

Anne sütüne geçen bazı ilaçların ve toksik maddelerin uzaklaştırılması

Program Kodu: 1001

Proje No: 112S138

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Tu ba Akbay

Araştırmacılar:

Prof.Dr. Nilhan Kayaman Apohan

Doç.Dr.M.Vezir Kahraman

Danıřman:

Prof. Dr. Göksel şener

Bursiyerler:

Burcu Oktay

Hazal İpekçi

NİSAN 2015

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından 112S138 numaralı 1001 projesi kapsamında desteklenmiştir. Proje çalışmalarında, anne sütüne geçen kotinin, fluoksetin ve siklosporine spesifik poli(vinil alkol)-poli(akrilik asit) esaslı, nano boyutlu immünosorbent fiber geliştirilmiştir. Anne sütüne geçen kotinin, fluoksetin ve siklosporin anne sütüne dışarıdan eklenerek süttten uzaklaştırma şartları çeşitli denemeler ile optimize edilmiştir. En yüksek verim ile uzaklaştırılma şartları esas alınarak deney sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar neticesinde proje kapsamında geliştirdiğimiz immünosorbent özellikli nanofiber ile kotinin, fluoksetin ve siklosporin anne sütünden uzaklaştırılmıştır.

Projenin başarıyla sonuçlandırılabilmesi için çalışma koşullarının oluşturulmasında sağladıkları desteklerden dolayı ve projede çalışan yüksek lisans ve doktora öğrencilerimize sağladıkları burs olanakları için TÜBİTAK SBAG Başkanlığı'na, projenin yürütülmesi sırasında tüm satın alma işlemlerinde gösterdikleri özverili çalışmadan dolayı M.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı personeline teşekkür ederim.

Anne sütündeki fluoksetinin uzaklaştırılması aşamasında LC-MS cihazı ile fluoksetin ölçümlerini yapan ve kullandığımız ELISA metodu sonuçlarının doğrulanmasında bize yardımcı olan Mustafa Nevzat İlaç A.Ş. AR-GE Müdürü Sayın Ayşegül Tunca'ya teşekkür ederim.

Ayrıca bu projenin başarıyla tamamlanması için özveriyle çalışan proje ekibi Prof.Dr. Nilhan Kayaman Apohan'a, Doç.Dr. M.Vezir Kahraman'a ve proje bursiyerleri Burcu Oktay ve Hazal İpekçi'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Prof.Dr.Tuğba Akbay

İÇİNDEKİLER

Şekil listesi	i
Tablo listesi.....	iii
Özet	iv
Abstract.....	v
GİRİŞ	1
1.LİTERATÜR ÖZETİ	3
1.1 Nanofiberler.....	3
1.2 Elektrospinning yöntemi.....	4
1.2.1 Tarihsel gelişimi.....	4
1.2.2 Elektrospinning yönteminin teorisi.....	7
1.3 Nanofiberlerin kullanım alanları.....	10
1.3.1 Biyomedikal uygulamalar.....	10
1.3.2 Yara Örtücü.....	11
1.3.3 Enzim taşıyıcı sistemler.....	12
1.3.4 Filtrasyon.....	12
1.3.5 Biosensör.....	12
1.4 Poli(vinil alkol)-Poli(akrilik asit) Esaslı Sistemler.....	13
1.5 İmmobilizasyon.....	14
1.5.1 Antikorların Genel Yapısı.....	15
1.5.2 Poliklonal (çok kolonili) antikorlar.....	16
1.5.3. Monoklonal (tek kolonili) antikorlar.....	16
1.5.4. Antikor-Antijen bağlanma gücü.....	16
1.5.5. Antijen–Antikor bağlanma kinetiği.....	17
1.5.6. Antikorların İmmobilizasyon Yöntemleri.....	17
1.5.6.1 Taşıyıcıya bağlama yöntemi.....	17
1.5.6.2 Fiziksel adsorpsiyon.....	18
1.5.6.3 İyonik bağlanma.....	18
1.5.6.4 Kovalent bağlama.....	19
1.5.6.5 Çapraz bağlama.....	19
1.5.6.6 Tutuklama yöntemi... ..	19
1.5.6.7 Kafes tipi (Polimer matriks içine tutuklama).....	20
1.6 Bebek Beslenmesinde Anne Sütü.....	21
1.6.1 Anne Sütünün Biyokimyas.....	21
1.6.2 Anne Sütünün Bebek İçin Yararları.....	22

1.6.3 Anne Sütünün Anne İçin Yararları.....	23
1.6.4 Anne Sütüne Geçen İlaç Ve Toksik Maddelerin Bebek Üzerindeki Genel Olumsuz Etkileri.....	23
1.7 Emziren Annede İlaç Kullanımı.....	23
1.8 Anne Sütüne İlaçların Geçışı.....	23
1.9 Proje Kapsamında Kullanılan Antijenler Ve Antikorlar.....	25
1.9.1 Kotinin ve Kotinin Antikoru.....	25
1.9.2 Fluoksetin ve Fluoksetin Antikoru.....	26
1.9.3 Siklosporin ve Siklosporin Antikoru.....	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
2.1 Deneylerde Kullanılan Spesifik Kimyasal Maddeler.....	28
2.2 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	29
2.3 Deneysel Yöntemler.....	30
2.3.1 Poli(vinil alkol) (PVA) ve Poli(akrilik asit) (PAA) Çözeltilerinin Hazırlanması.....	30
2.3.2 PVA ve PAA Çözeltilerinden Spin Çözeltilisinin Hazırlanması.....	30
2.3.3 PVA-PAA Çözeltilerinin Elektrospon Cihazıyla Spin İşlemi.....	30
2.3.3.1 Birinci Seri Nanofiberlerin Hazırlanması.....	30
2.3.3.2 İkinci Seri Nanofiberlerin Hazırlanması.....	31
2.3.3.3 Üçüncü Seri Nanofiberlerin Hazırlanması	32
2.3.3.4 Dördüncü Seri Nanofiberlerin Hazırlanması.....	32
2.3.4 PVA-PAA Nanofiberlerinin Termal Olarak Çapraz Bağlanması.....	33
2.3.5 N,N-Karbonil diimidazol (CDI) ile Çapraz Bağlı PVA-PAA Nanofiberlerinin Yüzey Modifikasyonu.....	33
2.3.6 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR).....	34
2.3.7 Termogravimetrik Analiz (TGA).....	34
2.3.8 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC).....	34
2.3.9 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	34
2.3.10 Nanofiber Üzerine Antikor İmmobilizasyonu.....	34
2.3.11 Nanofiber– Antikor Muamelesi.....	35
2.3.12 2 Saat İnkübasyon Sonrasında Yapılan Yıkama İşlemleri.....	35
2.3.13 Nanofiber - Antikor Bağlanmasını Güçlendirme Aşaması.....	35
2.3.14 5 Saat İnkübasyon Sonrasında Yapılan Yıkama İşlemleri.....	35
2.3.15 Bağlanmayan Antikorları Uzaklaştırma Aşaması.....	35
2.3.16 24 Saat Sonunda Yapılan Yıkama İşlemleri.....	35
2.3.17. Nanofiber Üzerine İmmobilize Edilen Antikorlarının Saklanması.....	35
2.3.18. Anne Sütü Örneklerinin Toplanması	35

2.3.19. İnek sütü örnekleri.....	36
2.3.20. Antikor İmmobilizasyonu Yapılmış Olan CPG ve Nanofibere Antijen Muamelesi.....	36
2.3.21. Antijen Muamelesinin Ardından Yapılan Tayin Aşamaları.....	36
2.3.21.1 Kotinin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi.....	36
2.3.21.2. Fluoksetin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi.....	38
2.3.21.3 Siklosporin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi.....	39
2.4 İmmobilizasyon sonrası antikor araması.....	40
2.5.SDS –POLİAKRİLAMİD jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	40
2.5.1. SDS PAGE için jellerin hazırlanması.....	41
2.5.2. PAGE için numunelerin hazırlanması.....	43
2.6. Western Blotting İşlemi.....	43
2.7 İstatiksel Analiz.....	44
3.BULGULAR	45
3.1 NanofiberlerinYapısal Karakterizasyonu.....	45
3.2 Nanofiberlerin Morfolojik Karakterizasyonu.....	47
3.2.1 Birinci Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu.....	47
3.2.2 İkinci Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu.....	48
3.2.3 Üçüncü Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu.....	49
3.2.4 Dördüncü Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu.....	49
3.2.5 Termal Olarak Çapraz Bağlı Nanofiberler.....	50
3.3 Nanofiberlerin Termal Karakterizasyonu.....	50
3.4 PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin, norfluoksetin antikoruna immobilize edilmiş CPG üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	52
3.5 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin, norfluoksetin antikoruna immobilize edilmiş nanofiber üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	53
3.6 PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	55
3.7 İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	56
3.8 Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	57

3.9 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin, kotinin antikoru immobilize edilmiş CPG'ye bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	59
3.10 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin, kotinin antikoru immobilize edilmiş nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	61
3.11 PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	63
3.12 İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	64
3.13 Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	64
3.14 PBS eklenen siklosporinin, siklosporin antikoru immobilize edilmiş CPG'ye bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	65
3.15 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin, siklosporin antikoru immobilize edilmiş nanofiber üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	66
3.16 PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması.....	67
3.17 Fluoksetin antikorlarının denatüre edilen ve edilmeyen formlarına uygulanan elektroforez işlemi.....	68
3.18 Kotinin antikorlarının denatüre edilen ve edilmeyen formlarına uygulanan elektroforez işlemi.....	70
3.19 Siklosporin antikorlarının denatüre edilen ve edilmeyen formlarına uygulanan elektroforez işlemi.....	72
TARTIŞMA.....	74
SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR.....	78

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İnsan saçı ile nanofiberin boyutsal karşılaştırılması	3
Şekil 2. Nanofiber üretiminin tarihsel süreci	6
Şekil 3. Yıllara göre yayın sayısı dağılımı	6
Şekil 4. Taylor konisi oluşumu	7
Şekil 5. Elektrospinningsisteminin şematik gösterimi	8
Şekil 6. Elektrospin cihazında kullanılan düze sistemleri	8
Şekil 7. Farklı toplayıcı yüzeyleri (A) dönen silindir, (B) düz plaka	9
Şekil 8. Elektrospinning cihazı	9
Şekil 9. Nanofiberlerin doku mühendisliği uygulamaları	11
Şekil 10. Poli(vinil alkol) kimyasal yapısı	13
Şekil 11. Poli(akrilik asit) kimyasal yapısı	13
Şekil 12. PVA ile PAA çapraz bağlanma reaksiyonu şeması	14
Şekil 13. Antikor İmmobilizasyonu	15
Şekil 14. Antikor Yapısı	15
Şekil 15. İmmobilizasyon Yöntemleri	18
Şekil 16. Çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi	19
Şekil 17. Kotinin ((5 S)-1-metil-5-(3-piridil) pirolidin-2-on) yapısı	25
Şekil 18. Fluoksetinin (N metil 3 Fenil 3-(α,α,α - tri floro-p-tolioksi) propilamin) yapısı	26
Şekil 19. Siklosporinin yapısı	27
Şekil 20. Poli vinil alkol ve poli akrilik asitin esterleşme reaksiyonu dizini	33
Şekil 21. Numunelerin slab jele yüklenmesi	43
Şekil 22. Western Blot membrana transfer işlemi	44
Şekil 23. PVA polimerinin FT-IR spektrumu	45
Şekil 24. PAA polimerinin FT-IR spektrumu	46
Şekil 25. Termal işlem uygulanmış nanofiberin esterleşme sonrasındaki FT-IR spektrumu	46
Şekil 26. CDI ile aktifleştirilmiş çapraz bağlı nanofiber FT-IR spektrumu	47
Şekil 27. 190 nm fiber çapına sahip birinci seri nanofiber SEM görüntüsü	48
Şekil 28. İkinci seri nanofiberlere ait SEM görüntüsü	48
Şekil 29. Ortalama 150 nm fiber çapına sahip nanofiberler	49
Şekil 30. Dördüncü seri nanofiber SEM görüntüsü	49
Şekil 31. Çapraz bağlanmış nanofiberlerin SEM görüntüleri	50

Şekil 32. Termal işlem öncesinde ve sonrasında nanofiberlerin çakışık TGA Termogramları	51
Şekil 33. Nanofiberlerin çakışık DSC grafikleri	51
Şekil 34. Farklı konsantrasyonlardaki fluoksetinin CPG'ye PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	53
Şekil 35. Farklı konsantrasyonlardaki fluoksetinin nanofibere PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	55
Şekil 36. Farklı konsantrasyonlardaki kotininin CPG'ye PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	60
Şekil 37 Farklı konsantrasyonlardaki kotininin nanofibere PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	62
Şekil 38 Denatüre edilmeyen fluoksetin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg yüklenmiş SDS-PAGE görüntüsü;	68
Şekil 39 Denatüre edilen fluoksetin antikorunun 3 farklı konsantrasyonda elde edilen (2-1-0,5 µg) SDS-PAGE görüntüsü	69
Şekil 40 Western Blotting yöntemi ile immobilizasyon yıkama sularında fluoksetin aranması	69
Şekil 41 Denatüre edilmemiş kotinin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg olarak yüklenmiş SDS-PAGE jel görüntüsü	70
Şekil 42 Denatüre edilen kotinin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg olarak yüklenmiş SDS-PAGE jel görüntüsü	71
Şekil 43 Western Blotting yöntemi ile immobilizasyon yıkama sularında kotinin aranması	71
Şekil 44 Denatüre edilmiş ve edilmemiş siklosporin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg olarak yüklenmiş SDS-PAGE jel görüntüsü	72
Şekil 45 Western Blotting yöntemi ile immobilizasyon yıkama sularında kotinin aranması	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Nanofiber üretim yöntemlerinin karşılaştırılması	4
Tablo 2. Nanolif oluşumunu etkileyen parametreler	10
Tablo 3: CPG veya Nanofiber ile Muamele edilen Antijen Konsantrasyonları	36
Tablo 4. Kotinin tayini için kullanılan ELISA Yöntemi	37
Tablo 5: Fluoksetin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi	38
Tablo 6: Siklosporin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi	39
Tablo 7. SDS-PAGE Alt jel Hazırlanması	41
Tablo 8. SDS-PAGE Üst Jel Hazırlanması	42
Tablo 9. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	52
Tablo 10. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin nanofiber bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	54
Tablo 11. PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	56
Tablo 12. İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	57
Tablo 13. Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	58
Tablo 14. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG'ye bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	59
Tablo 15. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	61
Tablo 16. PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen kotinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	63
Tablo 17. İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	64
Tablo18. Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	65
Tablo 19. PBS içindeki siklosporin CPG üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	66
Tablo 20. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	66
Tablo 21. PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması	67

ÖZET

Günümüzde anne sütü ile beslenme bebek beslenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak ilaçların emziren anneler tarafından bilinçsizce kullanımı veya yan etkileri hakkında bilgi eksikliği nedeniyle bir çok hastalık genç nesillerde sorun oluşturmaktadır. Ayrıca günlük yaşamda yiyeceklerle alınan birçok katkı maddeleri, tarım ilaçları, tatlandırıcılar, tütün ve tütün ürünleri, alkol, ilaçlar vs. veya bunların yıkım ürünleri anne sütüne geçerek bebeğin sağlığını tehdit etmektedir. Anne farkında bile olmadan süte geçen ilaçlar veya kimyasal maddelerin bebekte otizm, hiperaktivite, kanser gibi hastalıklara neden olabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; anne sütüne geçen zararlı maddeleri uzaklaştıran sistemi geliştirmektir. Bu amaçla öncelikle elektro spinning metodu kullanılarak poli(vinil alkol)-poli(akrilik asit) esaslı nanofiber üretilmiştir. Nanofiberler FTIR ve SEM yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Üretilen nanofiberin üzerine kotinin, fluoksetin ve siklosporin antikorlarının her biri ayrı ayrı immobilize edilerek immünosorbent fiber oluşturulmuştur. Kotinin, fluoksetin ve siklosporin eklenmiş fosfat tamponu, inek ve anne sütünden, eklenen ilaçlar immünosorbent fiber kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırmanın etkinliği, ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. İmmünosorbent nanofiberin etkinliği cam nano partiküller ile karşılaştırılmıştır. Proje kapsamında hazırladığımız spesifik nanofiberin günümüzde herhangi bir prototipi bulunmamaktadır.

Proje kapsamında geliştirilen immünosorbent nanofiber ile fluoksetin % 98, kotinin %94, siklosporin %94 verim ile anne sütünden uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada nano dokuda hazırladığımız immünosorbent özellikli fiberin kimyasal algılamada kullanılmasının verimli olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; proje kapsamında antijen-antikor ilişkisi kurularak geliştirilen nano dokuya sahip immünosorbent fiberler ile anne sütünden bebeğe geçebilecek bir çok zararlı maddenin uzaklaştırılması için bir üretim ağının yolu açılmıştır.

Anahtar Kelimeler: anne sütü, nanofiber, kotinin, fluoksetin, siklosporin

ABSTRACT

Nowadays breastfeeding is accepted as the gold standard for baby feeding. However, the unconscious usage of drugs by nursing mothers or the lack of information about the side effects of drugs generates health problems in young generation. Further more, many additives that are taken with food in our daily life, pesticides, flavors, tobacco products, alcohol, drugs, etc. or their degradation products are threatening the baby's health through excretion into breast milk. Drugs or chemicals that are excreted into breast milk may cause diseases in infant such as autism, hyperactivity and cancer without even aware of the mother.

The aim of this study is to develop a system that removes the harmful substances that are excreted in to breast milk. For this purpose, the poly (vinyl alcohol) -poly (acrylic acid) -based nanofiber is produced by using electro-spinning method. Nanofibers are characterized by FTIR and SEM methods. Immunosorbent fiber was developed by immobilizing the cotinin, fluoxetine and cyclosporin antibodies seperately on to the nanofiber. Cotinine, fluoxetine and cyclosporine that are added to the phosphate buffer, cow's milk and breast milk was removed by immunosorbent fiber. The removal efficiency was determined by using ELISA. The efficiency of the removal was compared with the glaa nano particles. Today, there was no prototype of this spesific nanofiber thatis created at this project.

With the immunosorbent nanofiber that is produced at this project, the efficiency of removal of fluoxetine, cotinine and cyclosporine from breast milk were 98%, 94 % and 94 % respectively. At this stage, the immunosorbent featured fiber that is developed atthis project seems to be efficient for chemical sensing.

In conclusion, with this project, the production network way was opened forthe removal of many kinds of harmful substances from the breast milk with the nano-sized immunosorbent fibers by establishing a relationship between antigen-antibody.

Keywords:breastfeeding, nanofiber, cotinin, fluoxetine, cyclosporin

GİRİŞ

Anne sütü, yenidoğan ve süt çocukları için ilk 6 ay tek başına yeterli olan en doğal besindir. İçinde yağ, protein, karbonhidrat gibi enerji kaynaklarının yanı sıra yağ asitleri, aminoasitler, vitaminler, mineraller ve eser elementler gibi büyüme ve gelişmenin sağlanması için gerekli maddeler bulunur.

Anne sütü ile beslenmenin hem bebek, hem de anne için, başta beslenme olmak üzere, sağlık, bağışıklık, gelişimsel, psikolojik, sosyal ve ekonomik yönden çok sayıda yararları vardır (Samur, 2008).

Yaşamlarının ilk altı ayı içerisinde bebeklere verilebilecek en ideal besin anne sütüdür. WHO ve UNICEF'in dünya çapında yürüttükleri çocuk sağlığı ve herkes için sağlık programlarında anne sütü ile beslenme, temel sağlık önerileri içinde anahtar bir öge olarak yer almaktadır. World Health Organization(2015)

Sağlıklı bir toplum oluşumunda erken çocukluk dönemindeki büyüme-beslenme ilişkisi çok önemlidir. Bebeklerin doğumdan sonraki ilk altı ayında anne sütüyle beslenme esastır. Anne sütü ile beslenme oranları günümüzde artış göstermesine rağmen, annenin zorunlu olarak kullandığı ilaçlar nedeniyle birçok anne bebeğine süt verememektedir. Anne sağlıklı olsa bile farkında olmadan süt yoluyla, bebeğine zararlı çeşitli kimyasal maddeleri (kafein, nikotin, pestisid, aflatoksin vs) geçirmektedir. Anne sütü ile bebeğe geçen bu maddeler sonraki dönemlerde bebeklerde uyku bozuklukları, hiperaktivite gibi istenmeyen durumlara ve otizm, bronşit, kanser gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Bu çalışmanın amacı doğum sonrası depresyonlarda doktor kontrolünde ya da kendiliğinden alınan fluoksetin içeren antidepresanlara, siklosporin içeren ilaçlara ve günlük hayatta annenin kullandığı sigara ile alınan nikotinin süte geçen metaboliti kotinine spesifik nano boyutlu immünosorbent fiber oluşturmaktır.Projemizde hazırlanan nanofiberler elektro-eğirme (electro-spinning) metodu kullanılarak üretilmiştir.

Elektro eğirme yöntemiyle, farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip polimerlerden, farklı yüzey kimyalarına ve fiziksel özelliklere sahip nanofiberler üretmek mümkündür. Nanofiberlerin yüksek yüzey alanı, yüzey kimyasının fonksiyonalize edilmesindeki esnek imkanlar, yüksek mukavemet ve mikroorganizmalar gibi küçük boyutlu organizmaların ayrılmasında bariyer özelliği gösterebilmesi onların birçok alanda kullanılmasının başlıca

sebepleridir. Bu avantajlar, nanofiberlerin birçok endüstri alanına rahatlıkla girmesine ve kendisine potansiyel kullanım alanı sağlamasına izin vermektedir.

Elektroüretim süreci aynı zamanda iki veya üç farklı polimerin birlikte eğrilmesine de olanak sağlamakta ve oluşan fiberlerin özelliklerini kontrol etmenin yollarını arttırmaktadır. Elektroüretim yönteminin bir diğer avantajı da polimerik nanofiberlerin içlerine çözünmeyen ilaç veya biyoaktif molekülerin (antikor, enzim) yerleştirilebilmesidir. Çalışmalar elektroüretim süreci sırasında fiberlerin içerisine yerleştirilmiş biyomoleküllerin biyolojik etkinliklerinin korunmasında nanofiberlerin önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Çeşitli enzimlerin biyolojik aktivitelerini nanofiber yapısı içinde korudukları tespit edilmiştir(Ramakrishna vd., 2006).Yapılan araştırmalar, nanofiberlerin biyoaktif molekülleri ve ilaçları taşımada uygun taşıyıcılar olduğu doğrultusundadır (Merrell vd., 2009).

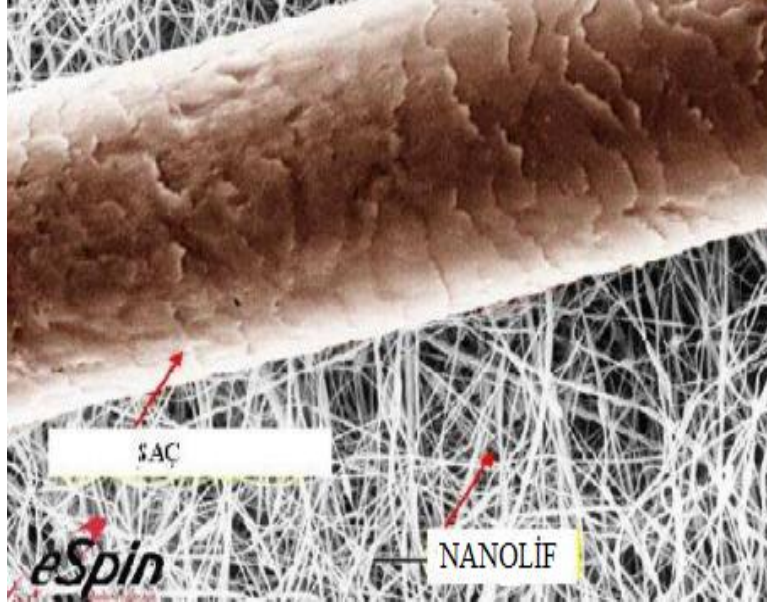
Yüksek yüzey alanı ve gözenekli yapısı sayesinde nanofiberlerden oluşturulmuş dokusuz yüzeylerin filtrasyon için kullanılması birçok yenilik ve avantaj sağlamakta olup bu yüzeyler hava, su, kan gibi akışkanlardan, 1 mikrondan küçük parçacıkların filtrelenmesine olanak sağlamaktadır. İnce partiküller (<0.3 μm boyutunda olanlar) nanofiber yapılarında kolaylıkla tutulabilirler ve filtrasyon verimliliğini geliştirebilirler. Nanofiberler ile elde edilen malzemeler yapısı 100 nm'den daha küçük parçacıkları veya damlacıkları sıvıdan veya gazlardan uzaklaştırılabilir.Bu da nanofiberlerin filtrasyon amaçlı kullanımını sağlar (Çakmak, 2011).

Proje kapsamında antijen-antikor ilişkisi kurularak geliştirilen nano boyutlu immünosorbent fiber ile anne sütünden bebeğe geçen zararlı maddelerin uzaklaştırılarak bebek ve gelecek nesil sağlığı açısından önemli bir adım atıldığı düşünülmektedir.

1. LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Nanofiberler

Nanofiberler, çapları 1 mikrondan daha küçük olan ipliksi görünüme sahip nano yapı malzemelerdir (Şekil 1). Boyutların nano mertebesinde olması son ürüne çeşitli özellikler kazandırır.



Şekil1. İnsan saçı ile nanofiberin boyutsal karşılaştırılması

Bu özellikler (Li vd., 2004);

- Yüzey alanı/hacim oranının çok yüksek olması (mikrofiberlerin 10^3 katı),
- Sertlik ve çekme gerilimlerinin artması,
- Daha hafif ve daha dayanıklı olması,
- Üretimde daha az malzeme kullanılması,
- Filtrelemede yüksek performansa sahip olmalarıdır.

Nanofiberlerin hazırlanması için kullanılan 5 genel teknik vardır.

- ✓ Kendiliğinden birleşme yöntemi
- ✓ Kalıp sentez yöntemi
- ✓ Çekme yöntemi
- ✓ Faz ayrımı yöntemi
- ✓ Elektrospinning

Bu yöntemler arasında basit, hızlı, sürekli ve büyük miktarlarda üretime imkan sağlayan “elektrospinning” yöntemi hemen hemen her polimerden nanofiber üretilmesinde kullanılır. Tablo 1’de nanofiber üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları yer almaktadır.

Tablo1. Nanofiber üretim yöntemlerinin karşılaştırılması

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Lif çapı	Lif uzunluğu
Çekme	Minimum donanım gereklidir.	Süreksiz bir prosestir.	2-100 nm	10 mikron
Kalıp sentez	Farklı çaplara sahip lifler hazırlanabilir.	Lif boyutlarının ve düzenlemesi sınırlıdır.	100 nm	10 mikron
Faz ayrımı	Minimum donanım gereklidir. 3 boyutlu gözenekli yüzeyler hazırlanabilir.	Kullanılan polimerler sınırlıdır.	50-500 nm	Gözenekli yapı
Kendiliğinden Birleşme	Küçük nanolifler hazırlanabilir.	Üretim aşamaları karmaşıktır.	7-100 nm	1-20 mikron
Elektrospining	Ucuz bir yöntemdir. Uzun ve sürekli nanolifler hazırlanabilir.	Toksik solventler	3-1000 nm	Çeşitli uzunluklarda (m)

1.2 Elektrospinning Yöntemi

1.2.1 Tarihsel Gelişimi

Elektrospin işleminin temeli elektro püskürtme denilen, bir sıvı damlasına elektrik uygulanması işlemine dayanır. Kapilerin ucunda bulunan yarı küresel damlaya elektrik verildiğinde; damlanın yüzey gerilimini yenerek bir koni şeklini aldığı ve hemen ardından da ufak damlalara ayrılan bir jet halinde kapilerden ayrıldığı belirlenmiştir (Lyons, 2004).

1800 yıllarında Larmor, elektrik alandaki dielektrik sıvının hareketini elektrodinamik teorisiyle açıklamıştır (Larmor, 1898).

1745'te Bose; elektro-hidrodinamik atomizasyonu tanımlamıştır (Lewin ve Sello, 1985).

1882' de Rayleigh, ince sıvı jetlerinin elektrik alanındaki davranışlarını ve onların kararlılık kriterlerini incelemiştir. Rayleigh, elektriksel olarak yüklü bir damlacık, yüzey geriliminin üstünde bir değer aldığı anda kararsız bir hal aldığını ve parçalanmanın gerçekleştiğini tahmin

etmiştir. Aynı zamanda bu damlacığı etkileyen 2 kuvvet bulunduğunu; bu kuvvetlerden birinin elektrik kuvveti olduğunu diğerrinin ise elektrik kuvvetine zıt yönde damlayı etkileyen yüzey gerilimi kuvveti olduğu görülmüştür. Bu elektrik kuvvetinin, yüzey gerilimi kuvvetini yendiği anda damlanın daha ince jetlere ayrıldığı gözlenmiştir (Raleigh, 1882).

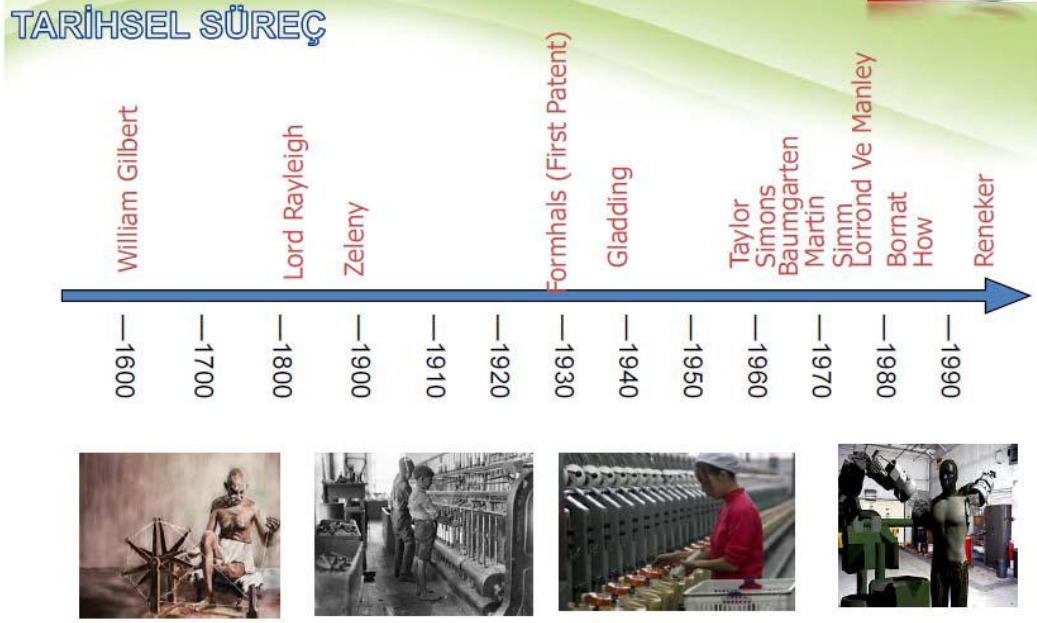
Elektrospun liflerle ilgili ilk patent 1934 yılında Formhals tarafından basılmıştır. Bu patentte Formhals selüloz asetatın etilen glikoldeki çözeltisine 5-10 kV potansiyel uygulayarak fiberler hazırlanmıştır. Formhals daha sonraki yıllarda daha farklı cihaz tasarımları yaparak çeşitli patentler almıştır (Anton, 1934).

1960 yıllarına gelindiğinde Simons hafif ve çok ince yapıya sahip fiberleri hazırlamayı başarmıştır. Selüloz esterler ve eterler, vinil, akrilik, polistiren, poliüretan ve polikarbonatlar gibi çok çeşitli polimerler kullanılarak farklı yapılarda fiber ağları hazırlamıştır (Simons, 1966). 1994-1969 yıllarında Taylor elektrik alan etkisindeki bir sıvı damlacığın hareketini matematiksel olarak modellemiştir. Bu modelde, bir sıvı damlasını koni şekline dönüştürmek için gereken kritik elektrik gerilime ait durumu belirlemiştir. Ayrıca koninin, elektrik alan ve yüzey gerilimi kuvvetlerinin etkisi içerisinde olduğunu ve fazla yüklerin sıvı damlacığın ucundan dışa doğru yönleneceğini göstermiştir.

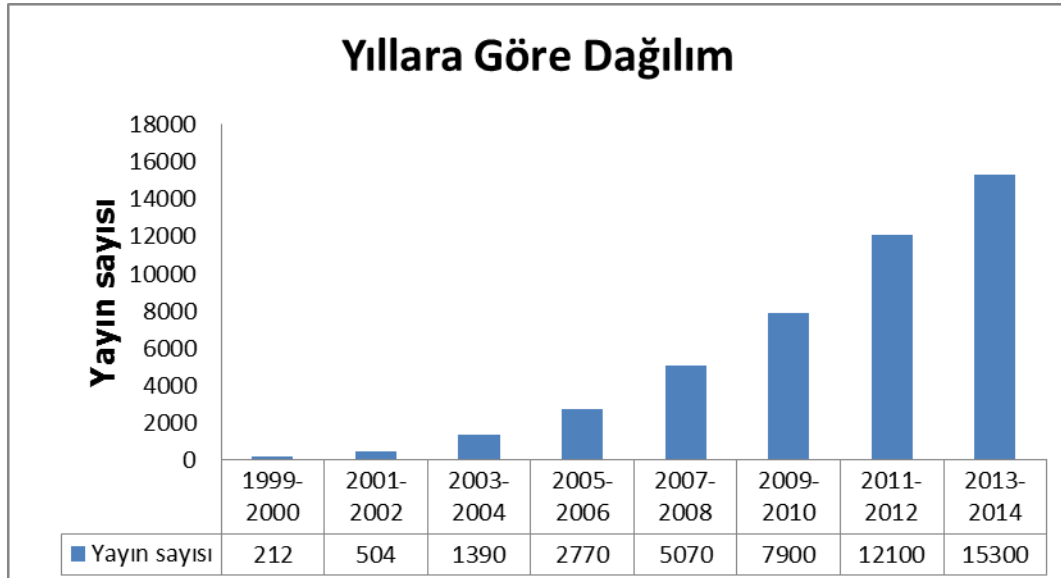
1970'li yıllar içerisinde Martin, Cockshott ve Fildes, elektrospun yöntemiyle elde edilen fiber yapıların tıbbi amaçlarla kullanılabileceğini kanıtlamışlardır (Martin vd., 1977).

1982 de Bornat PTFE, PU, PA, PAN, PEO, PVA ve PVP gibi biyouyumlu olarak kabul edilen polimerlerden elektrospun yöntemiyle elde edilen tüp şeklinde malzemeler hazırlamışlardır. Bu malzemelerin suni kan damarı ve idrar kanalı olarak medikal alanlarda kullanılabileceği iddia edilmiştir. Bornat bu çalışmalarla ilgili 1982 ve 1987 yıllarında çeşitli patentler almıştır (Mohan, 2002).

Günümüze kadar gelişerek gelen elektrospun sistemiyle doğal ve sentetik birçok polimerden nanofiberler hazırlanabilmektedir. Bu alanda yapılan çalışma, patent ve yayınların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Şekil 2).



Şekil2. Nanofiber üretiminin tarihsel süreci



Şekil 3.Yıllara göre yayın sayısı dağılımı (Google Scholar, 2015).

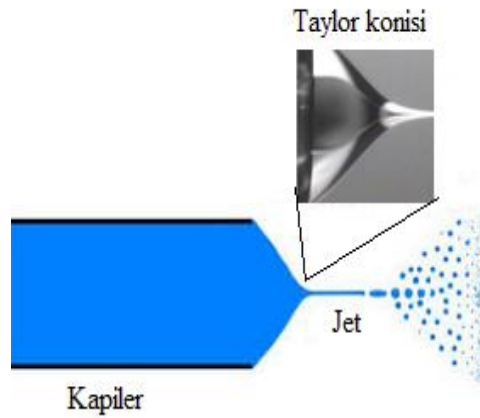
1.2.2 Elektrospinning Yönteminin Teorisi

Elektrospinning, polimerik nanofiberlerin elde edilmesinde kullanılan basit ve etkin bir yöntemdir. Bu yöntem, bir polimer çözeltisinin (veya erimiş haldeki polimerin) uygulanan elektrik alanın etkisi ile katı fiberler elde edilmesi temeline dayanır (Üstündağ, 2009).

Elektrospinning cihazı 4 temel bileşenden meydana gelir. Bunlar,

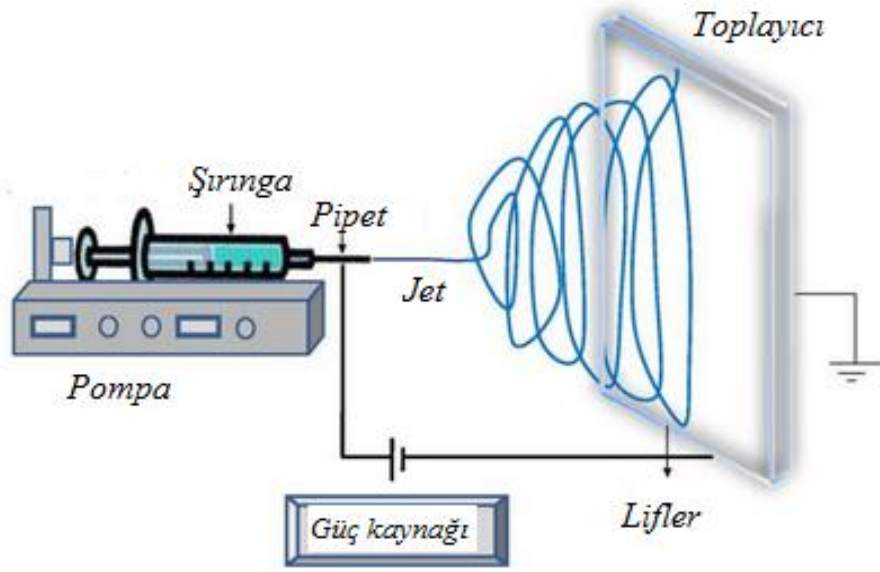
- ✓ Otomatik pompa,
- ✓ Pompanın bağlı olduğu bir düze sistemi,
- ✓ Nanofiberlerin toplanacağı yüzey,
- ✓ Yüksek gerilim güç kaynağı.

Elektrospinning yönteminde, güç kaynağı ile toplayıcı bir uçlarından toprak bağlantılı olduklarından sistem kapalı devre konumundadır. Şırınganın arka kısmına yerleştirilmiş olan otomatik pompa, şırınga içerisindeki polimer çözeltisini kontrollü olarak şırınga ucuna doğru iter. Polimer çözeltisine güç kaynağı tarafından uygulanan elektrik akımı ile elektrik oluşturulur ve sıvı yüzeyinde yüzey gerilimine zıt yönde bir kuvvet oluşturur. Uygulanan bu elektriksel alan şiddetinin artması ile şırınganın ucundaki küresel sıvı konik bir şekle dönüşür. Bu şekil literatürde “Taylor konisi” olarak geçmektedir (Şekil 4).



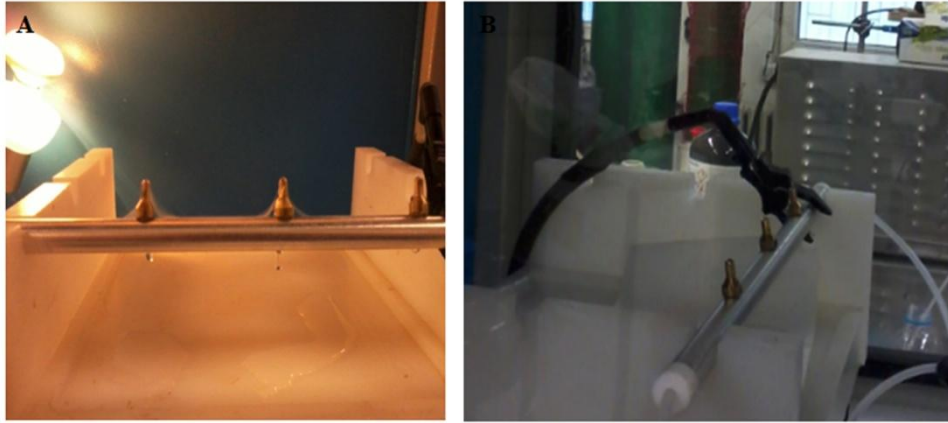
Şekil 4. Taylor konisi oluşumu

Sıvı yüzeyindeki elektriksel alan yüzey gerilimini yendiğinde sıvı topraklanmış toplayıcı yüzeye doğru bir jet oluşturur. Oluşan bu jet toplayıcıya doğru hareket ederken elektrostatik kuvvetler jetin uzamasına sebep olur. Uzamış olan bu jet polimer, topraklanmış olan toplayıcı yüzeye doğru yönlenir ve fiberlerin toplayıcı yüzey üzerinde oluşmasını sağlar. Şekil 5’de elektrospinning sistemini şematik gösterimi yer almaktadır. Yapılan hesaplamalar sonucunda yüksek gerilim altında fiber üretim hızının, sesin havadaki yayılma hızı (340 metre/saniye) kadar olduğu tespit edilmiştir (Shin, 2001).



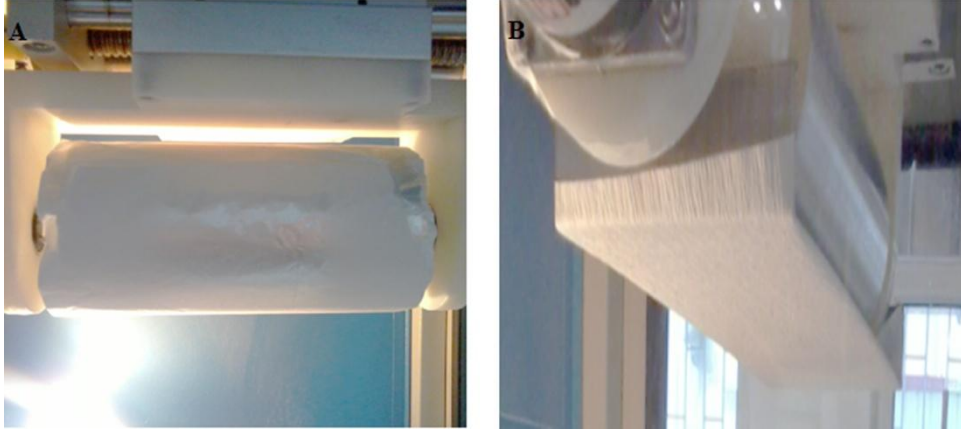
Şekil 5. Elektrosppinningsisteminin şematik gösterimi

Elektrospinning tekniğinde çoklu veya tekli düze sistemleri kullanılır. Nanofiber üretim miktarına göre düze sistemi seçilir. Fazla miktarlarda nanofiber hazırlanması için çoklu düzeler tercih edilir. Aynı zamanda az miktarlarda nanofiber hazırlanması için tekli düze de tercih edilebilir.



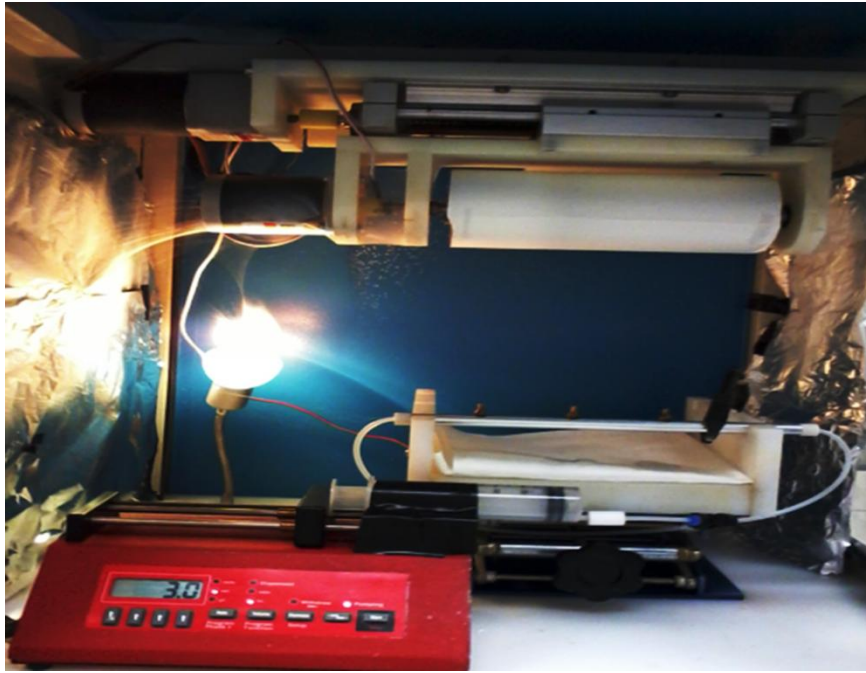
Şekil 6. Elektrosppin cihazında kullanılan düze sistemleri

Toplayıcı ünitesi elektrosppinning sisteminin diğer bir bileşenidir. Toplayıcı üzerinde, oluşan nanofiberler toplanır. Şekil 7’de topraklanmış dönen silindir ve düz plaka toplayıcıları görülmektedir. Ayrıca toplayıcılar sabit veya hareketli olabilir (eksen boyunca ve dönme hareketi). Dönen silindirtoplayıcı kullanılarak nanofiberlerin istenilen yönde oryante olmaları sağlanır.



Şekil 7. Farklı toplayıcı yüzeyleri (A) döner silindir, (B) düz plaka

Şekil 8'de döner silindir toplayıcı ve 3'lü düzeden oluşan electrospinning sisteminin dijital görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 8. Elektrospinning cihazı

Elektrospinning yönteminde çeşitli parametrelerin değiştirilmesi ile farklı morfolojilere sahip nanofiberler hazırlanabilir. Nanofiberlerin çapını, dağılımını ve morfolojisini etkileyen parametreler aşağıda belirtilmektedir (Huang, 2003).

1. Polimerin molekül ağırlığı, molekül ağırlığı dağılımı ve yapısı (lineer veya dallanmış),

2. Viskozite, iletkenlik ve çözeltinin yüzey gerilimi,
3. Uygulanan potansiyel, akış hızı ve konsantrasyon,
4. Düze ile toplayıcı arasındaki mesafe,
5. Sıcaklık, nem, atmosfer gibi ortam değişkenleri,
6. Toplayıcı yüzeyin şekli ve hareketi (sabit yada döner olması gibi),

Tablo 2.Nanofiber oluşumunu etkileyen parametreler

Çözelti parametreleri	İşlem parametreleri	Ortam parametreleri
Yüzey gerilimi	Uygulanan voltaj	Sıcaklık
Moleküler ağırlık ve Viskozite	Çözelti akış hızı	Nem
Çözücünün dielektrik sabiti	Toplayıcı-düze mesafesi	Basınç
Çözeltinin iletkenliği	Şırınga çapı	Atmosfer cinsi

1.3 Nanofiberlerin Kullanım Alanları

Nanofiberler fiber çekimi sonrasında toplayıcı bir yüzey üzerinde toplanarak dokusuz bir yüzey haline getirilmektedirler. Bu duruma ek olarak tek tek fiber veya bu fiberlerin oluşturduğu ipliklerin de elde edilmesi mümkündür (Frank, 2004; Li ve Xia, 2004). Çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle hazırlanan nano yapılar ile karşılaştırıldığında, nanofiberler oldukça uzundur. Elektrospinning kesintisiz bir yöntem olduğu için kilometrelerce uzunlukta fiberler hazırlanabilir (Frank, 2004).

Nanofiberlerden oluşturulan yapıların, birim ağırlıkta sağlanan yüksek alan özelliği, yumuşak tutumu, iyi mukavemet/birim ağırlık özelliği ve mikroorganizmalar ile ince parçacıklara bariyer oluşturması gibi özellikleri, nanofiberlerin birçok alanda kullanılmasının başlıca sebepleridir. Ayrıca, elektrospinning yöntemi ile elde edilen nanofiberler küçük boyutlarda çaplara sahip oldukları için, elde edilecek nanofiber membranların kalınlığı da düşük olacaktır. Bu özelliklerinden dolayı nanofiberler özel uygulamalara sahip membranların geliştirilmesinde son yıllarda giderek önem kazanmaktadır.

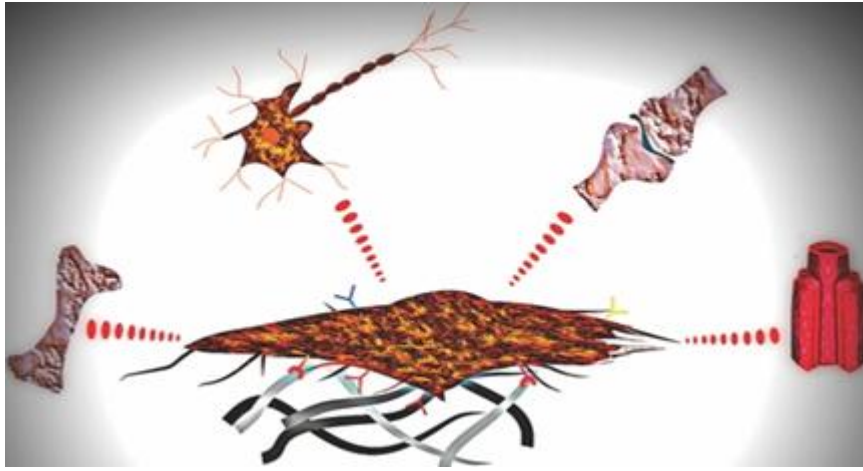
Endüstriyel ve bilimsel alanlarda nanofiberler ile ilgili çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Nanofiberler, biyomedikal, yara örtücüler, ilaç-salınım uygulamaları, enzim immobilizasyon, filtrasyon, ve sensör uygulamalarında kullanılmaktadır.

1.3.1 Biyomedikal Uygulamalar

Doku mühendisliğinin temel amacı onarmak, yenilemek ve olduğu gibi devam etmesini sağlamak ya da özelliklerini iyileştirmektir. Bu amacı gerçekleştirebilecek üç alan ortaya çıkmaktadır; hücre teknolojisi, doku iskelesi yapım teknolojisi ve in-vivo kullanım için teknolojiler (Nerem ve Saltzman, 1995).

Başarılı bir doku iskelesi, öncelikle yüksek gözeneklilikte ve geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Aynı zamanda doku iskelesi toksik olmamalı ve hücrenin tutunmasına ve çoğalmasına olanak sağlayacak şekilde biyouyumlu olmalıdır (Ma vd., 2005). Nanofiber doku iskeleleri nanoboyutlarda fibroz ekstra selüler matris (ECM) proteinlerine yapısal olarak benzemektedirler. Bu özelliklerinden dolayı ECM yapısına mükemmel bir şekilde taklit edebilirler (Izadifar vd., 2012).

Polimerik nanofiberler kemik, kalp, atardamar, kıkırdak ve sinir dokuları için yapay doku iskelesi olarak kullanılmaktadır. Kitosan, poli(vinil alkol) (PVA), kollajen, poli laktik asit (PLA), poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi pek çok polimer kullanılabilir. PVA gibi hidrofilik nanofiberlerin bulunması, hücre kültürü boyunca sıvı besin absorpsiyonunu artırarak yapışma, çoğalma, göç ve nüfuz etme kapasitesini artırır bunun için PVA-kitosan, PVA-Poli(vinilprolidon) polimer karışımları doku iskelesi uygulamalarında kullanılmaktadır (Shakumon vd., 2009; Fang vd., 2011; Subramanian vd., 2014).



Şekil9. Nanofiberlerin doku mühendisliği uygulamaları (Arslan vd., 2014)

1.3.2 Yara Örtücü

Yara örtüsünün görevi yarayı koruyarak yara bölgesinden fazla vücut sıvılarının dışarı atılmasını, dış mikroorganizmaların bulaşmasını önlemek, yaranın görünümünü düzeltmeyi ve bazende yaranın daha hızlı iyileşmesini sağlamaktır. Yara örtücü fiziksel bir bariyer olmalı ancak aynı zamanda da oksijen ve nemin geçişine izin vermelidir (Marler vd., 1998). Bu görevler hepsini birden yerine getirebilmek için nanofiber materyaller çok uygundur.

Deri yaralarının iyileşmesinde elektrospun edilmiş nanofiberler ekstraselüler matriks yapısı taklit etmelidir. Bunun için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle epidermal büyüme faktörü (EGF) ile modifiye edilen nanofiberler yara iyileşmesinde olumlu sonuçlar göstermektedir.

1.3.3 Enzim taşıyıcı sistemler

Enzimler immobilizasyonunda, yüzeyin morfolojik yapısı ve kompozisyonu enzimin bağlanma performansında etkilidir. Geniş yüzey alanlarına sahip gözenekli silika, nanoparçacıklar, nanotüpler ve nanofiberler gibi nano yapıları malzemelerin birçoğu enzim bağlanması ve stabilizasyonunda tercih edilir. Gözenekli silika, iç yapısından dolayı enzimin substrat içerisine difüzyonunu sınırlar. Nanotüp ve nanoparçacıklarda ise enzim dispersiyonu ve enzimin tekrar kullanılabilirliği sınırlıdır (Wang vd., 2009). Enzime daha geniş bağlanma imkanı sunan nanofiberler enzim immobilizasyonunda daha etkin olarak kullanılabilirler (Fang vd., 2011; Oktay vd., 2015).

1.3.4 Filtrasyon

Yüksek yüzey alanı ve gözenekli yapılarından dolayı, özellikle sıvı ve katı filtrasyon sistemleri için nanofiberler iyi bir malzeme grubuna içersindedir. Endüstriyel anlamda ilk nanofiber esaslı filtreler Donaldson şirketi tarafından 1982 yılında Ultra-Web® ticari adıyla elektrospinning yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu membran hava filtresi, otomotiv filtresi, sıvı filtrasyon, toz toplayıcı filtre olarak kullanılmıştır (Meinke vd., 2008).

1.3.5 Biosensör

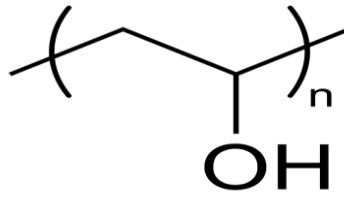
Sensörler; çevre koruması, sanayi proses kontrolü, tıbbi teşhis, güvenlik ve savunma uygulamaları için kullanılmaktadır. İyi bir sensör yüksek seçicilik, hassasiyet ve güvenilirlik gibi özelliklere sahip olmalıdır. Aynı zamanda küçük boyutlarda, ucuz üretilen ve çok fonksiyonel olmalıdır (Gibson vd., 2001).

Nanofiberlerin üç boyutlu yapıları, çeşitli duyarlı grupların immobilizasyonunda daha geniş bağlanma alanı ve daha fazla yükleme olanağı sunmaktadır[28].

Poli(akrilik asit) nanofiberlerinden hazırlanmış bir amonyak absorpsiyonunu ölçen bir sensör geliştirilmiştir. Gaz absorpsiyonunun sebep olduğu ağırlık artışı ölçülere, havadaki ppb seviyesindeki amonyak tespit edilebilmiştir (Ding vd., 2005). Poliakrilonitril ve polietilen oksit, poli(vinilidenflorür) esaslı nanofiberler ile çeşitli sensör çalışmaları gerçekleştirilmektedir.

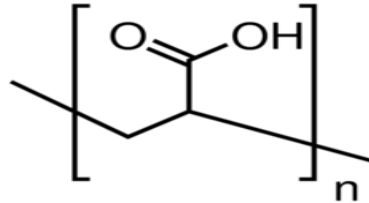
1.4 Poli(vinil alkol)-Poli(akrilik asit) Esaslı Sistemler

Poli(vinil alkol) (PVA)(Şekil 10), endüstriyel olarak poli(vinil asetat)ın kısmi hidrolizi ile sentezlenir (Zhang vd., 2005). Yapısında bulunan yoğun hidroksil (-OH) gruplarından dolayı yüksek hidrofilik özellik gösterir. Aynı zamanda suda çözünür, biyoyumlu, biyobozunur ve kendisi ve parçalanma ürünleri toksik özellik göstermeyen sentetik bir polimerdir. Üstün mukavemet, güçlü kimyasal direnç, yüksek su absorpsiyonu ve su tutma özellikleri gösterir (Aghdam vd., 2014).



Şekil 10.Poli(vinil alkol) kimyasal yapısı

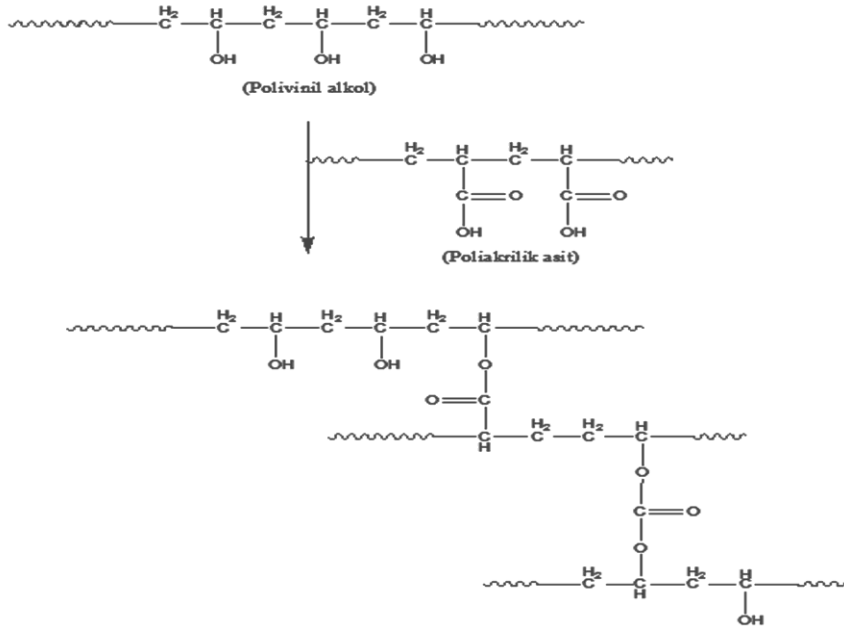
Poli(akrilik asit) (PAA) (Şekil 11), akrilik asitin polimerizasyonu ile sentezlenir. Nötral pH değerinde, PAA yan zincirleri protonlarının çoğunu kaybederek negatif yük ile yüklenip anyonik özellik gösterirler. Bu durum PAA'e polielektrolit özellik kazandırır. Su absorplama ve su tutma kapasitelerini artırarak kendi hacimlerinden birkaç kez daha fazla şişebilirler (Orwoll ve Yong, 1999).



Şekil 11.Poli(akrilik asit) kimyasal yapısı

Elektrospin edilmiş PVA ve PAA biyoyumlulukları, yüksek şişme derecesi ve iyi mekanik özelliklerinden dolayı özellikle biyomedikal uygulamalarda büyük bir gelecek vaat etmektedir. PVA-PAA sistemlerinde polimerler arası hidrojen bağları ile moleküler düzeyde karışabilirlik sağlanır (Shin vd., 1997). PVA zincirlerindeki hidroksil grupları ile PAA yapısındaki karboksilik asit gruplarının arasında termal esterifikasyon reaksiyonu sonucunda yeni güçlü bir bağlanma meydana gelir (Chen vd., 2002).

PVA-PAA sistemlerinden iç içe geçmiş matris yapısı oluşturularak, çeşitli moleküllerin matris içerisinde tutulma veya matristen salınma kontrol edilebilir (Shin vd., 1997).



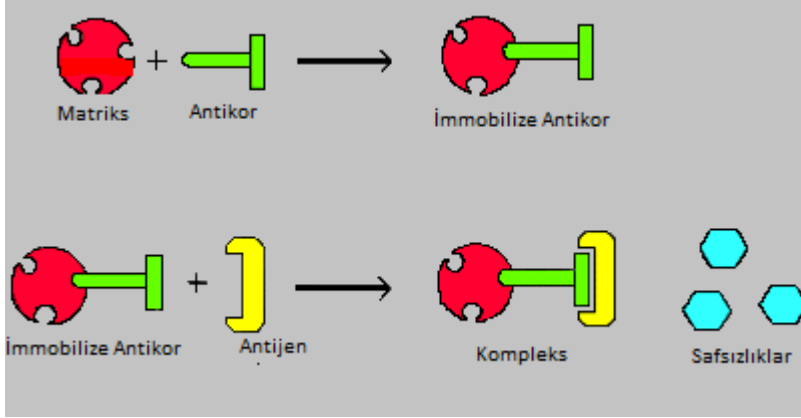
Şekil 12.PVA ile PAA çapraz bağlanma reaksiyonu şeması

1.5 İmmobilizasyon

Proteinlerin bir taşıyıcıya bağlanıp ya da bir matrikse hapsedilip kullanılması son zamanlarda özellikle endüstriyel açıdan önem kazanmış ve bu yöntemin teknolojik uygulamalarına önem verilmiştir (Eş vd., 2015).

Protein teknolojisinin (enzim, antikor) hızla gelişen yollarından birisi de immobilizasyondur. İmmobilizasyonun kelime anlamı "tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş" demektir. İmmobilizasyon, proteinlerin (enzim, antikor) ya da mikroorganizmaların fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulmasıdır. Bunun sonucunda immünosorbent özellikli yüzeyler oluşturulur(Sassolas vd., 2012).

İmmünosorbent yüzey, bir çözelti veya süspansiyondan antijeni uzaklaştırmak amacı ile spesifik antikorun çözünmeyen yüzeye bağlanması ile oluşturulur (Şekil 13).

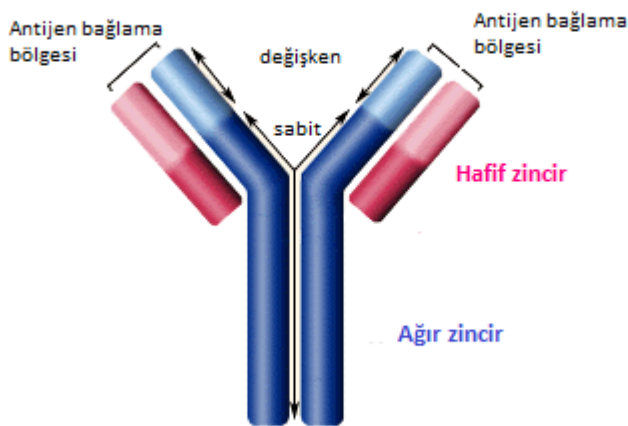


Şekil 13.Antikor İmmobilizasyonu(Noland, 2015)

1.5.1 Antikorların Genel Yapısı

Antikor, spesifik bir antijeni tanıma özelliği kazanmış olan biyomoleküldür ve “Ab” ile simgelenir. Antijen ise bir immün yanıtı neden olan ve vücut tarafından yabancı olarak tanınan herhangi bir moleküler maddedir ve “Ag” ile simgelenir.

Antikorlarağır ve hafif zincirlerden oluşan Fab (antijen bağlayıcı bölge) parçasından, antijenle spesifik olarak birleşir (Şekil 14).Y şeklindeki molekülün boyun kısmında bulunan Fc almaç bölgesiyse immün sistemin hücreleriyle etkileşir ve bu şekilde antijenlerin yok edilmesini sağlarlar (Chames vd., 2009; Daves ve Metzger, 1983). Poliklonal ve monoklonal olarak iki eşit antikor vardır.



Şekil 14. Antikor Yapısı(The Biology Project, 2015)

Antikorlar girişim etkileri varlığında uygun bir antijenin tanınmasına imkân veren yüksek derecede spesifikliğe sahip olduğundan, biyolojik tanıma elementi olarak çok fazla tercih edilir. Antikorlar, düşük molekül ağırlıklı haptenlerden bakteri gibi büyük hacimli maddelere kadar geniş bir alanda antijeni tanıma yeteneğine sahiptir.

1.5.2 Poliklonal (çok kolonili) antikorlar

Bir antijen (bakteri, virüs, hücre veya molekül) “epitop” adı verilen birçok antijenik bölge içerir. Her epitop ayrı bir antikor tipi tarafından tanınır. Bir antijen organizmaya girdiğinde her epitop için bir grup B-lenfosit hücresi özgül antikor üretmeye ve bölünerek çoğalmaya başlarlar. Böylece her epitop için özgül antikor üreten bir B-lenfosit kolonisi oluşur. Bir antijene karşı değişik B-lenfosit kolonileri olduğu için elde edilen antikora poliklonal (çok kolonili) antikor adı verilir (Çırakoğlu, 2002).

1.5.3. Monoklonal (tek kolonili) antikorlar

Tek bir antikor oluşturan B-lenfositten türevlenirler. Monoklonal antikorlar tedavi, tanı ve araştırma amaçlı kullanılırlar. En yaygın kullanılan ligand olan antikorlar, vücut tarafından antijene karşı kolayca üretilirler ve genellikle belli bir antijene karşı yüksek özgünlük ve bağlanma kapasitesi gösterirler (Reichert vd., 2005).

1.5.4. Antikor-Antijen bağlanma gücü

Antikor-Antijen birleşmesi özgüldür. Bu özgüllük elde ikisinden birisinin bulunması halinde, onu bir ayıraç olarak kullanarak diğerini araştırmak, saptamak ve tanımak olanakını verir. Makro moleküller antikor yanıtına sebep olurlar.

Antikor-Antijen birleşmesi kimyasal bir reaksiyondur. Kovalent olmayan bağlar rol oynar. Bu bağlar kuvvetli değildir. Bu kuvvetler; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerdir.

Elektrostatik etkileşimler, polaritesi yüksek moleküller arasında dipol-dipol etkileşimleri veya yüklü moleküller arasında ya itici ya da çekici kuvvetler olabilirler.

Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında meydana gelir. Bu etkileşimler kısmen zayıf olmasına rağmen, birçok etkileşimden meydana geldiği için toplam bağlanma şiddetinin % 50'sini oluşturabilir

Hidrofobik etkileşimler, polar olmayan moleküller ve su arasında meydana gelen itici güçlerdir (Abbott vd., 2014).

1.5.5. Antijen–Antikor bağlanma kinetiği

İmmünosorbent yüzey oluşturmak için kullanılan antikorlar tipik olarak bir katı yüzey üzerine immobilize edilirler. İmmobilizasyon antikorun yapısına göre değişebilir ve böylece bağlanma kinetiğini etkileyebilmektedir (Abbott vd., 2014).

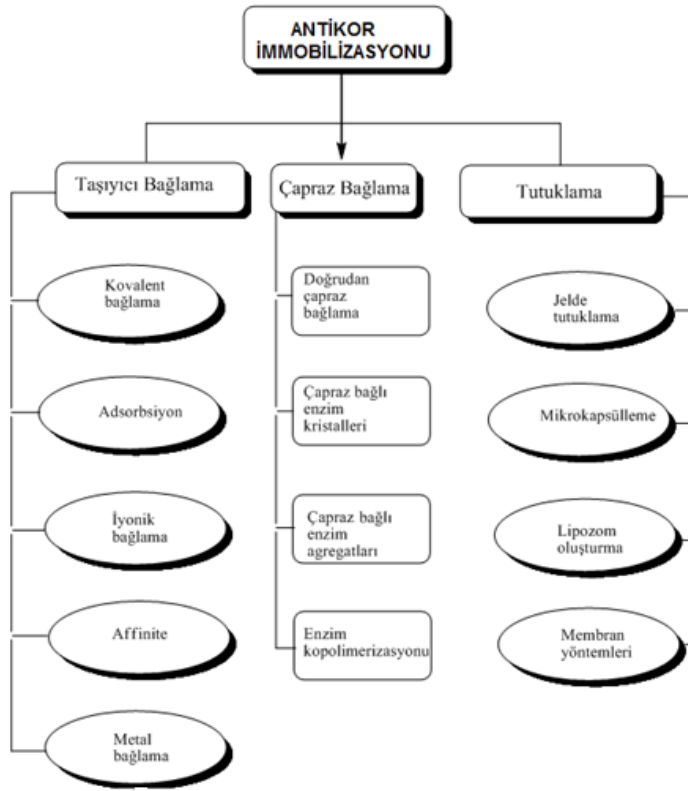
1.5.6. Antikorların İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyolojik materyallerin bir nanofiber yüzeyine başarılı bir şekilde tutturulması immünosorbent yüzey geliştirilmesinde en kritik adımdır. İmmobilizasyon aşamasının kimyasal işlem süreci, yüzey immünosorbent performansında son derece etkili olduğundan bu durum beklenen bir sonuçtur. İmmobilizasyon adımlarının başarılı olması biyosensörlerde olduğu gibi immünosorbent yüzeyin saklama süresi, cevap zamanı, tekrarlanabilirlik gibi özelliklerinin istenilen kriterlere uygunluğunu etkilemektedir (Andreescu ve Sadik, 2004).

İmmobilizasyon yüzeyinin yapısına ve fiziksel durumuna bağlı olarak birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Enzimler için uygulanan immobilizasyon yöntemleri, protein yapısındaki biyoreseptörler için de uygulanabilmektedir (Şekil 15).

1.5.6.1 Taşıyıcıya bağlama yöntemi

İmmobilizasyonda kullanılan en eski yöntemdir. Bu metotta immobilizasyondan sonraki aktivite ve taşıyıcıya bağlı proteinin miktarı taşıyıcının yapısına bağlıdır. Biyomolekül immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar silika jel, bentonit, aktif karbon, selüloz, dekstran, jelatin, polistiren türevleri, poliakrilamiddir.



Şekil 15.İmmobilizasyon Yöntemleri (Tischer ve Wedekind, 1999).

1.5.6.2 Fiziksel adsorpsiyon

Suda çözünmeyen bir taşıyıcı yüzey üzerine proteinlerin fiziksel adsorpsiyonu timeline dayanır. Bu yöntemde enzimde veya antikorda konformasyon değişikliği çok azdır ya da yoktur ve fiziksel adsorpsiyon genellikle reaktif gerektirmez, sadece minimum aktivasyon adımı gerektirir. Diğer yöntemlere göre basit ve ucuz bir yöntemdir. Bütün bu avantajların yanı sıra proteinler pH, iyonik şiddet değişimlerinden etkilendiği için desorbe olurlar ve spesifik olmayan bir yöntemdir (Kim vd., 2004).

1.5.6.3 İyonik bağlanma

Bu metot, yüzeyinde iyon değiştirme yeteneğine sahip gruplar bulunduran, suda çözünmeyen taşıyıcılara proteinlerin iyonik bağlanması esasına dayanır. Şartlarının kovalent bağlanmaya göre daha kolay olması bu yöntemi avantajlı kılar. Ayrıca biyomolekülün aktif bölgesinde ve konformasyonunda küçük çapta değişiklikler olur ve bu yöntem yüksek aktiviteye sahiptir. Buna karşın, iyonik bağlama yöntemde pH değişimleri olan veya yüksek

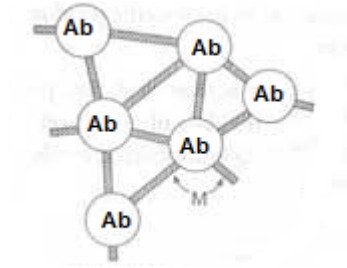
iyonik şiddetli çözeltilerde biyomolekölün taşıyıcıdan kopması meydana gelebilir (Kim vd., 2004).

1.5.6.4 Kovalent bağlama

Suda çözünmeyen taşıyıcılara proteinlerin kovalent bağlanma yoluyla bağlanması esasına dayanır. Proteinlerin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın protein aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Bunun bir sonucu olarak aktif molekülde aktivite kaybı meydana gelebilir. Kovalent bağlanma diğer yöntemlere göre karmaşık işlemler içerir ve pahalıdır. Kovalent bağlanma kullanılarak hazırlanan bir immünosorbent yüzey, sıcaklık, pH, iyonik şiddet değişikliklerine karşı dirençlidir. Ayrıca bağlanma metodu ve taşıyıcı materyallerin seçiciliğinden dolayı kovalent bağlanma yöntemi geniş bir seçim aralığına imkân sağlar (Tischeriand ve Wedekind, 1999).

1.5.6.5 Çapraz bağlama

Bu metot, bir ya da daha fazla fonksiyonel gruplar kullanılarak taşıyıcı ile biyomolekül arasında kovalent bağlanma esasına dayanır (Şekil 16). En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri suberdiimidat, glutaraldehit, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler vb. maddelerdir.



Şekil 16. Çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi

Bu yöntemde biyomolekül kuvvetli bir şekilde bağlandığından desorpsiyon çok düşüktür veya yoktur. Çapraz bağlama diğer metotlardan birisiyle konjugasyonda kullanılır. Çapraz bağlama reaksiyonu nispeten sert koşullarda gerçekleştiğinden bazı durumlarda, proteinin aktif bölgesinde değişikliklere neden olabilir.

1.5.6.6 Tutuklama yöntemi

Bu yöntemin esası protein molekülünü belirli bir ortamda durmaya zorlamaktır. Biyomolekül bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Tutuklama yöntemi, mikrokapsülleme ve polimer

matriks içine kafesleme olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik, biyomolekülün fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Tischeriand ve Wedekind, 1999).

1.5.6.7 Kafes tipi (Polimer matriks içine tutuklama)

Bu yöntem yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerde, protein moleküllerinin çapraz bağ arasında tutuklanması esasına dayanır. Polimer matriks içerisine tutuklama yöntemi, çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktarda biyomolekül ile gerçekleştirilmesi yönünden avantajlı bir yöntemdir. Ayrıca kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

İmmobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize biyomolekülün ancak küçük moleüllü substratlara karşı iyi aktivite göstermesi bu yöntemin dezavantajıdır (Tischeri ve Wedekind, 1999).

İmmobilizasyon yönteminin temel kullanım alanı biyosensörlerdir. Teknolojinin gelişim süreci boyunca ucuz, basit, hızlı, spesifik ve duyarlı analitik cihazlara ihtiyaç duyulmasının bir sonucu olarak biyosensörler çevre, klinik, tarım, gıda ve savunma amaçlı uygulamalarda farklı maddelerin, kalitatif ve kantitatif tayini için önemini koruyan ve gelişimini sürdüren bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır (Andreescu ve Sadik, 2004).

Biyoafinite esaslı biyosensörlerde en çok kullanılan biyoreseptörler antikorlar/antijenler ve reseptör hücrelerdir. Biyoreseptör olarak antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörler “immünosensör” olarak adlandırılır. İmmünosensörlerde reseptör tabakaya immobilize edilmiş spesifik bir antikora, antijenin (analit) bağlanmasıyla immünokimyasal bir reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyon son derece spesifik bir reaksiyondur ve genellikle bağlanma ve afinite sabiti çok büyük olduğundan, bu gibi sistemler ya tersinir değildir (tek kullanımlık biyosensörler) ya da gerekli tampon çözeltiler kullanılarak kompleksin çözünmesi yoluyla sistemin tekrar kullanımı sağlanabilir (Thevenot vd., 1999; Parkinson ve Pejcic, 2005).

İmmünosensörler çabuk ve yüksek duyarlılıklı immünolojik yanıt verebilmeleri nedeniyle tanı alanında oldukça ilgi çeken bir konudur. Antikorların, ilgili antijenlerine olan yüksek affiniteleri ve seçicilikleri, onların radyoimmünotest ve enzim-bağlı immünosorban test (Enzym-Linked Immunosorbant Assay, ELISA) gibi testlerin yaygın olarak kullanımlarını sağlamıştır. Bu nedenle fotometrik, kromatografik ve diğer dedeksiyon teknikleri kullanılarak klasik ELISA

formatında pek çok immünoşensör geliştirilmiştir (Kalab ve Skladal, 1997; Rishpon ve Rosen, 1997).

1.6 Bebek Beslenmesinde Anne Sütü

Anne sütü, hayatın ilk 4-6 ayında bebeğin tüm besin gereksinimini karşılamaktadır. Anne sütü sadece bir besin olmayıp, bebeği yaşamın getireceği çeşitli risklerden korumakta ve hayata sağlıklı, sorunsuz bir başlangıç yapmasını sağlamaktadır (Severin ve Wenshui, 2005).

1.6.1 Anne Sütünün Biyokimyası

Anne sütü içerdği tüm besin öğeleri açısından formülalardan üstündür. Sütün içeriği anneden anneye değişebileceği gibi aynı annenin sütü de her zaman aynı özelliklere sahip değildir. Anne sütünün bir emzirme sürecinde aylara göre hatta gün içindeki öğünlerde içeriğinin değiştiği gösterilmiştir. Günlük miktarı çok büyük değişiklikler göstermekle birlikte ortalama 650-850 ml arasında değişmektedir. (Quarles vd. 1994).

Anne sütü çok sayıda faydalı özelliği olan ve yeterli miktarda protein, yağ, karbonhidrat, mineral ve vitaminden oluşan bir gıdadır. Süt meme dokusunda epitellerde ve sekretuar alveolar hücrelerde sentezlenir. Daha sonra da kanaliküler sistem aracılığı ile dışarıya verilir. Anne sütünün %80'ini su olmasına rağmen önemli miktarda protein ve yağ ihtiva etmektedir. Kolostrumda protein ve mineral seviyeleri yüksek iken yağ konsantrasyonu daha düşüktür. Ayrıca anne sütündeki yağın da diüurnal varyasyonu vardır. Bu da ilaçların bağlanmasını ve bebeğe geçişini etkileyen faktörlerden biridir. Ayrıca proteinlere bağlanan veya hidrofobik veya lipofilik özelliği olan bir çok ilaç anne sütünde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

Annenin farmokokinetiği (absorpsiyon, distribüsyon, metabolizma ve eliminasyon) anne sütüne geçen ilacın itirahını etkileyecektir. İlaçların dağılımını memedeki kan akımı plazmanın pH'sı (7,45), anne sütünün pH'sı (7,08), meme dokusunun kompozisyonu anne sütünün kompozisyonu ilacın fizikokimyasal özellikleri, plazmanın ve anne sütünün ilaç bağlama kapasitesi anne sütü yapım hızı etkiler.

Anne sütü, Whey proteini ağırlıklıdır ve büyük kısmını α -laktalbümin ve laktoferrin oluşturur. İnek sütü ve formülalarda ise anne sütünde bulunmayan, antijenik reaksiyonlara neden olabilen β -laktoglobulin egemendir. Anne sütü, bebeği enfeksiyonlardan koruyan ve kolostrumda daha fazla bulunan IgA, laktoferrin, lizozim gibi koruyucu proteinlerden

zengindir. İnek sütünün %80'nini anne sütünün ise %20-40'ını oluşturan kazein anne sütünde daha kolay sindirilir bir yapıdadır (Severin ve Wenshui, 2005).

Anne sütünün ana karbonhidratı laktozdur ve bebeğin günlük enerjisinin %40'ını sağlar. Laktozun büyük kısmı enterosit laktazı tarafından sindirilir. Sindirilemeyen ve kolona geçen kısmı ise buradaki bakteriler tarafından sindirilir. Sindirilemeyen ve kolona geçen kısmı ise buradaki bakteriler tarafından laktat ve kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürülür ve emilir. Bu şekilde fazladan enerji kaynağı sağlanırken, kolonik pH asidik tarafa kayar ve kalsiyum emilimi olumlu yönde etkilenir.

Anne sütü laktozu bağırsakta laktobasil florası oluşumuna katkıda bulunarak bağırsak enfeksiyonlarına karşı koruyucu özellik sağlar. Bağırsak enfeksiyonları sırasında formüle ile beslenen bebekler laktozu sindiremezken, anne sütü ile beslenenlerde sorun yaşanmaz. Anne sütü çeşitli oligosakkaritleri yüksek konsantrasyonlarda içerir. Miktarı ortalama 15 g/l dolayındadır. Bunun %40'ı dışkı, %1-2'si ise idrarla atılır. Geri kalanı intestinal flora tarafından metabolize edilerek bir çeşit diyet lifi fonksiyonu görür. Bu bileşikler aynı zamanda virüsler, bakteriler ve toksinlere karşı koruyucu özellik taşır. Ayrıca oligosakkaritler kolon florasının, laktobasil florası şeklinde gelişimine de yardımcı olurlar (Severin ve Wenshui, 2005).

Anne sütünün enerji yoğunluğu 67 kcal/100 ml olup, bunun %50'si yağlardan sağlanır. Her emzirmenin başlangıcındaki süt daha fazla laktoz ve su içerirken, yağ miktarı azdır. Emzirmenin sonuna doğru yağ ve dolayısıyla enerji miktarı artar, süt daha az akışkan hale gelir. Bebeğin enerji gereksinimi için bu dönem çok önemli olduğundan, süt akışkanlığının azaldığı ve bebeğin emme hızının düştüğü gözlenmeden emzirme sonlandırılmamalıdır.

Anne sütü doymamış yağlardan zengindir ve esansiyel yağ asit içeriği yüksektir. Anne sütündeki uzun zincirli yağ asitleri (LCPUFA) inek sütünden daha iyi emilmektedir. Bu yağ asitleri bebeğin normal nörolojik gelişimi ve kortikal görme fonksiyonları için çok önemlidir. Yaşamın ilk aylarında bebekler esansiyel yağ asitlerini LCPUFA'lara yeteri kadar dönüştüremezler. Bu dönemde en önemli LCPUFA kaynağı anne sütüdür (Severin ve Wenshui, 2005).

1.6.2 Anne Sütünün Bebek İçin Yararları

- İshal sıklığının ve süresinin azalması
- Solunum yolu enfeksiyonlarından korunma
- Otitis media sıklığının azalması
- Neonatal nekrotizan enterokolit, bakteriyemi, menenjit ve idrar yolu enfeksiyonundan korunma

- Otoimmün hastalık riskinin azalması
- Ani çocuk ölümü sendromu riskinin azalması
- İnek sütü alerjisi riskinin azalması
- Geç çocukluk çağında obezite riskinin azalması
- Görsel ve psikomotor gelişimin en iyi şekilde sağlanması
- Çene gelişiminin daha iyi olması, maloklüzyonun önlenmesi

1.6.3 Anne Sütünün Anne İçin Yararları

- Emzirmenin erken başlaması ile uterus involüsyonunun hızlanması, ve maternal mortalite riskinin azalması
- Kan kaybının azalması ile vücut demirinin kaybının azalması
- Doğum sonrası kontrasepsiyon
- Kilo kaybının hızlanması ve doğum öncesi boyutlara hızlı dönüş
- Premenapozal meme kanseri riskinin azalması
- Over kanseri riskinin azalması
- Kemik mineralizasyonunun düzelmesi ve postmenapozal kırık riskinin azalması

1.6.4 Anne Sütüne Geçen İlaç Ve Toksik Maddelerin Bebek Üzerindeki Genel Olumsuz Etkileri

Eklem bozukluğu	Kemik iliği bozukluğu
Tiroid harabiyeti	Böbrek bozukluğu
Nötropeni	Diyare
Karaciğer bozukluğu	İmmün sistem hasarı
Jinekomasti	Huzursuzluk
Sedasyon	Uyku bozukluğu
İştah bozukluğu	Solunum bozukluğu

1.7 Emziren Annede İlaç Kullanımı

Anne sütü alan bebeklerin annelerine herhangi bir ilaç başlandığında hekimlerin ve diğer sağlık personelinin eğilimi genellikle anne sütüne ara vermek şeklinde olmaktadır. Buradaki düşünce tarzının altında yatan fikir genellikle gebelikte teratojen olduğu varsayılan ilaçların anne sütüne geçtiğinde de aynı toksik etkileri yapacağı endişesidir (Ito ve Lee 2003).

1.8 Anne Sütüne İlaçların Geçişi

Anne sütü ile beslenmenin önemi her geçen gün artmakta, anne sütünün özellikleri tanımlanmakta ve yenidoğan için vazgeçilmez bir besin olduğu kabul edilmektedir

(Michaelson vd., 2000). Metabolik hastalıklar ve ilaç kullanımı anne sütünün enerji ve besin öğeleri düzeyini etkileyen faktörlerdir. Yenidoğan için çok önemli olan anne sütünün verilmesi süresince; annenin kullanmak zorunda olduğu ilaçların seçimi bu ilaçların anne sütüne geçiş yolları, kısa ve uzun zaman periyodunda bebeğe olan etkileri araştırmacıları bu konuda çalışmaya yönlendirmiştir (Göçmen vd., 1992). İlaç alınıp anne plazmasına geçtikten sonra, plazma proteinlerine bağlanarak ya da serbest olarak meme kapiler kan damarlarına gelir. Buradan prealveolar interstisyuma geçerler. İlaçlar özelliklerine göre ya serbest kalır ya da ekstraselüler sıvı proteinlerine bağlanır (Giocoia ve Catz, 1979; Kayaalp, 1984).

Anne tarafından alınan ilaçlar süt proteinlerine bağlanarak ya da yağ globulleri içinde taşınırlar. Ancak maternal plazmadan ilacın süte geçmesi için meme alveolar hücre membranını geçmesi gerekmektedir. Bu geçiş birkaç mekanizma ile olmaktadır (American Academy of Pediatrics, 2001; Ito ve Lee, 2003; Sachs, 2013).

1- Pasif Difüzyon Transfer

- a) Meme alveolar hücre membranını difüzyon ile geçiş en sık olan ilaç geçiş mekanizmasıdır. Maternal plazmadaki ilaç konsantrasyonu, ilacın lipide çözünürlüğü, ilacın molekül ağırlığı, maternal plazmadaki ilacın proteine bağlanma derecesi ilaçların süte difüzyonunu etkilemektedir.
- b) Filtrasyon yoluyla pasif difüzyon (molekül ağırlığı 100-200 daltonun arasında olan iyonize ve suda eriyen ilaçların porlardan su kütlesi ile birlikte geçişidir).

2- Ortak Taşıyıcı ile Geçiş

İlacın alveolar hücre membranının bir tarafından diğer tarafına taşıyıcı bir protein ile taşınmasıdır.

3- Intersellüler difüzyon

İlacın maternal plazmadan doğrudan alveolar hücreler arasındaki intersellüler boşlukları geçerek süte geçişidir.

4- pH farklılık Teorisi

Zayıf bazlar asidik ortamda daha fazla iyonize olduklarından plazmaya göre pH'sı daha düşük olan süte iyonize olur ve lipid membranı tekrar geçemediklerinden süte kalırlar. Zayıf asitler ise bazik ortamda daha iyi iyonize olduklarından plazmada süten daha yüksek konsantrasyonda bulunurlar.

Süt veren anne tarafından terapötik dozlarda alınan ilaçların çoğu süte geçerler. Ancak geçen miktar en fazla alınan dozun yaklaşık % 2 'si kadar olmaktadır. Özellikle yenidoğan bebeklerin ilaçları detoksifiye mekanizmaları daha büyük bebeklere oranla yetersizdir.

Hepatik ve renal fonksiyonların immatür oluşu düşük dozlarda absorbe edilen bir ilaç bile yeni doğanın plazmasında birikebilir.

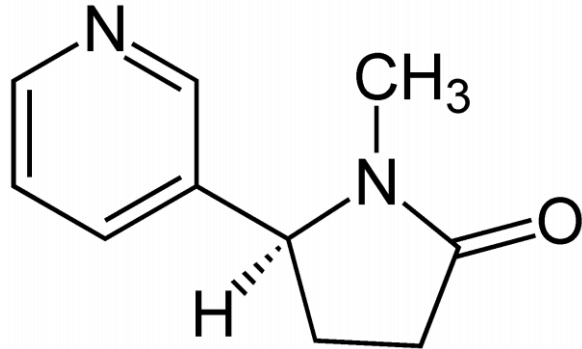
Günümüzde emziren annelere yönelik bazı öneriler gündemdedir. Kesin olarak gerekmedikçe emziren anneye hiçbir ilaç verilmemelidir. İlaç gerekiyorsa yan etkileri açısından en fazla çalışılan en etkili ilaç seçilmelidir. Emziren anne ilacı almak zorunda olduğunda anneye ilacı hemen emzirmeden sonra alması önerilerek, bebeğin ilaca maruz kalma süresi minimele indirilebilir ve emzirmeye 4 saat kadar ara vermesi önerilmelidir(Sökücü, 1987).

Anne sütüne geçen ilaçların bebek üzerindeki etkilerini minimize etmek için günümüzde önerilen genel yaklaşımları sınıflandırdığımızda bunlar; İlacın kullanılmaması, ilaç tedavisinin ertelenmesi, süte az geçen ilaçların kullanılması, alternatif uygulama yolu seçilmesi, süt ilaç konsantrasyon yüksek olduğu zamanlarda emzirmekten kaçınılması veya emzirmeye geçici ara verilmesidir.

1.9 Proje Kapsamında Kullanılan Antijenler Ve Antikorlar

1.9.1 Kotininve Kotinin Antikoru

Kotinin, nikotin pirolidin halkasının C ve N atomlarından oksitlenmesiyle oluşan metabolitidir (Şekil 17).



Şekil 17. Kotinin ((5 S)-1-metil-5-(3-piridil) pirolidin-2-on) yapısı

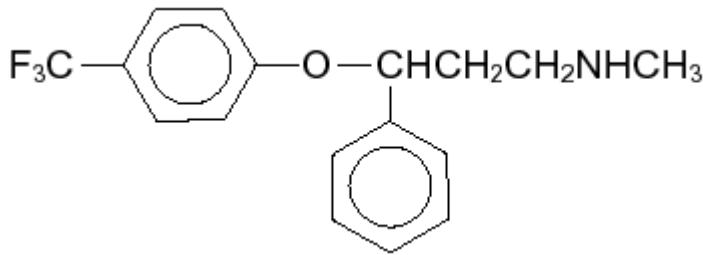
Çalışmamızda nikotin antikoru yerine kotinin antikoru kullanılmıştır. Bunun nedeni kotininin yarılanma ömrünün nikotinden fazla olması ve süte geçen miktarının nikotinden daha fazla olmasıdır. Nikotinin sütteki yarılanma ömrü 2 saat iken kotininin yarılanma ömrü 15-20 saat arasındadır.⁸ Anne sütündeki nikotin konsantrasyonu serumdaki konsantrasyonundan fazladır. Anne sütündeki nikotinin serumdaki nikotin konsantrasyonuna oranı 1,09 - 2,92 arasındadır. Nikotinin serumdaki konsantrasyonu 1-28 ng/ml iken sütteki konsantrasyonu 2-

62 ng/ml'dir. Nikotinin metaboliti olan kotininin anne sütündeki konsantrasyonu ise 12-222 ng/ml arasındadır. Kotininin serumdaki konsantrasyonu 16-330 ng/ml'dir (Mennella vd 2007).

Çalışmamızda kullandığımız Kotinin antikoru koyun kaynaklı poliklonal bir antikordur. (Randox, Anti-Cotinine PAS10081, İngiltere). Konsantrasyonu 7,9 mg/ml'dir.

1.9.2 Fluoksetin ve Fluoksetin Antikoru

Fluoksetin 1987'de ABD'de ilk piyasaya çıkan serotonin geri alım İnhibitörüdür (Şekil 18).Majör depresyon, obsesif kompulsif bozukluk, bulimiya nevroza, adet öncesi sendromunun tedavisinde kullanılmaktadır. Kadınların %10-15'inde doğum sonrası dönemde depresyon görülmektedir. Anneler doktor kontrolünde veya kendi seçimleri olarak fluoksetin içeren piyasadaki ilaçları kullanmaktadır. Fluoksetinin yarılanma ömrü tek dozda 1-3 gün uzun süreli kullanımında 4-6 gündür. Fluoksetinin aktif metaboliti olan Norfluoksetinin yarılanma ömrü ise 16 gündür.



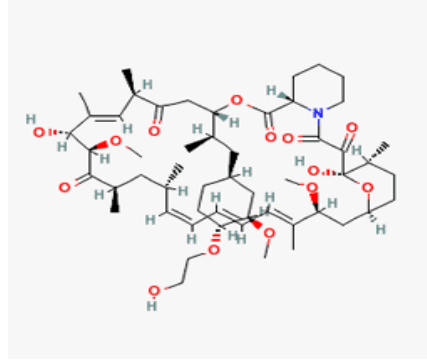
Şekil 18. Fluoksetinin (N metil 3 Fenil 3-(α,α,α - tri floro-p-tolioksi) propilamin) yapısı

Fluoksetin ile ilgili çalışmalarda¹⁴ fluoksetin antikoru yerine norfluoksetin antikoru kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda fluoksetin antikoru olarak norfluoksetin antikoru kullanılmıştır. Anne sütündeki fluoksetin konsantrasyonu 17,4-293 ng/ml arasındadır. Fluoksetin metaboliti olan norfluoksetinin ise anne sütündeki konsantrasyonu 23-279 ng/ml arasındadır. Emzirme sonunda bebeğe geçen fluoksetinin bebeklerde huzursuzluk, uyku bozukluğu, kusma ve sulu dışkılamaya neden olduğu gözlenmiştir (Davanzo vd 2011).

1.9.3 Siklosporin ve Siklosporin Antikoru

Siklosporin, 'Tolypocladium inflatum Gams' isimli fungustan elde edilen, nötral, lipofilik, sıklık bir polipeptiddir (Şekil 19). İmmünoşüpresyon yapan (immün sistemi baskılayan) ilaçlar arasında glukokortikoidler, antiproliferatif ilaçlar, siklosporin ve takrolimus bulunmaktadır. Halen kullanılan immünoşüpresif ilaçlar arasında etkinliği en yüksek olanıdır. ⁹ Siklosporin mide-bağırsak kanalında kısmen absorbe edilir, bu nedenle ağızdan alınabilir. Bioyararlanımı

az ve fazla deęiřkendir. Siklosporin plazmada, dūřuk, orta ve yūřsek dansiteli lipoproteinlere ve řilomikronlara baęlanmıř olarak tařınır. Bazen de plazmada serbest halde dolařabilir. Siklosporinin dokularda depolanma miktarı kiřiden kiřiye deęiřiklik gōstermektedir. Karacięer ilacın bařlıca deposu olmakla birlikte pankreas, kalp, bōbrekler, sinir ile kas dokularında ve yaę dokusu hūcrelerinde bulunmaktadır. Siklosporin kullanımına baęlı olarak oluřan yan etkiler arasında nefrotoksisite, hepatoksisite, hipertansiyon, gingival hiperplazi, nōrolojik komplikasyonlar ve dięerleri yer almaktadır (Osadchy ve Koren 2011).



şekil 19. Siklosporinin yapısı

Siklosporin, transplantasyon sonrası organ reddinin önlenmesinde, otoimmūn hastalıklarda, nefrotik sendromlarda, romatoid artrit gibi hastalıklarda kullanılır.¹⁰Siklosporinin serumdaki konsantrasyonu 123-273 mg/l arasındadır. Anne sūtūne geęen siklosporinin konsantrasyonu ise 79-286 mg/l arasındadır.

Çalışmamızda kullandığımız siklosporin antikoru fare kaynaklı monoklonal bir antikordur. (Abcam, Anti-Cyclosporin A (CSZ.22).(AB8312), İngiltere). Konsantrasyonu 2 mg/ml'dir.

Proje kapsamındakotinin, fluoksetin ve siklosporinin sūte eklenecek konsantrasyonları seęilirken anne sūtūne geęen konsantrasyonları gōz önūnde bulundurulmuřtur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Deneylerde Kullanılan Spesifik Kimyasal Maddeler

Poli(vinil alkol), Poli(akrilik asit), Kotinin,
Fluoksetin, Siklosporin, TEMED (N,N,N',N'-
Tetrametil etilen diamin), Suberdiimidat

Sigma-Aldrich

Akrilamid, Bisakrilamid, Coumassie Brilliant Blue, Poncaue S

Fischer Scientific

Albumin, Tetrahidrofuran

Merck

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

Thermo-Scientific

1,1'-Karbonil diimidazol

Fluka

PVDF membrane

Bio-Rad

Controlled Pore Glass (CPG)

Milipore

Kotinin antikoru

Randox

Norfluoksetin antikoru

Randox

Siklosporin antikoru

Abcam

2.2 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

Laboratuar tipi Elektrospin Cihazı	Inovenso, NE 20
FourierTransform Infrared spektroskopi	Perkin–Elmer Spectrum100
Termogravimetrik Analiz (TGA)	Perkin ElmerPyris 1
Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)	Perkin Elmer
Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	Philips XL30 ESEM- FEG/EDAX
Vortex	Janke& Kunkel,IKA LABOR TECHNIK
Ultra saf su cihazı	Purelab, Option Q, DV 25
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Hassas terazi	Shimadzu AUX 220
Otomatik pipetler	Gilson
Spektrofotometre	Ray Leigh UV-1800
Su banyosu (100 °C)	Nuve,BT 400
pH-metre	Mettler Toledo FE 20
ELISA	Rayto RT-2100 C
Çalkalayıcı	IKA KS 130 Basic
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Western Blot Tranfer Sistemi	Bio-Rad
Liyofilizatör	Virtis, Benchtop3L

2.3 Deneysel Yöntemler

Çalışmanın ilk aşamasında PVA ve PAA çözeltileri kullanılarak 5 değişik proses parametresinde çapraz bağlı nanofiberler hazırlandı. Hazırlanan çapraz bağlı nanofiberlerin yapısal, morfolojik ve termal özellikleri incelendi.

2.3.1 Poli(vinil alkol) (PVA) ve Poli(akrilik asit) (PAA) Çözeltilerinin Hazırlanması

Toz haldeki 5 g PVA polimeri, 95 ml destile su içerisinde 80 °C sıcaklıkta 6 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Kütlece %5'lik konsantrasyona sahip homojen bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti kullanılmadan önce oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

Toz haldeki 5 g PAA polimeri, 45 ml destile su içerisinde oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 6 saat boyunca karıştırılarak kütlece %10 konsantrasyona sahip PAA çözeltisi hazırlanmıştır. PAA çözeltisi kullanılmadan önce oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.

2.3.2 PVA ve PAA Çözeltilerinden Spin Çözeltisinin Hazırlanması

PVA ve PAA çözeltilerinin karışımından elektrospinning işlemi için spin çözeltileri hazırlanmıştır.

50 ml PVA çözeltisi içerisine 5 ml PAA eklenerek kütlece 10:1 (PVA: PAA) oranına sahip spin çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler manyetik karıştırıcı ile homojen bir çözelti elde edilinceye kadar karıştırılmıştır ve kullanılmadan önce oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmiştir.

2.3.3 PVA-PAA Çözeltilerinin Elektrospin Cihazıyla Spin İşlemi

Kütlece 10:1 oranına sahip PVA-PAA çözeltilerinden farklı toplayıcı tipi ve toplayıcı yüzeylerine sahip elektrospin düzeneklerinde spin yapılmıştır.

2.3.3.1 Birinci Seri Nanofiberlerin Hazırlanması

Kütlece 10:1 oranına sahip spin çözeltisi, 50 ml PVA çözeltisi ile 5 ml PAA çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı ve şırıngaya yüklendi. Otomatik pompa, şırınga içerisinde bulunan spin çözeltisini düzelerle saatte 3 ml çözelti gönderecek şekilde ayarlandı. Nanofiberlerin rastgele düzenlenmesini önlemek amacıyla düzeler ile karşılıklı gelecek şekilde toplayıcı yüzeyi oluşturulmuştur. Düzeler ile arasında 16 cm mesafe bulunan toplayıcı

yüzeyi Al folyo ile kaplanmıştır. Yüksek voltaj güç kaynağı kullanılarak spin çözeltisine 25 kV elektrik akımı uygulanarak elektriksel alan oluşturulmuştur. Sistemde sürekli olarak var olan 25 kV'luk elektriksel alan, düze ucundaki polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yenerek zıt yükle yüklenmiş olan toplayıcıya doğru yönlenmesi sağlar. Bu yönlenme sonucunda toplayıcı yüzeyinde nanoboyutlara sahip fiberler elde edilir. Polimer çözeltisinin tümü tükeninceye kadar spin işlemine devam edilmiştir. Spin işlemi normal atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Uygulama parametreleri

Ortalama Nanofiber çapı (nm)	190
Akış hızı (ml/h)	3
Toplayıcı-düze mesafesi (cm)	16
Voltaj (kV)	25
Toplayıcı tipi	Dönen silindir
Toplayıcı yüzeyi	Al folyo

2.3.3.2 İkinci Seri Nanofiberlerin Hazırlanması

50 ml PVA çözeltisi ile 5 ml PAA çözeltisinden hazırlanan kütlece 10:1 (PVA:PAA) oranına sahip spin çözeltisi elektrospinning cihazının şırınga sistemine yüklenir. Otomatik pompa şırınga içindeki polimer çözeltisini düzelerle saatte 3 ml gönderecek şekilde ayarlanmıştır. Toplayıcı yüzey olarak dönen silindir kullanılmıştır ve toplayıcı yüzeyi süzgeç kâğıdıyla kaplanmıştır. Düzeler ile toplayıcı yüzeyi arasındaki mesafe 16 cm olarak ayarlanmıştır. Elektrospinning sistemine sürekli olarak 25 kV potansiyel uygulanarak elektrik alan oluşturulmuştur. Spin çözeltisinin tümü bitinceye kadar spin işlemine devam edilmiştir.

Uygulama parametreleri:

Ortalama Nanofiber çapı (nm)	180
Akış hızı (ml/h)	3
Toplayıcı-düze mesafesi (cm)	16
Voltaj (kV)	25
Toplayıcı tipi	Dönen silindir
Toplayıcı yüzeyi	Süzgeç kâğıdı

2.3.3.3 Üçüncü Seri Nanofiberlerin Hazırlanması

50 ml PVA çözeltisi ile 5 ml PAA çözeltisinden hazırlanan kütlece 10:1 (PVA:PAA) oranına sahip spin çözeltisi elektrospin cihazının şırınga sistemine yüklendikten sonra polimer çözeltisini düzelere saatte 3 ml gönderecek şekilde ayarlanmıştır. Toplayıcı düz plaka yüzeyi süzgeç kâğıdıyla kaplanmıştır. Düzeler ile toplayıcı yüzeyi arasındaki mesafe 16 cm olarak ayarlanmıştır. Elektrospin sistemine sürekli olarak 25 kV potansiyel uygulanarak elektrik alan oluşturulmuştur. Spin çözeltisinin tümü bitinceye kadar spin işlemine devam edilmiştir.

Uygulama parametreleri:

Ortalama Nanofiber çapı (nm)	150
Akış hızı (ml/sa)	3
Toplayıcı-düze mesafesi (cm)	16
Voltaj (kV)	25
Toplayıcı tipi	Düz plaka
Toplayıcı yüzeyi	Süzgeç kâğıdı

2.3.3.4 Dördüncü Seri Nanofiberlerin Hazırlanması

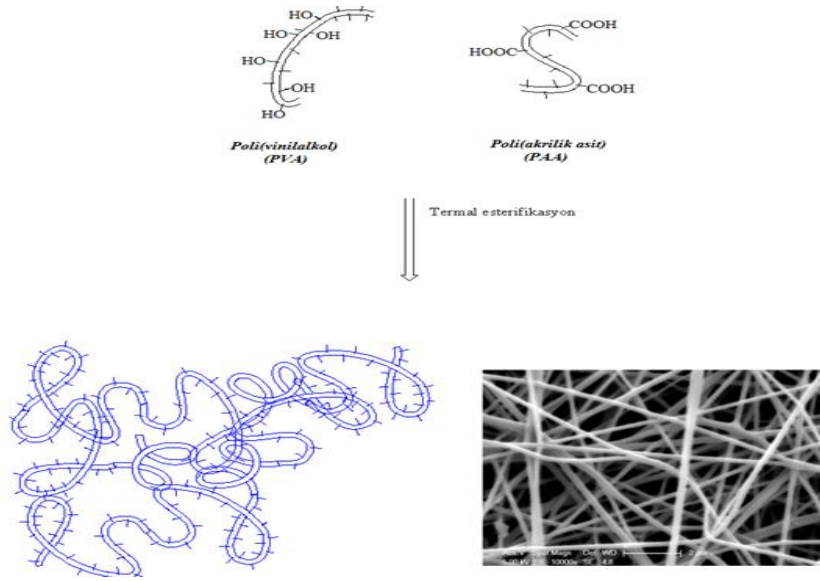
50 ml PVA çözeltisi ile 5 ml PAA çözeltisinden hazırlanan kütlece 10:1 (PVA:PAA) oranına sahip spin çözeltisi elektrospin cihazının şırınga sistemine yüklendikten sonra polimer çözeltisini düzelere saatte 5 ml gönderecek şekilde ayarlanmıştır. Toplayıcı yüzey olarak dönen silindir kullanılmıştır ve toplayıcı yüzeyi süzgeç kâğıdıyla kaplanmıştır. Düzeler ile toplayıcı yüzeyi arasındaki mesafe 17 cm olarak ayarlanmıştır. Elektrospin sistemine sürekli olarak 26 kV potansiyel uygulanarak elektrik alan oluşturulmuştur. Spin çözeltisinin tümü bitinceye kadar spin işlemine devam edilmiştir.

Uygulama parametreleri:

Ortalama Nanofiber çapı (nm)	130
Akış hızı (ml/sa)	5
Toplayıcı-düze mesafesi (cm)	17
Voltaj (kV)	26
Toplayıcı tipi	Dönen silindir
Toplayıcı yüzeyi	Süzgeç kâğıdı

2.3.4 PVA-PAA Nanofiberlerinin Termal Olarak Çapraz Bağlanması

Elektrospinning yöntemiyle hazırlanan PVA-PAA esaslı nanofiberlerin yapısında bulunan hidroksil grupları nedeniyle fiberler hidrofilik özellik göstermektedirler. Nanofiberlerin su ve diğer solventlerde çözünürlüğünü engellemek amacıyla, fiberler önce 30 dakika boyunca 100 °C de daha sonra 2 saat boyunca 140 °C de bekletilmiştir. PVA ana zincirine bağlı bulunan hidroksil grupları (-OH) ile PAA yapısında bulunan karboksil grupları (COOH) arasındaki moleküller arası etkileşim ile termal ve hidrolitik kararlılığı daha fazla olan ester bağı oluşmuştur. Termal esterifikasyon reaksiyonu sonucunda nanofiberler çapraz bağlanarak su, süt ve diğer çözücülerde çözünmemesi sağlanmıştır.



Şekil 20. Polivinil alkol ve poliakrilikasitinesterleşme reaksiyonu dizini

2.3.5 N,N-Karbonil diimidazol (CDI) ile Çapraz Bağlı PVA-PAA Nanofiberlerinin Yüzey Modifikasyonu

Çalışmamızın başlangıcında antikörlerin nanofiberlere kovalent olarak bağlanmasını sağlamak amacıyla N,N-Karbonil diimidazol (CDI) kullanıldı. Bunun için aşağıdaki yöntem izlendi. Antikörlerin nanofiber yüzeylerine kovalent olarak bağlanması iki basamakta gerçekleşir. Öncelikle CDI, nanofiber yüzeyinde bulunan hidroksil grupları ile etkileşerek yüzeyde N-açilimidazolfonksiyonel gruplarını oluşturdu. Aktifleştirilmiş olan bu yüzeylere fonksiyonel grubu bulunan spesifik antikörlerin kovalent olarak bağlanması sağlandı.

Bu amaçla çapraz bağlı nanofiberler 24 saat boyunca 30 °C de vakum altında kurutuldu. 10 g CDI 50 ml THF içerisinde manyetik karıştırıcı ile homojen bir çözelti elde edinceye kadar oda sıcaklığında karıştırıldı. Azot girişi ve geri soğutucu ile donatılmış üç boyunlu bir balon içerisinde çapraz bağlı nanofiber konuldu ve 50 ml CDI çözeltisi eklendi. 24 saat boyunca 40

°C de çalkalandı. 24 saatin sonunda N-açilimidazolmodifiye edilmiş nanofiberler elde edildi ve nanofiberler 4 °C de saklandı. Yüzey modifikasyonu daha sonra immobilizasyon aşaması ile birleştirilip suberdiimidat çözeltisi kullanılarak yapıldı.

2.3.6 Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FT-IR)

Hazırlanan nanofiberlerin kimyasal yapısının belirlenmesinde Perkin–Elmer Spectrum100 ATR-FTIR spektrofotometre cihazı kullanıldı. Spektrumlar 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında kaydedildi.

2.3.7 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Hazırlanan nanofiber malzemelerin termo-oksidatif kararlılıkları ölçmek amacıyla, Perkin Elmer Pyris 1 model TGA cihazı kullanıldı. Ölçümler hava atmosferinde 10 °C /dak ısıtma hızıyla 30 °C-750 °C sıcaklıkları arasında yapılmıştır.

2.3.8 Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC)

Hazırlanan nanofiberlerden 10 mg numuneler alındı. Program basamakları; 30 °C'den 200 °C'ye kadar 10 °C/dk hızı ile ısıtıldı. 200 °C'de 1 dk boyunca bekletildi.. Bu sıcaklıktan 30 °C'ye kadar 100 °C/dk hız ile hızlı soğutma yapıldı. 30 °C'de 1dk boyunca bekletildi. 30 °C'den 200 °C' ye kadar 10°C/dk hız ile ısıtıldı. Tüm basamaklar 20 mg/dk hız ile azot gazı geçişinde gerçekleştirildi.

2.3.9 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM)

Hazırlanan nanofiberlerin morfolojisi ve çaplarının boyutu Philips marka XL30 ESEM-FEG/EDAX ile incelenmiştir. Boğaziçi Üniversitesinden hizmet alımı yapılmıştır.

2.3.10 Nanofiber Üzerine Antikor Immobilizasyonu

Garcinuno ve arkadaşlarının CPG kullanarak yaptığı immobilizasyon baz alınarak metod nanofibere uyarlanacak şekilde modifiye edilmiştir.¹⁵ Modifikasyon şartları ön deneme çalışmaları ile tayin edilmiştir.

2.3.11 Nanofiber– Antikor Muamelesi

3cm-3cm kesilen polimer nanofiber üzerine 20µg'a denk gelecek şekilde antikor eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.¹⁵

2.3.12 2 Saat İnkübasyon Sonrasında Yapılan Yıkama İşlemleri

İnkübasyon süresi sona erdiğinde Polimerik Nanofiber yüzeyine bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için antikora spesifik fosfat tampon (6 mL) ile 3 kez ve 0,1 M Borat Tamponu (6 ml) ile 1 kez yıkama yapılmıştır. Her yıkama aşamasında petri kapları hafifçe çalkalanmıştır.

2.3.13 Nanofiber - Antikor Bağlanmasını Güçlendirme Aşaması

0,1 M Borat Buffer ile hazırlanan 0,02 M Dimetilsüprimidat çözeltisinden çökteltelerin (Nanofiber - Antikor) üzerine 6 ml eklenerek tüpler oda sıcaklığında 5 saat inkübe edilmiştir.

2.3.14 5 Saat İnkübasyon Sonrasında Yapılan Yıkama İşlemleri

5 saatlik inkübasyon sona erdiğinde Nanofiber-antikorlar, antikora spesifik fosfat tamponu (6 mL) ile 2 kez yıkanmıştır. Her yıkama aşamasında petri kapları hafifçe çalkalanmıştır.

2.3.15 Bağlanmayan Antikorları Uzaklaştırma Aşaması

İmmobilizasyon işlemleri sırasında bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak amacıyla çökteltinin(Nanofiber - Antikor) üzerine 6 ml 0,05 M KCN çözeltisi eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir.¹⁵

2.3.16 24 Saat Sonunda Yapılan Yıkama İşlemleri

24 saatlik inkübasyon sona erdiğinde tüpler 6 ml antikora spesifik fosfat tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Her yıkama aşamasında petri kapları hafifçe çalkalanmıştır.

2.3.17 Nanofiber Üzerine İmmobilize Edilen Antikorlarının Saklanması

24 saatlik yıkama aşamalarının ardından süpernatantlarından ayrılan Nanofiber – Antikor kompleksi üzerine 6 ml hacimde antikora spesifik fosfat tamponu eklenerek +4°C saklanmıştır.

2.3.18 Anne Sütü Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda kullandığımız anne sütü örnekleri hem tedavi veya takip amacıyla Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvurmuş olan gönüllülerden hem de çevremizdeki emziren annelerden temin edilmiştir. Çalışmamız için gerekli olan anne sütü toplanması için gerekli olan etik onay Marmara Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulundan alınmıştır. Ayrıca süt örneklerinin Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinden toplanması için de gerekli izinler alınmıştır.

2.3.19 İnek sütü örnekleri

Çalışmalarımız sırasında Sütaş marka cam şişede günlük süt kullanılmıştır.

2.3.20 Antikor İmmobilizasyonu Yapılmış Olan CPG ve Nanofibere Antijen Muamelesi

Antijenler Tablo 3’de belirtilen konsantrasyonlarda fosfat tampon, inek sütü ve anne sütü içerisinde hazırlanarak antikor immobilizasyonu yapılmış olan CPG ve nanofiber ile muamele edildi. Antijen eklenen tüpler oda sıcaklığında 80 rpm çalkalama hızında 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 3: CPG veya Nanofiber ile Muamele edilen Antijen Konsantrasyonları

ANTİJENLER	KONSANTRASYONLAR				
Fluoksetin HCL	25ng/ml	50 ng/ml	75 ng/ml	100 ng/ml	150 ng/ml
Kotinin	10ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	-
Siklosporin	-	100 ng/ml	200 ng/ml	300 ng/ml	-

2.3.21. Antijen Muamelesinin Ardından Yapılan Tayin Aşamaları

İnkübasyon sonrası Nanofiber-antikor kompleksi üzerine bağlanmayan kotinin, siklosporin ve fluoksetin miktarları ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

2.3.21.1 Kotinin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi

Testin prensibi: Kotininin spesifik antikorlar tarafından tanındığı direkt yarışmalı ELISA tekniğidir.

Numunede bulunan kotinin ve kotinin-HRP analogu çözeltideki tavşan anti kotinin antikorlarının bağlanma bölgeleri için yarışır.

Çalışmalarımız sırasında kotinin tayini için takip edilen adımlar Tablo 4’ te gösterilmiştir.

Tablo 4. Kotinin tayini için kullanılan ELISA Yöntemi

KOTİNİN ELISA		
ÖNCE	Başlamadan önce Elisa Kiti oda sıcaklığına getirilir.	
ÖNCE	5X Wash Buffer 1:5 oranında distile su ile seyreltilir.	
1	50µl örnekler kuyucuklara yüklenir.	
2	50µl enzim konjugat kuyucuklara yüklenir.	
3	50µl antibody solution kuyucuklara yüklenir.	
	Üst yüzey kaplanır. El ile güzelce çalkalanır. 30 sn.	
4	60 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.	
	Kuyucuklar boşaltılır.	
5	4 kere 250 µl 1X'lik Wash Buffer ile yıkama yapılır. Plate en sonunda kurulanır.	
6	100µl substrat/color solution eklenir ve 30dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.	
7	100µl Stop Solution eklenir.	
8	450nm'de 15 dk içinde hemen okunur.	

2.3.21.2. Fluoksetin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi

Testin prensibi: Fluoksetinin spesifik antikorlar tarafından tanındığı yarışmalı ELISA tekniğidir. 450 nm'de elde edilen sinyalin miktarı ile direkt olarak orantılıdır.

Çalışmalarımız sırasında fluoksetin tayini için takip edilen adımlar Tablo 5' te gösterilmiştir.

Tablo 5: Fluoksetin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi

FLUOKSETİN ELISA	
1	100 µl Fluoxetine Standartları düşük konsantrasyondan yükseğe kuyucuklara konur.
2	100 µl örnekler kuyucuklara yüklenir.
3	100 µl Antibody 1 kuyucuklara eklenir ve 1 dk shaker'da çalkalanır
4	Oda Sıcaklığında 30dk inkübasyona bırakılır.
5	3 kez 250µl 1X Wash Buffer ile yıkama yapılır.(son yıkamadan sonra kurula)
6	150µl 1X HRP-Conj Antibody2 eklenir.
7	Oda Sıcaklığında 30dk inkübasyon (Folyo ile plate sarılır,işıktan koru)
8	3 kez 250µl 1X Wash Buffer ile yıkama yapılır.(son yıkamadan sonra kurula)
9	100µl TMB eklenir ve 1dk shaker'da çalkalanır.
10	Oda Sıcaklığında 10-30dk inkübasyon (Folyo ile plate sarılır,işıktan koru)
11	100µl Stop Buffer eklenir.
12	450nm'de hemen okunur.

2.3.21.3 Siklosporin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi

Testin prensibi: Yarışmalı enzim bağlama immünotest tekniğine dayalı ELISA metodudur. Kuyucuklar siklosporin antikorı ile kaplıdır. Reaksiyon sırasında örnekteki veya standarttaki siklosporin biotin ile işaretli siklosporin ile yarışır.

Çalışmalarımız sırasında siklosporin tayini için takip edilen adımlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Siklosporin Tayini için Kullanılan ELISA Yöntemi

SİKLOSPORİN ELISA	
1	Dilüe standart, blank, sample 50 µl eklenir.
2	50 µl Detection Reagent A eklenir. Plate sealer ile kaplanır.
3	1 saat 37°C'de inkübasyona bırakılır.
4	3 defa 400 µl 1X wash buffer ile yıkanır. Her yıkama aşamasında 1-2 dk beklenir.
5	100 µl Detection Reagent B eklenir. Plate sealer ile kaplanır.
6	45 dk 37°C'de inkübasyona bırakılır.
7	5 defa 400 µl ile 1X wash buffer ile yıkanır. Her yıkama aşamasında 1-2 dk beklenir.
8	90 µl Substrate Solution (TMB) eklenir. Yeni sealer ile kaplanır.
9	15-30 dk 37°C'de karanlıkta inkübasyona bırakılır. (30 dk'nın aşılması gerekir.)
10	50 µl Stop Solution eklenir. (sarı renk meydana gelir)
11	450 nm de okuma yapılır.

2.4. İmmobilizasyon sonrası antikor aranması

İmmobilizasyon işlemi sonrası toplanan yıkama suları elektroforeze tabi tutulmadan önce biriktirilip liyafilizatörde fazla suları uzaklaştırıldı ve geriye kalan kuru kısım dilüe edilerek SDS-PAGE elektroforezi işlemine tabi tutuldu. Daha sonra Western Blotting yöntemi kullanılarak daha az miktarda olabileceği düşünülen antikorlar tespit edilmeye çalışıldı.

2.5. SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Kullanılan Çözeltiler

1. Tris çözeltisi (1.5 M , pH:8.8)
2. Tris-HCl Çözeltisi (1 M , pH : 6.8)
3. SDS çözeltisi (Sodyum dodesil sülfonat) (%10 g)
4. Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi ((30g/0.8g)/dL)
5. Amonyum persülfat çözeltisi (%10 g , taze hazırlanıp kullanıldı.)
6. TEMED (orjinal şişeden alınarak kullanıldı.)
7. Gliserin
8. 2-Merkaptoetanol (Orjinal şişeden alınarak kullanıldı.)
9. Bromfenol blue çözeltisi (%1 g).
10. Boyama çözeltisi ; 2,5 g Commasie Brilliant Blue , 454 mL distile su içinde çözüldü.Üzerine 454 mL metanol ve 92 mL glasiyal asetik asit ilave edildi. İyice karıştırıldı.Koyu renkli şişede ağzı sıkıca kapatılarak saklandı.
11. Boya çıkarma çözeltisi:Asetik asit çözeltisi (%10 g) (v/v)
12. PAGE tamponu; 3g Tris,15g glisin ve 1g SDS ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra karıştırıldı.
Hacim 1000 mL' ye tamamlandı(1 g SDS yerine %10 g SDS çözeltisinden 10 mL alınabilir).

13. PAGE yükleme tamponu

1M Tris çözeltisi (pH:6,8)	1	mL
Gliserin	1.6	mL
%10 g SDS çözeltisi	2	mL
2-merkaptoetanol	0.4	mL
Distile su	8	mL

karıştırılarak hazırlandı (uzun süre dayanır).

2.5.1. SDS-PAGE için jellerin hazırlanması

SDS-PAGE için jellerin hazırlanması sırasında alt ve üst jelin hazırlanması sırasında izlediğimiz işlem sırası Tablo 7 ve Tablo 8 de gösterilmiştir

Tablo 7. SDS-PAGE Alt jel Hazırlanması

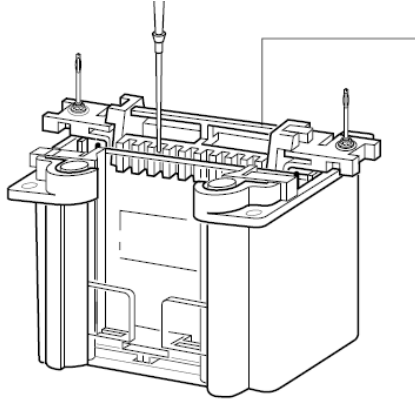
	Alt Jel (%10'luk)	4 JEL	2 JEL
1	Distile Su	12,1 ml	6,05 ml
2	1,5 M Tris Çözeltisi	7,5 ml	3,75 ml
3	Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi 30g/0,8g -dl	10 ml	5 ml
4	Amonyum Persülfat Çözeltisi-%10'luk	0,1 ml	0,05 ml
5	SDS çözeltisi - %10'luk	0,3 ml	0,15 ml
6	TEMED	0,05 ml	0,05 ml

Tablo 8. SDS-PAGEÜst Jel Hazırlanması

	Üst Jel (%4,5'luk)	4 JEL	2 JEL
1	Distile Su	7,5 ml	3,75 ml
2	1 M Tris Çözeltisi	1,25 ml	0,625 ml
3	Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi 30g/0,8g	1,5 ml	0,75 ml
4	Amonyum Persülfat Çözeltisi-%10'luk	0,1 ml	0,05 ml
5	SDS çözeltisi - %10'luk	0,1 ml	0,05 ml
6	TEMED	0,05 ml	0,05 ml

2.5.2. PAGE için numunelerin hazırlanması

Her numune PAGE yükleme tamponu ile karıştırıldı. 5 dakika 90-100⁰C'da ısıtıldı. Soğuması beklendi. Bu şekilde denatüre edilen antikorörnekleri kuyulara tatbik edildi (Şekil 21).



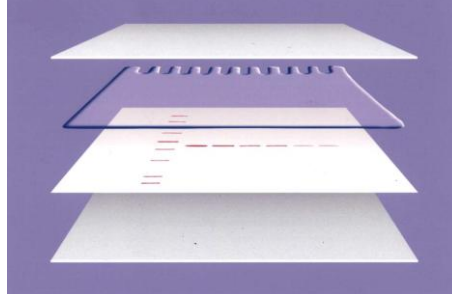
Şekil 21. Numunelerin slab jele yüklenmesi

Bir slab jel başına 30 mA'lık akım uygulandı. Boya jelin alt kısmına 0,5-1cm yaklaşıncaya kadar elektroforeze devam edildi.. Elektroforez tamamlanınca içindeki jeller bir spatül yardımı ile alınarak boyama çözeltisinde 15-20 dakika bekletildi. Daha sonra boya çıkarma çözeltisine alındı. Bir gece veya daha fazla tutularak protein bandlarının iyice belirginleştirilmesi sağlandı.

2.6. Western Blotting İşlemi

Çalışmamızda modifiye Western Blotting yöntemini kullanıldı. Western blot analizi yönteminde Towbin vd., (1979) çalışması referans alınmıştır. İmmüno sorbent yüzey hazırlamak için kullandığımız antikorlar Western blotting işleminde kullanılan primer antikor olduğu için primer antikor ile inkübasyon aşaması atlanarak diğer aşamalarda değişiklik yapılmadan yöneme devam edilmiştir.

- 1- SDS-PAGE' den sonra antikor transfer solüsyonu içerisinde PVDF membrana aktif olarak 25V' da 30 dakika süresince transfer edilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Western Blot membrana transfer işlemi

<http://cdn.rasayanika.com/wp-content/uploads/2014/03/imgres-1.jpeg>

- 2- Transfer tamamlandıktan sonra membran TBST (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, %0.05 Tween 20) ile 3 kez yıkanmıştır
- 3- %3 süttozu içeren TBST ile oda sıcaklığında 1,5 saat bloke edilmiştir.
- 4- 4 kez TBST ile yıkandıktan sonra sekonder antikor olarak fluoksetin, kotinin ve siklosporin antikorlarının kaynağına spesifik horse radish peroksidaz enzimi ile (Thermo Scientific Rockford, IL, USA) ile 1:3000 dilüsyonunda bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
- 5- Sekonder antikor sonrası membran 4 kez TBST ile yıkanmıştır. Membran SuperSignal West Pico Substrate kiti (Pierce) ile üreticinin direktiflerine göre boyanmıştır.

Görüntüleme Biorad 1708280EM ChemiDoc MP sistemi ile Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi , Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır.

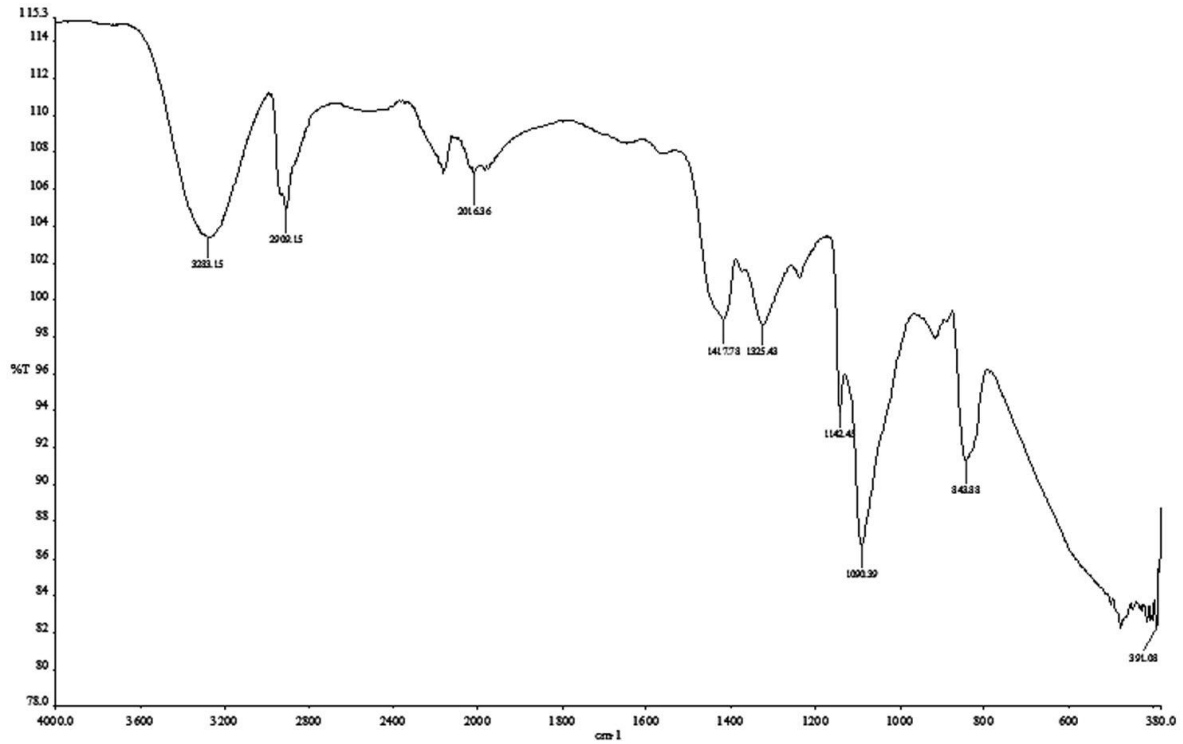
2.7 İstatiksel Analiz

Graph Pad 6.0 paket programı kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Anova varyans analizi, student "t" testi, Kruskal-Wallis testi, Dunntesti uygulandı. Grupların toplam deneme sayısı 30'dan az ise değerlendirmelerde non parametrik testler, 30'dan fazla ise parametrik testler kullanıldı.

3. BULGULAR

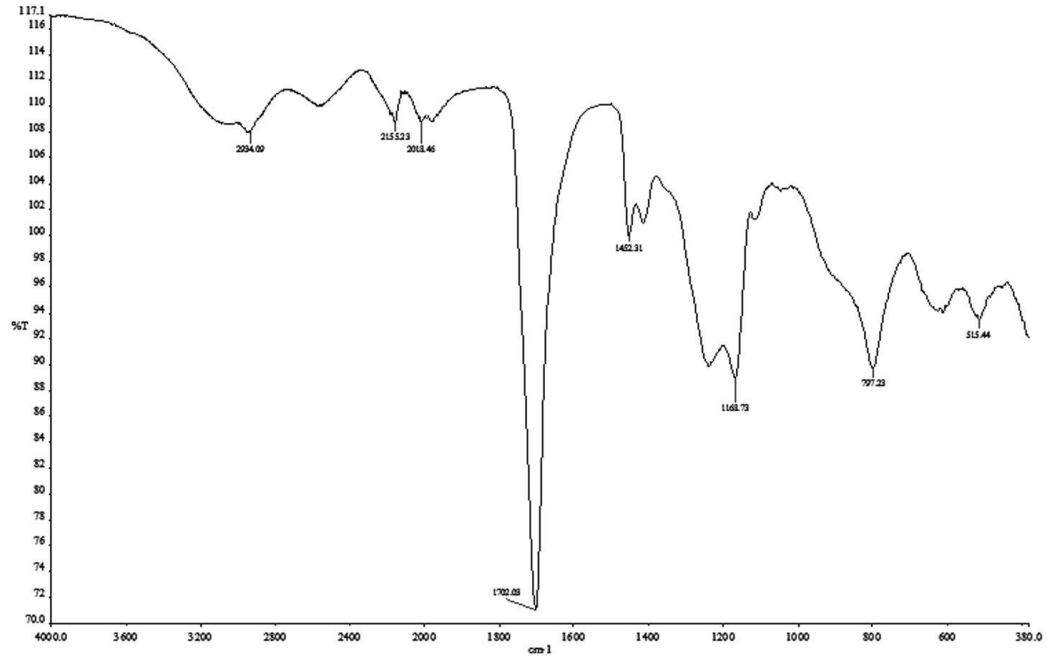
3.1 NanofiberlerinYapısal Karakterizasyonu

FourierTransform Infrared spektroskopi (FT-IR) tekniği kullanılarak tüm nanofiberlerin yapısal karakterizasyonu gerçekleştirildi. PVA çözeltisine ait FT-IR spektrumu (Şekil 23) incelendiğinde 3233 cm^{-1} ve 1090 cm^{-1} de PVA ana zincirine bağlı hidroksil (-OH) gruplarının absorpsiyon bantları ve 2902 cm^{-1} ve 1417 cm^{-1} de alkil gruplarına ait -CH gerilmeleri görülmektedir.



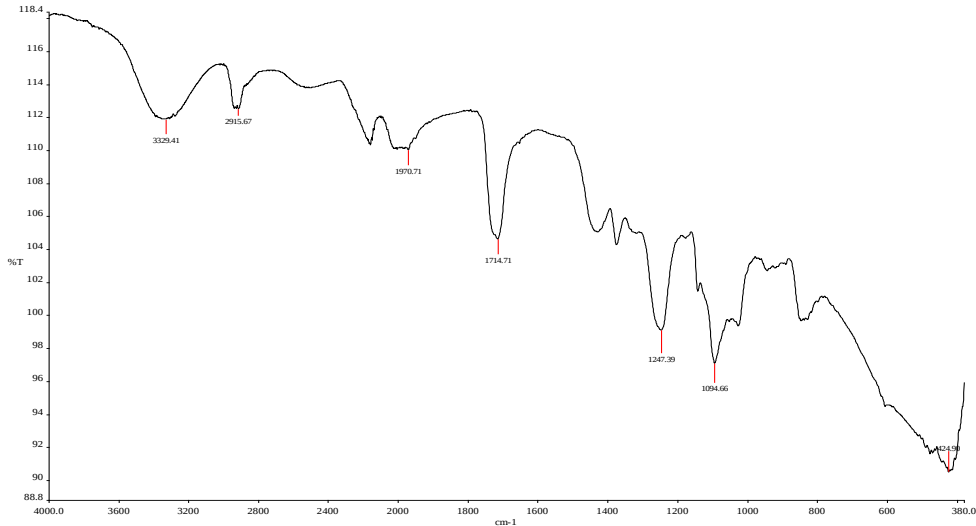
Şekil 23. PVA polimerinin FT-IR spektrumu

PAA polimerinin FT-IR spektrumu (Şekil 23) incelendiğinde 1702 cm^{-1} de karbonil grubunun (C=O) keskin absorpsiyon bandı ve $3400\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ arasındaki bölgede PAA yapısında hidroksil (-OH) grubuna ait gerilme bandı görülmektedir (Şekil 24)



Şekil 24. PAA polimerinin FT-IR spektrumu

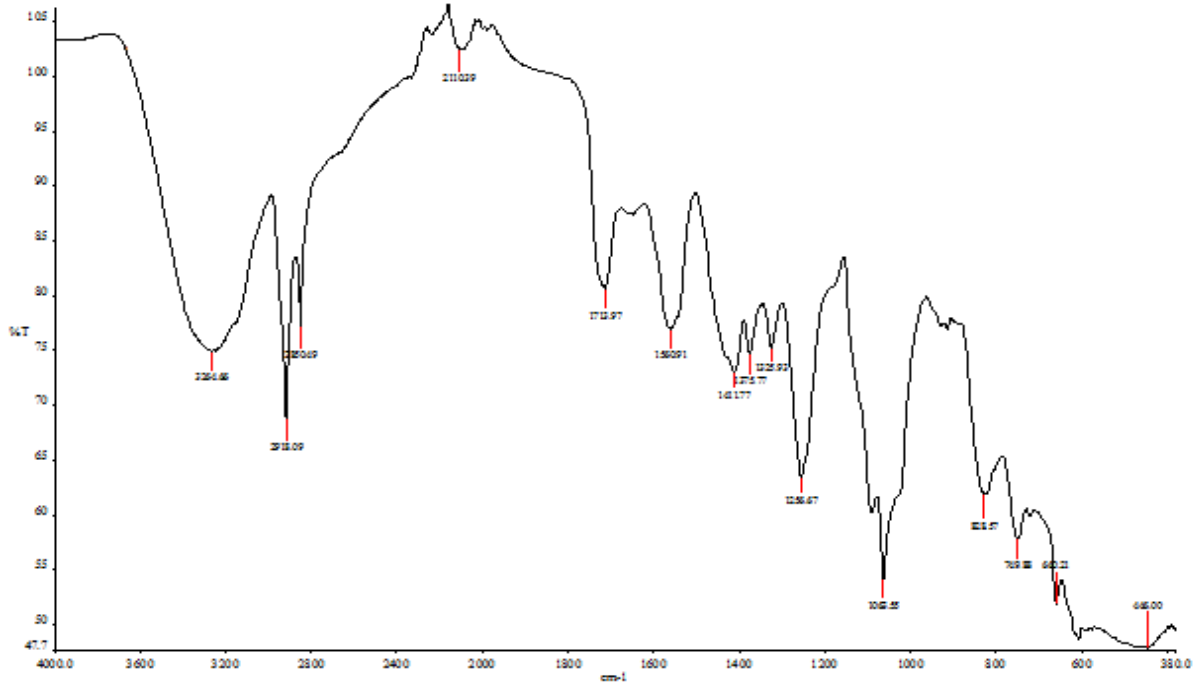
Termal olarak işlem görmüş fiberlerin FT-IR spektrumu (Şekil 25) incelendiğinde, esterleşme öncesinde yapıda bulunan hidroksil gruplarının güçlü moleküller arası hidrojen bağından dolayı $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ de hidroksil absorpsiyonu gözlenmektedir. Ayrıca 1714 cm^{-1} de gözlenen ester yapısına ait karbonil titreşim bandı, $1100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ arasında C-O ve C-O-C gerilmeleri görülmektedir (Arndt vd., 1999).



Şekil 25. Termal işlem uygulanmış nanofiberin esterleşme sonrasındaki FT-IR spektrumu

CDI ile aktifleştirilmiş nanofiber yüzeylerinin Şekil 26 deki FT-IR spektrumu incelendiğinde, imidazol halkasına ait 1610 cm^{-1} de oluşan yeni C=N bandı ve

1560 cm^{-1} de C=C bandı gözlenmektedir. Aynı zamanda 1713 cm^{-1} poliakrilikasitin (PAA) karbonil gruplarıyla çakışık yeni imidazol halkasına ait karbonil gerilmesi görülmektedir. C=O düzlem dışı eğilme piki ise 769 cm^{-1} de gözlenmiştir.



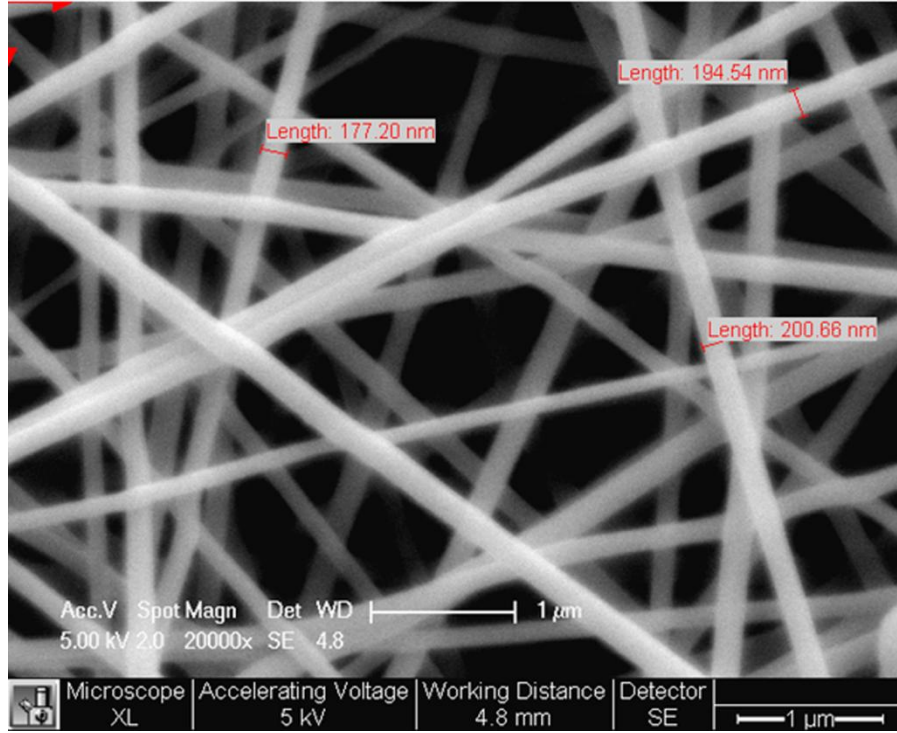
Şekil 26. CDI ile aktifleştirilmiş çapraz bağlı nanofiber FT-IR spektrumu

3.2 Nanofiberlerin Morfolojik Karakterizasyonu

Tüm nanofiberlerin morfolojik incelemeleri Görüntülü Elektron Mikroskopisi (SEM) ile gerçekleştirildi.

3.2.1 Birinci Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu

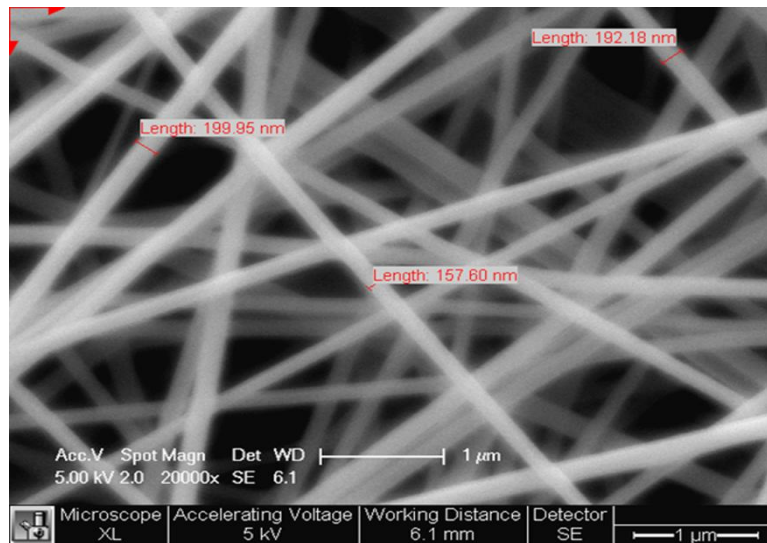
Nanofiberlerin SEM görüntüsü (Şekil 27) incelendiğinde, PVA-PAA çözeltisinden elektrospinning yöntemiyle ortalama 190 nm çapında, düzgün yapıda ve boncuksuz morfolojiye sahip nanofiberler elde edildiği görülmektedir.



Şekil 27. 190 nm fiber çapına sahip birinci seri nanofiber SEM görüntüsü

3.2.2 İkinci Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu

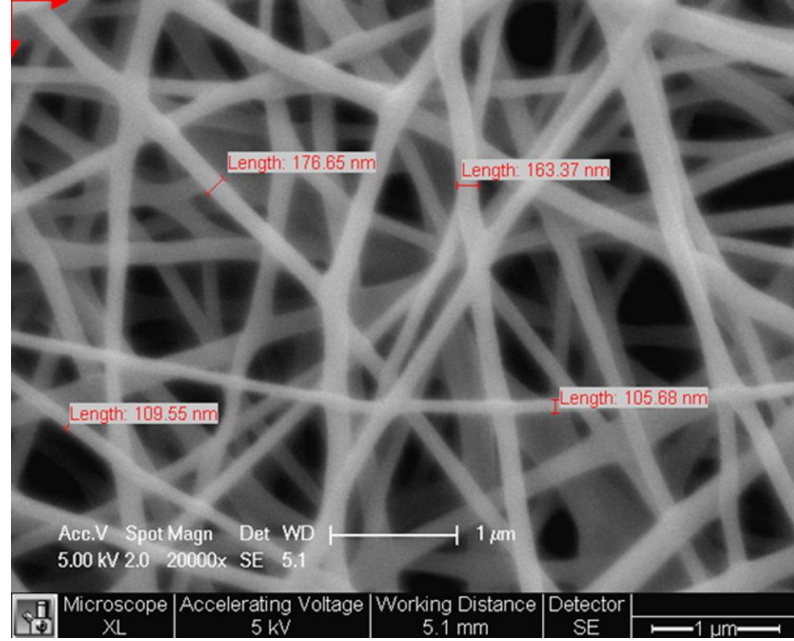
Nanofiberlerin SEM görüntüsü (Şekil 28) incelendiğinde, ortalama 180 nm boyutlarına sahip, düzgün dağılımlı ve boncuksuz bir morfoloji sergilediği görülmektedir.



Şekil 28. İkinci seri nanofiberlere ait SEM görüntüsü

3.2.3 Üçüncü Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu

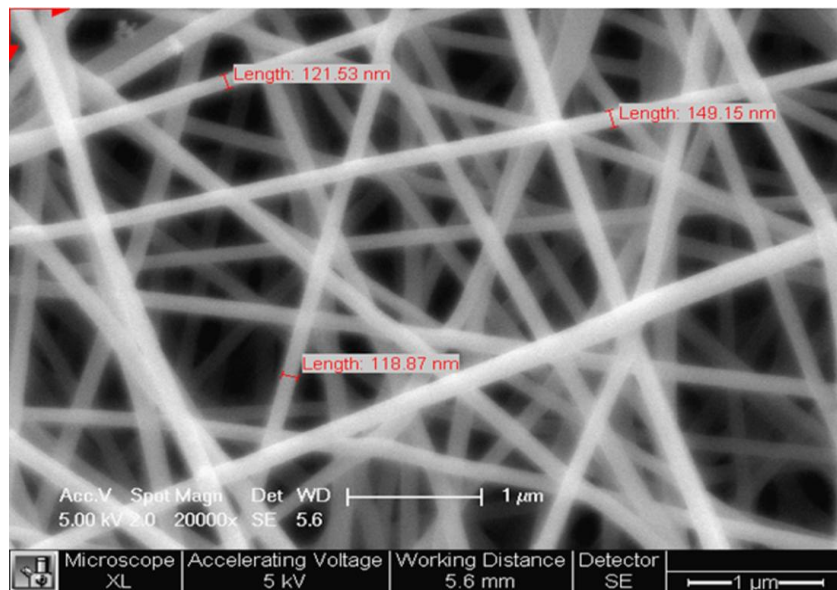
Ortalama 150 nm boyutlarına sahip, düzgün dağılımlı ve boncuksuz bir morfoloji sahip üçüncü seri nanofiberlerin SEM görüntüsü Şekil 29 'de yer almaktadır.



Şekil 29. Ortalama 150 nm fiber çapına sahip nanofiberler

3.2.4 Dördüncü Seri Nanofiberlerin Karakterizasyonu

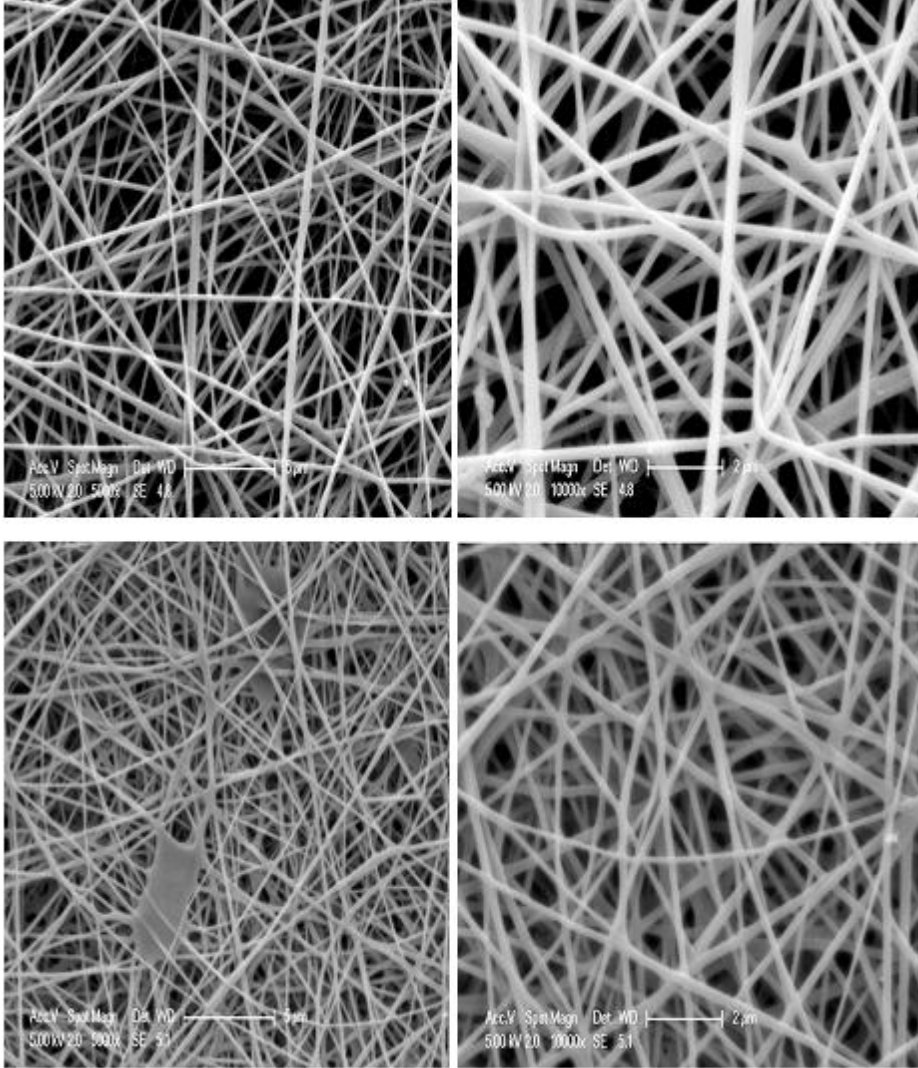
Dördüncü seri nanofiberlerin ortalama 130 nm çapında, düzgün dağılımlı ve boncuklanma göstermeyen bir morfolojiye sahip olduğu görülmektedir. (Şekil 30)



Şekil 30. Dördüncü seri nanofiber SEM görüntüsü

3.2.5 Termal Olarak Çapraz Bağlı Nanofiberler

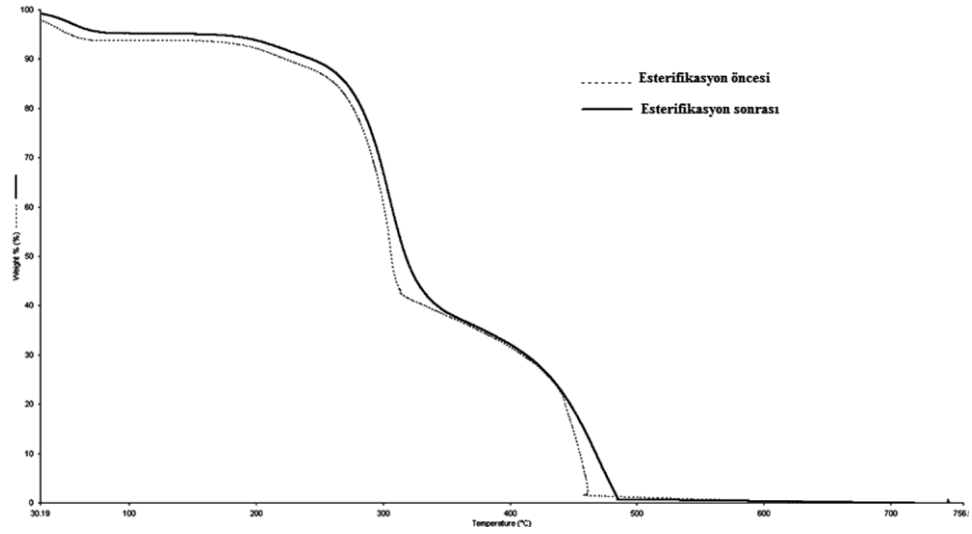
100 ve 140 °C'de gerçekleştirilen termal esterifikasyon reaksiyonu sonucunda nanofiberlerin birbirleriyle çapraz bağlanarak çapraz bağlı ağ yapı oluşturdıkları SEM görüntüsünden gözlenmektedir (Şekil 31).



Şekil 31. Çapraz bağlanmış nanofiberlerin SEM görüntüleri

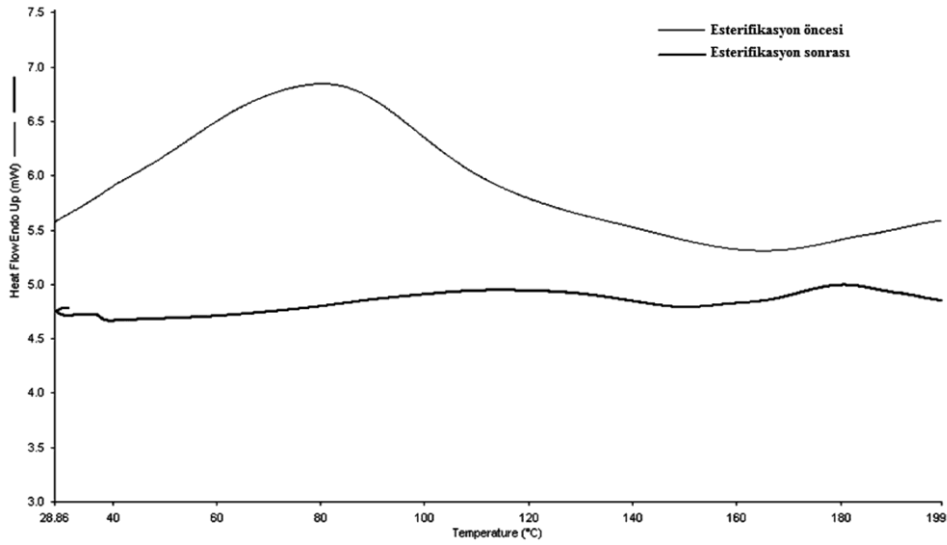
3.3 Nanofiberlerin Termal Karakterizasyonu

Termal işlem öncesinde ve sonrasında nanofiberlerin çakışık TGA termogramları Şekil 3.10'da yer almaktadır. Termogramda, 3 ana kütle kaybı gözlenmektedir (Chirwodza ve Sanderson, 2010). 100 °C altında gözlenen kütle kayıpları yapı bulunan nemin uzaklaşmasıyla, diğer kütle kayıplarının ise polimer ana zincirlerinin degradasyonundan meydana geldiği düşünülmektedir. Termal işlemin nanofiber yapısının termal kararlılığını arttığı TGA termogramından net bir şekilde gözlenmektedir.



Şekil 32. Termal işlem öncesinde ve sonrasında nanofiberlerin çakışık TGA termogramları

Nanofiberlerin esterifikasyon öncesinde ve sonrasında çakışık DSC termogramlarından, esterifikasyon sonrasında çapraz bağlı PVA-PAA nanofiberinin daha yüksek T_g değerine sahip olduğu görülmektedir (Şekil 32).



Şekil 33. Nanofiberlerin çakışık DSC grafikleri

Nanofiberlerin TGA ve DSC sonuçlarından, PVA ve PAA zincirlerinin birbirleriyle çapraz bağlanmaları sonucunda termal kararlılığının arttığı görülmektedir (Şekil 33).

3.4 PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin, norfluoksetin antikoru immobilize edilmiş CPG üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

25, 50, 75, 100 ve 150 ng/mL konsantrasyonlarında PBS, inek sütü ve anne sütüne eklenen fluoksetinin CPG yüzeyine bağlanma verimleri Tablo 9 da gösterilmiştir.

PBS'e eklenen 25 ng/mL fluoksetinin CPG'ye bağlanma verimi 50 ve 75 ng/ mL fluoksetin içeren PBS'e göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 9).

İnek sütüne eklenen 75 ng/mL fluoksetinin CPG'ye bağlanma verimleri 100 ng/mL fluoksetin içeren PBS'e göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 9).

Anne sütüne eklenen 50 ng/mL fluoksetinin CPG'ye bağlanma verimleri 75 ve 150 ng/mL fluoksetin içeren PBS'e göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 9)

Tablo 9. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

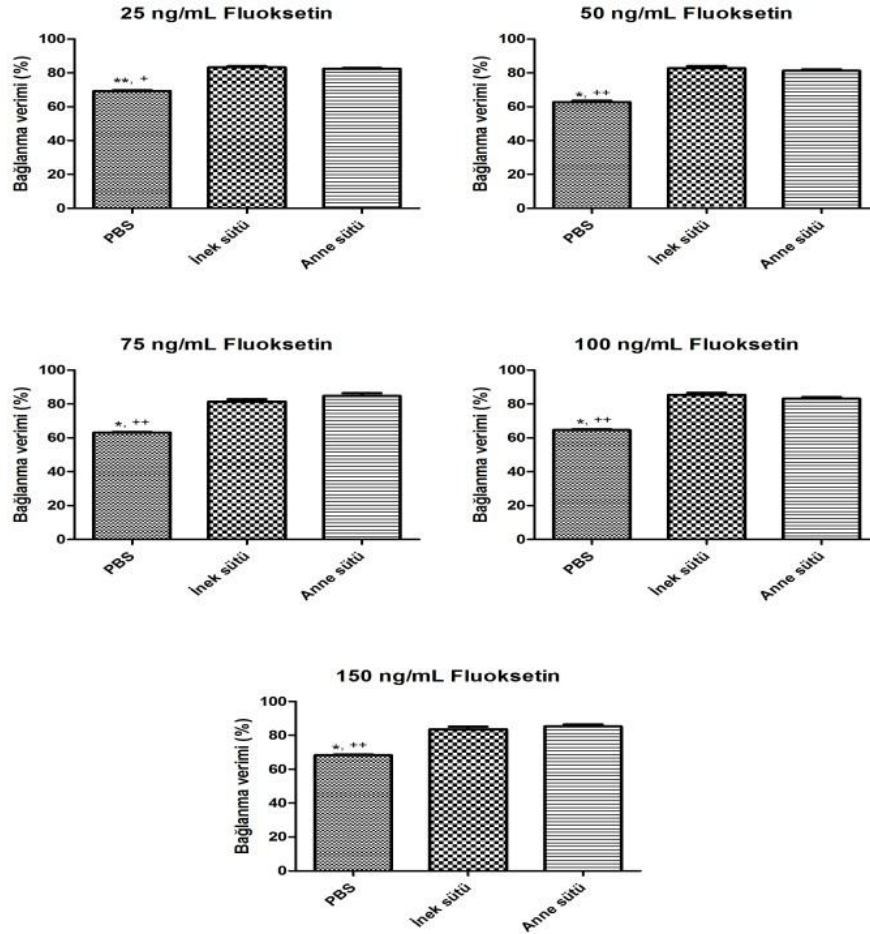
Fluoksetin	25 ng/mL Ort SD	50 ng/mL Ort SD	75 ng/mL Ort SD	100ng/ ml Ort SD	150 ng/mL Ort SD	p değeri
PBS	69.30 0.41 $\Delta\Delta\Delta, *$	62.70 0.83	63.14 0.33	64.60 0.47	68.30 0.37	0.0002
İnek sütü	83.20 0.77	82.70 1.30	81.40 1.40 **	85.30 1.21	83.60 1.52	0.0112
Anne sütü	82.40 0.49	81.20 0.87 *, ++	84.80 1.58	83.10 0.97	85.30 1.13	0.0009

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. PBS: FosfatTampon

*: p<0.05, 75 ng/mL ile karşılaştırma **: p<0.01, 100 ng/mL ile karşılaştırma

++: p<0.01, 150 ng/mL ile karşılaştırma $\Delta\Delta\Delta$: p<0.001, 50 ng/mL ile karşılaştırma

Şekil 34'de görüldüğü üzere en düşük verim ile CPG'ye bağlanma PBS'e eklenen fluoksetin örneklerinde gözlenmiştir.



Şekil 34. Farklı konsantrasyonlardaki fluoksetinin CPG'ye PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

3.5 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin, norfluoksetin antikoru immobilize edilmiş nanofiber üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

25, 50, 75, 100 ve 150 ng/mL konsantrasyonlarında PBS, inek sütü ve anne sütüne eklenen fluoksetinin nanofibere bağlanma verimleri Tablo 10 gösterilmiştir.

PBS'e eklenen 25 ng/mL fluoksetinin nanofibere bağlanma verimleri 150 ng/ mL

fluoksetin içeren PBS'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Yine 50 ng/mL fluoksetin içeren PBS örneklerindeki fluoksetinin nanofibere bağlanma verimi 100 ve 150 ng/mL fluoksetin içeren PBS'ye göre istatistiksel anlamlı düşük bulunmuştur. (Tablo 10).

İnek sütüne eklenen 25 ng/mL fluoksetinin nanofibere bağlanma verimleri 100 ve 150 ng/mL fluoksetin içeren inek sütüne göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Yine 50 ng/mL fluoksetin içeren inek sütündeki fluoksetinin nanofibere bağlanma verimi 100 ve 150 ng/mL fluoksetin içeren inek sütüne göre anlamlı düşük bulunmuştur (Tablo 10).

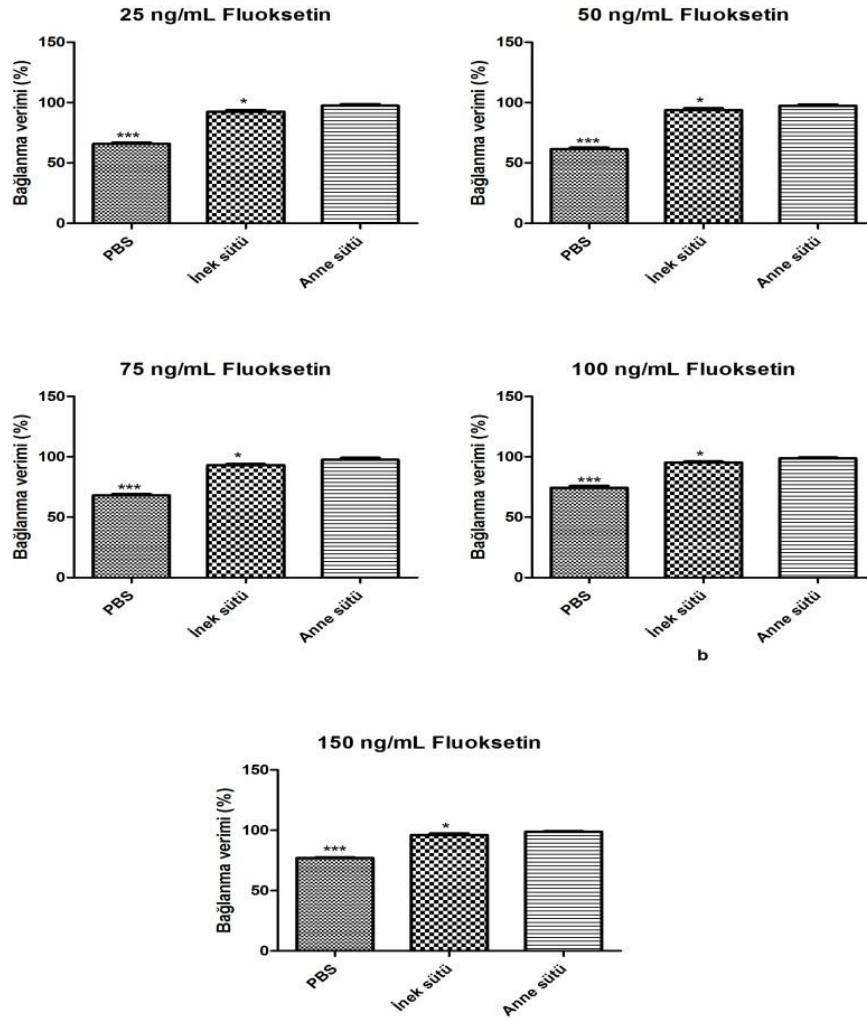
Anne sütüne eklenen fluoksetin örneklerinin nanofibere bağlanma verimleri aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 10).

Tablo 10. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin nanofiber bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Fluoksetin	25 ng/mL Ort SD	50 ng/mL Ort SD	75 ng/mL Ort SD	100ng/ ml Ort SD	150 ng/mL Ort SD	P değeri
PBS	65.80 1.09 +	61.40 1.27 **, ***	68.20 0.84	74.30 1.58	76.90 0.82	0.0001
İneksütü	92.40 1.40 ***, ***	93.70 1.61 ++	93.10 0.79 *, ***	95.20 0.98	96.10 1.29	0.0001
Anne sütü	97.60 1.12	97.36 1.06	97.60 1.58	98.70 0.74	98.70 0.62	0.0112

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. PBS: FosfatTampon
+ : p<0.05, ++ : p<0.01, +++, 150 ng/mL ile karşılaştırma * p<0.05, ** : p<0.01, 100 ng/mL ile karşılaştırma

Şekil 35'de görüldüğü üzere en düşük verim ile nanofibere bağlanma PBS'e eklenen fluoksetin örneklerinde gözlenmiştir. En yüksek verim ile nanofibere bağlanma ise tüm fluoksetin konsantrasyonlarında anne sütü içerisinde olmuştur.



Şekil 35. Farklı konsantrasyonlardaki fluoksetinin nanofibere PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

3.6 PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 11'de belirtilmiştir. Tablo 11'e göre PBS içerisindeki fluoksetinin 25 ve 50 ng/mL dışındaki diğer konsantrasyonlarda nanofibere CPG'ye göre anlamlı derecede daha yüksek verim ile bağlandığı görülmektedir. 25 ng/mL fluoksetin CPG'ye nanofibere göre anlamlı derecede yüksek verimle bağlanmıştır. 50 ng/mL fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanmaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 11. PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Fluoksetin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		P değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
25	69.30	0.41	65.80	1.09	0.079
50	62.70	0.83	61.40	1.27	NS
75	63.14	0.33	68.20	0.84	0.012
100	64.60	0.47	74.30	1.58	0.012
150	68.30	0.37	76.90	0.82	0.012

Sonuçlar Ortalama (Ort)

ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

3.7 İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 12’de belirtilmiştir.

Tablo 12. İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere

bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Fluoksetin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		p değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
25	83.20	0.77	92.40	1.40	0.0016
50	82.70	1.30	93.70	1.61	0.0016
75	81.40	1.40	93.10	0.79	0.0043
100	85.30	1.21	95.20	0.98	0.0043
150	83.60	1.52	96.10	1.29	0.0016

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

Tablo 12 'ye göre inek sütündeki fluoksetin tüm konsantrasyonlarında nanofibere daha yüksek verim ile bağlanmıştır.

3.8 Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 13’de belirtilmiştir.

Tablo 13. Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen fluoksetinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Fluoksetin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		p değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
25	82.40	0.49	97.60	1.12	0.0027
50	81.20	0.87	97.36	1.06	0.0027
75	84.80	1.58	97.60	1.58	0.0027
100	83.10	0.97	98.70	0.74	0.0026
150	85.30	1.13	98.70	0.62	0.0026

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

Tablo 13 ‘e göre anne sütündeki fluoksetin tüm konsantrasyonlarında nanofibere daha yüksek verim ile bağlanmıştır.

3.9 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin, kotinin antikoru immobilize edilmiş CPG'ye bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarında PBS, inek sütü ve anne sütüne eklenen kotinin CPG'ye bağlanma verimleri Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG'ye bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Kotinin	10 ng/mL		25 ng/mL		50 ng/mL		100ng/ ml		p değeri
	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
PBS	57.00 Δ , **	1.28	61.60	0.41	62.40	0.71	65.70	0.74	0.0005
İneksütü	80.40 ***	0.62	84.42	1.16	82.00 *	0.84	87.50	0.88	0.0006
Anne sütü	81.20 **	0.78	85.10	1.13	84.30	1.26	86.40	0.92	0.0032

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. PBS: FosfatTampon

Δ : p< 0.05 50 ng/mL ile karşılaştırma ** : p<0.01, +++, 100 ng/mL ile karşılaştırma

*** : p<0.001 100 ng/mL ile karşılaştırma

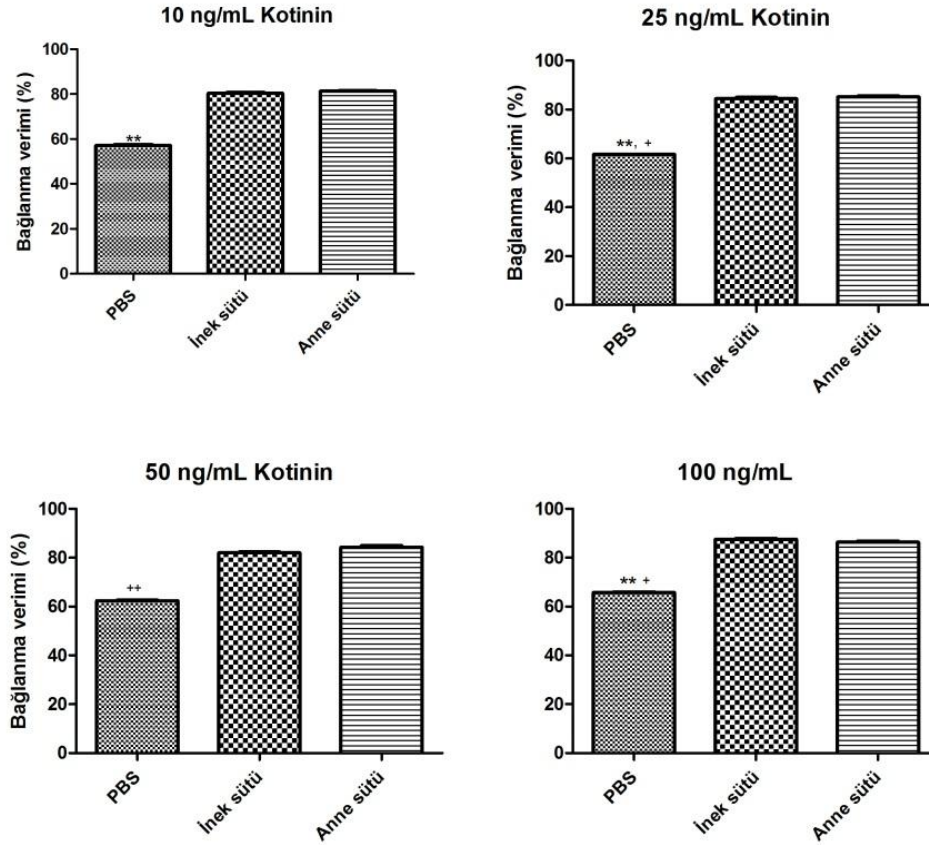
PBS'e eklenen 10 ng/mL kotinin nanofibere bağlanma verimi 50 ve 100 ng/ mL kotinin içeren PBS'e göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 14).

İnek sütüne eklenen 10 ng/mL kotininin nanofibere bağlanma verimi 100 ng/mL kotinin içeren PBS'e göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 14).

Anne sütüne eklenen kotinin miktarları karşılaştırıldığında en yüksek verim ile nanofibere bağlanma 100 ng/mL kotininde olmuştur. PBS'e eklenen 10 ng/mL kotininin nanofibere bağlanma verimleri 100 ng/mL kotinin içeren PBS'e göre

anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 14).

Şekil 36' de görüldüğü üzere en düşük verim ile CPG'ye bağlanma PBS'e eklenen kotinin örneklerinde gözlenmiştir



Şekil 36. Farklı konsantrasyonlardaki kotininin CPG'ye PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

3.10 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin, kotinin antikoru immobilize edilmiş nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

10, 25, 50 ve 100 ng/mL konsantrasyonlarında PBS, inek sütü ve anne sütüne eklenen kotinin nanofibere bağlanma verimleri Tablo 15'de gösterilmiştir.

Tablo 15. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Kotinin	10 ng/mL		25 ng/mL		50 ng/mL		100ng/ ml		p değeri
	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
PBS	71.38 Δ , **	1.39	78.50	1.05	82.50	0.71	83.40	0.92	0.0008
İneksütü	88.20 $\Delta\Delta\Delta$, ***	0.76	87.30 $\Delta\Delta\Delta$, ***	1.12	94.10	1.07	94.60	1.13	0.0001
Anne sütü	91.20 $\Delta\Delta$, ***	2.13	93.10	2.86	95.70	2.28	96.20	3.22	0.0004

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. PBS: FosfatTampon

Δ : p<0.05, $\Delta\Delta$: p<0.01 $\Delta\Delta\Delta$: p<0.001, 50 ng/mL ile karşılaştırma

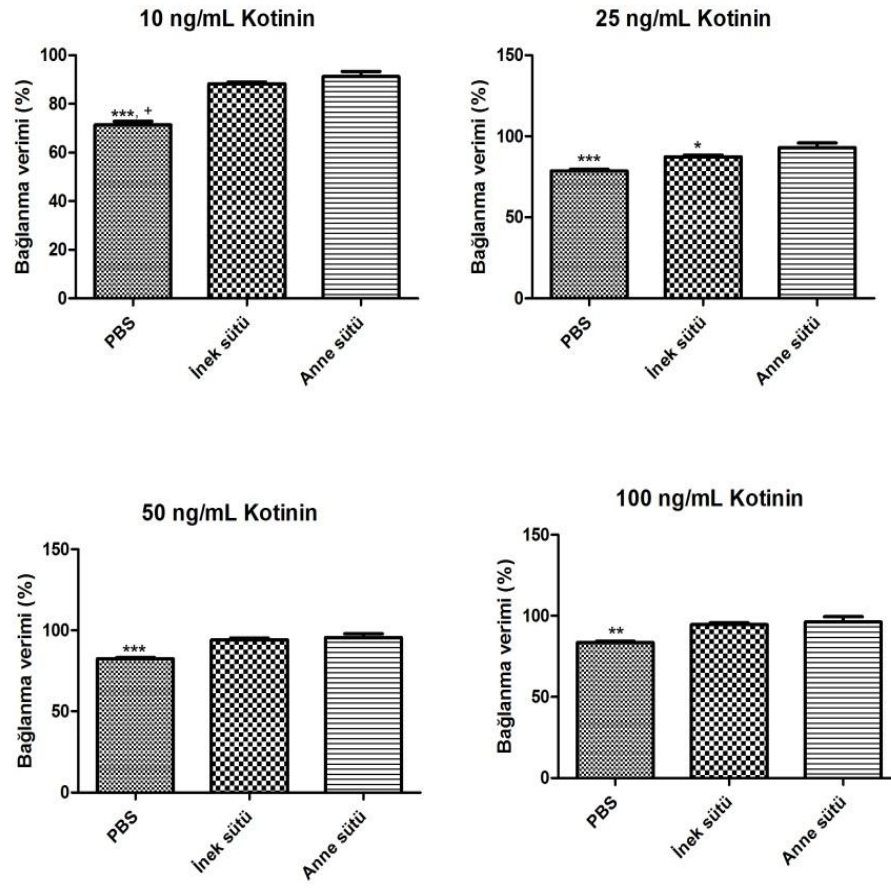
** : p<0.01 *** : p<0.01, 100 ng/mL ile karşılaştırma

PBS'e eklenen 10 ng/mL kotinin nanofibere bağlanma verimi 50 ve 100 ng/ mL kotinin içeren PBS'e göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Tablo 15).

PBS'e eklenen 10 ve 25 ng/mL kotinin nanofibere bağlanma verimleri 50 ve 100 ng/mL kotinin içeren PBS'e göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 15).

PBS'e eklenen 10 ng/mL kotininin nanofibere bağlanma verimleri 50 ve 100 ng/mL kotinin içeren PBS'e göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 15).

Şekil 37'da görüldüğü üzere en düşük verim ile nanofibere bağlanma PBS'e eklenen kotinin örneklerinde gözlenmiştir



Şekil 37. Farklı konsantrasyonlardaki kotininin nanofibere PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

3.11 PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 16'da belirtilmiştir. Tablo 16'ya göre PBS'e eklenen 10, 25, 50, 100 ng/mL kotininin CPG ve nanofibere bağlanmaları karşılaştırıldığında kotininin nanofibere anlamlı derecede yüksek verim ile bağlandığı tespit edilmiştir.

Tablo 16. PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen kotinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Kotinin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		P değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
10	57.00	1.28	71.38	1.39	0.0079
25	61.60	0.41	78.50	1.05	0.0075
50	62.40	0.71	82.50	0.71	0.0079
100	65.70	0.74	83.40	0.92	0.0079

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

3.12 İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 17’de belirtilmiştir. Tablo 17’ye göre PBS’e eklenen 10, 25, 50, 100 ng/mL kotininin CPG ve nanofibere bağlanmaları karşılaştırıldığında kotininin nanofibere anlamlı derecede yüksek verim ile bağlandığı tespit edilmiştir.

Tablo 17. İnek sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Kotinin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		P değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
10	80.40	0.62	88.20	0.76	0.0016
25	84.42	1.16	87.30	1.12	0.0053
50	82.00	0.84	94.10	1.07	0.0043
100	87.50	0.88	94.60	1.13	0.0016

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

3.13 Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması ile ilgili sonuçlar Tablo 18’de belirtilmiştir. Tablo 18’e göre PBS’e eklenen 10, 25, 50, 100 ng/mL kotininin CPG ve nanofibere

bağlanmaları karşılaştırıldığında kotininin nanofibere anlamlı derecede yüksek verim ile bağlandığı tespit edilmiştir.

Tablo18.Anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen kotininin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Kotinin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		P değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
10	81.20	0.78	91.20	2.13	0.0007
25	85.10	1.13	93.10	2.86	0.0007
50	84.30	1.26	95.70	2.28	0.0027
100	86.40	0.92	96.20	3.22	0.0007

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

3.14 PBS eklenen siklosporinin, siklosporin antikoru immobilize edilmiş CPG'ye bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Siklosporin antikorunun az miktarda olması ve pahalı olması nedeniyle CPG üzerine bağlanma verimleri sadece PBS içerisinde ölçülmüştür (Tablo 19).

Tablo 19 . PBS içindeki siklosporin CPG üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Siklosporin	100 ng/mL		200 ng/mL		300 ng/mL		p değeri
	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
PBS	53.70	0.91	54.30	1.81	56.10	0.95	NS

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. PBS: fosfat Tamponu

Tablo 19 'a göre PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin CPG üzerine bağlanma verimleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

3.15 PBS, İnek Sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin, siklosporin antikor immobilize edilmiş nanofiber üzerine bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

100, 200 ve 300 ng/mL konsantrasyonlarında PBS, inek sütü ve anne sütüne eklenen siklosporinin nanofibere bağlanma verimleri Tablo 20'de gösterilmiştir

Tablo 20. PBS, inek sütü ve anne sütüne farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Siklosporin	100 ng/mL		200 ng/mL		300 ng/mL		p değeri
	Ort	SD	Ort	SD	Ort	SD	
PBS	80.20	0.71	82.80	1.19	82.50	0.46	0.0092
	Δ , *						
İneksütü	91.30	1.91	91.70	0.93	90.70	1.76	NS
Anne sütü	93.10	2.02	94.70	1.92	94.00	0.70	NS

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. PBS: Fosfat Tampon
 Δ : p < 0.05 200 ng/mL ile karşılaştırma * : p < 0.05 300 ng/mL ile karşılaştırma

PBS'e eklenen 100 ng/mL siklosporinin nanofibere bağlanma verimleri 200 ve 300 ng/ mL siklosporin içeren PBS'e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur(Tablo 20).

İnek sütüne eklenen siklosporin miktarları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 20)..

Anne sütüne eklenen fluoksetin örneklerinin nanofibere bağlanma verimleri aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 20).

3.16 PBS'e farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin CPG ve nanofiberebağlanma verimlerinin karşılaştırıldığında nanofibere anlamlı derecede yüksek verimle bağlandığı tespit edilmiştir.

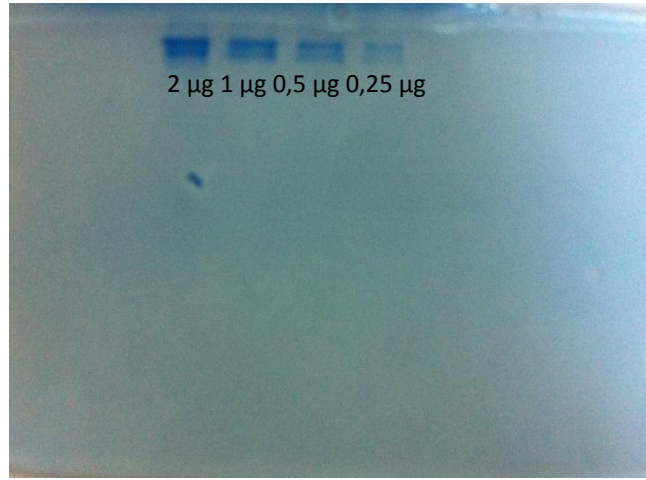
Tablo 21. PBS tamponuna farklı konsantrasyonlarda eklenen siklosporinin CPG ve nanofibere bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

Siklosporin (ng/mL)	CPG		Nanofiber		P değeri
	Ort	SD	Ort	SD	
100	53.70	0.91	80.20	0.71	0.0079
200	54.30	1.81	82.80	1.19	0.0079
300	56.10	0.95	82.50	0.46	0.0075

Sonuçlar Ortalama (Ort) ve standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. CPG: Controlled pore glass

3.17 Fluoksetin antikorlarının denatüre edilen ve edilmeyen formlarına uygulanan elektroforez işlemi

Antikorların denature ve denature olmayan halleri elektroforeze tabii tutularak görüntüleri elde edildi ve elektroforez standartı olarak kullanıldı (Şekil 38 ve Şekil 39).



Şekil 38. Denatüre edilmeyen fluoksetin antikorumun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg yüklenmiş SDS-PAGE görüntüsü

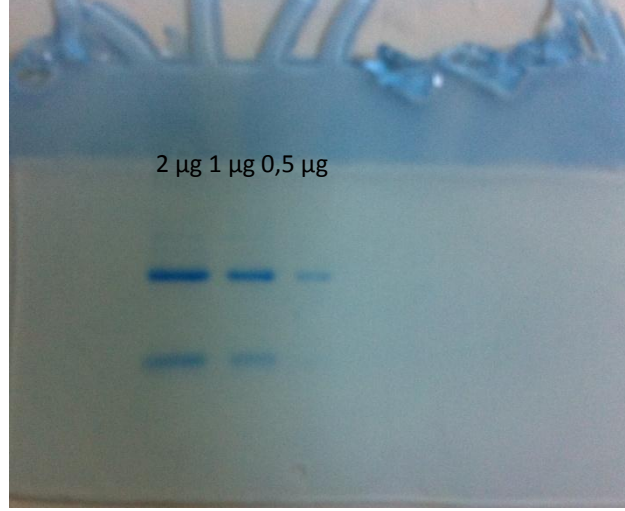
Denatüre edilen fluoksetin antikorumda 0,25 µg fluoksetin denature edilmeyene göre daha net görüldü (Şekil 38) .

Denatüre edilmiş fluoksetin antikorumna SDS-PAGE uygulandığında ise kuyucuk başına 0,5 µg yüklemeye kadar tespit edilmiştir bu miktarın altında antikor tespiti yapılamamıştır (Şekil 38).

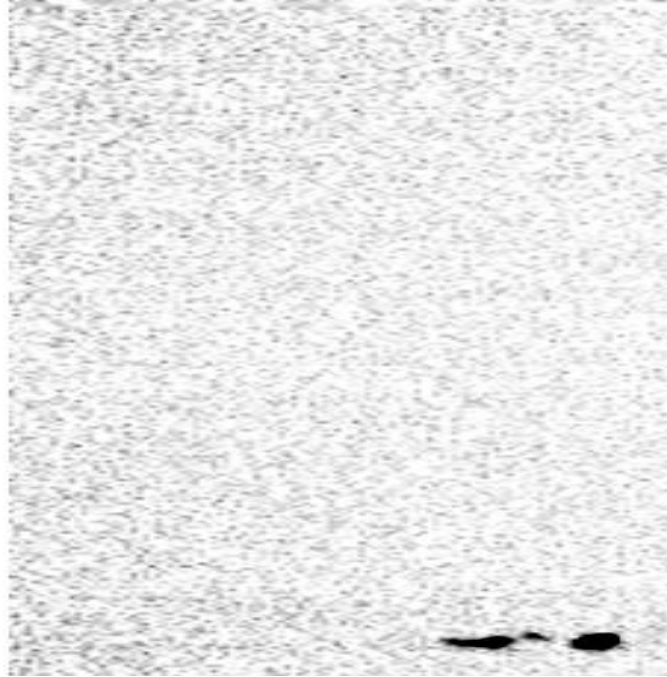
İmmobilizasyon işlemi sonrası toplanan yıkama sularında bulunabileceğini düşündüğümüz fluoksetin antikoru elektroforeze tabi tutulmadan önce yıkama suları biriktirilip liyofilizatörde fazla suları uzaklaştırıldı ve geriye kalan kuru kısım elektroforeze uygulanacak şekilde dilüe edilerek bu kısımlara elektroforez uygulandı. Elektroforez işlemi ile yıkama sularında herhangi bir fluoksetin antikoru tespit edilmedi. Dolayısıyla uyguladığımız immobilizasyon aşamasında 0.25 µg kadar bile antikor olmadığını tespit ettik. Daha az miktarda bir fluoksetin antikoru

varlığının tespiti için uyguladığımız Western blotting işlemlerinde de fluoksetin antikorunu tespit edilmemiştir (Şekil 40).

Şekil 39'da denatüre edilen fluoksetin antikorunun 4 farklı konsantrasyonda (2-1-0,5-0,25 μ g) yüklenmiş SDS-PAGE görüntüsü yer almaktadır.



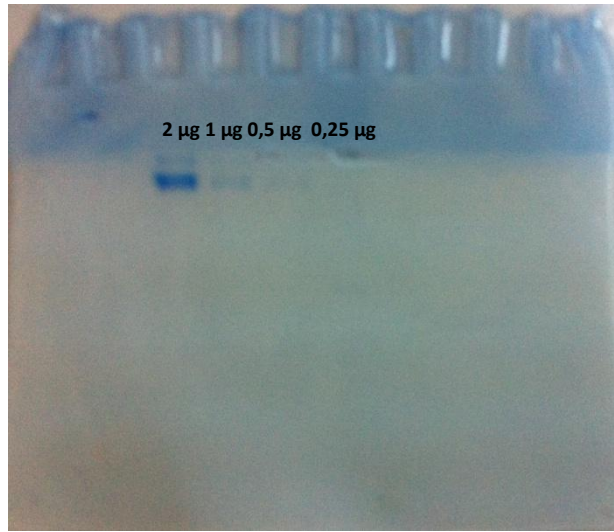
Şekil 39. Denatüre edilen fluoksetin antikorunun 3 farklı konsantrasyonda elde edilen (2-1-0,5 μ g) SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 40. Western Blotting yöntemi ile immobilizasyon yıkama sularında fluoksetin aranması

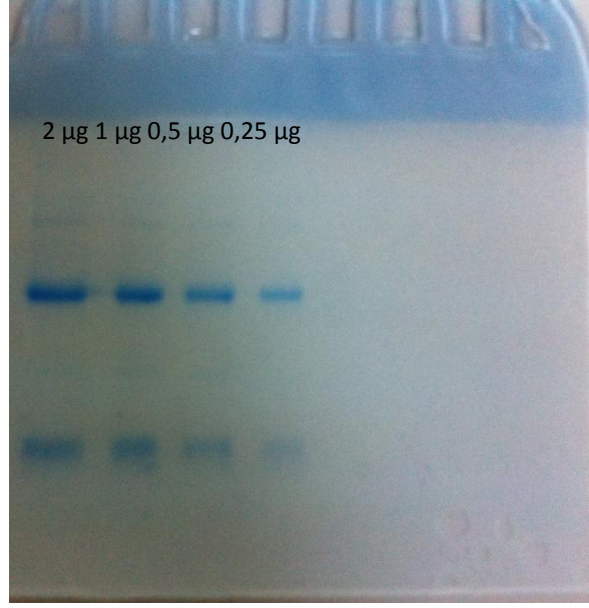
3.18 Kotinin antikorlarının denatüre edilen ve edilmeyen formlarına uygulanan elektroforez işlemi

Standardizasyon çalışmaları için kotinin antikor örneklerinin bilinen miktarları denatüre edilerek ve edilmeyerek iki ayrı şekilde elektroforez işlemi uygulandı (Şekil 41 ve Şekil 42).



Şekil 41. Denatüre edilmemiş kotinin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg olarak yüklenmiş SDS-PAGE jel görüntüsü;

Denatüre edilmeyen numunelerde 0.25 µg kotinin antikoru net olarak görülemedi.



Şekil 42. Denatüre edilen kotinin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg olarak yüklenmiş SDS-PAGE jel görüntüsü;

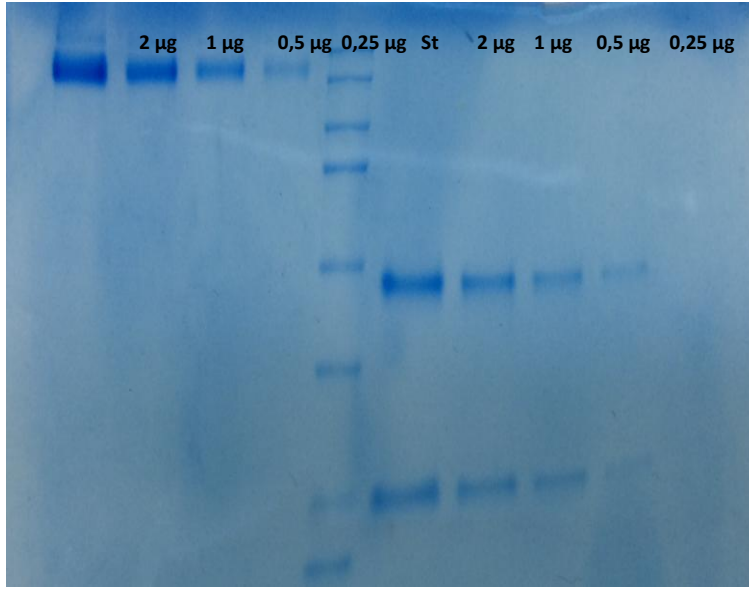
Elektroforez işlemi ile yıkama sularında herhangi bir kotinin antikoru tespit edilmedi. Dolayısıyla uyguladığımız immobilizasyon aşamasında 0.25 µg kadar bile antikor olmadığını tespit ettik. Daha az miktarda bir kotinin antikoru varlığının tespiti için uyguladığımız Western blotting işlemlerinde de kotinin antikoru tespit edilmemiştir (Şekil 43).



Şekil 43. Western Blotting yöntemi ile immobilizasyon yıkama sularında kotinin aranması

3.19 Siklosporin antikorlarının denatüre edilen ve edilmeyen formlarına uygulanan elektroforez işlemi

Standardizasyon çalışmaları için siklosporin antikor örneklerinin bilinen miktarları denatüre edilerek ve edilmeyerek iki ayrı şekilde elektroforez işlemi uygulandı (Şekil 44).



Şekil 44. Denatüre edilmiş ve edilmemiş siklosporin antikorunun kuyucuk başına 2-1-0,5-0,25 µg olarak yüklenmiş SDS-PAGE jel görüntüsü;

Elektroforez işlemi ile yıkama sularında herhangi bir siklosporin antikoru tespit edilmedi. Dolayısıyla uyguladığımız immobilizasyon aşamasında 0.25 µg kadar bile antikor olmadığını tespit ettik. Daha az miktarda bir kotinin antikoru varlığının tespiti için uyguladığımız Western blotting işlemlerinde de kotinin antikoru tespit edilmemiştir (Şekil 45).



Şekil 45. Western Blotting yöntemi ile immobilizasyon yıkama sularında siklosporin aranması

TARTIŞMA

Son yıllarda kimyasal ve biyokimyasal bileşiklerin algılanmasında kullanılan nano boyutlu malzemelerin ayarlanabilir ve birçok geliştirilebilir özelliğe sahip oldukları ispatlanmıştır. Bu nedenle nano boyutlu malzemelerin biyo-algılamada kullanılmak üzere sentezlenmesi, karakterizasyonu ve geliştirilmesi konuları en önemli araştırma alanlarından biri olmuştur. Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmonrezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler (Coulet, 2010; Mulchandani 1991 Yeğenoğlu 2013). Nano boyutlu malzemelerin üretim yöntemlerinden biri de elektrospinnig (elektro eğirme) yöntemidir.

Elektrospinning yöntemi kullanılarak hazırlanan nanofiberler esnek ve çok sağlam yapılı malzemelerdir. Bükülerek veya kıvrılarak yapıları bozulmadığı için istenilen boyutlardaki şekillerde kullanılabilir. Ayrıca bu önemli avantajların yanında filtre kalınlığının ayarlanabilir olması uygulama kolaylığını artırmaktadır.

Bu proje kapsamında geliştirilen PVA-PAA esaslı nanofiberlerin geniş yüzey alanı ve yüksek yüzey/hacim oranı sahip olmasından dolayı, immobilizasyon çalışmalarının sonuçlarında gözenekli polimerik yapılar ile (mikro küreler gibi) karşılaştırıldığında daha iyi sonuçlar elde edildiği gözlenmektedir. Çapraz bağlı üç boyutlu ağ yapı içerisinde biyomoleküller daha etkin bağlanma verimlerine sahiptirler. Aynı zamanda PVA-PAA esaslı nanofiber filtrenin hidrofilik yapısı sulu/fizyolojik ortamlarda kolayca şişerek protein esaslı biyomoleküllerin bağlanma yüzdesini artırmaktadır.

Kim ve arkadaşları (2010) protein immobilizasyonu işlemlerinde 3 boyutlu nanoyüzeylerin düz yüzeylere göre daha pürüssüz ve geniş bir alan oluşturduğunu ve bu yolla 5 kat daha fazla proteinin nanoyüzeye immobilize edileceğini belirtmişlerdir.

Antikorların substrata immobilizasyonunun avantajları kendi ligand molekülleri ile oldukça spesifik etkileşime girmeleri, hedef protein veya liganda geri dönüşümsüz olarak bağlanmalarıdır. Antikorlar daha önce farklı yüzeylere bağlanmıştır. Bunlar

katı yüzeyler (Dixit 2011) mikro fluidik platformlar (Feyssa 2013), karboksil yüzeyler (Pei 2010), mikro arrayler (Peluso 2003), ultraflat polistrene yüzeyler (Qian 2000), altın parçacıkları (Karyakin 2000), kitosan mikro tanecikleri (Custodio 2013), kitosan yüzeyler (Costodio 2012) dir. Substarata antikor immobilizasyonunun en önemli rolü hücre ve protein adhezyonu için spesifik bölgeler oluşturmaktır.

Bu proje kapsamında PVA-PAA esaslı nanofiber elektrospinning yöntemi kullanılarak üretilmiş, daha sonra nanofibere fluoksetin, kotinin ve siklosporin antikorları immobilize edilmiştir. Antikor immobilize edilmiş nanofiberin etkinliği PBS, inek sütü ve anne sütü içerisindeki fluoksetin, kotinin ve siklosporin ile tayin edilmiştir.

Çalışmamızda anne sütünden fluoksetin, kotinin ve siklosporini uzaklaştırmak için geliştirdiğimiz PVA-PAA esaslı antikor immobilize nanofiberin etkinliğini yine nano boyutlu Prosep - vA Ultra Plus Chromatography Media (Milipore, DS-DS2234EN00) ticari ismi ile bilinen çapları 75-125 µm aralığında olan Protein A immobilize edilmiş cam boncuklar (controlledporeglass, CPG) ile karşılaştırılmıştır.

Yaptığımız literatür araştırmamızda anne sütünden fluoksetin, kotinin ve siklosporin uzaklaştırılması amacı ile immobilizasyon teknikleri ve nano yüzeyler daha önce kullanılmamıştır. Projemiz bu alanda yapılan ilk çalışmadır.

Anne sütü bebek yaşamının ilk altı ayı için vazgeçilmez bir besin olduğu için her anne bebeğine süt vermeyi istemektedir. Sağlık nedeniyle zorunlu fluoksetin veya siklosporin içeren ilaçları kullanan anneler ve bebeğe zarar verdiğinin farkında olmadan sigara kullanan annelerin sütlerine her üç madde geçerek bebek üzerinde çeşitli olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Çalışmamızda anne sütünden uzaklaştırılmasını hedeflediğimiz fluoksetin, kotinin ve siklosporine karşı 3 ayrı immunosorbent özellikli nanofiber geliştirilmiştir. Geliştirilen yüzey fluoksetin, kotinin ve siklosporini miknatıs gibi kendine çekerek bulunduğu PBS, inek sütü ve anne sütü ortamlarından uzaklaştırmaktadır.

Fluoksetinin nanofibere bağlanma verimi PBS içerisinde inek sütü ve anne sütüne göre daha düşük bulunmuştur. Anne sütüne eklenen beş ayrı konsantrasyondaki (25, 50, 75, 100 ve 150 ng/mL) fluoksetinin anne sütünden uzaklaştırılma verimleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Anne

sütünden fluoksetin %98 oranında uzaklaştırılmıştır.

Fluoksetinin PBS, inek sütü ve anne sütünden CPG veya nanofiber aracılı uzaklaştırılması karşılaştırıldığında nanofiber CPG'ye göre her üç sıvı içerisinde de fluoksetini istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek verimle uzaklaştırmıştır. En yüksek bağlama verimi yine anne sütü ve nanofiber ile elde edilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda anne sütünün daha önce bilinmeyen bir özelliği daha tespit edilmiştir. Bu da anne sütünün, fosfat tamponu veya inek sütüne göre antikör-antijen bağlanma kapasitesini arttırdığıdır. Anne sütünün bu etkisi araştırmaya açık bir konudur.

Kotininin nanofibere bağlanma verimi PBS içerisinde inek sütü ve anne sütüne göre daha düşük bulunmuştur. Anne sütüne eklenen dört ayrı konsantrasyondaki (10, 25, 50 ve 100 ng/mL) kotinin anne sütünden uzaklaştırılma verimleri karşılaştırıldığında sadece 10 ng/mL kotininin uzaklaştırılma verimi 50 ve 100 ng/mL'ye göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Konsantrasyon artışı bağlanma verimini yaklaşık % 4-5 oranında etkilemiştir. Genel olarak bakıldığında kotinin anne sütünden nanofiber kullanılarak uzaklaştırılma verimi yaklaşık % 94 olarak tespit edilmiştir.

Kotininin PBS, inek sütü ve anne sütünden CPG veya nanofiber aracılı uzaklaştırılması karşılaştırıldığında nanofiber CPG'ye göre her üç sıvı içerisinde de kotinini istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek verimle uzaklaştırmıştır. En yüksek bağlama verimi yine anne sütü ve nanofiber ile elde edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında sigara içen anne bulmak hastane ortamlarında mümkün olmamıştır. Çevremizde yaptığımız araştırmalarda emziren ve sigara içen iki anneden elde ettiğimiz süt örnekleri ile deneme yapılmıştır. Ancak 2 numuneden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilemediği için sunulmamıştır.

Siklosporinin nanofibere bağlanma verimi PBS içerisinde inek sütü ve anne sütüne göre daha düşük bulunmuştur. Anne sütüne eklenen üç ayrı konsantrasyondaki (100, 200, 300 ng/mL) siklosporinin anne sütünden uzaklaştırılma verimleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Siklosporinin anne sütünden nanofiber kullanılarak uzaklaştırılma verimi yaklaşık % 94 olarak tespit edilmiştir.

SONUÇ

112S138 no'lu "Anne sütüne geçen bazı ilaçların ve toksik maddelerin uzaklaştırılması" isimli projemizden elde ettiğimiz sonuçlar;

- 1- PVA-PAA esaslı nanofiber elektrospinning yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde üretilmiştir.
- 2- Üretilen nanofiberin üzerine fluoksetin, kotinin ve siklosporin antikorların immobilize edilmiştir.
- 3- Geliştirdiğimiz bu immünosorbent özellikli nanofiber ile fluoksetin anne sütünden yaklaşık olarak %98 oranında uzaklaştırılmıştır.
- 4- Kotinin yaklaşık % 94 oranında anne sütünden uzaklaştırılmıştır.
- 5- Siklosporin de yaklaşık % 94 oranında anne sütünden uzaklaştırılmıştır.
- 6- Anne sütünün antikor-antijen bağlanma reaksiyonunu PBS ve inek sütüne göre arttırdığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızın sonuçları doğrultusunda daha önce dünyada bir örneği olmayan bir araştırma tamamlanmıştır. Geliştirdiğimiz yöntem ve materyaller üretime yöneliktir. Proje ekibi olarak bu çalışma ile elde edilen prototip filtrenin sanayi ile ortak olarak yeni çalışmalar ile geliştirilmesinin bilimsel alanda ülkemize katma değer sağlayacağını düşünmekteyiz.

Bu şekilde yolumuza devam edersek bebeklerin beslenmesinde altın kriter olarak kabul edilen anne sütünün tadını bebeklerin doyasıya ve yan etkisiz çıkarmasını sağlayabiliriz ve gelecek nesil sağlığına katkıda bulunabiliriz.

KAYNAKLAR

Abbott, WM., Damschroder, MM., Lowe, DC. 2014. "Current approaches to fine mapping of antigen-antibody interactions", *Immunology*, 142(4), 526-35.

Aghdam , R. M., Shakhesi , S., Najarian , S., Mohammadi , M. M., Tafti , S. H. A., Mirzadeh , H. 2014. "Fabrication of a Nanofibrous Scaffold for the In Vitro Culture of Cardiac Progenitor Cells for Myocardial Regeneration", *International Journal Of Polymeric Materials*, 63(5), 229-239.

American Academy of Pediatrics Comittee on Drugs. 2001. "The transfer of drugs and other chemicals into human milk", 108(3), 776-89.

Andreescu, S., Sadik, O.A. 2004. "Trends and Challenges in Biochemical Sensors for Clinical and Enviroment Monitoring", *Pure Appl. Chem.*, 76(4), 861-878.

Anton, F. 1934. "Process and apparatus for preparing artificial threads", United States Patent, No: 1975504 dated 02.10.1934.

Arndt, K.-F., Richter, A., Ludwig, S., Zimmermann, J., Kressler, J., Kuckling, D., Adler, H.-J. 1999. "Poly(vinyl alcohol)/Poly(acrylic acid) Hydrogels: FT-IR Spectroscopic Characterization and Work at Transition Point", *Acta Polym.*, 50, 383-390.

Arslan, E., Garip, C., Gulseren, G., Tekinay A.B., Guler, M.O. 2014. "Bioactive Supramolecular Peptide Nanofibers for Regenerative Medicine", *Advanced Healthcare Materials*, 3, 1357–1376.

Chames, P., Regenmortel, M., Weiss, E., Baty, D. 2009. "Themed Section: VectorDesign And Drug Delivery Review Therapeutic antibodies: successes,limitations and hopes for the future", *British Journal of Pharmacology*, 157,220–233.

Chen, Q., Kurosu, H., Ma, L.,Matsuo, M. 2002. "Elongation-induced phaseseparation of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic-acid) blends as studied by ¹³C CP/MAS NMR and wide-angle X-ray diffraction", *Polymer*, 43(4), 1203–1206.

Chirowodza, H., Sanderson R.D. 2010. "Surface Modification of Poly(vinyl alcohol) Fibers", *Macromolecular Materials and Engineerin*, 295(11), 1009-1016.

Coulet, P.R. 1991. "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications",

Ed: Blum L J, Coulet PR., Marcel Dekker Inc., New York, (1-6).

Custódio, C.A., Santo, V.E., Oliveira, M.B., Gomes, M.E., Reis, R.L., Mano, J.F. 2013. "Functionalized microparticles producing scaffolds in combination with cells". *Advanced Functional Materials*, 24, 1391–1400.

Custódio, C.A., Frias, A. M.; del Campo, A.; Reis, R. L.; Mano, J. F. 2012 "Selective cell recruitment and spatially controlled cell attachment on instructive chitosan surfaces functionalized with antibodies" *Biointerphases*, 7, 65.

Çakmak, S. 2011. "Elektroeğrilmış Nanofiberlerin Uygulama Alanları", *Nanobülten*, Eylül 2011 Sayısı, 12-21.

Çırakoğlu, B. 2002. "Monoklonal antikorlar", *Bilim ve Teknik Dergisi*, sayfa (6-7)

Davanzo R., Copertino M., De Cunto A., Minen F., Amaddeo A. 2011. "Antidepressant drugs and breastfeeding: a review of the literature". *Breastfeed Med.*, 6(2),89-98.

Davies, D.R., Metzger H. 1983. "Structural basis of antibody function", *Annu. Rev. Immunol.*, 1, 87-117.

Ding, B., Yamazaki, M., Shiratori, S. 2005. "Electrospun fibrous polyacrylicacid membrane-based gassensors", *Sens Actuat B: Chem.*, 106(1), 477-483.

Dixit, C.K., Vashist, S.K., MacCraith, B.D., O’Kennedy, R. 2011. "Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays" *Nature Protocols* 6(4), 439–445.

Dixit, C.K. 2011. "Surface Modification and Conjugation Strategies for Bioassay/ Biomaterial Applications" *Ph.D. Thesis*, Dublin City University .

Eş, I., Vieira, JD., Amaral, AC. 2015. "Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application", *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(5), 2065-82

Fang, J., Wang, X., Lin, T. 2011. *Functional Applications of Electro spun Nanofibers*. Basım Yeri: Hırvatistan.

Fang, Y., Huang, X.J., Chen, P.C., Xu, Z.K. 2011. "Invited Mini Review: Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors", BMB Reports, 44(2), 87-95.

Feyssa, B., Liedert, C., Kivimaki, L., Johansson, L.S., Jantunen, H., Hakalahti, L. 2013. "Patterned immobilization of antibodies within roll-to-roll hot embossed polymeric microfluidic channels", PLoS One, 8(7), 68918

Frank, K.Ko. 2004. "Nanofiber technology: Bridging the Gap between Nano and Macro World", Kluwer Academic Publishers, 1-18.

Giacomelli, C.E., Valenti, L.E., Carot, L. 2007. "Biomolecules and Solid Substrate Interaction: Key Factors in Developing Biofunctional Surfaces", Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 1– 16.

Gibson, P., Schreuder-Gibson, H., Rivin, D. 2001. "Transport properties of porous Membranes based on electrospun nanofibers", Coll Surf A: Physicochem Eng Asp, 187-188, 469-481.

Giocoia, GP., Catz, CS. 1979. "Drugs and pollutants in breast milk", Clinics in Perinatology, 6(1), 181-196.

Google Scholar

https://scholar.google.com.tr/scholar?hl=tr&as_sdt=0,5&q=Nanofibers+and+Electrospinning

Son erişim tarihi: 04.03.2015

Göçmen, İ., Mete Z., Erkan O., Tunçer M. 1992. "Emzikli annenin ilaç kullanımı, anne sütüne geçen ilaçlar ve bebeğe olan etkileri", ANKEM Derg., 6(4), 468-473.

Hildebrand, H.F., Blanchemain, N., Mayer, G., Zhang, Y. M., Melnyk, O., Morcellet, M., Martel, B. 2005. "Functionalization of Biomaterials" Advanced Biomaterials VI 288, 47– 50

Huang, Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. 2003. "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nano composites", Composites Science and Technology, 63(15), 2223–2253.

Ito, S., Lee, A. 2003. "Drug excretion into breast milk-Overview", Advanced Drug Delivery

reviews, 55(5), 617-627.

Izadifar, Z., Chen, X., Kulyk, W. 2012. "Strategic Design and Fabrication of Engineered Scaffolds for Articular Cartilage Repair", J. Funct. Biomater., 3(4), 799-838.

Kalab, T., Skladal, P. 1997. "Disposable multichannel immunosensors for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using acetylcholinesterase as an enzyme label", Electroanalysis, 9(4), 293-297.

Karyakin, A.A., Presnova, G.V., Rubtsova, M.Y., Egorov, A.M. 2000. "Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol groups". Anal. Chem., 72(16), 3805–3811

Kayaalp, O. 1984. Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji (3. Baskı). Basım Yeri: Ankara, Ulucan Matbaası.

Kim, DJ., Lee, KB., Lee, ZW., Woo, SI., Choi, IS. 2004. "Pattern generation of biological ligands on a biodegradable poly(glycolic acid) film", Langmuir, 20(7), 2531-5.

Kim S.Y., Yu J., Son S.J., Min J. 2010 "Signal enhancement in a protein chip array using a 3-D nanosurface". Ultramicroscopy. 110(6), 659-665

Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4", Nature, 227, 680-685.

Larmor, J. 1898. "Note on the complete scheme of electrodynamic equations of a moving material medium, and on electrostriction", Proceedings of the Royal Society of London, 63, 365-372.

Lewin, M., Sello, S. B. 1985. Handbook of Fiber Science and Technology. Basım Yeri: NewYork.

Li, D., Xia, Y. 2004. "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the Wheel", Advanced Materials, 16(14), 1151-1170.

Li T.B.,Liang J., Xu B.S., Wang J. 2010. "Preparation and characteristic of one dimensional Magnesium Borate Nanomaterials", Journal of Inorganic Materials, 25, 947.

Lyons, J.M. 2004. "Melt-electrospinning of Thermoplastic Polymers: An Experimental and Theoretical Analysis", Doktora Tezi, Drexel Üniversitesi, Philadelphia, Pensilvanya, Amerika.

Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., Ramakrishna, S. 2005. "Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds", Tissue Eng, 11, 101.

Marler, J.J., Upton J., Langer, R., Vacanti, J.P. 1998. "Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration", Advanced Drug Delivery Reviews, 33, 165-182.

Martin, G.E., Cockshott, I.D., Fildes, J.T. 1977. US Patent 4044404

Meinke, P., Belcher M., Olson, D., Torit, D. "Industrial dust&fume control: Ordinary nanofiber proven inferior to ultra-web". Donaldsontarit.

<http://india.donaldson.com/en/industrialair/literature/066551.pdf>

Son erişim tarihi: 13.03.2015

Merrell, J. G., McLaughlin, S. W., Tie, L., Laurencin, C. T., Chen, A. F. and Nair, L. S. 2009. "Curcumin-loaded poly (epsilon-caprolactone) nanofibres: diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties", Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 36(12), 1149-1156.

Mennella J.A., Yourshaw L.M., Morgan L.K., 2007. " Breastfeeding and smoking: short-term effects on infant feeding and sleep" , Pediatrics, 120(3), 497-502.

Michaelsen, KF., Weaver, L., Branca F., Robertson A. 2000. "Feeding and Nutrition of Young Infants and Children, Guidelines for the WHO European Region with Emphasis on the Former Soviet Countries",WHO Regional Publications European Series, 87, 127-167.

Mohan, A. 2002. "Formation and Characterization of Electro spun Non-woven Webs",Thesis The Graduate Faculty of North Carolina State University.

Mulchandani A., Bassi A.S. 1995. "Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control". Crit. Rev. Biotechnol., 15: 105-24.

Nerem, R.M., Saltzman, A. 1995. "Tissue engineering: From biology to biological substitutes", Tissue Eng, 1(1), 3-1.

Noland, G. S. "Affinity Chromatography".

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01grnoland/affinchr.html>

Son erişim tarihi: 12.03.2015.

Oilic, C., Mur, P., Blanquet, E., Delapierre G., Vinet, F., Billon T. 2007. "DNA microarrays on silicon nanostructures: Optimization of the multilayer stack for fluorescence detection", Biosensors and Bioelectronics, 22(9-10), 2086-2092.

Oktay, B., Demir, S., Apohan, N. 2015. "Immobilization of α -amylase on topoly (glycidyl methacrylate) grafted electrospun fibers by ATRP", Materials Science and Engineering:C, 50, 386–393.

Orwoll, R.A., Yong, C.S. 1999. "Poly(acrylic acid)". Polymer Data Handbook. Editör: Mark, J.E. Oxford University Press.

Osadchy A., Koren G. 2011. "Cyclosporine and lactation: when the mother is willing to breastfeed". Ther Drug Monit. 33(2):147-8

Parkinson, G., Pejicic, B. 2005. "Using Biosensors Detect Emerging Infectious Diseases", Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology Perth, Western Australia, Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, Final Report.

Pei, Z., Anderson, H., Myrskog, A., Dunér, G., Ingemarsson, B., Aastrup, T. 2010 " Optimizing immobilization on two-dimensional carboxyl surface: pH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity". Anal. Biochem., 398(2), 161–168

Peluso, P., Wilson, D.S., Do, D., Tran, H., Venkatasubbaiah, M., Quincy, D., Heidecker, B., Poindexter, K., Tolani, N., Phelan, M., Witte, K., Jung, L.S., Wagner, P., Nock, S. 2003. " Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays" . Anal. Biochem., 312(2), 113–124

Qian, W., Yao, D., Yu, F., Xu, B., Zhou, R., Bao, X., Lu, Z. 2000. "Immobilization of Antibodies

on Ultraflat Polystyrene Surfaces” Clin. Chem. 46(9), 1456–1463.

Quarles A., Williams P.D., Hoyle D.A., Brimeyer M., Williams A.R. 1994. “Mothers’ intention, age, education and the duration and management of breastfeeding, Matern”. Child Nurs. J. 22, 102–108.

Raleigh, X.L. Dublin Philosophy Magazine, 184, London, Edinburgh.

Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Yong, T., Ma, Z. and Ramaseshan, R. 2006. “Electrospun nanofibers: solving global issues”, Materials Today, 9(3), 40-50.

Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B., Dewitz, M.C. 2005. “Monoclonal antibody successes in the clinic”, Nature Biotechnology, 23, 1073 – 1078.

Rishpon, J., Rosen, I. 1989. “The development of an immunosensor for the electrochemical determination of the isoenzyme LDH5”, Biosensors, 4(2), 61-74.

Sachs, HC. 2013. “The transfer of drugs and therapeutics into human breast milk: an update on selected topics”, Pediatrics, 132(3), 796-809.

Samur, G. 2008. Anne Sütü(1.Baskı). Ankara: Klasmat Matbaacılık

Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, BD. 2012. “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors”, Biotechnol Adv., 30(3), 489-511.

Severin S., Wenshui X. 2005. “Milk biologically active components as Nutraceuticals:Review”. Crit. Rev. Food Sci Nutr., 45(7-8), 645-56.

Shakumon, K.T., Binulal N.S., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Menon D., Furuike T., Tamura, H., Jayakumar, R. 2009. “Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications”, CarbohydratePolymers, 77(4), 863–869.

Shin, H.S., Kim S.Y., Lee, Y.M. 1997. “Indomethacin Release Behaviors from Hand Thermo responsive Poly (vinyl alcohol) and Poly (acrylic acid) IPN Hydro gels for Site-Specific Drug Delivery”, Journal of Applied Polymer Science, 65(4), 685–693.

Shin, M., Hohman, M., Brenner, M., Rutledge, G. 2001. “Electrospinning: whipping fluid jet

generates submicron polymer fibers”, Appl. Phys. Lett., 78, 1149.

Simons, H.L. 1966. “Process and apparatus for producing patterned non-woven fabrics”, United States Patent, No:3280229 dated 18.10.1966.

Sökücü, S. 1987. “Laktasyonda ilaç kullanımı ve bebekteki etkileri”, Ankem Dergisi, 1(3), 330-335.

Subramanian, U.M., Kumar, S.V., Nagiah, N., Sivagnamam, U.T. 2014. “Fabrication of Polyvinyl Alcohol-Polyvinyl pyrrolidone Blend Scaffolds via Electrospinning for Tissue Engineering Applications”, International Journal of Polymeric Materials, 63(9), 476-485.

The Biology Project. “Antibody Structure”.

<http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>

Son erişim tarihi: 12.03.2015

Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, S. 1999. “Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report)”, Pure Appl. Chem., 71 (12), 2333-2348.

Tischeri, W., Wedekind, F. 1999. “Immobilized Enzymes: Methods and Applications”, Topics in Current Chemistry, 200, 96-123.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”, Proc. Natl. Acad. Sci., 76(9), 4350-4.

Üstündağ, G.Ç. 2009. “Elektrospinning yöntemi ile biyomedikal kullanıma yönelik nanolif yüzey üretimi ve uygulaması”, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa.

Yeğenoğlu H., Aslım B., Tamer U. 2013 “Gıda patojenlerinin Tanısında nano boyutlu İmmüno sensör tasarımı”. N. Ü. Fen Bil Enst Derg, 2(1), 58-68.

Zhang , C.X., Yuan , X.Y., Wu , L.L., Han , Y., Sheng , J. 2005. “Study on morphology of electrospun poly(vinylalcohol) mats”, European Polymer Journal, 41, 423-432.

Wang, Z.G., Wan, L.S., Liu, Z.M., Huang, X.L., Xu, Z.K. 2009. "Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56, 189–195.

World Health Organization. "10 facts on breastfeeding".

<http://www.who.int/features/factfiles/breastfeeding/en/> Son erişim tarihi: 07.03.2015.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. TUĞBA AKBAY
Proje No:	112S138
Proje Başlığı:	Anne Sütüne Geçen Bazı İlaçların Ve Toksik Maddelerin Uzaklaştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	MEMET VEZİR KAHRAMAN, NİLHAN KAYAMAN APOHAN
Danışmanlar:	GÖKSEL ŞENER
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	MARMARA Ü. DIŞ HEKİMLİĞİ F.(İNG) TEMEL DİŞ HEK.BİLİMLERİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2012 - 01/04/2015
Onaylanan Bütçe:	363100.0
Harcanan Bütçe:	284587.5
Öz:	ÖZET Günümüzde anne sütü ile beslenme bebek beslenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak ilaçların emziren anneler tarafından bilinçsizce kullanımı veya yan etkileri hakkında bilgi eksikliği nedeniyle bir çok hastalık genç nesillerde sorun oluşturmaktadır. Ayrıca günlük yaşamda yiyeceklerle alınan birçok katkı maddeleri, tarım ilaçları, tatlandırıcılar, tütün ve tütün ürünleri, alkol, ilaçlar vs. veya bunların yıkım ürünleri anne sütüne geçerek bebeğin sağlığını tehdit etmektedir. Anne farkında bile olmadan süte geçen ilaçlar veya kimyasal maddelerin bebekte otizm, hiperaktivite, kanser gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Bu çalışmanın amacı; anne sütüne geçen zararlı maddeleri uzaklaştıran sistemi geliştirmektir. Bu amaçla öncelikle elektro spinning metodu kullanılarak poli(vinil alkol)-poli(akrilik asit) esaslı nanofiber üretilmiştir. Nanofiberler FTIR ve SEM yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Üretilen nanofiberin üzerine kotinin, fluoksetin ve siklosporin antikorlarının her biri ayrı ayrı immobilize edilerek immünosorbent fiber oluşturulmuştur. Kotinin, fluoksetin ve siklosporin eklenmiş fosfat tamponu, inek ve anne sütünden, eklenen ilaçlar immünosorbent fiber kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırmanın etkinliği, ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. İmmünosorbent nanofiberin etkinliği cam nano partiküller ile karşılaştırılmıştır. Proje kapsamında hazırladığımız spesifik nanofiberin günümüzde herhangi bir prototipi bulunmamaktadır. Proje kapsamında geliştirilen immünosorbent nanofiber ile fluoksetin % 98, kotinin %94, siklosporin %94 verim ile anne sütünden uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada nano dokuda hazırladığımız immünosorbent özellikli fiberin kimyasal algılamada kullanılmasının verimli olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; proje kapsamında antijen-antikor ilişkisi kurularak geliştirilen nano dokuya sahip immünosorbent fiberler ile anne sütünden bebeğe geçebilecek bir çok zararlı maddenin uzaklaştırılması için bir üretim ağının yolu açılmıştır.
Anahtar Kelimeler:	anne sütü, nanofiber, kotinin, fluoksetin, siklosporin
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır