



Kitosan-Gümüş Nanopartikülü ve Kitosan-Gümüş-Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi*

Dilşad ONBAŞLI¹, Gökçen YUVALI ÇELİK¹, Gökşen Dilşat DURBİLMEZ¹, İsmail ÖÇSOY²

¹Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Mikrobiyal patojenlerde antibiyotik dirençliliği dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Son yıllarda, antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni bileşikler geliştirmek için daha etkili alternatif tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır. Nanopartiküller (NP) sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle, antibakteriyel etki, kanser terapisi, ilaç ve gen taşıyıcı sistemler gibi birçok alanda uygulama bulmaktadır. Bu çalışmada, hidrotermal yöntemle sentezlenen yeni nesil bir antimikrobiyal ajan olarak kitosan-gümüş nanopartikülü (K-Ag-NP) ve kitosan-Gümüş-Grafen Oksit (K-Ag-GO) nanokompoziti (NK) kullanılmıştır. Bu maddeler UV-visible (UV-vis) absorpsiyon spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Aynı zamanda bu maddelerin *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler bu maddelerin antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, grafen oksit nanokompoziti, gümüş nanopartikülü, kitosan

Synthesis and Characterization of Chitosan-Silver Nanoparticle and Chitosan-Silver-Graphene Oxide Nanocomposite with Their Determination of Antimicrobial Activities

Summary: Antibiotic resistance in microbial pathogens has become a serious health problem in the world. In recent years, more effective alternative treatment approaches have been investigated to develop new compounds with antimicrobial activity. Nanoparticles (NPs) find applications in many areas such as antibacterial effects, cancer therapy, drugs and gene delivery systems due their superior properties. In this study, chitosan-silver nanoparticles (K-Ag-NP) and chitosan-silver-graphene oxide (K-Ag-GO) nanocomposites (NK) synthesized by hydrothermal method were used as a new generation antimicrobial agent. These materials were characterized by UV-visible absorption spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Antimicrobial activities of those against *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Candida albicans* ATCC 90028 strains were also tested by using disk diffusion method. The data we have obtained show that these materials have antibacterial effect.

Key words: Antimicrobial activity, chitosan, graphene oxide nanocomposite, silver nanoparticle

Giriş

Nanoteknoloji biyoloji, kimya ve fizik gibi temel bilimlerin mühendislik ile bütünleştirildiği, nanoteknoloji ile üretilen nanoyapıların geleneksel yöntemlerle üretilenlere göre daha üstün kabul edilen özellikler sergilediği, son yılların en gözde bilim alanlarından biri olarak kabul edilmektedir. Nanopartiküller (NP); boyutları 1-100 nm arasında değişen, doğal (proteinler, polisakkaritler) ya da sentetik (üretim sırasında sentezlenenler, önceden sentezlenenler) yapıdaki polimerlerle de hazırlanabilen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündü-

rüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği yada bağlandığı matris sistemlerdir (11,15,42). Son yıllarda, nanoteknoloji tıp ve biyoteknoloji alanında NP sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli derecede artış olmuştur (6,11,42). Tıptaki uygulamalar özellikle; ilaç, gen ve antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması, *in vitro/in vivo* diagnostiklerin uygulanması, diyet destekleyiciler, geliştirilmiş biyouyumlu materyallerin üretimi gibi konuları kapsamaktadır (1,8,11,19-22,24,36). Doğal ya da sentetik polimerlerin kullanılması ile elde edilen ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri, ilaçların, proteinlerin ya da peptidlerin stabilitesinin artırılmaları için kullanılan nanopartiküllerin sağladığı en önemli avantajlardan birisi, NP'lerin küçük partikül bo-

Geliş Tarihi/Submission Date : 20.07.2017

Kabul Tarihi/Accepted Date : 26.12.2017

*Bu çalışma 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresinde tebliğ edilmiş ve özeti yayımlanmıştır.

yutlarına sahip olmasıdır. Böylece küçük kapilerlerden geçerek hücrelere alınır ve hedef bölgede etkili etkin madde akümülyasyonunu sağlarlar (14-17,35,47). Diğerleri ise, NP'lerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır. Biyobozunur malzemeler günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamaktadırlar (44). Kitosan; (i) biyobozunur, biyo-uyumlu, güvenli ve toksik olmayan, doğal bir polimerdir (ii) memeli ve mikroorganizma hücrelerine bağlanabilme, (iii) bağ dokusu üzerinde rejeneratif aktivite, (iii) kemik üreten hücre (osteoblast) oluşumunu hızlandırıcı aktivite, (iv) kanamayı durdurucu (hemostatik) aktivite, (v) antimikrobiyal aktivite, (vi) anti-kanserojen aktivite, (vii) anti-kolesterol aktivite, (viii) kemik oluşumunu hızlandırıcı aktivite, (ix) merkezi sinir sistemini baskılayıcı aktivite ve (x) bağışıklık sistemini uyarıcı aktivite şeklinde sıralanabilecek birçok biyolojik özelliğe sahiptir (18). Kitosan ve türevlerinin biyolojik önemli özelliklerinden birisi sahip oldukları antimikrobiyal aktivitedir. Kitosanın antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktiviteye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Ayrıca algelere karşı da aktiftir (23,31,38).

Mikrobiyal direncin artması, halk sağlığının yönetimini, modern dünyada önemli bir konuya getirmiştir. Son yıllarda birçok yeni antibiyotik geliştirilmiş olsa da, hiç biri çoklu ilaç dirençli (MDR) enfeksiyonlarla mücadele etmek için yeterli değildir (29). Bu nedenle, dirençli patojenler için alternatif ve daha etkili terapötik stratejiler geliştirilmesi önemlidir. Son yıllarda materyal bilimi ve biyolojiji birleştiren bir alan olan nanobiyoteknoloji bilimindeki ilerlemeler, antimikrobiyal özellikteki NP'lerle çalışıldığını göstermiştir. NP'ler ve kitosan, birçok avantajlarından dolayı tıp, biyomedikal, biyomühendislik, farmasötik ve kozmetik alanlarında oldukça fazla ilgi görmektedir. Kronik hastalıkların teşhisinde terapötik maddelerin verilmesinde başarılı bir şekilde kullanılan NP'ler (50) cilt ve yanık yaralarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için de bir seçenek olmuştur. NP'i ve kitosani yeni nesil antimikrobiyal ajanlar olarak geliştirmek, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde görülen ilaç direnci sorununu gidermek için cazip ve uygun maliyetli bir araç olabilir. Bu çalışmanın amacı kitosani kullanarak gümüş nanopartikülü (Ag-NP) ve gümüş-grafen oksit-nanokompozit (Ag-GO NK)'lerinin sentezi ve karakterizasyonu için basit ve çevre dostu bir yaklaşım geliştirerek, kitosan-

gümüş-nanopartikülü (K-Ag-NP)'ü ve kitosan-gümüş-grafen oksit-nanokompozit (K-Ag-GO NK)'lerinin *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC 68175, *Candida albicans* ATCC 90028 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Kitosan-Gümüş Nanopartikülü (K-Ag-NP)'nin Sentezi

Çalışmada, 4 mL 50 mM AgNO₃ (gümüş nitrat (AgNO₃) %99'luk Sigma Aldrich) ve 30 mg/mL 10 mL kitosan (K) %1 lik asetik asit hazırlanmıştır. Bu iki çözelti 30 dakika boyunca karıştırılarak teflona aktarılmıştır. Etüvde 95°C'de 24 saat boyunca bekletilmiş ve elde edilen malzeme daha sonra karakterize edilmiştir.

Kitosan-Gümüş-Grafen oksit Nanokompoziti (K-AgGO-NK)'nin Sentezi

Gümüş-grafen oksit nanokompoziti (Ag-GO NK) Sriram ve ark. (45) tarafından önerilen yöntemle sentezlenmiştir. Grafen oksit (GO) tarafından gümüş nanopartikülleri (Ag-NP)'nin yakalanması için farklı konsantrasyonlarda iki aşamalı olarak NaCl çözeltisi eklenerek sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. GO (final konsantrasyonu 0.1 mg/mL) karıştırken üzerine önceden sentezlenmiş olan Ag-NP çözeltisi 2 mL eklenmiş ve karışma işlemi devam ederken NaCl çözeltisi (2.4 mL, 0.09 M) damla damla ilave edilmiştir. Ag-NP'nin ön toplanması gerçekleştiikten belirli bir süre sonra (10s) NaCl çözeltisi (5 mL, 0.29 M) damla damla ilave edilmiştir. Karışım 30 dk karışmaya bırakılarak daha sonra karışım 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan Ag-NP/GO içeren solüsyon 5000 rpm'de 10 dk santifüj edilerek ayrılmış ve katı Ag-GO parçacıkları 5 mL deiyonize su içerisinde dağıtılarak, santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.

Antimikrobiyal Aktivitenin İncelenmesi

Kitosan-gümüş nanopartikülü (K-Ag-NP) ve kitosan-gümüş-grafen oksit nanokompozitinin (K-Ag-GO NK) test suşları üzerinde antimikrobiyal aktivitesi Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü

sü'ne göre disk difüzyon metodu kullanılarak yapılmıştır (10). Steril kabin içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanmış olan mikroorganizma süspansiyonundan steril şartlarda 100 µL alınarak ve daha önce hazırlanan katı besiyeri ortamına ekilmiştir. Boş steril antibiyotik disklerine 15 µL 30 ppm olacak şekilde K-Ag-NP ve K-Ag-GO NK'i emdirilmiştir. Bu diskler katı besi yerinin üzerine düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir. Kontrol grupları da aynı paralelde hazırlanmıştır. Bu işlemlerden sonra mikroorganizmalar 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda oluşan inhibisyon zonları kumpas yardımı ile ölçülerek zon çapları milimetre (mm) olarak kaydedilmiştir. Tüm analizler iki paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

K-Ag-NP'nün ve K-Ag-GO NK'nin Sentez ve Karakterizasyonu

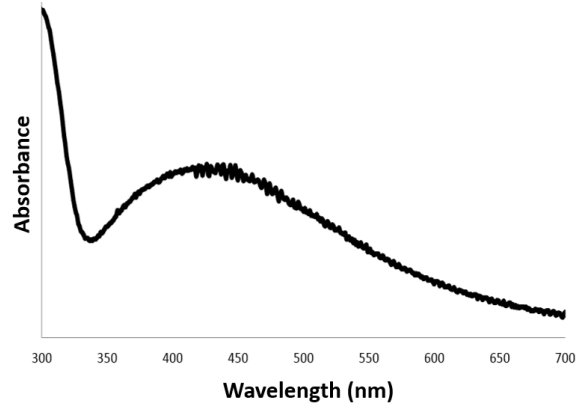
Hidrotermal yöntem ile kitosan, indirgenme ve stabilize ajanı olarak kullanılıp gümüş (Ag^+) iyonlarını, gümüş metal formuna indirgeyerek kararlı K-Ag-NP'ü sentezlenmiştir. Kitosan molekülleri ile Ag^+ iyonlarının etkileşiminde elektron transferi kitosandan Ag^+ iyonlarına doğru akar ve kitosan oksitlenirken Ag^+ iyonları Ag metal formuna indirgenerek Ag çekirdekleri oluşur. Klasik NP sentezinde olduğu gibi çekirdeklenmeyi, büyüme basamağı takip ederek kitosan moleküllerinin üzerine bağlandığı kararlı Ag-NP sentezlenir. Uv-Vis spektrumdaki Ag-NP'ye ait dar absorbands piki ve Ag-NP çözeltisinde 2 hafta boyunca çökelti oluşmaması, kararlı Ag-NP'lerin varlığını gösterir. Plazmonik NP'lerden olan dairesel Ag-NP'lerin karakteristik UV-Vis absorbands piki 400-440 nm aralığındadır. Yapı-



Şekil 1. K-Ag-NP



Şekil 2. K-Ag-GO NK

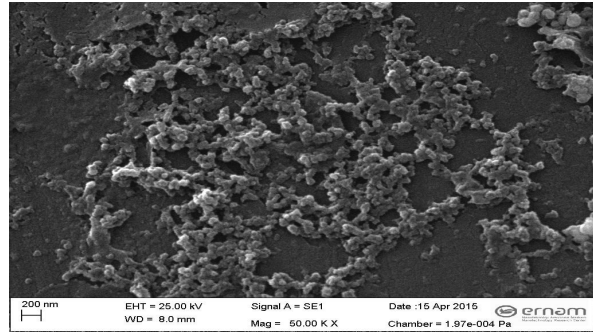


Şekil 3. Ag-NP UV-vis spektroskopisi (Ag-NP Karakteristik absorbands pik: ~440 nm)

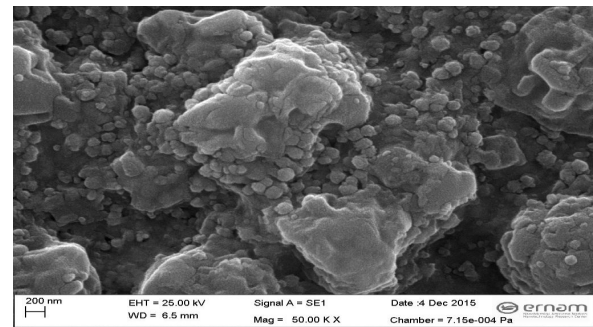
lan analiz sonucunda, K-Ag-NP çözeltisinin absorbands noktası da yaklaşık olarak 440 nm olarak ölçülmüştür. Bu durum K-Ag-NP oluşumunun en önemli göstergelerinden biridir. K-Ag-NP'nün 5 mg/mL ile 50 µg/ml GO çözeltisini karıştırarak kitosan-gümüş-grafen oksit (K-Ag-GO) nanokompoziti sentezlenmiştir. Oluşan K-Ag-NP turuncu-kahverengi, K-Ag-GO NK'i ise gri-siyah renktedir (Şekil 1 ve Şekil 2). Aynı zamanda UV-Vis spektrofotometresi ile Ag-NP'nin UV-Vis spektrumu alınmıştır (Şekil 3).

SEM Analizi

ZEISS EVO LS10 SEM 25 kV çalışma geriliminde kullanılarak görüntüler elde edilmiştir (Şekil



Şekil 4. Ag-NP SEM görüntüsü Ag-NP: ~ 45 nm



Şekil 5. Ag-GO NK'nin SEM görüntüsü

4, Şekil 5). Konsantre 50 µL Ag-NP sulu çözeltisi karbon bant kaplı stub üzerine damlatılmıştır ve berrak görüntülerin elde edilmesi için bir gece boyunca kurutulmuştur.

K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO-NK'nin Antimikrobiyal Aktivitesi

Disk difüzyon metoduna göre tespit edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 1.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; K-Ag-NP'nün *E. coli* ATCC35218 (4.7±0.1), *S. aureus* ATCC 25923 (3.4±0.2), *S. mutans* ATCC 68175 (3.0±0.2), *B. subtilis* ATCC 6633 (2.2±0.0) suşlarına karşı ve K-Ag-GO-NK'nin *E. coli* ATCC35218 (2.5±0.1), *S. aureus* ATCC 25923 (2.5±0.1), *S. mutans* ATCC 68175 (1.4±0.0), *B. subtilis* ATCC 6633 (1.5±0.1) suşlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiği fakat *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı antifungal aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda K-Ag-NP'nin test suşlarına karşı K-Ag-GO-NK'den daha yüksek antibakteriyel etki gösterdiği de belirlenmiştir. K-Ag-NP test bakterileri arasında en yüksek aktiviteyi ise gram negatif bir bakteri olan *E. coli* ATCC 35218 suşuna karşı göstermiştir.

Özellikle ilaç taşınması, antimikrobiyal uygulamalar ve kanser terapisi konularında, nanopartiküller ile yapılan çalışmalar oldukça ümit vericidir (46). Metaller nanopartiküller uzun yıllardır antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadırlar. Bakterilerin metal nanopartiküllerine karşı direnç kazanma ihtimali, diğer konvansiyonel ve dar spektrumlu antibiyotiklerden daha azdır (34). Gümüşün antimikrobiyal aktivitesi yüzyıllardır bilinmektedir. Biyolojik uygulamalarda geniş bir kullanıma sahiptir. Antifungal, antibiyotiklere karşı dirençli bakteriler için, enfeksiyonların önlenmesi, yara iyileştirme ve anti-inflamatuvar gibi kullanım alanları yer almaktadır (5,25,39,40). Antimikrobiyal etki mekanizmalarının, tam olarak anlaşılmasına rağmen, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bakterinin hücre zarına bağlanmasını içeren bir mekanizmayla, hücre zarına zarar verdiği belirlenmiştir (43,51). Grafen çok yönlü bir karbon bileşiği olarak birçok uygulama alanına konu olmuş ve kullanım alanları genişlemekte olan bir nanomateryaldir (2). Grafen elmasın sert ancak esnek yapısıdır, hafif ve kuvvetlidir. Ayrıca transparen, inert, yoğun, yüksek iletkenlik ve termal iletkenlik gibi özelliklerinden dolayı önemli bir molekül olarak

Tablo 1. K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO-NK'nin disk difüzyon testi sonuçları

Test suşları	İnhibisyon Zon Çapı (mm)	
	K-Ag-NP	K-Ag-GO-NK
<i>E. coli</i>	4.7±0.1	2.5±0.1
<i>S. aureus</i>	3.4±0.2	2.5±0.1
<i>S. mutans</i>	3.0±0.2	1.4±0.0
<i>B. subtilis</i>	2.2±0.0	1.5±0.1
<i>C. albicans</i>	-	-

"-" Herhangi bir etki gözlenmemiştir

"±"Ortalama ±Standart sapma

"NP, NK"Nanopartikül, Nanokompozit (30 ppm); "K" Kitosan; "Ag" Gümüş; "GO" Grafenoksit

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan nano boyuttaki ilaç partiküllerinin sentezlenmesi, yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde ilgi çekici bir konu haline gelmiştir. Nanopartiküllerin sahip olduğu eşsiz elektriksel, kimyasal, mekanik ve optik özellikleri, yüksek yüzey alanı/hacim oranları ve oldukça küçük boyutları sayesinde etkin antimikrobiyal özellik gösterdikleri gözlemlenmiştir (30). Tüm bu farklı özellikleri nanopartikülleri, hastalıkların tanısı ve tedavisinde ilgi odağı haline getirmiştir (46).

görülmektedir (2). Ayrıca grafen oksitte biyoyumludur (7). Grafen oksit, grafit tabakalarının oksitlenerek birbirinden ayrılmış tek katmanlı halidir (3). Geniş yüzey alanına, mükemmel elektriksel ve termal iletkenlik ve biyoyumluluk gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Antimikrobiyal ajan olarak yapılan çalışmalarda grafen oksidin toksikliğini azaltmak ve verimliliğini arttırmak için, farklı inorganik nanoyapılar, biyomoleküller ve polimerler ile yüzey modifikasyonu ve fonksiyonizasyonu geliştirilmiştir (26,28).

Doğal bir biyopolimer olan kitosan ise, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitine göre birçok avantaja da sahip olan kitosan basta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, eczacılık, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur (13). Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok alanda karşımıza çıkmaktadır (13). Kitosan nanoparçacıkları (K-NP) antibakteriyel, antimikrobiyal ve antifungal etkilere sahiptir (46). Bazı araştırmacılar kitosanın selüloz gibi diğer polimerlerle karışımını sağlamışlar ve kitosanın polikationik doğasının hücre membranı yüzeyindeki makromoleküllerin negatif yüklü rezidüleri ile etkilenmesinin bakteri ve fungusların ölümüne neden olduğunu belirtmişlerdir (48). KNP'nin midede ilaç tahrişini önleyen ya da azaltan asit giderici ve antiülser etkilerinin yanısıra kontrollü ilaç salımı (kitosan jelleri, tabletleri, mikroküreleri ve mikrokapsülleri ile gerçekleştirilen) sistemlerindeki yararlarından dolayı kullanımı oldukça önem taşımaktadır (33,41).

Jena ve ark. (21) kitosan kaplı gümüş nanopartiküllerinin (K-AgNP) insan patojenlerine ve makrofaj hücrelerine karşı toksisitesi ve antibakteriyel etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma ile K-Ag-NP farklı insan patojenlerine karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği ve ayrıca bakteriyel biyofilm oluşumunu önlediği sonucuna varmışlardır. Spesifik dozdaki kitosan temelli gümüş nanopartiküllerinin vücut hücrelerine zarar vermeden bakteriyi öldürdüğü ve böylece bakteriyel kolonizasyonu ve ilaç direnciyle mücadele etmek için dizayn edilecek olan antibakteriyel ajana potansiyel örnektir. Başka bir çalışmada kitosan jel ile formüle edilmiş gümüş nanopartiküllerinin antibiyofilm etkisinin ve insan fibroblastları üzerine olan sitotoksik etkisi incelenmiştir. Gümüş nanopartiküllerinin geniş spektrumlu antibakteriyel ajan olarak kullanılabilirliği son çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak medikal alanda, sitotoksik etkileri onların kullanımını sınırlandırmaktadır. Çalışmada, gümüş nanopartikülleri ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin antibiyofilm kapasitesi değerlendirilmiştir. Bu işlem gümüş sulfadiazin (SSD) kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak, kronik yaralardaki infeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde,

kitosan jelleri ile Ag-NP'nin kullanılabilirliği gösterilmiştir (37). Liu ve ark. (27) ile Das ve ark. (12) tarafından yapılan çalışmalarda, GO-Ag hibrid kompozitleri özgün antibakteriyel sistemler olarak kullanmışlardır. Grafen oksit (GO) nanoset yüzeyinin Ag nanopartiküller tarafından modifiye edilmesi, antimikrobiyal özelliğini; GO-NP'nin kararlılığını ve dispersitesini arttıracıcağını bildirmişlerdir. Grafen oksit-gümüş (GO-Ag) nanokompozitlerin konjuge formları, sinerjik etki ve bakteri hücreleri arasındaki etkileşimi azaltarak negatif yüzey yükü ile antibakteriyel aktivitenin artmasına neden olduklarını vurgulamışlardır. Zhu ve ark. (52) Ag-NP'nin GO tabakalarına konjuge edilmesi için farklı yoğunluk, boyut ve formlara sahip bir bağlayıcı olarak poli dialildimetilamonyum klorür (PDDA) kullanmışlar ve GO-PDDA-AgNP'in antibakteriyel aktivitesinin Ag-NP'ine kıyasla önemli ölçüde arttırdığını ortaya koymuşlardır. Cai ve ark. (4) yaptıkları bir çalışmada polietilenimini (PEI), indirgenmiş grafen oksit (rGO)'in Ag-NP'ne konjugasyonu için bağlayıcı olarak kullanmışlardır. Bu hibridin, yüksek çözünürlük, kararlılık, hafif sitotoksikite, uzun süreli antibakteriyel etki gösterdiğini ve GO'nun 46.7 mV'luk negatif zeta potansiyeli ile stabil kalmasını sağladığını, GO-PEI-Ag-NP'nin polivinilpirolidon (PVP)-Ag-NP'e göre uzun süre antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu ve mükemmel stabilite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Veerapandian ve ark. (49) *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *B. subtilis*, *E. coli*, için UV ışınlarına maruz bırakılmış GO nanosetlerinin minimum bakterisid konsantrasyonunun (MIC) normal nanoset ve antibiyotik olan kanamisininkinden daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. GO'in yüksek güçte antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Chen ve ark. (9) GO'in bakteriyel ve fungal patojenlerin çoğalması üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (bakterilerin yaklaşık %90'ı öldürülmüş ve %80 makroconidia çimlenmesini bastırmıştır). Ochoy ve ark. (32) *Xanthomonas perforans*'la yaptıkları bir çalışmada GO üzerinde büyüyen DNA yönlendirmeli Ag-NP'ini geliştirmişlerdir. Gümüş-çiftzincirli DNA-grafen oksit (Ag-dsDNA-GO) kompozitlerinin kültürde ve bitkilerde *X. Perforans*'ın hücre canlılığını etkili bir şekilde azatlığını ve çok düşük konsantrasyonda bu kompozitin, gelişmiş stabilite, arttırılmış antibakteriyel aktivite ve daha güçlü adsorpsiyon özellikleri açısından önemli avantajlar sağlayan mükemmel antibak-

teriyel özellik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları denemelerimizi destekler niteliktedir. Yaptığımız çalışmada, kitosan kullanılarak Ag-NP ve Ag-GO-NK'nin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda bu maddelerin, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 68175, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 90028 suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler K-Ag-NP ve KAg-GO-NK'nin antibakteriyel etkiye sahip olduklarını fakat antifungal bir aktivite göstermediklerini ortaya çıkarmıştır. Diğer yandan K-Ag-GO NK'inin K-Ag-NP'e göre daha düşük antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç geliştirmeleri ve sürdürülebilir sağlık koşullarının ekonomik olarak sağlanması amacıyla çok sayıda araştırmacı, yeni ve etkili antimikrobiyal ajanlara dayanıklılık geliştirmeye yönelik teknoloji arayışına girmişlerdir. NP'ler ve kitosan sahip oldukları eşsiz ve etkin antimikrobiyal özellikleri sayesinde hastalıkların tanı ve tedavisinde ilgi odağı haline gelmişlerdir. Bu çalışmada, K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO NK, kitosan kullanılarak sentezlenmiş ve elde edilen veriler bu maddelerin antibakteriyel potansiyele sahip olduklarını göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan K-Ag-NP'ü ve K-Ag-GO NK'nin, çeşitli bulaşıcı hastalıklara sebep olan Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin tedavisinde, mevcut antibiyotiklere alternatif olarak yeni antimikrobiyal bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu moleküllerin stabilite, immünogenetik, farmakokinetik ve farmakodinamik ve özellikle de klinik etkileri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. Kunugi S, Yamaoka T. eds. In: Polymers in Nanomedicine. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2011; p.31-64.
2. Bedeloğlu A, Taş M. Grafen ve grafen üretim yöntemleri. AKU J Sci Eng 2016; 16(3): 544-54.
3. Bianco A, Cheng HM, Enoki T, Gogotsi Y, Hurt RH, Koratkar N, Zhang J. All in the graphene family-A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. Carbon 2013; 65:1-6.
4. Cai X, Lin M, Tan S, Mai W, Zhang Y, Liang Z, Lin Z, Zhang X. The use of polyethyleneimine-modified reduced graphene oxide as a substrate for silver nanoparticles to produce a material with lower cytotoxicity and long-term antibacterial activity. Carbon 2012; 50 (10): 3407-15.
5. Carmona D, Lalueza P, Balas F, Arruebo M, Santamaría J. Mesoporous silica loaded with peracetic acid and silver nanoparticles as a dual-effect, highly efficient bactericidal agent. Micropor Mesopor Mat 2012; 161:84-90.
6. Chan WC. Bionanotechnology progress and advances. Biol Blood Marrow Transplant 2006; 12(1): 87-91.
7. Chang Y, Yang, ST, Liu JH, Dong, E, Wang Y, Cao A. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicol Lett 2011; 200(3): 201-10.
8. Chen Y, Mohanraj VJ, Parkin, JE. Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide. Int J Pept Res Ther 2003; 10(5-6): 621-9.
9. Chen J, Peng H, Wang X, Shao F, Yuan Z, Han H. Graphene oxide exhibits broadspectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation. Nanoscale 2014; 6(3): 1879-89.
10. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard: M02-A10. Tenth Edition Vol. 29, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: 2009; p.1.
11. Çırpanlı Y. Kamptotesin içeren polimerik ve oligosakkarit bazlı nanopartiküler formülasyonların geliştirilmesi ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi, Doktora tezi, Hacettepe Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2009; s. 4-15.
12. Das MR, Sarma RK, Saikia R, Kale VS, Shelke MV, Sengupta P. Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity. Colloids Surf B Biointerfaces 2011; 83(1): 16-22.
13. Demir A, Seventekin N. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. Tekstil Tekno Elek Derg 2009; 3: 92-103.
14. Derman Acar S. Canine parvovirus'e ait antijenik özellikli sentetik peptidlerin sentezi ve biyokonjugatlarının geliştirilmesi, Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniv Fen Bil Ens, İstanbul

- 2012; s. 45-53.
15. Derman S, Kızılbey K, Akdeste ZM. Polymeric nanoparticles. *J Eng Nat Sci* 2013; 31: 107-20.
 16. Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharm Res* 1996; 13(12): 1838-45.
 17. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; 14(11): 1568-73.
 18. Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res* 2004; 63(1): 20-31.
 19. Freitas RA. What is nanomedicine? *Nanomedicine* 2005; 51: 325-41.
 20. Govender T, Riley T, Ehtezazi T, Garnett MC, Stolnik S, Illum L, Davis SS. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm* 2000; 199 (1): 95-110.
 21. Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1805-18.
 22. Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotech* 2004; 4(5): 484-8.
 23. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol* 2010; 144(1): 51-63.
 24. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810(3): 361-73.
 25. Landry BK, Nadworny PL, Omotoso OE, Maham Y, Burrell JC, Burrell RE. The Kinetics of thermal instability in nanocrystalline silver and the effect of heat treatment on the antibacterial activity of nanocrystalline silver dressings. *Biomaterials* 2009; 30(36): 6929-39.
 26. Lightcap IV, Kosel TH, Kamat PV. Anchoring semiconductor and metal nanoparticles on a two-dimensional catalyst mat. Storing and shuttling electrons with reduced graphene oxide. *Nano Lett* 2010; 10(2): 577-83.
 27. Liu L, Liu J, Wang Y, Yan X, Sun DD. Facile synthesis of monodispersed silver nanoparticles on graphene oxide sheets with enhanced antibacterial activity. *New J Chem* 2011; 35(7): 1418-23.
 28. Ma J, Zhang J, Xiong Z, Yong Y, Zhao X. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide. *J Mater Chem* 2011; 21(10): 3350-2.
 29. Mohanty S, Mishra S, Jena P, Jacob B, Sarkar B, Sonawane A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med* 2012; 8(6): 916-24.
 30. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnol* 2005; 16(10): 2346-253.
 31. No HK, Meyers SP, Prinyawiwatkul W, Xu Z. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of food: A review. *J Food Sci* 2007; 72(5): 87-100.
 32. Ocsoy I, Paret ML, Arslan Ocsoy M, Kunwar S, Chen T, You M, Tan W. Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *ACS Nano* 2013; 7(10): 8972-80.
 33. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 2004; 339 (16): 2693-700.
 34. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(6): 1712-20.
 35. Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm* 2003; 262(1-2): 1-11.
 36. Panyam J, Williams D, Dash A, Leslie-Pelecky D, Labhasetwar V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci* 2004; 93(7): 1804-14.
 37. Perez-Diaz M, Alvarado-Gomez E, Sanchez-Sanchez R, Velasquillo C, Gonzalez C,

- Ganem-Rondero A, Martinez-Castanon G, Zavala-Alonso N, Martinez-Gutierrez F. Antibiofilm activity of chitosan gels formulated with silver nanoparticles and their cytotoxic effect on human fibroblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016; 60(1): 317-23.
38. Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1457-65.
39. Raffi M, Hussain F, Bhatti T, Akhter JI, Hameed A, Hasan MM. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E.coli* ATCC-15224. *J Mater Sci Technol* 2008; 24(2): 192-6.
40. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; 27(1): 76-83.
41. Rajalakshmi R, Indira Muzib Y, Aruna U, Vinesha V, Rupangada V, Krishna moorthy SB. Chitosan nanoparticles - an emerging trend in nanotechnology. *Int J Drug Deliv* 2014; 6(3): 204-29.
42. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size control parameters. *Progress Polymer Sci* 2011; 36(7): 887-913.
43. Slawson RM, Van Dyke MI, Lee H, Trevors JT. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid* 1992; 27(1): 72-9.
44. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski, WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 2001; 70(1-2): 1-20.
45. Sriram MI, Kanth SB, Kalishwaralal K, Gurnathan S. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine* 2010; 5: 753-62.
46. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol* 2007; 2(16): 1-6.
47. Thomas M, Klivanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003, 100(16): 9138-43.
48. Torres-Giner S, Ocio M, Lagaron JM. Development of active antimicrobial fiber based chitosan polysaccharide nanostructures using electrospinning. *Eng Life Sci* 2008; 8(3): 303-14.
49. Veerapandian M, Zhang L, Krishnamoorthy K, Yun K. Surface activation of graphene oxide nanosheets by ultraviolet irradiation for highly efficient antibacterials. *Nanotechnol* 2013; 24(39): 395-706.
50. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83(5): 761-9.
51. Zhao G, Stevens Jr SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals* 1998; 11(1): 27-32.
52. Zhu Z, Su M, Ma L, Ma L, Liu D, Wang Z. Preparation of graphene oxide-silver nanoparticle nanohybrids with highly antibacterial capability. *Talanta* 2013; 117: 449-55.

Sorumlu Yazar:

Doç. Dr. Dilşad ONBAŞLI
Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı,
Kayseri-TÜRKİYE
Tel: 03522076666/28402
Fax: 03524379169
E-posta: odilsad@gmail.com