

# KARBAPENEM DİRENÇLİ *ACINETOBACTER BAUMANNII*'DE KUERSETİN-MEROPENEM YÜKLÜ LESİTİN/KİTOSAN NANOPARTİKÜLÜNÜN ETKİNLİĞİ

Sedef İlk<sup>a</sup>, Tuğba Arslan Gülen<sup>b</sup>, Üner Kayabaş<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmunoloji Anabilim Dalı, 51240, Niğde

<sup>b</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, 51240, Niğde

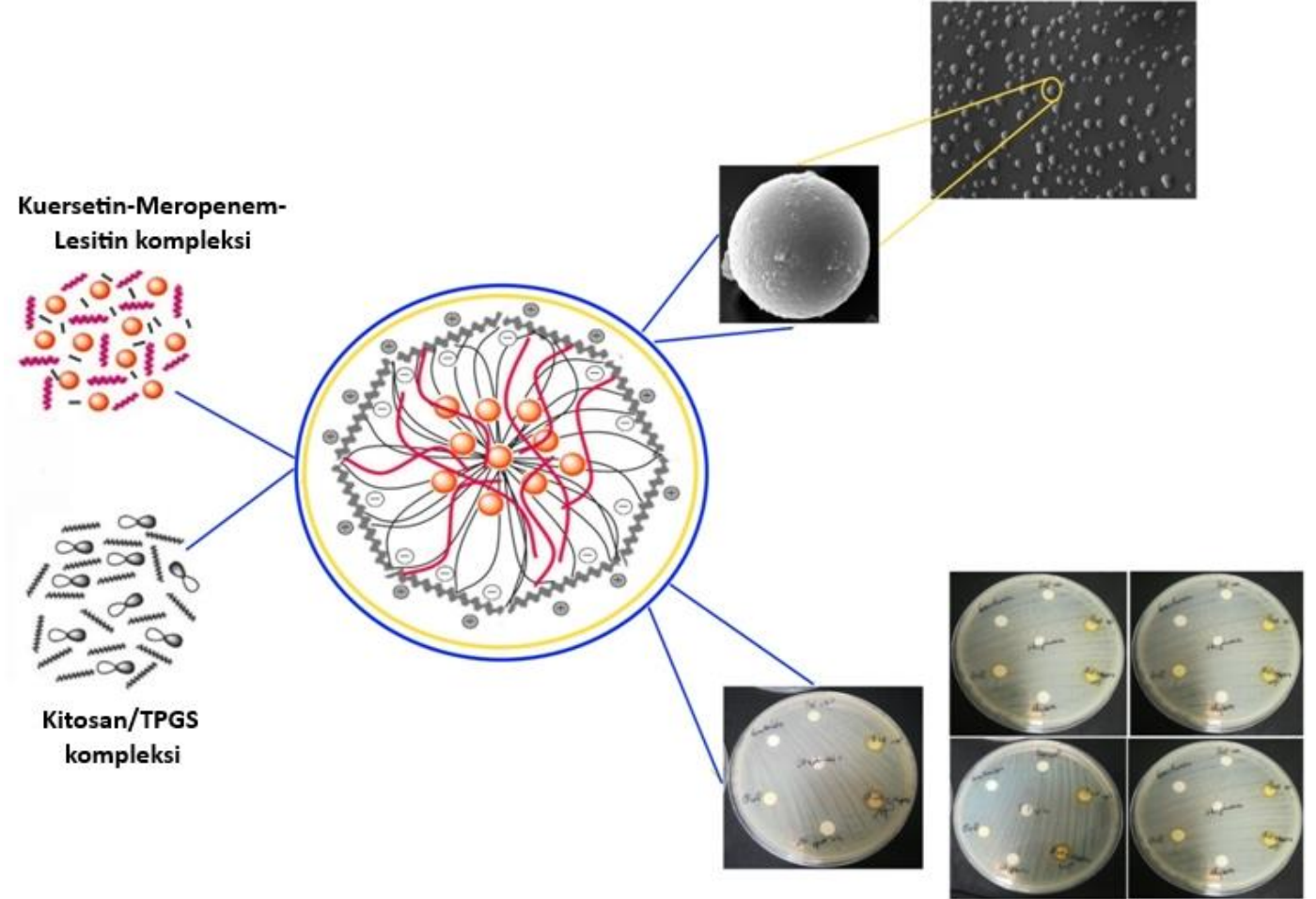
# GİRİŞ

- Günümüzde mevcut antibiyotiklere karşı dirençli bakteri türlerinin sürekli artması, bilim insanlarını yeni antibiyotik arayışına yönlendirmektedir.
- Bu araştırmada; flavonoidler grubunda yer alan, antioksidan ve antibiyotik özelliği olan, kuersetin ile meropenemin birlikte lesitin/kitosan nanopartiküllere hapsedilerek, fizikokimyasal karakterizasyonu yapılan bu nanopartiküllerin, karbapeneme dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırılması amaçlandı.



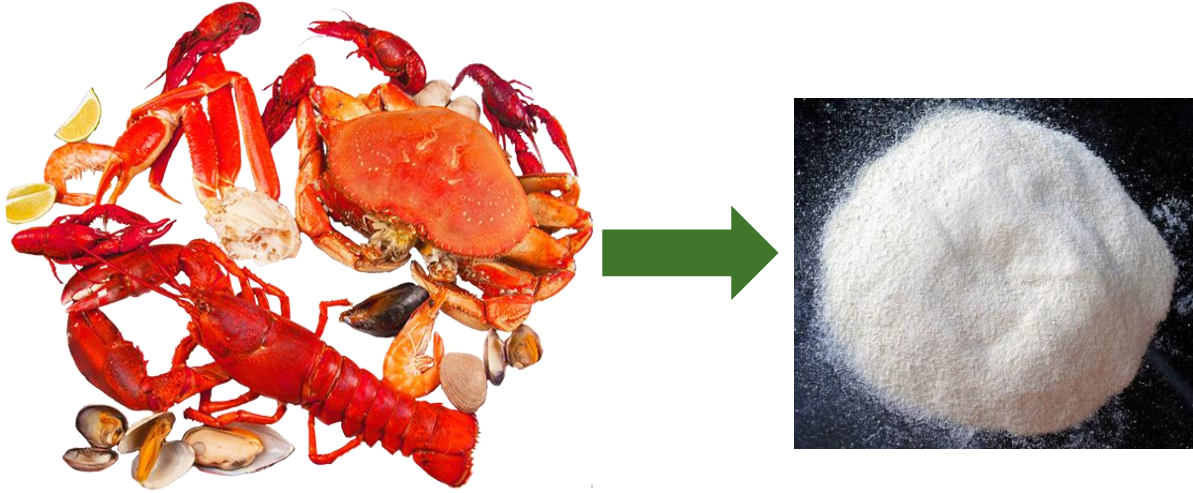
# Çalışmanın Amacı

- Dirençli *Acinetobacter baumannii*'ye karşı yeni nesil yüksek aktiviteli antibiyotik özellikteki nanotaşıyıcı sistem Meropenem-kuersetin yüklü lesitin/kitosan nanopartiküllerin elde edilmesi,
- Kuersetin/meropenemin sinerjik etkisinin nanopartiküllere hapsedilerek uzun süreli biyoaktivite ile kullanımı,
- Geniş yüzey alanı/hacim oranı ile düşük miktarlarda etken madde kullanımı ile yüksek verimli nanoboyutta antibiyotik elde edilmesi.

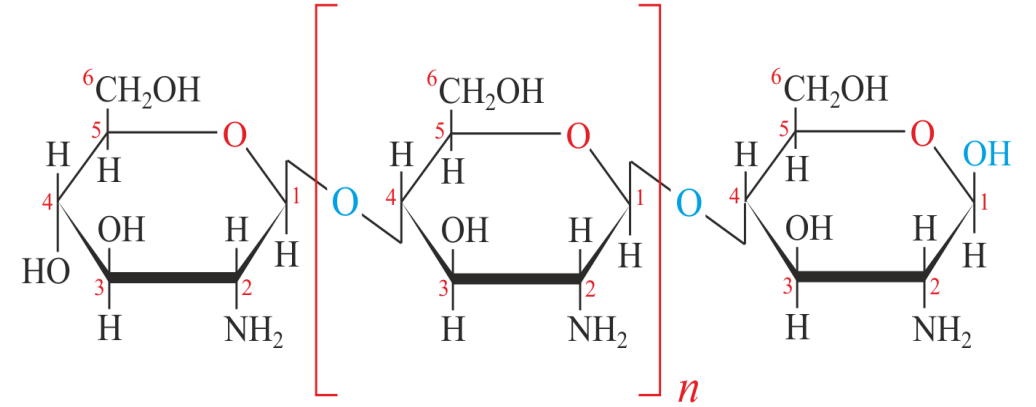


# Kitosan

- Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunmaktadır. Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğramakta ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir.
- Kitosan biyobozunur, nontoksik ve biyouyumlu olması, ayrıca doğal olarak elde edilebilmesi sebebiyle ziraat, biyoteknoloji, gıda, kozmetik, medikal alan ve atık sulardaki kirleticilerin temizlenmesi gibi endüstriyel ve akademik alanlardaki birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır.



Chitosan

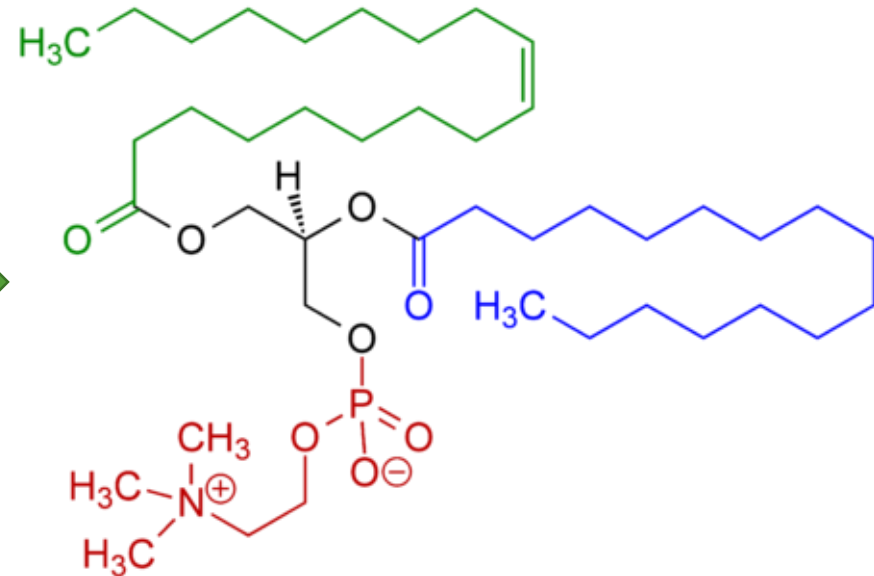


$\beta$ -(1,4)-D-glucosamine



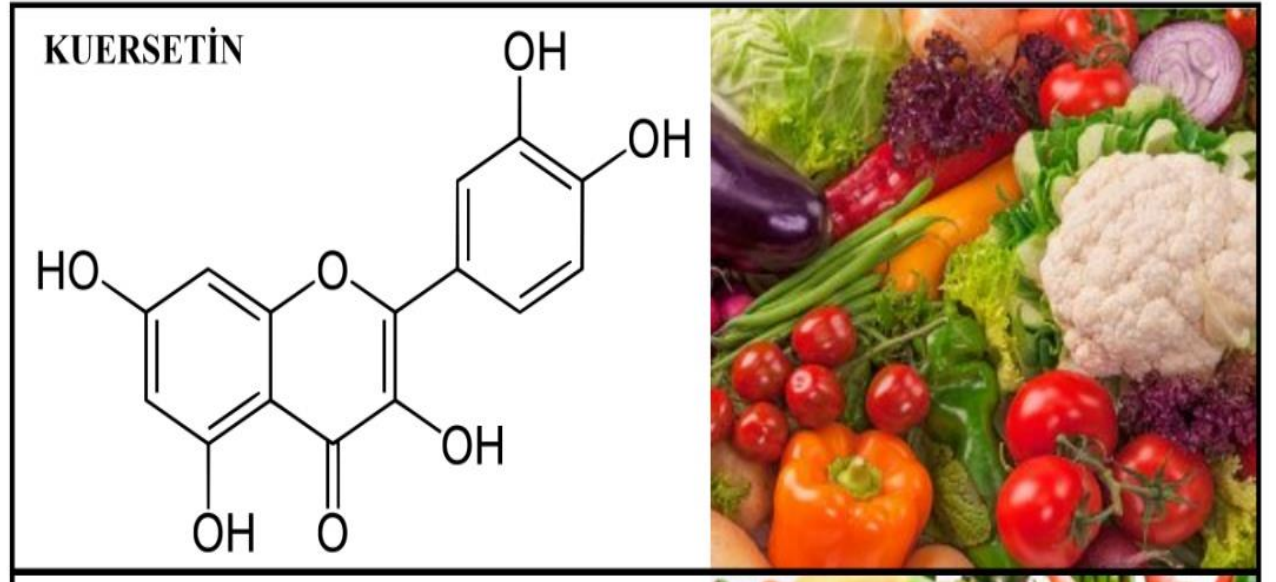
# LESİTİN

- Lesitin; glikolipid, trigliserid ve fosfolipitlerden oluşan bir karışımdır. İnsanda hücre zarını oluşturan yapı taşlarından biri olan lesitin bu özelliğinden dolayı insanlar için gerekli bir maddedir. Yumurta sarısında ve soya fasulyesinde bolca lesitin bulunur. İlaç ve gıda sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Lesitin molekülü, yağ fazında bulunan hidrofobik kuyruk kısmı ve su fazında bulunan negatif yüklü fosfat baş kısmı sayesinde yağ nano-damlacığının yağ-su arayüzeyini sağlar ve bu özellik ile nano-emülsiyon gibi nano-taşıyıcılı ajanlara negatif yüzey yükü kazandırır.



# KUERSETİN

- Flavonoid yapıları bitki bazlı gıdalarda bolca bulunan, çiçekli bitkilere renk veren, bitkinin büyüme, gelişme ve savunmasında rol alan bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Yüksek biyoaktiviteye sahip bu yapılar 'antioksidan madde' adı altında da adlandırılmaktadır. Bu fitokimyasalların antioksidan özelliklerinin yanında, anti-inflamatuar, anti alerjik, antibakteriyel, antifungal, antiviral gibi biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Flavonoidler ahududu, böğürtlen, maviyemiş, çilek, kiraz, elma, domates, soğan ve baklagillerde oldukça fazladır.
- Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) bitkilerde en çok bulunan flavonoidlerdendir. Üzümsü meyvelerin çeşitli konsantrasyonlarında kuru ağırlıkta 53 ve 153 mg kg<sup>-1</sup> arasında kuersetin bulunur.



**MATERYAL – METOD**

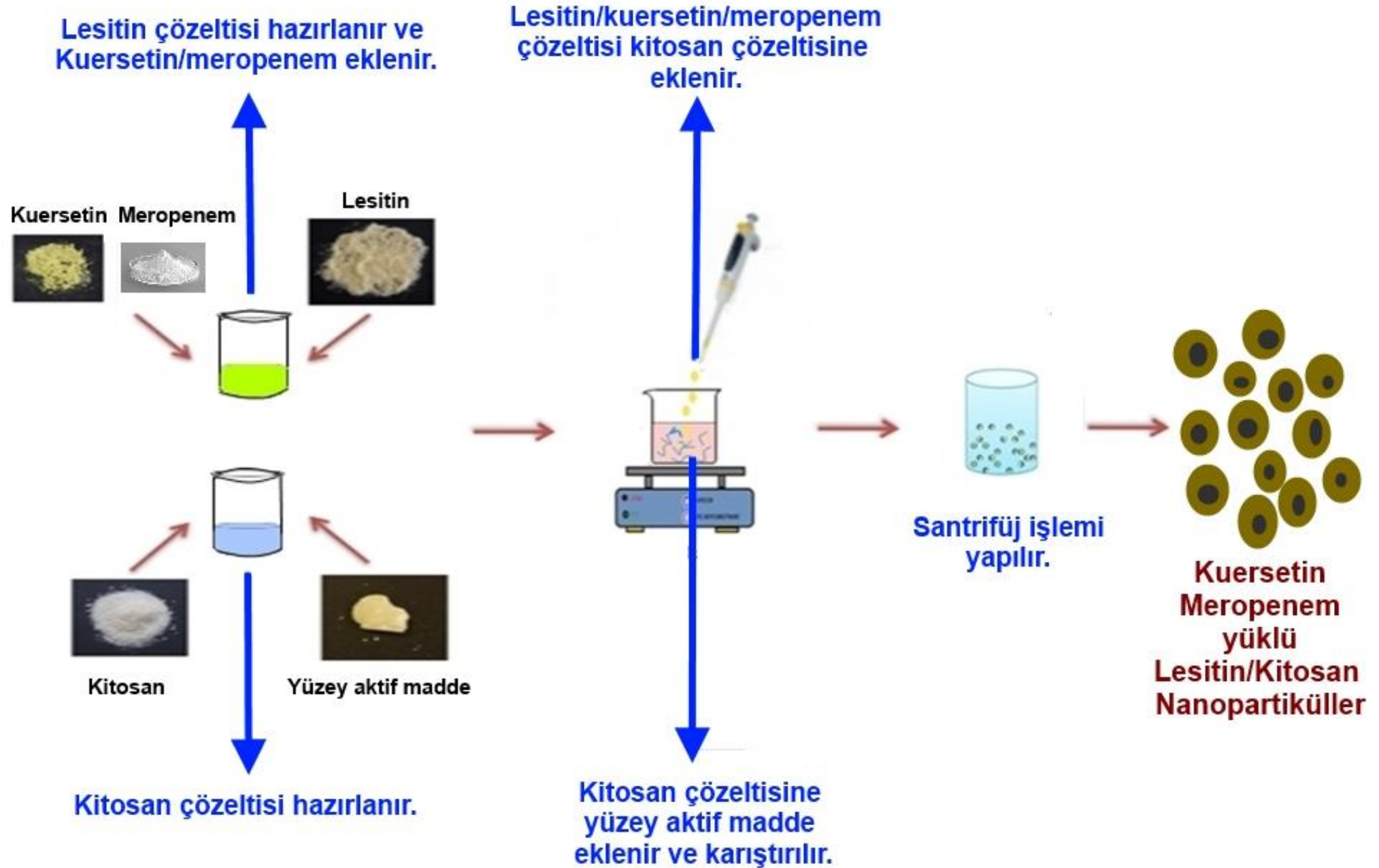
# Deneysel Kısım

Çalışmamız üç basamaktan oluşmaktadır:

- İlk aşama; antioksidan özellikteki flavonoid olan kuersetin bileşiği ile birlikte meropenemin lesitin/kitosan nanopartiküllerine hapsedilmesi,
- İkinci aşama; sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu; boy-boy dağılımı - yüzey yükü değerleri (ZetaSizer), morfolojik özellikleri (SEM) ve kimyasal özelliklerinin (FTIR) incelenmesi.
- Son aşama; sentezlenen nanopartiküllerin dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına karşı *in vitro* antibakteriyel aktivitesinin araştırılması.



# KUERSETİN-MEROPENEM YÜKLÜ LESİTİN/KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ



# NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

## 1. Boyut ve Yük Dağılımının Belirlenmesi

Nanopartiküllerin boyut ve yük dağılımı Zeta Sizer cihazı ile şu şekilde ölçüldü: Sentez sonrası yıkanarak çöktürülen nanopartiküller, deiyonize su ile seyreltildi ve yaklaşık 2 mL hacimli örnek çözeltisi, polistren küvet içerisine konularak gerekli ölçümler gerçekleştirilmiştir.



## 2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin kimyasal kimyasal bağlanma yapılarının analizleri FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy, Marka: Bruker, Model: Vertex 70) kullanılarak değerlendirilmiştir. Analizler  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  dalgaboyu aralığında ve  $4 \text{ cm}^{-1}$  çözünürlükte yapıldı. Elde edilen FTIR spektrumları değerlendirilerek hazırlanan nanopartiküllere meropenem ve flavonoidin enkapsüle edilip edilmediği incelenmiştir.



## 3. Yüzeysel Özelliklerinin Belirlenmesi

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzeysel özellikleri SEM (Scanning Electron Microscopy, Marka: Zeiss, Model: Evo 40) ile incelendi.



# ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

## Disk Difüzyon Testi

➤ Çalışma kapsamında sentezlenen nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesini belirlemek için, bakteri arşivimizde bulunan 10 adet karbepenem dirençli *Acinetobacter baumannii* suşunda EUCAST'a göre disk difüzyon testi ile incelendi.

➤ Hazırlanan petrilere steril diskler yerleştirildi ve disklerin üzerine sentezlenen üç tip nanopartikül:

- İçi boş lesitin/kitosan nanopartikül,
- kuersetin yüklü lesitin/kitosan nanopartikül,
- kuersetin-meropenem yüklü lesitin/kitosan nanopartikül
- sadece meropenem,
- sadece kuersetin
- Kontrol olarak gentamisin

etken madde solüsyonları 20 µL

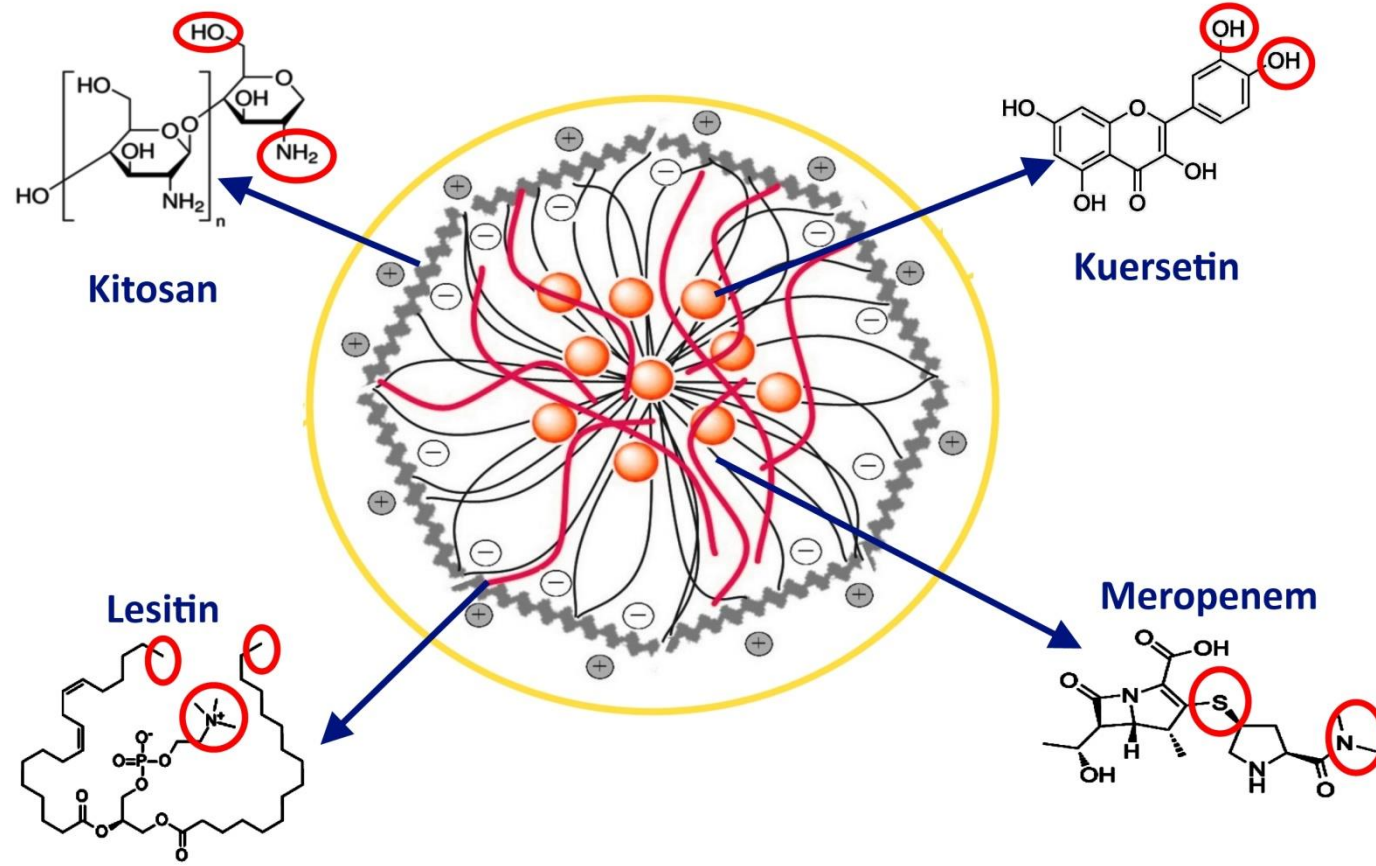
➤ Petriler inkübasyon için 37°C'de 24 saat etüvde bırakıldı.

➤ Disklerin etrafında oluşan temiz zon (mm) ölçüldü.

**SONUÇLAR**

# Sonuçlar

## Meropenem-Kuersetin Yüklü Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Sentezlenmesi



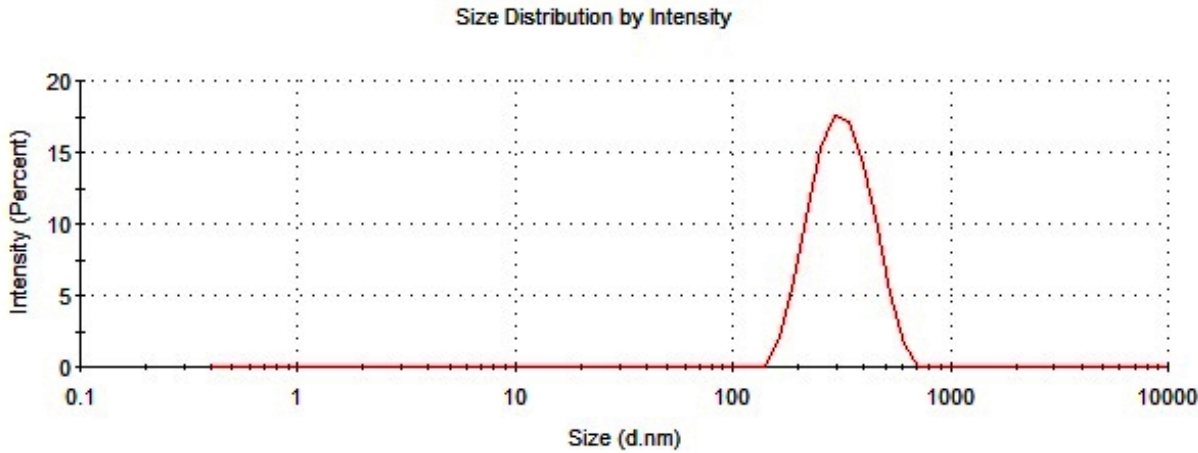
Sentezlenen nanopartiküllerin hidrofobik çekirdek kısmı TPGS ve lesitin yapısının birbirleriyle etkileşen hidrofobik gruplarından oluşmaktadır ve hidratlaşmış tabakalı dış kısmı ise TPGS ve kitosanın hidrofilik zincirlerinden meydana gelmiştir. Meropenem ve kuersetinin iyi lipofilik özelliğe sahip olması ve kabuk tabakasının hidratlaşmış yapısı sayesinde, polifenolik bileşik ve meropenem hidrofobik çekirdek kısımda çözünür ve kolaylıkla dağılır bu sayede dış tabaka yapısından korunur.

# Meropenem-Kuersetin Yüklü Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

## -Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Boy-Boy ve Yüzey Yükü Dağılımı-

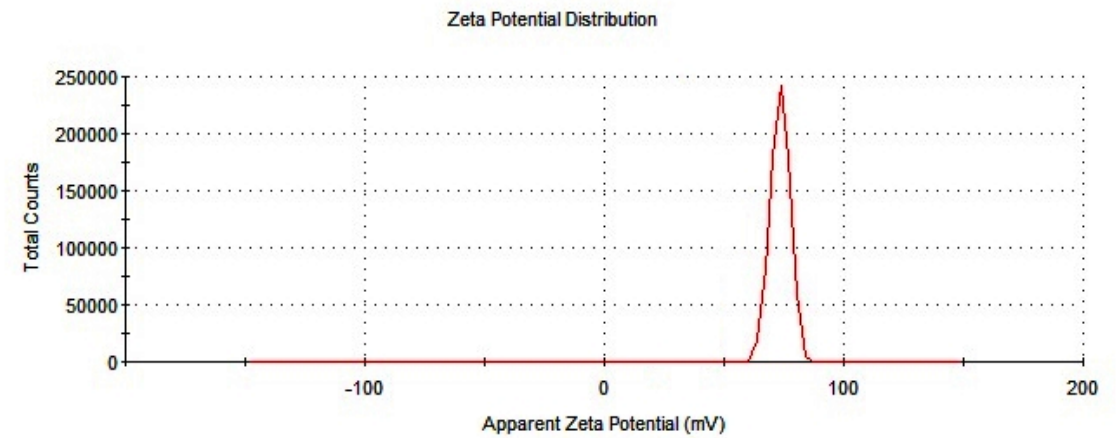
**Z-Average (d.nm): 276,4**  
**Pdl: 0,185**  
Intercept: 0,931  
Result quality : **Good**

| Size (d.nm):  | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|---------------|--------------|----------------|
| Peak 1: 327,0 | 100,0        | 99,04          |
| Peak 2: 0,000 | 0,0          | 0,000          |
| Peak 3: 0,000 | 0,0          | 0,000          |



**Zeta Potential (mV): 52,3**  
**Zeta Deviation (mV): 4,05**  
Conductivity (mS/cm): 0,174  
Result quality : **Good**

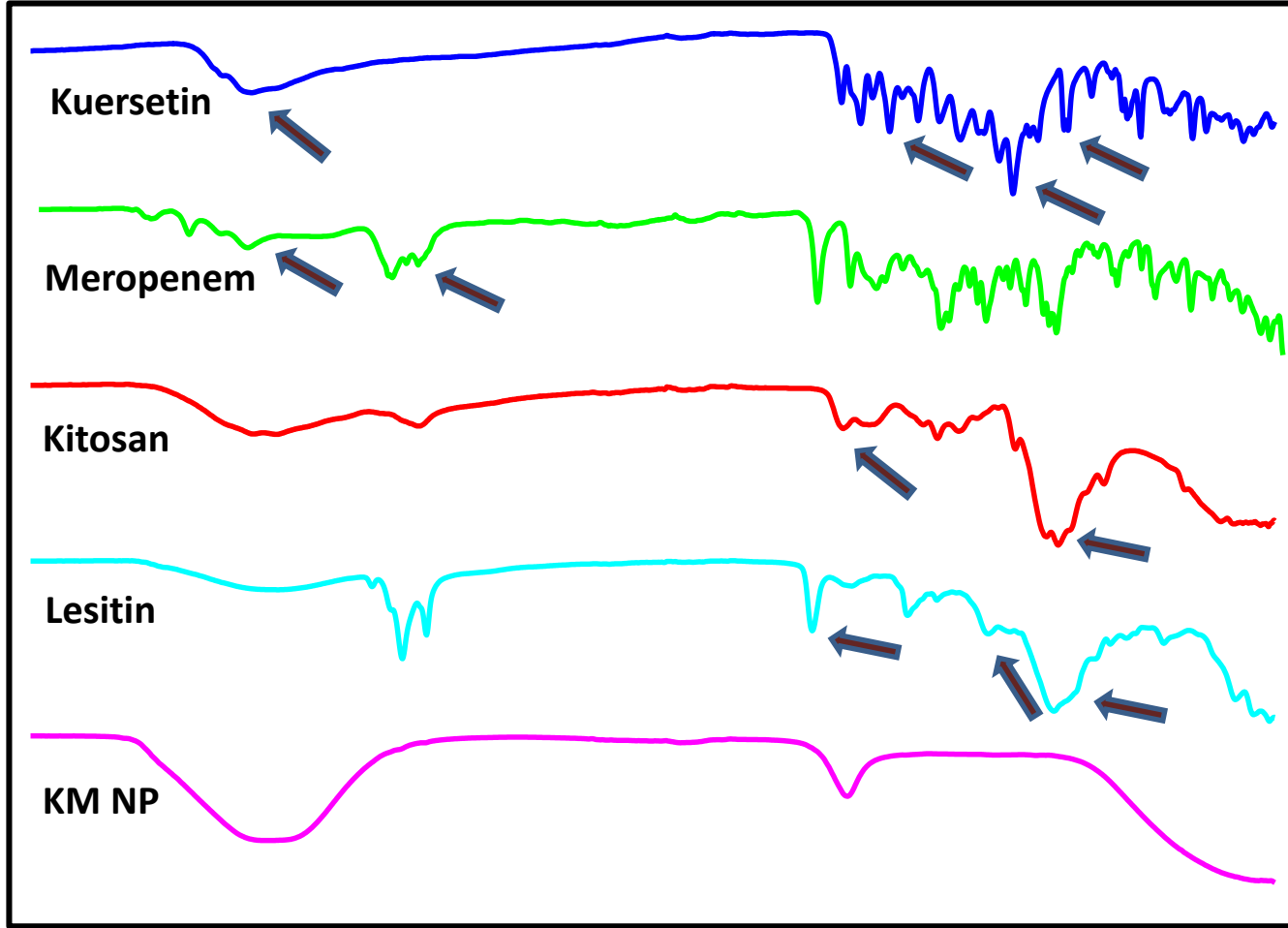
| Mean (mV)    | Area (%) | St Dev (mV) |
|--------------|----------|-------------|
| Peak 1: 52,3 | 100,0    | 4,05        |
| Peak 2: 0,00 | 0,0      | 0,00        |
| Peak 3: 0,00 | 0,0      | 0,00        |



Sentezlenen nanopartiküllerin boy-boy dağılımı 242.3 nm ile 285.3 nm arasında ve monodisperse ( $PDI \leq 0.2$ ) sahip oldukları ve yüzey yükü olarak +51.6 mV ile +56.4 mV değer sergileyerek kararlı bir yük potansiyeline sahip oldukları gözlemlenmiştir.

# Meropenem-Kuersetin Yüklü Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

## -Nanopartiküllerin Kimyasal Özellikleri-



**Kuersetin:** 3.370  $\text{cm}^{-1}$  (O–H bandı), 1.663  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1.606  $\text{cm}^{-1}$  (C=C), 1.382  $\text{cm}^{-1}$  (C–OH), 1.262  $\text{cm}^{-1}$  (C–O–C)

**Meropenem:** 3.570  $\text{cm}^{-1}$  (pirolin halkasının N–H bandı), 3.480–3.400  $\text{cm}^{-1}$  (O–H bandı), 3.980  $\text{cm}^{-1}$  ve 2.860  $\text{cm}^{-1}$  (N–H ve C–H gerilmesi)

**Kitosan:** 1.680  $\text{cm}^{-1}$  (N–H bandı), 1.125  $\text{cm}^{-1}$  (C–O–C bandı) 1.586, 1.073 ve 953  $\text{cm}^{-1}$  (C–O gerilmesi)c

**Lesitin:** 1735–1700  $\text{cm}^{-1}$  (C=O gerilme bandı), 1.180  $\text{cm}^{-1}$  (P=O bandı) , 1145–970  $\text{cm}^{-1}$  (P–O–C gerilmesi)

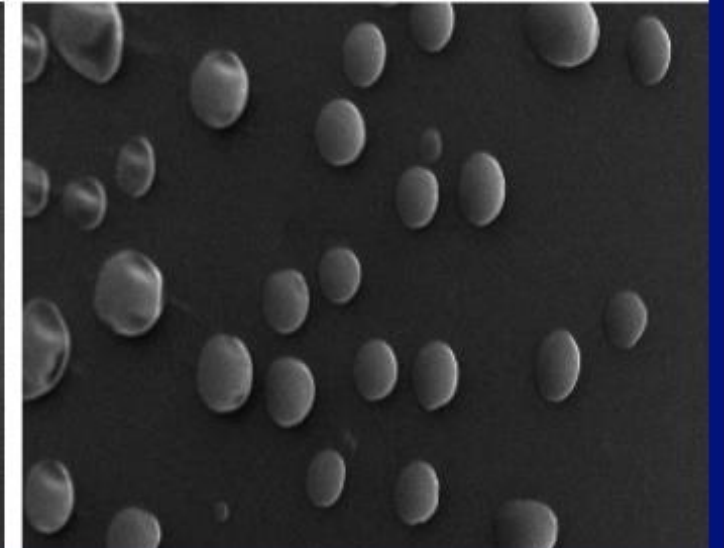
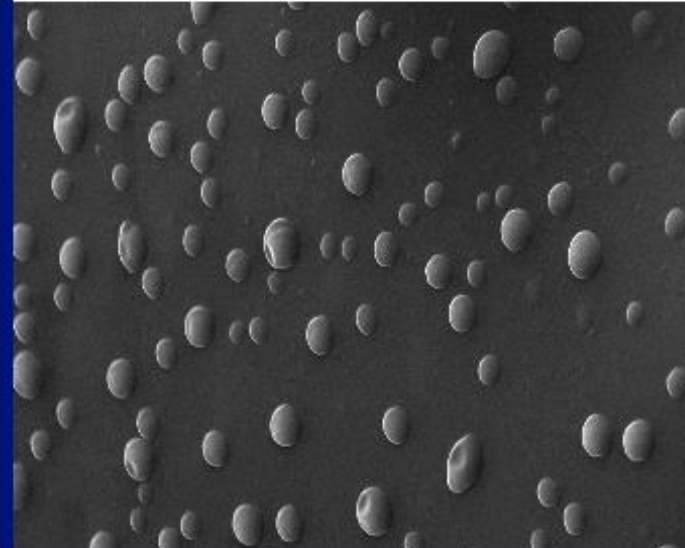
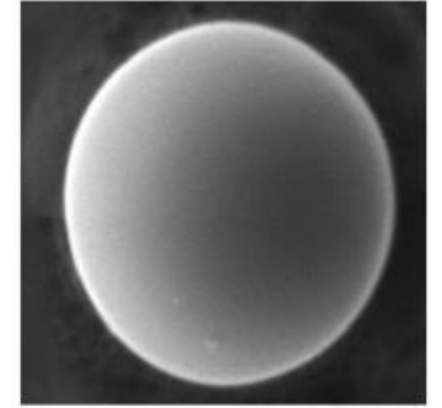
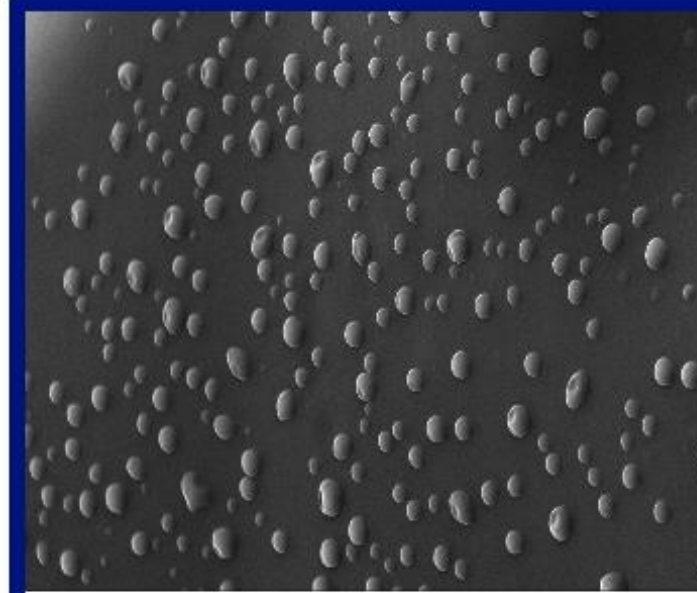
**Nanopartikül :** 3.100-3.380  $\text{cm}^{-1}$  (O–H gerilme bandı), 1.650  $\text{cm}^{-1}$  (N–H bandı) ve 850-480  $\text{cm}^{-1}$  (P–O–C bandı)

Wavenumber  $\text{cm}^{-1}$

# Meropenem-Kuersetin Yüklü Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

## -Nanopartiküllerin Yüzey Özellikleri-

Meropenem-kuersetin enkapsüle lesitin/kitosan nanopartiküller topografik açıdan incelendiğinde nanopartiküllerin oldukça düzgün, küresel formda ve monodisperse özellikte oldukları anlaşılmaktadır.





# Meropenem-Kuersetin Yüklü Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

-Antimikrobiyal Aktivite-



# Meropenem-Kuersetin Yüklü Lesitin/Kitosan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

**Tablo 1. Moleküllerin inhibisyon zon çapları**

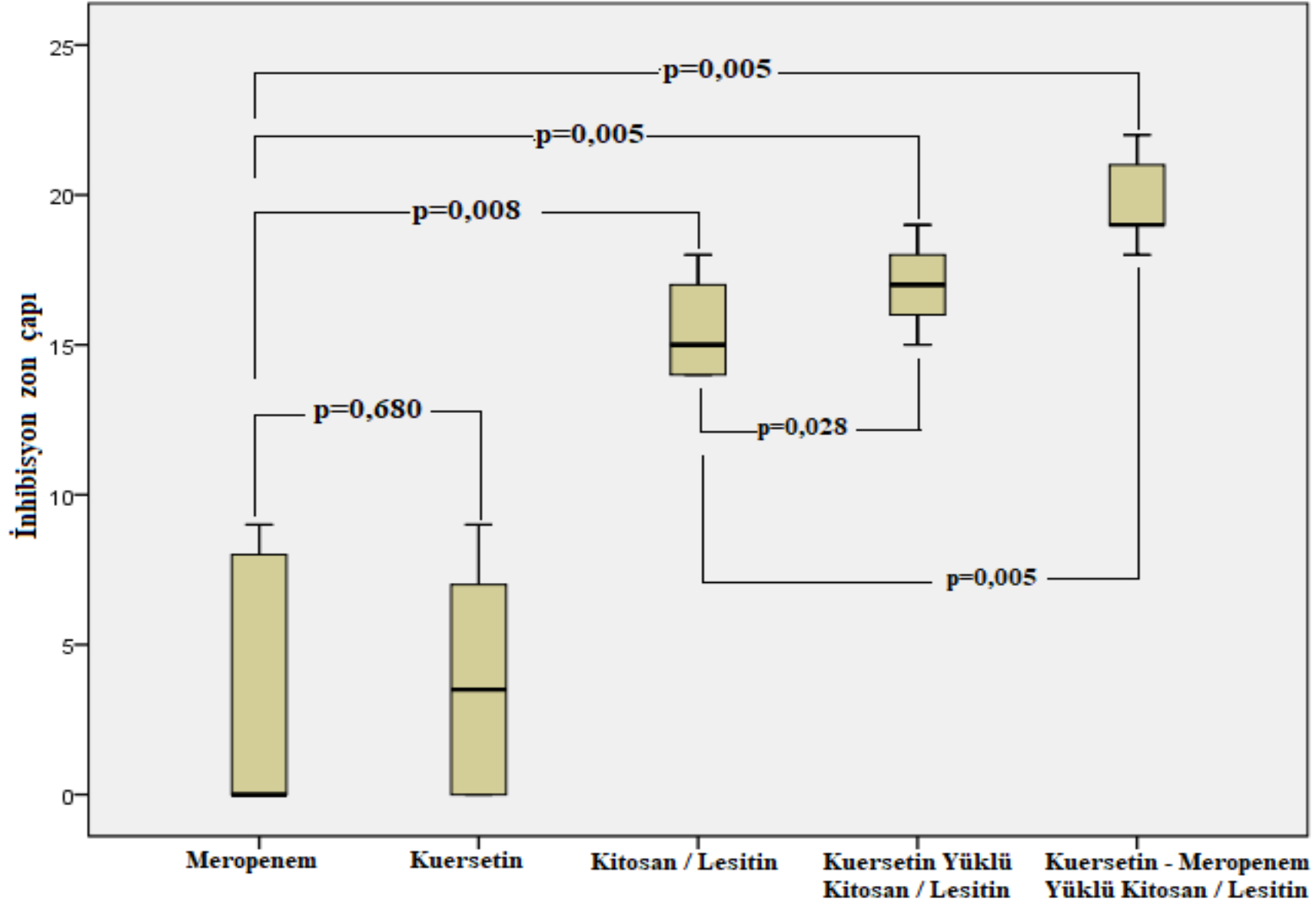
|  | İnhibisyon zon çapları (mm) |       |       |       |       |       |       |       |       |        | Ortalama± standart sapma (mm) |
|--|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------------------------|
|  | Suş 1                       | Suş 2 | Suş 3 | Suş 4 | Suş 5 | Suş 6 | Suş 7 | Suş 8 | Suş 9 | Suş 10 |                               |
| Meropenem  | 9                           | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 8     | 0     | 0     | 9      | 2,6±4,2                       |
| Kuersetin  | 9                           | 7     | 7     | 0     | 7     | 0     | 7     | 0     | 0     | 0      | 3,7±4,0                       |
| İçi Boş Kitosan/Lesitin Nanopartikül                   | 14                          | 15    | 18    | 14    | 15    | 8     | 18    | 0     | 17    | 17     | 13,6±5,6                      |
| Kuersetin Yüklü Kitosan/Lesitin Nanopartikül           | 17                          | 16    | 17    | 15    | 18    | 19    | 19    | 8     | 17    | 17     | 16,3±3,2                      |
| Kuersetin-Meropenem Yüklü Kitosan/Lesitin Nanopartikül | 21                          | 20    | 19    | 18    | 19    | 21    | 22    | 10    | 19    | 19     | 18,8±3,3                      |

**Tablo 2.** Meropenem ile diğer moleküllerin inhibisyon zon çaplarının karşılaştırılması

|                  | Diğer moleküller                                       | p deęeri     |
|------------------|--|--------------|
| <b>Meropenem</b> | Kuersetin  | 0,680        |
|                  | İçi Boş Kitosan/Lesitin Nanopartikül                   | <b>0,008</b> |
|                  | Kuersetin Yüklü Kitosan/Lesitin Nanopartikül           | <b>0,005</b> |
|                  | Kuersetin-Meropenem Yüklü Kitosan/Lesitin Nanopartikül | <b>0,005</b> |

Wilcoxon testi

# Grafik. Meropenem ve Kitosan/Lesitin ile diğer moleküllerin inhibisyon zon çaplarının karşılaştırılması



# TARTIŐMA

- Son yıllarda artan antimikrobiyal direnç sorunu nedeni ile; farklı yaklaşımlar ile bu soruna çözümler getirebilmek için yeni ilaç arayışları başlamıştır.
- Nanoteknolojik yaklaşımlar ile günümüzde kullanılan antimikrobiyallerin dirençli etkenlere karşı etkinliğini arttırmak için; sinerjik etki potansiyeli olan moleküller ve çeşitli taşıyıcı nanosistemler ile antibiyotiklerin kombinasyonu, antibiyotik direncini yenmekte gelecek için ümit vaat etmektedir.

# Literatürde; insana toksik özellikleri olan ve pahalı;

- Demir/hem metabolizması hedefli Galyum nanopartiküller,
- Gümüş, altın ve çinko oksit nanopartiküller ile yapılmış çalışmalar mevcut.

Choi SR ve ark. Antimicrob Agents Chemother. (2019)

El-Nezhawy AOH et al. Bioorg Med Chem. (2019)

Ghasemi F et al. J Glob Antimicrob Resist. (2016)

Singh R et al. J Nanosci Nanotechnol. (2018)

- Yaptığımız bu çalışma ile, dirençli bakterilere karşı kuersetinin sinerjik antibakteriyel etkinliğinin ve lesitin/kitosan nanopartiküllerinin taşıyıcı özelliğinin, geliştirilecek yeni jenerasyon antibiyotik kombinasyonları için, etkili bir yaklaşım potansiyeli olabileceği öngörülmektedir.