

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORTAK EKSENLİ ELEKTRO-EĞRİLMİŞ
SIĞIR SERUM ALBUMİN NANOLİFLERİNDEN
AMPİSİLİNİN KONTROLLÜ SALIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceylan DEMİRCİ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

AĞUSTOS 2017

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Anabilimdalı Başkanı

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 151711002 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ceylan DEMİRCİ**'nin ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**ORTAK EKSENLİ ELEKTRO-EĞRİLMİŞ SIĞIR SERUM ALBÜMİN NANOLİFLERİNDEN AMPİSİLİNİN KONTROLLÜ SALIMI**" başlıklı tezi **16.08.2017** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mehmet MUTLU**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY (Başkan)**.....
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Ceylan DEMİRCİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ORTAK EKSENLİ ELEKTRO-EĞRİLMİŞ SIĞIR SERUM ALBÜMİN NANOLİFLERİNDEN AMPİSİLİNİN KONTROLLÜ SALIMI

Ceylan DEMİRCİ

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Tarih: Ağustos 2017

Bu çalışmada, doğal bir protein olan sığır serum albümin (SSA) kullanılarak kontrollü ilaç salım platformu geliştirilmiştir. İlaç yüklü amiloid benzeri Sığır Serum Albümini (AL-SSA) nanoliflerinin üretimi, modifiye ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Model ilaç olarak ise hidrofilik bir yapıya sahip olan ampisilin (Amp) seçilmiştir. Kabuk ve çekirdek çözeltileri belirli oranlarda hazırlandıktan sonra, lif üretimi iğne ucunu tıkamadan, sorunsuz ve sürekli olarak gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme sistemine sadece çekirdek çözeltisi beslenerek tekli (C) membranlar üretilmiştir. Kabuk-çekirdek şeklindeki CS1 ve CS2 membranları ise ortak eksenli elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiştir. Glutaraldehit, C membran yüzeyinde, ani salımı azaltmak için çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri; C, CS1 ve CS2 nanoliflerin yüzeylerinin pürüzsüz ve homojen olduğunu göstermiştir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ise liflerin kabuk-çekirdek yapısına sahip olduğunu

doğrulamıştır. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), AL-SSA nanolifinin, ilaç ile matris arasında hidrojen bağı oluşması nedeniyle ampisilin ile uyum sağladığını göstermiştir. Temas açısı ölçümleri sonucunda ise AL-SSA membranlarının hidrofobik karakterde olduğu görülmüştür. In vitro ilaç salım testleri, C ve GA-C membranlarının Fick taşınımına göre sıfırıncı dereceden kinetik denkleme daha uygun olduğunu; CS1 ve CS2 membranlarının ise başlangıç ani salım aşaması ve sonrasındaki sürekli salım aşamaları ile tipik iki fazlı salım davranışı sergilediğini göstermiştir. AL-SSA kaplı kabuk-çekirdek yapısındaki membranlar tekli elektro-eğrilmiş membranlarla karşılaştırıldığında, ani salım oranlarının daha az, ilaç salım sürelerinin ise daha uzun olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal aktivite testleri, ilaç yüklü nanoliflerin gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve gram negatif *Escherichia coli*'ye karşı inhibisyon bölgeleri oluşturması sonucu, elektro-eğirme işlemi sonrası ilaç etkinliğinin bozulmadığını ve membranlar içerisine yüklenen ilaç miktarının bakteri inhibisyonu için yeterli olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi, Amiloid protein, Çapraz bağlama, Fick taşınımı, İki fazlı salım

ABSTRACT

Master of Science of Philosophy

CONTROLLED RELEASE OF AMPICILLIN FROM COAXIALLY ELECTROSPUN BOVINE SERUM ALBUMIN NANOFIBERS

Ceylan DEMİRCİ

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Date: August 2017

In this study, a controlled drug release platform was developed by using natural protein, namely bovine serum albumin (BSA). Drug-loaded amyloid-like Bovine Serum Albumin (AL-BSA) nanofibers were prepared by modified coaxial electrospinning process. A hydrophilic drug, ampicillin (Amp) was selected as a model drug. After the shell and core solutions prepared at certain rates, fiber production has been carried out smoothly and continuously without any plugging on the needle tip. By single-needle electrospinning of the core, core (C) membranes were produced and two types of core/shell membranes were produced via coaxial electrospinning: Core/shell 1 and Core/shell 2 (CS1 and CS2). Glutaraldehyde was used as a cross-linking agent for C membranes (GA-C) to reduce the burst release. Scanning electron microscopy (SEM) images demonstrated that C, CS1 and CS2 nanofibers were smooth and homogeneous. Transmission electron microscopy (TEM) verified that the membranes consisted of nanofibers with core-shell structure. Fourier transform infrared spectra (FTIR) of drug-loaded AL-BSA nanofiber showed that both the shell and the core matrix had good compatibility with Amp due to the formation of hydrogen bond between drug and matrix. The contact angle

measurements showed that AL-BSA membranes were hydrophobic character. In vitro Amp release tests showed that C and GA-C followed Fickian transport, which was close to zero-order kinetics whereas CS1 and CS2 showed typical biphasic release behaviors, including the initial burst release and the sustained release stages. Nanofibers produced by core-shell electrospinning compared to single electrospinning, AL-BSA coated core-shell nanofibers had less initial burst release and longer drug release periods. The results from the zone of inhibition test of the AL-BSA against both gram-positive *Staphylococcus aureus* and gram-negative *Escherichia coli* indicated that the released ampicillin retained its effectiveness after the electrospinning process and the amount of drug in the AL-BSA membrane was sufficient for bacterial inhibition.

Keywords: Coaxial electrospinning, amyloid-like protein, cross-linking, Fickian transport, biphasic release.

TEŞEKKÜR

İlk olarak değerli bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına destek olması, yüksek lisans tezimi planlayıp yol göstermesi ve bizlere elindeki tüm imkanlarını sunmasından ötürü danışman hocam Prof. Dr. Mehmet MUTLU'ya teşekkür ederim.

Tez jürime katılmayı kabul eden TOBB ETU Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fatih BÜYÜKSERİN'e

Tez çalışmalarım boyunca kıymetli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve yine tez jürime katılmayı kabul eden Çankırı Karatekin Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY'a,

Antimikrobiyal analizler için bana her türlü yardımı ve desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Araştırma Görevlisi Dr. Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN'a,

Teknoloji merkezinde yer alan imkanları tüm öğrencilerine sunan ve yüksek lisansım boyunca bana burs sağlayan TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi'ne desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca okul hayatımı daha eğlenceli kılan, gücümün azaldığı noktada fikirleri ve teknik destekleriyle işleri benim için kolaylaştıran, moralimin bozulduğu her an yanımda olan, her türlü sıkıntımı paylaşabildiğim değerli arkadaşlarım Abdullah EYİDOĞAN, Anıl UZUN, Merve ÇELİK ve Pınar ALPASLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, hayatımın her aşamasında aldığım kararları destekleyen ve arkamda olan, şefkatlerini ve anlayışlarını hiç eksik etmeyen annem, babam ve tatlış kardeşlerime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Kontrollü İlaç Salımı	3
2.1.1 Kontrollü salım sistemlerinin tanımı.....	3
2.1.2 Kontrollü salım sistemi	4
2.1.3 Kontrollü salım sisteminin temeli	5
2.2 Kontrollü Salım Mekanizmaları.....	7
2.2.1 Difüzyon kontrollü salım sistemleri.....	7
2.2.2 Şişme kontrollü salım sistemleri	8
2.2.3 Kimyasal kontrollü salım sistemleri	9
2.3 Elektro-Eğirme Sistemi	11
2.3.1 Elektro-eğirme sisteminin çalışma prensibi	11
2.3.2 Elektro-eğirme işlemini etkileyen parametreler.....	12
2.3.2.1 İşlem parametreleri.....	12
2.3.2.2 Çözelti parametreleri.....	14
2.3.2.3 Çevresel faktörler	14
2.3.3 Elektro- eğirme türleri.....	15
2.4 Ortak Eksenli Elektro-Eğirme Sistemi	16
2.4.1 Çalışma prensibi.....	16
2.4.2 Ortak eksenli liflerin ilaç salım çalışmalarında kullanımı	18
2.5 Kullanılan Polimer ve Aktif Ajan	19
2.5.1 Biyomalzemeler	19
2.5.1.1 Sığır serum albümin ve amiloid dönüşümü	20
2.5.1.2 Aktif ajan olarak ampisilin.....	21
3. DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
3.1 Gereçler	23
3.1.1 Kimyasal maddeler	23
3.1.2 Aletler ve cihazlar	23
3.1.2.1 Ortak eksenli elektro-eğirme sistemi	23
3.1.2.2 Ultraviyole-Görünür (UV-Gör) bölge spektroskopisi.....	26
3.2 Yöntemler.....	26
3.2.1 Ön çalışmalar	26

3.2.1.1 Çözelti hazırlama.....	27
3.2.1.2 Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ve membran üretimi.....	28
3.2.2 Yüzeyde çapraz-bağ oluşturulması	29
3.2.3 Nanoliflerin karakterizasyonu	29
3.2.3.1 Optik (ışık) mikroskobu analizi.....	29
3.2.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....	30
3.2.3.3 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi.....	30
3.2.3.4 Fourier transform infrared spektroskopi (FTIR) analizi	31
3.2.3.5 Termal analiz.....	31
3.2.3.6 Temas açısı ölçümü	31
3.2.4 İlaç salım çalışmaları.....	31
3.2.5 Antimikrobiyal aktivite analizi.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1 Ön Çalışmalar Kapsamında Ulaşılan Sonuçlar	35
4.1.1 Protein çözeltilerinin hazırlanması ve amiloid formun elde edilmesi.....	35
4.1.2 Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile amp-ssa membranlarının üretimi	36
4.2 Guluteralehit ile Çapraz Bağ Oluşturma Çalışması Sonuçları	40
4.3 Nanoliflerin Yapı ve Morfolojisi.....	41
4.3.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analiz sonuçları	41
4.3.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analiz sonuçları	45
4.3.3 Fourier transform infrared spektroskopi (FTIR) analiz sonuçları.....	46
4.3.4 Termal analiz sonuçları	47
4.3.5 Temas açısı ölçüm sonuçları	49
4.4 Salım Testi sonuçları	50
4.5 Nanoliflerin Antimikrobiyal Aktiviteleri	53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Kandaki ilaç derişiminin zamanla değişiminin karşılaştırılması; a) ani salım, b) klasik dozaj alım şekli, c) enjeksiyon yöntemiyle alım, d) kontrollü salım sistemleri.....	5
Şekil 2.2 : Elektro-eğirme kurulumunun şematik gösterimi	12
Şekil 2.3 : Taylor konisinin voltaj artışına bağlı değişimi	13
Şekil 2.4 : (A) emülsiyon elektro-eğirme işlemi ve (B) ortak eksenli elektro-eğirme işleminin şematik gösterimi	15
Şekil 2.5 : Ortak eksenli elektro- eğirme işlemi kurulumunun şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.6 : Ortak eksenli elektro-eğirme işleminde Taylor Konisi oluşumu.....	18
Şekil 2.7 : Sığır serum albümin.....	20
Şekil 2.8 : Ampisilinin kimyasal yapısı	21
Şekil 3.1 : Ortak eksenli elektro-eğirme düzeneği	24
Şekil 3.2 : Ortak eksenli iğne taslağı.....	25
Şekil 3.3 : Ortak eksenli elektro-eğirme iğnesi; Yandan görünüm (A), Alttan görünüm (B)	25
Şekil 3.4 : UV-Görünür spektrofotometre cihazı.....	26
Şekil 3.5 : Ampisilin kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 4.1 : AL-SSA çözeltisiyle hazırlanan membranın Kongo kırmızısı boya ile boyama öncesi (a), sonrası görüntüleri (b) ve doğal haldeki SSA çözeltisinin Kongo kırmızısı boya ile boyama görüntüsü (c)	36
Şekil 4.2 : Çalışmada kullanılan ortak eksenli elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi.....	37
Şekil 4.3 : Voltajın lif çapına ve dağılımına etkisine ait optik mikroskop görüntüleri (a) 15 kV, (b) 21 kV, (c) 18 kV.....	39
Şekil 4.4 : Çapraz bağ oluşturulmuş C membranlarına ait SEM görüntüsü	41
Şekil 4.5 : C membranlarına ait SEM görüntüsü a) 20 000X, b) 10 000X, c) 5 000X ve d) lif çapı grafiği.....	42
Şekil 4.6 : CS1 membranlarına ait SEM görüntüsü a) 20 000X, b) 10 000X, c) 5 000X ve d) lif çapı grafiği.....	43
Şekil 4.7 : CS2 membranlarına ait SEM görüntüsü a) 20 000X, b) 10 000X, c) 5 000X ve d) lif çapı grafiği.....	44
Şekil 4.8 : Membranların lif çapları	45
Şekil 4.9 : Membranlara ait kabuk-çekirdek yapısını gösteren TEM görüntüleri a) CS1 , b)CS2.....	45
Şekil 4.10 : Saf Amp, AL-SSA, C, CS1 ve CS2 membranlarının ATR-FTIR spektrumu	47
Şekil 4.11 : AL-SSA, Amp-SSA ve Amp örnekleri için a) TGA, b) DTGA, c) DSC eğrileri	48

Şekil 4.12 : AL-SSA, C, CS1 ve CS2 membranlarına ait temas açısı sonuçları.....	49
Şekil 4.13 : C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının ilk 4 saat boyunca in vitro ilaç salım profili	51
Şekil 4.14 : C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının 48 saatlik in vitro ilaç salım profili	51
Şekil 4.15 : NC membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a0) <i>S.aureus</i> , b0) <i>E.coli</i>	54
Şekil 4.16 : C membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a1) <i>S.aureus</i> , b1) <i>E.coli</i>	54
Şekil 4.17 : GA-C membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a2) <i>S.aureus</i> , b2) <i>E.coli</i>	55
Şekil 4.18 : CS1 ve CS2 membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a3) CS1 için <i>S.aureus</i> , a4) CS2 için <i>S.aureus</i> , b3) CS1 için <i>E.coli</i> , b4) CS2 için <i>E.coli</i>	56



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1 : Membran üretimi için kullanılan elektro-eğirme parametreleri ve çözelti viskoziteleri.....	39
Çizelge 4.2 : C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının regresyon denklemleri ve korelasyon katsayısı (R^2).....	52



KISALTMALAR

AL-SSA	: Amiloid benzeri sığır serum albumin
Amp	: Ampisilin
β-ME	: Beta merkaptoetanol
BHA	: Brain heart agar
BHB	: Brain heart brotth
C	: Tekli membranlar
CS1	: Ortak eksenli membran 1
CS2	: Ortak eksenli membran 2
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GA-C	: Çapraz bağlı membranlar
SSA	: Sığır serum albümin
PBS	: Tamponlanmış fosfat solüsyonu
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TFE	: Trifluoroetanol
TGA	: Termal gravimetrik analiz
UV-Vis	: Ultraviyole görünür bölge spektroskopisi

1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı

İlaç salım sistemleri kimyasal bir uyarıya cevap olarak ilacın serbest bırakıldığı sistemlerdir. Bu sistemler, ilaç etken maddesi ve etken maddenin salımını düzenleyen destek malzemesi olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Kontrollü salım sistemleri ise etkin maddenin bölgesel veya sistematik olarak önceden belirlenmiş oranlarda ve belirli zaman aralıklarında salım yapmasını sağlamaktadır [1-4].

Geçmiş yıllarda, ilaç salım sistemlerinde kolay işlenebilme, enzimatik proseslerden etkilenmeme vb. gibi özellikleri nedeniyle, destek malzemesi olarak polikaprolakton, polilaktik-ko-glikolik asit, polietilenglikol, polivinilalkol ve poliüretan gibi biyobozunur sentetik polimerler tercih edilmiştir [5].

Fakat günümüzde, destek malzemesi olarak biyoaktif/biyofonksiyonel olmaları, biyolojik ve kimyasal olarak doğal dokulara benzerlikleri, toksisiteye sahip olmamaları nedeniyle aljinat, jelatin, nişasta, kollajen, kitin ve kitosan gibi biyobozunur doğal polimerler tercih edilmektedir [5, 6].

Doğal polimerlerin ilaç salım çalışmalarına kullanılması; sulu çözelti içerisinde dondurarak kurutma/çapraz bağlama veya elektro-eğirme ile lif üretimi gibi sınırlı sayıda teknik ile mümkün olmaktadır [7].

Elektro-eğirme yöntemi, çeşitli polimer çözeltilerinden lif elde etmeye yarayan basit bir tekniktir. Bu yöntem ile üretilen lifler, klasik eğirme işlemleri ile elde edilen lifler ile karşılaştırıldığında daha ince lif çapına; bunun sonucunda ise daha büyük yüzey alanına sahip olduğu görülmektedir [8-12]. Lif çapının azalması, ilaç boyutlarının yüzey alanlarının artışı sağlamakta olup, ilaç moleküllerinin çözünme hızlarını

arttırmaktadır. Ayrıca ilaçlar ya da aktif bileşenler, taşıyıcı polimerlere elektro-eğirme yöntemi ile kolaylıkla yüklenebilmektedir [13].

Elektro-eğrilmiş lifler ile yapılan birçok ilaç salım çalışması, tekli elektro-eğirme ile üretilen liflerin, yüzeylerinde yüksek oranda ilaç bulundurmaları nedeniyle, ani salımın orantısal olarak yüksek olduğunu ortaya koymuştur [14, 15]. Bununla birlikte, modifiye bir yöntem olan ortak eksenli elektro-eğirme yöntemi iç içe geçmiş iğneler ile polimerin kabuğa, etken maddenin ise çekirdeğe beslenerek kabuk-çekirdek yapısında lif üretimi sağlamaktadır. İlaç bir kabuk tarafından çevrelendiği için, ortak eksenli elektro-eğirme ile üretilen lifler, ani salımı büyük ölçüde azaltmaktadır [16]. Ani salımın engellenmesinde, toksisite ve biyolojik uyumluluğun azaltılması gibi bazı dezavantajlarına rağmen kullanılan bir başka yöntem ise membran yüzeylerinde çapraz bağ oluşturulmasıdır [17].

Bu tez çalışmasında ortak eksenli elektro-eğirme yöntemi ile üretilen membranların ilaç salım davranışları incelenmiş ve elde edilen sonuçlar, tekli elektro eğirme ile üretilen normal ve yüzeyinde çapraz bağ oluşturulmuş membranların ilaç salım davranışları ile karşılaştırılmıştır. Ortak eksenli elektro-eğirme işleminde destek malzemesi olarak tamamen doğal bir protein olan Sığır Serum Albumin (SSA); etken madde olarak ise hidrofilik bir antibiyotik olan Ampisilin kullanılmıştır. Normal şartlarda elektro-eğirme özelliği olmayan SSA, çeşitli çözücülerle amiloid forma dönüştürülmüş ve ardından elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Üretilen membranlardan salınan ilaç miktarları UV spektrofotometre ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler Ritger ve Peppas denkleminde yerine konularak, membranların ilaç salım davranışları incelenmiştir. Salınan ilaçların aktiviteleri, biri gram negatif diğeri gram pozitif olan *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı test edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kontrollü İlaç Salımı

2.1.1 Kontrollü salım sistemlerinin tanımı

Canlı için gerekli olan etken maddenin hedef bölgeye, salım hızını kontrollü olarak ulaştıran sistemler “*kontrollü salım sistemleri*” olarak adlandırılır. Başka bir deyişle, kontrollü salım sistemleri ilacı taşıyan ve taşıdıkları ilacı salım hızını ve süresini çeşitli değişkenler yardımıyla kontrol eden uygulamalardır. Bu sistemlerin temel amacı; ilaç dozunu minimuma indirmek, doz alım aralığını uzatmak, hastanın ilacın sahip olduğu yan ve zararlı etkilerden minimum düzeyde etkilenmesini sağlamak ve hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır [18]. Klasik ilaç kullanım şekillerinde ortaya çıkan sorunların giderilmesi için bu alanda yapılan araştırma ve geliştirmeler hız kazanmıştır. Bunun sonucunda ise geliştirilen bu sistemler kısa zaman içerisinde kardiyoloji, oftalmoloji, endokrinoloji, onkoloji ve immünoloji dahil olmak üzere tıbbın birçok alanında kullanılmaktadır.

İlaç salım sistemlerinin son yıllarda bu denli hızlı gelişmesinin nedeni sahip olduğu avantajların yanında yeni ilaç arayışlarının geliştirme sürecinin çok uzun olmasından da kaynaklanmaktadır. Yeni bir ilaç üzerindeki çalışmalar ve patentinin alınmasının 10 yıldan daha uzun sürmektedir ki bu durum da ilaç firmaları araştırmacılarını, var olan ilaçların kullanım ömrünü ve etkinliğini uzatmaya yönlendirmiştir. Bu alanda üretilen ilk ticari ürün olan Spansules®’dir. 1950’li yılların başında geliştirilen bu ilaç oral yolla alınan ilaçların etki süresini uzatmak için tasarlanmıştır. Bu çalışma sonucunda ilaç kaplama kalınlıkları değiştirilerek, kaplama yapılan ilacın salım süresinin değiştirilebildiği gösterilmiştir ve elde edilen formülasyon “geciktirilmiş salım ürünleri” olarak adlandırılmıştır [19].

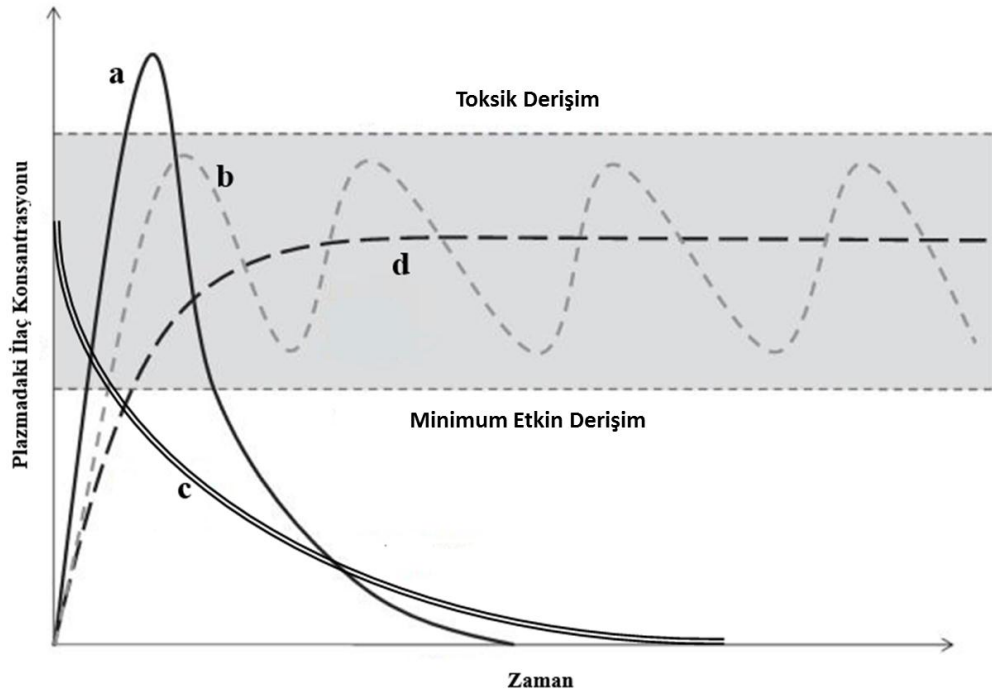
2.1.2 Kontrollü salım sistemi

Tabletlerin ağızdan alımı ya da enjeksiyon şeklinde vücuda verilmesi sıklıkla kullanılan ilaç alım yöntemleridir. Bu tip ilaç alımları ile plazmadaki ilaç seviyesi sabit bir düzeyde tutulamamaktadır. Bunu engellemek için ise ilacın sık ve tekrarlanan dozlarda alınması gerekmektedir. Kandaki ilaç düzeyinin zamana karşı değişimini gösteren Şekil 2.1'deki grafik incelendiğinde;

tek seferde yüksek dozda alınan ilacın plazmadaki seviyesi “a” eğrisi ile gösterilmektedir. İlaç alımını takiben, başlangıçta kandaki ilaç derişiminin zamanla artarak toksik seviyeye geçtiği görülmektedir. Daha sonra ise derişim zamanla azalmaya başlar. Alışılmış dozaj şekillerinde alınan ilacın plazmadaki durumu ise “b” eğrisinde gösterilmektedir. İlaç ilk alındığında plazmadaki oranı yavaş yavaş artar, daha sonra derişim düşmeye başlar. Yeni doz uygulamasıyla beraber oran tekrar artmaya başlar ve etkin madde-plazma düzeyi etkili alanda tutulmaya çalışılır, tedavi ancak bu işlemin birçok defa tekrarlanmasıyla sağlanabilir. Bu tip alımlarda toksik seviyeye geçilmesini engellemek için bir sonraki dozun zamanlamasının çok iyi yapılması gerekmektedir. “c” eğrisi ise kana direkt verilen enjeksiyon ile alımı göstermektedir.

Derişimin düşme süresi, ilacın metabolize edilme, parçalanma ya da etki alanından uzaklaşma gibi nedenlerle vücuda yararsız hale gelme hızına bağlıdır, bu nedenlerden dolayı ilacın kan plazmasındaki derişimi etkin düzeyin altına düşebilir veya güvenilir düzeyin (toksik bölge) üzerine çıkabilir.

Minimum toksik derişiminin üstünde yer alan bölgeler kullanılmamış ilaç miktarını ifade etmektedir ki bu durum, hastada istenmeyen yan etkilere neden olur [19].



Şekil 2.1 : Kandaki ilaç derişiminin zamanla değişiminin karşılaştırılması; a) ani salım, b) klasik dozaj alım şekli, c) enjeksiyon yöntemiyle alım, d) kontrollü salım sistemleri [20].

Klasik alım yöntemlerinin aksine kontrollü salım sistemlerinde ilaç, belirli bir dozda alındıktan sonra etkin madde, sürekli olarak sisteme salındığı için plazma düzeyinde istenilen sürede sabit kalır. Bu sayede tedavi sonlanıncaya kadar ikinci bir uygulama yapılmasına gerek kalmaz. Plazmanın etkin madde düzeyi değişmediği için de tedavi düşük dozda ve aynı seviyedeki aktif madde ile sağlanmış olur.

2.1.3 Kontrollü salım sisteminin temeli

Kontrollü ilaç salımı teknolojinin ve bilimin hızla gelişen ve yenilenen bir alanıdır. Biyoloji, fizik, kimya, tıp ve malzeme bilimlerin derinlemesine anlaşılmasını içeren bir sentez bu alan için gereklidir. İlaçtan faydalı yararlanımı artırdıkları ve toksik etkiyi azalttığı için kontrollü ilaç salımı geleneksel ilaç alım yöntemlerinden daha avantajlıdır. Yapay polimerler bu sistemlerde sıklıkla ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır. Kontrollü ilaç salımının ortak ilkesi ve temel hedefi ilaç kullanımının etkinliğini artırmaktır. İlaç ve taşıyıcısı olarak kullanılan polimer ve lipozom vb. birimler arasındaki uyumluluk kontrollü ilaç taşıma sistemlerinin başarısını etkileyen en temel etmenlerden biridir. Bu etkileşimler incelendiğinde, birincil bağıntıların

iyonik, kovalent ve metalik bağlar gibi güçlü olduğu görülür [21]. Uyumluluk ise esasen ilaç ve taşıyıcısı arasındaki ikincil bağıntılara işaret eder. Bu ikincil etkileşimler birincil etkileşimler ile karşılaştırıldıklarında bağ kuvvetleri oldukça zayıftır. Bu ikincil etkileşimlerin birçok türü vardır [22, 23] :

İyonik Etkileşimler: İyonlar veya moleküller birbirleri arasında tam kalıcı yükler oluşturduklarında katyon (pozitif yüklü parçacık) ile anyon (negatif yüklü parçacık) arasındaki ilgi ile oluşur. Elektronlar paylaşılmadığı veya elektron alışverişi yapılmadığı için iyonik bağ veya kovalent bağ olarak nitelendirilemez.

Van der Waals Kuvvetleri: Farklı atomlardaki tekdüze olmayan yük dağılımlarının bir neticesi olarak gözlemlenir. Bir atomun elektron dağılımındaki anlık rastgele dalgalanmaların bir sonucu dipol oluşumudur. Dipol oluşumu London Dağılım Kuvvetlerini, uyarılmış dipol-dipol etkileşimlerini ve dipol-dipol etkileşimlerini içeren bir yapılanmadır. Dipol-dipol etkileşimleri moleküllerdeki kalıcı dipoller arasında oluşur. Uyarılmış dipol-dipol etkileşimleri kalıcı bir dipol olmayan kutuplanmamış bir molekül ile bir kalıcı dipol oluşturmuş bir molekül arasında oluşur. Bu türden bir etkileşimde kutuplanmamış olan molekül kalıcı dipol yönünde veya aksine kutuplanarak uyarılmış olur. London Dağılım Kuvvetleri ise iki uyarılmış dipol molekül arasında oluşan kuvvetlerdir.

Hidrojen Bağı: Bir elektron paylaşımı veya alışverişi olmamasına rağmen bağ olarak adlandırılır. Lakin bir kimyasal bağ değil, ikincil etkileşimlerin bir alt türüdür. Elektro negativitesi yüksek flor, oksijen, klor, azot ve sülfür gibi atomlar ile yarı pozitif olarak nitelendirilebilecek hidrojen atomu arasında oluşan özel bir tür dipol-dipol etkileşimdir.

Hidrofobik etkileşimler: Kutuplaşmamış moleküller arasında oluşan herhangi bir dipole momenti veya iyon etkisi içermeyen etkileşimlerdir. Diğer bir deyişle kutupsuz moleküllerin sulu çözeltilerde suyu dışa iterek birbirlerine doğru birikme eğilimidir [23].

Kontrollü ilaç salım sistemleri ile ilacın salım yeri veya salım periyodu düzenlenebildiği gibi iki avantaj birlikte de kullanılabilir. Bir başka deyişle ilaç salımı uzaysal ve/veya zamansal olarak kontrol edilebilir. Salım periyodunun

kontrolü için; ilacın etken maddesinin korunarak, etken maddenin hasta bünyesinde hızla çözülerek metabolize olması veya vücuttan uzaklaştırılmasının önüne geçilmesi örnek verilebilir. İlacın etken maddesinin korunması hem ilacın difüzyonunun yavaşlatılması hem de çözülmesinin geciktirilmesi şeklinde olabilir. Hızlı metabolizmaya uğrayan veya vücuttan atılan ilaçlar için salımın periyodunun genişletilmesi faydalıdır. İlacın salım yerinin kontrolü için ise ilacın salımının vücudun belli bir yerine hedeflenmesi amacıyla ilaç salım mekanizması içeren implantın ilgili bölgeye yerel olarak yerleştirilmesi örnek verilebilir [24]. Doku iskeleleri de ilaç salım sistemlerinde kullanılmak üzere uygun bir şekilde tasarlanıp değerlendirilebilir. Bu iskeleler, bir yandan dokuya mekaniksel destek verip dokunun büyüüp gelişmesine yardım ederken, diğer yandan bu tedaviyi destekleyecek ilaçların veya büyüme faktörlerinin salımı için kullanılabilir [25]. Bu uzaysal ve zamansal kontrolü sağlayabilmek için kontrollü salım mekanizmalarının derinlemesine incelenmesi gerekmektedir.

2.2 Kontrollü Salım Mekanizmaları

Salım süreci bir takım mekanizmalar ile açıklanabilir. Yüksek başarımlı bir ilaç taşıma sisteminin tasarlanması için bu mekanizmaların ve bu mekanizmaları etkileyen parametrelerin tanımlanması ve anlamlandırılması gerekmektedir. İlacın salım sürecinde genellikle birden fazla mekanizma etkin rol alır. Salım sürecinin farklı periyotlarında farklı mekanizmalar salımın karakteristiğinde baskın etki gösterebilir [26]. Bu mekanizmalar kovalent bağların kopması, şişme, geri dönebilir ilaç-polimer etkileşimleri veya difüzyon olarak temelde sıralanabilir [27].

2.2.1 Difüzyon kontrollü salım sistemleri

İlaç salımında kullanılan matriks porlu bir yapıya sahipse ve bu porlar ilacın üç boyutlu moleküler yapısından daha büyük ise difüzyon katsayısı ilacın salım mekanizmasında oldukça etkin ve baskın bir rol alır. Diğer yandan matriks porsuzsa veya porlar ilacın moleküler yapısından küçük ise ilacın difüzyon yolu uzayacağı için difüzyon katsayısı azalır ve difüzyonun ilacın salım sürecindeki etkisi zayıflar.

Eğer ki sistem ilacın polimer içerisinde kılıflanması şeklinde ve sistem kararlı yapıda ise (steady state), Fick'in ilk difüzyon kanunu ilacın membrandan salım profilini tanımlamak için kullanılabilir.

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (2.1)$$

J: İlacın akısı [mol/(m²s)], D: Difüzyon katsayısı (m²/s), x: Konum (m) ve C: İlacın konsantrasyonu (mol/m³) olarak tanımlanmıştır.

Eğer ki sistem ilacın polimer içerisinde hapsedilmesi şeklinde, ilaç tekdüze dağılım göstermiş ve ilaç konsantrasyonu zaman ile değişmekte ise (unsteady state), Fick'in ikinci difüzyon kanunu ilacın membrandan salım profilini tanımlamak için kullanılabilir [27].

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

t: Zaman (s), D: Difüzyon katsayısı (m²/s), x: Konum (m) ve C: İlacın konsantrasyonu (mol/m³) olarak tanımlanmıştır [27].

Eğerki ilacın salım hızı ilacın konsantrasyonuna bağlı değil ise sıfırıncı dereceden difüzyon kinetiği ilacın membrandan salım profilini tanımlamak için kullanılabilir. Sıfırıncı dereceden ilaç salım eşitliği aşağıda verilmiştir [28].

$$C = C_0 + K_0 t \quad (2.3)$$

C: Salınan ilaç miktarı (mol/m³), C₀: Başlangıçta ortamdaki ilaç miktarı (mol/m³) (genellikle sıfırdır), K₀: Sıfırıncı dereceden kinetik sabiti [mol/(m²s)], t: Zaman (s) [28].

Eğerki ilacın salım hızı ilacın konsantrasyonuna bağlı ise birinci dereceden difüzyon kinetiği ilacın membrandan salım profilini tanımlamak için kullanılabilir. Birinci dereceden ilaç salım eşitliği aşağıda verilmiştir [29].

$$\ln(C) = \ln(C_0) - kt \quad (2.4)$$

C: Salınan ilaç miktarı (mol/m³), C₀: Başlangıçta ortamdaki ilaç miktarı (mol/m³) (genellikle sıfırdır), k: Birinci dereceden kinetik sabiti [mol/(m³s)], t: Zaman (s) [29].

Higuchi eşitliği difüzyona bağlı ilaç salım profilini tanımlamak için kullanılabilir [30].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H t^{1/2} \quad (2.5)$$

M_t: Belirli bir zamana kadar salınan ilaç miktarı (mol/m³) t: Zaman (s), M_∞: Salınan tüm ilacın miktarı (mol/m³) ve K_H: Higuchi sabiti (s^{-1/2}) [30].

Son olarak, Korsmeyer-Peppas eşitliği difüzyona bağlı ilaç salım profilini tanımlamak için kullanılabilir [31].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad (2.6)$$

M_t: Belirli bir zamana kadar salınan ilaç miktarı (mol/m³) t: Zaman (s), M_∞: Salınan tüm ilacın miktarı (mol/m³), n: İlaç salımın mekanizmasını işaret eden salım sembolü ve k: Sistemi tanımlayan yapısal/geometrik bir sabit (s⁻ⁿ) [30]. İlaç salım matrisleri için ayırık salım mekanizmalarına ve geometrilerine sahip çeşitli n değerleri mevcuttur [27]. Korsmeyer-Peppas eşitliği için ilacın homojen olarak dağıldığı kabul edilmektedir. Ayrıca optimum salım ortamı ve sabit difüzyon akısı diğer kabuller arasındadır [31, 32].

Difüzyon kontrollü ilaç salımında salınan ilaç miktarını ve salım hızını birçok etmen etkiler. En belirgini ilaç ve taşıyıcı polimer arasındaki birincil ve ikincil etkileşimlerdir. Bir diğeri ise ilaç salım sisteminin kullanılacağı ortamın ilaç salım sistemi içerisine yayılma kabiliyetidir. Son olarak ilacın salındığı ortamdaki çözülebilme yeteneği önemlidir [33].

2.2.2 Şişme kontrollü salım sistemleri

İlaç salım sistemlerinde kullanılan camsı faz özelliğinden kauçuksu faz özelliğine geçiş gösterirken şişme kontrollü davranan polimerler olabilirler. Kauçuksu fazda

ilaç molekülleri hızlı difüzyon yapabilirken, camsı fazda ilaç molekülleri hareketsizdir. Bu tür sistemlerde, salım profili jelin şişme hızına bağlıdır. Sistem difüzyon kontrollü iken ilacın difüzyon periyodu, hız sınırlayıcı basamaktır. Sistem şişme kontrollü iken ise gevşeme [relaxation (λ)] hız sınırlayıcı basamaktır.

Eğer sistem hem difüzyon kontrollü hem de şişme kontrollü ise Korsmeyer-Peppas eşitliğinin bir uyarlaması sistemi tanımlamak için uygun olabilir.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (2.7)$$

M_t : Belirli bir zamana kadar salınan ilaç miktarı (mol/m^3) t: Zaman (s),
 M_∞ : Salınan tüm ilacın miktarı (mol/m^3), k_1*t^m : İlaç salım mekanizmasına difüzyonun etkisi ve k_2*t^{2m} : İlaç salım mekanizmasına şişmenin etkisi k_1 ve k_2 : Sistemi tanımlayan yapısal/geometrik birer sabit (s^{-n}) [27].

2.2.3 Kimyasal kontrollü salım sistemleri

Difüzyon ve şişme kontrolü genellikle ilacın salınacağı ortam ile aynı polariteye (karakteristiğe)sahip olduğu kontrollü ilaç salım sistemlerinde baskın olan mekanizmalardır. İlacın salınacağı ortam ile karakteristiğinin farklı olduğu durumlarda ilacın salınacağı ortamda çözülmesi zorlaşır. Bu tarz durumlarda ilacın salımında baskın olan mekanizma ilacı taşıyan polimerin kimyasal bozunması süreci olmaktadır [33].

Kimyasal kontrollü ilaç salımı temelde iki türe ayırmak mümkündür.

Kinetik kontrollü salım: Bu mekanizmada difüzyonun etkisi yok denecek kadar az kabul edilir ve polimerin bozunması hız belirleyici basamaktır.

Reaksiyon-Difüzyon kontrollü salım: Bu mekanizmada difüzyonun etkisi ihmal edilmez, böylece hem difüzyon hem de polimerin bozunması hız belirleyici basamaklar olarak kabul edilir [27].

Hopfenberg eşitliği matriks erozyonuna bağlı sistemlerde salım profilini tanımlamada kullanılabilir. Bu eşitlik yüzeyden bozunan (surface eroding) silindirik

matrikslerin salım profilini tanımlı bir başlangıç boyutunu (a_0) kullanarak tanımlar [27].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{k_\alpha t^n}{C_0 a_0} \right) \quad (2.8)$$

M_t : Belirli bir zamana kadar salınan ilaç miktarı (mol/m^3) t: Zaman (s),
 M_∞ : Salınan tüm ilacın miktarı (mol/m^3), n: İlacın dik salım doğrultuları sayısı,
 C_0 : Başlangıçtaki ilaç konsantrasyonu (mol/m^3), k_α : Bozunma Sabiti, a_0 : ilaç salım matrixinin başlangıç boyutu (küresel veya silindirik geometri için yarıçap; plaka için yarı kalınlık) [27].

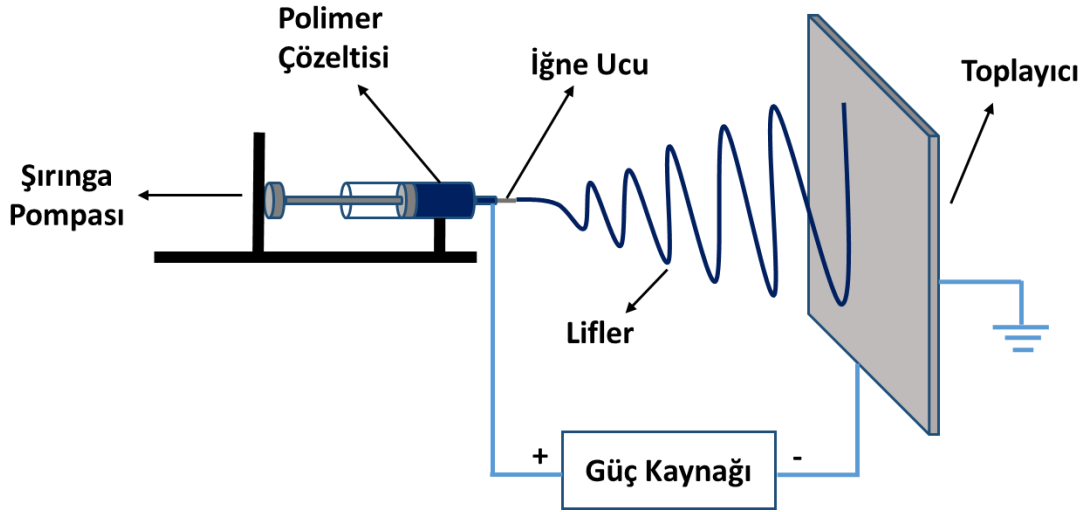
2.3 Elektro-Eğirme Sistemi

Elektro-eğirme sistemi, lif yapıdaki ilaç salım sistemlerinin üretiminde kullanılan yöntemlerden birisidir. İlaç yüklü polimer çözeltiler, uygulanan elektriksel kuvvet yardımıyla nanometre çapında liflere dönüştürülür. Üretim, düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir ve ilave ıslak-kimya işlemlerine ihtiyaç duyulmaz [34].

2.3.1 Elektro-eğirme sisteminin çalışma prensibi

Bu yöntemde, polimer çözeltisi veya polimer eriyiğinden oluşan sıvı damlacıklarına yüksek gerilim uygulanır. Uygulanan gerilim sıvı damlacıkları arasında elektrostatik bir itme kuvvetine neden olurken; sıvı damlacığı ile zıt yüklü toplayıcı arasında elektrostatik bir çekme kuvveti oluşturur. Uygulanan voltaj arttırıldıkça, meydana gelen bu kuvvetler, yüzey gerilimini yenebilecek büyüklüğe ulaşır ve iğne ucunda Taylor konisi oluşumuyla sonuçlanır. Taylor konisinden toplayıcıya doğru lif jeti oluşur ve lif üzerinde kalmış olabilecek çözelti, lif jeti toplayıcıya ulaşınca kadar buharlaşır. Sonuç olarak, katı formdaki nano boyutlardaki polimer lifleri toplayıcı üzerinde birikir.

Şekil 2.2'de, yatay konumlandırılmış elektro-eğirme düzeneği gösterilmektedir.



Şekil 2.2 : Elektro-eğirme kurulumunun şematik gösterimi.

Bu ölçekteki biyomalzemelerin basit bir şekilde üretilmesi, doku mühendisliği ve ilaç salım uygulamalarında elektro-eğirme yöntemine ilgi duyulmasına neden olmuştur [35].

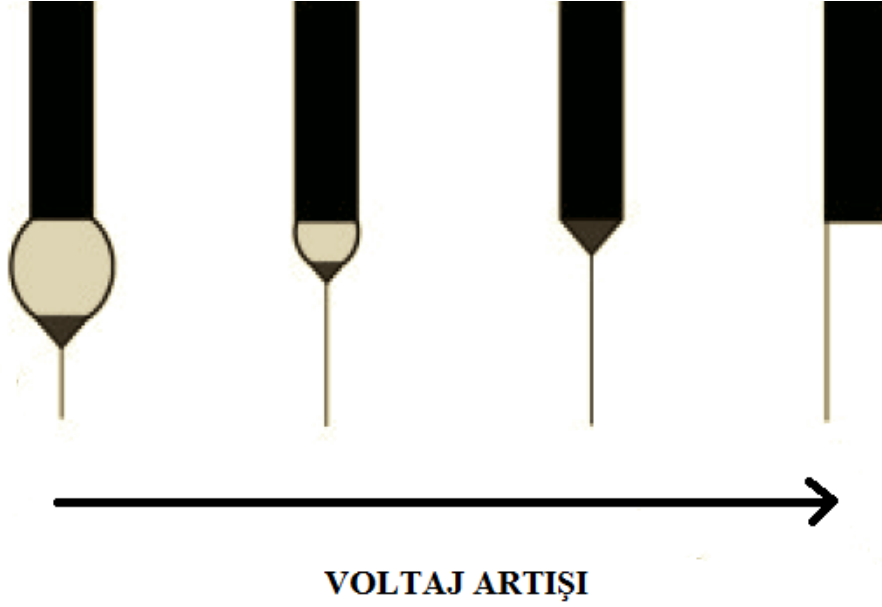
2.3.2 Elektro-eğirme işlemini etkileyen parametreler

İşlem parametreleri, çözelti parametreleri ve çevresel faktörler elektro-eğirme işlemini etkileyen başlıca faktörlerdir.

2.3.2.1 İşlem parametreleri

Liflerin kalitesini etkileyen işlem parametreleri şu şekilde sıralanabilir;

Uygulanan Voltaj: İğne ucuna uygulanan voltaj Taylor konisi oluşumunu etkiler. Voltaj büyüklüğü kritik gerilimden düşük olduğunda, Taylor konisi, bunun sonucunda ise lif jeti uygun şekilde oluşturulmaz. Voltaj büyüklüğü kritik voltaj değerinin çok üzerinde ise Taylor konisi dengesizleşir ve lif oluşumu yerini partikül oluşumuna bırakır. Voltaj etkisinin lif morfolojisi üzerine etkisi incelendiğinde ise artan voltaj ile lif çapının azaldığı gözlenmiştir [36].



Şekil 2.3 : Taylor konisinin voltaj artışına bağlı değişimi [37].

Akış Hızı: İşlem sırasında Taylor konisinin sürekliliği için sisteme beslenen polimer çözeltisi yeterli miktarda olmalıdır. Akış hızı optimum değerden fazla ise iğne ucunda tıkanmalar meydana gelmektedir [36].

İğne Ucu ile Toplayıcı Arasındaki Mesafe: Mesafe çözücünün tamamının buharlaşması için yeterli uzunlukta olmalıdır. Mesafe artışı lif çapında azalmaya neden olmaktadır. Bununla birlikte, lif yapısı boncuklu ise mesafenin artması liflerin üzerinde daha büyük boncuklar oluşmasına neden olur [38].

İğne Çapı: Kritik voltaj değeri ve iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe gibi Taylor konisi oluşum parametrelerini etkilemektedir. [39].

Toplayıcının Etkisi: Lifleri toplamak için iletken yüzey olarak işlev gören birkaç tür toplayıcı vardır. Düzlem plaka toplayıcı, tamburlu döner toplayıcı ve ızgara tipi toplayıcı bunlardan bazılarıdır. Toplayıcının şeklinin ve boyutunun, elektro-eğirme işlemi sırasında üretilen liflerin çapına, dizilimine ve yapısında etkisi olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir [40].

2.3.2.2 Çözelti parametreleri

Polimer Konsantrasyonu: Polimer konsantrasyonunda meydana gelen artış, daha büyük çaplı lif üretimine neden olmaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda yüksek polimer konsantrasyonuna sahip çözeltilerin, sahip oldukları yüksek viskozite nedeniyle elektro-eğirme işlemi sırasında lif oluşumunun engellendiği gözlemlenmiştir. Çözeltinin konsantrasyonunun çok düşük olması ise lif yerine partikül oluşumuna neden olmaktadır [36].

Polimerin Molekül Ağırlığı: Lif çapının polimerin moleküler ağırlığı ile arttığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, düşük molekül ağırlığına sahip polimerlerin dairesel kesitli; yüksek molekül ağırlığına sahip polimerlerin ise yassı lifler oluşturduğu yapılan çalışmalar sonucu gözlemlenmiştir [41].

Ayrıca, çözeltinin viskozitesi, iletkenliği ve yüzey gerilimi, elektro-eğirme işlemi etkilemektedir ve kararlı Taylor konisi oluşumu için belli değer aralıklarda olmaları gerekmektedir. Bu aralıklar polimer çözeltisine göre farklılık göstermektedir. Viskozite ve yüzey gerilimi çözücü oranlarının değiştirilmesi sonucu düzenlenebilir. Ancak iletkenlik doğrudan çözücü ve polimer ile ilişkili bir durumdur [42, 43].

2.3.2.3 Çevresel faktörler

Sıcaklık: Çözücünün buharlaşma hızı sıcaklık arttıkça artar, diğer yandan sıcaklık arttıkça viskozite azalır [44].

Nem: Ortamdaki nem, çözeltideki çözücünün buharlaşma oranını belirler. Nemin lif çapına etkisi ise polimerin ve çözeltinin kimyasal ve moleküler etkileşimine bağlıdır [44].

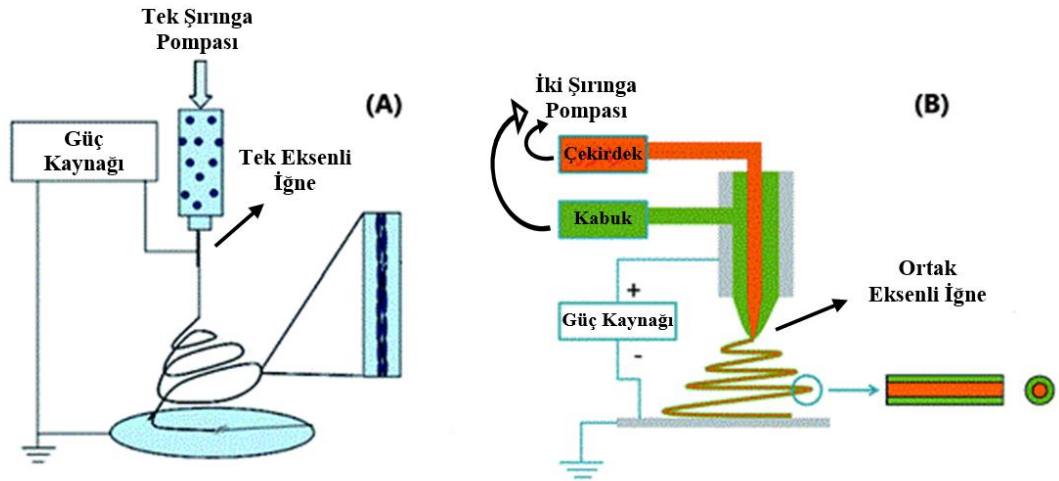
Atmosfer Çeşidi: Havada bulunan gazlar yüksek elektrik alan altında farklı davranış göstereceği için genel olarak, tek tip lif üretimi için ortamdaki gaz çeşitliliği sabit tutulmalıdır [44].

Basınç: Ortam basıncındaki değişiklik sıvı viskozitesini değiştireceği için elektro-eğirme işlemi sırasında oluşan jette kararsızlıklara neden olmaktadır. Jet oluşumunun ise lif oluşumu ve yapısı üzerine etkisi bulunmaktadır [42].

2.3.3 Elektro-eğirme türleri

Tek Eksen Elektro-Eğirme: Tek bir iğne ve şırınga pompasının kullanıldığı geleneksel elektro-eğirme yöntemidir.

Ortak Eksen Elektro-Eğirme: Bu tip elektro-eğirme sisteminde iç içe geçmiş iki başlıktan oluşan nozzle (iğne ucu ve haznesi) iki polimer çözeltisine bağlıdır. Biri kabuk polimer çözeltisi için diğeri ise çekirdek polimer çözeltisi için olmak üzere iki şırınga pompası kullanılmaktadır. Tekli elektro-eğirme sistemine göre daha karmaşık bir yapısı vardır ve işlem optimizasyonu için gereken süre daha fazladır.



Şekil 2.4 : (A) emülsiyon elektro-eğirme işlemi ve (B) ortak eksenli elektro-eğirme işleminin şematik gösterimi [45].

Emülsiyon Elektro-Eğirme: Kabuk-çekirdek yapıları nano lif üretiminin tekli elektro-eğirme düzeneği kullanılarak elde edildiği sistemlerdir. Bunun için, çalışma sıvısı olarak iki polimer çözeltisinin emülsiyonu hazırlanmalıdır [46]. Şekil 2.4'te, emülsiyon elektro-eğirme ve ortak eksenli elektro eğirme sistemleri şematik olarak gösterilmektedir. Emülsiyon elektro-eğirme sisteminde, tek bir nozzle kullanılır. Buna karşılık, ortak eksenli elektro eğirme sisteminde iki girişi olan ortak eksenli bir nozzle gereklidir. Emülsiyon elektro-eğirme sisteminde çekirdek ve kabuk çözeltisi, emülsiyon oluşturabilecekleri şekilde karışabilir olmamalıdır. Öte yandan, ortak eksenli elektro eğirme sistemi için hem karışabilir hem de karıştırılmaz çekirdek ve kabuk çözeltileri kullanılabilir.

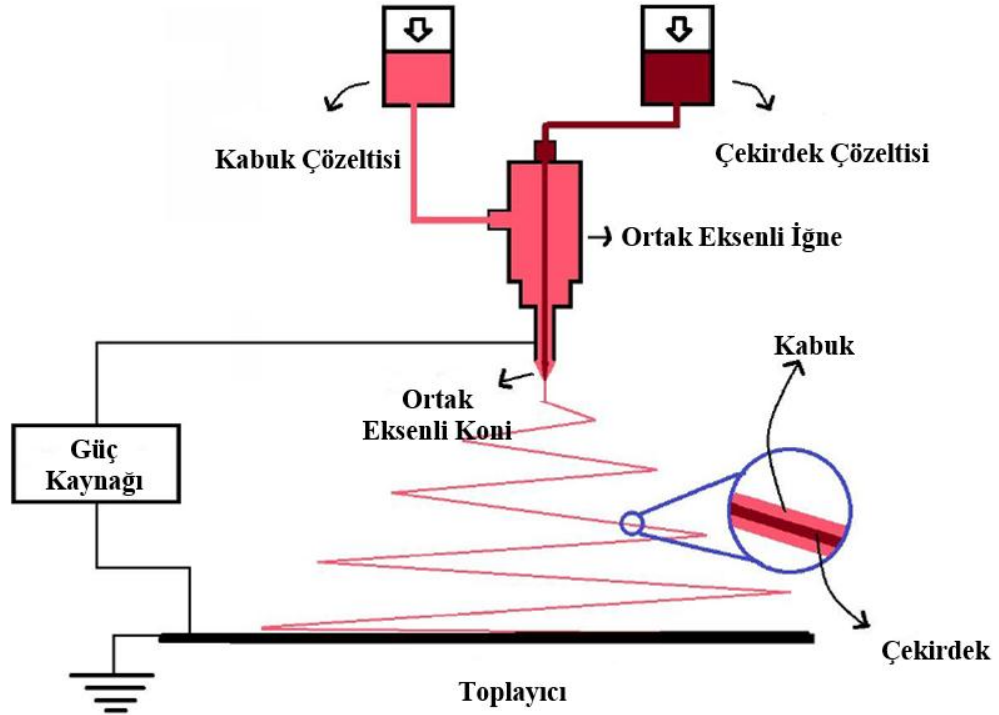
Eriyik Elektro-Eğirme Sistemi: Bu tip sistemlerde, polimeri uçucu çözücüler içinde çözmek yerine çözelti olarak doğrudan polimer eriyikleri kullanılır [47]. Geleneksel elektro-eğirme işlemine bir alternatif olmasına rağmen, genellikle çapları on mikron olan mikro boyutlarda lifler elde edilmektedir [48, 49].

2.4 Ortak Eksenli Elektro-Eğirme Sistemi

2.4.1 Çalışma prensibi

Ortak eksenli elektro-eğirme sisteminin genel kurulumu, tekli elektro-eğirme için kullanılan sisteme oldukça benzerdir. Aralarındaki fark, kullanılan nozzle tipinden kaynaklanmaktadır. Ortak eksenli konfigürasyon elde etmek için daha küçük bir iç çapa sahip iğne ucu, daha büyük bir iç çapa sahip olan iğne ucu içine yerleştirilmiştir ve bu iki iğne eş merkezli olarak ayarlanır. Dış iğne ucu, kabuk çözeltisini içeren şırıngaya bağlanır ve içteki iğne çekirdek çözeltisini içeren ikinci bir şırıngaya bağlanır [50]. Farklı kanallar yardımıyla sisteme beslenen iki polimer çözeltisi, kabuk-çekirdek yapısındaki liflerin üretimi için, aynı anda elektro-eğirme işlemine tabi tutulur [51]. Aynı ayrı hazırlanan çekirdek ve kabuk çözeltileri farklı şırınga pompalarına yerleştirilmiştir. Çözeltilerin akış hızı, sabit Taylor konisi oluşturacak şekilde işlem sırasında ayarlanır. Uygulanan gerilim, toplayıcı ile iğne arasındaki mesafe gibi geriye kalan tüm parametreler geleneksel elektro-eğirme kurulumunda yapılarına benzer şekilde ayarlanır. Sistem kurulumu yatay veya düşey şekilde ayarlanabilir [52].

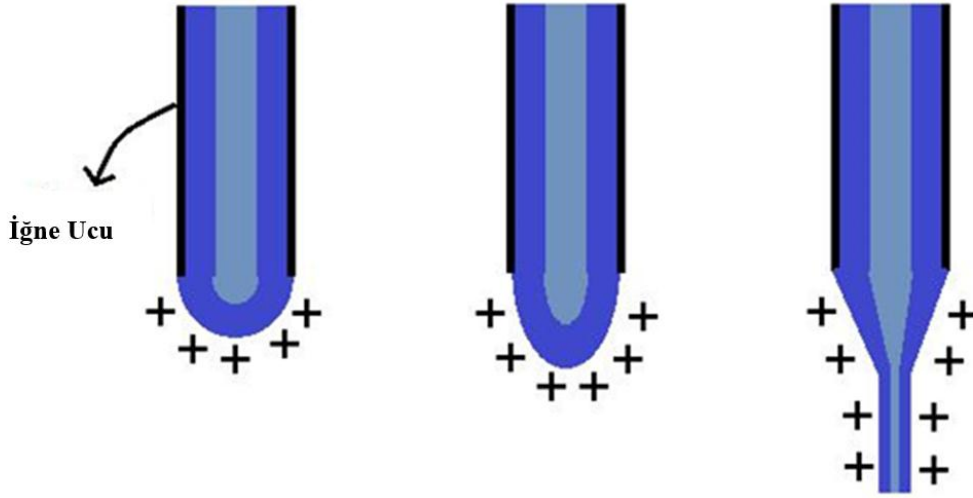
Şekil 2.5'de ortak eksenli elektro-eğirme düzeneği gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi sistem yüksek voltaj kaynağı, şırınga pompaları, toplayıcı ve ortak eksenli iğne ucundan oluşmaktadır [50].



Şekil 2.5 : Ortak eksenli elektro- eğirme işlemi kurulumunun şematik gösterimi [50].

Ortak eksenli elektro-eğirme işleminde geleneksel yöntemde olduğu gibi birçok polimer kullanılabilir. Bu polimerler arasında doğal malzemeler, sentetik malzemeler ve sentetik biyolojik olarak parçalanabilir polimerler bulunmaktadır. Elde edilen kabuk-çekirdek şeklindeki lifler ilaç salım çalışmaları başta olmak üzere, doku mühendisliği için üretilen iskelelerde ve yara bandajı üretiminde kullanılmaktadır. Biyomedikal uygulamalara ek olarak, bu ürünler sıvı, gaz ve moleküler filtreler olarak, fotovoltaiik sistemlerde, LCD cihazlarda, termomekanik ve biyokimyasal sensör cihazlarında da kullanılmaktadır [50].

Ortak eksenli elektro eğirme işleminde çekirdek ve kabuk çözeltileri arasındaki etkileşim önemlidir. Hem çekirdek hem de kabuk çözeltileri hazırlamada kullanılan çözücülerini seçerken dikkat edilmesi gereken nokta, iki çözelti iğne ucunda bulduğunda; çözücüler, diğer çözeltideki polimerin çözünürlüğüne zarar vermemelidir [53]. Diğer bir nokta ise çekirdek ve kabuk çözeltileri arasında meydana gelen ara yüzey gerilimi, Taylor konisinin dengede kalması için mümkün olduğunca düşük olmalıdır [54]. Şekil 2.6'da ortak eksenli iğne ucunda Taylor konisi oluşumunun bir çizimi gösterilmektedir.



Şekil 2.6 : Ortak eksenli elektro-eğirme işleminde Taylor konisi oluşumu [50].

2.4.2 Ortak eksenli liflerin ilaç salım çalışmalarında kullanımı

Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi, kabuk ile çevrelenmiş ürün elde etmek için tek aşamalı bir yöntemdir. Ortak eksenli liflerin kabuk-çekirdek yapısı sayesinde, kullanılan malzemeler birbirine karıştırılmadığı için işlem öncesinde sahip oldukları özelliklerini koruyabilmektedirler.

Elektro-eğirme yoluyla kabuk-çekirdek nano lif üretimi, biyomedikal uygulamalar için büyük bir gelişme olmuştur. Yeni yapılar içeren kabuk-çekirdek nano lifleri üretilerek birçok farklı çalışma gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı olarak kabuk-çekirdek yapıları lifler kullanılarak sürekli salım yapan ilaç sistemlerinin tasarlanması da bu çalışmalar arasındadır [55].

Kontrollü ilaç salım sistemleri dışında, kabuk-çekirdek nano liflerinin biyomedikal uygulamalarda kullanımı şu şekildedir [13, 56, 57];

- Kararsız bir bileşenin, oldukça reaktif bir ortamda bozunmasını engellemek için izolasyonunun sağlanması
- Bir malzemenin mekanik özelliklerini geliştirmek için güçlendirilmesi

- Biyouyumluluğu düşük olan malzemelerin, biyolojik olarak uyumlu bir polimer tarafından çevrelenerek doku mühendisliği için iskele üretimi

Ortak eksenli lifler, ilaç salım sistemlerine ek olarak; plazmid DNA'nın, peptitlerin ve büyüme faktörlerinin ve doku yenilenmesinde kullanılan diğer biyomoleküllerin tek adımda kapsüllenmesi ve kontrollü salınması için kullanılabilir [16, 58]. Elektro-eğirme işlemi, sert koşullar ya da organik çözücülerle etken maddelerin doğrudan temasından kaynaklanan hasarları önlemektedir [59]. Kabuk katmanı, çekirdek içerisindeki moleküllerin ani salımını önlemede bariyer görevi görmektedir [60]. Kapsüllenmiş ajanların salımı, nano liflerin kompozisyonu ve yapısının değiştirilmesi ile kontrol edilebilmektedir.

2.5 Kullanılan Polimer ve Aktif Ajan

2.5.1 Biyomalzemeler

İnsan vücudundaki herhangi bir organ, doku veya fonksiyonel bölgenin tedavi edilmesi ya da tamamen değiştirilmesi için kullanılabilen doğal veya sentetik malzemeler biyomalzeme olarak adlandırılır [61]. Biyomalzeme, belli bir fonksiyonu yerine getirmek amacıyla canlı vücuduna belirli bir süre temas eden malzeme ve cihazların genel adıdır [62]. Biyomalzemeler;

- Biyolojik sistemle uyumlu olma,
- Safsızlık oranı düşük olma ve iyi bir şekilde sterilize edilme,
- Kullanılacağı yere göre gerekli fonksiyonel özelliklere (geçirgenlik, elastikiyet, elektrik ve termal özellikler, vb.), yeterli biyomekanik dayanıma (çekme, baskı ve çarpma), istenilen fiziksel özelliklere (kristalinite, vb.) sahip olma

gibi özellikleri taşınmalı ve bu özelliklerini işlem süresi boyunca sürdürmelidirler.

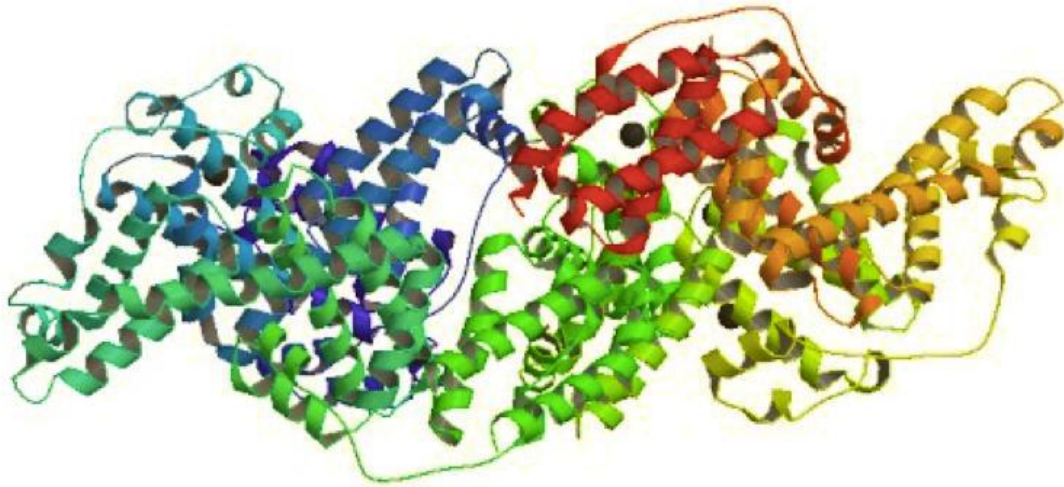
Malzeme seçimi, geçtiğimiz yıllarda malzemenin fiziksel ve mekanik özelliklerine göre yapılmaktaydı. Ancak günümüzde malzemenin sahip olduğu biyolojik uyumluluk, malzeme seçiminde belirleyici etkindir. Bu durum, biyolojik

uyumluluğu yüksek, fonksiyonellik kazandırılmış doğal yapıların (proteinler, polisakkaritler ve biyokompozitler) biyomalzeme olarak kullanımı yaygınlaşmıştır [62-64].

Yapılan çalışmalar, nano boyuta inildikçe malzemenin mekanik özelliklerinin geliştiğini göstermiştir. Ayrıca lif ve küresel yapılı proteinlerin biyoaktif ajanlar için koruyucu olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bir araya getirildiğinde, protein yapılar saf halde ya da sentetik polimerlerle birlikte kullanılarak, iyileştirilmiş mekanik özelliklere sahip lif yapısında biyokompozit malzemeler üretilmiştir. Sahip oldukları biyoyoumluluk ve biyofonksiyonellik özellikler sayesinde, üretilen biyokompozit malzemeler biyomedikal alandan doku mühendisliğine kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir [62-66].

2.5.1.1 Sığır serum albümin ve amiloid dönüşümü

Küresel bir protein olan sığır serum albümin (SSA), 17 tane molekül içi disülfid bağına sahiptir (Şekil 2.7.). Molekül ağırlığı, yaklaşık 66.5 kDa'dır. Sudaki çözünürlüğu oldukça yüksektir (>100 mg/mL) ve çapraz bağlanmaya imkan tanımaktadır. Sahip olduğu bu özellikler nedeniyle, SSA biyoteknolojik uygulamalarda model protein olarak tercih edilmektedir. Bunun yanında, biyoaktif ajanları koruyup, bu yapıların stabilitesini arttırması SSA'nın biyosensör uygulamalarında kullanılmasını sağlamaktadır [65, 66].



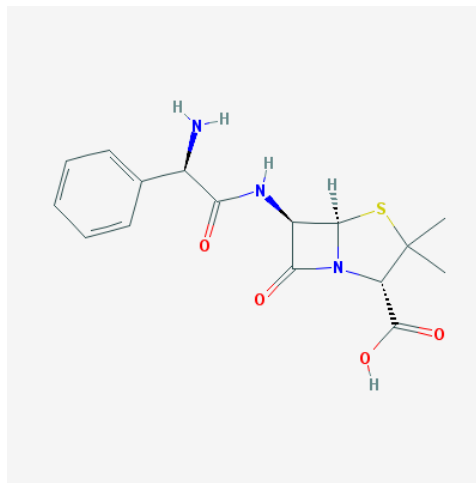
Şekil 2.7 : Sığır Serum Albümin [67].

SSA' in belirtilen uygulamalarda kullanımı, genellikle sahip olduğu üçüncül yapı formunun, ikincil yapıya indirgenmesiyle mümkündür. Yapılan çalışmalarda SSA'in sahip olduğu üçüncü yapı, β -ME kullanılarak açılmakta, ardından flor grubuna sahip alkoller (HFIP, TFE vb.) kullanılarak elde edilen alt form sabitlenmektedir [68]. Bu şekilde amiloid adı verilen, mekanik özellikleri güçlendirilmiş, doğal yapıda ve suda çözünmeyen kararlı bir biyomalzeme elde edilmektedir [65, 66, 68, 69].

Elde edilen bu amiloid yapı, elektro-eğirme yöntemi kullanılarak lif formuna dönüştürülebilmektedir. Üretilen lifler, yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve gelişmiş mekanik özelliklere sahip olmaları nedeniyle biyolojik tabanlı çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

2.5.1.2 Aktif ajan olarak ampisilin

349.405 g/mol molekül ağırlığına ve $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ formülasyonuna sahip olan ampisilin, bakterisidal etkinliğe sahip geniş spektrumlu, yarı sentetik bir beta-laktam penisilin antibiyotiktir (Şekil 2.8.). Etki mekanizması şu şekildedir; bakteriyel hücre duvarının iç zarında bulunan penisiline bağlanan proteinlere (PBP) bağlanır ve bunları inaktive eder. PBP'lerin inaktivasyonu, bakteri hücre duvarının mukavemeti ve sağlamlığı için gerekli olan peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını etkiler. Bu, bakteri hücre duvar sentezine müdahale eder ve bakteri hücre duvarının zayıflamasına ve hücre yıkımına neden olur [70].



Şekil 2.8 : Ampisilin kimyasal yapısı [70].

Ampisilin, çeşitli beta-laktamazlar tarafından gerçekleştirilen hidrolize karşı dayanıklı olduğu için, birçok gram-pozitif ve gram-negatif enfeksiyonlarında kullanılır [70]. Sistemik tedavide ve mide-bağırsak enfeksiyonlarında lokal olarak kullanılır. Asitlere karşı dirençlidir ve bu nedenle ağızdan verilebilir. Biyolojik olarak yarı ömrü 0.75-1.5 saat arasında değişir [71].

Ampisilin uygulanmasını daha etkili hale getirmek için araştırmalar, sürdürülebilir ve kontrollü salımı için tasarım formüllerine yöneltilmiştir. Bu amaçla bu çalışmada model olarak ampisilin seçilmiştir.



3. DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler

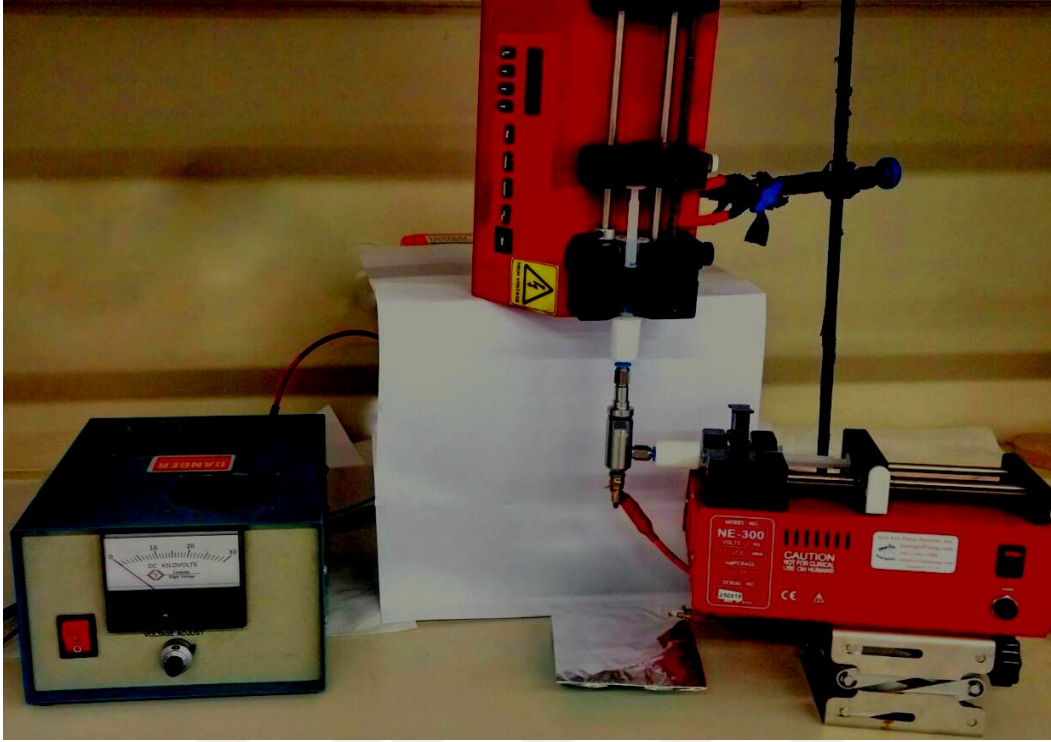
3.1.1 Kimyasal maddeler

Elektro-eğirme işleminde kullanılan, beta-merkaptöetanol (β -ME), 2,2,2 trifluoroetanol (TFE), Ampisilin sodyum tuzu (Amp) ve phosphate-buffered saline (PBS) tabletleri (pH:7.4) Sigma (ABD) firmasından; Sığır serum albümin (SSA) (Ma \approx 66000 Da) ise Acros Organics (ABD) firmasından temin edilmiştir. Elektro-eğirme işlemi sonrası çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan gluteraldehit'in temini ise AppliChem (Almanya) firmasından yapılmıştır. Tüm deneylerde damıtılmış su kullanılmıştır. İlaç aktivitesinin kontrolü için kullanılan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC:25923) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC:25922) kültürleri, Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü (Türkiye)'nden temin edilmiştir. Kültür gelişiminin sağlandığı Brain Heart Agar (BHA) ve Brain Heart Broth (BHB) besiyerlerinin temini Merck (Almanya) firmasından yapılmıştır.

3.1.2 Aletler ve cihazlar

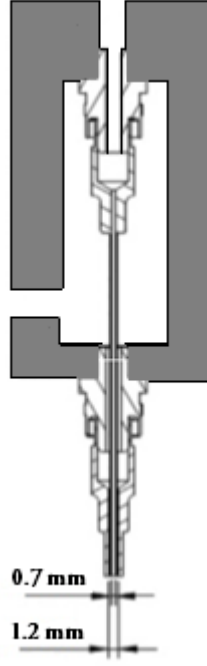
3.1.2.1 Ortak eksenli elektro-eğirme sistemi

Ortak eksenli nanoliflerin üretimi için iki şırınga pompasının (NE-1000, New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, ABD) yüksek voltaj DC güç sağlayıcı (MCH 303D2; Gamma High Voltage Research Inc., Ormond Beach, FL, ABD) ile modifiye edildiği laboratuvar ölçeğinde elektro-eğirme sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : Ortak eksenli elektro-ğirme düzeneği.

Kabuk-çekirdek biçiminde lif eldesi için iki farklı girişı olan ortak eksenli paslanmaz çelik iğne ucu (Inovenso, Türkiye) kullanılmıştır. Üst tarafta bulunan ilk giriş 0.7 mm iç çapa sahip olup çekirdek çözeltisinin; sol tarafta bulunan 1.2 mm iç çapa sahip olan ikinci giriş ise kabuk çözeltisinin sisteme beslenmesi için kullanılmaktadır (Şekil 3.2). Sisteme beslenen iki farklı çözelti iğne çıkışında kabuk-çekirdek şeklini alarak, tek bir çıkış ile sistemden uzaklaşmaktadır.



Şekil 3.2 : Ortak eksenli iğne taslağı.

(A)



(B)



Şekil 3.3 : Ortak eksenli elektro-eğirme iğnesi (A) Yandan görünüm (B) Alttan görünüm.

3.1.2.2 Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi (UV-Vis)

Nanoliflerden salınan ilaç miktarını incelemek için belirli zaman aralıklarında salım haznesinden alınan çözelti 5 ml lik kuvars küvetlere konularak 204 nm’de UV-Vis spektrofotometre (Hitachi U-5100, Japonya) ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Ampisilin kalibrasyon grafiğinden salınan ampisilin miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.4 : UV-Görünür spektrofotometre cihazı.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Ön çalışmalar

Bu çalışmada, SSA’in ilaç salım davranışı incelenerek, doğal polimer ile üretilen kontrollü ilaç salım sisteminin oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, kabuk polimeri olarak “amiloid protein” ve etken madde olarak “ampisilin” kullanılarak ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile farklı kabuk çapına sahip ilaç yüklü lif üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma sırasında şu basamaklar takip edilmiştir;

1. Çözelti hazırlama,
2. Tek ve ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile lif üretimi için işlem parametrelerinin belirlenmesi,
3. Tekli elektro-eğirme işlemi ile üretilen membranların yüzeyinde çapraz bağ oluşturulması,
4. Üretilen liflerin karakterizasyonu,
5. Üretilen membranların ilaç salım davranışlarının incelenmesi,
6. Membran içerisindeki ilaç aktivitesinin test edilmesi.

Yukarıda verilen basamaklara ait ayrıntılar ve elde edilen sonuçlar, tezin ilerleyen bölümlerinde sunulmuştur.

3.2.1.1 Çözelti hazırlama aşaması

Normal koşullarda elektro-eğirme özelliği olmayan SSA, fiziksel yapısı değiştirilerek elektro-eğrilebilir forma dönüştürülmüştür. Protein çözeltisi hazırlama aşamasında, doğal halde küresel olan SSA, ağırlıkça %12 olacak şekilde ve oda sıcaklığında bulunan (25 °C) PBS tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş sonrasında üçüncül yapının açılması, S-S bağlarının açılması, için 10 eşdeğer bağ β - ME eklenmiştir. Açılan bağların sabitlenmesi için ise çözeltiye (1.5:1 (v:v) TFE:PBS) olacak şekilde TFE eklenmiştir [19]. Elde edilen amiloid benzeri SSA (AL-SSA) çözeltisi manyetik karıştırıcıda, 800 rpm hızla karıştırılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen çözelti doğrudan kabuk çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çekirdek çözeltisi ise hazırlanan çözeltiye 1:2 (w:w) Amp:SSA oranında olacak şekilde ampisilin (ilaç) eklenerek elde edilmiştir. Kabuk çözeltisinde yer alan ilacın iyice çözünmesi için çözelti 4 saat boyunca 400 rpm'de karıştırılmıştır. Hazırlanan çözeltiler 5 mL'lik şırıngalara koyularak şırınga pompalarına yerleştirilmiştir.

3.2.1.2 Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ve membran üretimi aşaması

Elektro-eğirme sistemi düzeneğinde, toplayıcı olarak 10 x 10 cm² alanında kesilen alüminyum folyo yüzeyler kullanılmıştır. Güç kaynağından çıkan pozitif elektrot (anot) şırınga iğnesine, topraklanan diğer elektrot (katot) ise toplayıcı levhaya bağlanmıştır. Çekirdek çözeltisine ait pompa dikey, kabuk çözeltisine ait pompa yatay konumdaki destek üzerine kıskaçlar yardımıyla sabitlenerek düşey konumlu bir sistem kurulmuştur (Şekil 3.1).

Öncelikle ortak eksenli nanoliflerin kabuk ve çekirdek bölgelerini oluşturacak polimerlerin tekli olarak elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiş, daha sonra ortak eksenli nanoliflerin elektro-eğirme çalışmalarına geçilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sırasında, sabit bir Taylor koni oluşumu ve düzgün bir nanolif dağılımının oluşumu hedeflenmiştir. İşlem parametrelerinin iyileştirilmesi aşamasında, düşey olarak konumlandırılan sistemde iğne ucu toplayıcı arası mesafe 5.5 cm'de sabit tutularak; akış hızı 0.1-0.5 ml/saat aralığında, gerilim 13-22 kV aralığında değiştirilerek bu iki değişkenin lif oluşumu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

AL-SSA liflerinin ilaç salımı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, iki farklı şekilde lif eldesi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilki çekirdek çözeltisinin tekli elektro-eğrilmesi ile elde edilen lifler, ikincisi ise ilaçlı çözeltinin çekirdekte, ilaçsız çözeltinin ise kabuk kısmında yer aldığı ortak eksenli elektro-eğrilmiş liflerdir. Kabuk- çekirdek şeklindeki liflerin kabuk kısmının ilaç salımı üzerindeki etkisinin açıkça görülebilmesi ortak eksenli elektro-eğirme işlemi sırasında kabuk çözeltisinin hızı değiştirilerek kabuk kalınlığı farklı olan iki çeşit membran üretilmiştir. Tekli lif üretimi sırasında sadece çekirdek çözeltisi 0.3 ml/saat hızla sisteme beslenerek tekli membranlar (C) üretilmiştir. Ortak eksenli lif üretimi sırasında ise çekirdek akış hızı 0.1 ml/saat olarak sabitlenip; kabuk çözeltisinin hızı 0.2 ml/saat ve 0.3 ml/saat olarak ayarlanarak ortak eksenli membran 1 (CS1) ve ortak eksenli membran 2 (CS2) üretilmiştir.

Optimizasyon koşulları belirlendikten sonra, ilaç salım çalışmalarında kullanılmak amacıyla 4'er saatlik işlem süresi boyunca toplayıcıda biriktirilen lif örnekleri alüminyum folyolardan çıkarılarak elektro-eğrilmiş membranlar elde edilmiştir.

3.2.2 Yüzeyde çapraz-bağ oluşturulması aşaması

Ön çalışmalarda gözlemlenen tekli eksenli membranlarda (C) meydana gelen hızlı salımın önlenmesi için yüzeyde çapraz bağ oluşturulması düşünülmüştür. Bu hedef doğrultusunda çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit (GA) kullanılmıştır [12]. 1:2 (w:w) Amp: SSA içeren tekli elektro-eğrilmiş membranlar % 5'lik (v:v) GA buharında 4 saat bekletilerek çapraz bağlı membranlar (GA-C) elde edilmiştir. Çapraz bağlama işleminden sonra, tüm örnekler, üç kere PBS (pH 7.4) ve iki kez damıtılmış su ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Tüm deneyler, 25 °C'lik sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Nanoliflerin karakterizasyonu

Elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen lifler nano boyutlarında olduklarından, karakterizasyonları için ileri görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Çalışma sürecinde ilerlemelerin çalışma ile paralel yürümesi için ön çalışma sonuçları TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Teknoloji Merkezinde bulunan optik (ışık) mikroskobu; elde edilen nanoliflerin karakterizasyonları için ise Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde (UNAM) bünyesinde bulunan elektron mikroskobu tekniklerinden; elektron demetinin yüzeyi taraması ile nanoliflerin görüntülenebildiği Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve SEM'e göre daha yüksek çözünürlüğe ve büyütme oranlarına sahip, elektron demetlerinin malzeme içerisinden geçirildiği Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)'den faydalanılmıştır.

3.2.3.1 Optik (ışık) mikroskop analizi

Elektro-eğirme ön çalışmaları süresince, işlem parametrelerinin lif oluşumu ve morfolojisi üzerine etkisinin incelenmesi, mikroskop lamları üzerinde toplanan örneklerin optik mikroskop (Nikon Eclipse, LV100, ABD) altında gözlemlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değişkenlere bağlı olarak değerlendirilmiş ve lif üretiminde kullanılacak parametreler bu sonuçlara göre belirlenmiştir.

3.2.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilen tüm nanolif topluluklarının morfolojilerini incelemek üzere Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (e-SEM; FEI-Quanta 200 FEG, ABD) kullanılmıştır.

Alüminyum folyo üzerine toplanan nanolif numuneleri, tarayıcı elektron mikroskobunda görüntü alınmak üzere numune tutuculara çift taraflı karbon bant yapıştırılarak yerleştirilmiştir. Örnekler, görüntü alınmadan önce elektrik iletkenliğini sağlamak için argon atmosferinde altın kaplama işlemine tabi tutulmuşlardır.

e-SEM görüntüleri alındıktan sonra, örneklerin lif çapları ImageJ® Görüntüleme ve Ölçümleme Yazılımı (NIH, MD, ABD) kullanılarak 50 farklı lokasyondan alınan çap ölçümlerinin ortalamasının alınması ile ölçülmüştür. Üç membran grubunun (C, CS1 ve CS2) lif çapları, OriginLab v.6 kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sunulan tüm veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır.

3.2.3.3 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Üretilen ortak eksenli nanoliflerin kabuk-çekirdek morfolojilerinin açık bir şekilde incelenmesi amacıyla Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM, FEI Tecnai, G2-F30, OR, ABD) kullanılmıştır.

TEM analizi 80 kV altında gerçekleştirilmiştir. Kabuk-çekirdek polimerleri arasındaki düşük kontrastın üstesinden gelmek için kabuk çözeltisini değiştirmeden, çekirdeğe beslenen polimer çözeltisi bir “TEM stain” (Bromfenol Mavi) kullanılarak boyanmıştır. Bu sayede liflerin kabuk ve çekirdek yapıları arasında optik kontrast yakalanmıştır. TEM görüntüsü almak için hazırlanan polimer çözeltilerinin elektro-eğirme işlemi doğrudan Holey karbon film kaplı 300-mesh TEM grid üzerine gerçekleştirilmiştir. Elde edilen liflerin grid üzerine kalın tabaka oluşturulmaması için işlem 2 saniyelik aralıklarla tüm gridler için tekrarlanmıştır.

3.2.3.4 Fourier transform infrared spektroskopisi- Azaltılmış toplam yansıma (FTIR-ATR) analizi

Hazırlanan membranların yüzeylerinde bulunan fonksiyonel gruplar, FTIR (Perkin Elmer Spectrum, 100, ABD) cihazı kullanılarak 650- 4000 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte tanımlanmıştır.

3.2.3.5 Termal analiz

Saf ampisilin (Amp), Amp-SSA membranı ve ampisilin içermeyen AL-SSA membranının ısı bozunma sıcaklıkları ve kütle kayıpları termal gravimetrik analiz (TGA) (TA Instruments Co., DE, ABD) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) (TA Instruments system, DE, ABD) cihazları kullanılarak incelenmiştir. Termal analizler 20-600 $^{\circ}\text{C}$ aralığında, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ tarama hızında, 40 mL/dk'lik akış hızında azot gazı ortamında gerçekleştirilmiştir. TGA analizi için 2-5 mg; DSC analizi için ise 5-6.5 mg ağırlığında seçilmiş olan örnekler ısı bozunma sıcaklıkları açısından değerlendirilmiştir.

3.2.3.6 Temas açısı analizi

Membran yüzeyleri arasındaki farklılık temas açısı ölçme cihazı (KSV Instruments Ltd., Finlandiya) kullanılarak incelenmiştir. ~10 μl hacimdeki deiyonize su damlatma tekniği ile mikroskop lamı üzerine toplanan örnekler üzerine damlatılarak damlanın yüzeye yaptığı temas açısı ölçülmüştür. Ölçümler membran yüzeyinin en az üç farklı noktada yapılmış ve sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

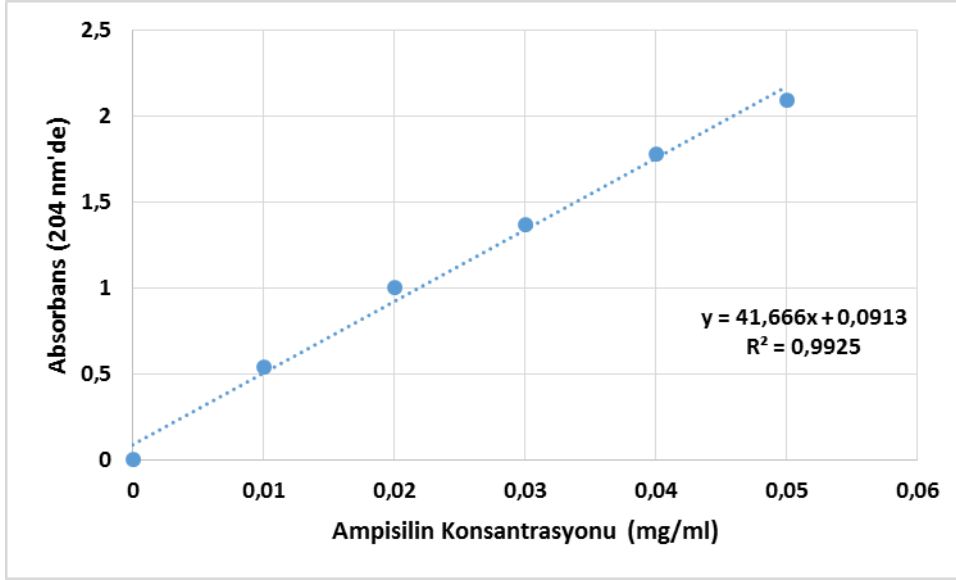
3.2.4 İlaç salım çalışmaları

In vitro ilaç salım testleri 48 saatte gerçekleştirilmiş olup, belirlenen zaman aralıklarında alınan örnekler ile toplam ilaç salım miktarı belirlenmiştir.

Ampisilinin, elektrospin membranlardan salınım profili, fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) çözeltisine salınan ampisilin konsantrasyonunun, UV-Görünür spektrofotometre ile ölçülmesiyle incelenmiştir.

Ampisilin salınım profilini incelemek için ilk olarak, satın alınan ampisilin PBS içinde çözdürülerek maksimum absorbansı incelenmiş ve 204 nm dalga boyunda

oluştugu tespit edilmiştir. PBS içerisinde belirli konsantrasyonlarda hazırlanan ilaç çözeltisinin absorbens değerleri, bu dalga boyunda ölçülerek, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.5). Elde edilen kalibrasyon eğrisi daha sonra PBS çözeltisine salınan ampisilinin konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır.



Şekil 3.5 : Ampisilinin kalibrasyon eğrisi.

Alüminyum folyo üzerinde toplanan membranlar 1 cm² boyutlarında kareler şeklinde kesilmiştir. Yaklaşık 100 mg ağırlığına sahip olan bu membranlar, alüminyum folyodan ayrıldıktan sonra üzerlerinde kalmış olabilecek çözeltinin uzaklaştırılması için bir gece desikatörde bekletilmiştir.

PBS çözeltisini (pH:7.4) hazırlamak için 1 adet PBS tablet 200 ml saf su içerisinde çözülmüş ve hazırlanan çözelti +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Desikatörden alınan membranlar, amber şişe içerisindeki 5 ml PBS çözeltisine daldırılarak çalkalama hızı 50 rpm olan 36.5 °C'deki inkübatöre (Innova[®] 40, ABD) yerleştirilmiştir. Kontrol gurubu olarak ilaç içermeyen membranlar kullanılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 saat olmak üzere) ortamdan 1 mL çözelti alınıp yerine 1 mL taze PBS eklenmiştir. Ortamdan alınan çözelti içerisindeki ilacın absorbensı 204 nm'de UV-Görünür spektrofotometre ile ölçülmüştür. 48 saatin sonunda test sonlandırılmıştır. Salım testleri 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Antimikrobiyal aktivite analizi

% 50 oranında ilaç içeren C, GA-C, CS1 ve CS2 nanoliflerin antimikrobiyal aktiviteleri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram pozitif), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negatif)'ye karşı değerlendirilmiştir. -20 °C'de stok halinde saklanan bakteriler, Brain Heart Broth (BHB) besiyerine ekilerek 37 °C 'de 24 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Aktif hale gelen mikroorganizmalar % 0,85 NaCl çözeltisi ile seyreltilmiştir. Bu seyreltme işleminden sonra, test organizmalarının başlangıç mikroorganizma süspansiyonu elde edilmiştir .

Elde edilen süspansiyondan 100 er µl alınarak Brain Heart Agar (BHA) besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Her bir nanolif örneğinden 1 cm²'lik alanlar kesilerek BHA besiyerlerinin merkezine yerleştirilmiş ve 37 °C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İlaç yüklenmemiş nanolifler ise kontrol nanolifleri olarak kullanılmıştır.

Başlangıç mikroorganizma süspansiyonunun içerdiği bakteri sayısının belirlenmesi için ise süspansiyon 10⁻⁶ seviyesine kadar seyreltilerek BHA besiyerlerine tek koloni düşürme yöntemi ile ekim yapılmıştır. Tüm çalışmalar steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

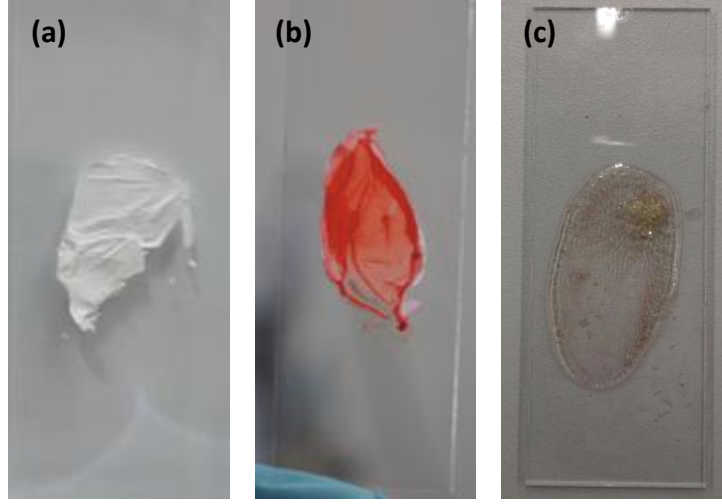
4.1 Ön Çalışmalar Kapsamında Ulaşılan Sonuçlar

4.1.1 Protein çözeltilerinin hazırlanması ve amiloid formun elde edilmesi

Doğal halde küresel yapıda bulunan SSA, elektro-eğrilebilir değildir. Elektro-eğirme işleminin gerçekleştirilebilmesi için bu yapıdaki proteinlerin dördüncül ve üçüncül yapılarının açılması ve daha alt formlara (α sarmal, β yaprak) indirgenmesi gerekmektedir [72].

Yapılan bu çalışmada, tersiyer formun indirgenerek amiloid benzeri yapıya dönüşmesi için, tampon çözeltide tamamen çözdürülmüş SSA'in içerdiği disülfid bağları β -Merkaptoetanol yardımıyla kırılmıştır. Kırılan disülfid bağlarının tekrar oluşmasını engellemek ve elektro-eğirme işlemini daha kararlı hale getirmek için ise elde edilen çözeltilere açılan S bağlarına bağlanacak flor grubuna sahip 2,2,2 Trifluoroetanol ilavesi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen çözeltinin amiloid yapısının incelenmesi, literatür çalışmalarında yer alan prosedüre göre yapılmıştır [73, 74]. Kongo kırmızısı ile yapılan boyama sonucu çözeltinin amiloid yapıda olduğu belirlenmiştir [37].



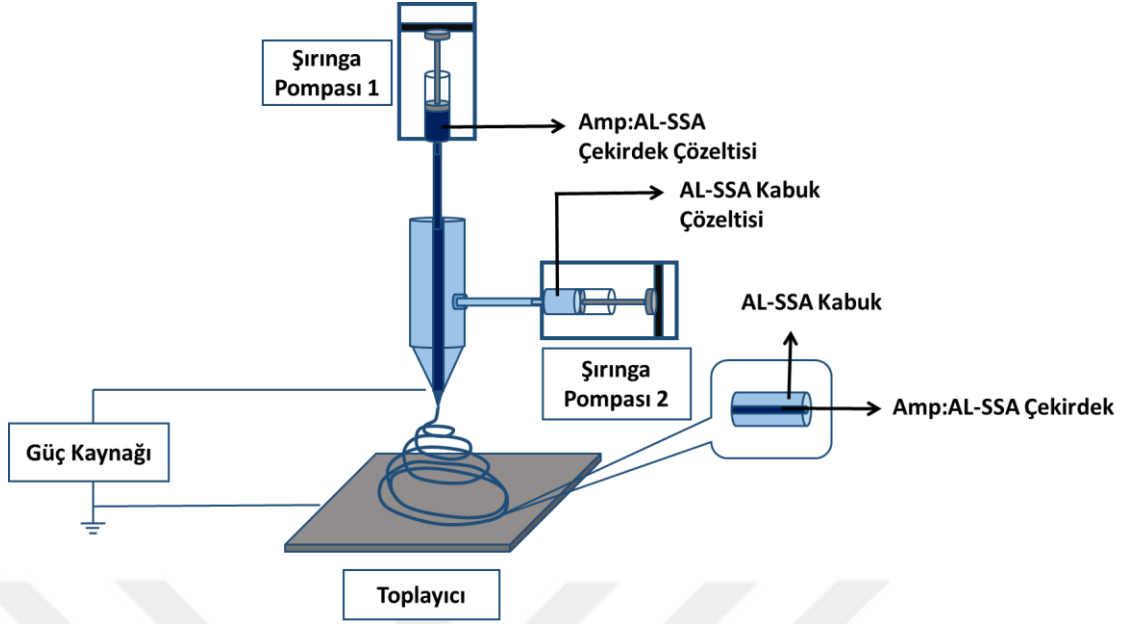
Şekil 4.1 : AL-SSA çözeltisiyle hazırlanan membranın Kongo kırmızısı boya ile boyama öncesi (a), sonrası (b) görüntüleri ve doğal haldeki SSA çözeltisinin Kongo kırmızısı boya ile boyama görüntüsü (c) [37].

4.1.2 Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile Amp-SSA membranlarının üretimi

Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi için, daha önceki labortuvar çalışmaları sonucu elde edilen parametreler (% 12 (w:v) SSA, 10 eşdeğer bağ β -ME, 3:1 (v:v) TFE:PBS) ile SSA çözeltisi hazırlanmıştır [37]. Hazırlanan çözelti kabuk beslemesi için doğrudan kullanılırken, çekirdek beslemesi için içerisine ampisilin 1:2 (w:w) Amp:SSA eklenmiştir.

Ortak eksenli nanoliflerin çekirdek bölgelerine ampisilin ilave edilmeden gerçekleştirilen elektro-eğirme işlemi ile testlerde kontrol grubu olarak kullanılacak olan ortak eksenli nanoliflerin üretimi yapılmıştır.

Hazırlanan çözeltiler pompalara yerleştirildikten sonra dikey konumlandırılmış elektro-eğirme sistemi ile işlemler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). Sistem parametrelerini değiştirerek yapılan ön çalışmalar, boncuksuz, sürekli ve homojen yapıda lif elde edilinceye kadar devam ettirilmiştir.



Şekil 4.2 : Çalışmada kullanılan ortak eksenli elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi.

Kullanılan ilk parametreler Taylor konisi oluşumuna göre ile belirlenmiştir ve koni sürekliliği sağlanarak farklı sistem parametrelerinin lif oluşumu ve yapısı üzerine etkisi incelenmiştir.

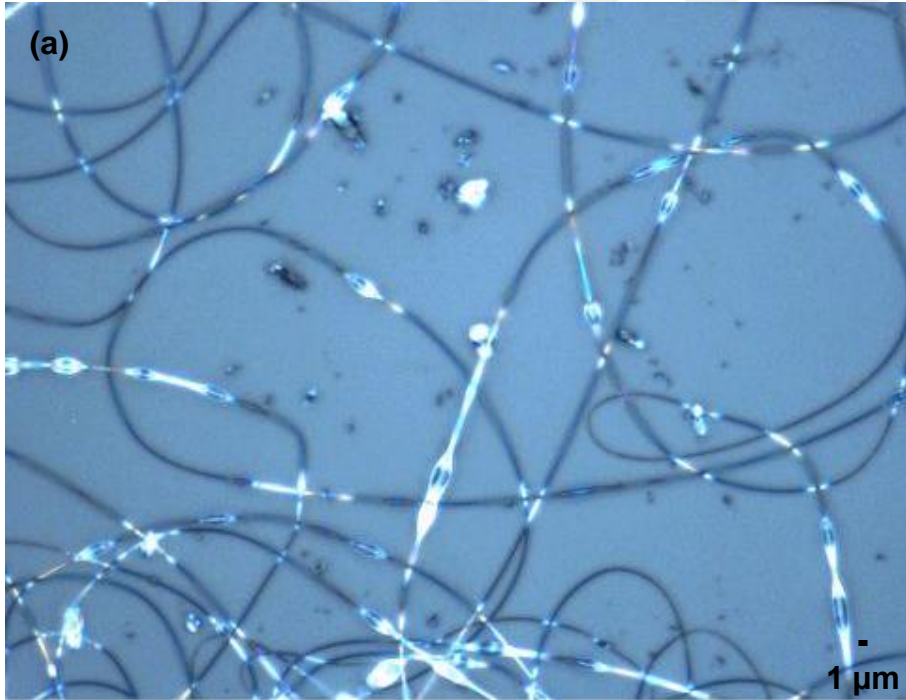
Elektro-eğirme işleminde çözeltideki çözücünün toplayıcıya ulaşınca kadar sistemden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu da akış hızı ile uygulanması gereken voltaj değeri arasında oluşturulacak doğrusal ilişki ile mümkün olmaktadır. Ön çalışmalar sırasında bu durum göz önünde bulundurularak iğne ucu-toplayıcı arasındaki uzaklık sabit tutularak (5.5 cm), değiştirilen voltaj (12-23 kV) ve akış hızınının (0.1-0.5 ml/saat) lif morfolojisi üzerine etkisi incelenmiştir.

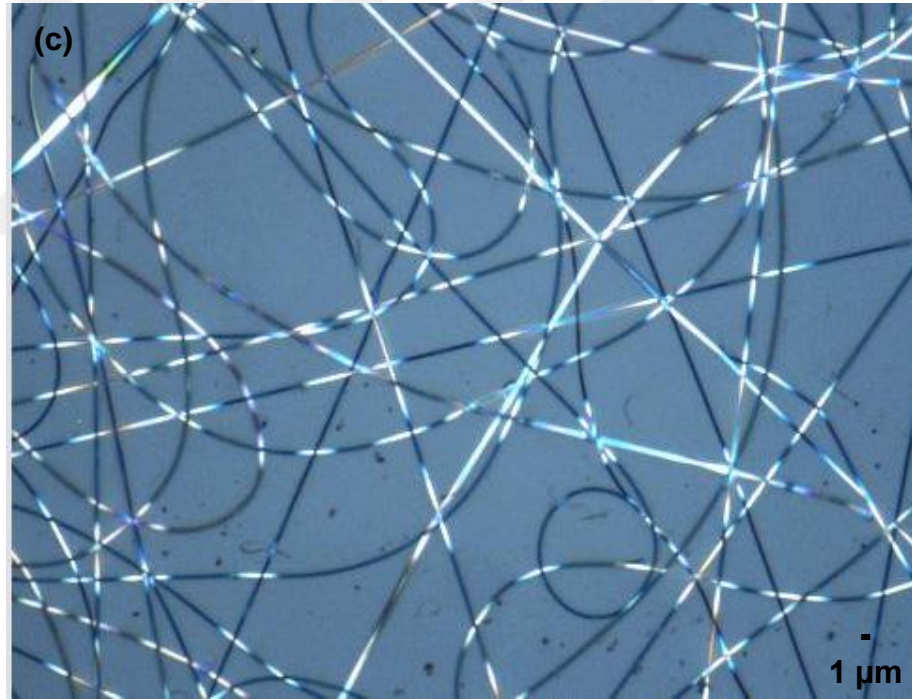
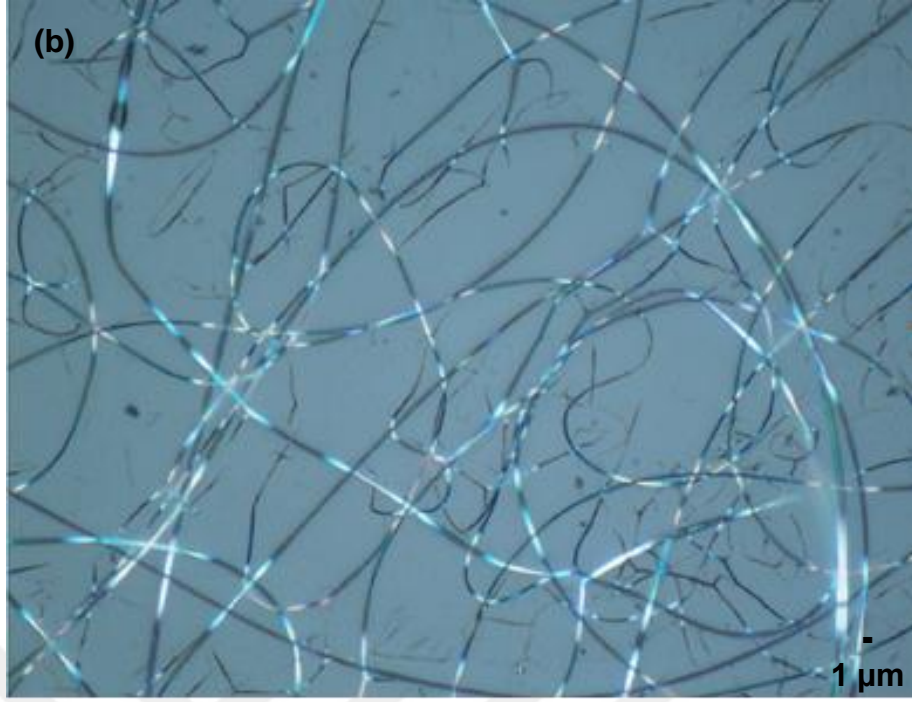
Elde edilen sonuçlara göre, çekirdek çözeltisi akış hızı 0.1 ml/saat'ten küçük olması durumunda liflerin içerisine yüklenen ilaç miktarı azalmakta olup UV-spektrofotometre ile yapılan ölçümlerin hassasiyeti düşmüştür. Bu durumu engellemek için çekirdek çözeltisi akış hızı 0.1 ml/saat olarak belirlenmiştir.

Kabuk çözeltisinin hızı 0.2 ml/saat'ten küçük olması durumunda çekirdek çözeltisinin etrafı tamamen sarılamadığı için sabit bir Taylor konisi oluşturulamamış ve dolayısıyla ortak eksenli elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilememiştir.

Kabuk ve çekirdek akış hızları toplamının 0.4 ml/saat'ten büyük olması durumunda ise uygulanan tüm voltaj değerlerinde çözücü sistemden uzaklaştırılamamış ve damlama gözlenmiştir.

Uygulanan voltajın etkisi incelendiğinde ise 12 kV'un altındaki değerlerde oluşturulan elektrik alan, çözelti yüzey gerilimi üstesinden gelmek için yetersiz olduğundan Taylor konisi oluşturamamıştır. 12-17 kV aralığındaki voltaj değerlerinde ise çözücünün tamamı buharlaştırılmadığı için boncuklu ve kalın lif oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.3-A1). 20-22 kV aralığındaki voltaj değerleri ise liflerde kopmalara sebep olarak, kılçıklı ve çok ince yapıda lif oluşmasına neden olmuştur (Şekil 4.3-A2). Voltaj değeri 23 kV'un üzerine çıktığında ise çözelti moleküllerinin yüksek orandaki polarizasyonundan kaynaklı olarak Taylor konisi istenilen yapıda oluşturulamamış ve çoklu jet oluşumu gözlenmiştir. Diğer bir deyişle, elektro-eğirme işlemi yerine püskürtme işlemi meydana gelmiştir. İstenilen homojen yapı, boncuksuz lif üretimi ise sisteme uygulanan 18-19 kV voltaj değerleri ile elde edilebilmiştir (Şekil 4.3-A3).





Şekil 4.3 : Voltajın lif çapına ve dağılımına etkisine ait optik mikroskop görüntüleri (a) 15 kV, (b) 21 kV, (c) 18 kV.

Sonuç olarak, tekli elektro-eğirme yöntemi ile üretilen C membranları için akış hızı 0.3 ml/saat; ortak eksenli elektro-eğirme yöntemi ile üretilen CS1 ve CS2 membranlarının kabuk akış hızları ise sırasıyla 0.2 ml/saat ve 0.3 ml/saat olarak ayarlanmıştır. CS1 ve CS2 membranlarının çekirdek akış hızları ise 0.1 ml/saat

olarak sabitlenmiştir. Her üç membran grubu ön çalışmalar sonucunda belirlenen parametrelere göre üretilmiştir (Çizelge 4.1).

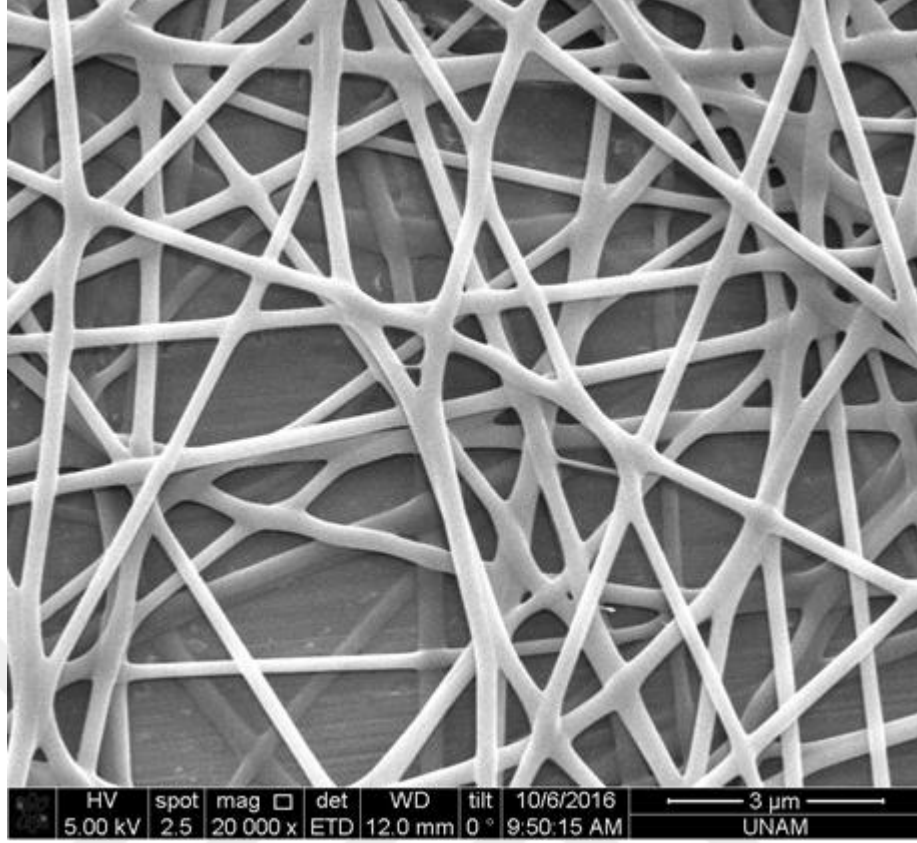
Çizelge 4.1. Membran üretimi için kullanılan elektro-eğirme parametreleri ve çözelti viskoziteleri

Membran Çeşidi	İşlem	Akış Hızı (ml/saat)		Mesafe (cm)	Voltaj (kV)	Viskozite (cP)
		Çekirdek Akışı	Kabuk Akışı			
S	-	-	-	-	-	28.6
C	Tekli	0.3	-	5.5	18	51.1
CS1	Ortak Eksenli	0.1	0.2	5.5	18	-
CS2	Ortak Eksenli	0.1	0.3	5.5	18	-

Viskozitenin elektrospon membranlar üzerindeki etkisini gözlemlemek için çekirdek ve kabuk çözeltilerinin viskozite değerleri ölçülmüştür. Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi ilacın AL-SSA çekirdek solüsyonuna ilavesi, viskozitede 28.6 cP'den 51.1 cP'ye belirgin bir artışa neden olmuştur. Çözeltideki katı madde içeriği arttığı için elde edilen nanoliflerin morfolojik özellikleri de değiştirmektedir [75].

4.2 Gluteraldehit ile Çapraz Bağ Oluşturma Çalışması Sonuçları

% 5'lik GA buharında 4 saat bekletilen C membranlarının SEM görüntüsü Şekil 4.4'te gösterilmektedir. SSA lif yüzeylerinde yüksek oranda bulunan aktif bölgeler, aldehit grupları ile birbirine bağlanarak liflerin birbiri ile kaynaşmasına sebep olmuştur. Kaynaşmanın meydana geldiği bölgelerde, yüzeydeki ilaçlar hapsedildiği ve difüzyon yolu arttığı için GA-C membranlarında ani salım oranı azalmış ve ilaç salım hızı düşmüştür. Bu sonuçlar Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.14'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

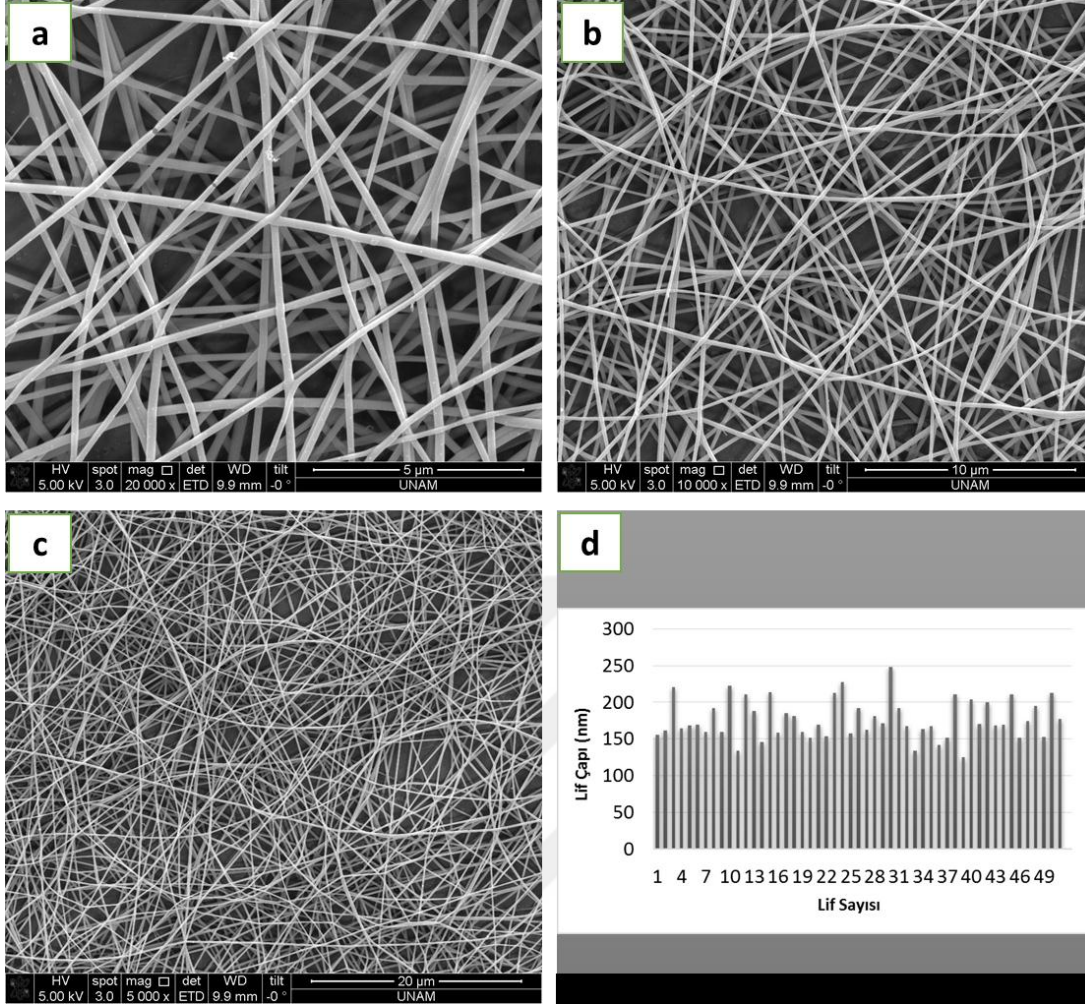


Şekil 4.4 : Çapraz bağ oluşturulmuş C membranlarına ait SEM görüntüsü.

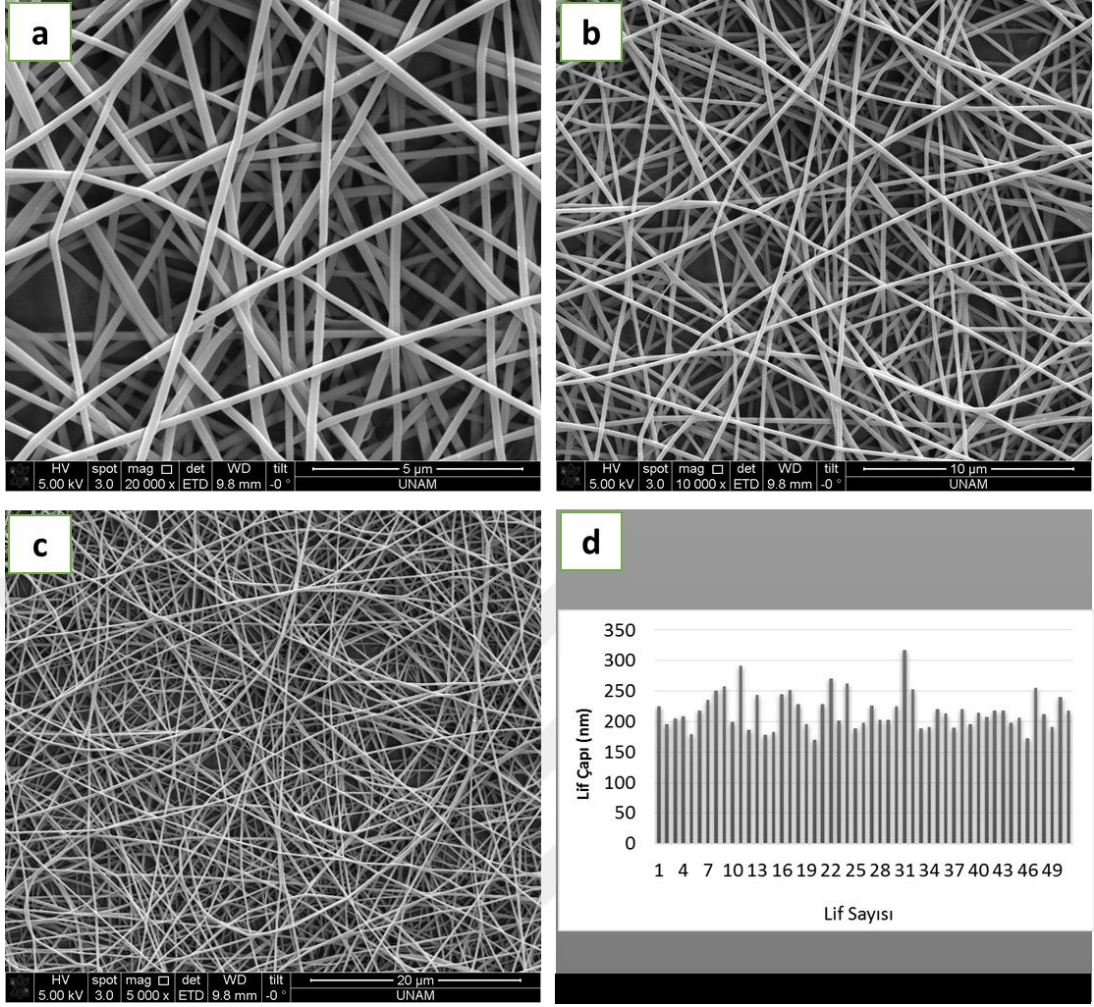
4.3 Nanoliflerin Yapı ve Morfolojisi

4.3.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analiz sonuçları

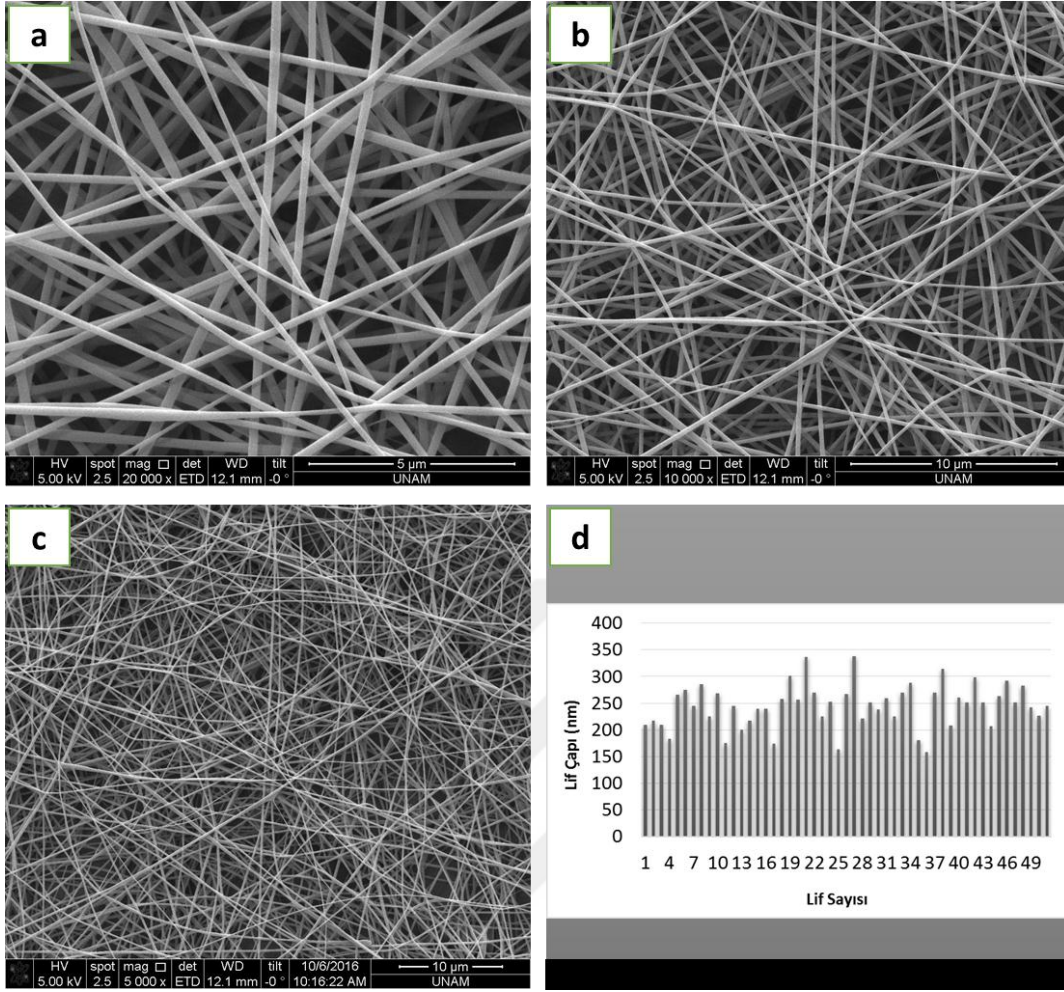
C, CS1, CS2 membranlarının morfolojik yapısı Taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak farklı büyütme oranları ile incelenmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Elde edilen görüntüler C, CS1, CS2 membranlarının, homojen bir lif dağılımına sahip olduğunu göstermiştir. Bunun yanında, kabuk-çekirdek liflerinin SEM görüntüleri, liflerin pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğunu; bu da ampisilinin lifler içerisine başarıyla yüklendiğini ve lif morfolojisinin bundan zarar görmediğini göstermiştir.



Şekil 4.5 : C membranlarına ait SEM görüntüsü a) 20 000X, b)10 000X, c) 5 000X ve d) lif çapı grafiği.



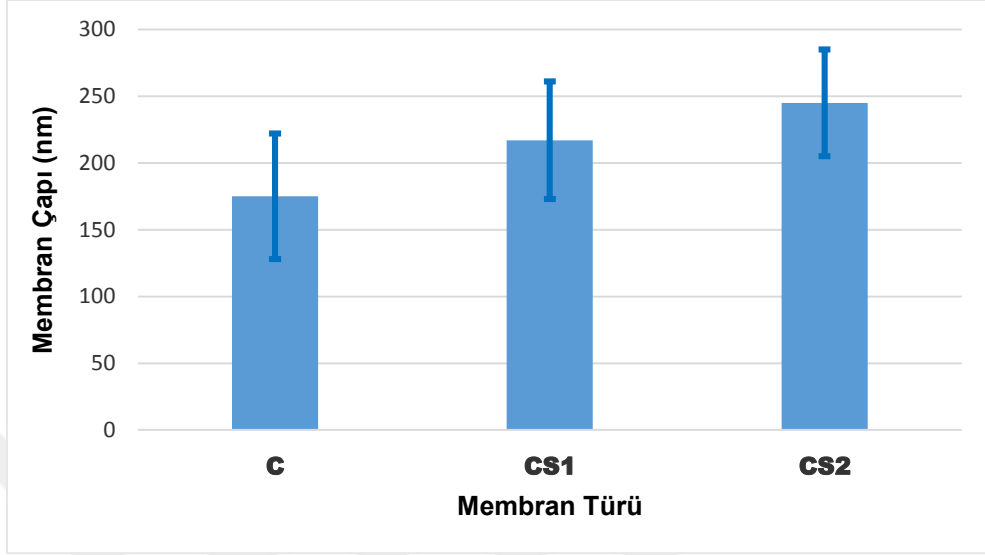
Şekil 4.6 : CS1 membranlarına ait SEM görüntüsü a) 20 000X, b)10 000X, c) 5 000X ve d) lif çapı grafiği.



Şekil 4.7 : CS2 membranlarına ait SEM görüntüsü a) 20 000X, b)10 000X, c) 5 000X ve d) lif çapı grafiği

C, CS1 ve CS2 membranları için ortalama lif çapları sırasıyla 175 ± 47 nm, 217 ± 44 nm ve 245 ± 40 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.8). Elde edilen sonuçlar, lif çaplarının elektro-eğirme işleminde kullanılan akış hızı ile ilişkili olduğunu açıkça göstermiştir. Toplam akış hızı en az (0.3 ml/saat) olan C membranlarının en ince nanolif çap dağılımına sahip olduğu yapılan hesaplamalar sonucu belirlenmiştir. Ortak eksenli membranlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, CS2 membranlarının daha yüksek kabuk akış hızına (0.3 ml/saat) sahip olması sonucu CS1 membranlarına göre daha kalın çapa sahip olduğu görülmüştür. Membranlar arasında genel bir karşılaştırma yapıldığında ise, CS1 ve CS2 membranlarının, C membranlarına göre daha kalın liflerden meydana geldiği görülmüştür. Akış hızı etkisinin yanında Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi değişen çözelti viskozitesinin de bu sonuç üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir [75-77]. Tüm membranlar için

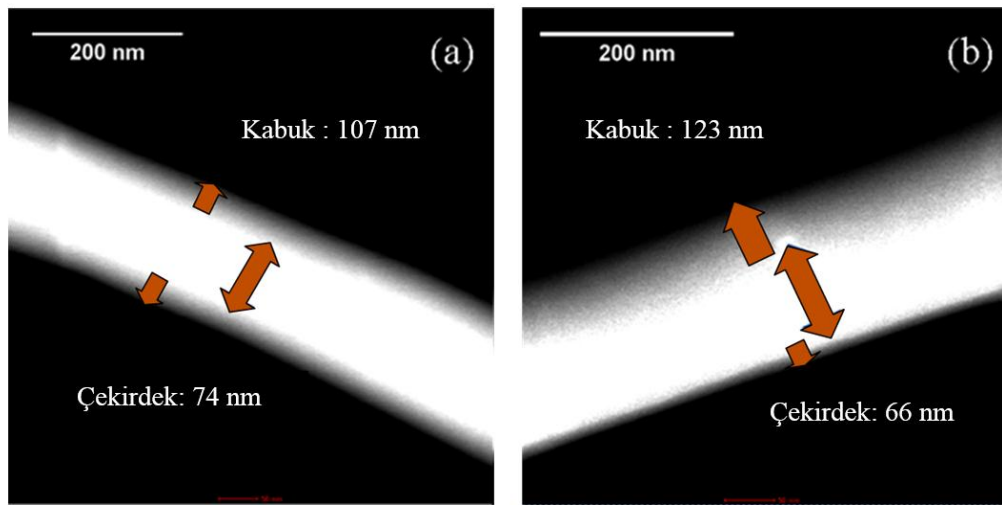
standart sapmalar kabul edilebilir bir aralıkta bulunmuştur ve küçük sapmaların, elektro-eğirme işlemi sırasında oluşan kısa süreli çoklu jetlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.8 : Membranların lif çapları.

4.3.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analiz sonuçları

Ortak eksenli elektro-eğirme nanoliflerin kabuk-çekirdek yapılarını gözlemleyebilmek için yöntem kısmında belirtilen şekilde hazırlanan gridler üzerine toplanan liflerin TEM görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 : Membranlara ait kabuk-çekirdek yapısını gösteren TEM görüntüleri a) CS1 , b)CS2.

Kullanılan Bromfenol Mavisi ile kabuk ve çekirdek polimerleri arasında yüksek kontrast sağlanabilmiştir. Lif eksenleri boyunca düzgün dağılmış bir çekirdek yapısı gözlemlenmiştir. Aynı çekirdek akış hızı ile üretilmiş CS1 ve CS2 yapıları karşılaştırıldığında liflerdeki çekirdek çaplarının yaklaşık olarak eşit olduğu görülmüştür. Aradaki küçük fark ise aynı büyüklükteki elektrostatik kuvvetin 0.3 ml/saat ve 0.4 ml/saat akış hızlarına sahip olan farklı miktardaki çözeltiler üzerine uygulanmasından kaynaklanmaktadır.

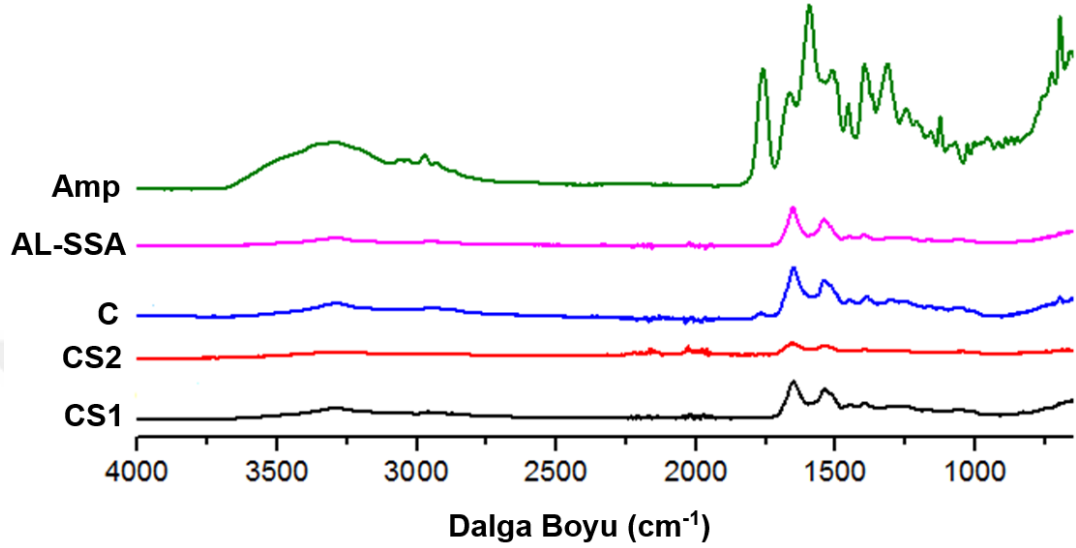
4.3.3 Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) analiz sonuçları

AL-SSA ve Amp arasındaki hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik etkileşim gibi ikincil etkileşimlerin oluşumu; membran ve ilaç arasındaki uyumluluğu göstermektedir ve ilacın difüzyon davranışını doğrudan etkilemektedir. Tekli ve ortak eksenli elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen membranlarda meydana gelen bu etkileşimler, ATR-FTIR spektrumu ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

AL-SSA membranı için, 3292 cm^{-1} dalgaboyunda elde edilen bant, -OH ve -NH (amid A) gerilmelerini göstermiştir. Ayrıca 3064 , 1652 , 1539 ve 1240 cm^{-1} 'deki karakteristik bantlar sırasıyla amid B, amid I, amid II ve amid III'e karşılık gelmektedir [78]. Amp örnekleri için -OH ve -NH gerilmeleri 3306 cm^{-1} 'de görülmüştür. Amp için karakteristik bant, 1759 cm^{-1} (CO gerilme bandı), 1598 cm^{-1} (fenil halkasının C-C gerilmesi ve C-H deformasyonu) ve 1126 cm^{-1} (-COO grup deformasyonu)'dur [79-81]. İlaçlı C ve CS1 membranlarında meydana gelen 3306 cm^{-1} 'de -OH bandının artışı; SSA de bulunan azot atomları ile ampisilin içerisindeki hidrojen atomları arasındaki etkileşimin neden olduğu hidrojen bağı oluşumu göstermiştir. Meydana gelen bu ikincil etkileşim, CS2 membranları için gözlenmemiştir [79]. CS2 membranlarının kabuk kısımları CS1'e kıyasla daha kalındır. Kabuk kalınlığındaki artışın, membran içerisindeki ampisilin ve AL-SSA arasındaki meydana gelen hidrojen bağlarının görüntülenmesini engellediği düşünülmektedir.

Çekirdek çözeltisi ile üretilen C membranlarında 1765 cm^{-1} 'de meydana gelen bant; ilacın membran içinde hapsedilemediğini, bir kısmının membran yüzeyine sızdığını

göstermiştir. CS1 ve CS2 membranlarında ise herhangi bir karakteristik bant gözlenmemiştir. Bu membranlar ortak eksenli elektro-eğirme yöntemi ile üretildiği için ilaç çevresinde bir kabuk bulunmakta ve bu kabuk ilacın yüzeye ulaşmasını engellemiştir. İlacın membranlar içerisine hapsedilmesi başarı ile sonuçlanmıştır.

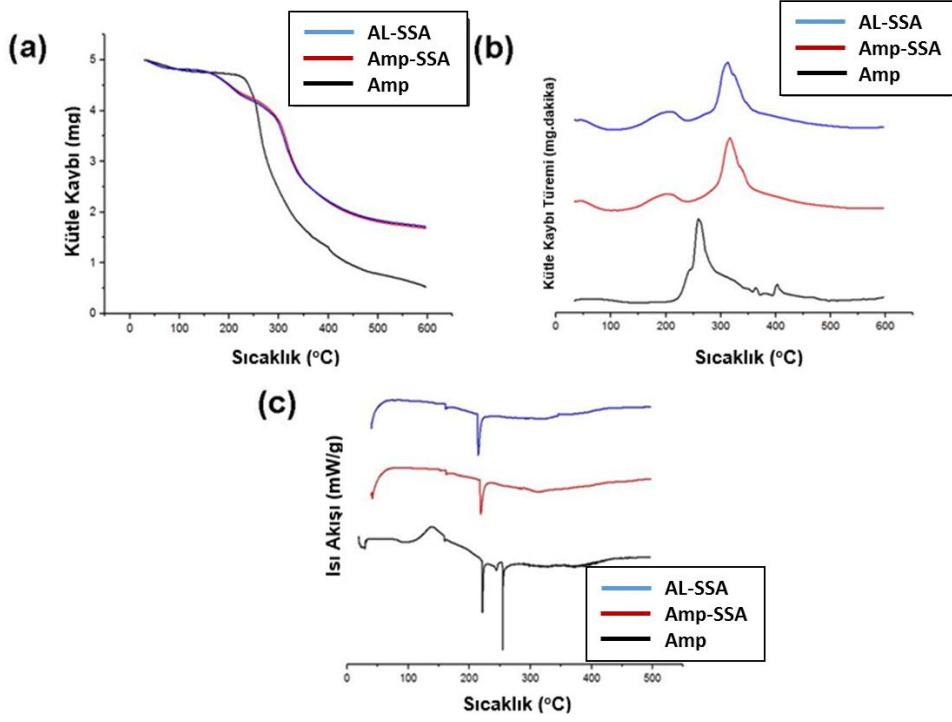


Şekil 4.10 : Saf Amp, AL-SSA, C, CS1 ve CS2 membranlarının FTIR-ATR spektrumu.

4.3.4 Termal analiz sonuçları

Amp, AL-SSA ve % 50 (w: w) Amp-SSA membranlarının termal kararlılıkları TGA analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Tüm örnekler için 30 - 150 °C aralığında dehidrasyon ve çözücü buharlaşmasından kaynaklı olarak, başlangıç termal geçiş değişimi gözlenmiştir. Saf ampisilin ≈ 240-600 °C sıcaklık aralığında tek basamaklı bozunma göstermiş ve kütle kaybı yaklaşık % 90 olarak bulunmuştur. Amp-SSA ve AL-SSA membranlar için ise ağırlık kaybı iki basamakta gerçekleşmiş olup, elde edilen TGA eğrileri yüksek oranda benzerlik göstermiştir. AL-SSA ve % 50 (w: w) Amp-SSA membranının ilk ağırlık kaybı ≈180 °C’de gerçekleşmiştir. Ancak en büyük ağırlık kaybı ≈305 °C de gerçekleşen ikinci bozunmada meydana gelmiştir. % 50 (w: w) Amp-SSA membran için, içerdiği ilacın bozunduğu üçüncü bir adımın elde edilmesi beklenmiştir. Ancak bu basamak elde edilen TGA eğrilerinde gözlemlenememiştir. Bu karakteristik bozunma adımının yokluğu, ilaçsız kabuk içerisinde yer alan ilaçlı çekirdek bölgesinin, tüm membrana

oranla düşük ampisilin içeriği nedeniyle kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ampisilin oranının düşük olması üçüncü adımın ayırt edilememesine neden olmuştur.



Şekil 4.11 : AL-SSA, Amp-SSA ve Amp örnekleri için a) TGA, b) DTGA, c) DSC eğrileri.

Amp, AL-SSA membranı ve % 50 Amp-SSA için TGA grafiğinden elde edilen kütle kaybı türevlerine (DTGA) ait eğriler Şekil 4.11b' de gösterilmiştir. DTGA toplu kütle azalışının meydana geldiği sıcaklıklar hakkında bilgi vermektedir. Elde edilen sonuçlar, maksimum ağırlık kaybının Amp için ≈ 259 °C' de, AL-SSA ve % 50 (w:w) Amp-SSA membranları için ise ≈ 312 °C' de gerçekleştiğini göstermiştir.

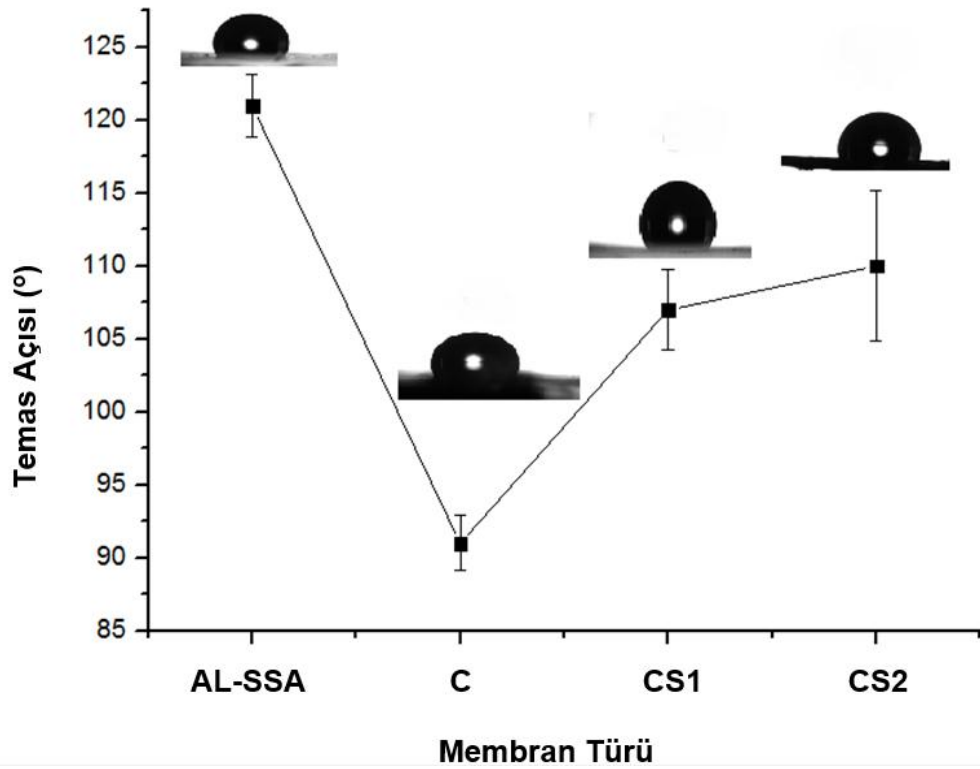
DSC ile yapılan termal analiz sonuçları ise Şekil 4.11c'de gösterilmiştir. DSC eğrileri Amp için, 100-150 °C arasındaki dehidrasyondan kaynaklandığı düşünülen, geniş bir endoterm göstermiştir. Amp için hal değişimini gösteren endotermik pikler 221 °C ve 240 °C'de meydana gelmiştir. ≈ 214.36 °C'de oluşan keskin endotermik pik ise AL-SSA için, erime sıcaklığını (T_m) temsil eden etmektedir. Amp-SSA DSC eğrisi, Amp'nin AL-SSA membranına eklenmesinin; membranın erime sıcaklığında artışa (≈ 219 °C) neden olduğunu göstermiştir. Erime sıcaklığında meydana gelen bu

artışın, ampisilin ilave edildikten sonra hidrojen bağı oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir [82-84].

4.3.5 Temas açısı ölçüm sonuçları

Temas açısı analizi, ampisilin AL-SSA membran yapısına etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. AL-SSA, C, CS1 ve CS2 membranları için elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

Sonuçları incelendiğinde, AL-SSA membranlarının hidrofobik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durumun nedeni daha önce yapılan çalışmalarda da bildirildiği gibi amiloid formdan lif oluşumunun, proteindeki β -tabakaları arasındaki hidrofobik etkileşimler sonucu meydana gelmesidir [78].



Şekil 4.12 : AL-SSA, C, CS1 ve CS2 membranlarına ait temas açısı sonuçları.

Ampisilin ilavesi sonrası tekli elektro-çirime işlemi ile üretilen C membranların ait sonuçlarında ise temas açısının azaldığı görülmüştür. Bu durum, yüzeyde bulunan yüksek miktardaki ampisilin nedeniyle yüzeyin hidrofobik karakterinin azalmasından

kaynaklanmıştır. Ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile üretilen CS1 ve CS2 membranlarında ise bu durumun etkisi nispeten daha az görülmüştür. Bu membranlar için temas açısı değerleri, kabuk benzerliği nedeniyle birbirine yakın ölçülmüştür ve dış yüzeylerinde ilaç içermeyen bir AL-SSA kabuk olduğu için C membranlarına göre hidrofobiteleri daha yüksektir. Ancak yine de yapıda bulunan ilacın, eğirme işlemi sırasında kabuk ile yapmış olduğu temas, membranların AL-SSA mebranlarına göre daha düşük temas açısı sonucu vermesine neden olmuştur.

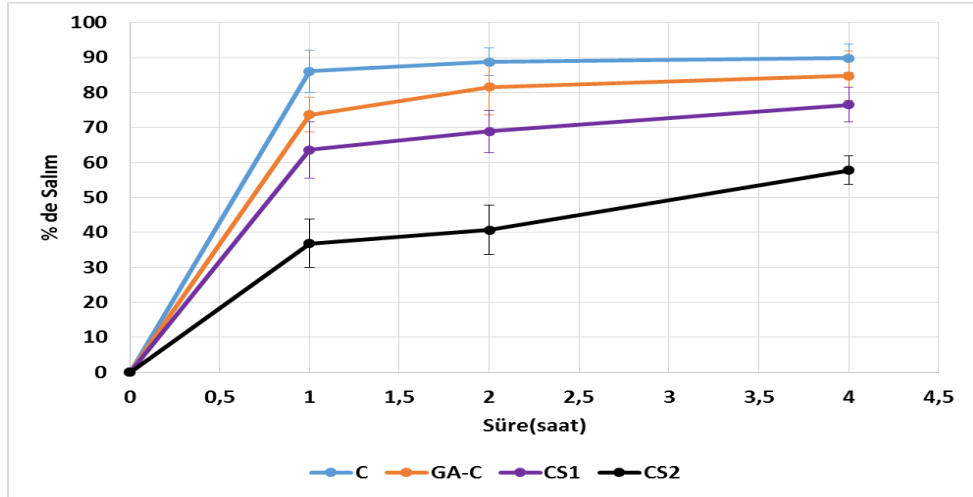
4.4 Salım Testi Sonuçları

C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının in vitro ilaç salım profilleri, UV-Görünür spektrofotometresi kullanılarak elde edilen ilaç derişimlerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilmiş, GA modifikasyonu ve kabuk-çekirdek oluşumunun ilaç salımı üzerine etkisi bu profiller üzerinden incelenmiştir. Elde edilen amiloid benzeri yapıların, şişme yeteneği olmaması ve PBS içerisinde sınırlı bir bozunma hızına sahip olması nedeniyle şişme kontrollü veya kimyasal kontrollü ilaç salım mekanizmaları ortadan kalkmıştır. Bu durumda, AL-SSA membranlarının salım mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğu varsayılmaktadır [81, 83, 85].

PBS ortamına salınan ampisilin miktarını belirlemek için önce bilinen ampisilin konsantrasyonlarının UV absorbans değerleri ölçülerek; konsantrasyon ve absorbans arasındaki bağlantıyı gösteren bir kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu amaçla kullanılan kalibrasyon eğrisi Deneysel Gereç ve Yöntemler bölümünde gösterilmektedir. Amp konsantrasyonu (mg/mL) C, ve 204 nm' de çözelti absorbansı A olmak üzere, kalibrasyon eğrisinden türetilen formül şu şekildedir;

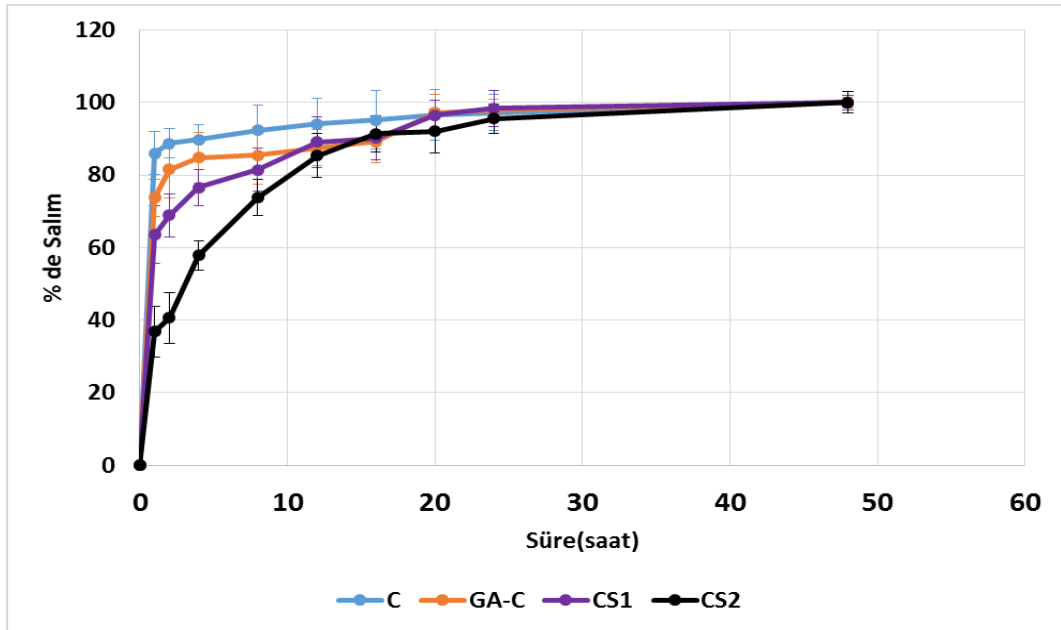
$$C=0.024 A - 2.19*10^{-3} \quad (4.1)$$

C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının in vitro ilaç salım profilleri ve her membrandan ampisilinin toplam salım yüzdeleri Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13 : C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının ilk 4 saat boyunca in vitro ilaç salım profili.

İlaç salım çalışmalarının ilk aşamasında, tekli elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen C membranlarının ilaç salım davranışları incelenmiştir. Sonuçlar, ilacın % 80'inden fazlasını ilk bir saat içerisinde serbest bırakan C membranlar ani salım oranının en yüksek olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni ise yüksek miktarda (% 50 w:w) Amp kullanılarak hazırlanan çekirdek çözeltisinin, C liflerinin üretimi için kullanılması nedeniyle, taşıyıcı sistemin ilacın tamamını hapsedememesi sonucunda ilacın büyük bir kısmının taşıyıcı yüzey üzerinde birikmesidir.



Şekil 4.14 : C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının 48 saatlik in vitro ilaç salım profili.

İkinci aşamada ise C membranlardaki ani salımı azaltmak için, yüzeyinde glutaraldehit ile çapraz bağ oluşturulan GA-C membranları incelenmiştir. Sonuçlar, çapraz bağlı GA-C membranlarının ani salım oranını %80'den %75'e düşürdüğünü göstermiştir. Ani salım oranının görece olarak azalması, membran yüzeyinde oluşturulan amin grupları arasında çapraz bağlanma sonucu Amp difüzyonunun yavaşlatılmasından kaynaklanmaktadır.

Son aşamada ise membranlardan salınan ilaç miktarının hızını kontrol edebilmek için, ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile üretilen, ilacın bir kabuk ile çevrelendiği, kabuk-çekirdek şeklinde CS1 ve CS2 membranlarının ilaç salım davranışları incelenmiştir. Tekli elektro-eğirme yöntemi ile üretilen C ve GA-C membranlarının aksine, CS1 ve CS2 membranları iki fazlı bir salım mekanizması göstermiştir [86]. İlk basamakta sırasıyla % 64 ve % 37'lik ani salım ve ardından yavaşlayan bir salım davranışı gözlenmiştir. CS2 membranlarının ani salım oranının daha az ve ikinci bölgedeki ilaç salım mekanizmasının daha yavaş olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, daha yüksek kabuk akış hızı ile üretilmesi, dolayısıyla da kabuk kalınlığının daha büyük olması olarak açıklanabilmektedir (Kabuk kalınlığı; CS1: 107 nm, CS2: 121 nm). Artan kabuk kalınlığı membran içerisindeki ilacın difüzyonunu güçleştirmektedir.

Salım davranışlarını analiz etmek için, Ritger ve Peppas denklemi ($Q = kt^n$) kullanılmıştır; burada Q zamanla salınan toplam ilaç yüzdesini, k emisyon sabitini ve n salım mekanizmasını temsil etmektedir [84]. Silindirik sistemlerde, salım bileşeni (n) 0.45'e eşit veya daha düşük olduğunda ilaç salımı Fick yasası ile kontrol edilmektedir. Bu değer sıfır olduğunda ise sistem, sıfıncı derece kinetik göstermektedir. Bu durum n değeri sıfıra yakın olan C ve GA-C membranlarında görülmektedir. Bir saatlik ani salım sonrası yapıda kalan ilaç, sıfıncı derece kinetik ile sistemden uzaklaşmaktadır. CS1 ve CS2 membranlarında ise n değeri sırasıyla 0.327 ve 0.137 olarak hesaplanmıştır. Bu membranlarda ani salım sonrası ilaç salımı kontrol mekanizması n değeri 0.45 den küçük olması nedeniyle Fick yasasına uygundur. C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının ilaç salım denklemleri Çizelge 4.2'de listelenmiştir.

Çizelge 4.2. C, GA-C, CS1 ve CS2 membranlarının regresyon denklemleri ve korelasyon katsayısı (R^2).

	C	GA-C	CS1	CS2
R^2	0.992	0.989	0.988	0.996
Q	$0.007 \times t^{0.039}$	$0.003 \times t^{0.086}$	$0.003 \times t^{0.327}$	$0.002 \times t^{0.137}$

Ampisilin'in AL-SSA kabuk-çekirdek membranlarından salım mekanizması şu şekilde açıklanmaktadır: Başlangıçta, PBS tampon çözeltisi Amp-SSA lifleri boyunca yayılmaya başlar. Önce lif yüzeyindeki ilaç moleküllerini eritmektedir ve bu durum sistemde ani salım olarak ortaya çıkmaktadır. Daha sonra ise ilaç içeren çekirdek kısmına ulaşmaktadır ve burada bulunan ilaçlar çözülmeye başlamaktadır. Konsantrasyon farkından kaynaklı olarak çözünen ampisilin, daha az yoğunluğa sahip lif dışına çıkmak için kabuğa doğru difüzlendirilmektedir. Difüzyon hızı mesafe ile yakından ilişkili olduğundan, kabuk kalınlığı ilaç salım mekanizması üzerinde doğrudan rol oynamaktadır. Elektro-eğirme sistemi ve çözelti parametreleri, liflerin kabuk kalınlığını, dolayısıyla salım mekanizmasını değiştirmek için ayarlanabilmektedir [87].

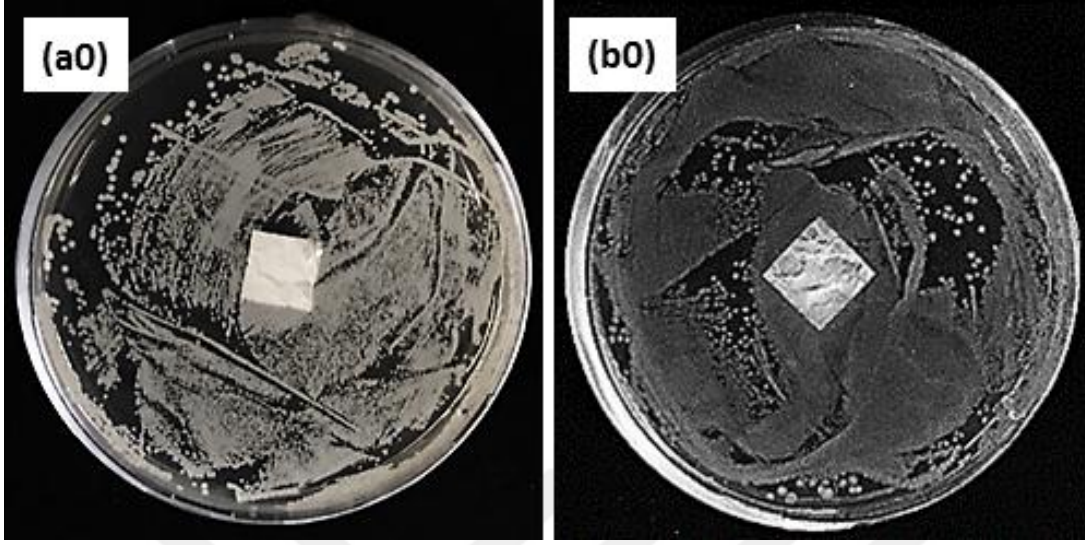
4.5 Nanoliflerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

İlaç içermeyen negatif kontrol (NC) ve % 50 oranında ilaç içeren C, GA-C, CS1, CS2 membranlarının antimikrobiyal aktivitesi tipik klinik patojenler olan *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı test edilmiştir.

Tek koloni düşürme yöntemi ile ekim yapılan agarlardan alınan sayım sonucu *E.coli* ve *S.aureus* başlangıç süspansiyonlarının içerdiği bakteri sayısının sırasıyla 10^8 cob/ml ve 10^7 cob/ml olduğu belirlenmiştir.

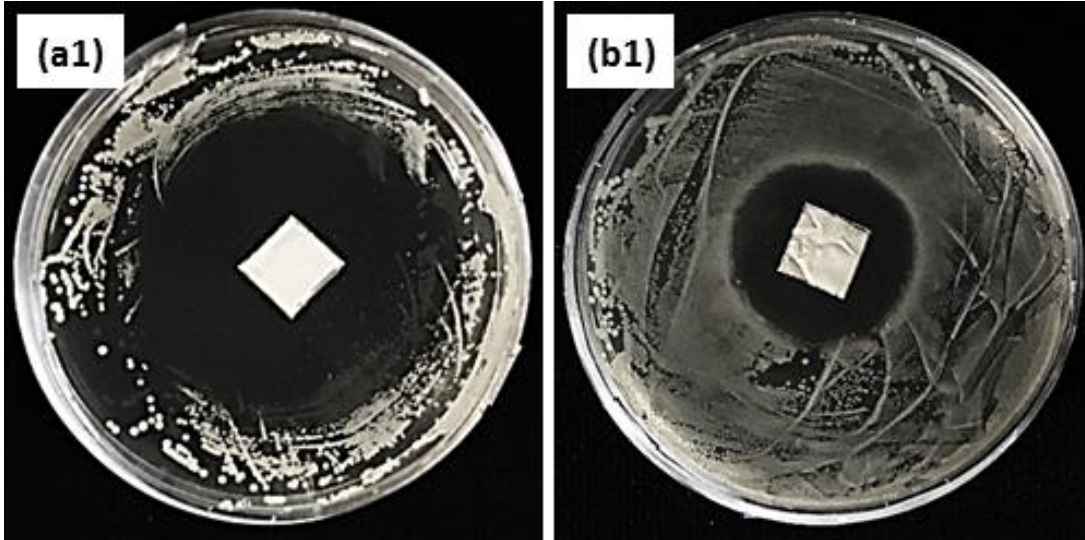
Antimikrobiyal aktivite test sonuçları, membranlar içerisine yüklenmiş olan ilacın membran dışına difüzlenererek, bakteri gelişimini engellediğini göstermiştir. Agar yüzeyinde bulunan boş, koloni gelişiminin gerçekleşmediği, alanlar inhibisyon

bölgesi olarak tanımlanır ve bu bölgenin alanı bakterilerin direnci ile ters orantılıdır [88].



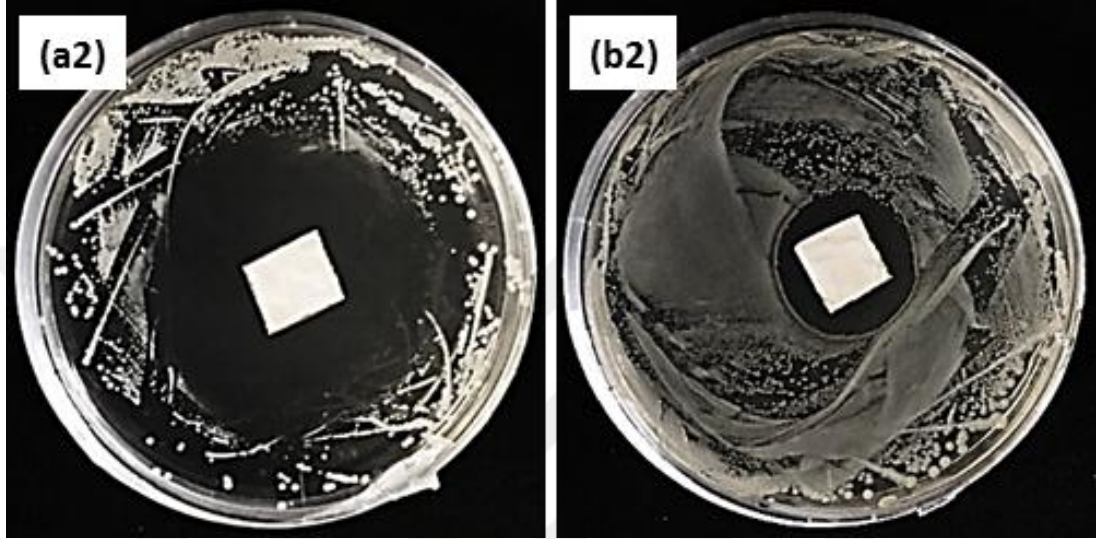
Şekil 4.15 : NC membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a0) *S.aureus*, b0) *E.coli*.

NC membranlarının test sonuçlarına göre agar yüzeyinde inhibisyon bölgelerinin olmaması, ilaçsız membranların herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını göstermiştir (Şekil 4.15).



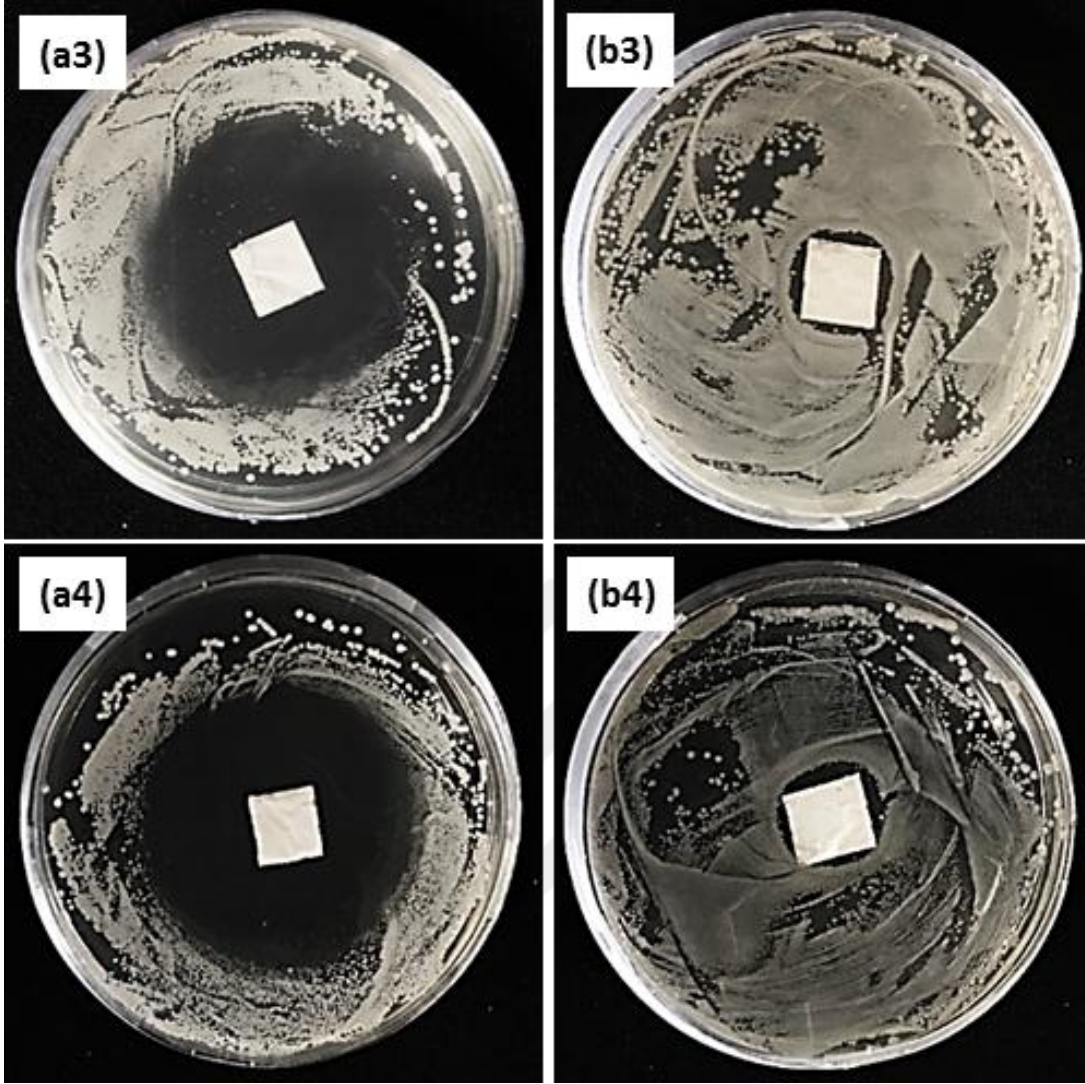
Şekil 4.16 : C membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a1) *S.aureus*, b1) *E.coli*.

Membranlar kendi içlerinde karşılaştırıldığında iki bakteri grubu için de en geniş inhibisyon bölgesi C membranlarında gözlenmiştir (Şekil 4.16). Nedeni ise bu membranların tekli elektro-eğirme ile üretilmesi sonucu, yüzeylerinde yüksek oranda ilaç bulundurması olarak açıklanmaktadır. Elde edilen bu sonuç ilaç salım sonuçları ile de paralellik göstermekte olup C membranlarının yüksek orandaki ani salımından kaynaklanmıştır.



Şekil 4.17 : GA-C membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri
a2) *S.aureus*, b2) *E.coli*.

Çapraz bağlanmış GA-C membranlarının analiz sonuçlarına bakıldığında ise inhibisyon bölgelerinin C membranlarına göre daha küçük olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Bunun nedeni nanolifler yüzeylerinde oluşturulan çapraz bağların agar yüzeyine difüzenen ilaç miktarını azaltması ile açıklanmaktadır.



Şekil 4.18 : CS1 ve CS2 membranlarına ait antimikrobiyal test görüntüleri a3) CS1 için *S.aureus*, a4) CS2 için *S.aureus*, b3) CS1 için *E.coli*, b4) CS2 için *E.coli*.

CS1 ve CS2 membranlarının inhibisyon bölgeleri incelendiğinde ise görece olarak en küçük alana sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.18). Ortak eksenli elektro-eğirme işleminden kaynaklı olarak bu iki membran grubunun kabuk-çekirdek yapısına sahiptir. Bunun sonucu olarak ise dışta bulunan ilaçsız kabuk çekirdekteki ilacın difüzyonunu zorlaştırıp agar yüzeyine salınan ilaç miktarını azalmasına neden olmaktadır. Salınan ilaç miktarının düşük olması CS1 ve CS2 membranlarının inhibisyon bölgelerinin daha küçük olmasına neden olmuştur.

E.coli'ye karşı oluşturulan inhibisyon bölgeleri *S.aureus*'a karşı oluşturulan inhibisyon bölgelerinden daha küçüktür. Bu durum ekim yapılan *E.coli* sayısının

S.aureus sayısından fazla olmasından kaynaklanmaktadır. *E.coli*'ye karşı oluşturulan inhibisyon bölgelerinin daha küçük olmasının diğer bir nedeni ise gram negatif bakterilerin, gram pozitif bakterilere göre ampisiline karşı daha dirençli olmasıdır [88, 89]. Antimikrobiyal test sonuçları ampisilin ilaç aktivitesinin elektro-eğirme işlemi sonrası kaybolmadığını göstermiştir. Ayrıca membranlar içerisindeki ilaç miktarının başlangıç mikroorganizma süspansiyonlarının içerdiği 10^7 cob/ml ve 10^8 cob/ml yoğunluğundaki bakteri inhibisyonu için yeterli olduğu görülmüştür.





5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada doğal destek malzemesi ile üretilen ilaç salım sistemlerinin tasarlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla model ilaç ampisilin, ortak eksenli elektro-eğirme işlemi ile AL-SSA lifleri içerisine yüklenmiş ve işlem sonucu elde edilen kabuk-çekirdek yapısındaki mebranların ilaç salım davranışları incelenmiştir. Bu işlemin etkinliği, tekli elektro-eğrilmiş lifler (C) ve yüzeylerinde çapraz bağ oluşturulmuş C membranları (GA-C) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

SEM görüntüleri sonucu elde edilen veriler, ilaç ile SSA arasındaki uyum sayesinde pürüzsüz yüzeye sahip liflerin üretildiğini ve elde edilen liflerin homojen bir dağılıma sahip olduğunu göstermiştir. Lifler üzerinde yapılan ölçümler sonucu C, CS1 ve CS2 membranlarının sırasıyla 175 ± 47 nm, 217 ± 44 nm ve 245 ± 40 nm lif çapına sahip olduğu görülmüştür.

TEM analizi ile ortak eksenli yapıya sahip nanoliflerin başarılı bir şekilde üretildiği ortaya konmuştur. Ortak eksenli nanoliflerin TEM analizinde kabuk-çekirdek morfolojisinin gözlenmesi, çekirdek çözeltisine uygun boya (stain) ilavesi ile kabuk ve çekirdek arasında yeterli kontrast yaratılmasıyla mümkün olmuştur. Yaratılan kontrast sayesinde kabuk ve çekirdek çapları ayrı ayrı ölçülmüş ve kabuk akış hızı artışının, kabuk çapını arttırdığı belirlenmiştir.

FTIR spektrumları, ampisilindeki hidroksil grupları ile AL-SSA'daki amin grupları arasında oluşan hidrojen bağlarını sayesinde ilaç ile destek malzemesi arasında yüksek uyumluluğun olduğunu göstermiştir.

TGA/DSC analiz sonucunda, ampisilinin AL-SSA membranına eklenmesi sonrası, ilaç ile protein arasında meydana gelen etkileşimlerden kaynaklı olarak membranın erime sıcaklığının arttığı görülmüştür.

Temas açısı analizleri, membranların hidrofobik karakterde olduğu göstermiştir. İlaç yüklemesi sonrası özellikle C membranlarında yüzeyde yüksek oranda ilaç varlığı hidrofobik karakterde azalmaya neden olmuştur. CS1 ve CS2 membranlarında ise yüzeylerinde ilaçsız bir kabuk bölgesine sahip olmaları nedeniyle bu azalma oranının çok daha düşük olduğu görülmüştür.

In vitro salınım testleri C ve GA-C'nin yüksek oranda ani salım oluşturduktan sonra sıfır hız kinetiğini izlediğini, CS1 ve CS2'nin ise düşük oranda ani salım sonrası ve sürekli salım safhaları olmak üzere tipik iki fazlı salınım davranışları gösterdiğini ortaya koymuştur. Kabuk kalınlığındaki artışın difüzyon süresini geciktirdiği ve bu sayede ilaç salım süresinin uzatılabildiği görülmüştür.

İlaç yüklü nanoliflerin tipik klinik patojenler olan *E.coli* ve *S.aureus* karşı gösterdikleri antimikrobiyal etki, elektro-eğirme işlemi sonrası ilaç etkinliğinin bozunmadığını ve membranlar içerisine yüklenen ilaç miktarının bakteri inhibisyonu için yeterli olduğunu göstermiştir.

Gelecek çalışmalarda ise;

- Kabuk sıvısının konsantrasyonunu ve akış oranını değiştirerek geciktirilmiş ilaç salım profillerinin elde edilmesi,
- Hidrofobik veya hidrofilik ilaçlar dışında, peptitler, proteinler, büyüme faktörleri ve plazmid DNA gibi biyolojik ajanların kontrollü salım çalışmalarının yapılması,
- In vitro olarak elde edilen sonuçların, in vivo koşullarda kullanılabilirliğinin araştırılması

önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Jain, K. K. (Ed.).** (2008). *Drug delivery systems* (Vol. 437). Springer Science & Business Media.
- [2] **Jain, K. K.** (2008). *The handbook of nanomedicine* (Vol. 404). Totowa:: Humana Press.
- [3] **Langer, R.** (1980). Invited review polymeric delivery systems for controlled drug release. *Chemical Engineering Communications*, 6(1-3), 1-48.
- [4] **Nguyen, T. T. T., Ghosh, C., Hwang, S. G., Chanunpanich, N., & Park, J. S.** (2012). Porous core/sheath composite nanofibers fabricated by coaxial electrospinning as a potential mat for drug release system. *International journal of pharmaceutics*, 439(1), 296-306.
- [5] **Nair, L. S., & Laurencin, C. T.** (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8), 762-798.
- [6] **Panthi, G., Park, M., Kim, H. Y., & Park, S. J.** (2015). Electrospun polymeric nanofibers encapsulated with nanostructured materials and their applications: a review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 24, 1-13.
- [7] **Chung, H. J., & Park, T. G.** (2007). Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4), 249-262.
- [8] **Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., & Koombhongse, S.** (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied physics*, 87(9), 4531-4547.
- [9] **Schreuder-Gibson, H., Gibson, P., Senecal, K., Sennett, M., Walker, J., Yeomans, W., ... & TSAI, P. P.** (2002). Protective textile materials based on electrospun nanofibers. *Journal of advanced materials*, 34(3), 44-55.
- [10] **Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S.** (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology*, 63(15), 2223-2253.

- [11] **Theron, S. A., Yarin, A. L., Zussman, E., & Kroll, E.** (2005). Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer*, 46(9), 2889-2899.
- [12] **Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., & Ramakrishna, S.** (2005). Potential of nanolif matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue engineering*, 11(1-2), 101-109.
- [13] **Zhang, Y. Z., Venugopal, J., Huang, Z. M., Lim, C. T., & Ramakrishna, S.** (2005). Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanolifs using fibroblasts. *Biomacromolecules*, 6(5), 2583-2589.
- [14] **Chunder, A., Sarkar, S., Yu, Y., & Zhai, L.** (2007). Fabrication of ultrathin polyelectrolyte lifs and their controlled release properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(2), 172-179.
- [15] **Moghe, A. K., & Gupta, B. S.** (2008). Co-axial electrospinning for nanolif structures: preparation and applications. *Polymer Reviews*, 48(2), 353-377.
- [16] **Saraf, A., Baggett, L. S., Raphael, R. M., Kasper, F. K., & Mikos, A. G.** (2010). Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun lif mesh scaffolds. *Journal of Controlled Release*, 143(1), 95-103.
- [17] **Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., & Supaphol, P.** (2007). Effect of cross-linking on properties and release characteristics of sodium salicylate-loaded electrospun poly (vinyl alcohol) fibre mats. *Nanotechnology*, 18(17), 175102.
- [18] **Pillai, O., & Panchagnula, R.** (2001). Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 5(4), 447-451.
- [19] **Çelik, G.** (2013). *İlaç yüklü nanolif sistemlerden kontrollü ilaç salınımı*(yüksek lisans tezi) Adres: <http://sdu.edu.tr>
- [20] **Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A.** (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1, 149-173.
- [21] **Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J.** (1995). *Molecular cell biology* (Vol. 3). New York: Scientific American Books.
- [22] **Liu, J., Xiao, Y., & Allen, C.** (2004). Polymer–drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(1), 132-143.

- [23] **Darnell, J., & Lodish, H. B.** (1990). Molecular cell biology (No. QH581. 2 D22 1990).
- [24] **Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M.** (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*, 99(11), 3181-3198.
- [25] **Kretlow, J. D., Klouda, L., & Mikos, A. G.** (2007). Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4), 263-273.
- [26] **Siepmann, J., Siegel, R. A., & Rathbone, M. J. (Eds.).** (2011). *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. Springer Science & Business Media.
- [27] **Lin, C. C., & Metters, A. T.** (2006). Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews*, 58(12), 1379-1408.
- [28] **Singhvi, G., & Singh, M.** (2011). In-vitro drug release characterization models. *Int J Pharm Stud Res*, 2(1), 77-84.
- [29] **Costa, P., & Lobo, J. M. S.** (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.
- [30] **Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P.** (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-23.
- [31] **Streubel, A., Siepmann, J., Peppas, N. A., & Bodmeier, R.** (2000). Bimodal drug release achieved with multi-layer matrix tablets: transport mechanisms and device design. *Journal of Controlled Release*, 69(3), 455-468.
- [32] **Yu, D. G., Li, X. Y., Wang, X., Chian, W., Liao, Y. Z., & Li, Y.** (2013). Zero-order drug release cellulose acetate nanofibers prepared using coaxial electrospinning. *Cellulose*, 20(1), 379-389.
- [33] **Liu, H., Leonas, K. K., & Zhao, Y.** (2010). Antimicrobial properties and release profile of ampicillin from electrospun poly (ϵ -caprolactone) nanofiber yarns. *J Eng Lif Fabr*, 5(4), 10-19.
- [34] **Reneker, D. H., & Chun, I.** (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7(3), 216.
- [35] **Sill, T. J., & von Recum, H. A.** (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006.

- [36] **Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. E. A., & Tan, N. B.** (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1), 261-272.
- [37] **Kabay, G.** (2015). *Amiloid tabanlı biyokatalitik membran üretimi*(yüksek lisans tezi). Adres: <http://etu.edu.tr/>
- [38] **Thompson, C. J., Chase, G. G., Yarin, A. L., & Reneker, D. H.** (2007). Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*, 48(23), 6913-6922.
- [39] **Tan, S. H., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S.** (2005). Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, 46(16), 6128-6134.
- [40] **Kumar, P.** (2012). *Effect of collector on electrospinning to fabricate aligned nanofiber* (Doctoral dissertation).
- [41] **Koski, A., Yim, K., & Shivkumar, S.** (2004). Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58(3), 493-497.
- [42] **Theron, S. A., Zussman, E., & Yarin, A. L.** (2004). Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*, 45(6), 2017-2030.
- [43] **Li, Z., & Wang, C.** (2013). Effects of working parameters on electrospinning. In *One-Dimensional Nanostructures* (pp. 15-28). Springer Berlin Heidelberg.
- [44] **De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., & De Clerck, K.** (2009). The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of materials science*, 44(5), 1357.
- [45] **Qu, H., Wei, S., & Guo, Z.** (2013). Coaxial electrospun nanostructures and their applications. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(38), 11513-11528.
- [46] **Yarin, A. L.** (2011). Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies*, 22(3), 310-317.
- [47] **Lyons, J., Li, C., & Ko, F.** (2004). Melt-electrospinning part I: processing parameters and geometric properties. *Polymer*, 45(22), 7597-7603.
- [48] **Dalton, P. D., Grafahrend, D., Klinkhammer, K., Klee, D., & Möller, M.** (2007). Electrospinning of polymer melts: phenomenological observations. *Polymer*, 48(23), 6823-6833.

- [49] **Reneker, D. H., Yarin, A. L., Zussman, E., & Xu, H.** (2007). Electrospinning of nanofibers from polymer solutions and melts. *Advances in applied mechanics*, *41*, 43-346.
- [50] **Moghe, A. K., & Gupta, B. S.** (2008). Co-axial electrospinning for nanofiber structures: preparation and applications. *Polymer Reviews*, *48*(2), 353-377.
- [51] **Sun, Z., Zussman, E., Yarin, A. L., Wendorff, J. H., & Greiner, A.** (2003). Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced materials*, *15*(22), 1929-1932.
- [52] **Zhang, Y. Z., Wang, X., Feng, Y., Li, J., Lim, C. T., & Ramakrishna, S.** (2006). Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly (ϵ -caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules*, *7*(4), 1049-1057.
- [53] **Yu, J. H., Fridrikh, S. V., & Rutledge, G. C.** (2004). Production of submicrometer diameter fibers by two-fluid electrospinning. *Advanced Materials*, *16*(17), 1562-1566.
- [54] **Díaz, J. E., Barrero, A., Márquez, M., & Loscertales, I. G.** (2006). Controlled encapsulation of hydrophobic liquids in hydrophilic polymer nanofibers by co-electrospinning. *Advanced Functional Materials*, *16*(16), 2110-2116.
- [55] **Fazley Elahi MD., Lu W., Guoping G., Khan F.** (2013). Core-shell fibers for biomedical applications—A review. *J Bioeng Biomed Sci* 3:1–14.
- [56] **Loscertales, I. G., Barrero, A., Guerrero, I., Cortijo, R., Marquez, M., & Ganan-Calvo, A. M.** (2002). Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets. *Science*, *295*(5560), 1695-1698.
- [57] **Zhang, Y., Huang, Z. M., Xu, X., Lim, C. T., & Ramakrishna, S.** (2004). Preparation of core-shell structured PCL-r-gelatin bi-component nanofibers by coaxial electrospinning. *Chemistry of Materials*, *16*(18), 3406-3409.
- [58] **Liao, I. C., Chen, S., Liu, J. B., & Leong, K. W.** (2009). Sustained viral gene delivery through core-shell fibers. *Journal of Controlled Release*, *139*(1), 48-55.
- [59] **Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., Zhao, P., Zhu, K., & Chen, W.** (2005). A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*, *108*(2), 237-243.

- [60] **Huang, Z. M., He, C. L., Yang, A., Zhang, Y., Han, X. J., Yin, J., & Wu, Q.** (2006). Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 77(1), 169-179.
- [61] **Park, J., & Lakes, R. S.** (2007). *Biomaterials: an introduction*. Springer Science & Business Media.
- [62] **Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q.** (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, 33(6), 362-369.
- [63] **Korhonen, H., & Pihlanto, A.** (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
- [64] **Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S., & Lelkes, P. I.** (2005). Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5999-6008.
- [65] **Kowalczyk, T., Nowicka, A., Elbaum, D., & Kowalewski, T. A.** (2008). Electrospinning of bovine serum albumin. Optimization and the use for production of biosensors. *Biomacromolecules*, 9(7), 2087-2090.
- [66] **Hamerly, T., Heinemann, J., Tokmina-Lukaszewska, M., Luszczyk, E. R., Mulier, K. E., Beilman, G. J., & Bothner, B.** (2014). Bovine serum albumin as a molecular sensor for the discrimination of complex metabolite samples. *Analytica chimica acta*, 818, 61-66.
- [67] "RCSB Protein databank" erişim adresi: <http://www.rcsb.org/> , erişim tarihi: 23 Temmuz 2017.
- [68] **Kang, Y. N., Kim, H., Shin, W. S., Woo, G., & Moon, T. W.** (2003). Effect of Disulfide Bond Reduction on Bovine Serum Albumin-Stabilized Emulsion Gel Formed by Microbial Transglutaminase. *Journal of food science*, 68(7), 2215-2220.
- [69] **Kang, Y. N., Kim, H., Shin, W. S., Woo, G., & Moon, T. W.** (2003). Effect of Disulfide Bond Reduction on Bovine Serum Albumin-Stabilized Emulsion Gel Formed by Microbial Transglutaminase. *Journal of food science*, 68(7), 2215-2220.
- [70] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ampicillin#section=2D-Structure>, erişim tarihi: 23 Temmuz 2017.
- [71] **Anal, A. K., & Stevens, W. F.** (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *International journal of pharmaceuticals*, 290(1), 45-54.

- [72] **Dror, Y., Ziv, T., Makarov, V., Wolf, H., Admon, A., & Zussman, E.** (2008). Nanolifs made of globular proteins. *Biomacromolecules*, 9(10), 2749-2754.
- [73] **Puchtler, H., & Sweat, F.** (1965). Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 13(8), 693-694.
- [74] **Howie, A. J., & Brewer, D. B.** (2008). Physical Basis of Colours Seen in Congo Red-stained Amyloid in Polarised Light. *The Journal of Pathology*, 214, 16A.
- [75] **Sill, T. J., & von Recum, H. A.** (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006.
- [76] **Doshi, J., & Reneker, D. H.** (1995). Electrospinning process and applications of electrospun lifs. *Journal of electrostatics*, 35(2-3), 151-160.
- [77] **Roozbahani, F., Sultana, N., Almasi, D., & Naghizadeh, F.** (2015). Effects of chitosan concentration on the protein release behaviour of electrospun poly (-caprolactone)/chitosan nanolifs. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 11.
- [78] **Kabay, G., Kaleli, G., Sultanova, Z., Ölmez, T. T., Şeker, U. Ö. Ş., & Mutlu, M.** (2016). Biocatalytic protein membranes fabricated by electrospinning. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 26-32.
- [79] **Sultanova, Z., Kaleli, G., Kabay, G., & Mutlu, M.** (2016). Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanolifs. *International journal of pharmaceuticals*, 505(1), 133-138.
- [80] **Giunchedi, P., Genta, I., Conti, B., Muzzarelli, R. A. A., & Conte, U.** (1998). Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres. *Biomaterials*, 19(1), 157-161.
- [81] **Baraldi, C., Tinti, A., Ottani, S., & Gamberini, M. C.** (2014). Characterization of polymorphic ampicillin forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 100, 329-340.
- [82] **Haider, A., Haider, S., & Kang, I. K.** (2015). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanolifs in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [83] **Yu, D. G., Li, X. Y., Wang, X., Chian, W., Liao, Y. Z., & Li, Y.** (2013). Zero-order drug release cellulose acetate nanolifs prepared using coaxial electrospinning. *Cellulose*, 20(1), 379-389.

- [84] **Nista, S. V. G., Bettini, J., & Mei, L. H. I.** (2015). Coaxial nanofibers of chitosan–alginate–PEO polycomplex obtained by electrospinning. *Carbohydrate polymers*, *127*, 222-228.
- [85] **Hirota-Nakaoka, N., Hasegawa, K., Naiki, H., & Goto, Y.** (2003). Dissolution of β 2-microglobulin amyloid fibrils by dimethylsulfoxide. *Journal of biochemistry*, *134*(1), 159-164.
- [86] **Kabay, G., Kaleli Can, G., & Mutlu, M.** (2017). Amyloid-like protein nanofibrous membranes as a sensing layer infrastructure for the design of mass-sensitive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*.
- [87] **Kabay, G., Meydan, A.E., Kaleli Can, G., Demirci, C., & Mutlu, M.** (2017). Controlled release of a hydrophilic drug from electrospun amyloid-like protein blend nanofibers. *Materials Science & Engineering: C*.
- [88] **Liu, H., Leonas, K. K., & Zhao, Y.** (2010). Antimicrobial properties and release profile of ampicillin from electrospun poly (ϵ -caprolactone) nanofiber yarns. *J Eng Lif Fabr*, *5*(4), 10-19.
- [89] **Neu, H. C., Aswapokee, N., Aswapokee, P., & Fu, K. P.** (1979). HR 756, a new cephalosporin active against gram-positive and gram-negative aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *15*(2), 273-281.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ceylan DEMİRCİ
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 11.07.1992- Kağızman
E-posta : ceylan.dmrci@gmail.com
Telefon: : 554 697 81 95

ÖĞRENİM DURUMU

Yüksek Lisans : 2017, TOBB ETÜ, Biyomedikal Mühendisliği
Lisans : 2015, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği

YABANCI DİL: İngilizce

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR

Gözde Kabay, Ahmet Ersin Meydan, Gizem Kaleli Can, **Ceylan Demirci**, Mehmet Mutlu, Controlled release of a hydrophilic drug from electrospun amyloid-like protein blend nanofibers, *Materials Science & Engineering C*, **81**, 271-279, (2017)

Gözde Kabay, **Ceylan Demirci**, Gizem Kaleli Can, Ahmet Ersin Meydan, Beyhan Günaydın Daşan, Mehmet Mutlu, A Comparative Study of Single-Needle and Coaxial Electrospun Amyloid-like Protein Nanofibers to Investigate Hydrophilic Drug Release Behavior, *Materials Science & Engineering C* (submitted)