlara karşı 30-2000 kat daha dirençli olduğu bilinmektedir [4].

Bitkiler tarafından üretilen ve organizmaların büyüme, gelişme ve üreme süreçlerinde etkili olan sekonder metabolitlerin birçoğu çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir ve bundan dolayı tıp ve eczacılık araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır [86]. Naftakinonlar grubundan olan ve ceviz bitkisinden elde edilen juglon; antimikrobiyal, antikanser, antitümör vb özelliklerinden dolayı dikkat çeken bir moleküldür. Ancak

hidrofobik yapısı ve toksik özelliği sebebiyle juglonun biyolojik sistemlerde kullanılması mümkün olmamaktadır.

Juglon ve benzeri moleküllerin kullanımında karşılaşılan bu problemlerin üstesinden gelinmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda; lipozomlar, polimerik nanopartiküller, dendrimerler ve katı lipid nanopartiküller gibi nanopartiküler ilaç dağıtım sistemlerin kullanılmasının başarılı bir strateji olduğu tespit edilmiştir. Bu sistemlerin kullanılması, ilacın enfeksiyon bölgesine iletimini kolaylaştırmakla beraber, terapötik etkiyi sağlamak için gereken dozu ve buna bağlı toksisiteyi de azaltmaktadır [35], [87]. Mikropartiküllere göre daha avantajlı olan nanopartiküllerin, en küçük kılcal damarların 5-6 µm çapta olduğu dolaşım sisteminde agregasyona ve dolayısıyla damar tıkanıklığına yol açmayacak olması da tercih edilme sebeplerinden biridir [17].

İlaçlar, peptidler veya nükleik asitler gibi farklı moleküller için uygulanabilir olan biyobozunur polimerik nanopartiküller; trombojenik, immünojenik ve enflamatuvar olmamaları, kandaki kararlılıkları ve nötrofilleri aktive etmemeleri sebebiyle antimikrobiyallerin iletiminde sıklıkla tercih edilmektedirler [37].

FDA onaylı olması sebebiyle oldukça fazla ilgi gören PLGA ile hazırlanan polimerik nanopartiküller birçok antimikrobiyal etken maddenin kontrollü salımında başarılı sonuçlar elde etmiştir. PLGA'nın bozunma oranı içeriğindeki laktik asit ve glikolik asit oranları değiştirilerek kontrol edilebilmektedir [18], [87]. İlaç salım hızı, ilaç yüklenme verimliliği ve nanopartikül boyutuyla da alakalıdır. Nanopartikül yüzeyine yakın olan veya yüzeye tutunmuş etken maddenin hızlı salımına "burst release" adı verilmektedir. Burst release sonrasında, etken maddenin salımı için nanopartikül içinde kat etmesi gereken yol uzar ve buna bağlı olarak salım giderek yavaşlar [88].

Üretilen juglon-PLGA nanopartiküllerinin salım çalışmalarında; 1. saatte hızlı bir salım, yani burst release gerçekleşmiş ve daha sonra salım hızı giderek yavaşlamıştır. 60. günün sonunda, sentezlenen JB-1, JB-2 ve JB-3 nanopartikülleri için salım oranları sırasıyla %41,37, %38,98 ve %46,16 olmuştur. Antimikrobiyal çalışmalarda, juglon-PLGA nanopartiküllerinin aktiviteleri, uygulama sürelerindeki salım oranları göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

Juglon ve Fluconazole'un antibiyofilm aktivitesini incelemek amacıyla, öncelikle kolay uygulanım ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliğinden dolayı biyofilm çalışmalarında sıklıkla tercih edilen XTT analizi uygulanmıştır. *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumu üzerindeki etkinin incelendiği çalışmada, 10 mg/ml Fluconazole için %32 inhibisyon hesaplanmıştır. Kristal viyole analizinde (CV) ise 10 mg/ml Fluconazole'un biyofilm oluşumunda %51, önceden oluşturulmuş 6 saatlik biyofilmlerde ise %45 inhibisyon sağladığı bulunmuştur. Bu durum antifungal direnç ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle HIV/AIDS hastalarında kullanılan başlıca antifungal olan Fluconazole direnciyle ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. *Candida* biyofilmlerinin *in vitro* Fluconazole direncinin, planktonik hücrelere kıyasla 400 kata kadar yüksek olduğu bulunmuş ve ayrıca bu direncin MDR1 ve CDR1 promoterlerinin artan ekspresyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir [2], [3].

Çalışmamızda, XTT ve CV analizlerinde juglon için anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. XTT analizinde, juglonla muamele edilen kuyucuklarda beklenenin çok üzerinde absorbans değerleri elde edilmiştir. Yıkama aşamalarında kuyucuklardan arındırılmayan ve turuncu-kahverengi bir boyar madde olan juglon, açık sarı renkteki XTT'yi turuncu formazana dönüştürebilme özellikleri sayesinde canlı hücrelerin tespitini sağlayan bu analizin sonuçlarında sapmaya sebep olmuştur. Aynı problem CV analizinde de yaşanmış ve juglona bağlı renk değişimi hatalı negatif sonuçlar alınmasına yol açmıştır. Söz konusu problemin yaşanmasında, juglonun yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının payı büyük olsa da, biyofilm oluşmalarının engellenmesi ve bertarafında yeterli etkinin görülebilmesi için yüksek dozların kullanılması zaruridir. Gerçekleştirilen bu iki analizin sonuçları, özellikle yüksek konsantrasyonda renkli etken madde kullanılacak olan antibiyofilm çalışmalar için kolorimetrik yöntemlerin seçilmesinin uygun olmadığını göstermektedir.

XTT ve CV analizlerinin ardından, indirekt metodlardan olan standart petri sayım metodu antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesi için uygulanmıştır. Sonikasyon ve vortex ile biyofilm hücrelerinin tutundukları yüzeyden ayrılması sağlanmış ve daha sonra seri dilüsyonlar halinde standart petri sayım tekniği ile ekimler yapılarak petri yüzeyinde oluşan koloniler sayılmıştır. Biyofilm oluşumu üzerindeki etkinin incelenmesi için yapılan bu çalışmada; juglon ve Fluconazole 10mg/ml'den başlanarak yarı yarıya azalan 5 doz halinde uygulanmıştır. Ayrıca JB-1 nanopartiküllerinin aktivitesi de incelenmiş ve

nanopartiküller serbest juglona eşdeğer konsantrasyonlarda uygulanmıştır. *C. albicans* hücrelerinin 6 saat boyunca etken maddelere maruz bırakıldığı bu çalışmada, en düşük dozda dahi, üç etken maddenin de biyofilm oluşumunu tamamen engellediği tespit edilmiştir. Salım çalışmalarının sonuçlarına göre, JB-1 nanopartikülleri 6 saatte %10 salım gerçekleştirmektedir. Buna göre, kuyucuklarda sırasıyla 10, 5, 2.5, 1.25 ve 0.625 mg/ml juglona eşdeğer nanopartikül bulursa da, dışarıya salınan ve dolayısıyla hücreler üzerinde etkili olan juglon miktarı yalnızca bu değerlerin %10'u kadardır. En düşük doz için hesaplama yapıldığında; nanopartikül formülasyonu içinde bulunduğu, 0.0625 mg/ml juglonun *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumunu tamamen engelleyebildiği sonucuna ulaşılmaktadır. Önceden oluşturulmuş biyofilmlerle yapılan standart petri sayımı çalışmasında ise; Fluconazole'un en yüksek dozda bile anlamlı bir inhibisyona yol açmadığı tespit edilmiştir. Juglonun su içerisinde çözülmesi çalışmada, ilk dört dozda koloni oluşumu gözlenmemiştir. 0.625 mg/ml konsantrasyon için ise, oluşan koloniler sayılmış ve %98.25 inhibisyon hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan JB-2 nanopartikülleri için ise hiçbir dozda koloni oluşumu gözlenmemiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi ve JB-2 ile gerçekleştirilen salım çalışması sonuçlarına göre hesaplama yapıldığında; 0.625 mg/ml serbest juglon %98.25 inhibisyon gösterirken, eşdeğer miktarda juglon içeren JB-2 nanopartiküllerinin 0.081 mg/ml (%13) salım yaptığı ve %100 inhibisyona yol açtığı bulunmuştur.

Standart petri sayımı sonuçlarının mikroskopik olarak da değerlendirilmesinin sağlanması amacıyla konfokal mikroskopu ile görüntüleme yapılmış ve etken maddelerin inhibisyon etkileri ile *C. albicans* biyofilmlerinin morfolojik yapıları görsel olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmada, Fluconazole'un anlamlı bir inhibisyona yol açmadığı ve *C. albicans* hücrelerinin farklı morfolojik yapılarda olduğu gözlenmiştir. Juglonda ise, çalışılan iki dozda da (1.25 ve 0.625 mg/ml) hücre tutunmasının engellendiği ve canlı hücre sayısının azaldığı gözlemlendiğinden biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Juglonun su içerisinde çözülmesi konfokal mikroskopi çalışmasında; Fluconazole'de olduğu gibi farklı morfolojik yapılar görülmüştür. Ancak etanolle (çözücü kontrolü) ve etanolde çözülmüş juglonla muamele edilen hücrelerin, yalnızca maya formunda olduğu gözlemlendiğinden etanolün psödohif ve hif oluşumunu engellediği sonucuna varılmıştır. JB-2 nanopartiküllerinin ise serbest

juglona benzer bir inhibisyona yol açtığı tespit edilmiştir. Önceden oluşturulmuş biyofilmlerle yapılan çalışmada ise, Fluconazole'un 10 mg/ml konsantrasyonda dahi anlamlı bir etki gösteremediği görülmüştür. 1.25 mg/ml ve 0.625 mg/ml dozda uygulanan serbest juglon, hem suda hem de etanolde çözüldüğünde, oluşan biyofilmin tamamına yakını bertaraf etmiştir. Kalan hücrelerin ise çoğu hif modundaki ölü hücrelerdir. JB-3 nanopartikülleri de güçlü bir inhibisyona yol açmıştır. Yüzeye tutunmuş birçok hücre bulunsa da, bu hücrelerin büyük çoğunluğunun membran yapısı bozulmuş hücreler olduğu görülmüştür. Canlı kalan hücrelerin biyofilmin alt katmanlarında bulunduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda juglon ve juglon nanopartiküllerinin antibiyofilm aktivitesinin belirlenmesinde son olarak membran depolarizasyon testi kullanılmıştır. Membran depolarizasyon testinde uygulanacak DiSC3(5) boya konsantrasyonunun belirlendiği çalışmada; farklı boya konsantrasyonlarına karşılık gelen floresans şiddeti değerleri tespit edilmiştir. 0.0025 mg/ml DiSC3(5) için yaklaşık 65000, 0.00125 mg/ml için yaklaşık 52000 ve 0.0005 mg/ml için yaklaşık 34000 a. u. floresans şiddeti ölçülmüştür. *C. albicans* ve test örneklerinin uygulandığı çalışmada ise; *C. albicans* hücrelerinin DiSC3(5) ile inkübasyonunu takiben ölçülen 0. saat floresans yoğunluğu değerlerinin (0.0025 mg/ml, 0.00125 mg/ml ve 0.0005 mg/ml DiSC3(5) boyamasından sonra sırasıyla 7000, 6000 ve 2000 a.u.), yalnızca DiSC3(5) için elde edilen değerlerden oldukça düşük olması, DiSC3(5)'in hücre içine girdiğini ispatlamaktadır. Membran depolarizasyonu ile ortamdaki boya konsantrasyonunun ve floresans yoğunluğunun artması beklenirken, juglon ve juglon nanopartikülleri için ölçülen floresans şiddetinde zamana bağlı olarak düşüş gözlenmiştir. Floresans şiddetindeki değişim juglon ve juglon-PLGA nanopartiküllerinin membran depolarizasyonunu sağladığını göstermektedir. Ancak etkinin beklenin tersine floresans şiddetinde azalma olarak sonuçlara yansımaları, floresans sönmüleme (fluorescence quenching) olayının varlığını ile açıklanabilmektedir. Floresans sönmüleme, ışık yayan bir molekülün başka moleküllerle (quencher) interaksyonu sonucunda floresans yoğunluğunun azalmasına sebep olan fizikokimyasal bir prosestir [89]. Bu çalışmada; serbest juglon ve juglon nanopartiküllerinin, *C. albicans*'ın membran depolarizasyonunu sağlayarak sitoplazma dışına çıkan DiSC3(5) boyası ile interaksyona girmesiyle aynı zamanda quencher görevi gördüğü

düşünülmektedir. Schoefer ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada, flavonoidlerin floresans özellikteki boyalarla interaksiyona girerek floresans şiddetini söndürdüğü tespit edilmiştir [90]. Juglonun naftakinon yapısında bir flavonoid olması ve floresan özelliğinden dolayı benzer bir etki gerçekleştiği düşünülmektedir. Juglon nanopartiküllerinin quenching etkisinin de serbest juglona kıyasla daha fazla olmasının, nanopartikül yapısındaki PLGA'nın zamana bağlı olarak bozunmasıyla reaksiyon ortamının kimyasal ve fiziksel yapısının değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Fluconazole ve kontrol çalışması için 1., 3. ve 24. saatte ölçülen floresans yoğunluk değerlerinin birbirine çok yakın olması, Fluconazole'un membran depolarizasyonunu istenilen ölçüde sağlamadığını göstermektedir. Her iki çalışmada da; ilk üç saatte ölçülen floresans yoğunluğu değerleri, 0. saatte elde edilen değerlerden yüksek bulunmuştur. Ancak, yalnızca DiSC3(5)'e ait ölçüm sonuçları göz önüne alındığında, bu artışın çok küçük miktarda boyadan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu boya salımının ise, özellikle antimikrobiyal direnç gösteren suşlarda overeksprese olduğu bilinen ve antibiyotiklerin hücre içinde akümülyasyonunu azaltan efflux pompa sistemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonrasında (24.saat) floresans yoğunluğunda gözlenen düşüş ise, süspansiyon içindeki *C. albicans* hücrelerinin ortamdaki glikoz sebebiyle üremesi ile kalan DiSC3(5)'in ortamdaki hücre sitoplazması içine alınması ve akümülyasyonu sebebiyle gerçekleşmiştir.

Çalışmamız sonucunda standart petri sayımı, konfokal ve membran depolarizasyon sonuçlarının birbirini destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Ayrıca, juglon ve juglon-PLGA nanopartiküllerinin *C. albicans* membran yapısı üzerine Fluconazole'e kıyasla çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Biyofilm enfeksiyonlarına karşı PLGA nanopartiküller sisteme enkapsüle edilen etken maddenin iki fazlı ve uzun süreli salınımı önemlidir. Başlangıçta burst release ile sağlanan yüksek lokal konsantrasyon, devam eden yavaş salım sayesinde korunur [15]. Juglon-PLGA nanopartiküllerinin üretilmesi juglonun salımını sağlamasının yanı sıra, sudaki çözünürlüğünün de artmasına sebep olmuştur [21]. Ayrıca yine kontrollü salım sayesinde, toksik bir madde olan juglonun daha az dozlarda etkili olarak kullanımı sağlanmıştır. Bu özellikleri sayesinde, çalışmada üretimi juglon nanopartiküller

formülasyonların *C. albicans* biyofilminin oluşum aşamasında ve/veya bertarafında juglonun serbest formuna kıyasla daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, PLGA'ya enkapsüle edilen juglon nanopartiküllerinin ve serbest juglonun tek tür mikroorganizma tarafından oluşturulan biyofilmler (mono-species biofilms) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ancak farklı türlerin bir araya gelerek (maya-maya, bakteri-maya gibi) oluşturduğu biyofilm yapıları (mixed-species biofilms) da sıklıkla görülmektedir [3]. Etkili bir antifungal ve antibakteriyel [21], [78] olan juglon ile hazırlanan nanopartikül formülasyonların bu tür biyofilmlerde de başarılı sonuçlar elde edeceği düşünülmektedir. Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarla oldukça ilerleme kaydedilmiş olsa da, biyofilmlerin oluşumu ve yüksek antimikrobiyal direncinde etkili moleküler mekanizmaların aydınlatılması için de yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Davies, D., (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents", *Nat Rev Drug Discov*, 2: 114-122.
- [2] Seneviratne, C.J. Jin, L. ve Samaranayake, L.P., (2008). "Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review", *Oral Diseases*, 14: 582-590.
- [3] Mukherjee, P.K. Zhou, G. Munyon, R. ve Ghannoum, M.A., (2005). "*Candida* biofilm: a well-designed protected environment", *Med Mycol*, 43: 191-208.
- [4] Hawser, S.P. ve Douglas, L.J., (1995). "Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro", *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 2128-2131.
- [5] Baillie, G.S. ve Douglas, L.J., (1998). "Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents", *Antimicrob Agents Chemother*, 42: 1900-1905.
- [6] Mukherjee, P.K. Chandra, J. Kuhn, D.M. ve Ghannoum, M.A., (2003). "Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols", *Infect Immun*, 71: 4333-4340.
- [7] Nett, J. Lincoln, L. Marchillo, K. Massey, R. Holoyda, K. Hoff, B. VanHandel, M. ve Andes, D., (2007). "Putative Role of β -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance", *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 510-520.
- [8] Ramage, G. Bachmann, S. Patterson, T.F. Wickes, B.L. ve Lopez-Ribot, J.L., (2002). "Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 973-980.
- [9] Tobudic, S. Kratzer, C. Lassnigg, A. ve Presterl, E., (2012). "Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms", *Mycoses*, 55: 199-204.
- [10] Ramage, G. Rajendran, R. Sherry, L. ve Williams, C., (2012). "Fungal biofilm resistance", *Int J Microbiol*, 2012: 528521.
- [11] Aithal, B.K. Kumar, M.R. Rao, B.N. Udupa, N. ve Rao, B.S., (2009). "Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells", *Cell Biol Int*, 33: 1039-1049.

- [12] Yigit, D. Yigit, N. Aktas, E. ve Ozgen, U., (2009). "Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyal Aktivitesi", *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 39: 7-11.
- [13] Coder, K.D., (2011). "Black Walnut Allelopathy: Tree Chemical Warfare", *Allelopathy Series, WSFNR11-10*: 1-13.
- [14] Kocacaliskan, I. ve Terzi, I., (2015). "Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth", *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76: 436-440.
- [15] Abdollahi, S. ve Lotfipour, F., (2012). "PLGA- and PLA-Based Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery", *Biomedicine International*, 3: 1-11.
- [16] Dinarvand, R. Sepehri, N. Manoochehri, S. Rouhani, H. ve Atyabi, F., (2011). "Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents", *Int J Nanomedicine*, 6: 877-895.
- [17] Singh, R. ve Lillard, J.W., Jr., (2009). "Nanoparticle-based targeted drug delivery", *Exp Mol Pathol*, 86: 215-223.
- [18] Kerimoglu, O. ve Alarcin, E., (2012). "Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Based Drug Delivery Devices For Tissue Engineering And Regenerative Medicine", *ANKEM Dergisi*, 26: 86-98.
- [19] Esmaeili, F. Hosseini-Nasr, M. Rad-Malekshahi, M. Samadi, N. Atyabi, F. ve Dinarvand, R., (2007). "Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles", *Nanomedicine*, 3: 161-167.
- [20] Cheow, W.S. Chang, M.W. ve Hadinoto, K., (2010). "Antibacterial Efficacy of Inhalable Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles Against *E. coli* Biofilm Cells: The Effect of Antibiotic Release Profile", *Pharmaceutical Research*, 27: 1597-1609.
- [21] Arasoglu, T. Mansuroglu, B. Derman, S. Gumus, B. Kocyigit, B. Acar, T. ve Kocacaliskan, I., (2016). "Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone) Using PLGA Nanoparticles System", *J Agric Food Chem*, 64: 7087–7094.
- [22] Riehemann, K. Schneider, S.W. Luger, T.A. Godin, B. Ferrari, M. ve Fuchs, H., (2009). "Nanomedicine--challenge and perspectives", *Angew Chem Int Ed Engl*, 48: 872-897.
- [23] Whatmore, R.W., (2006). "Nanotechnology--what is it? Should we be worried?", *Occup Med (Lond)*, 56: 295-299.
- [24] Singh, M. Singh, S. Prasad, S. ve Gambhir, I.S., (2008). "Nanotechnology in Medicine And Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles", *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3: 115-122.
- [25] Zhang, L. Gu, F.X. Chan, J.M. Wang, A.Z. Langer, R.S. ve Farokhzad, O.C., (2008). "Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments", *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83.

- [26] Roco, M.C., (2011). "The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years", *Journal of Nanoparticle Research*, 13: 427-445.
- [27] Perelshtein, I. Applerot, G. Perkas, N. Guibert, G. Mikhailov, S. ve Gedanken, A., (2008). "Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity", *Nanotechnology*, 19: 245705.
- [28] Qu, X. Alvarez, P.J. ve Li, Q., (2013). "Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment", *Water Res*, 47: 3931-3946.
- [29] Presting, H. ve König, U., (2003). "Future nanotechnology developments for automotive applications", *Materials Science and Engineering: C*, 23: 737-741.
- [30] Kang, S.J. Kocabas, C. Ozel, T. Shim, M. Pimparkar, N. Alam, M.A. Rotkin, S.V. ve Rogers, J.A., (2007). "High-performance electronics using dense, perfectly aligned arrays of single-walled carbon nanotubes", *Nat Nanotechnol*, 2: 230-236.
- [31] Rashidi, L. ve Khosravi-Darani, K., (2011). "The applications of nanotechnology in food industry", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51: 723-730.
- [32] Liu, T.M. Musinski, L.D. Patel, P.R. Gallimore, A.D. Gilchrist, B.E. ve Keidar, M., (2007). "Nanoparticle Electric Propulsion for Space Exploration", *Space Technology and Applications Forum, STAIF*.
- [33] Pitkethly, M., (2009). "Nanotechnology and forensics", *Materials Today*, 12: 6.
- [34] Rai, M. ve Ingle, A., (2012). "Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests", *Appl Microbiol Biotechnol*, 94: 287-293.
- [35] Zhang, L. Pornpattananankul, D. Hu, C.-M.J. ve Huang, C.-M., (2010). "Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery", *Current Medicinal Chemistry*, 17: 585-594.
- [36] Desai, M.P. Labhsetwar, V. Walter, E. Levy, R.J. ve Amidon, G.L., (1997). "The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent", *Pharmaceutical Research*, 14: 1568-1573.
- [37] Kumari, A. Yadav, S.K. ve Yadav, S.C., (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75: 1-18.
- [38] Chakravarthi, S.S. ve Robinson, D.H., (2007). *Nanoparticles Prepared Using Natural and Synthetic Polymers*, ed. *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. CRC Press, 51-60.
- [39] Derman, S. Kizilbey, K. ve Mustafaeva Akdeste, Z., (2013). "Polymeric Nanoparticles", *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31: 107-120.
- [40] Makadia, H.K. ve Siegel, S.J., (2011). "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier", *Polymers (Basel)*, 3: 1377-1397.

- [41] Hans, M.L. ve Lowman, A.M., (2002). "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting", *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6: 319-327.
- [42] Rao, J.P. ve Geckeler, K.E., (2011). "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters", *Progress in Polymer Science*, 36: 887-913.
- [43] Soppimath, K.S. Aminabhavi, T.M. Kulkarni, A.R. ve Rudzinski, W.E., (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", *Journal of Controlled Release*, 70: 1-20.
- [44] Khan, I. Saeed, K. ve Khan, I., (2017). "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities", *Arabian Journal of Chemistry*.
- [45] Martinez-Gutierrez, F. Boegli, L. Agostinho, A. Sanchez, E.M. Bach, H. Ruiz, F. ve James, G., (2013). "Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms", *Biofouling*, 29: 651-660.
- [46] Sathyanarayanan, M.B. Balachandranath, R. Genji Srinivasulu, Y. Kannaiyan, S.K. ve Subbiahdoss, G., (2013). "The effect of gold and iron-oxide nanoparticles on biofilm-forming pathogens", *ISRN Microbiol*, 2013: 272086.
- [47] Hetrick, E.M. Shin, J.H. Paul, H.S. ve Schoenfisch, M.H., (2009). "Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles", *Biomaterials*, 30: 2782-2789.
- [48] Chou, C.-H., (1999). "Roles of Allelopathy in Plant Biodiversity and Sustainable Agriculture", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 609-636.
- [49] Rudnicka, M. Polak, M. ve Karcz, W., (2013). "Cellular responses to naphthoquinones: juglone as a case study", *Plant Growth Regulation*, 72: 239-248.
- [50] Soltys, D. Krasuska, U. Bogatek, R. ve Gniazdowska, A., (2013). *Allelochemicals as Bioherbicides - Present and Perspectives*, ed. *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. 517-542.
- [51] Riffel, A. Medina, L.F. Stefani, V. Santos, R.C. Bizani, D. ve Brandelli, A., (2002). "In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 811-818.
- [52] Clark, A.M. Jurgens, T.M. ve Hufford, C.D., (1990). "Antimicrobial Activity of Juglone", *Phytotherapy Research*, 4: 11-14.
- [53] Jeon, J.-H. Lee, C.-H. Kim, M.K. ve Lee, H.-S., (2009). "Antibacterial Effects of Juglone and Its Derivatives against Oral Pathogens", *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52: 720-725.
- [54] Chuan Tan, D.T. Osman, H. Mohamad, S. ve Kamaruddin, A.H., (2012). "Synthesis and Antibacterial Activity of Juglone Derivatives", *J. Chem. Chem. Eng.*, 6: 84-89.
- [55] Sánchez-Calvo, J.M. Barbero, G.R. Guerrero-Vásquez, G. Durán, A.G. Macías, M. Rodríguez-Iglesias, M.A. Molinillo, J.M.G. ve Macías, F.A., (2016). "Synthesis,

antibacterial and antifungal activities of naphthoquinone derivatives: a structure–activity relationship study", *Medicinal Chemistry Research*, 25: 1274-1285.

- [56] Noumi, E. Snoussi, M. Hajlaoui, H. Valentin, E. ve Bakhrouf, A., (2010). "Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29: 81-88.
- [57] Noumi, E. Snoussi, M. Noumi, I. Valentin, E. Aouni, M. ve Al-sieni, A., (2014). "Comparative study on the antifungal and antioxydant properties of natural and colored *Juglans regia* L. barks: A high activity against vaginal *Candida* strains", *Life Science Journal*, 11: 327-335.
- [58] Chandra, J. Kuhn, D.M. Mukherjee, P.K. Hoyer, L.L. McCormick, T. ve Ghannoum, M.A., (2001). "Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance", *Journal of Bacteriology*, 183: 5385-5394.
- [59] Cuéllar-Cruz, M. López-Romero, E. Villagómez-Castro, J.C. ve Ruiz-Baca, E., (2012). "Candida species: new insights into biofilm formation", *Future Microbiology*, 7: 755-771.
- [60] Chandra, J. Mukherjee, P.K. Leidich, S.D. Faddoul, F.F. Hoyer, L.L. Douglas, L.J. ve Ghannoum, M.A., (2001). "Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro", *Journal of Dental Research*, 80: 903-908.
- [61] Baillie, G.S. ve Douglas, L.J., (1999). [48] *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents, ed. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 644-656.
- [62] Kim, J. ve Sudbery, P., (2011). "*Candida albicans*, a Major Human Fungal Pathogen", *Journal of Microbiology*, 49: 171-177.
- [63] Sudbery, P. Gow, N. ve Berman, J., (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*", *Trends in Microbiology*, 12: 317-324.
- [64] Harding, M.W. Marques, L.L.R. Howard, R.J. ve Olson, M.E., (2009). "Can filamentous fungi form biofilms?", *Trends in Microbiology*, 17: 475-480.
- [65] Lohse, M.B. Gulati, M. Johnson, A.D. ve Nobile, C.J., (2017). "Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms", *Nat Rev Micro*, advance online publication.
- [66] Chandra, J. Mukherjee, P.K. ve Ghannoum, M.A., (2008). "In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms", *Nat Protoc*, 3: 1909-1924.
- [67] Albuquerque, P. ve Casadevall, A., (2012). "Quorum sensing in fungi--a review", *Med Mycol*, 50: 337-345.
- [68] Enjalbert, B. ve Whiteway, M., (2005). "Release from Quorum-Sensing Molecules Triggers Hyphal Formation during *Candida albicans* Resumption of Growth", *Eukaryotic Cell*, 4: 1203-1210.
- [69] Hornby, J.M. Jensen, E.C. Lisec, A.D. Tasto, J.J. Jahnke, B. Shoemaker, R. Dussault, P. ve Nickerson, K.W., (2001). "Quorum Sensing in the Dimorphic

- Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol", *Appl Environ Microbiol*, 67: 2982-2992.
- [70] Chen, H. Fujita, M. Feng, Q. Clardy, J. ve Fink, G.R., (2004). "Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 5048-5052.
- [71] Ramage, G. Mowat, E. Jones, B. Williams, C. ve Lopez-Ribot, J., (2009). "Our Current Understanding of Fungal Biofilms", *Critical Reviews in Microbiology*, 35: 340-355.
- [72] Nobile, C.J. ve Mitchell, A.P., (2006). "Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation", *Cellular Microbiology*, 8: 1382-1391.
- [73] Finkel, J.S. ve Mitchell, A.P., (2010). "Genetic control of *Candida albicans* biofilm development", *Nature Reviews Microbiology*, 9: 109.
- [74] Al-Fattani, M.A. ve Douglas, L.J., (2006). "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance", *Journal of Medical Microbiology*, 55: 999-1008.
- [75] Baillie, G. ve J Douglas, L., (2000). Matrix Polymer of *Candida* Biofilms and their possible role in Biofilm Resistance to Antifungal Agents.
- [76] VEDIYAPPAN, G. ROSSIGNOL, T. ve d'ENFERT, C., (2010). "Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucans", *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 2096-2111.
- [77] Yelkenci, G., (2015). Juglon Yüklü Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [78] Arasoglu, T. Derman, S. Mansuroglu, B. Yelkenci, G. Kocyigit, B. Gumus, B. Acar, T. ve Kocacaliskan, I., (2017). "Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Juglone Encapsulated PLGA Nanoparticles", *Journal of Applied Microbiology*.
- [79] Derman, S., (2015). "Caffeic Acid Phenethyl Ester Loaded PLGA Nanoparticles: Effect of Various Process Parameters on Reaction Yield, Encapsulation Efficiency, and Particle Size", *Journal of Nanomaterials*, 2015: 1-12.
- [80] Douglas, L.J., (2003). "*Candida* biofilms and their role in infection", *Trends in Microbiology*, 11: 30-36.
- [81] Moss, B.J. Kim, Y. Nandakumar, M.P. ve Marten, M.R., (2008). "Quantifying Metabolic Activity of Filamentous Fungi Using a Colorimetric XTT Assay", *Biotechnol. Prog.*, 24: 780-783.
- [82] Pierce, C.G. Uppuluri, P. Tristan, A.R. Wormley, F.L. Mowat, E. Ramage, G. ve Lopez-Ribot, J.L., (2008). "A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing", *Nat Protoc*, 3: 1494-1500.
- [83] Qin, H. Cao, H. Zhao, Y. Zhu, C. Cheng, T. Wang, Q. Peng, X. Cheng, M. Wang, J. Jin, G. Jiang, Y. Zhang, X. Liu, X. ve Chu, P.K., (2014). "In vitro and in vivo

anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium", *Biomaterials*, 35: 9114-9125.

- [84] Lv, Y. Wang, J. Gao, H. Wang, Z. Dong, N. Ma, Q. ve Shan, A., (2015). "Antimicrobial Properties and Membrane-Active Mechanism of a Potential α -Helical Antimicrobial Derived from Cathelicidin PMAP-36", *PLoS One*, 9: e86364.
- [85] te Winkel, J.D. Gray, D.A. Seistrup, K.H. Hamoen, L.W. ve Strahl, H., (2016). "Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4.
- [86] Padhye, S. Dandawate, P. Yusufi, M. Ahmad, A. ve Sarkar, F.H., (2012). "Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs", *Med Res Rev*, 32: 1131-1158.
- [87] Amaral, A.C. Bocca, A.L. Ribeiro, A.M. Nunes, J. Peixoto, D.L. Simioni, A.R. Primo, F.L. Lacava, Z.G. Bentes, R. Titze-de-Almeida, R. Tedesco, A.C. Morais, P.C. ve Felipe, M.S., (2009). "Amphotericin B in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) nanoparticles against paracoccidioidomycosis", *J Antimicrob Chemother*, 63: 526-533.
- [88] Hill, L.E. Taylor, T.M. ve Gomes, C., (2013). "Antimicrobial efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped cinnamon bark extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*", *J Food Sci*, 78: N626-632.
- [89] Fleming, K.G., (2017). *Fluorescence Theory*, ed. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*.
- [90] Schoefer, L. Braune, A. ve Blaut, M., (2001). "A fluorescence quenching test for the detection of flavonoid transformation", *FEMS Microbiol Lett*, 204: 277-280.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Büşra GÜMÜŞ
Doğum Tarihi ve Yeri : 05.09.1990 / KOCAELİ
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : bbusragumuss@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Genetik ve Biyomühendislik (İngilizce)	Yeditepe Üniversitesi	2013
Lise	Fen Bilimleri	Kocaeli 24 Kasım Anadolu Lisesi	2008

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014-2015	Atlas CRO	Saha Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Turkish Journal of Biology, 2016 Preparation, Characterization and Enhanced Antimicrobial Activity: Quercetin Loaded PLGA Nanoparticles against Foodborne Pathogens
2. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016 Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) Using a Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticle System
3. Journal of Applied Microbiology, 2017 Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Juglone Encapsulated PLGA Nanoparticles

Bildiri

1. 7th European Congress of Pharmacology, 2016 Bioflavonoid Encapsulated PLGA Nanoparticles against *Listeria Monocytogenes*
2. 2nd International Balkan Agriculture Congress, 2017 Determination of Xylanase Producer *Aspergillus* section *Nigri* Strains and Cloning of Corresponding Xylanase Genes

Proje

1. KAP Projesi Evaluation of Antigenotoxic Activity of Catechin Molecules into the Nanoparticles Systems
2. TÜBİTAK 1003 Projesi Development/Improvement of Economical Production Systems for an Industrial Enzyme used in the Bakery Products Industry