BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOLİPOZOM İLE *PISTACIA TEREBINTHUS* L. YAPRAĞI EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

AĞUSTOS 2020

BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ❖ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOLİPOZOM İLE *PISTACIA TEREBINTHUS* L. YAPRAĞI EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali YILMAZ
(171083107)
ORCID: 0000-0003-0442-6503

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL
ORCID: 0000-00021786-1216

AĞUSTOS 2020

BTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 171083107 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Ali YILMAZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "NANOLİPOZOM İLE *PISTACIA TEREBINTHUS* L. YAPRAĞI EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU VE KARAKTERİZASYONU" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müge ÇAĞAL** .....
Bursa Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER** .....
Bursa Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Gülengül DUMAN .....
Yeditepe Üniversitesi

Teslim Tarihi **:13 Ağustos 2020**
Savunma Tarihi **:25 Ağustos 2020**

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere göre uygun rapor alınmıştır.

İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ali YILMAZ

İmzası :

Babama,

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında yabani fıstık olarak da bilinen menengiç bitkisinin yaprağından elde edilen ekstraktın mikro akışkanlaştırma tekniği kullanılarak hazırlanan lipozom ile enkapsülasyonu sağlanılmıştır. Geliştirilen bu teknik, sonraki çalışmalar için bir yol gösterici özelliği taşımaktadır.

Öncelikle, tez konumun belirlenmesi, düzenlenmesi ve deneylerimin yürütülmesinde bilimsel desteğini benden esirgemeyen ve yol gösterici deneyimlerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver Müğe ÇAĞAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarm.

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi olarak desteklerini esirgemeyen annem Hatice ARSLAN, abim Teyfik YILMAZ, ablalarım Şenay BOYACI ve Şerife AKBAŞ ve kız kardeşim Tuba ARSLAN'a teşekkürler ederim. Ayrıca her zaman yanımda hissedeceğim babam Yusuf YILMAZ'a bu tezi atfediyorum.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca desteğini her an hissettiğim ve daima yanımda olan değerli arkadaşlarım Nagihan NİZAM, Atakan TURAN, Sedat KALE'ye ve desteklerinden dolayı ayrıca Recep Kutsi ÇAĞAL Bey'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde destek ve katkılarından dolayı Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN hocama teşekkürlerimi sunarım. Bilgilerini benden esirgemeyen Bursa Teknik Üniversitesine Gıda Mühendisliği Bölümü akademisyeni Doç. Dr. Gökçen İZLİ'ye ilgilerinden, yardımlarından ve ayrıca beni cesaretlendirmesinden dolayı içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda yol göstermesinden dolayı Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Bölümü akademisyeni Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülengül DUMAN hocama teşekkür ederim. Çalışmalarımın yürütülmesi sırasında yardımlarından dolayı Bursa Teknik Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ömer KOZ hocama teşekkür ederim. Bursa Teknik Üniversitesine Gıda Mühendisliği Bölümü akademisyeni Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aycan ÇINAR hocama desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Tez ile ilgili çeşitli çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Yeditepe Üniverstesi Eczacılık Bölümü Uzm. Kim. Meltem MACİT'e, Bursa teknik Üniverstesi Gıda Mühendisliği Bölümü Ar. Gör. Seda ALTUNTAŞ'a, Bursa Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Ar. Gör. Berna NİŞ'e teşekkür ederim. Ve desteklerinden dolayı Yeditepe Üniverstesi Biyosidal ve ARGE laboratuvar görevlisi Sayın Uzm. Sadık KALAYCI'ya teşekkür ederim. Çalışmalarımda desteklerinden dolayı Bursa Gıda Araştırma Başkanı Yıldıray İSTANBULLU Bey'e teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışmada yer alan çeşitli materyalleri sağlayan Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsüne ve Bursa Gıda Araştırma Enstitüsüne ve eğitimim için Bursa Teknik Üniversitesine teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2020

Ali YILMAZ
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
KISALTMALAR ..... **viii**
SEMBOLLER ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **x**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Lipozomlar ve Enkapsülasyon 2
1.2 Enkapsülasyon 4
1.2.1 Enkapsülasyon için lipozom hazırlama yöntemleri 8
1.2.2 Lipozom karakterizasyonu 13
1.2.2.1 Lipozomların fiziksel karakterizasyonu 13
1.2.2.2 Kimyasal karakterizasyonu 15
1.2.2.3 Biyolojik karakterizasyonu 15
1.3 Antibakteriyal Maddelerin Mekanizmaları ve Antibakteriyal Aktivite Belirlenmesindeki Yöntemler 15
1.3.1 Disk difüzyon yöntemi 16
1.3.2 Mikrodilüsyon yöntemleri 16
1.4 Menengiç (*Pistacia terebinthus*) 17
1.5 Literatür Araştırması 18
1.6 Tezin Amacı 21
2. MATERYAL VE YÖNTEM **22**
2.1 Materyal 22
2.2 Yöntem 22
2.2.1 Nanolipozom hazırlanması 22
2.2.1.1 Direk uç sonikatör sistemi ile mikro emülsiyon hazırlanması 22
2.2.1.2 Mikro akışkanlaştırıcı tekniği ile nanolipozom dispersiyonunun hazırlanması 23
2.2.2 Nanolipozomun fiziksel karakterizasyonu 24
2.2.3 Menengiç yaprağının etanol ile ekstraksiyonu 24
2.2.4 Nanolipozom ile MYE enkapsülasyonu 25
2.2.5 Enkapsülasyon verimi analizi 26
2.2.6 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntü analizi 27
2.2.7 Antibakteriyel aktivite tayini 27
2.2.7.1 Disk difüzyon testi 27
2.2.7.2 Minimum inhibisyon konsantrasyon testi 28
2.3 İstatistiksel Yöntemler 30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA **31**
3.1 Nanolipozomun Hazırlanması ve Karakterizasyonu 31
3.2 Menengiç (*P. terebinthus*) Bitkisinin Etanol Ekstraksiyonu 37
3.3 Nanolipozom ile Enkapsüle Menengiç (*P. terebinthus*) Yaprağı Etanol Ekstraktının Karakterizasyonu 37
3.4 Antibakteriyel Aktivite Tayini 40
3.4.1 Disk difüzyon testi 40

3.4.2 Minimum inhibasyon konsantrasyon testi 43
4. SONUÇ VE ÖNERİLER 46
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 57

KISALTMALAR

CMC : Kritik misel konsantrasyonu
DLS : Dinamik ışık saçılımı
DPPC : Dipalmitoil fosfatidilkolin
DPPE : Dipalmitoil fosfatidiletanolamin
DPPH : 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DPPS : Dipalmitoil fosfatidilserin
DSPC : Distearoil fosfatidilkolin
DSC : Diferansiyel taramalı kalorimetre
EE : Enkapsülasyon verimi
EL : Işığa duyarlı lipozomlar
GUV : Büyük katmansız lipozomlar
HPLC : Yüksek performans sıvı Kromatografisi
Kriyo-TEM : Kriyojenik geçirimli elektron mikroskobu
LUV : Büyük Katmansız Lipozomlar
MBK : Minimum bakterisidal konsantrasyonu
MİK : Minimum inhibasyon konsantrasyonu
ML : Manyetik lipozom
MLV : Çok katmanlı lipozomlar
MUV : Orta katmansız lipozomlar
MV : Çok keseçikli lipozomlar
OLV : Oligo katmanlı lipozomlar
PC : Fosfatidilkolin
PG : Fosfatidilgliserol
pHSL : Aside bağlı lipozomlar
PI : Fosfatidilinositol
PS : Fosfatidilserin
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
SUV : Küçük katmansız lipozomlar
TL : Sıcaklığa bağlı lipozomlar

SEMBOLLER

a/a **:** Ağırlık/ağırlık
a/h **:** Ağırlık/hacim
g **:** Gram
h/h **:** Hacim/hacim
kob **:** Koloni oluşturan birim
mL **:** Mililitre
Mpa **:** Megapaskal
ppm **:** Milyonda bir
psi **:** İnçkare başına libre
rpm **:** Dakikadaki devir sayısı
µL **:** Mikrolitre
µm **:** Mikrometre
ζ **:** Zeta

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: Fosfolipid türleri. **2**
Çizelge 1.2: Enkapsülasyon türleri ve farklı yapıları. **5**
Çizelge 1.3: Lipozom hazırlama yöntemleri, avantajları ve dezavantajları. **8**
Çizelge 1.4: Menengiç (*P. terebinthus*) bitkisi yaprağı ekstraktının fenolik madde kompozisyonu (mg/g). **18**
Çizelge 2.1: MYE enkapsüllemek için hazırlanan nanolipozom formülasyonları. ... **26**
Çizelge 3.1: Elde edilen lipozom ve nanolipozom partiküllerinin fiziksel karakterizasyon sonuçları. **37**
Çizelge 3.2: Hazırlanan formülasyonların absorbans ve enkapsülasyon verimi. **39**
Çizelge 3.3: Disk difüzyon testi ile antibakteriyal aktivite karşılaştırmaları. **41**
Çizelge 3.4: *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde etkili test numunelerine ait MİK değerleri. **44**
Çizelge 4.1: Miktarına göre MYE ve NLMYE'nin bakteriler üzerinde etkisi. **47**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Lipozom ve fosfolipid yapısı. **3**
Şekil 1.2: Lipozomlara bağlanan farklı moleküller. **3**
Şekil 1.3: Lipozomların boyut-katman grafiği. **11**
Şekil 1.4: Sonikasyon yönteminin şematik gösterimi. **12**
Şekil 1.5: Yüksek basınç homojenizasyonu yöntemlerinden biri olan Mikro akışkanlaştırıcı şematik olarak gösterimi. **13**
Şekil 1.6: Gram (+) ve gram (-) hücre yapısının basit olarak gösterimi. **16**
Şekil 2.1: Direk uç sonikatör sistemi ile lipozom dispersiyonu hazırlanması. **23**
Şekil 2.2: Nanolipozom dispersiyonu için kullanılan mikro akışkanlaştırıcı. **23**
Şekil 2.3: Nanolipozomun fiziksel karakterizasyonu için kullanılan master zeta-sizer cihazı. **24**
Şekil 2.4: Menengiç yaprağından etanol ekstraksiyonun aşamalı olarak gösterimi. . **25**
Şekil 2.5: Enkapsülasyonu gözlemlemek için kullanılan SEM cihazı. **27**
Şekil 2.6: Disk difüzyon testinin deneydeki uygulama gösterimi. **28**
Şekil 2.7: MİK testinin uygulama gösterimi. **29**
Şekil 3.1: Direk uç sonikatör ile hazırlanan lipozomların zeta potansiyel grafiği. **31**
Şekil 3.2: Direk uç sonikatör ile hazırlanan lipozomların yoğunluğa göre boyut grafiği. **32**
Şekil 3.3: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 1. döngü sonunda elde edilen lipozomların zeta potansiyel grafiği. **33**
Şekil 3.4: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan lipozomların 1. döngü aşamasındaki yoğunluğa göre boyut dağılımı. **33**
Şekil 3.5: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 2. döngü lipozomların toplam sayıma göre zeta potansiyeli grafiği. **34**
Şekil 3.6: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 2. döngü lipozomların yoğunluğa göre boyut grafiği. **34**
Şekil 3.7: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 3. döngü nanolipozomların toplam sayıma göre zeta potansiyeli grafiği. **35**
Şekil 3.8: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 3. döngü nanolipozomların yoğunluğa göre boyut dağılım grafiği. **35**
Şekil 3.9: Menengiç (*Pistacia terebinthus*) yaprağı etanol ekstraktının nanolipozom ile enkapsülasyonun şematik gösterimi. **38**
Şekil 3.10: NLMYE'nin enkapsülasyon verimi şematik gösterimi. **39**
Şekil 3.11: Nanolipozom ile enkapsüllenen *Pistacia terebinthus* yaprağı etanol ekstraktının SEM görüntüsü. **40**
Şekil 3.12: Disk difüzyon testi ile *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinde gözlemlenen inhibisyon zonları. **42**
Şekil 3.13: Disk difüzyon yönteminde kullanılan NLMYE'nin *E. coli* üzerinde antibakteriyal aktivitelerinin saatlere göre R programlama ile karşılaştırmalı analiz grafiği. **43**

Şekil 3.14: Disk difüzyon yönteminde kullanılan NLMYE'nin *S. aureus* üzerinde antibakteriyal aktivitelerinin saatlere göre R programlama ile karşılaştırmalı analiz grafiği. **43**

NANOLİPOZOM İLE *PISTACIA TEREBINTHUS* L. YAPRAĞI EKSTRAKTININ ENKAPSÜLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, sentezlenen nanolipozom yapıları içerisine *Pistacia terebinthus* bitkisinden elde edilen etanol ekstraktının enkapsüle edilmesinden sonra nanolipozomal formülasyonun antibakteriyal aktiviteye etkilerinin belirlenmesidir.

Türkiye'nin birçok yerinde yetişen çok yıllık bir bitki olan menengiçin yapısında birçok değerli kimyasal bileşik (terpenoidler, fenolik bileşikler, yağ asitleri ve stereoller gibi) bulunmaktadır. İçerdiği kimyasal bileşenler sayesinde antioksidan, antienflamatuar, antibakteriyal ve sitotoksik etkinliği olan bir bitkidir.

Lipozomlar ise, farmosötik ve gıda gibi çeşitli alanlarda etken maddelerin enkapsülasyonu için kullanılan biyouyumlu malzemelerdir. Enkapsüle ettiği etken maddelerin daha stabil halde taşınımını sağlaması ile hücre veya doku seviyesinde alımlarını kolaylaştırarak, biyolojik dağılımlarını arttıran ilaç salınım sistemleridir. Yapısal olarak, lipofilik ve hidrofilik bölgeler içeren lipozomlar, bir veya daha fazla konsantrik lipid çift tabakasından oluşan fosfolipid veziküllerdir. Bundan dolayı, lipozomal sistemler hem lipofilik hem de hidrofilik çeşitli ilaçları veya bileşikleri yakalama ve tutma kabiliyetine sahiptir. Enkapsülleme sistemleri için lipozomlar, esnek, tamamen biyobozunur, biyo-uyumlu, toksik ve immünojenik olmamalarından dolayı tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, nanolipozom dispersiyonu iki aşamada hazırlanmıştır. Birincil homojenizasyon olarak direk uç (prob) sonikasyon içeren mikro emülsiyon tekniği ile farklı yapılarda lipozomların oluşturulması sağlanılmıştır. İkincil homojenizasyon olarakta yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemlerinde biri olan mikro akışkanlaştırma (15000 psi) tekniği sayesinde lipozom dispersiyonlarının daha stabil formu olan nanolipozomlar (SUV) oluşturulmuştur. Oluşturulan lipozom dispersiyonu liyofilize edilerek, enkapsülasyon ve diğer fiziksel stabilite deneyleri için muhafaza edilmiştir. Boş lipozomlar üzerinde yapılan fiziksel karakterizasyon deneyleri; partikül büyüklüğünü ve lipozomların yükü (zeta (ζ) potansiyeli) malvern zeta potansiyeli ve dinamik ışık saçılım cihazı ile ölçülmüştür. Bununla birlikte, menengiç bitkisinin etanol ekstraktının lipozomla enkapsüllenmesinden sonra fiziksel karakterizasyon için santrifüj ile enkapsülasyon verimliliği ölçülmüştür.

En yüksek enkapsülasyon verimini elde etmek için, etanol ekstraktı ve lipozom dispersiyonu (0,9:0,5 a/a) bir araya getirilerek enkapsülleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Enkapsüle ekstrakların antibakteriyal aktivitesi için disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu testleri yapılmıştır. Sırasıyla *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* için gruplandırılan menengiç yaprağı etanol ekstraktı (MYE), lipozom ile enkapsüllenen menengiç yaprağı ekstraktı (NLMYE), pozitif kontrol olarak ofloksasin ve negatif kontrol olarak ise otoklavlanmış saf su kullanılarak, 18, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen zon çapları karşılaştırılmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyon tekniği ile 5.10^5 kob başlangıç

miktarına sahip *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı 24 saatlik inkübasyondan sonra %90-100 aralığında inhibitör etki gösteren NLMYE'nin minimum değeri, *E. coli* için 0,114 mg olarak ve *S. aureus* için 0,0838 mg olarak ölçülmüştür.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, laboratuar koşullarında, gram (-) bakteri olarak *E. coli* ve gram (+) bakteri olarak *S. aureus* üzerinde nanolipozom ile enkapsüle olan menengiç bitkisinin antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Menengiç (*Pistacia terebinthus*), Lipozom, Mikro akışkanlaştırıcı, Antibakteriyal aktivite

ENCAPSULATION AND CHARACTERIZATION OF *PISTACIA TEREBINTHUS* L. LEAF EXTRACT WITH NANOLIPOSOME

SUMMARY

The aim of this study is to determine the effects of nanoliposomal formulation on antibacterial activity after encapsulated ethanol extract from *Pistacia terebinthus* plant into the synthesized nanoliposome structures.

P. terebinthus grown in Turkey's many parts, is a perennial plant and isolated from various regions due to various chemical compounds (terpenoids, phenolic compounds, such as fatty acids and stereol on) antioxidants and inflammatory, antimicrobial and cytotoxic effects. Liposomes, are drug delivery systems that increase the biodistribution of agents used for applications in various fields, thereby facilitating the more stable transport and thus uptake at the cell or tissue level for higher organisms. Structurally, they are phospholipid vesicles consisting of one or more concentric lipid bilayers containing lipophilic and hydrophilic domains. Thus, liposomal systems have the able to capture and retain various lipophilic and hydrophilic drugs or compounds. Liposomes for encapsulation systems are preferred because they are flexible, fully biodegradable, biocompatible, nontoxic and non-immunogenic.

Nanoliposome dispersion was produced in two stages in this study. The microemulsion technique containing direct end (probe) sonication, known as primary homogenization, enabled the formation of liposomes in different structures. Microfluidization (15000 psi) technique, which is one of the high-pressure homogenization methods, also known as secondary homogenization, has also produced more stable nanoliposomes (SUV) of liposome dispersions. The formed liposome dispersion was then lyophilized and stored for encapsulation and other physical stability experiments. Physical characterization experiments on empty liposomes; particle size and charge of liposomes (zeta (ζ) potential) were measured with malvern zeta potential and dynamic light scattering device.

To achieve the highest encapsulation efficiency, the encapsulation was performed by combining the aqueous solution and the liposome dispersion (0,9:0,5 w/w). Disc diffusion and minimum inhibition concentration tests were performed for the antimicrobial activity of the encapsulated extracts. Terebinth leaf extract (MYE) grouped for Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* respectively, liposome encapsulated terebinth leaf extract (NLMYE), ofloxacin as positive control and autoclaved pure water as negative control, obtained at 18, 24 and 48 hours. In addition, using the minimum inhibitory concentration technique, the minimum value NLMYE showing inhibitory effect in the range of 90-100% after 24 hours incubation against *E. coli* and *S. aureus* bacteria having an initial amount of 5.10^5 cfu was 0,0838 mg for *S. aureus*, was recorded as 0,114 mg for *E. coli*.

The results of this study determined that antibacterial activity of *P. terebinthus*, which was encapsulated with nanoliposomes on *E. coli* as gram negative bacteria and *S. aureus* as gram positive bacteria, in laboratory conditions.

Keywords: *P. terebinthus*, Nanoliposome, Microfluidizer, Antimicrobial activity.

1. GİRİŞ

Lipozomlar, lipid çift tabakaları içinde ve arasında sulu faz bulunan bir veya daha fazla çift tabakada düzenlenmiş amfipatik lipidlerden oluşan küçük küresel yapılardır. Ayrıca, doğal lipidlerden oluşan lipozomlar biyolojik olarak uyumlu, biyobozunur ve daha az immünojeniktir. Çok sayıda farmasötik çalışmada enkapsülasyon için farklı uygulama yollarıyla güvenli bir şekilde uygulandığı literatürde yer almaktadır. Özellikle antimikrobiyal ilaç taşıyıcısı olarak lipozomlar tercih edildiğinde enfeksiyon bölgesinde antibiyotik konsantrasyonlarını (pasif veya aktif hedefleme) yükselterek bakterisidal etkinliği arttırdığını gösteren araştırmalarda mevcuttur. Diğer bir katkısı ise potansiyel olarak toksik olan antimikrobiyal etken maddenin toksisitesini azaltabildiği yönündedir. Ayrıca; dermatolojide penetrasyon arttırıcılar ile birlikte uygulandığında lipozomların ilaç deposu olarak kullanıldığı bilinmektedir (Pierre ve Costa, 2011; Puglia ve Bonina, 2012). Günümüzde nano yapıların özellikle ilaç taşıyıcısı olarak enkapsüle etken maddenin aktivitesini arttırması nedeniyle lipozomlarda nano boyutlarda hazırlanarak etkinlikleri çalışılmıştır. Özellikle son zamanlarda lipozom dispersiyonlarını homojen ve nano boyutlarda üretmesi nedeniyle mikro akışkanlaştırma tekniği ile hazırlanmış nanolipozomlar enkapsülasyon materyali olarak daha çok tercih edilmektedir (Fresta ve diğ., 1995; Sachetelli ve diğ., 2000; Zylberberg ve Matosevic, 2016).

Lipozomal enkapsülasyon tekniğinin en çok uygulandığı alanlardan birisi de tıbbi öneme sahip bitkilerin ekstraktları ve esansiyel yağlarıdır. Bu çalışmada, enkapsülasyon tekniklerinden nanolipozomların bitki ekstraktları ile kullanımına dair literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir. Türkiye'de doğal olarak yetişen ve tıbbi özellikler içerdiği yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılan menengiç (*P. terebinthus* L.) bitkisinin yaprağından elde edilen etanol ekstraktının hazırlanan nanolipozomlar ile ilk olarak enkapsülasyonu yapılmıştır. Enkapsülasyon sonucu nanolipozomların fiziksel stabilitesi ile menengiç bitkisinin antibakteriyel aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

1.1 Lipozomlar ve Enkapsülasyon

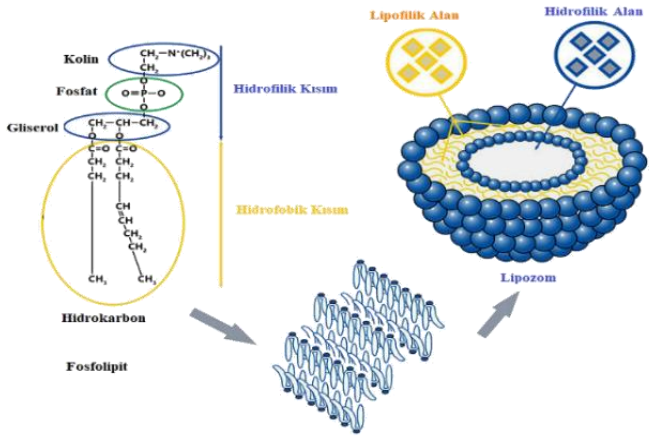
Lipozomlar, ilk olarak ingiliz Hematolog Dr. Alec D. Bangham tarafından Babraham Enstitüsü'nde 1964'te yayımlanan çalışmada tanımlanmıştır. Lipozom ismi iki yunanca kelimeden türemiştir: 'Lipos' yağ anlamına ve 'Soma' beden anlamına gelmektedir (Düzgüneş ve Gregoriadis, 2005). Eşit sayıda sulu bölmeyi çevreleyen bir veya daha fazla fosfolipid tabakasından oluşan veziküler yapılar olup, kolloidaldirler. Yumurta sarısı, soya fasulyesi ve kolestrol gibi yapılarda bol miktarda bulunan fosfolipidler, hücre zarının ana bileşenleri olmalarından dolayı biyouyumluluk özelliğine sahiptir.

Lipozomları oluşturan fosfolipidler çeşitli parçalardan oluşmaktadır (Şekil 1.1). Bunlardan bir tanesi olan gliserol, fosfolipidlerin en önemli parçalarından birisidir. Lipozom formülasyonunun en yaygın kullanılan bileşeni olmakla beraber biyolojik zarlarda lipid ağırlığının %50'sinden fazlasını temsil etmektedir (Shashi ve diğ., 2012).

Çizelge 1.1: Fosfolipid türleri (Kırtıl ve Öztop, 2014; Shashi ve diğ., 2012).

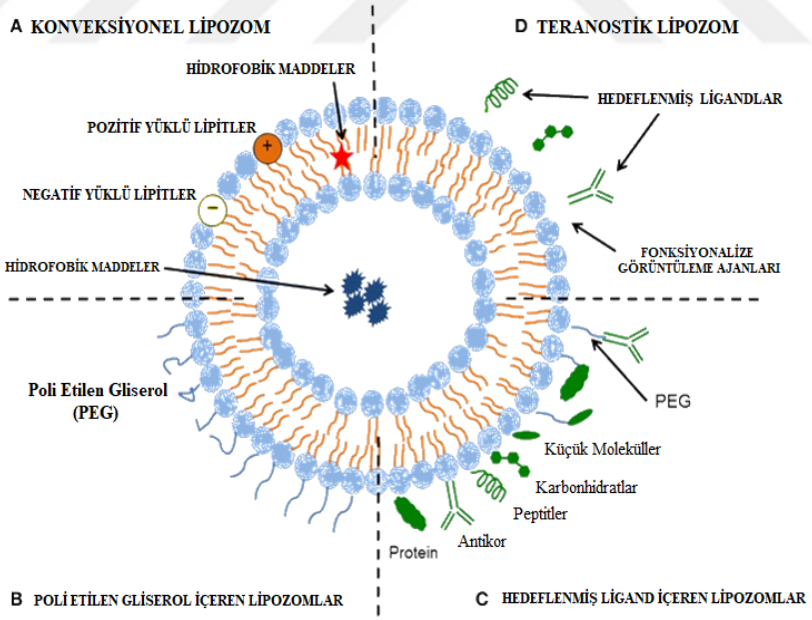
Doğal Fosfolipidler	Yapay fosfolipidler
Fosfatidilkolin (Lesitin) (PC)	Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC)
Fosfatidilserin (PS)	Distearoil fosfatidilkolin (DSPC)
Fosfatidilinositol (PI)	Dipalmitoil fosfatidiletanolamin (DPPE)
Fosfatidilgliserol (PG)	Dipalmitoil fosfatidilserin (DPPS)

Lipozom oluşturmada kullanılan çeşitli fosfolipidler Çizelge 1.1'de verilmiştir. Ayrıca fosfat grubuna bağlanan kolin, serin gibi materyaller baş kısım (hidrofilik kısım) olarak anılmaktadır. Kuyruk kısmını ise hidrokarbon grupları tamamlamaktadır (hidrofobik kısım). Lipozomlar; suda çözünen aktif bileşenleri merkezlerinde bağlayabilmektedir., Suda çözünmeyen hidrofobik bileşenleri ise membrana tutunmasını sağlayacak biyolojik etkinliklere sahiptirler. Ayrıca, biyoaktif bileşenlerin hücreye bağlanmasını ve çeşitli ligandlarla spesifik hedef hücreye iletilmesini sağlamaları yanında boyutlarının da bazı işlemlerle istenilen hale getirilebilmeleri gibi çeşitli özelliklere sahiptirler (Torchilin, 2005).



Şekil 1.1: Lipozom ve fosfolipid yapısı (Laouin ve diğ., 2012).

Birbirinden farklı lipozomlar çeşitli koşullara karşı hazırlanmasına göre sınıflandırılabilmektedir. Örneğin sıcaklığa duyarlı lipozomlar (TL), pH duyarlılığı asite bağlı lipozomlar (pHSL), ultrases ile çalışan ekojenik lipozomlar (EL), ışığa duyarlı lipozomlar ile aktif maddenin hedef doku/bölgeye verilmesi yöntemine göre manyetik lipozomların (ML) aralarında olduğu çeşitli lipozom türleri bulunmaktadır (Eloy ve diğ., 2014). Bunun dışında çeşitli biyomoleküllerle bağlanıp hedef hücreye göre taşınabilen lipozom türleri de mevcuttur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Lipozomlara bağlanan farklı moleküller (Robson ve diğ.,2018).

Lipozomlar boyut yapısına göre sınıflandırma yapıldığında; küçük tek katmanlı lipozomlar (SUV), orta tek katmanlı kesecikler (MUV), büyük tek katmanlı kesecikler (LUV), çok büyük katmansız kesecikler (GUV), çok katmanlı kesecikler

(MLV), oligo katmanlı kesecikler (OLV) ve çok keseciklileri (MV) olarak gösterilmektedir (Shashi ve diğ., 2012).

1.2 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, saf bir malzemenin ya da bir karışımın başka bir malzemeyle kaplanmasını veya tutulmasını hedeflemektedir. Enkapsülasyonun amacı ise küçük moleküllerin zara girip çıkmasına izin verirken içeriğini yıkıcı olabilecek dış ortamdan korumaktır (Gibbs ve diğ., 1999). Enkapsülasyon tekniğinde birkaç farklı aşama söz konusudur. Bu aşamalar; enkapsüle edilecek etken maddenin izolasyonu, maddenin kaplanması ve muhafazası ile kontrollü salınımıdır (Andrade ve diğ., 2015). Ayrıca, aktif olarak kullanılan maddenin ve kaplama olarak kullanılan taşıma sisteminin yapısal fonksiyonunun korunması için bazı durumlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu hususlar aşağıdaki gibidir;

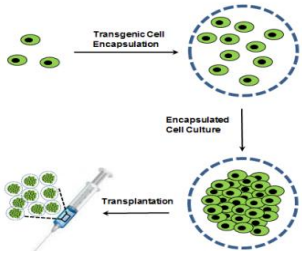
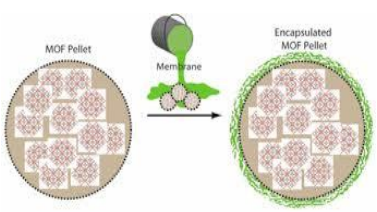
- Aktif olarak kullanılacak madde
- Uygulanacak kaplama malzemesi,
- Kaplama yöntemi,
- Aktif maddenin ve kaplama malzemesinin fizikokimyasal özellikleri,
- Aktif olarak kullanılacak maddeye ve kaplama malzemesine uygun işlem koşulları,
- Aktif maddenin muhafaza süresinin belirlenmesi,
- Enkapsülasyon işleminden sonraki depolama koşulları,
- Parçacık boyutu, dağılımı ve yoğunluğu,
- Maliyeti (Gökmen ve diğ., 2012)

Enkapsülasyon çeşitleri boyutlarına göre mikroenkapsülasyon ve nanoenkapsülasyon olarak ikiye ayrılmaktadır. Mikroenkapsülasyon, çok küçük damlacıkların, sıvıların veya katı madde parçacıklarının sürekli polimerik malzeme filmi ile çevrelendiği veya kaplandığı hızlı genişleyen bir teknolojidir. İlk olarak, mikroenkapsülasyon prosedürü Bungen burg de Jon ve Kan (1931) tarafından yapılmıştır (Vyas ve Khar, 2002). Mikroenkapsülasyon; sıvıların kolloidal ve yüzey özelliklerini değiştiren, katı korumaya dönüştüren, çevresel koruma sağlayan ve farklı kaplanmış malzemelerin

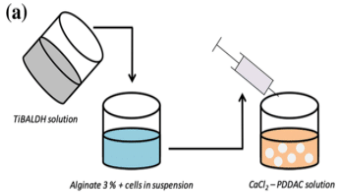
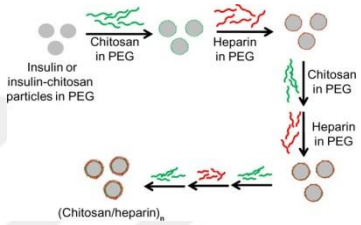
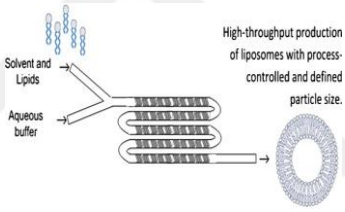
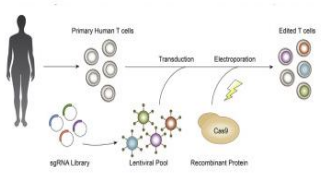
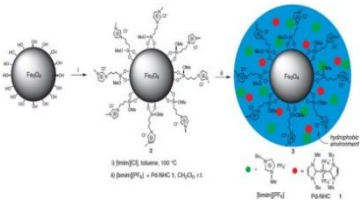
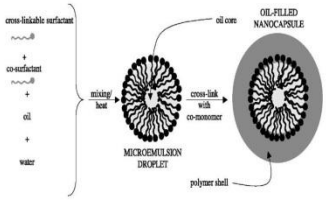
salınım özelliklerini kontrol eden bir yöntemdir (Lachman ve diğ., 1976; Abu-Izza ve diğ., 1996). Mikroenkapsüllenen ürünlerin çoğu, 1 ile 1000 μm arasındaki çaplara sahiptir (Umer ve diğ., 2011). Mikroenkapsülasyonda canlı hücreler, yapıştırıcılar, tatlar, agrokimyasallar, enzimler, farmasötikler ve benzeri çok sayıda çekirdek malzeme kullanılmaktadır (Mathiowitz, 1999).

Nanoenkapsülasyon ise; nano boyutlardaki maddeleri enkapsüle etmeyi sağlayan teknolojidir. Nano ölçekli aralıkta olan biyoaktif paketlemeyi ifade etmektedir (Lopez ve diğ., 2006). Herhangi bir biyoaktif bileşiğin vücut içindeki çeşitli bölgelere verilirken partikül boyutu küçüldükçe daha başarılı sonuçlar alınmaktadır (Takeuchi ve diğ., 2001; Hughes, 2017). Bu nedenle nanoenkapsülasyon; biyoyararlanımı arttırma, kontrollü salınımı arttırma ve biyoaktif bileşiklerin mikroenkapsülasyondan daha büyük oranda hassas hedeflenmesini sağlama potansiyellerine sahiptir (Mozaferi ve diğ., 2006). Nanopartiküller, çapı 10 ile 1,000 nm arasında değişen kolloidal büyüklükteki partiküllerdir. Hem nano kapsüller hem de nano küreler olarak ifade edilmektedir (Konan, 2002). Ayrıca; nanokapsüller, biyoaktif bileşiğin benzersiz bir polimer membran ile çevrili bir boşluğa sınırlandırıldığı ve biyoaktif bileşiğin eşit biçimde dağıldığı matris sistemlerinin olduğu veziküler sistemlerdir (Couvreur ve diğ., 1995). Literatürde yer alan enkapsülasyon türleri çizelge 1.2'de verilmiştir.

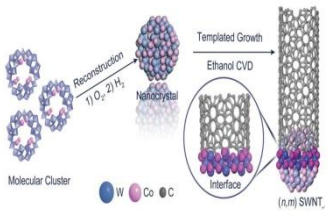
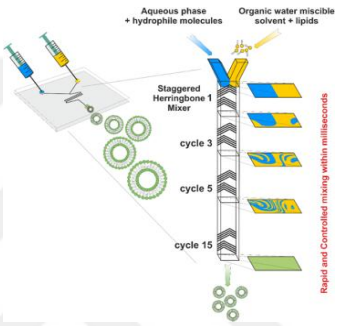
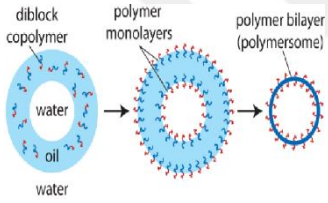
Çizelge 1.2: Enkapsülasyon türleri ve farklı yapıları.

Enkapsülasyon Türler	Enkapsülasyon Yapısı	Enkapsülasyon Oluşum Şekli	Kaynak
Makroenkapsülasyon	Hücre, Kök Hücre ve Doku Enkapsülasyonu		Zhang (2015)
	Membran Kaplı Adsorban		Hossain ve diğ. (2018)

Çizelge 1.2 (Devam): Enkapsülasyon türleri ve farklı yapıları.

Enkapsülasyon Türler	Enkapsülasyon Yapısı	Enkapsülasyon Oluşum Şekli	Kaynak
Mikroenkapsülasyon	Mikrokapsüller		Leroux ve diğ. (2020)
	Mikropartiküller		Song ve diğ. (2014)
	Mikrokesecikler (Lipozom vb.)		Kastner ve diğ. (2014)
	Hücrelere Gen Ekleme		Shifrut ve diğ. (2018)
Nanoenkapsülasyon	Nanoparçacıklar		He ve Alexandridis, (2017)
	Nanokapsüller		Url-1, (2020)

Çizelge 1.2 (Devam): Enkapsülasyon türleri ve farklı yapıları.

Enkapsülasyon Türler	Enkapsülasyon Yapısı	Enkapsülasyon Oluşum Şekli	Kaynak
Nanoenkapsülasyon	Nanotüpler		Yang (2014)
	Nanolipozomlar		Kotouček ve diğ. (2020).
	Polimerzomlar		Hayward ve diğ. (2006)

Lipozomlar; kozmetik, eczacılık ve gıda gibi farklı alanlarda farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda kullanım amaçları değişkenlik göstermektedir.

Örneğin; kozmetik ve ilaç sektöründe, çoğunlukla molekül taşıyıcı olarak uygulanılmaktadır. Deri sağlığı için gerekli olan değişik tipte yağlar, vitaminler ve iyonlar, lipozomların içerisine enkapsüle edilerek deriye doğrudan uygulanabilmektedir. Kozmetikte lipozom kullanımının sağladığı en büyük avantaj, uzun süreli ve kontrollü madde salınımıdır (Kirby ve diğ., 1991). Gıda sektöründe ise mikroenkapsülasyon teknolojisinin geliştirilmesi ile lipozomlar çok popüler bir sistem haline gelmiştir. Bunun en büyük nedeni, lipozomların gıda statüsünde bir madde olarak kabul edilmesidir. Gıda alanında; ürünlerin kalitesini arttırmak veya fermantasyon süresini kısaltmak için lipozom ile enkapsüle edilmiş enzimler

kullanılmaktadır. Bu enzimlerin kullanılması sayesinde kimyasallara karşı korunma sağlanmaktadır. Bu durumun en klasik örneği peynir yapımıdır.

1.2.1 Enkapsülasyon için lipozom hazırlama yöntemleri

Literatürde birçok lipozom hazırlama yöntemi bulunmaktadır. Çizelge 1.3'de bu tekniklerden sıklıkla kullanılan bazı yöntemler ve bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları gösterilmektedir.

Çizelge 1.3: Lipozom hazırlama yöntemleri, avantajları ve dezavantajları.

Lipozom Hazırlama Yöntemleri	Yöntemin Avantajları	Yöntemin Dezavantajları	Kaynak
Sonikasyon (Yüksek şiddetli homojenizasyon)	-Hızlı ve basit yöntem - Hazırlık kolaylığı -Yüksek ölçekli üretim -Organik çözücü olmadan hazırlık -Biyolojik olarak parçalanabilirliğinin daha kolay olması	-Çok düşük iç hacim / kapsülleme etkinliği -Kapsüllenecek fosfolipitlerin ve bileşiklerin olası bozulması -Prob ucundan metal kirlenmesi -Enkapsüllenen maddenin sıcaklığa ve sulu faza bağlı bozunması	Dua ve diğ., (2012); Naseri ve diğ., (2015)
French Press cell ekstrüzyon	- Yöntem basit, hızlı, tekrar üretilebilir - Daha hassas malzemelerin kullanılmasında avantaj sağlaması	- Ön işlem gerektirmesi (Sonikasyon gibi) -Yüksek sıcaklığa ulaşmanın zor olması -Çalışma hacimlerinin nispeten küçük olmasıdır (maksimum olarak yaklaşık 50 mL)	Barenholzt ve Amselem, (1979)

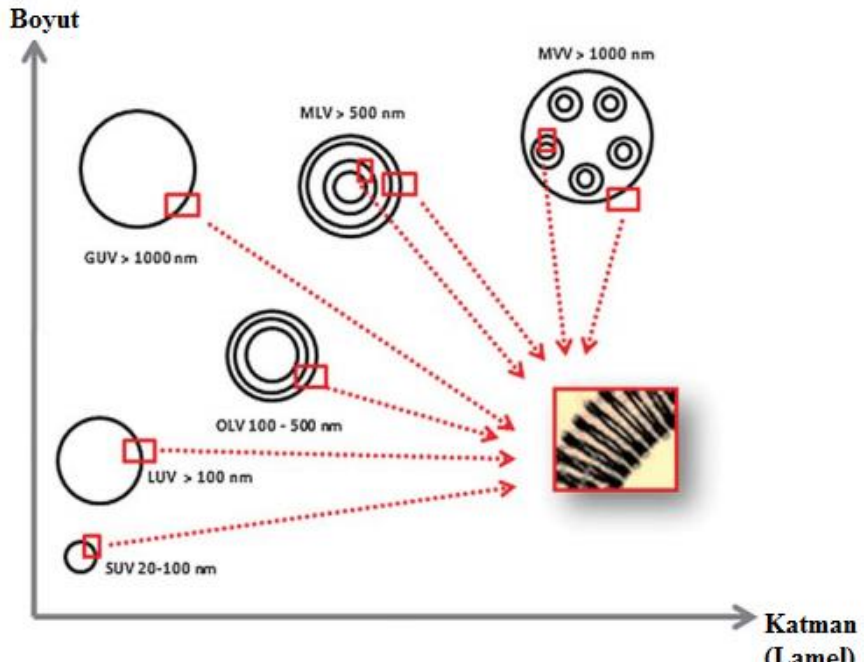
Çizelge 1.3 (Devam): Lipozom hazırlama yöntemleri, avantajları ve dezavantajları.

Lipozom Hazırlama Yöntemleri	Yöntemin Avantajları	Yöntemin Dezavantajları	Kaynak
Mikro akışkanlaştırma (Yüksek basınçlı homojenizasyon)	-Yüksek sentez tekrarlanabilirliği -Daha küçük boyutlu ve daha iyi boyut dağılımına sahip nanosize lipozomlar -Veziküller uzun süreli stabilite (> 26 gün) ve yüksek kapsülleme verimliliği	- Ön işlem gerektirmesi (Sonikasyon gibi) -Kirlenme ve kanal tıkanma riski -Nanopartiküllerin çevre ile etkileşme durumu -Diğer yöntemlere göre daha karmaşık tasarım	Yu ve diğ., (2009); Stachowiak ve diğ., (2008)
Membran (Zar) ekstrüzyon	-Diğer yöntemlere göre düşük basınçda (<100 psi) çalışması -Herhangi bir kontaminasyon olmaksızın homojen yapıya sahip lipozomlar üretilmesi	- Ön işlem gerektirmesi (Sonikasyon gibi) -Yüksek kapsüllenme için, suda çözünür bileşiklerin ekstrüzyon işlemi sırasında süspansiyon ortamında bekletilmesi gerekir	Morano ve diğ., (1990); Hunter ve Frisken (1998)
Etanol enjeksiyonu	- Yöntem basit, hızlı, tekrar üretilebilir - Homojen partikül dağılımına saip olması	- Lipozom oluşumu için uzun süre beklenilmesi -Kullanılan etanolün lipid yapısını bozabilmesi	Pons ve diğ., (1993)
Eter enjeksiyonu	-Yüksek yakalama verimliliği - Jel filtrasyonuna uygunluğu	- Enkapsüllenen maddenin sıcaklıkla bozunması -Kullanılan eterin ortamda kalması	Dua ve diğ., (2012); Mathai ve Sitaraman (1987)

Çizelge 1.3 (Devam): Lipozom hazırlama yöntemleri, avantajları ve dezavantajları.

Lipozom Hazırlama Yöntemleri	Yöntemin Avantajları	Yöntemin Dezavantajları	Kaynak
Lipid hidrasyon	- Lipozomal partikülleri spesifik hücre türlerine göre fonksiyonelleştirme ve hedefleme	-Düşük kapsülleme - Heterojen boyut dağılımı (SUV, MUV, LUV) -Organik çözücünün yavaşça ortamdan kaldırılması -Kullanılan asitin lipid yapısını bozabilmesi	Chanda ve diğ., (2011), Torchilin, (2005)
Ters Faz Evaporasyon	-Yüzde tutma kabiliyetinin yüksek olması - Proteinler, nükleik asitler ve diğer biyokimyasal reaktifler için uygun metot yapısına sahip olması	- Ön işlem gerektirmesi (Sonikasyon gibi) -Organik çözücünün yavaşça ortamdan kaldırılması -Bu süreçte jel durumu çökebilir ve ters çevrilen misellerin bazıları bozulması	Himanshu ve diğ., (2011); Kataria ve diğ., (2011); Szoka ve Papahadjopoulos (1978)
Diyaliz	- Yöntem basit, hızlı, tekrar üretilebilir - Kullanımı kolaylığı ve pahalı bir ekipmana gerek olmaması - Büyük miktarlarda numune kullanılabilir	- Kritik misel konsantrasyonlarına (CMC) sahip deterjanların lipozom yapısını bozması ve ortamdan uzaklaştırılamaması -Lipozom oluşumunun diğer yönteme göre uzun sürmesi	Shaheen ve diğ., (2006); Daemen ve diğ., (1995); Alpes ve diğ., (1986); Lin ve Xianrong, (2019).
Dilüsyon	- Kendiliğinden oluşma gerçekleşmesi - Çeşitli çözücülerin kullanılabilmesi (Tiriton-X, etanol, metanol, poliyol)	- Kullanılan deterjan türlerinin (Triton X, DDM) ortamdan uzaklaştırılamaması - Çok az miktarda lipozom partikülü oluşturması	Knol ve diğ., (1998); Kikuchi ve diğ., (1994); Kusumato ve diğ., (2014)

Lipozom oluşturma teknikleri arasında farklı yaklaşımlar literatürde mevcuttur. Bunlar arasında hidrasyon, ekstrüzyon, çift emülsiyon, zar (ekstrüzyon) gibi çeşitli çalışmalar görülmektedir. Bu yöntemlerin birçoğu, nano ölçekli ilaç dağıtım araçlarının üretilme potansiyellerini sınırlayan, nispeten büyük veziküler sistemlerin (dev veya büyük katmansız lipozomlar) veya mikrotübüllerin üretilmesine neden olur. Farklı çalışmalarla oluşturulan lipozomların boyut-katman grafiği şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3: Lipozomların boyut-katman grafiği (Laouini ve diğ., 2012).

Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile fiziksel olarak nano boyutta ve daha stabil lipozomlar elde edildiği de literatürde yer almaktadır (Lajunen ve diğ., 2014). Bu nedenle nanolipozom hazırlamada yöntemler arasında özellikle yüksek şiddetli ultrasonikasyon ile yüksek basınç homojenizasyonu tercih edilmektedir.

Yüksek şiddetli ultrasonikasyon yöntemi

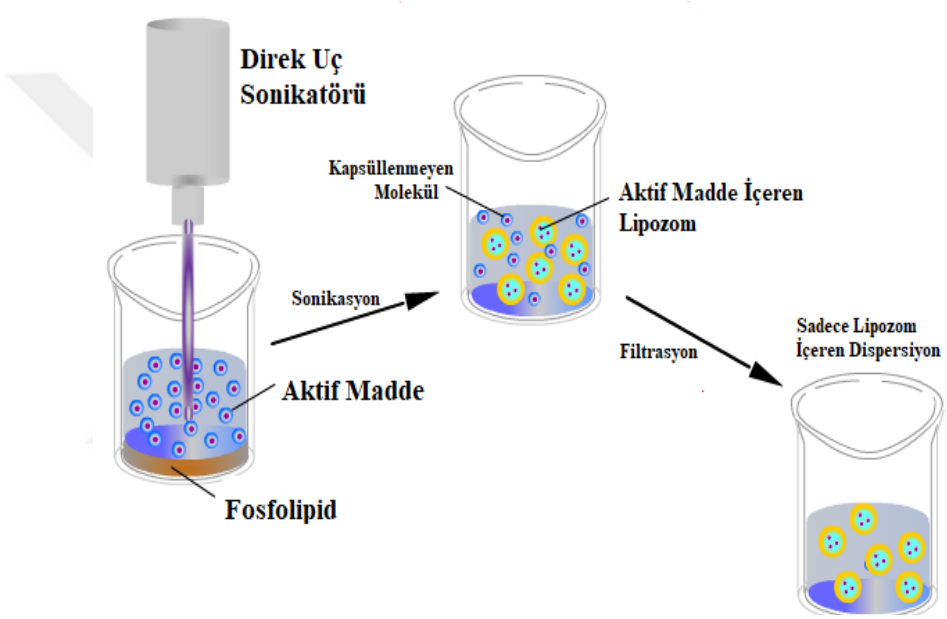
Sonikasyon, SUV'un hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Burada, MLV'ler, pasif bir atmosfer altında banyo (küvet) tipi bir sonikatör veya direk uç (prob) sonikatörüyle sonikasyona tabi tutulmaktadır.

İki sonikasyon tekniği vardır:

Direk uç (Prob) sonikasyonu: Bir sonikatörün ucu, doğrudan lipozom dispersiyonunun içine sokulur. Bu yöntemde lipid dispersiyonuna enerji girişi çok

yüksektir. Uçtaki enerjinin bağlanması yerel sıcaklığa neden olur. Bu nedenle, bir kap su/buz banyosunda yapılmalıdır. Sonikasyonda 1 saate kadar, lipidlerin %5'inden fazlası deesterifikasyona uğrama ihtimali vardır. Ayrıca, prob sonikatörü ile birlikte, titanyum sıyrılarak solüsyonu kirletebilmektedir (Şekil 1.4).

Banyo (Küvet) tipi sonikasyon: Beher veya mezür içindeki lipozom dispersiyonu bir banyo sonikatörüne yerleştirilir. Lipid dispersiyonun sıcaklığının kontrolü, bu yöntemde, doğrudan ucu kullanarak dağıtma yoluyla yapılan sonikasyonun aksine daha kolaydır. Oluşan malzeme steril bir kapta korunabilmekte veya inert bir atmosfer altında korunabilmektedir (Kataria ve diğ., 2011).



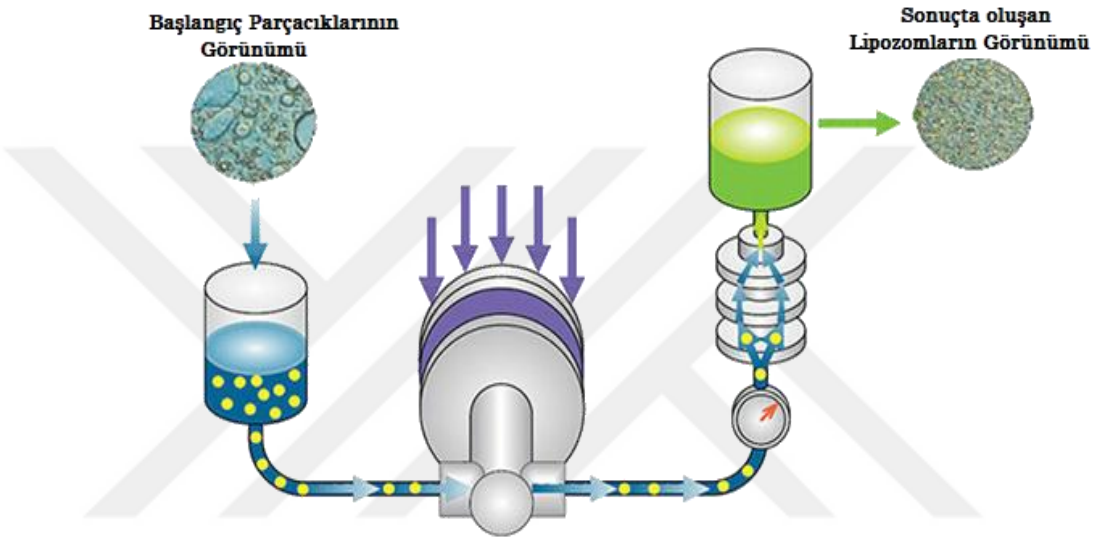
Şekil 1.4: Sonikasyon yönteminin şematik gösterimi (Tpe: Les Technologıes Dans La Medecıne, 2019).

Bu yöntemin uygulama kolaylığı olmasının yanında nanolipozom hazırlamada temel dezavantajları; çok düşük iç hacim (enkapsülleme etkinliği), fosfolipidler ile enkapsüllenecek bileşiklerin olası bozunması, büyük moleküllerin ortadan kaldırılması, prob (direk uç) ucundan metal kirlenmesi ve SUV ile birlikte MLV'nin varlığıdır (Riaz, 1996).

Yüksek basınç homojenizasyonu yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizatörlerde partiküller yaklaşık olarak 200 m/s'den hızda 10 ila 100 MPa arasında bir basınca sahip olan bir halka içinden geçirilmektedir. Bu durum parçacık boyutlarının önemli ölçüde azalması ve daha stabil lipozomların oluşumunu sağlamaktadır. Sistemin verimliliği giriş ve çıkış arasındaki basınç farkı ile

ilişkilidir. Yüksek basınçlı homojenizatör olan mikro akışkanlaştırıcıda (Şekil 1.5), partikül büyüklüğü küçültme, önce sisteme giren sıvının iki ayrı mikro işlemciye ayrılması ve daha sonra bu iki yüksek hızlı akışın çarpışması ile elde edilmektedir (Barnadas ve Sabes, 2003). Bu yöntem ile yüksek enkapsülasyon verimi alınmaktadır. Ayrıca benzer yüksek basınçlı homojenizatörlere kıyasla çoğu zaman daha küçük boyutta parçacıklar elde edilebilmektedir.



Şekil 1.5: Yüksek basınç homojenizasyonu yöntemlerinden biri olan Mikro akışkanlaştırıcı şematik olarak gösterimi (Missoum ve diğ., 2013).

1.2.2 Lipozom karakterizasyonu

Lipozomlar; fosfolipid içeriği, boyutları ve şarj davranışına bağlı olarak değişen farklı özellikler gösteren yapılardır (Abra ve Hunt, 1981; Jaroni ve diğ., 1986). Yapısal farklılıkları ise; temel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak karakterize edilmektedir.

1.2.2.1 Lipozomların fiziksel karakterizasyonu

Lipozomların fiziksel karakterizasyonu; şekilleri, büyüklükleri, morfolojileri, tabaka (lamel) davranışları ve salınımları değerlendirilerek belirlenmektedir.

Vezikül şekli, büyüklüğü ve morfolojisi

Lipozomların fiziksel stabilitesi; büyüklüklerine ve polidispersite indekslerine (PDI) bağlıdır (Armengol ve Estelrich, 1995). Taramalı elektron mikroskobu, lipozom vezikül boyutunun ölçülmesinde ve bunların morfoloji ve lamellerinin

belirlenmesinde kullanılmaktadır (Akashi ve diğ., 1996; Jiskoot ve diğ., 1986; Egerdie ve Singer, 1982). Geçirimli elektron mikroskobu ise çoğunlukla boyut dağılımının ölçümünde kullanılmaktadır. Ayrıca, kriyojenik geçirimli elektron mikroskobu (Kriyo-TEM) dondurulmuş halde olan lipozomların görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Kuntsche ve diğ., 2011). Bu tekniğin avantajı analizlerin kendi ortamlarında yapılmasıdır. Böylece veziküllerin bozulmasını önlenmektedir (Gustafsson ve diğ., 1995).

Yüzey yükü (zeta potansiyeli)

Zeta potansiyeli, lipozomal dispersiyonda lipozomlar tarafından elde edilen toplam yüktür (Lyklema ve Fleer, 1987). Dispersiyondaki lipozomların yüzey yükü, zeta potansiyeli ile bilinir (Hunter ve diğ., 2001). Lipozomların stabilitesi ise her zaman zeta potansiyeline bağlıdır (Du plessis ve diğerleri, 1994). Lipozomal dispersiyon, veziküller herhangi bir toplanma olmadan ayrı kaldığında her zaman kararlıdır. Veziküller şarj olduğunda ise itici kuvvetlerle dağılan veziküller arasında itme görülür ve stabil hale gelir. Stabil bir lipozomal dispersiyon için maksimum vezikül yükü olacaktır. Zeta potansiyeli, dispersiyonların stabil olup olmadığını veya pratik bir zaman ölçeği içinde kümeleşmeye yönelik olup olmadığını belirlediğinden daha büyük zeta potansiyeline sahip dispersiyonlar genellikle tercih edilir (Awad ve diğ., 2005).

Lipozomal dispersiyonun faz davranışı (DSC)

Lipozomal dispersiyon faz davranışı, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılarak belirlenebilmektedir (Jousma ve diğ. 1987). Diferansiyel taramalı kalorimetre metodu, lipozomların aşırı ısı kapasitesindeki sıcaklık ölçümüne bağlıdır (Biltonen ve Lichtenberg, 1993).

Enkapsülleme verimliliği

Yüzde enkapsülleme verimi (% EE), santrifüj yöntemiyle belirlenmektedir. Tutma verimini bulmak için lipozomal dispersiyonlar 5 ºC'de 18.000 rpm'de 1 saat santrifüj edilmektedir. Lipozomları içeren karışımın sediment kısmı Triton X-100 veya metanol gibi çeşitli çözücüler kullanılarak ayrıştırıldıktan sonra parçalanmaktadır. Ardından dilüsyondan sonra lizize edilmiş lipozomlardan aktif maddenin konsantrasyonu ilgili dalga boyunda UV görünür spektrofotometre kullanıldıktan sonra hesaplanarak belirlenmektedir. Bu sonuca göre en iyi enkapsülasyon verimi

alınan formülasyon çalışmalarda kullanılmaktadır (Sudhakar ve diğ., 2014; Demel ve diğ., 1972; Nii ve Ishii, 2005).

1.2.2.2 Kimyasal karakterizasyonu

Kimyasal karakterizasyon çalışmaları lipozomal bileşenlerde saflığın tanımlanması için yapılmaktadır. Bu amaçla; fosfolipidlerin konsantrasyonu, yağ asidi kompozisyonu, peroksidasyonu ve hidrolizi testler yapılarak belirlenmektedir (Bozkır ve Koçyiğit, 1995).

1.2.2.3 Biyolojik karakterizasyonu

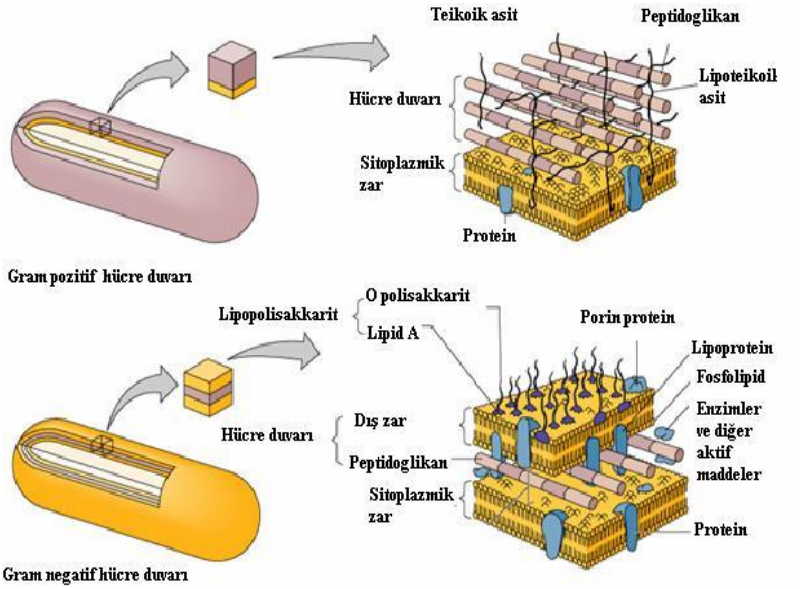
Biyolojik karakterizasyon, *in vivo* çalışmalar yapıldığında lipozom formülasyonlarının güvenliğini tanımlamaktadır (Talsma ve Crommelin, 1992). Lipozomların biyolojik sterilitesi, aerobik veya anaerobik kültürler hazırlanarak tanımlanabilir ve pirojenik olma durumunu belirlemek için tavşanlar üzerindeki pirojen testi ile ortaya çıkarılabilmektedir. Lipozomların enkapsülasyon malzemesi olarak kullanımı ve taşıdığı etken maddenin antibakteriyal etkinliğinin belirlenmesinde ise genellikle *in vitro* yöntemle disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri uygulanmaktadır.

1.3 Antibakteriyal Maddelerin Mekanizmaları ve Antibakteriyal Aktivite Belirlenmesindeki Yöntemler

Antibakteriyaller, enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlardır (Saran ve Karahan, 2010). Antibakteriyal maddeler etkilerini; nükleik asit, enzim ve hücre duvarı sentezini inhibe etmesi, hücre zarı fonksiyonunu inhibe etmesi ve hücrenin metabolizmasını bozması şeklinde göstermektedir.

Hücre duvarı yapılarının farklı olması nedeniyle gram negatif bakteriler antibakteriyal ajanlara karşı daha çok dirençlidir. Diğer yandan gram pozitif bakterilerin kalın peptidoglikan duvarlarında yer alan peptid bağları ajanlar karşısında çok daha kolay parçalanmaktadır (Şekil 1.6).

Çeşitli yöntemler kullanılarak antibakteriyal aktivitenin belirlenmesi için ajanlar gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı test edilmektedir. Bunlar: disk difüzyon yöntemi, E-test, minimum inhibisyon konsantrasyon yöntemi, tüp dilüsyon, agar dilüsyon, minimum bakterisidal konsantrasyon yöntemileridir.



Şekil 1.6: Gram (+) ve gram (-) hücre yapısının basit olarak gösterimi (Tortora ve diğ., 2004).

1.3.1 Disk difüzyon yöntemi

Disk difüzyonu veya Kirby-Bauer testi antibakteriyal aktiviteyi belirlemek için uygulanan klasik mikrobiyoloji tekniklerinden biridir. Uygunluk, verimlilik ve maliyet nedeniyle disk difüzyon yöntemi antibakteriyal direncin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerden birisidir. Ajanları test etmek için müller-hilton agar veya nutrient agar gibi farklı besiyerlerine ekilen bakterilere antibiyotik ve boş diskler (kör olarak) yerleştirilir. Boş disklere farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan ilave edilir. Mikroorganizma çeşidine göre değişen uygun inkübasyon sıcaklığı ve süresi sonrasında, her bir diskin etrafındaki büyüme önleme bölgeleri (zon), en yakın milimetreye kadar ölçülür. Bir diskin hemen yakınında büyümesi olmayan açık bir dairesel bölge, bu antibakteriyal için duyarlılığı gösterir (Sandle, 2016). Bu bölgeye inhibisyon zonuda denilmektedir.

1.3.2 Mikrodilüsyon yöntemleri

Sıvı (broth) ve katı (agar) olmak üzere iki çeşit ortamda mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Mikrodilüsyon yöntemleri; minimum inhibisyon konsantrasyon ve minimum bakterisidal konsantrasyon testleri olarak alt gruplara ayrılmaktadır.

Minimum inhibisyon konsantrasyon yöntemi

Minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) yöntemi antibakteriyal aktivite belirleme de kullanılan bir mikrodilüsyon yöntemidir. Tanımlanan *in vitro* koşullar altında,

belirli bir süre içinde bir mikroorganizmanın görünür büyümesinin ortaya çıkmasını engelleyen bir antibakteriyal maddenin (mg/L cinsinden) en düşük konsantrasyonu MİK olarak bilinmektedir. (Wiegand ve diğ., 2008). MİK yöntemleri; direnç gözlemi ve disk testlerinde eşdeğer sonuçlar veren organizmaların minimum duyarlılığını belirlemek için kullanılmaktadır.

Minimum bakterisidal konsantrasyon yöntemi

Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK); mikrodilüsyon tekniklerinden bir diğeri olup, belirli bir koşul altında belirli bir süre boyunca bakterileri öldürmek için gereken en düşük antibakteriyal madde konsantrasyonudur. MBK, MİK'i tamamlayıcı niteliktedir. MİK testi, büyümeyi büyük ölçüde engelleyen en düşük antibakteriyal madde seviyesini göstermektedir. MBK ise; mikrobiyal ölüme neden olan en düşük antibakteriyal madde seviyesini gösterir. Antibakteriyal ajanlar ile MBK testinde elde edilen sonuç MİK'in dört katından fazla olması halinde bakterisidal olarak kabul edilmektedir (Andrews, 2001).

1.4 Menengiç (*Pistacia terebinthus*)

Pistacia, Anacardiaceae ailesine ait yaklaşık olarak 70 cinsten oluşan ve 600'den fazla miktarda alt tür içeren çiçekli bitkilerin bir cinsidir. Türkiye'de; *Pistacia* türü ve onların doğal melezleri yaygın biçimde bulunmaktadır. (Kole, 2007). Bu türlerden biri olan *P. terebinthus,* yaygın olarak menengiç olarak adlandırılsa da çöğre, çitlenbik, çedene, sakız ağacı, yabani fıstık isimleri ile de adlandırılmaktadır (Orman Genel Müdürlüğü, 1991). *Pistacia* türleri, özellikle flavonoidler ve diğer fenolik bileşenler nedeniyle antibakteriyal, antienflamatuar ve sitotoksik aktivitelerin yanı sıra antioksidan etkiye sahip olmaları nedeniyle çeşitli alanlarındaki çalışmalarda kullanılmaktadır (Baytop, 1984).

Menengiç bitkisinin meyvelerinden, çiçeklerinden, yapraklarından ve dallarından elde edilen uçucu bileşenler; terpenoidler, fenolik bileşikler, yağ asitleri ve stereoller olarak sınıflandırılmaktadır (Bozorgi, 2013). Menengiç bitkisinin aromatik özelliği ve çeşitli tıbbi özellikleri, fenolik bileşiklerden özellikle tanen açısından zengin bir bitki olmasından kaynaklanmaktadır (Doğan ve diğ. 2017). Pelvan ve Demirtaş'ın (2018) yaptığı bir çalışmada, antep fıstığı ve siirt fıstığına (*P. vera*) oranla fenolik

madde miktarı daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapısında bulundurduğu çeşitli fenolik bileşiklerin miktarı çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4: Menengiç (*P. terebinthus*) bitkisi yaprağı ekstraktının fenolik madde kompozisyonu (mg/g) (Yaşar, 2016).

Fenolik bileşik	mg/g
Gallik Asit	0,91
Protokateşik Asit	0,07
Kateşin	0,36
P-Hidroksibenzoik Asit	0,14
Klorojenik Asit	0,13
Kafeik Asit	0,02
Siringik Asit	0,05
Vanilin	0,02
P-Kumarik Asit	0,03
Toplam	1,73

1.5 Literatür Araştırması

Literatüre bakıldığında, çeşitli bitkilerin lipozom ile enkapsülasyonu hakkında birçok çalışma mevcuttur. Rapor edilen lipozom hazırlama yöntemleri ve formülasyonları ise çalışmaya göre değişmektedir. Ancak nanolipozomlar ile Menengiç bitkisinin bölümlerinden elde edilen ekstraktların enkapsülasyonu ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesiyle ilgili literatürde bir çalışmayla karşılaşılmamıştır.

Benzer çalışmalardan olan Gortzi ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan araştırmada, sakız ağacının (*P. lentiscus*) bir alt türü olan ve endemik olarak yetişen chia (Anacardiaceae) özütü ile fosfatidilkolinin (PC) ve kolesterol'den (CH) oluşan lipozomlar enkapsüle edilerek antimikrobiyal testleri yapılmıştır. Lipozom hazırlanmasında ise ince film buharlaştırma, donma-çözülme ve etanol enjeksiyonu yöntemleri kullanılmıştır. *S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, E. coli, Candida albicans, Candida tropicalis* ve *Candida glabrata* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Yapılan bir diğer çalışmada ise, Rafiee ve arkadaşları (2017) tarafından membran, ekstrüzyon yöntemi ile oluşturulan nanolipozomları, antep fıstığı (*P. vera*) meyvesinin yeşil kısmından farklı konsantrasyonlarda elde ettikleri fenolik bileşikler (500, 750 ve 1000 ppm) ve lesitin (ağırlıkça %1, %2) içeren nanolipozomlarla beraber ince hidrasyon metodu ile hazırlanmıştır. Bu çalışma sonucu nanolipozomların, gıda maddelerinde biyofonksiyonel aktiflerinin korunması ve geliştirilmesi için etkili bir taşıyıcı olduğu ve depolama sırasında önemli bir stabiliteye sahip olduğu saptanmıştır.

Ülkemizde de lipozomların kullanımı, biyoyararlanım, stabilite ve antibakteriyal ajanlarından etkin bir şekilde faydalanmak için yapılan çalışmaların son yıllarda artış gözlemlenmiştir. Ülkemize ait olduğu bilinen sater otunun (*Satureja hortensis* L.) uçucu yağının, karvakrol, timol ve ρ-simen varlığı nedeniyle yüksek antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Demirbaş'ın (2012) yaptığı bir tez çalışmasında, sater otu esansiyel yağı, antibakteriyal etkinliğini göz önüne alınarak bir lipozom tekniği olan lipid hidrasyon yöntemi kullanılarak enkapsüllenmesi ve çeşitli fiziksel karakterizasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak, hazırlanan ekstraktlı lipozomların tüm test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise, elma kabuğundan elde edilen fenolik bileşikler lipozom ile kaplanmış ve çeşitli kaplama materyalleri (kitosan ve maltodekstrin) ile stabilitesinin arttırılması sağlanmıştır (Demircan 2016). Çalışmada, fosfolipid öncelikle asetat tampon çözeltisiyle oda sıcaklığında bir gece manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Mikro akışkanlaştıcı kullanılarak elde edilen lipozom ile ekstrakt enkapsüle edilmiştir. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri ölçülerek lipozom karakterizasyonu yapılmıştır. Çeşitli formülasyonlar denenmiş ve sonuçta kefir içeceği fonksiyonel olarak zenginleştirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca fiziksel stabiliteyi arttırmak için negatif yüklü olan lipozom parçacıkları pozitif yüklü olan kitosan ile kaplanmıştır. Isısal işleme dayanıklılığı sağlamak için maltodekstrin ile kaplanarak enkapsülasyon işlemi tamamlanmış ve kefir ürününe uygulanmıştır. Çeşitli deneylerle ortamdaki fenolik madde miktarındaki gerçekleşen değişim ile lipozom enkapsülasyonun başarılı olduğunu belirlenmiştir (Demircan 2016).

Dağ ve Öztop'un (2017) yaptığı çalışmada ise yeşil çay ekstraktı, fonksiyonel özelliklerini korumak ve kateşinlerin biyoyararlanımını ve stabilitesini arttırmak için lipozomla enkapsülasyon yapılmıştır. Enkapsülasyon işlemi için kullanılan soya

lesitini ile, yüksek basınçlı homojenleştirme (mikro akışkanlaştırma) ve yüksek şiddetli homojenizasyon uygulamaları ile lipozom dispersiyonu elde edilmiştir. Homojenizasyon uygulaması ve dispersiyon ortam pH'ının, depolama süresince lipozomların fiziksel özellikleri ve stabilitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Sonuç olarak, partikül boyutunda ve antioksidan aktivite üzerinde lipozomun etkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinde düzgün boyut ve şekil elde edildiği gözlemlenmiştir.

Yukarıda bahsedilen fitokimyasal çalışmalar dışında özellikle farmasötik, kozmetik ve tıp gibi alanlarda çeşitli çalışmalar ve uygulamalar da literatürde mevcuttur. Literatürde menengiç bitkisinin antibakteriyal etkisinin araştırıldığı Çoban ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2017) ise, menengiç bitkisinin ve gelincik bitkisi (*Papaver rhoeas*) ekstrelerinin antibakteriyal aktivitesi bazı patojen mikroorganizmalara karşı test edilmiştir. Menengiç bitkisi ekstraktlarının test edilen bakteri ve küf patojenlerine karşı gelincik bitkisi ekstraktlarından daha etkili olduğu rapor edilmiştir.

Kavak ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir çalışmada ise menengiç bitkisi yaprakları %80 etanol-su karışımı ile 37 ^{o}C'de 2 saat karıştırılmış daha sonra dondurarak kurutulmuştur. Oluşturulan katı haldeki menengiç bitkisinin HPLC ile fenolik madde miktarı tayini ve ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi gözlemlenmiştir. Daha sonra, menengiç yaprağı ekstresi, gram (-) bakteri olarak *E. coli* ve gram (+) bakteri olarak *S. aureus* üzerinde antibakteriyal aktivite testi olan MİK analizi ile yapılmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyon değeri *S. aureus*'a karşı ≤1,56 mg/mL olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, ham ekstrenin *E. coli* üzerinde antibakteriyal etkisi belirlenmemiştir.

Pulaj ve arkadaşlarının (2016) Kosova'da yaptığı bir çalışmada da uçucu yağların doğal popülasyonlar arasındaki kimyasal değişkenliğini analiz etmek ve onları *S. aureus*'a karşı potansiyel antibakteriyal aktivite açısından test edilmiştir. Bu amaçla, menengiçin farklı kısımlarından (yapraklardan, pedisellerden, meyvelerden ve safralardan) elde edilen uçucu yağların antibakteriyal aktivitesini değerlendirmek için klinik olarak ilgili *S. aureus* (NRS385, LAC ve UAMS-1) suşuna karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) yöntemi uygulanılmıştır. Sonuç olarak; *S. aureus*'a karşı büyüme önleyici aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

1.6 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı; hazırlanan nanolipozomlar ile menengiç (*P. terebinthus* L.) yaprağından elde edilen etanol ekstraktının enkapsülasyonu ve nanolipozom ile enkapsülasyonun menengiç yaprak ekstresinin fiziksel stabilitesi ve antibakteriyal aktivitesine etkilerinin belirlenmesidir. Bu amaçla sırasıyla;

- Yüksek basınçlı ve yüksek şiddetli homojenizasyon teknikleri ile bu alanda kullanılmak üzere nanolipozom formülasyonu geliştirildi
- Nanolipozom sisteminin fiziksel karakterizasyonu belirlendi.
- Menengiç yaprağı etanol ekstraktının nanolipozom ile enkapsülasyonun gram (+) ve gram (-) bakterilere karşıantibakteriyal aktivitesine etkisi araştırıldı.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Deneylerde kullanılan menengiç (*P. terebinthus*) yaprakları, Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsün'den (2019) temin edilmiştir. Menengiç yaprakları akan su altında yıkandıktan sonra kullanılana kadar -18 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Yapraklardan elde edilen etanol ekstaktı ise liyofilize edilerek, lipozom ile enkapsülasyon işlemine kadar +4 ^{o}C'desaklanmıştır. Deneylerde analitik saflıktaki kimyasallar kullanılmıştır. Etanol, ISOLAB (Wertheim, Almanya) firmasından, L-α-fosfatidilkolin (soya fasulyesi lesitini, ≥30% enzimatik) ve sodyum karbonat Sigma-Aldrich (Missouri, ABD) firmasından temin edilmiştir.

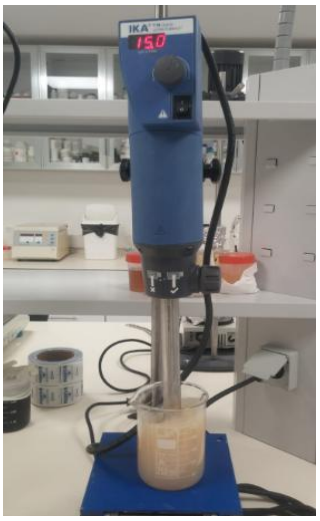
2.2 Yöntem

2.2.1 Nanolipozom hazırlanması

Çağal ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışma temel alınarak boş nanolipozomlar iki aşamalı homojenizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan nanolipozomlar liyofilize edilerek çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

2.2.1.1 Direk uç sonikatör sistemi ile mikro emülsiyon hazırlanması

Nanolipozom eldesi için lipozomların ilk olarak mikroemülsiyonları hazırlanmıştır. Direk uç sonikatörü ile yapılan bu işlem birincil homojenizasyon adımıdır. Birincil homojenizasyon için, 200 mL saf suya, L-α-fosfatidilkolin (S30) materyalinden 4 g (%2 a/h oranında) ilave edilmiş ve yüksek hızlı homojenizatör olan direk uç sonikatör (IKA- T-18 Dijital Ultra-Turrax Homojenizatör, Staufen, Almanya) yardımıyla işlem boyunca %70'lik güçle, 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Oluşturulan dispersiyonda katı parçaçıkların olmaması ve Şekil 2.1'de görüldüğü gibi süt köpüğü halini alması sağlanmıştır. Homojenizatörün uç kısım sıcaklığının lipozomları etkilememesi için dakikada 5 saniye karıştırma işlemine ara verilmiştir.



Şekil 2.1: Direk uç sonikatör sistemi ile lipozom dispersiyonu hazırlanması.

2.2.1.2 Mikro akışkanlaştırıcı tekniği ile nanolipozom dispersiyonunun hazırlanması

Oluşturulan mikroemülsiyon daha sonra mikro akışkanlaştırıcıda yapısal olarak daha stabil nanolipozom dispersiyonu hazırlamak için ikincil homojenizasyon işlemine tabi tutulmuştur. İkincil homojenizasyon olarak yüksek basınçlı homojenizasyon (M-110EH-30 Microfluidizer High Pressure Homogeniser, Westwood, Amerika Birleşik Devletleri) yöntemi ile lipozomlar mekanik olarak hazırlanmıştır (Şekil 2.2). Bu çalışma için döngü sayısı beş (5) olarak 15000 psi'lik basınç ile yapılmıştır. Son karışımda nano boyut halinde SUV olarak elde edilmiştir. Elde edilen nanolipozom dispersiyonu, stabilitesinin artması ve enkapsülasyonda kullanılmak üzere liyofilize (Christ Alpha 1-4 LSC Freeze-Dryer, Harz, Almanya) edilmiştir.



Şekil 2.2: Nanolipozom dispersiyonu için kullanılan mikro akışkanlaştırıcı.

2.2.2 Nanolipozomun fiziksel karakterizasyonu

Dinamik ışık saçılımı (DLS) ve zeta (ζ) potansiyel ile karakterizasyonu

Elde edilen lipozomal sistemlerin fiziksel karakterizasyonu malvern zeta-sizer cihazı (Malvern Zeta-sizer, Worcestershire, England) ile yapılmıştır. Bu kısımda mikro akışkanlaştırıcı cihazından elde edilen içerik olarak boş haldeki nanolipozom dispersiyonlarından 15 mL'lik falkon tüpüne aktarıldıktan sonra dinamik ışık saçılımı cihazının ölçüm küvetine alınmıştır. Ardından makineye 90° açı ile yerleştirilerek okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan lipozom dispersiyonlarının zeta (ζ) potansiyel ile lipozom yükünün belirlenmesi için mikro akışkanlaştırıcı cihazından elde edilen boş lipozom dispersiyonları, zeta potansiyel için tasarlanmış küvete alınarak, malvern zeta-sizer cihazına (Malvern Zeta-sizer, Worcestershire, England) 90^{o} açı ile yerleştirilmiştir. Daha sonra okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.3'de çalışmada kullanılan malvern zeta-sizer cihazı gösterilmektedir.

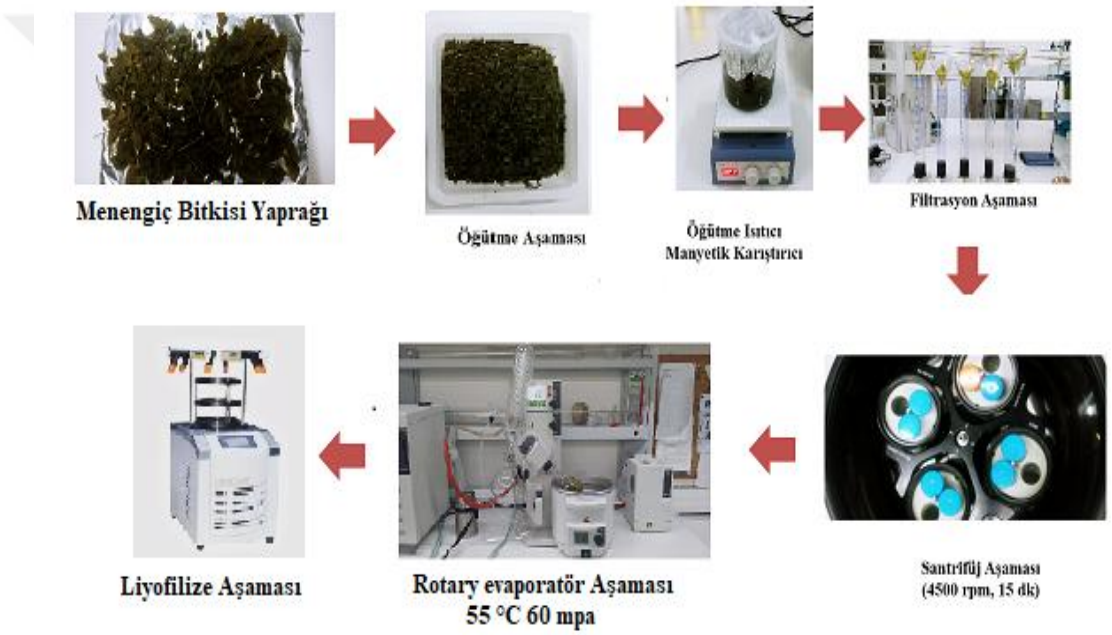


Şekil 2.3: Nanolipozomun fiziksel karakterizasyonu için kullanılan master zeta-sizer cihazı.

2.2.3 Menengiç yaprağının etanol ile ekstraksiyonu

Menengiç yaprağının ekstraksiyonunda, Doğan ve arkadaşlarının (2017) uyguladıkları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yapılan işlemler şekil 2.4'de aşamalı olarak gösterilmiştir. Öncelikle menengiç yaprakları etüvde 40 ^{O}C'de 12 saat tutularak kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra sap parçaları ile çürük ve ezik haldeki yapraklardan temizlenenen menengiç

yaprakları öğütülmüştür. Ön işlemleri tamamlanan 20 g menengiç yaprağı üzerine 200 mL %90'lık etanol çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 24 saat karıştırma (Stuart/UC 152, Staffordshire, Birleşik Krallık) işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, adi filtre kağıdından geçirilerek elde edilen karışım, oda sıcaklığında, 4500 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Beckman-Coulter Allegra X30R, Indiana, ABD). Santrifüj işlemini takiben elde edilen süpernatant döner buharlaştırıcı (BUCHI rotary evaporator/R360-E, Flawil, İsviçre) yardımıyla etanol kısmından ayrılmıştır. Elde edilen çözelti petri kabına alınarak -80 ^{O}C'de 5 saat bekletildikten sonra liyofilize (Toros / TRS 2/2V, İstanbul, Türkiye) edilmiştir.



Şekil 2.4: Menengiç yaprağından etanol ekstraksiyonun aşamalı olarak gösterimi.

2.2.4 Nanolipozom ile MYE enkapsülasyonu

Enkapsülasyon için liyofilize halde bulunan nanolipozomlar ile MYE ekstraktının çözündürülmesi işlemleri yapılmıştır. Liyofilize nanolipozomlara 1:10 (a:h) oranında otoklavlanmış su ilavesinden sonra bir direk uç sonikatör (Bandelin/GM4200, Berlin, Almanya) ile 5 dakika boyunca %70'lik güçle karıştırma işlemi yapılmıştır. Çözündürme işlemi süresince nanolipozomal yapının bozulmaması için dispersiyon buzlu kova içerisinde tutulmuştur. Ayrıca, homojenizatörün uç kısmından kaynaklanacak sıcaklık artışını önlemek amacıyla dakikada 5 saniye işleme ara verilmiştir. Oluşan dispersiyon işlem sonrası +4 oC'de buzdolabında çalışmalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

Liyofilize edilmiş MYE'nin çözünme işlemi 1 g üzerine 50 mL saf su eklendikten sonra oda sıcaklığında 4500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek gerçekleştirilmiştir.

2.2.5 Enkapsülasyon verimi analizi

Enkapsülasyon verimi analizi Kamra ve arkadaşlarının (2005) ve Nii ve Ishii'nin (2005) yaptığı çalışmalar örnek alınarak modifiye edilip kullanılmıştır. En iyi enkapsülasyonun gerçekleştiği oranın hesaplanması için enkapsülasyon verim analizi yapılmıştır. Yüzde enkapsülleme veriminin (%EE) bulunması için çözünme işlemi sonrası hazır hale gelen tamamen çözünmüş nanolipozom dipersiyonu ile MYE ekstraktı kullanılmıştır. Nanolipozom dispersiyonu ile çizelge 2.1'de gösterilen nanolipozom dispersiyonları sabit tutularak MYE'nin miktarı kademeli olarak arttırılıp karıştırılarak enkapsülasyon verim analizi yapılmıştır.

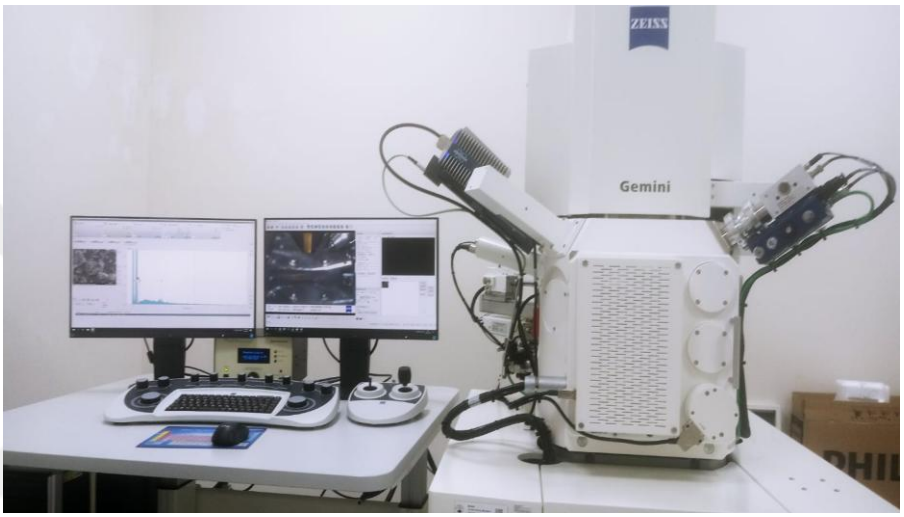
Çizelge 2.1: MYE enkapsüllemek için hazırlanan nanolipozom formülasyonları.

Nanolipozom Formülasyonu	Nanolipozom Dispersiyonu (NLD) (mL)	Ekstrakt Solüsyonu MYE (mL)
NLF1	0,5	1,0
NLF2	0,5	0,9
NLF3	0,5	0,8
NLF4	0,5	0,7
NLF5	0,5	0,6
NLF6	0,5	0,5
NLF7	0,5	0,4
NLF8	0,5	0,3
NLF9	0,5	0,2
NLF10	0,5	0,1
NLF11	0,5	0,05
L	1,5	-
M	-	1,5

Yüzde enkapsülleme verimi (%EE), santrifüj yöntemiyle belirlenmiştir. En iyi tutma kapasitesine sahip olan formülasyon fiziksel ve biyolojik karakterizasyon

çalışmalarında kullanılmıştır. Nanolipozom formülasyonlarının santrifüjde denge konumunu sağlamak için her biri 1,5 mL'ye kadar distile su (dH_2O) ile tamamlanmış (Çizelge 2.1) ve 5 ºC'de 18.000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Nanolipozomları içeren karışımın sediment kısmı etanol kullanılarak ayrıştırılmış ve parçalanmıştır. Daha sonra 1 mL etanol-lizize edilmiş nanolipozom solüsyonundan alınarak 340 nm dalga boyunda UV görünür spektrofotometre (VWR/UV-1600PC, Pensilvanya, Amerika Birleşik Devletleri) ile karşılaştırma yapılmıştır.

2.2.6 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntü analizi



Şekil 2.5: Enkapsülasyonu gözlemlemek için kullanılan SEM cihazı.

Nanolipozom ile enkapsüllenen menengiç yaprağı etanol ekstraktının (NLMYE) morfolojisi SEM (Zeiss Geminisem 300, Oberkochen, Almanya) cihazında (Şekil 2.5) 5kV artan voltajlı yüksek vakumda incelendi. İnceleme için NLMYE'den 5 µL alüminyum folyo üzerine damlatıldı. Kuruduktan sonra görüntü 1.49 x yakınlaştırma ile alındı.

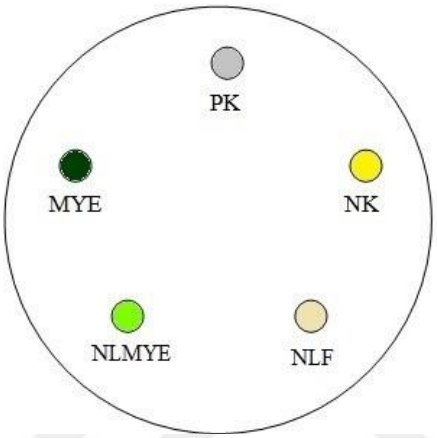
2.2.7 Antibakteriyel aktivite tayini

NLMYE'nin biyolojik karakterizasyonu disk difüzyon ve minimum inhibisyon testleriyle yapıldı.

2.2.7.1 Disk difüzyon testi

Bu yöntem NLMYE'nin mikroorganizma üzerinde ve antibiyotiğe göre etkili olup olmadığını saptamak için yapılmıştır. Antibakteriyal aktivite için gram (-) bakteri olarak; *E. coli* ATTC 25922 ve gram (+) bakteri olarak ise *S. aureus* ATTC 25923 öze yardımıyla çizgi ekim yöntemiyle nutrient agar üzerine stoklarından alınarak

ekilmiştir. Pozitif kontrol (PK) olarak ofloksasin disk kullanılmıştır. Negatif kontrol (NK) olarak ise boş disk üzerine 18 µL otoklavlanmış saf su konulmuştur. Antibakteriyal etkinliği gözlemlenmek istenen NLYME'nin yanında içeriğini oluşturan MYE ve NLF'de 18 µL olacak şekilde sırasıyla diğer boş diskler üzerine eklenmiştir (Şekil 2.6). Daha sonra besiyeri 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra diskler çevresinde oluşan inhibasyon zon çapları petri kablarının alt yüzeyinden cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Bu deney her bakteri için üç tekrarlı yapılarak, zonların aritmetik ortalamaları alınmıştır.



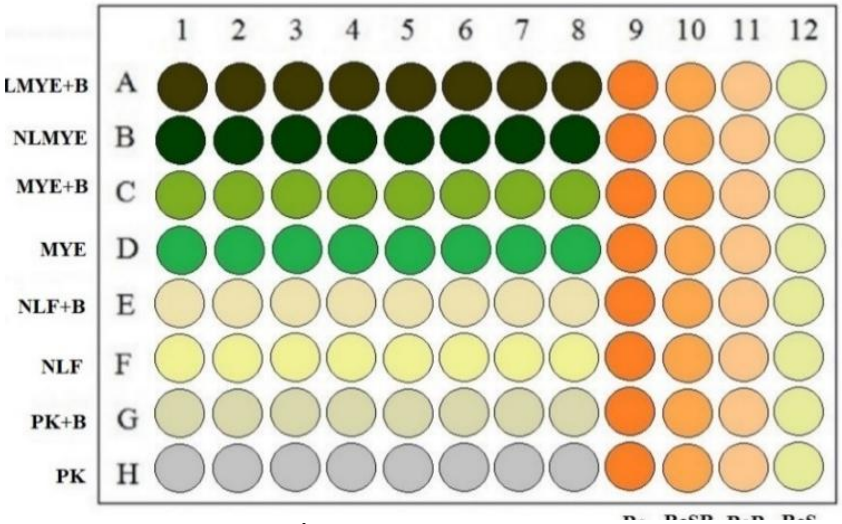
Şekil 2.6: Disk difüzyon testinin deneydeki uygulama gösterimi.

2.2.7.2 Minimum inhibisyon konsantrasyon testi

MYE, NLF ve NLMYE'nin minimum inhibisyon konsantrasyon testi yöntemi ile antibakteriyel etkinlikleri madde miktarlarına göre belirlenmiştir. Test için belirlenen bakteri suşları üzerinden (*E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923), minimum inhibisyon değerlerini belirlemeye yönelik yapılan mikro kuyucuk dilüsyon deneyi, bakterilerin 24 saatlik sıvı kültürleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bakteriler üzerinde antibakteriyal etkisi incelenmesi için test edilecek malzemenin mL'sine göre madde içeriğinin kuru ağırlık miktarı ölçülmüştür. Bu miktarın en yüksek konsantrasyonu baz alınmıştır.

Belirlenen konsantrasyondan itibaren seyreltme işlemi ile 8 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır (Şekil 2.7). 96 kuyucuklu mikro plaka üzerinde de kullanılacak her sıra için 1. kuyucuktan 9. kuyucuğa kadar 95 µL sıvı besiyeri eklenmiştir. Üzerine 9 farklı MYE konsantrasyonundan 100 µL eklenmiştir. 195 µL farklı konsantrasyonlarda ekstraktlı besiyeri bulunan kuyucukların her birinde $5x10^5$ kob bakteri olması için, 0,5 Mcfarland bulanıklığında makro dilüsyonu yapılmıştır. 24

saatlik kültürlerden 5 µL alınarak ve 2 farklı bakterinin MYE ile değerlendirilmesi için kullanılacak her bir sıraya eklenerek (en az 2 farklı sıra) kuyucuklar 200 µL'ye tamamlanmıştır. Aynı adımlar, 2 farklı bakteri için 9 farklı lipozom konstrasyonu ile; 1:1 (h/h) oranında 500 µL: 500 µL stok olarak hazırlanmış NLMYE'den 8 farklı konstrasyon ile hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak disk difüzyon testinde de kullanılan ofloksasin antibiyotiğinin sıvı solüsyonunun 9 farklı konstrasyonu kullanılmıştır. Kontaminasyon kontrolü olarak kullanılan her bir sıranın 10. kuyucuğu sadece 200 µL sıvı besiyeri ile doldurulmuş ve büyüme kontrolü olarak ise, kullanılan her bir sıranın 11. kuyucuğuna 195 µL sıvı besiyeri ve 5 µL bakteri kültürlerinden eklenmiştir. 12. kuyucuğu ise besiyeri ve su ile doldurulmuştur. Kuyucuklara her bir farklı madde eklenildiğinde maddelerin kuyucukların sadece bir kısmına tutunmasını engellemek ve dağılımını sağlamak için pipetaj yapılmıştır. 96-kuyucuklu mikro plaka 150 rpm'de 40 saniye mikro plaka çalkalayıcıda tutularak 24 saat boyunca 37ºC derecede etüvde inkübe edilmiştir. Antibakteriyal etkinliklerin bakterilerin üremesi üzerinden değerlendirilmesi için 24 saatin sonunda mikro plakalar 600 nm absorbans değerinde mikro plaka okuyucuda okutulmuştur (Biotek EPOCH microplate spectrophotometer, Vermont, Amerika Birleşik Devletleri). 12. kuyucuklar kör olarak belirlenmiştir. Mikro plaka okuyucuda elde edilen değerler sonucunda kör ve büyüme kontrolüne göre antibakteriyal maddelerin her bir konstrasyonunun etkinlik yüzdeleri ve bakteri gelişimini inhibe edici en düşük konsantrasyonları belirlenmiştir. Mikroplaka okuyucuda gelişimin olmadığı kuyucuklar ise minimum bakterisidal konstrasyonlar olarak kaydedilmiştir.



Şekil 2.7: MİK testinin uygulama gösterimi.

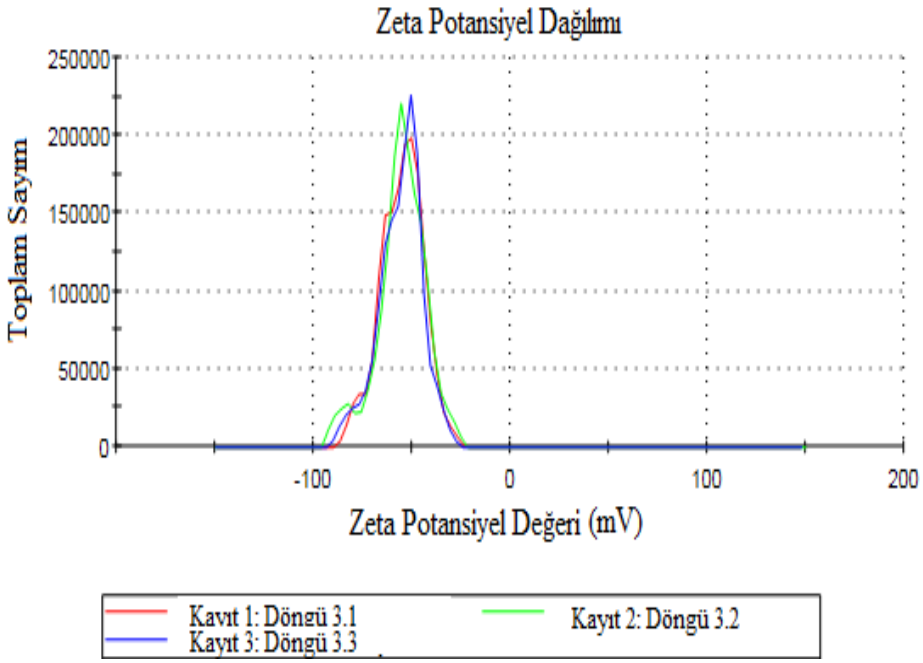
2.3 İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar R programlama dili kullanılarak analiz edilmiştir (R Studio Incorparation, 2009). Değerler arasındaki ilişkinin belirlenlenmesi ve modellenmesi için parametrik testlerden “Tek Yönlü Varyans” testine karşılık gelen Kruskal-wallis test kullanıldı.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Nanolipozomun Hazırlanması ve Karakterizasyonu

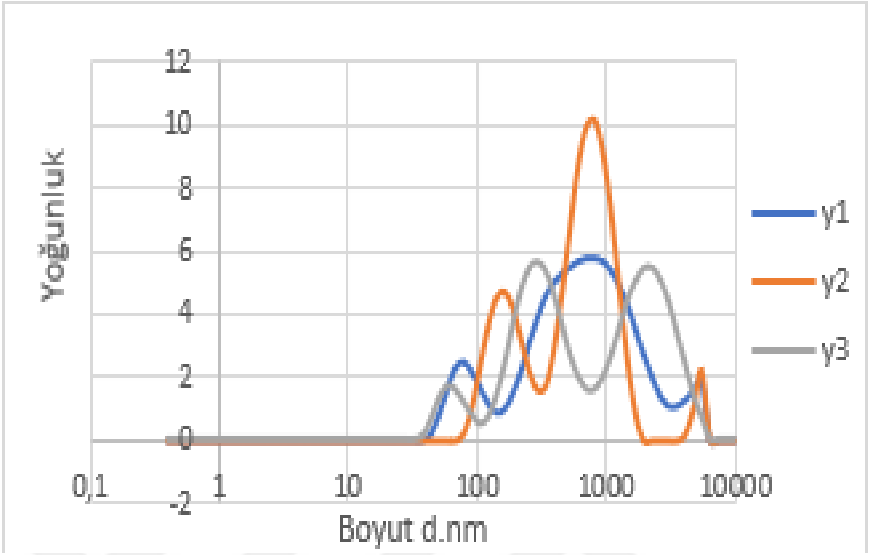
Bir ön işlem olarak da görülen yüksek şiddetli homojenizasyon tekniği ile hazırlanan ilk dispersiyonlarda oluşan lipozomlar zeta potansiyeline ve boyut dağılımına bakılarak daha büyük boyutta ve yüzey yüküne bağlı stabilite olarak farklı özellikler taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Zeta potansiyeli, boyut ve PDI parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan hesaplamalar 13321: 1996 E ve ISO 22412: 2008 ISO standart belgelerinde tanımlanmıştır.



Şekil 3.1: Direk uç sonikatör ile hazırlanan lipozomların zeta potansiyel grafiği.

Şekil 3.1'de toplam sayıma göre zeta potansiyeli grafiğine bakıldığında direk uç sonikatör elde edilen lipozom yüklerinin standart bir eğriye sahip olmadığı görülmektedir. Şekil 3.2 grafiğinde ayrıca mavi, yeşil ve kırmızı olarak ölçülen aynı ürünün üç ölçümünde zeta potansiyel yani lipozom yükü (mV) ortalama değeri (-) 55,0 mV olarak rapor edilmiştir. Zeta potansiyeli, dispersiyonların stabil olup olmadığını veya pratik bir zaman ölçeği içinde kümeleşmeye yönelik olup olmadığını belirlediğinden daha büyük zeta potansiyeline sahip dispersiyonlar

genellikle tercih edilir (Awad ve diğ., 2005). Zeta potansiyeli, (-)25 mV'den düşük bir değere ait olan lipozomlar saklama işlemleri süresince stabil olarak kalmamaktadır (Duman ve diğ., 2014). Bu nedenle direk uç sonikatörden üretilen lipozomal dispersiyonun saklama işlemleri için stabilitesi uygun bulunmuştur.



Şekil 3.2: Direk uç sonikatör ile hazırlanan lipozomların yoğunluğa göre boyut grafiği.

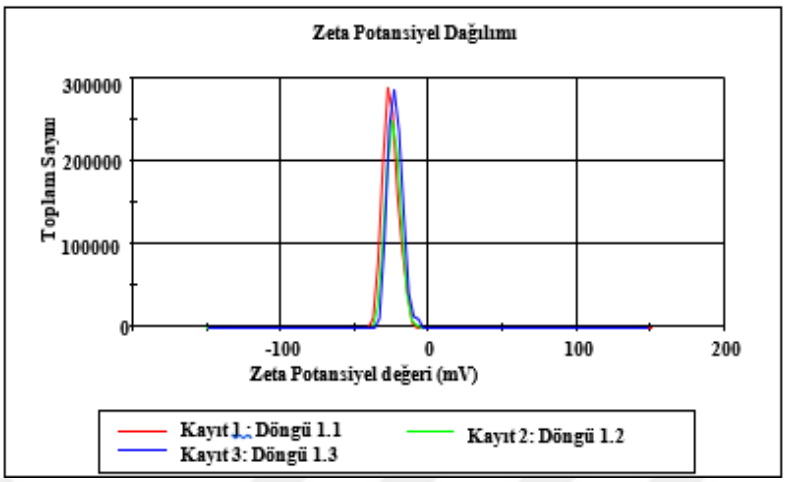
Kırmızı, mavi ve yeşil çizgiler direk uç sonikatör ile hazırlanan aynı ürünün boyut ölçümlerini göstermektedir. Kayıt 1, kayıt 2 ve kayıt 3'de sırasıyla 930,5, 540,7 ve 245,7 nm sahip olan ürünün ortalama boyut değeri ise 440,6 nm olarak ölçülmüştür.

Polidispersite indeksine bakıldığında ölçülen değer, eğer 0,7 nm'den büyük olursa, numunenin çok geniş bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu ve muhtemelen dinamik ışık saçma (DLS) tekniği ile analiz edilmeye uygun olmadığını göstermektedir. Eğer bu değer 0,05 nm değerinden küçük olursa, monodispers olarak adlandırılmaktadır. Bu tür sistemlerin aynı boyutta partiküllere sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, farklı boyut dağılım algoritmaları 0,05-0,7 nm PDI değeri arasına giren verilerle çalışır.

İlk homojenizasyon sonucu polidispersite indeksi (heterojenlik göstergesi) 0,626 olarak ölçülmüştür. Grafik ve polidispersite indeksi sonucu gösteriyor ki direk uç sonikatörden elde edilen lipozomların SUV, MUV ve LUV şeklinde farklı yapılarda çeşitleri bulunmaktadır.

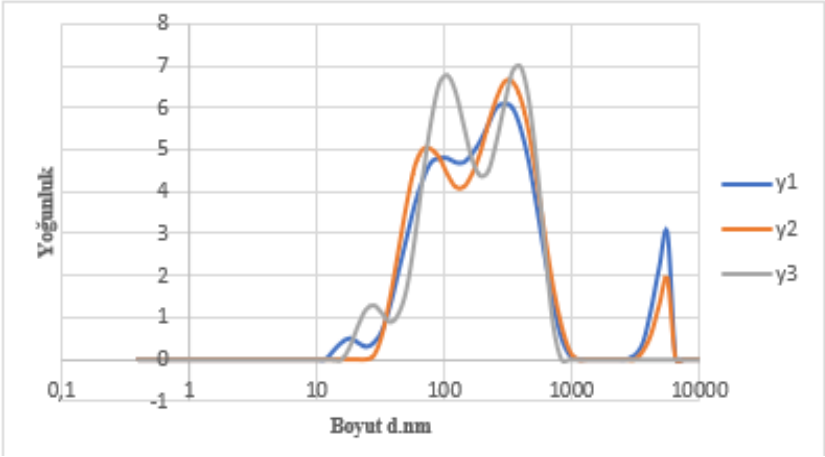
Nanolipozom elde etmek için ikinci homojenizasyon olarak yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği olan mikro akışkanlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bu

teknik ile nano boyutta ve belli bir fiziksel karakteristik yapıya sahip SUV'ler oluşmaktadır.



Şekil 3.3: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 1. döngü sonunda elde edilen lipozomların zeta potansiyel grafiği.

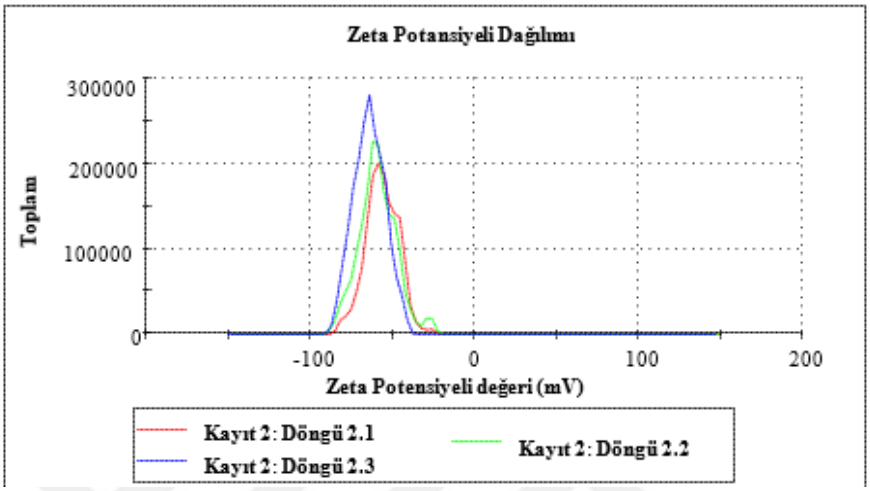
Şekil 3.3'de toplam sayıma göre zeta potansiyeli grafiğine bakıldığında mikro akışkanlaştırma tekniğinin 1. döngüsünden elde edilen lipozom yüklerinin standart bir eğriye sahip olmaya başladığı görülmektedir. Şekil 3.3 grafiğinde ayrıca mavi, yeşil ve kırmızı olarak gösterilen aynı ürünün üç ölçümünde zeta potansiyel yükü (mV) ortalama değeri (-)25,7 mV bulunmuştur. Zeta potansiyeli, (-)25 mV'den düşük bir değere ait olan 1. döngü lipozomal dispersiyonun saklama işlemleri için stabil olduğunu fakat daha iyi ürün stabilitesi için döngü sayısının arttırılması gerekmiştir.



Şekil 3.4: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan lipozomların 1. döngü aşamasındaki yoğunluğa göre boyut dağılımı.

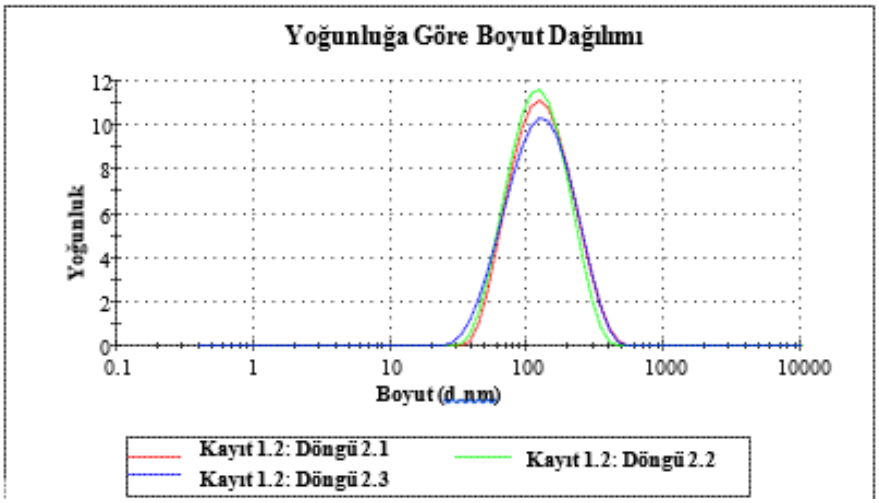
Şekil 3.4'de mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan lipozomların yoğunluğa göre boyut grafiği görülmektedir. Kırmızı, mavi ve yeşil çizgiler mikro akışkanlaştırma ile hazırlanan aynı ürünün diğer ölçümlerini göstermektedir. Kayıt 1,

kayıt 2 ve kayıt 3'de sırasıyla 307,1, 78,76 ve 4927 nm sahip olan ürünün ortalama boyut değeri ise 144,9 nm olarak ölçülmüştür. Polidispersite indeksi ise 0,671 nm olarak ölçülmüştür. Boyut dağılımı ve polidispersite indeksi sonuçlarına göre mikro akışkanlaştırma tekniği ile 1. döngüden elde edilen lipozomların SUV, MUV ve LUV şeklinde farklı yapılarda lipozom çeşitleri bulunmaktadır.



Şekil 3.5: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 2. döngü lipozomların toplam sayıma göre zeta potansiyeli grafiği.

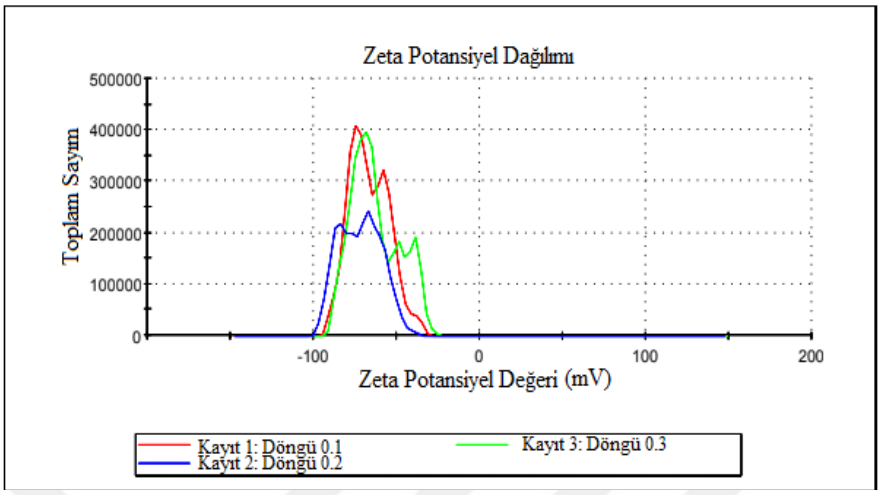
Şekil 3.5 grafiğinde mavi, yeşil ve kırmızı olarak gösterilen aynı ürünün zeta potansiyel yükü (mV) ortalama değeri (-)56,0 mV olarak ölçülmüştür. Buna göre 1. döngüde (-)25,7 mV olan zeta potansiyeli; 2. döngü sonunda (-)25 mV'den büyük bir değere ulaşması sağlanmıştır. Böylece stabil yapıda lipozomlar elde edilmiştir.



Şekil 3.6: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 2. döngü lipozomların yoğunluğa göre boyut grafiği.

Şekil 3.6'deki grafikte kırmızı, mavi ve yeşil çizgiler ile gösterilen lipozomun ortalama boyut değeri 107,0 nm olarak ölçülmüştür. Polidispersite indeksi ise 0,235

olarak bulunmuştur. 2. döngüde lipozom veziküllerinin boyutları nanoboyuta yaklaşmaya başlamıştır.

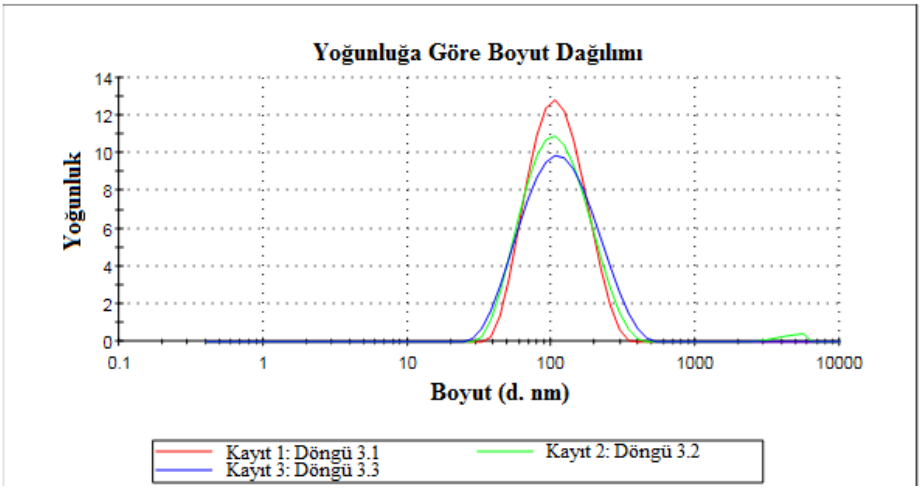


Şekil 3.7: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 3. döngü nanolipozomların toplam sayıma göre zeta potansiyeli grafiği.

Zeta potansiyeli hesaplanması özellikle dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında bilgi vermekte ve değerinin yüksek olması partiküller arasında elektriksel itme ile partikül agregasyonunun oluşma ihtimali azalmasını sağlamaktadır.

Şekil 3.7 grafiğinde mavi, yeşil ve kırmızı olarak gösterilen aynı ürünün üç zetapotansiyel yükü (mV) ortalama değeri (-)66,6 mV olarak ölçülmüştür.

Buna göre 2. döngüde (-)56,0 mV olan zeta potansiyeli; 3. döngü sonunda (-)66,6 mV'a gelmesi sağlarak daha stabil yapıda lipozomlar elde edilmiştir. Ayrıca, zeta potansiyel değeri daha düşük bir değere ulaşması sonucu sediment (topaklanma) oluşturmada daha karalı bir yapıya sahip lipozomlar ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3.8: Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanan 3. döngü nanolipozomların yoğunluğa göre boyut dağılım grafiği.

Parçacık çapı kayıt 1, kayıt 2 ve kayıt 3'de aynı anda aynı örnekten yapılan ölçümlerde ortalama olarak 91,13 nm olarak ölçülmüş, polidispersite indeksi 0,231 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlere bakıldığında mikro akışkanlaştırma yöntemi ile elde edilen nanolipozomlar direk uç sonikasyon tekniği ile elde edilen lipozomlara göre yapısal olarak daha düzenli ve kararlı olduğu gibi ayrıca nanoboyutta olduğu şekil 3.8'de yer alan grafikte de görülmektedir. Mikro akışkanlaştırma yöntemi ile oluşan lipozomlar yapısına göre SUV olarak bilinmektedir. Daha küçük boyutlarda lipozom üretiminin diğer bir önemi ise sedimantasyon oranı azalmasıdır (Wu ve diğ., 2011).

Literatüre bakıldığında ise; Jaafar-Maalej ve arkadaşlarının (2010) etanol enjeksiyonu yöntemiyle oluşturulan farklı yapılardaki lipozomların zeta potansiyeli (-)22 ila (-)30 mV arasında değiştiği raporlanmıştır. Ayrıca, parçacık boyutu dağılımına bakıldığında ise 82 ila 134 nm boyutları arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise Schneider ve arkadaşlarının (1994) ekstrüzyon yöntemi ile yaptığı çalışmada lipozomların zeta potansiyeli (-)53,7 ila (-)55 mV arasında değiştiği raporlanmıştır. Parçacık boyutu dağılımına bakıldığında ise 99 ila 107 nm boyutları arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise Poudel ve arkadaşlarının (2019) lipid hidrasyon yöntemi kullanılarak hazırladığı lipozomların zeta potansiyelinin (-)9,8 ila (-) 14 mV arasında değiştiği raporlanmıştır.

Parçacık boyutu dağılımına bakıldığında ise 186 ila 260 nm boyutları arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Bu tekniklerin fiziksel karakterizasyonları karşılaştırıldığında mikro akışkanlaştırma tekniğinin daha etkili olduğu görülmektedir. Bu çalışmada 3. döngü sonunda oluşturulan boş nanolipozom parçacıklarının zeta potansiyeli (ortalama olarak (-)66,6 mV ve boyut dağılım (ortalama olarak 91,13 nm) grafikleri incelendiğinde 2. homojenizasyon olan mikro akışkanlaştırıcıdan elde edilen lipozomların nanoboyuta geldiği ve polidispersite indeksine göre daha stabil olduğu gözlemlendi.

Elde edilen bütün lipozom ve nanolipozomların fiziksel karakterizasyonları çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu çizelgeye göre direk uç sonikatörü ve mikro akışkanlaştırma yöntemleri kullanılarak elde edilen lipozom ve nanolipozom yöntemlerinin lipozom yükü yani zeta potansiyeli, boyutu ve oluşturulan toplam lipozom ve nanolipozom

partiküllerinin heterojenlik dağılımı anlamına gelen polidispersite indeksinin (PDI) yapılan işlemlere göre değişimi görülmektedir.

Çizelge 3.1: Elde edilen lipozom ve nanolipozom partiküllerinin fiziksel karakterizasyon sonuçları.

Formülasyon	Zeta Potansiyeli (mV)	Ortalama Boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)
DUS	(-) 55,0	440,6	0,626
MAY (Döngü 1)	(-)25,7	144,9	0,671
MAY (Döngü 2)	(-)56,0	107,0	0,235
MAY (Döngü 3)	(-)66,6	91,13	0,231

DUS: Direk uç Sonikatörü, MAY: Mikro akışkanlaştırma Yöntemi

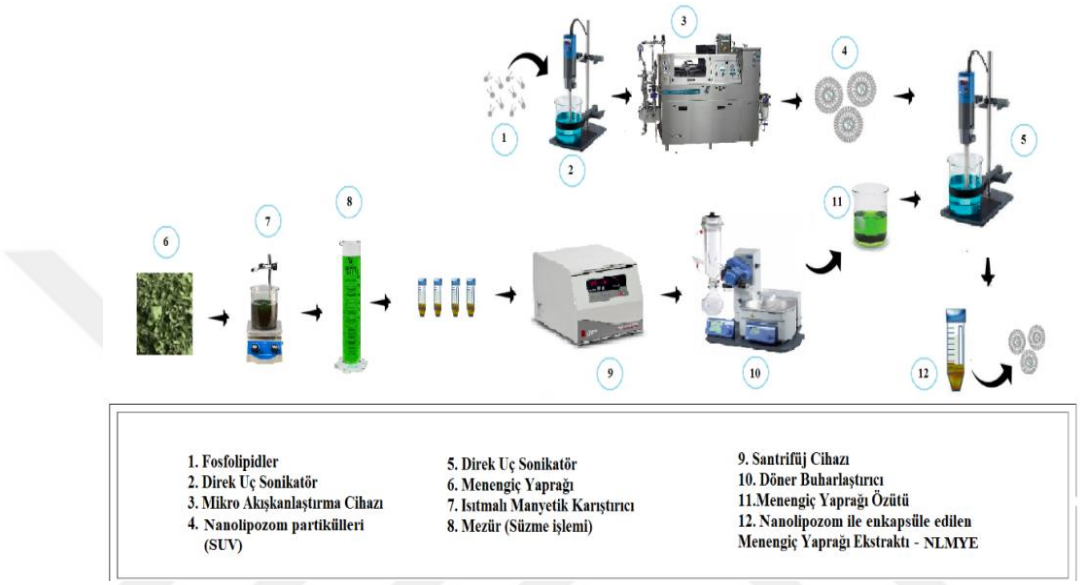
3.2 Menengiç (*P. terebinthus*) Bitkisinin Etanol Ekstraksiyonu

Başlangıçta 20 g menengiç yaprağından elde edilen etanol ekstraktının döner buharlaştırıcıda etanolünün uzaklaştırılması sonrası liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Liyofilize edildikten sonra toz haline getirilen MYE ağırlığı 5,7 g olarak tartıldı. Liyofilize işleminin kullanılmasındaki amaç; çalışmalarda kullanım için saklanan liyofilize MYE'lerin yapılarında bozulma olmamasıdır Ayrıca, hesaplamalarda MYE'nin ağırlık cinsinden miktarının verilerek kullanılması içindir.

3.3 Nanolipozom ile Enkapsüle Menengiç (*P. terebinthus*) Yaprağı Etanol Ekstraktının Karakterizasyonu

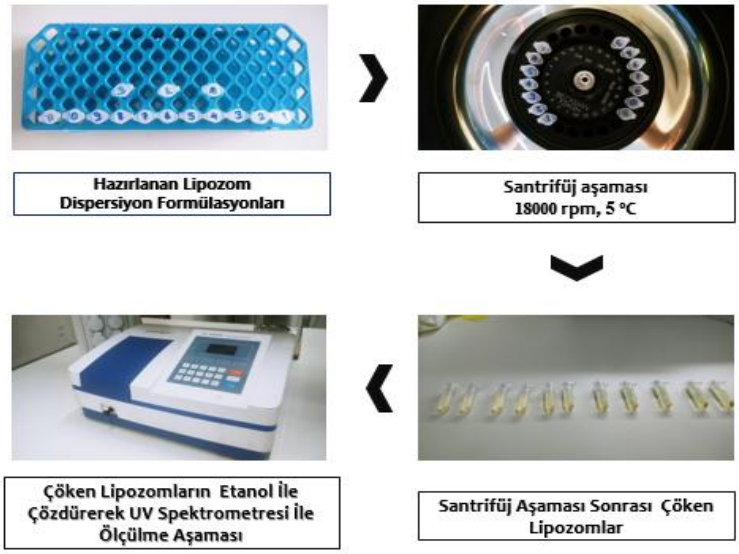
Bu çalışmada hazırlanan MYE'nin nanolipozom ile enkapsülasyonu şekil 3.9'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Liyofilize MYE'nin esas çözücüsü olan etanol yerine su ile çözündürülmüştür. Bu işlem nanolipozomal formülasyonun çözücüsünün su olmasından dolayı yapılmıştır. Ayrıca, antibakteriyal etkinlik testlerinde farklı bir kimyasaldan kaynaklı etkinin ortaya çıkması da önlemiştir. Toz haline getirilen menengiç yaprağının etanol ekstraktından alınan 1,0 g 50 mL otoklavlanmış su içerisine eklendikten sonra, 1,5 saat boyunca karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlanmıştır. Sonuçta çöken maddelerin ayrıştırılması için 4500 rpm'de 26 ^{o}C'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve tortularından ayrıştırılmıştır. MYE'nin esas çözücüsü su olmadığı için ilk eklenen 1,0 g MYE miktarının sadece bir kısmı çözünmüştür. Çözünen kısmın ağırlığının hesaplamak için, başlangıçtaki

toz haldeki MYE'den santrifüj sonrası su içinde çökelti oluşturan MYE miktarı çıkarılarak elde edilmiştir. Sonuç olarak, 50 mL saf su içerisinde çözünen madde miktarı 0,19 g olarak bulunmuştur. Enkapsülasyon için 1g/100 mL saf su ile hazırlanan nanolipozom ile MYE enkapsülasyon verim analizi sonucuna göre seçilen miktarlarda birleştirilmiştir. Bu oranlarda enkapsüllenme verimi en yüksek olan lipozom formülasyonun karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.9: Menengiç (*Pistacia terebinthus*) yaprağı etanol ekstraktının nanolipozom ile enkapsülasyonun şematik gösterimi.

Enkapsülleme verimi; lipozomların çift tabakası arasında tuzaklanan lipofilik herhangi bir maddeyi salmak/çıkarmak ve lipozomal çift tabakayı parçalayan organik çözücüler kullanılarak belirlenmektedir. Çift katmanlı tabaka, organik çözücüler ve deterjanlar varlığında çözülmektedir. Bununla birlikte, tüm organik çözücüler ve deterjanlar, lipidleri aynı verimlilikte çözmemektedir. Çalışmaların çoğunda, lipid çözücü olarak metanol, izopropanol, Triton-X 100, Tween-20 gibi çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kalan izopropanol, Triton-X 100 veya Tween-20 gibi lipid çözücü maddelerin içeriği hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Sadece az sayıda çalışma daha az toksik alternatif olarak etanol kullanımını araştırılmasının gerektiğinden bahsedilmektedir (Carugo ve diğ., 2016; Demircan, 2016). Bu çalışmada daha az toksik olduğu için lipid çözücü olarak etanol tercih edilmiştir. Elde edilen etanol ekstraktının lipozom ile enkapsülasyonu sağlandıkdan sonra enkapsülasyon verimliliğini hesaplamak için lipozom lipid çift katmanlı yapısı etanol ile çözdürüldü. Ardından UV görünür spektrofotometre ile analiz gerçekleştirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: NLMYE'nin enkapsülasyon verimi şematik gösterimi.

Çizelge 3.2 de gösterildiği gibi lipozom enkapsülasyon verimi hesaplanarak ve en yüksek değer %91,90 olarak rapor edilmiştir Belli bir orandan sonra veriminin düşüşe geçmesinin temel nedeni ise topaklanma ve lipozom yapısındaki bozulmadan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

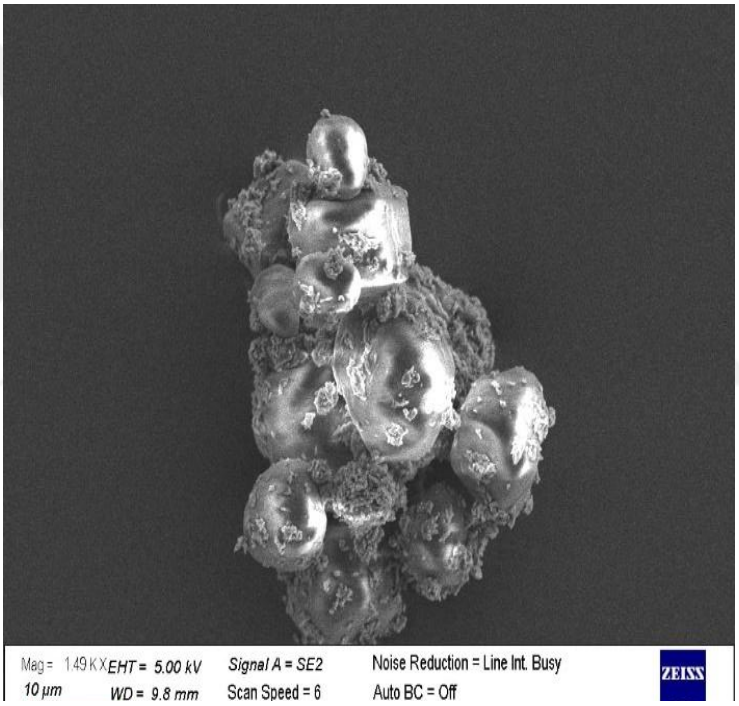
Çizelge 3.2: Hazırlanan formülasyonların absorbans ve enkapsülasyon verimi.

Nanolipozom Formülasyonu	Absorbans Miktarı (nm)	Enkapsülasyon Verimi (%)
NLF1	2,280	77,24
NLF2	2,713	91,90
NLF3	2,475	83,84
NLF4	2,238	75,81
NLF5	2,520	85,37
NLF6	2,319	78,56
NLF7	1,941	65,75
NLF8	1,525	51,66
NLF9	1,488	50,41
NLF10	1,441	48,81
NLF11	1,417	48,00

Bu teknikle hazırlanan formülasyonda en yüksek değere sahip oran olan NLF2 formülasyonu (0,9 ml MYE + 0,5 NL+ 0,1 dH_2O) morfolojik karakterizasyonu ve

antibakteriyal aktivite belirlemek için kullanılmıştır. Ayrıca, seçilen nanolipozom formülasyonuna (NLF2) göre enkapsüllenen madde miktarına bakıldığında 1,5 mL de enkapsüllenen menengiç yaprağı miktarı 3,14 mg olarak hesaplanılmıştır.

Elde edilen formülasyon morfolojik karakterizasyon için kullanılmış ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. NLMYE parçacıklarının boyutları SEM görüntüsü üzerinden imageJ programı ile 130 ile 340 nm arasında ölçüldü. Başlangıçtaki nanolipozomlara (91,13 nm) göre lipozom parçacıkları arasındaki boyut farkına bakıldığında nanolipozomun MYE ile enkapsülasyon sonrası boyutlarının büyüdüğü gözlemlendi. Şekil 3.11'da SEM kullanılarak elde edilen NLMYE gösterilmektedir.



Şekil 3.11: Nanolipozom ile enkapsüllenen *Pistacia terebinthus* yaprağı etanol ekstraktının SEM görüntüsü.

3.4 Antibakteriyel Aktivite Tayini

Bu kısımda kullanılan yöntemler, nanolipozom, MYE ve nanolipozom ile enkapsüle edilen MYE'nin (NLMYE) biyolojik karakterizasyonu için yapılmıştır.

3.4.1 Disk difüzyon testi

Disk difüzyon için kullanılan miktarlar daha önce hazırlanan çözeltilerden hesaplanarak ortaya çıkarıldı. Buna göre, disk difüzyon testi için kullanılan 18 µL hacimde alınan MYE, NLF ve NLMYE içerik miktarları yapılan hesaplamaya göre

şu şekildedir. Disk difüzyon yöntemi için mikropipetör yardımıyla alınan 18 µL ekstraktın içerisinde 68,4 µg MYE olduğu hesaplanmıştır. Enkapsülasyon için 1g liyofilize lipozom üzerine 100 mL saf su eklenerek hazırlanan lipozom dispersiyonundan disk difüzyon için alınan 18 µL NLF içinde çözünen lipozom miktarı ise 180 µg olarak hesaplanmıştır. NLMYE için ise öncelikle nanolipozom ve MYE arasında belli oranlarda karışım oluşturuldu. Enkapsüllenme verimi yöntemi kullanılarak en yüksek kaplamaya sahip formülasyon ortaya çıkarıldı ve seçilen NLF2 ile hazırlanan NLMYE içinden alınan 18 µL çözeltiye göre tekrar hesaplandı. Buna göre enkapsüllenen MYE miktarı ise 37,7 µg olarak hesaplanıldı. Çizelge 3.3'de ve Şekil 3.12'de gösterildiği gibi, nanolipozom ile enkapsüle olan ve olmayan menengiç yaprağı etanol ekstraktının ve nanolipozom dispersiyonunun özellikle gıda kaynaklı *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyal aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçta MYE ile NLMYE'nin bakteri popülasyonları üzerinde antibakteriyel etkinliğinin önemli oranda ($P<0,05$) artışı gözlemlenmiştir. Buradaki önemli nokta ise etken madde olan MYE ile MYE'nin %50 daha az oranda olduğu NLMYE'nin sonuçlarının birbirine çok yakın çıkmasıdır. Bu sonuçlar; nanolipozom ile enkapsülasyonda etken madde miktarı oranının azalmasının aktiviteyi azaltmadığı tam tersine arttırdığını göstermektedir.

Çizelge 3.3: Disk difüzyon testi ile antibakteriyal aktivite karşılaştırmaları.

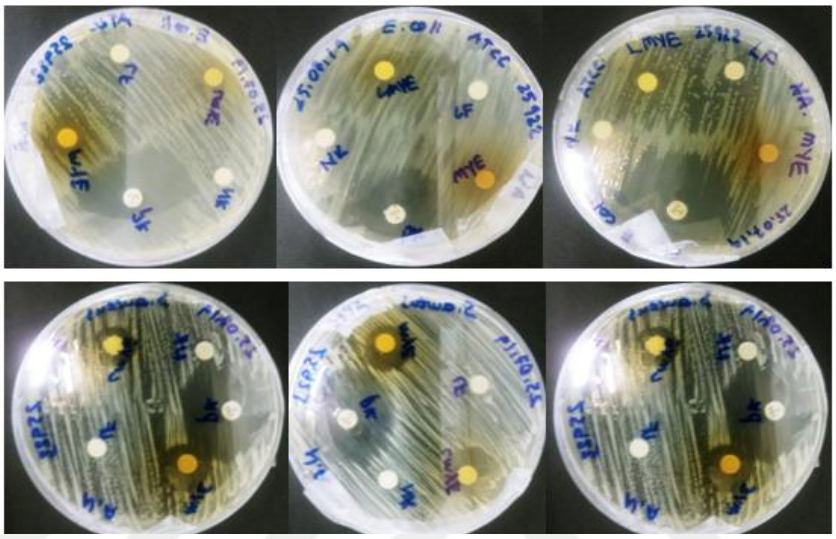
Bakteri Türü	Saat	Zon Çapları (mm)				
		NLMYE	MYE	NLF	PK	NK
E. coli	16	10,67 ±3,21^{a}	9,3 ±0,58^{b}	GG	38,01 ±1,00^{ac}	GG
	24	11,67 ±2,51^{a}	9,3 ±0,58^{b}	GG	38,67 ±1,15^{c}	GG
	48	12,67 ±2,08^{a}	11,01 ±0,00^{b}	GG	39,01 ±1,00^{c}	GG
S. aureus	16	15,01 ±2,00^{a}	16,67 ±1,15^{b}	GG	31,33 ±1,52^{c}	GG
	24	1567 ±2,52,^{a}	16,67 ±1,15^{b}	GG	33,33 ±0,00^{c}	GG
	48	17,01 ±2,65^{a}	18,01 ±1,00^{b}	GG	33,33 ±0,58^{c}	GG

NLMYE: Menengiç yaprağı ekstraktının nanolipozom ile enkapsülasyonu; MYE: Menengiç yaprağı ekstraktı; NLF: Nanolipozom formülasyonu; PK: Pozitif kontrol (Ofloksasin); NK: Negatif kontrol (UV saf su); GG: mikrobiyal gelişim gözlemlenmediğini; a-c: Aynı satırdaki birbirinden farklı olan küçük harfler, veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark ($P<0,05$) olduğunu göstermektedir

Ekstrakt içermeyen nanolipozom dispersiyonunun antimikrobiyal etkinlik göstermediği görülmüştür. Nanolipozom ile enkapsüle olan ve olmayan MYE'nin,

pozitif olarak kullanılan Ofloksasin ile karşılaştırıldığında MYE'nin ve NLMYE'nin antibakteriyal maddeye göre daha az etkili olduğu görülmektedir.

Antibakteriyal aktivite olarak elde edilen sonuçların, Doğan'ın (2016) ortaya koyduğu tez çalışmasında kullanılan menengiç ve bazı bitkilerin farklı ekstraktlarının (Su, etanol ve metanol) bakteri ve mayalar üzerinde antibakteriyal ve antifungal etkilerini inceledikleri araştıma sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

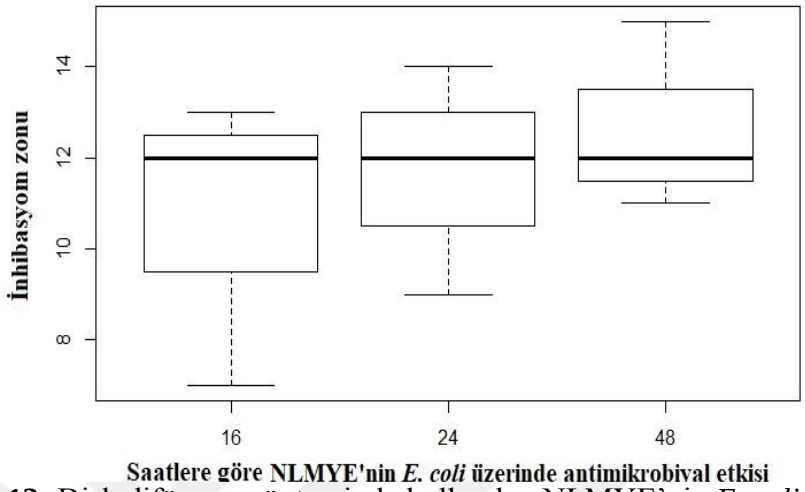


Şekil 3.12: Disk difüzyon testi ile *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinde gözlemlenen inhibisyon zonları.

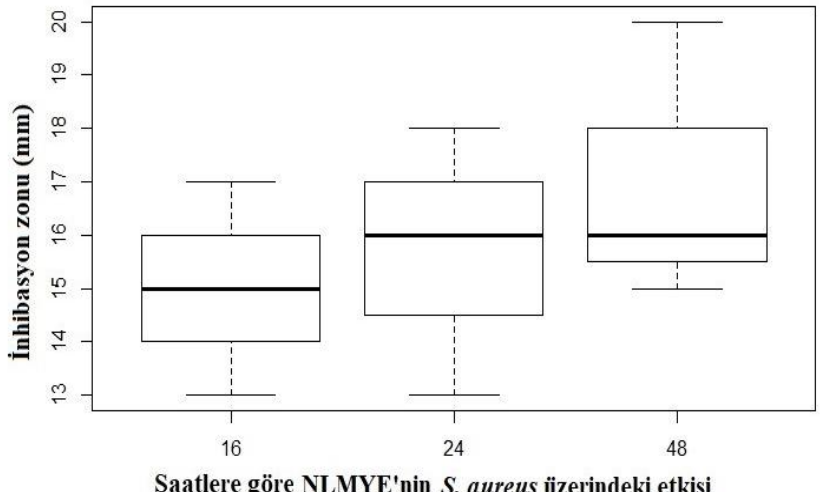
Şekil 3.13 ve şekil 3.14'de disk difüzyon yönteminde kullanılan NLMYE'nin *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyal aktivitelerinin saatlere göre karşılaştırmalı analiz grafiği gösterilmektedir. Test grupları Kruskal-Wallis rank sum test kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

16, 24 ve 48 saat için oluşturulan test gruplarında *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri için nanolipozomlu ekstrakt ve ekstakt gruplarının aynı grup olduğu gözlendi ($p>0,05$). Bu gruplarda yalnızca ekstraktın yapacağı etki göz önünde bulundurulduğunda nanolipozomla enkapsüle kullanımında da aynı oranda etki sağlanabileceği görüldü. Antibakteriyal aktivite için ekstrakt yerine nanolipozom enkapsüle ekstrakt kullanıldığında ayrıca; kontrollü etkileşim, absorbsiyon, biyouyumluluk gibi temel faktörler bakımından da katkı sağlanmıştır. Kontrol grupları ile birlikte değerlendirildiğinde ise gruplar arasında sadece 16.saatte *S. aureus*'ta, 24.saatte ve 48.saatte *E. coli*'de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuca göre; sadece bu grupların pozitif kontrol grubu ofloksasin'den farklı olduğunu, pozitif kontrol grubuna göre daha az etki gösterdiğini ama bunun dışında

kalan gruplar için pozitif kontrol gruplarının etkisinin yakalanabildiğini göstermektedir. Bakteri grupları bakımından da *S. aureus*'da daha fazla antibakteriyal etki sağlandığı gözlendi. En yüksek etkinin ise; her iki bakteri grubu içinde 48.saatte sağlandığı belirlenmiştir.



Şekil 3.13: Disk difüzyon yönteminde kullanılan NLMYE'nin *E. coli* üzerinde antibakteriyal aktivitelerinin saatlere göre R programlama ile karşılaştırmalı analiz grafiği.



Şekil 3.14: Disk difüzyon yönteminde kullanılan NLMYE'nin *S. aureus* üzerinde antibakteriyal aktivitelerinin saatlere göre R programlama ile karşılaştırmalı analiz grafiği.

3.4.2 Minimum inhibasyon konsantrasyon testi

Disk difüzyon testi sonrasında test materyallerinin mikro kuyucuk dilüsyon yöntemiyle MİK değerleri tayin edilmiştir. NLMYE, MYE, NLF ve oflaksasin (PK: pozitif kontrol) için 100-0,781 µL/ml değer aralığında 8 seyreltme yapılmıştır. Her bir bakteri üzerine antibakteriyal etki gösteren test numunelerinin MİK değerlerine

ait sonuçlar çizelge 3.4'de sunulmuştur. Bu grafikten de anlaşıldığı gibi *S. aureus* üzerinde NLMYE ve MYE'nin antibakteriyal aktivitesi daha yüksektir.

24 saatlik inkübasyondan sonra %90-100 aralığında inhibitör etki gösteren NLMYE için minimum değer, *E. coli* için 0,114 mg ve *S. aureus* için 0,0838 mg olarak raporlanmıştır. Bu değerlerin gözlemlendiği kuyucuklardaki NLMYE içinde enkapsüllenen MYE miktarları ayrı ayrı hesaplanılmıştır. *E. coli* için enkapsüllenen menengiç yaprağı miktarı 2,69 µg iken; *S. aureus* için 3,77 µg olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, MYE için minimum değer, *E. coli* için 0,152 mg ve *S. aureus* için 0,228 mg olarak raporlanmıştır. Sonuçlar, Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2000) tarafından onaylanan standartlarla birlikte broth seyreltme yöntemi ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.4: *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde etkili test numunelerine ait MİK değerleri.

Bakteri Türü	Test Numuneleri	MİK (mg)
E. coli	MYE	0,152
E. coli	NLMYE	0,114
S. aureus	MYE	0,228
S. aureus	NLMYE	0,0838

NLMYE: Menengiç yaprağı ekstraktının nanolipozom ile enkapsülasyonu; MYE: Menengiç yaprağı ekstraktı; NLF: Nanolipozom formülasyonu

E. coli; gram (-) bakteri ve bir lipopolisakkarit dış zarına sahip olduğundan, moleküllerin transferi hücre zarından porinler ile gerçekleştirilir. Gram (-) organizmada antibakteriyal direnç, sıklıkla dış membran porinindeki değişiklikler yoluyla olur. Antibakteriyal ajanın dış plazma zarına nüfuz etme ve etki alanına ulaşma yeteneğini önemli ölçüde azaltır. Bu durum göz önüne alındığında, moleküllerin kanallardan geçebilme kabiliyetleri, boyut ve şekillerinden etkilenmesiyle; MYE'de bulunan flavonoidler muhtemelen hücre zarından geçememiştir. MBK değerinin gözlemlenmemesinin nedeni ise deney düzeneğinde kullanılan konsantrasyonların daha geniş bir aralıkta olmamasıdır.

Antibakteriyal analizler karşılaştırıldığında, enkapsüle edilmemiş MYE ve NLMYE, gram (-) bakterilere kıyasla gram (+) bakteriler üzerinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Kavak ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada bunu destekler

niteliktedir. Yapılan çalışmaya göre, menengiç bitkisi yaprağının etanol ekstresi, *S. aureus*'a karşı antibakteriyal aktivite göstermiştir. Diğer yandan, ham ekstrenin *E. coli* üzerinde antibakteriyal etkisi olmamıştır. Yapılan diğer bir çalışma da ise Sinaplı (2010) menengiç bitkisi yaprağının su ekstresi *E. coli, S. aureus, Klebsiella pneumoniae, Listeria monocytogenes* gibi bakterilere karşı hiçbir zon oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sonuç olarak, farmösotik açıdan bitkisel ilaç taşıyıcısı olarak nanolipozomun etken madde miktarı kullanımını azaltması yönüyle daha ekonomik olması aynı zamanda etken maddenin antimikrobiyal özelliklerini negatif yönde etkilemeden kullanılabileceği gözlemlenmiştir.

Nanolipozom veya mikron altı çift katmanlı lipid vezikül, biyoaktif ajanların kapsüllenmesi ve iletilmesi için literatürdeki birçok çalışma ile desteklenen bir teknolojidir. Biyouyumlulukları ve biyobozunurlukları nedeniyle, nanosifikasyonları ile birlikte nanolipozomlar, kozmetik, gıda teknolojisi ve tarım gibi geniş bir alanda potansiyel uygulamalara sahiptir. Nanolipozomlar, çözünebilirliklerini ve biyoyararlanımlarını, *in vitro* ve *in vivo* stabilitelerini geliştirmenin yanı sıra, diğer moleküller ile istenmeyen etkileşimlerini önleyerek, biyoaktif maddelerin performansını artırabilir.

Bu çalışma ile nanolipozomların yapısı, kullanımının sağladığı avantajlar, oluşturma metotları, karakterizasyonu, stabilite sorunları ortaya konulmuştur. Ayrıca, mikro akışkanlaştırma tekniği kullanılarak verimli bir şekilde üretilebileceğini göstermiştir. Üretilen nanolipozomlar fiziksel olarak diğer yöntemlere göre daha stabil olduğu gözlenmiştir. Özellikle tortu oluşturulmamasına karşı lipozomun zeta potansiyeli ve nanolipozom boyut dağılımına bakıldığında oluşturulan boyutun (91,13 nm) ve lipozom yükünün (-66,6 mV) stabil olduğu görülmektedir.

Ayrıca biyolojik karakterizasyon olarak antibakteriyal aktivite ile elde edilen sonuçlara bakıldığında nanolipozom ile enkapsüle edilen etanol ekstraktı ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar, nanolipozom ile enkapsülleme yönteminin özellikle biyoaktif maddelerin etkisini daha uzun bir zamana yayabileceğini ortaya çıkarmaktadırkoymaktadır. Ayrıca, enkapsüllenen MYE ile enkapsüllenmeyen MYE arasında kıyaslandığında özellikle bakteriler üzerinde yakın etkiye sahip olması, fakat enkapsüllenen ürünün daha az miktarda olması nanolipozomların biyoyararlılıklarının göstergesidir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: Miktarına göre MYE ve NLMYE'nin bakteriler üzerinde etkisi.

Tür	MYE Miktarı	Bakteriler	
		E. coli	*S. aureus*
MYE	68,4 µg	11,01 ±0,00[b]	18,01 ±1,00[b]
NLMYE	37,7 µg	12,67 ±2,08[a]	17,01 ±2,65[a]

Bu araştırmanın sonuçlarına bakılarak, benzer bilimsel araştırmaların ortaya çıkması açısından önerilerimiz:

- Menengiç bitkisi ve diğer bitkilerden elde edilecek farklı ekstrelerin ortam şartlarından korunması için nanolipozom ile enkapsülasyon çalışmasının yapılması sayesinde farklı şartlarda ve alanlarda çok daha az miktarları kullanılarak uygulanmalarının imkânı olacaktır.
- Genellikle bitki ekstraktları farklı kimyasallar içerisinde daha iyi çözünmektedir. Nanolipozomun su içerisinde hazırlanması ve farmasötik alanlarda kullanımda su çözücüsünün daha çok tercih edilmesi bitki ekstraktları ile enkapsülasyonu zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda da görüldüğü gibi etanol içerisinde elde edilen MYE suda çözündürüldüğünde madde miktarı açısından kayıp yaşanmaktadır. Ancak buna rağmen çok az miktarda antimikrobiyal etkinlik gözlenmiştir. Enkapsülasyon sonucu etken madde kaybının yaşanmaması için süper kritik akışkanlar gibi farklı teknikler ile ekstraksiyonlar elde edilip yeniden araştırma yapılmalıdır.
- Bu çalışma, nanolipozomun diğer karakterizasyon (fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak) teknikleri kullanılarak genişletilebilir. Bu şekilde elde edilen nanolipozomun özellikleri daha detaylı tanımlanırken, ayrıca diğer çalışmalar için farklı lipozom dispersiyonları geliştirilebilir.
- Bu araştırmada nanolipozomların enkapsüle edilen menengiç bitkisinin *S. aureus'a* karşı aktivitesini etkilemediğini ve kontrollü salınım yapması sebebiyle aktivitenin uzun sürede ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Nanolipozomların, biyolojik karakterizasyonun daha kapsamlı belirlenmesi için sitotoksik çalışmalar ile toksisitesininde araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abra, R. M., & Hunt, C. A. (1981). Liposome disposition *in vivo*: III. Dose and vesicle-size effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 666(3), 493-503.

Abu-Izza, K. A., Garcia-Contreras, L., & Lu, D. R. (1996). Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres: optimization of the release characteristics using response surface methodology. *Journal of pharmaceutical sciences*, 85(2), 144-149.

Akashi, K. I., Miyata, H., Itoh, H., & Kinosita Jr, K. (1996). Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophysical journal*, 71(6), 3242-3250.

Alpes, H., Allmann, K., Plattner, H., Reichert, J., Rick, R., & Schulz, S. (1986). Formation of large unilamellar vesicles using alkyl maltoside detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 862(2), 294-302.

Andrade, B., Song, Z., Li, J., Zimmerman, S. C., Cheng, J., Moore, J. S., ... & Katz, J. S. (2015). New frontiers for encapsulation in the chemical industry. *ACS applied materials & interfaces*, 7(12), 6359-6368.

Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.

Armengol, X., & Estelrich, J. (1995). Physical stability of different liposome compositions obtained by extrusion method. *Journal of microencapsulation*, 12(5), 525-535.

Awad, D., Tabod, I., Lutz, S., Wessolowski, H., & Gabel, D. (2005). Interaction of Na2B12H11SH with liposomes: Influence on zeta potential and particle size. *Journal of organometallic chemistry*, 690(11), 2732-2735..

Barenholzt, Y., & Amselem, S. (1979). A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes)-french press. *FEBS letters*, 99(1), 210-214.

Barnadas, R. R., & Sabés, X. M. (2003). Liposomes prepared by high-pressure homogenizers. *Methods in enzymology*, 367, 28.

Baytop, T. (1984). *Therapy with medicinal plants in Turkey*. Istanbul, CA.: Faculty of Pharmacy Pub.

Biltonen, R. L., & Lichtenberg, D. (1993). The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and physics of lipids*, 64(1-3), 129-142.

Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. H., Shams-Ardekani, M. R., & Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera, P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk, and P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2013.

Bozkır, A. ve Koçyiğit, S. (1995) Lipozomların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi: *An Investigation of Physical and Chemical Stabilities on Liposomes*.

Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R., & Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Pharm Biomed Sci*, 5(27), 1-9.

Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E., & Nastruzzi, C. (2016). Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific reports*, 6, 25876.

Couvreur, P., Dubernet, C., & Puisieux, F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 41(1), 2-13.

Çağal M. M., Duman G., Kalaycı S., Yılmaz A., Macit M., Şahin F. (2018). The Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Satureja hortensis* Incorporated with Nanoliposome Prepared by Dynamic High-Pressure Microfluidization. *Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress*. Antalya, Türkiye

Çoban, E. P., Biyik, H., Törün, B., & Yaman, F. (2017). Evaluation the antimicrobial effects of *Pistacia terebinthus* L. and *Papaver rhoeas* L. extracts against some pathogen microorganisms. *Indian J Pharm Education Research*, 51(3), 377-80.

Dag, D., & Oztop, M. H. (2017). Formation and characterization of green tea extract loaded liposomes. *Journal of food science*, 82(2), 463-470.

Daemen, T., Hofstede, G., Ten Kate, M. T., Bakker-Woudenberg, I. A., & Scherphof, G. L. (1995). Liposomal doxorubicin-induced toxicity: Depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. *International journal of cancer*, 61(5), 716-721.

Demirbaş, G. (2012). *Liposomal incorporation of Satureja hortensis* L. *essential oil and in vitro antimicrobial activity on oral microorganisms* (Doktora tezi). Yeditepe University, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Demircan, E. (2016). *Elma Kabuklarından Elde Edilen Fenolik Bileşiklerin Lipozom İle Enkapsülasyonu* (Doktora tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R., & Van Deenen, L. L. M. (1972). The effect of sterol structure on the permeability of lipomes to glucose, glycerol and Rb+. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 255(1), 321-330.

Doğan, C. (2016). Determination of Menengiç and some nuts husk's antimicrobial and antioxcidant properties and use in fruit yogurt productions, *Doctoral dissertation*.

Doğan, C., Çelik, Ş., & Doğan, N. (2017). Siirt Bölgesi Melengiçlerin Toplam Fenolik Madde Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(3), 293-298.

Duman, G., Aslan, İ., Yekta Özer, A., İnanç, İ., & Taralp, A. (2014). Liposome, gel and lipogelosome formulations containing sodium hyaluronate. *Journal of liposome research*, 24(4), 259-269.

Du Plessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., & Müller, D. G. (1994). The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 103(3), 277-282.

Dua, J. S., Rana, A. C., & Bhandari, A. K. (2012). Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*, 3(2), 14-20.

Duke, J. A. (2002). *CRC handbook of medicinal spices*. Florida. CA.: CRC press.

Duru, M. E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., & Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74(1), 170-176.

Düzgüneş, N., & Gregoriadis, G. (2005). Introduction: the origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham. *In Methods in Enzymology*, 391, (1-3).

Egerdie, B., & Singer, M. (1982). Morphology of gel state phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine liposomes: a negative stain electron microscopic study. *Chemistry and Physics of lipids*, 31(1), 75-85.

Eloy, J. O., de Souza, M. C., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J.M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363.

Fresta, M., Spadaro, A., Cerniglia, G., Ropero, I. M., Puglisi, G., & Furneri, P. M. (1995). Intracellular accumulation of ofloxacin-loaded liposomes in human synovial fibroblasts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1372-1375.

Gibbs F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C.N., B. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 50(3), 213-224.

Gortzi, O., Athanasiadis, V., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2014). Study of antioxidant and antimicrobial activity of chios mastic gum fractions (neutral, acidic) before and after encapsulation in liposomes. *Journal of Food Processing & Technology*, 5(8), 1.

Gökmen, S., Palamutoğlu, R., Sarıçoban, C. (2012). Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları. *Electronic Journal of Food Technologies*, 7(1), 36-50.

Gustafsson, J., Arvidson, G., Karlsson, G., & Almgren, M. (1995). Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1235(2), 305-312.

He, Z., & Alexandridis, P. (2017). Ionic liquid and nanoparticle hybrid systems: Emerging applications. *Advances in colloid and interface science*, 244, 54-70.

Himanshu, A., Sitasharan, P., & Singhai, A. K. (2011). Liposomes as drug carriers. *IJPLS*, 2(7), 945-951.

Hossain, M. I., Udoh, A., Grabicka, B. E., Walton, K. S., Ritchie, S. M., & Glover, T. G. (2018). Membrane-coated UiO-66 MOF adsorbents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(3), 1352-1362.

Hughes, G. A. (2017). Nanostructure-mediated drug delivery. *InNanomedicine in Cancer*, 47-72.

Hunter, D. G., & Frisken, B. J. (1998). Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophysical journal*, 74(6), 2996-3002.

Hunter, R. J. (2001). *Foundations of colloid science*. Oxford, CA.: Oxford university press.

Hayward, R. C., Utada, A. S., Dan, N., & Weitz, D. A. (2006). Dewetting instability during the formation of polymersomes from block-copolymer-stabilized double emulsions. *Langmuir*, 22(10), 4457-4461.

Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A., & Fessi, H. (2010). Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of liposome research*, 20(3), 228-243.

Jaroni, H. W., Schubert, R. E., & Schmidt, K. H. (1986). *Liposomes as Drug Carries*. Stutgart, CA.: Georg thiemeVerlag.

Jiskoot, W., Teerlink, T., Beuvery, E. C., & Crommelin, D. J. (1986). Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. *Pharmaceutisch Weekblad*, 8(5), 259-265.

Jousma, H., Talsma, H., Spies, F., Joosten, J. G. H., Junginger, H. E., & Crommelin, D. J. A. (1987). Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 35(3), 263-274.

Kamra, M., Diwan, A., & Sardana, S. (2018). Novel Topical Liposomal Gel of Benzoyl Peroxide and Resveratrol for Treatment of Acne. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 6(2), 27-42.

Kastner, E., Kaur, R., Lowry, D., Moghaddam, B., Wilkinson, A., & Perrie, Y. (2014). High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *International journal of pharmaceutics*, 477(1-2), 361-368.

Kataria, S., Sandhu, P., Bilandi, A., Akanksha, M., & Kapoor, B. (2011). Stealth liposomes: a review. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(5).

Kavak, D. D., Altıok, E., Bayraktar, O., & Ülkü, S. (2010). *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β-glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4), 167-171.

Kırtıl, E., & Öztop, M. H. (2014). Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 12(4).

Kikuchi, H., Yamauchi, H., & Hirota, S. (1994). A polyol dilution method for mass production of liposomes. *Journal of Liposome Research*, 4(1), 71-91.

Kirby, C. J., Whittle, C. J., Rigby, N., Coxon, D. T., & Law, B. A. (1991). Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *International journal of food science & technology*, 26(5), 437-449.

Knol, J., Sjollema, K., & Poolman, B. (1998). Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry*, 37(46), 16410-16415.

Kole, C. (2007). *Fruits and nuts*. Berlin, CA.: Springer Science & Business Media.

Konan, Y. N., Gurny, R., & Allémann, E. (2002). Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 233(1-2), 239-252.

Kotouček, J., Hubatka, F., Mašek, J., Kulich, P., Velínská, K., Bezděková, J., ... & Hrebík, D. (2020). Preparation of nanoliposomes by microfluidic mixing in herring-bone channel and the role of membrane fluidity in liposomes formation. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.

Kuntsche, J., Horst, J. C., & Bunjes, H. (2011). Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International journal of pharmaceutics*, 417(1-2), 120-137.

Lachman, L., Lieberman, H. A., & Kanig, J. L. (1976). *The theory and practice of industrial pharmacy*. Philadelphia, CA.: Lea & Febiger.

Lajunen, T., Hisazumi, K., Kanazawa, T., Okada, H., Seta, Y., Yliperttula, M., ve Takashima, Y. (2014). Topical drug delivery to retinal pigment epithelium with microfluidizer produced small liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 23-32.

Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *Journal of colloid Science and Biotechnology*, 1(2), 147-168.

Leroux, G., Neumann, M., Meunier, C. F., Michiels, C., Wang, L., & Su, B. L. (2020). Alginate TiO 2 hybrid microcapsules as a reservoir of beta INS-1E cells with controlled insulin delivery. *Journal of Materials Science*, 1-13.

Lin, M. & Xianrong, Q. (2019). Purification Method of Drug-Loaded Liposome. *Liposome-Based Drug Delivery Systems*, 1-11

Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 567-575.

Lyklema, J., & Fleer, G. J. (1987). Electrical contributions to the effect of macromolecules on colloid stability. *Colloids and surfaces*, 25(2-4), 357-368.

Mathiowitz, E. (1999). *Encyclopedia of controlled drug delivery*. New Jersey, CA.: Wiley-Interscience.

Mathai, J. C., & Sitaraman, V. (1987). Preparation of large uni-lamellar liposomes by the ether injection method and evaluation of the physical integrity by osmometry. *Biochemical Education*, 15(3), 147-149.

Missoum, K., Belgacem, M., & Bras, J. (2013). Nanofibrillated cellulose surface modification: a review. *Materials*, 6(5), 1745-1766.

Morano, J. K., Martin, F. J., & Woodle, M. (1990). *U.S. PatentNo. 4,927,637*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.

Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2015). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 5(3), 305

Nii, T., & Ishii, F. (2005). Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International journal of pharmaceutics*, 298(1), 198-205.

Orman Genel Müdürlüğü, (1991). *Ülkemizde Bazı Önemli Orman Tali Ürünlerinin Teşhis ve Tanıtım Kılavuzu*. Ankara: Orman Bakanlığı.

Pelvan, E., ve Demirtas, İ. (2018). Türkiye'de Yetişen Bittim (*Pistacia terebinthus* L.) ve Fıstık (*Pistacia vera*) Yağlarinin Yağ Asidi, Sterol, Tokol Kompozisyonlari, Toplam Fenolik Madde Miktarlari Ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Gida/The Journal of Food*, 43(3), 384-392.

Pierre, M. B. R., & Costa, I. D. S. M. (2011). Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Archives of dermatological research*, 303(9), 607.

Pons, M., Foradada, M., & Estelrich, J. (1993). Liposomes obtained by the ethanol injection method. *International journal of pharmaceutics*, 95(1-3), 51-56.

Poudel, A., Gachumi, G., Wasan, K. M., Dallal Bashi, Z., El-Aneed, A., & Badea, I. (2019). Development and Characterization of Liposomal Formulations Containing Phytosterols Extracted from Canola Oil Deodorizer Distillate along with Tocopherols as Food Additives. *Pharmaceutics*, 11(4), 185.

Puglia C, Bonina F. (2012). Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv* 9:429–41

Pulaj, B., Mustafa, B., Nelson, K., Quave, C. L., & Hajdari, A. (2016). Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Pistacia terebinthus* essential oils derived from wild populations in Kosovo. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 147.

Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high–valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food chemistry*, 220, 115-122.

Riaz, M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 9(1), 65-77.

Robson, A. L., Dastoor, P. C., Flynn, J., Palmer, W., Martin, A., Smith, D. W., & Hua, S. (2018). Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in pharmacology*, 9, 80.

Sachetelli, S., Khalil, H., Chen, T., Beaulac, C., Sénéchal, S., & Lagacé, J. (2000). Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1463(2), 254-266.

Sandle, T. (2016). Antibiotics and preservatives. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control*, 171-183.

Saran, B., & Karahan, Z. C. (2010). Antibakteriyal ajanlara genel bakış. *Turk Urol Sem*, 97(1), 216-220.

Schneider, T., Sachse, A., Röβling, G., & Brandl, M. (1995). Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high-pressure extrusion method. *International journal of pharmaceutics*, 117(1), 1-12.

Shashi, K., Satinder, K., & Bharat, P. (2012). A complete review on: Liposomes. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(7), 10-6.

Shaheen, S. M., Shakil Ahmed, F. R., Hossen, M. N., Ahmed, M., Amran, M. S., & Ul-Islam, M. A. (2006). Liposome as a carrier for advanced drug delivery. *Pak J Biol Sci*, 9(6), 1181-1191.

Shifrut, E., Carnevale, J., Tobin, V., Roth, T. L., Woo, J. M., Bui, C. T., ... & Marson, A. (2018). Genome-wide CRISPR screens in primary human T cells reveal key regulators of immune function. *Cell*, 175(7), 1958-1971.

Sinapli, Ö. (2010). Myrtus communis, *Pistacia terebinthus, Conyza bonariensis* bitkilerinin antigenotoksik ve antibakteriyal aktivitelerinin araştırılması Investigation of antigenotoxic and antimicrobial activity of *Myrtus communis, Pistacia terebinthus, Conyza bonariensis* plants.

Song, L., Zhi, Z. L., & Pickup, J. C. (2014). Nanolayer encapsulation of insulin-chitosan complexes improves efficiency of oral insulin delivery. *International journal of nanomedicine*, 9, 2127.

Stachowiak, J. C., Richmond, D. L., Li, T. H., Liu, A. P., Parekh, S. H., & Fletcher, D. A. (2008). Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(12), 4697-4702.

Sudhakar, B., Ravi Varma, J. N., & Ramana Murthy, K. V. (2014). Formulation, characterization and ex vivo studies of terbinafine HCl liposomes for cutaneous delivery. *Current drug delivery*, 11(4), 521-530.

Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the national academy of sciences*, *75*(9), 4194-4198.

Takeuchi, H., Yamamoto, H., & Kawashima, Y. (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1), 39-54.

Talsma, H., & Crommelin, D. J. A. (1992). Liposomes as drug delivery systems. Part I: Preparation. *Pharmaceutical technology*, 16(10), 96-96.

Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*, 4(2), 145.

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., & Johnson, T. R. (2004). *Microbiology: an introduction (Vol. 9)*. San Francisco, CA: Benjamin Cummings.

Tpe: Les Technologıes Dans La Medecıne. *(2019). Retrieved June 12, 2019, from http://tpe-medecine-technologie.e-monsite.com/pages/ii-guundefinedrir-l-homme-par-les-technologies.html*

Umer, H., Nigam, H., Tamboli, A. M., & Nainar, M. S. M. (2011). Microencapsulation: Process, techniques and applications. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences*, 2(2), 474-481**.**

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163.

Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 63(6), 456-469.

Vyas S P, Khar R K. (2002). *Targeted and controlled drug delivery*, New Delhi.CA.: CBS Publisher and Distributer.

Yang, F., Wang, X., Zhang, D., Yang, J., Luo, D., Xu, Z., & Li, X. (2014). Chirality-specific growth of single-walled carbon nanotubes on solid alloy catalysts. *Nature*, 510(7506), 522-524.

Yaşar, S., Demir, F., & Karatepe, Y. (2016). Bazı maki türlerinin kimyasal içeriği ve fenolik ekstraktifleri üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Forestry*, 17(2), 187-193.

Yu, B., Lee, R. J., & Lee, L. J. (2009). Microfluidic methods for production of liposomes. *Methods in enzymology*, 465, 129-141.

Yang, F., Wang, X., Zhang, D., Yang, J., Luo, D., Xu, Z., & Li, X. (2014). Chirality-specific growth of single-walled carbon nanotubes on solid alloy catalysts. *Nature*, 510(7506), 522-524.

Zhang, W. (2015). Encapsulation of transgenic cells for gene therapy. *In Gene Therapy-Principles and Challenges*. IntechOpen.

Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Delivery*, 23(9), 3319-3329.

Url-1 <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/oil-filled-nanocapsules-nanotechnology/>, erişim tarihi 29.07.2020

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad **: Ali YILMAZ**

Doğum Tarihi ve Yeri **: 23.08.1990 Nurdağı**

E-posta **:** aliagayilmaz@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2017, Gaziantep Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yüksek Lisans** **:** 2020, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2016- Yenigün Gıda A.Ş. (ANTALYA)
- 2018- S2E Gıda Üretim Pazarlama Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti (BURSA)
- 2019- Doğan Tat Biber ve Salça Fabrikası (GAZİANTEP)
- 2020- Anadolu Etap Penkon Gıda ve Tarım Ürünleri Sanayi ve Tic. A.Ş. (KARAMAN)

TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **The Antimicrobial Activity of Extract of *Pistacia Terebinthus* Incorporated with Nanoliposome Prepared by Dynamic High-Pressure Microfluidization**
  [a]Ali Yılmaz, [a]Nagihan Nizam, [b]Gülengül Duman, [c]Fikrettin Şahin, [d]Münevver Müge Çağal **(POSTER SUNUMU)**

DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **The Antimicrobial Activity of Essential Oil of Satureja hortensis Incorporated with Nanoliposome Prepared by Dynamic High-Pressure Microfluidization**
  [a]Münevver Müge Çağal, [b]Gülengül Duman, [c]Sadık Kalaycı, [d]Ali Yılmaz, [b]Meltem Macit, [c]Fikrettin Şahin **(SÖZEL SUNUM)**