ÇEŞİTLİ HASTALIKLARI TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN ve İLAÇ YÜKLÜ TAŞIYICILARIN ALVEOLLER ve AKCİĞER YÜZEY AKTİF MADDESİ İLE OLASI ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE INTERACTION OF DRUGS AND DRUG LOADED CARRIERS USED IN THE TREATMENT OF VARIOUS DISEASES WITH THE ALVEOLI AND PULMONARY SURFACTANT

MERVE GÖKDEMİR

PROF. DR. NİHAL AYDOĞAN
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2018

MERVE GÖKDEMİR'in hazırladığı "**Çeşitli Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan İlaçların Ve İlaç Yüklü Taşıyıcıların Alveoller Ve Akciğer Yüzey Aktif Maddesi İle Olası Etkileşiminin İncelenmesi**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Başkan .....

Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN
Danışman .....

Prof. Dr. Tülay DURUSOY
Üye .....

Prof. Dr. Hülya YAVUZ ERSAN
Üye .....

Dr. Öğretim Üyesi Eda ÇELİK AKDUR
Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

☑ **Tezimin/Raporumun** 5/6/2020 **tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

☐ **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

05. / 06. / 2013

(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Merve Göktemir

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içinde bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

05/06/2018



Merve GÖKDEMİR

ÖZET

ÇEŞİTLİ HASTALIKLARIN TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN ve İLAÇ YÜKLÜ TAŞIYICILARIN ALVEOLLER ve AKCİĞER YÜZEY AKTİF MADDESİ İLE OLASI ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

Merve GÖKDEMİR

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN

Haziran 2018, 147 sayfa

Hidrofobik kuyruk ve hidrofilik baş gruplardan oluşan, sıvı-hava ara yüzeyine adsorbe olarak yüzey geriliminin düşmesini sağlayan maddelere sürfaktan denir. İnsan vücudunda doğal olarak bulunan yüzey aktif maddeler akciğerlerde yer almaktadır. Akciğerler geniş yüzey alanları ve hava ile sürekli temas halinde olmaları sebebiyle ilaç taşınım yolu olarak tercih edilmektedirler. Akciğerlerden ilaç taşınımı, sadece akciğer hastalıklarının tedavisinde değil, diğer hastalıkların tedavisinde de kullanılabilen invazif olmayan bir yöntemdir. Pulmoner yol ile alınan ilaçların akciğerlere ulaşmasıyla alveollerin üzerinde bulanan akciğer yüzey aktif maddesi ile etkileşimi sonucu hem ilacın etkinliğinin hem de pulmoner sürfaktanın fonksiyonunun bozulmaması son derece önemlidir. Bu kapsamda yapılan çalışmada Siprofloksasin (antibiyotik), Naproksen (antiinflamatuar) ve Dipiradamol (kardiyak) farklı hastalıklar için model ilaçlar olarak kullanılmıştır. Bu ilaçların etkileşimini incelemek için model yüzey aktif madde olarak akciğer yüzey aktif maddesinde en çok bulunan

fosfolipit olan dipalmitolfosfatidilkolin (DPPC) ve sığır akciğer lavajından elde edilen BNS (bovine natural surfactant) kullanılmıştır. Model sürfaktanlar ve ilaçlar ile farklı oranlar kullanılarak ara yüzey özellikleri, dinamik adsorpsiyon özellikleri ve birbirleriyle etkileşimleri incelenmiştir. Ara yüzey özellikleri LB trough ve floresan mikroskopu cihazlarıyla incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda ilaçların tekli tabakaların yüzey basıncı-alan izotermlerine etkisinin çok fazla olmadığı, elastisite değerlerini değiştirmediği ve FM görüntülerinden de tekli tabakanın LC faz adacıklarını küçülttüğünü ve tabakayı akışkanlaştırdığı görülmektedir. İlaçların çözelti halinde verilmesinin yanı sıra bir taşıyıcı kullanarak da verilmesi mümkündür. Literatürde ilaç taşıyıcı olarak kullanılan bir çok partikül vardır. Ancak, akciğerlerden ilaç verilmesinde partikül boyutu önemli olduğu için nano boyutta partiküller tercih edilmektedir. Kullanılan partküllerin toksik özelliğinin azaltılması için de biyouyumlu olan lipit bazlı nanopartiküllerin çalışmalarına önem verilmektedir. Bu çalışmada lipit bazlı biyouyumlu ve yüksek stabiliteye sahip katı lipit nanopartiküller (KLN) sentezlenerek kullanılmıştır. İlaç taşıyıcı olarak kullanılan KLN'lerin akciğerlere ulaştığında sürfaktan ile etkileşimleri incelenmiştir. KLN'lerin ara yüzeye adsorbe olabildiği ve ara yüzeydeki madde miktarını arttırdığını, kesme elastisitesini etkilediğini ancak FM görüntülerinden tabakanın LC faz adacıklarına etkisinin çok olmadığını görmekteyiz. KLN'ler ara yüzey özelliklerinin incelenmesinde LB trough metodu yanında askıda damla metodu (pendant drop) ile de analiz gerçekleştirilmiştir. Çalışılan en yüksek miktardaki KLN kullanılarak 0.1Hz frekansta osilasyon yapılmış ve THD (total harmonik distortion) hesaplanarak tekli tabakanın reolojik özelliğine partiküllerin etkisi incelenmiştir. KLN'lerin tekli tabakaya eklenmesinin doğrusallığı çok fazla bozmadığı görülmüştür. Ayrıca ilaç yüklü KLN ile de etkileşimler önemli olduğu için öncelikle model ilaç olarak antiinflamatuar ilaçların son yıllarda kanser tedavisi için kullanımına yönelik çalışmaların olmasından dolayı Naproksen seçilmiştir. Naproksen yüklü KLN'ler elde edilerek karakterizasyonu sonucu boş KLN'nin fiziksel özelliklerini değiştirmediği sonucuna varılmıştır. Daha sonra Naproksen

yüklü KLN'den Naproksen salımı çalışmaları yapılmıştır. KLN'lerin Naproksen tutma kapasitesi %95 olarak hesaplanmış ve 250 dakikada Naproksen'in yaklaşık %15'ini salmış daha sonra azalan bir hızla salım devam etmiş ve 24 saatte yaklaşık %25'ini saldığı görülmüştür. Sürfaktan tekli tabakası varlığında Naproksen ile KLN'nin eş zamanlı eklenmesinin tek başına KLN'nin eklenmesiyle elde edilen sonuca benzer sonuç verdiği ancak Naproksen varlığından dolayı gözlenen sonucun tek başına KLN ile gözlenen kadar çok olmadığı görülmüştür. Bu da ortam koşullarında Naproksen'in negatif yüklü olması ve negatif yüklü KLN ile etkileşiminden kaynaklamaktadır. Sonuçta, çeşitli hastalıkların tedavisinde akciğerlerden ilaç alımının uygunluğu ve KLN'lerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğinin uygunluğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Akciğer yüzey aktif maddesi, ilaç taşınımı, katı lipit nanopartikül, elastisite, hava/su ara yüzeyi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE INTERACTION OF DRUGS AND DRUG LOADED CARRIERS USED IN THE TREATMENT OF VARIOUS DISEASES WITH THE ALVEOLI AND PULMONARY SURFACTANT

Merve GÖKDEMİR

Master of Science, Departmant of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN

Haziran 2018, 147 Pages

Surfactants contains hydrophobic tail and hydrophilic head groups and they cause surface tension to decrease by being adsorbed on the liquid-air interface. Surfactants found naturally in the human body are found in the lungs. Lungs are preferred as the drug delivery route because they are in constant contact with air and have large surface areas. Drug transport from the lungs is a non-invasive method that can be used not only in the treatment of lung diseases, but also in the treatment of other diseases. After drugs reach the alveoli, they interact with the pulmonary surfactant found on the alveoli by pulmonary. It is important that both drug activity and pulmonary surfactant function are not impaired. Ciprofloxacin (antibiotic), Naproxen (antiinflammatory) and dipyridamole (cardiac) have been used as model medicines for different diseases in this study. To

investigate the interaction of these drugs, dipalmitolphosphatidylcholine (DPPC), the most abundant phospholipid in the lung surfactant, and bovine natural surfactant (BNS) from bovine lung lavage were used as model surfactant. Interfacial properties, dynamic adsorption properties and interactions with each other were investigated by using different ratios with model surfactants and drugs. Interfacial properties were investigated with LB trough and fluorescence microscopy (FM). The LB trough results show that the effects of the drugs on the surface pressure-area isotherms of the monolayers are not so big and they do not change the elasticity values. The FM images show that it is seen that the monolayer reduces LC domains and fluidizes the surfactant monolayer. In addition to giving medicines in solution, it can also be delivered using a carrier. There are many particles in the literature used as drug carriers. However, nano-sized particles are preferred because the particle size is important when the drug is administered from the lungs. In order to reduce the toxic properties of the used particles, biocompatible lipid-based nanoparticles are preferred. In this study, lipid-based biocompatible and high-stability solid lipid nanoparticles (KLN) were synthesized and used. Interactions with surfactants have been investigated when KLNs used as drug carriers reach the lungs. Analysis of the interface properties of the KLNs was performed by pendant drop as well as the LB trough method. Using the highest amount of KLN worked, 0.1 Hz frequency oscillation was performed and THD (total harmonic distortion) was calculated and the effect of particles on the rheological properties of the monolayer was investigated. The addition of KLNs to the monolayer did not seem to distort the linearity much. In addition, as interactions with drug loaded KLN are important, Naproxen was chosen primarily because antiinflammatory drugs as model drugs have been used for cancer treatment in recent years. Naproxen loaded KLNs were obtained, resulting in the characterization that the resulting free KLN did not change its physical properties. Then Naproxen release studies were carried out from Naproxen loaded KLN. The Naproxen encapsulation efficiency of the KLNs

was calculated as 95%. It released about 15% of Naproxen in 250 minutes, then continued to release at a decreasing rate and attacked about 25% in 24 hours. The simultaneous addition of Naproxen and KLN in the presence of a surfactant monolayer showed similar results with the addition of KLN alone, but the result of the presence of Naproxen did not appear to be as much as observed with KLN alone. This is due to the fact that Naproxen is negatively charged in ambient conditions and interacts with negatively charged KLN. In summary, the suitability of drug delivery from the lungs in the treatment of various diseases and the suitability of lipid-based KLNs for their use as carrier systems have been shown.

Keywords: Lung surfactant, drug delivery, solid lipid nanoparticle, elasticity, air/water interface

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteğinden, bana sağladığı imkanlardan ve karşılaşmamı sağladığı güzel insanlardan dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nihal Aydoğan'a,

Tez çalışmamda ciğer hediye ederek katkı sağlayan Sincan Et ve Süt Kurumu'na ve 215 M 759 numaralı proje kapsamında bursiyer olarak destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Tezimin her aşamasında karşılaştığım zorluklarda her zaman yanımda olan beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum laboratuvar arkadaşlarım ve hocalarım olan Gökçe hoca, Erdem hoca, Dicle hoca, Hande hoca, Nihan, Merve, Arwa ve Nazlı'ya,

Ayrıca laboratuvara yeni gelen arkadaşlarım Gizem ve Bahar'a beraber geçirdiğimiz süre boyunca paylaştığımız güzel anılardan dolayı,

Lisansta tanışıp arkadaş olduğumuz ve yüksek lisans yaşamım boyunca da yanımda desteğiyle yer alan dostum Meltem'e,

Tezimin son aşamasında tanıştığım ve yanımda olduğu süre boyunca desteğini hem tezimde hem hayatımda hissettiğim benim için büyük değere ve öneme sahip olan Caner'e,

Ankara'ya geldiğimden beri hayatımda olan ve şanslarım olduğuna inandığım arkadaştan öte kardeş olduğum Neslihan, Vildan ve Özgül'e bana her zaman katlandıkları için, uzakta olsalar bile her koşulda daima yanımda oldukları için, her şeyimi rahatlıkla paylaşabildiğim ve daima hoşgörüyle yanımda olacaklarını bildiğim için,

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez aşamasında da büyük destek veren yanımda olmaları bana güç veren başta Hatice teyzem olmak üzere dedem, anneannem, annem, ağabeyim, Eser teyzem, İhsan ağabeyim, Esat, Canan, Melis abla, Elif ve babama her zaman yanımda oldukları için,

Ve bu süreçte tüm kahrıma ortak olan adını sayamadığım bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma,

en içten teşekkürlerimi sunarım.

Merve GÖKDEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....i
ABSTRACT.....iv
TEŞEKKÜRLER.....vii
İÇİNDEKİLER.....viii
ÇİZELGELER.....xi
ŞEKİLLER.....xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....xxii
1. GİRİŞ.....1
2.GENEL BİLGİLER.....3
2.1.Akciğerin Yapısı.....3
2.2.Akciğer Yüzey Aktif Maddesi Bileşenleri.....6
2.2.1.Fosfolipitler.....8
2.2.2.Proteinler.....9
2.3.Vücuda İlaç Alım Yolları.....13
2.4.İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Kullanılabilecek İlaçlar.....15
2.5.Langmuir Tabakası Biyofiziksel Özelliklerinin İncelenmesi.....25
2.5.1.Termodinamik Açıdan Karışabilirlik(Gibbs Serbest Enerjisi).....25
2.5.2.Ara yüzeyden Madde Kaybı Hesabı.....26
2.5.3.Elastisite Hesabı.....26
2.5.4.Tekli Tabakanın Reolojik Cevabının Doğrusallığının İncelenmesi.....27
3.DENEYSEL YÖNTEMLER.....29
3.1.Kimyasal Maddeler.....29
3.2.Katı Lipit Nanopartikül Sentezi.....29
3.2.1.Mikroemulsiyon Hazırlama.....29
3.2.2.KLN Oluşturma.....30
3.3.Sentezlenen Katı Lipit Nanopartikülün Karakterizasyonu.....30
3.3.1.Işık Saçınım Yöntemi (LS).....30
3.3.2.Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....31
3.3.3.Zeta Potansiyel Ölçümü.....32

3.4.Katı Lipit Nanopartiküllerin İlaç Tutma ve Salma Özelliklerinin İncelenmesi……33
3.4.1.İlaç Tutma Özelliği……33
3.4.2.İlaç Salma Özelliği……34
3.5.Model Akciğer Yüzey Aktif Maddelerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi……34
3.5.1.DPPC'nin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi……..35
3.5.2.Doğal Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin (BNS) Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi……36
3.5.3.Model Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri ile Model İlaçların Etkileşiminin İncelenmesi……37
3.5.4.Model Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri ile KLN Etkileşiminin İncelenmesi……38
3.6.Floresans Mikroskopi Ölçümleri……39
3.7.İkili Sistemlerinin Termodinamik Açıdan Karışabilirliliklerinin İncelenmesi……40
3.8.Yüzey Elastisitelerinin İncelenmesi……40
3.9.Tekli Tabakanın Reolojik Cevabının İncelenmesi……41
4.DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞILMASI……..42
4.1.Akciğer Yüzey Aktif Madde Modellerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi……42
4.1.1.Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) Modelinin Ara yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi……42
4.1.2.Sığır Akciğerinden Elde Edilen Yüzey Aktif Madde(BNS) Modelinin Ara Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi……47
4.2.Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına İlaçların Etkisinin İncelenmesi……54
4.2.1.Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Siprofloksasin'in Etkisinin İncelenmesi……54
4.2.2.Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Dipiradamol'ün Etkisinin İncelenmesi……68

4.2.3.Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Naproksen'in Etkisinin İncelenmesi.....80
4.3.Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakalarına Katı Lipit Nanopartiküllerin Etkisinin İncelenmesi.....93
4.4.Naproksen Yüklü Katı Lipit Nanopartikül'den İlaç Salım Çalışması....118
4.5.Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Katı Lipit Nanopartikül ve Naproksen Etkisinin İncelenmesi.....120
5.SONUÇLAR.....133
KAYNAKLAR.....136
EKLER.....145
ÖZGEÇMİŞ.....147

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2. 1. İlaçların Özelliklerinin Özeti……25

Çizelge 4. 1. Saf DPPC izoterminin sıkıştırılması sonucu 30 ve 60 mN/m yüzey basınçlarında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……44

Çizelge 4. 2. Saf BNS izoterminin sıkıştırılması sonucu basınç 30 ve 45 mN/m yüzey basınçlarında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……50

Çizelge 4. 3. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……57

Çizelge 4. 4. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……64

Çizelge 4. 5. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……..70

Çizelge 4. 6. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……76

Çizelge 4. 7. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……83

Çizelge 4. 8. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin

enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……88

Çizelge 4. 9. Katı Lipit Nanopartikülün Fiziksel Özellikleri……..…..93

Çizelge 4. 10. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……..……101

Çizelge 4.11. KLN eklenmesiyle DPPC tekli tabakasının THD değerindeki değişimi……107

Çizelge 4. 12. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza KLN enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……110

Çizelge 4. 13. KLN eklenmesiyle BNS tekli tabakasının THD değerindeki değişimi……115

Çizelge 4. 14. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……121

Çizelge 4. 15. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri……127

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Akciğerin yapısı……3
Şekil 2.2. Gaz alış verişinin şematik gösterimi……4
Şekil 2.3. Laplace Yasası ve Alveoller……5
Şekil 2.4. Yüzey Aktif Madde Yapısı……6
Şekil 2.5. Yüzey aktif maddelerin ortamlarda davranışı……6
Şekil 2.6. Yüzey gerilimi oluşumu……7
Şekil 2.7. Akciğer Yüzey Aktif Maddesi Bileşimi……8
Şekil 2.8. DPPC molekül yapısı……8
Şekil 2.9. Akciğer yüzey aktif madde proteinleri……10
Şekil 2.10. Proteinlerin yerleşimleri……11
Şekil 2.11. Sağlıklı solunum için gerekli özelliklerin nefes alış-veriş çevriminde gösterimi……12
Şekil 2.12. Vücuda ilaç alım yolları……13
Şekil 2.13. İlaç Taşıyıcı Sistemler……16
Şekil 2.14. KLN ve NLC yapıları……18
Şekil 2.15. Siprofloksasin molekül şekli……22
Şekil 2.16. Siprofloksasinin farklı pHlarda yapısı……22
Şekil 2.17. Naproksen molekül şekli……23
Şekil 2.18. Dipiridamol molekül şekli……24
Şekil 3.1. Işık saçınımının şematik gösterimi……31
Şekil 3.2. AFM'nin örnek koyulan yüzeyinin görünümü……32
Şekil 3.3. Zeta Potansiyel cihazı……33
Şekil 3.4. Langmuir – Blodgett (LB) cihazı……35
Şekil 3.5. LB cihazında DPPC'nin sıkıştırılması sırasında faz değişimi……36
Şekil 3.6. LB cihazında BNS'nin sıkıştırılması sırasında faz değişimi……37
Şekil 3.7. Ara yüzeyden yığın faza KLN enjeksiyonunun şematik gösterimi……38
Şekil 3.8. 3,6-bis(dietilamino)-9-(2-oktadesil) fenil klorid (R18)'in molekül şekli……39

Şekil 3.9. Floresan Mikroskop……39
Şekil 4.1. Saf DPPC tekli tabakasının PBS/hava ara yüzeyinde a)yüzey basıncı(Π)–alan(A) izotermi ve b)sıkıştırma-genişletme döngüsü……43
Şekil 4.2. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen saf DPPC tekli tabakasının yüzey basıncı-elastisite grafiği……..45
Şekil 4.3. Saf DPPC tekli tabakası için askıda damla metodu ile elde edilen yüzey gerilimi-zaman grafiği……46
Şekil 4.4. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen saf DPPC tekli tabakasının farklı yüzey basınçlarında FM görüntüleri……47
Şekil 4.5. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde zamanla yüzey gerilimi değişimi……48
Şekil 4.6. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde a) yüzey basıncı-alan izotermi ve b) sıkıştırma-genişletme döngüsü……49
Şekil 4.7. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde elastisitesi-yüzey basıncı grafiği……51
Şekil 4.8. Saf BNS tekli tabakası için askıda damla metodu ile elde edilen yüzey gerilimi-zaman grafiği……52
Şekil 4.9. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde FM görüntüleri……53
Şekil 4.10. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda Π-A izotermleri……55
Şekil 4.11. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda sıkıştırma-genişletme çevrimleri……56

Şekil 4.12. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri…….58

Şekil 4.13. Fosfat tampon çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Xcipro=0.5 ve Xcipro=0.83 oranında Cipro enjeksiyonu ile farklı basınçlarında elde edilen FM görüntüleri…….……60

Şekil 4.14. Fosfat tampon çözeltisinde DPPC tekli tabakası varlığında XCipro=0.5 ve XCipro=0.83 oranında Cipro enjeksiyonu sonrası farklı basınçlarında artık Gibbs Serbest Enerjileri…….……61

Şekil 4. 15. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda Π-A izotermleri…….62

Şekil 4.16. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda sıkıştırma-genişletme çevrimleri…….……63

Şekil 4.17. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri…….……65

Şekil 4.18. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin Xcipro=0.5, Xcipro=0.83 oranında enjeksiyonu ile farklı basınçlarda elde edilen FM görüntüleri……66

Şekil 4.19. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin XCipro =0.5 ve XCipro =0.83 oranında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında artık Gibbs Serbest Enerjileri……..67

Şekil 4.20. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında Π-A izotermleri…….68

Şekil 4.21. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri……69

Şekil 4.22. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri……71

Şekil 4.23. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında farklı yüzey basınçlarında FM görüntüleri……72

Şekil 4.24. Fosfat tampon çözeltisinde saf DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında artık Gibbs Serbest Enerjileri……73

Şekil 4.25. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında Π-A izotermleri……74

Şekil 4.26. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri……75

Şekil 4.27. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri……77

Şekil 4.28. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında farklı basınçlarda FM görüntüleri……78

Şekil 4.29. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında artık Gibbs Serbest Enerjileri……79

Şekil 4.30. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında Π-A izotermleri……81

Şekil 4.31. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri……82

Şekil 4.32. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında elastisite-yüzey basıncı grafikleri……84

Şekil 4.33. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında farklı basınçlarda FM görüntüleri……85

Şekil 4.34. Fosfat tampon çözeltisinde saf DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında artık Gibbs Serbest Enerjileri……86

Şekil 4.35. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında Π-A izotermleri……87

Şekil 4.36. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri……88

Şekil 4.37. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında elastisite-yüzey basıncı grafikleri……90

Şekil 4.38. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında farklı basınçlarda FM görüntüleri……91

Şekil 4.39. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında artık Gibbs Serbest Enerjileri……92

Şekil 4.40. Üç farklı orandaki saf KLN'nin yüzey basıncı(Π)-alan(A) izotermleri……95

Şekil 4.41. Fosfat tampon yığın fazında KLN'lerin sıkıştırma-genişletme çevrimleri……96

Şekil 4.42. Saf DPPC tekli tabakası varlığında a)KLN:DPPC=5x10-9 partikül/molekül ve b)KLN:DPPC=40x10-9 partikül/molekül oranlarında KLN enjeksiyonu sonrasında farklı yüzey basınçlarında Π-t grafikleri……97

Şekil 4.43. Saf BNS tekli tabakası varlığında KLN:BNS=5x10-9 partikül/molekül ve KLN:BNS=40x10-9 partikül/molekül oranlarında KLN enjeksiyonu sonrasında 30 mN/m yüzey basıncında Π-t grafikleri……98

Şekil 4.44. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının($x10^{-9}$) enjeksiyonunun Π-A izotermleri……99

Şekil 4.45. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının (x10-9) enjeksiyonunun sıkıştırma-genişletme çevrimleri……101

Şekil 4.46. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza farklı oranlarda KLN eklenerek elde edilen farklı basınçlarda FM görüntüleri……103

Şekil 4.47. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının enjeksiyonunun 15 mN/m yüzey basıncında FM görüntüleri……104

Şekil 4.48. Saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza farklı partikül/molekül oranlarında (x10-9) KLN eklenmesiyle elde edilen elastisite- yüzey basıncı grafikleri……105

Şekil 4.49. Fosfat tampon çözeltisi içindeki DPPC ve DPPC-KLN tekli tabakalarının ΔA/A0=0.3 genişleme genliği için v=0.1 Hz frekansında salınan yüzey gerilim-zaman izotermleri……106

Şekil 4.50. DPPC ve DPPC-KLN tekli tabakalarının dilatasyon ve kesme elastisiteleri……107

Şekil 4.51. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının (x10-9) enjeksiyonunun Π-A izotermleri……109

Şekil 4.52. Fosfat tampon yığın fazında saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası oluşturarak alt faza farklı oranlarda (x10-9) KLN ekleyerek elde edilen sıkıştırma-genişletme çevrimleri……110

Şekil 4.53. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza farklı oranlarda KLN eklenerek elde edilen farklı basınçlarda FM görüntüleri……113

Şekil 4.54. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının enjeksiyonunun 30 mN/m yüzey basıncında FM görüntüleri……114

Şekil 4.55. Saf BNS tekli tabakası ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza farklı oranlarda (x10-9) KLN eklenmesiyle elde edilen elastisite - yüzey basıncı grafikleri……114

Şekil 4.56. Fosfat tampon çözeltisi içindeki BNS ve BNS-KLN tekli tabakalarının ΔA/A0=0.3 genişleme genliği için v=0.1 Hz frekansında salınan yüzey gerilim-zaman izotermleri……116

Şekil 4.57. BNS ve BNS-KLN tekli tabakalarının dilatasyon ve kesme elastisiteleri……117

Şekil 4.58. Nap yüklü Katı Lipit Nanopartikülden salınan Nap yüzdesinin zamanla değişimi……119

Şekil 4.59. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve

NAP enjeksiyonunun Π-A izotermleri (KLN:DPPC= 5x10-9 partikül/molekül, Nap=5.5 x10-5 mg/ml)……121

Şekil 4.60. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun sıkıştırma-genişletme çevrimleri (KLN:DPPC= 5x10-9 partikül/molekül, Nap=5.5 x10-5 mg/ml)……122

Şekil 4.61. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakanın ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun elastisite-basınç grafikleri……124

Şekil 4.62. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun FM görüntüleri……125

Şekil 4.63. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun Π-A izotermleri (0.18x10-4 mg/ml KLN, 3.36x10-4 mg/ml Nap)……126

Şekil 4.64. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında 40 mN/m basınçta yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjekte edildiğinde Π-t grafikleri (0.18x10-4 mg/ml KLN, 3.36x10-4 mg/ml Nap)……127

Şekil 4.65. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun sıkıştırma-genişletme çevrimleri (0.18x10-4 mg/ml KLN, 3.36x10-4 mg/ml Nap)……128

Şekil 4.66. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun elastisite-yüzey basıncı grafikleri……130

Şekil 4.67. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun FM görüntüleri……..131

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Π	Yüzey Basıncı
ε	Elastisite
ΔG_{ex}	Artık Gibbs Serbest Enerjisi

Kısaltmalar

PBS	Fosfat Tampon Çözelti (Phosphate Buffer Solution)
DPPC	Dipalmitolfosfatidilkolin
BNS	Sığır Akciğer Sürfaktan Özütü(Bovine Natural Surfactant)
Cipro	Siprofloksasin
Dip	Dipiradamol
Nap	Naproksen
ME	Mikroemülsüyon
KLN	Katı Lipit Nanopartikül
LC	Sıvı yoğunlaşmış faz (Liquid Condensed)
LE	Sıvı genişlemiş faz (Liquid expanded)
R18	3,6-bis(dietilamino)-9-(2-oktadesil) fenil klorid
LB	Langmuir-Blogett
FM	Floresan Mikroskop
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskop
DLS-SLS	Dinamik Işık Saçınımı-Statik Işık Saçınımı
THD	Toplam Harmonik Distorsiyon(Total Harmonic Distortion)
FFT	Hızlı Fourier Dönüşümü (A Fast Fourier Transform)

1.GİRİŞ

Yüzey aktif maddeler tekstil, temizlik gibi hayatımızın birçok alanında karşımıza çıkmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte yüzey aktif maddelerin önemi giderek artmış ve doğada bulunan yüzey aktif maddelerle birlikte sentetik olarak üretilen yüzey aktif maddelerle de birçok çalışma yapılmaktadır. İnsan vücudunda doğal olarak bulunan yüzey aktif maddelere akciğer yüzey aktif maddesi (akciğer sürfaktanı-pulmoner sürfaktan) denir ve nefes alış-verişini düzenlemek gibi hayati önem taşımaktadırlar. Pulmoner sürfaktan, alveol tip II hücreleri tarafından alveolar boşluğa salgılanan lipitlerin ve proteinlerin bir karışımıdır [1]. Laminer cisim ve tubular myelin sayesinde, bu yüzey aktif madde karışımı ara yüzeye taşınarak düzgün nefes alış-verişi için yüzey gerilimini düşürmektedir [2].

Akciğerler geniş bir iç yüzeye sahip, çevre ile sürekli temas halinde olan büyük organlardır. Vücut hacminin yaklaşık %6'sını oluşturmaktadırlar. Memelilerin akciğerleri alveollerle ayrılmış keselerden oluşur ve küçük keseler gaz alışverişi için yüzey alanını büyük oranda arttırırlar. Sıcakkanlı hayvanlar için yüksek miktarda oksijen alımı gerektiği için geniş yüzey alanı çok önemlidir [3]. Akciğerlerin difüzyon kapasitesi yapısal olarak alveolar yüzey alanının büyüklüğü ve kan-gaz bariyeri kalınlığı ile sınırlıdır [4]. Gaz alışverişi alveollerde gerçekleşmektedir. Oksijen alveolden kılcal damarlara dağılır ve karbon dioksit, kılcal damarlardan ayrılır ve alveollere yayılır. Nefes alınması sırasında alveoller şişerek yüzey alanıyla beraber yüzey gerilimi de artmaktadır. Çok fazla artan yüzey gerilimi akciğerin çökmesine neden olur. Bu eğilim, alveolün iç yüzeyindeki yüzey gerilimini çok düşük değerlere düşüren yüzey aktif maddelerin varlığı ile asgariye indirilir [3].

Akciğerler sahip olduğu avantajlardan dolayı hastalıkların tedavisinde kullanılması tercih edilebilen invazif olmayan bir yöntemdir. Ancak akciğerde bulunan yüzey aktif maddenin işlevinin bozulmaması son derece önemlidir. Bu sebeple de pulmoner yolla dağıtım yapıldığında

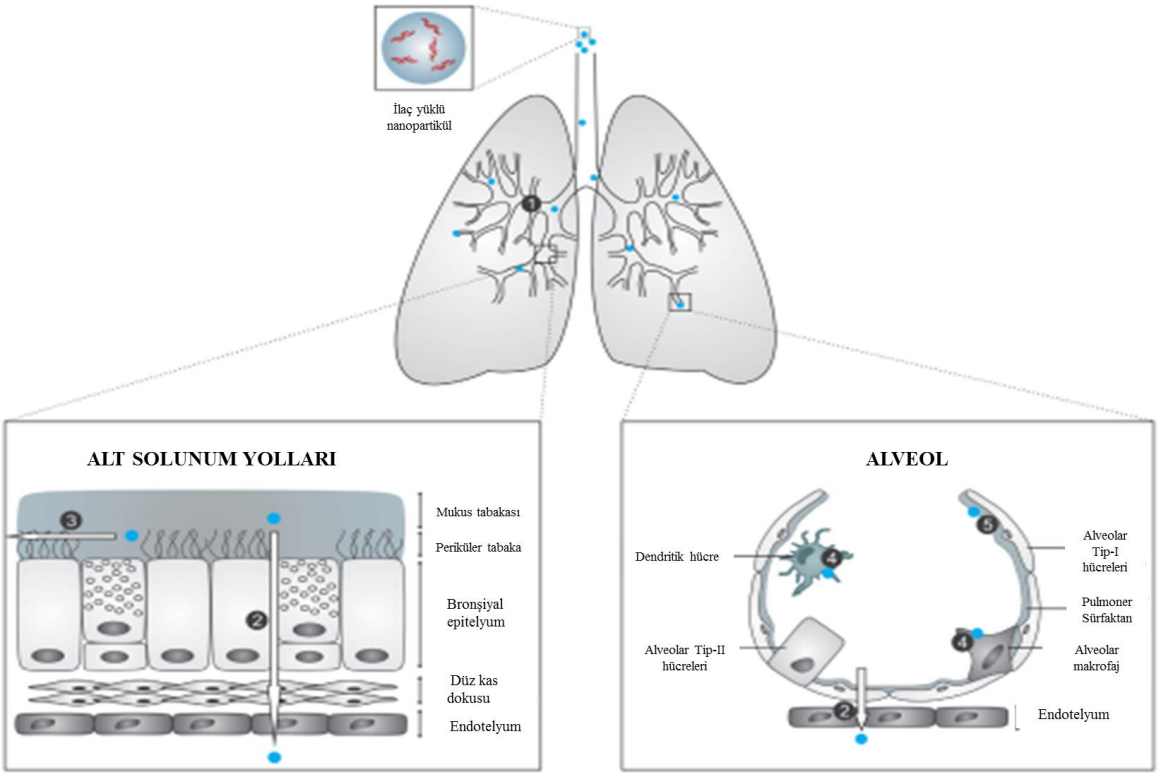
alveollere gelen etken maddenin sürfaktanın fonksiyonuna etkisinin araştırılması gerekmektedir. Akciğerlerden ilacın direk çözeltisi verilebileceği gibi ilaç taşıyıcı sistemlerle de ilaç verilebilmektedir. Bu taşıyıcı sistemler için de en önemli kısıtlayıcı etkenler boyut ve taşıyıcının toksik etkisidir.

Tez çalışmasında, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların ve ilaç taşıyıcıların inhalasyon yolu ile alımıyla alveollere ulaşması sonucu akciğer yüzey aktif maddeleri ile gerçekleşen etkileşimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, öncelikle model sürfaktan sistemi olarak akciğer yüzey aktif maddesinde en çok bulunan fosfolipit olan dipalmitolfosfatidilkolin (DPPC) ve sığır akciğerinden Bligh-Dyer methodu ile elde edilen doğal akciğer sürfaktanı (BNS, bovine natural surfactant) kullanılacaktır. Model ilaç olarak da sudaki çözünürlükleri ve yükleri farklı olan Siprofloksasin (antibiyotik), Dipiridamol (kardiyak) ve Naproksen (antiinflamatuar) ilaçları seçilerek pulmoner sürfaktan tekli tabakalarının ara yüzey özelliklerine ve elastisitelerine etkileri Langmuir Blodgett trough cihazı ve floresan mikroskobu ile incelenecektir. Ayrıca ilaç taşıyıcı sistem olarak da toksik etki göstermeyen, biyouyumlu ve stabilitesi yüksek lipit bazlı katı lipit nanopartiküller (KLN) sentezlenecektir. KLN'lerin de akciğer sürfaktan sistemi üzerine etkilerinin anlaşılabilmesi için LB trough ve FM cihazlarıyla kullanılacak, ayrıca üç boyutlu sistem olan askıda damla metodu kullanılarak da etkileşimin daha iyi anlaşılması sağlanacaktır. Son olarak da, ilaç yüklü KLN'nin sürfaktan üzerindeki etkisini görmek için son yıllarda anti-inflamatuar ilaçların kanser tedavisi için kullanımının araştırılmasından dolayı Nap yüklü KLN'lerin salım profilleri incelenerek salım miktarları hesaplanarak aynı miktarlarda sürfaktan modellerle etkileşiminin incelemeleri yapılacaktır. Bu sayede sadece akciğer hastalıkları için değil çeşitli hastalıklar için de akciğerlerden ilaç alımının potansiyeli ve bunun için de taşıyıcı sistem olarak KLN'lerin uygunluğu belirlenecektir.

2.GENEL BİLGİLER

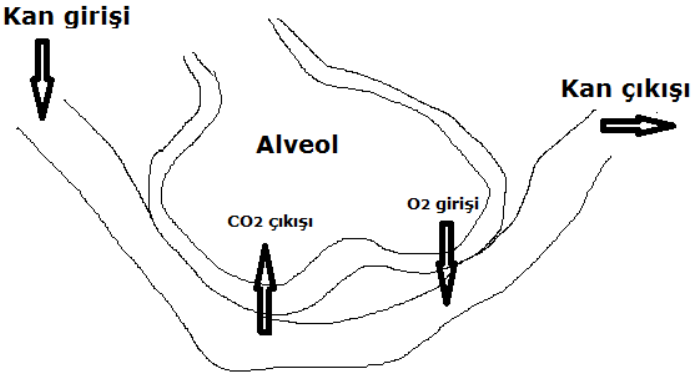
2.1. Akciğerin Yapısı

Akciğerler geniş bir iç yüzeye sahip, çevre ile sürekli temas halinde olan büyük organlardır. Vücut hacminin yaklaşık %6'sını oluşturmaktadırlar. Şekil 2. 1'de akciğer yapısı görülmektedir.



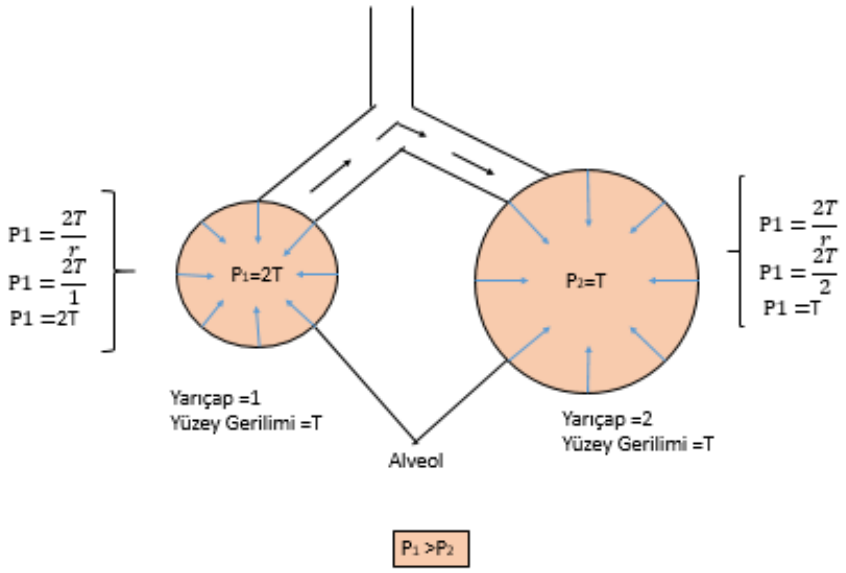
Şekil 2. 1. Akciğerin yapısı [6]

Memelilerin akciğerleri Şekil 2. 2'de görüldüğü gibi her birinin çapı yaklaşık 0.25 mm olan 300 milyondan fazla alveollerle ayrılmış keselerden oluşur ve alveoller yaklaşık 100 m^2 yüzey alanına sahip olduklarından gaz alışverişi için yüzey alanını büyük oranda arttırmaktadırlar. Oksijen, alveollerden kılcal damarlara difüz olur iken karbondioksit, kılcal damarlardan alvollere difüz olarak akciğerden uzaklaşmaktadır. Sıcakkanlı hayvanlar için yüksek miktarda oksijen alımı gerektiği için geniş yüzey alanı çok önemli olmaktadır [3].



Şekil 2. 2. Gaz alış verişinin şematik gösterimi

Alveoller, nemli yüzeylerindeki moleküllerin etkileşiminin sonucu olan spesifik bir yüzey gerilimine sahiptirler. Nefes alımı sırasında alveoller büyüyerek yüzey alanları artmakta ve yüzey alanının artmasıyla yüzey gerilimi de artmaktadır. Artan yüzey gerilimi akciğerlerin çökmesine neden olabilecek büyüklüğe ulaşabilmektedir [3]. Akciğer sıvısında, bu gerilim sebebiyle akciğerin çökmesini engelleyecek bir takım maddeler yer almaktadır. Bu maddeler, nefes alırken akciğer hacminin artmasıyla yüzey gerilimini arttırmakla, nefes verirken ise akciğer hacminin azalmasıyla yüzey gerilimini düşürmekle görevli olan akciğer yüzey aktif maddeleridir [3]. Bu nefes alıp verme sırasında oluşan basınç farkı oldukça önemlidir. Bu basınç farkını ifade eden yasaya Young-Laplace Yasası denir [7,8].



Şekil 2. 3. Laplace Yasası ve Alveoller

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \qquad \text{Eşitlik 2.1}$$

Alveollerin yüzeyi sıvı, içi ise hava doludur. Yüzeyde bulunan bu sıvı tabaka, nefes alma işleminde hava ile temas ederek yüksek yüzey gerilimine neden olmaktadır. Young-Laplace yasası, atmosfer ile alveol içinde oluşan basınç farkının (ΔP), alveol yüzeyindeki yüzey gerilimine (γ) ve yarıçapına (r) bağlı olduğunu göstermektedir. Eşitlikte de görüldüğü gibi, yarıçapla ters orantılı olduğu için, küçük çaplı alveolü şişirmek için gereken basınç büyük çaplı alveolü şişirmek için gereken basınçtan daha büyüktür. Bu yüksek basınç farkının giderilmesi için yüzey geriliminin düşürülmesi sağlanmalıdır. Akciğerlerde bulunan, alveollerimizin sağlıklı bir şekilde büyüyüp küçülmesini sağlayan ve sıvı-hava ara yüzeyinde yüzey gerilimini düşürme görevi olan akciğer yüzey aktif maddelerinin varlığı bu yüzden hayati öneme sahip olmaktadır [8].

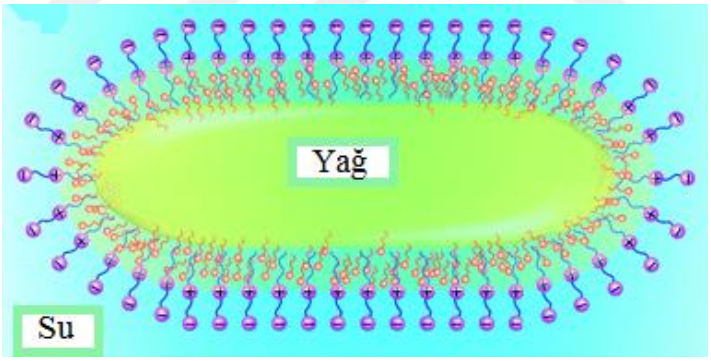
2.2. Akciğer Yüzey Aktif Madde Bileşenleri

Yüzey aktif madde (sürfaktan), bulunduğu ortamın yüzey gerilimini etkileyen, suyu seven baş grubu ve suyu iten kuyruk grubundan oluşan amfifilik maddelerdir.



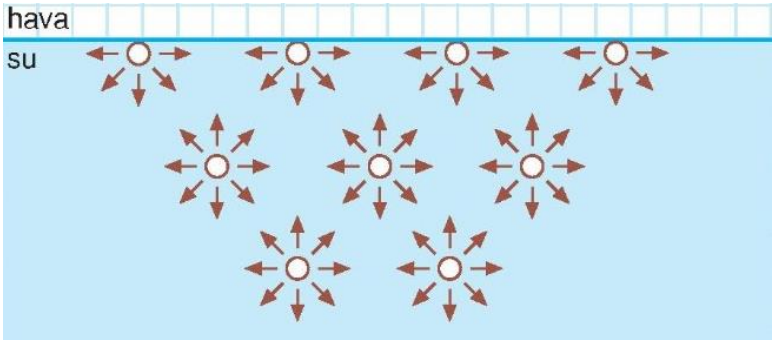
Şekil 2. 4. Yüzey Aktif Madde Yapısı

Su molekülleri arasındaki hidrojen bağı nedeniyle kuyruk grubu dışarda kalır ve hidrofobik kısım olarak adlandırılmaktadır. Baş grubunun iyonik veya polar olması sayesinde de sürfaktanlar su molekülleri ile dipol-dipol etkileşiminde bulunmaktadırlar [9].



Şekil 2. 5. Yüzey aktif maddelerin ortamlarda davranışı [10]

Yüzey aktif maddeler, sistemi kararlı hale getirmek için hava-sıvı ara yüzeyine adsorbe olarak yüzey gerilimini düşüren maddelerdir. Yüzeyi oluşturmak için gereken enerjiye serbest enerji, birim alan başına serbest enerjiye ise yüzey gerilimi (ara yüzeyi genişletmek için gerekli iş miktarı) denmektedir. Yüzey gerilimi, bir sıvıda bulunan bütün moleküller birbirine her yönde kuvvet uygularken sıvının yüzeyindeki moleküller çözelti içine doğru kuvvet uyguladığından sıvı yüzeyindeki net kuvvet sıfır olmadığı için oluşmaktadır.

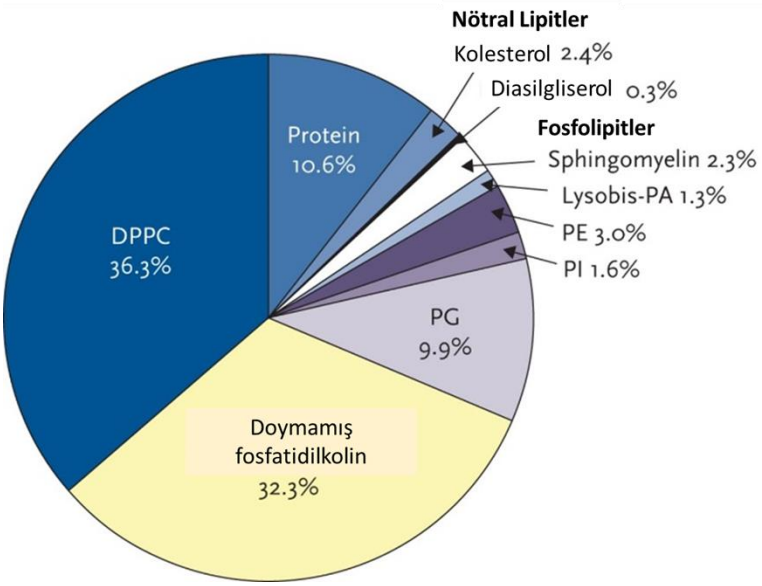


Şekil 2. 6. Yüzey gerilimi oluşumu

Bu yüzey aktif madde özelliklerini taşıyan ve doğal olarak akciğerlerin yüzeyinde bulunan Tip-II hücreleri tarafından sentezlenen lipit ve protein karışımı yapılara akciğer yüzey aktif maddesi denmektedir. Akciğer yüzey aktif maddesinin görevleri; nefes alış-verişi sırasında yüzey gerilimini dengelemek, böylece solunumu kolaylaştırmaktır [3]. Üretilen yüzey aktif madde karışımı Laminer cisim yapıları şeklinde endoplazmaya yayılmaktadır. Birden fazla Laminer cismin birleşmesiyle Tubuler Myelin yapısı oluşmaktadır. Tubuler Myelin yapısı alveollerin ara yüzeyine çok hızlı adsorbe olarak yayılmaktadırlar [2].

Sürekli bir proses olan nefes alış-verişinin düzgün devam edebilmesi için nefes vermeyle alveol içine yönlenen tekli tabakanın yüzeye hızlı bir şekilde adsorbe olması ve ayrıca alveollerin zarar görmemesi için yüksek elastisiteye sahip olması gerekmektedir. Bunlar da akciğer yüzey aktif maddesinin görevleri arasında yer almaktadır.

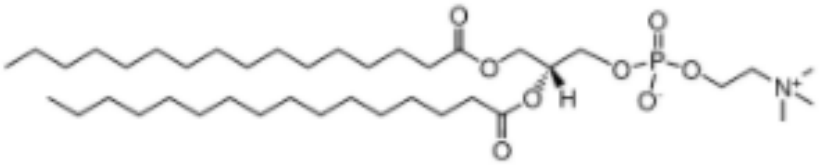
Akciğer yüzey aktif maddesi çeşitli lipitlerden, hidrofilik ve hidrofobik proteinlerden oluşmaktadır.



Şekil 2. 7. Akciğer Yüzey Aktif Maddesi Bileşimi [11]

2.2.1. Fosfolipitler

Akciğer yüzey aktif maddesinin %90'ı lipitlerden oluşmaktadır. Tüm memeli türlerinde yüksek miktarda (yaklaşık %80) fosfotidilkolin (PC) bulunmaktadır [12]. Genellikle PC'nin yaklaşık %60'ının dipalmitollenmiş formda olduğu kabul edilmektedir. Fosfatidilgliserol (PG) lipid havuzunun yaklaşık % 10'unu ve küçük miktarda (lizo) fosfatidik asit (PA), fosfatidilinositol (PI) ve fosfatidiletanolamin (PE) bulmaktadır [13]. Kolesterol, pulmoner yüzey aktif cisminde bulunan en bol nötr lipittir.



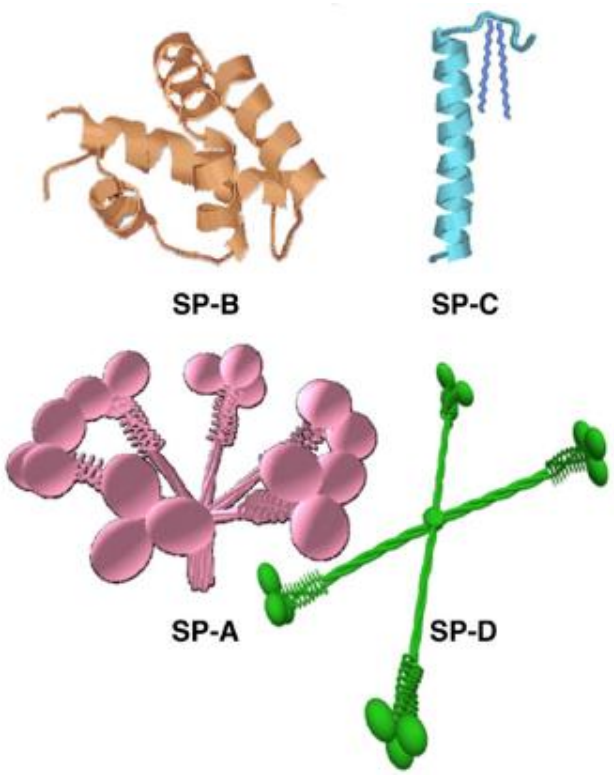
Şekil 2. 8. DPPC molekül yapısı [14]

DPPC genellikle, yüksek sıkıştırılabilirliğe sahip olan ve ara yüzeyin sıkıştırılması sırasında sıfıra yakın bir yüzey gerilimi üretmekten sorumlu olan lipit olarak kabul edilmektedir [15]. DPPC hem pozitif hem negatif yük taşıdığı için amfoter yapıdadırlar. İki doymuş hidrokarbon zinciri, lipitin sıkı bir şekilde paketlenmiş bir tek tabaka oluşturmasını sağlar ve bu da çökme olmadan bu düşük yüzey gerilimini sağlayabilmektedir. DPPC, klinik sürfaktan çalışmalarında sıkıştırılabilirliğinin yüksek olması nedeniyle temel olarak kullanılmaktadır [16]. Doymamış PC lipitleri, bir

lipit rezervuar oluşumunda, lipitlerin ara yüzeye ilk adsorpsiyonunda veya solunum döngüsü sırasında yüzey geriliminin düzenlenmesinde önemli olmaktadır. Bugüne kadar doymamış PC türlerinin herhangi birinde herhangi bir spesifik rol bulunmadığı kanıtlanmıştır [1]. Sürfaktan içindeki PG'nin alışılmadık derecede yüksek miktarı bu asidik fosfolipit için özel bir rolü işaret etmektedir. DPPC: PG karışımları, hidrofobik SP-B ve SP-C proteinleri bulunduğunda PC karışımlarına kıyasla adsorpsiyon aktivitesini arttırmaktadır. Negatif yüklü PG ile SP-B ve SP-C'nin pozitif yükleri arasında doğrudan bir etkileşim söz konusu olmaktadır [17]. Bazı istisnalar olmasına rağmen, negatif yüklü PI seviyeleri genellikle düşüktür. Yüzey aktif maddede kolesterol ve lizoPC, PE veya PA gibi minör lipit bileşenlerinin rolü çok açık değildir. Kolesterol, DPPC bakımından zengin surfaktan membran sistemlerinin hacimlerini artırabilir ve küçük lipit bileşenleri, Tubuler Myelininde eğrilik yapılarına neden olabilir [18].

2.2.2. Proteinler

Akciğer yüzey aktif madde karışımında hidrofobik (SP-B, SP-C) ve hidrofilik (SP-A,SP-D) olmak üzere 2 çeşit protein grubu bulunmaktadır [18]. Hidrofilik proteinler boyut olarak hidrofobik proteinlerden daha büyüktürler ve yüzey aktivitesi göstermemektedirler. Proteinler lipit bağlı olarak ciğerde bulundukları için hava-sıvı ara yüzeyinde bir bozulmaya uğramamaktadırlar.



Şekil 2. 9. Akciğer yüzey aktif madde proteinleri [19]

Proteinlerin görevleri;

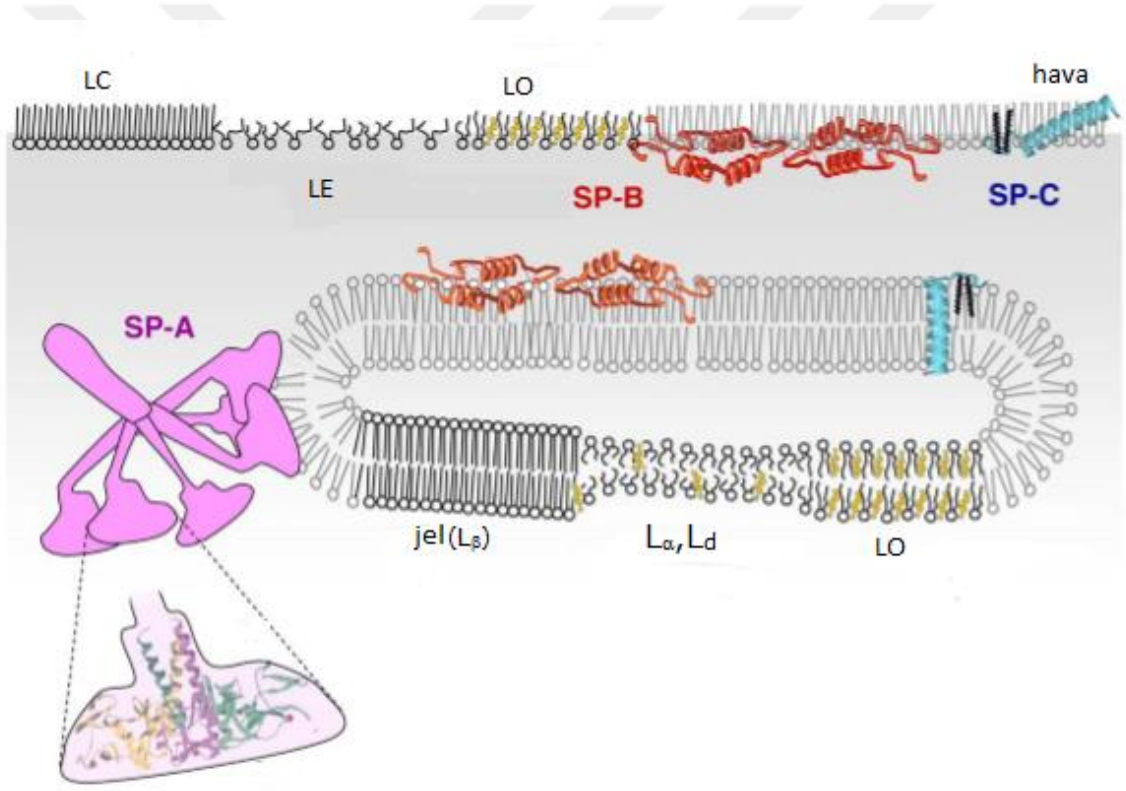
SP-A ; Alveolar sıvıda en fazla bulunan hidrofilik glikoproteindir. Tubuler Myelin oluşturmak ve patojenlerin yüzeyine bağlanarak akciğerin savunulması görevleri arasında yer almaktadır [20]. Sürfaktanın yüzey gerilimini düşürmede görevli değildir sadece yapısal organizasyonda görev almaktadırlar [21].

SP-D ; İkinci hidrofilik glikoproteindir. SP-A gibi alveolar makrofajların aktive edilmesini ve bakterilerin temizlenerek akciğerin savunmasında görevlidirler. SP-D proteininin üretimi akciğere özel değildir [22]. 335 adet amino asit içermektedirler.

SP-B; Hava-su ara yüzeyine lipit taşınmasını kolaylaştırmak için SP-B ve SP-C sürfaktan proteinlerinin bu sürece katılımının özellikle önemli olduğu düşünülmektedir. Bu küçük proteinlerin olağandışı yapısal özellikleri vardır ve bunlardan biri güçlü bir hidrofobik karaktere sahip olmasıdır. SP-B, molekül ağırlığı 18 000 Da olan bir dimerdir [17]. 79 amino asit içerir ve pozitif yüklüdürler [23]. SP-B proteini, ara yüzeyin dayanıklılığını

arttırmada, lipitlerin ara yüzeye girişini hızlandırmada ve ikili tabakaların moleküler içi ve dışı düzenlemesini arttırmakta görevlidirler [3].

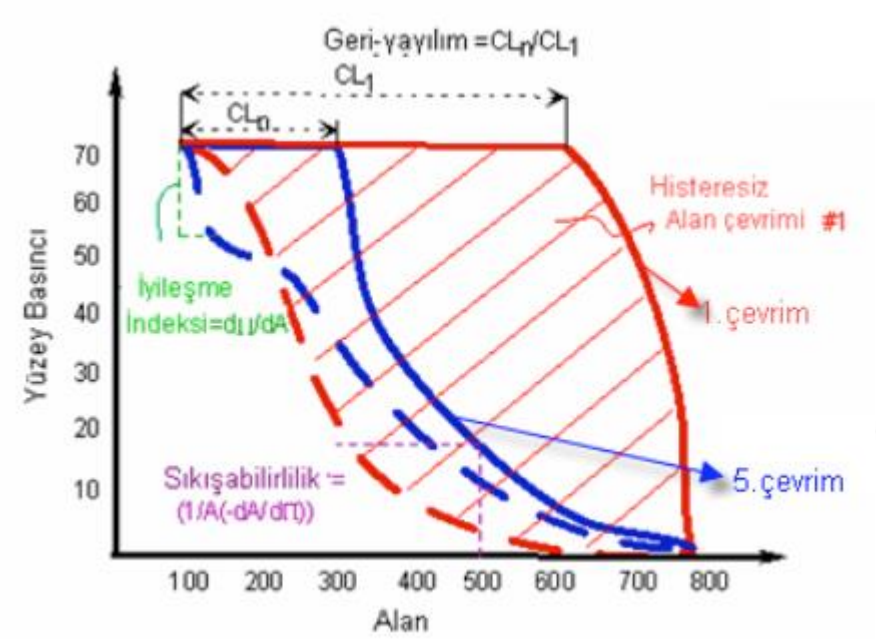
SP-C; SP-C, molekül ağırlığı 4 000 Da olan, 35 amino asidin küçük bir peptididir. Hidrofobikliği oldukça yüksek, SP-B gibi katyonik bir proteindir [17]. Her iki protein, SP-B ve SP-C'nin in-vitro fosfolipit yüzey film oluşum hızını önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir. SP-C, tek tabakanın sıvı faz bölgeleri içinde tek katmanlar ve çok katmanlar arasında bir geçiş oluşturarak iyi adsorpsiyon ve tekrar yayılma için gerekli olan doymamış lipitlerin alt fazdaki kayıplarını ortadan kaldırır [24]. Yüzey elastisitesini arttırmaktadır.



Şekil 2. 10. Proteinlerin yerleşimleri [25]

Akciğer yüzey aktif maddesinin bileşenlerine bakıldığında, sağlıklı bir yaşam için nefes alış-verişinin düzgün bir şekilde devam edebilmesi için büyük bir öneme sahip olan kompleks bir karışım olduğu görülmektedir [26]. Ancak, nefes alış-veriş döngüsünün istenildiği gibi sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için hava sıvı ara yüzeyinde bulunan akciğer sürfaktanının ara yüzey gerilimini düşürmesi yetmemektedir. Yüzey aktif

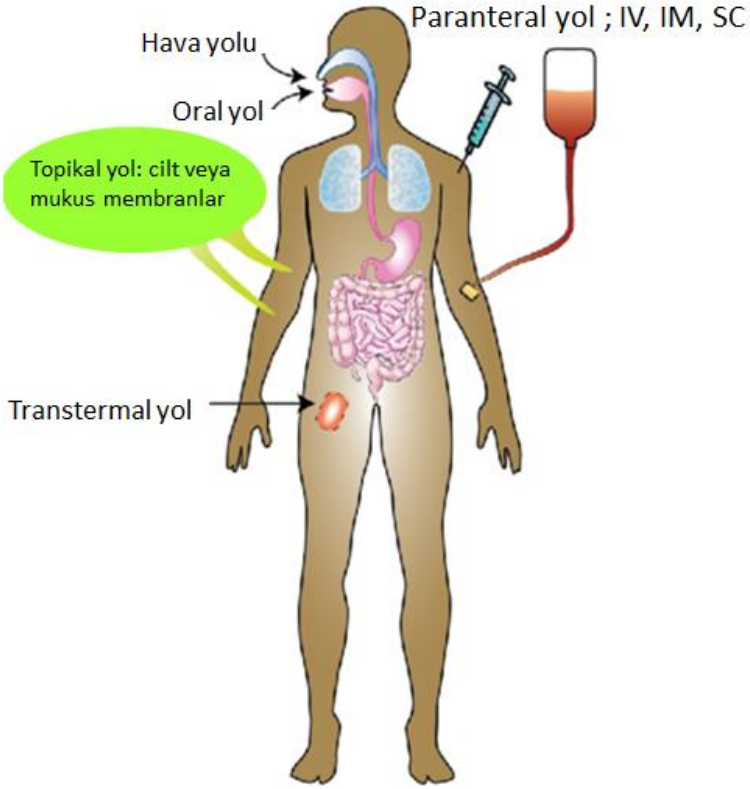
maddenin yayılma süresi, geri yayılım özelliği, sıkıştırılabilirliği, histerisizi ve iyileşme indeksi de önemli özelliklerindendir [30]. Yüzey basıncının yüksek olması alveol yıkılımını önlerken, yüksek geri yayılım oranı ara yüzeye tekrar sürfaktan girişini sağlamakta ve çevrimler arasında yüzeydeki fosfolipitlerin azalmasını önleyerek düşük histerisiz sağlamaktadır. Sıkıştırılabilirliğin düşük olması yıkılım olmadan düşük yüzey gerilimi ve yüksek elastisite sağlamaktadır. İyileşme indeksinin yüksek olması nefes alma sırasında yüzey geriliminin artmasıyla zarar görmeyen alveol sayısını arttırmaktadır.



Şekil 2. 11. Sağlıklı solunum için gerekli özelliklerin nefes alış-veriş çevriminde gösterimi [28]

Yüzey aktif maddenin bileşenlerinden olan DPPC tekli tabakasının yüzey gerilimini düşürdüğünü bilmekteyiz ancak diğer özelliklere sahip değildir. Bunun için DPPC'nin tek başına yeterli olmadığı görülmektedir. Yüzey aktif maddenin bileşenlerinden olan SP-B ve SP-C proteinlerinin eklenmesi diğer özellikleri de kazandırmaktadır [26, 27, 28]. Gerçek akciğer yüzey aktif maddesinde tüm özellikler sağlanmaktadır. Herhangi bir özelliğin bozulması durumunda hastalıklar ve ölümler görülmektedir.

2.3. Vücuda İlaç Alım Yolları



Şekil 2. 12. Vücuda ilaç alım yolları [34]

Vücudumuza ilaç alımı oral, oküler, intravenöz enjeksiyon ve pulmoner gibi bir çok farklı yolla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2. 12). Oral ilaç dağıtımı, sistemik etkiler amaçlandığında ilaç verilmesi için en uygun yoldur [32]. Bununla birlikte, bazı bileşiklerin düşük oral biyoyararlanımı daha etkili yolların araştırılmasına neden olmuştur [33]. İlaç vermenin transmukozal yolları (yani, burun, rektal, vajinal, göz ve ağız boşluğunun mukozal astarlan), sistemik ilaç verme için oral uygulama karşısında belirgin avantajlar sunmaktadır. Belirli bir dağıtım sisteminin etkinliği, sıvı, toz, jel, mikroküre, lipozom veya nanoparçacıklar gibi formülasyonundan da etkilenir. İntranazal ilaç dağıtımı artık oral ve parenteral yollara yararlı ve güvenilir bir alternatif olarak bilinmektedir. Burun iletiminin, merkezi sinir sistemi (CNS) aktif bileşiklerin biyofazında doğrudan ilaç verilmesine izin veren kan-beyin bariyeri (BBB) engellerini atlatmanın elverişli bir yolu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, aşıların uygulanması için de düşünülmüştür [34]. Buna ek olarak, burun içi

absorpsiyon gastrointestinal ve hepatik presistemik metabolizmayı önler ve ilaç biyoyararlanımı gastrointestinal absorpsiyon sonrasında elde edilenle karşılaştırıldığında artırır [35]. Dolayısıyla akut veya kronik burun hastalıklarının yanı sıra ciddi sistemik ilaç maruziyeti gerektiren akut veya kronik durumların tedavisinde de uygun bir yol olduğu görülmektedir [36]. İntranazal yolun yanı sıra inhalasyon ile ilaç alımı, akciğerdeki ilaç etkisini uzun süreler boyunca lokalize edebilir ve sistemik advers etkileri azaltabilir [37]. Nebülizörler, akciğerlere dağıtımı için ilaçları (solüsyonları veya süspansiyonları) aerosolize etmek için kullanılmaktadırlar. Optimum nebülizör sistemi geleneksel olarak yüksek ilaç çıkışı, küçük boyutlu damlacıkların verilmesi ve kısa nebulizasyon süresi olan bir sistem olarak tanımlanmaktadır.

Son yıllarda akciğere ilaç salımı, hem yerel hem de sistemik hastalık durumlarının geniş bir yelpazesini tedavi etme potansiyeli nedeniyle önemli ilgi görmüştür. Pulmoner dağıtım sadece hava yolu hastalıklarının lokal tedavisinde değil aynı zamanda ilaçların sistemik olarak uygulaması için de ilgi odağı olmaktadır [38]. İnhalasyon yoluyla sistemik uygulanmanın önemli rol oynayabileceği hastalıklar; kanser, diyabet gibi metabolik bozukluklar, akut ağrı, bağışıklık yetersizliği, otoimmün hastalıklar ve enfeksiyonlardır. Uygulama alanı olarak akciğerin avantajları geniş yüzey alanı, ince alveolar epitel, kolay geçirgen membran ve geniş vaskülatür olup çözünebilir ve geçirgen aktiflerin hızlı ve yüksek emilimine izin vermesidir [38]. Ayrıca, düşük hücre dışı ve hücre içi enzim aktivitesi nedeniyle ilaçların akciğerde bozunması yavaştır. Dolayısıyla, düşük absorpsiyon oranlarına sahip bileşikler bile, pulmoner uygulamadan sonra nispeten yüksek bir seviyede emilebilirler [39].

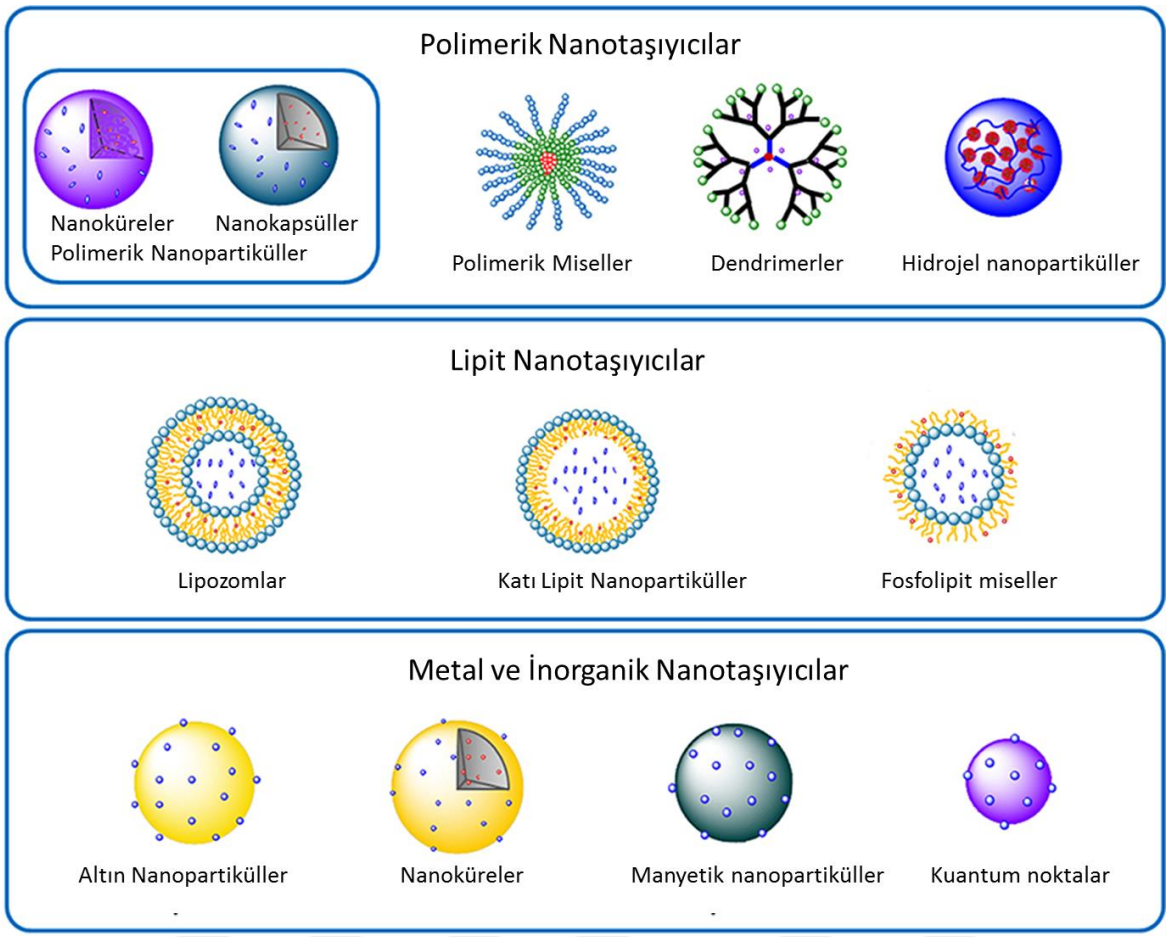
Hava yolu hastalıklarının lokal tedavisinde pulmoner uygulama ile doğrudan akciğer epiteline ulaşmakta ve böylece etki hızlı bir şekilde başlayarak oral yol gibi geleneksel uygulama yollarına kıyasla gerekli doz azaltılmış olmaktadır [39].

İnhalasyon yolu ile ilaç alımının, sistemik dolaşıma ulaşmadan önce akciğer epitelyal bariyerler aracılığıyla birçok ilacın alınmasında sınırlamalar vardır. İlaçlar, özellikle hidrofilik, polar veya yüksek moleküler ağırlıklı (makromoleküller) oldukları takdirde, sistemik absorbsiyonları olmadan biyolojik aktiviteleri gösterememektedir [40-42]. Mukus tabakası, hava yolu epitel hücreleri tarafından salgılanan alveolar makrofaj klirensi ve solunum sürfaktanları, solunum yolunun bariyer fonksiyonunun birincil bileşenleridir. Tüm bu faktörler, akciğerdeki patojenler, alerjenler ve partiküler materyallere karşı ilk savunma hattına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır [43]. Bu nedenle, eğer ilaçların akciğer yoluyla sistemik olarak sağlanması başarılırsa, bu bariyerlerin, en azından geçici olarak, solunum yolundan etkili ilaç emilimine karşı, aşılması gerekir [43].

2.4. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Kullanılabilecek İlaçlar

Misel çözeltileri, vesikül ve sıvı kristal dispersiyonları gibi koloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin yanı sıra 10-400 nm çapında küçük partiküllerden oluşan nanopartikül dispersiyonları, ilaç verme sistemleri olarak büyük umut vaat etmektedir. Bu formülasyonları geliştirirken, amaç en iyi hale getirilmiş ilaç yükleme ve bırakma özellikleri, uzun raf ömrü ve düşük toksisiteli sistemleri elde etmektir. Dahil edilen ilaç, sistemin yapısına katılmakta ve özellikle ilaç amfifilik özellikte ise moleküler etkileşimler nedeniyle yapıyı etkileyebilmektedirler.

Nanotaşıyıcılar, spesifik reseptörlere bağlanıp hücreye giriş yaptığında genellikle endozomlar tarafından kuşatılırlar, böylece hücrenin ilaca karşı olan direnç mekanizması by-pass edilmiş olur [44].



Şekil 2. 13. İlaç Taşıyıcı Sistemler [45]

1.Polimerik Taşıyıcı Sistemler:

Hazırlama yöntemine bağlı olarak, ilaç fiziksel olarak polimer matrisine tutturulmakta veya kovalent olarak bağlanmaktadır. Ortaya çıkan bileşikler, kapsül (polimerik nanopartiküller), amfifilik göbek/kabuk (polimerik miseller) veya aşırı dallı makromoleküller (dendrimerler) yapısına sahip olabilmektedir. İlaç konjugatları olarak kullanılan polimerler doğal ve sentetik polimerler olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Polimerik Nanopartiküller: Albumin, kitosan ve heparin gibi polimerler doğal olarak bulunmaktadır ve oligonükleotidlerin, DNA'nın ve proteinin yanı sıra ilaçların verilmesi için tercih edilen bir materyal olmaktadır.

Polimerik Miseller: Misellerin işlevsel özellikleri, amfifilik blok kopolimerleri temel almaktadır ve bunlar, sulu ortamda bir nano boyutlu çekirdek/kabuk yapısı oluşturmak üzere bir araya getirilmektedir. İlaç

fiziksel kapsülleme veya kimyasal kovalent bağlanma şekillerinde polimerik bir misele yüklenebilmektedir [44].

Dendrimerler: Sayısız küçük moleküllerden oluşan 3 boyutlu yapılardır. Bir dendrimer, merkezi çekirdekten radyal olarak çıkan çok sayıda dallanmış monomerlerden oluşan nanometre boyutlarında sentetik bir polimerik makromoleküldür. Bu moleküller nispeten düzgün şekillerde, boyutlarda ve molekül ağırlıklarındadır [44]. Bu nanokarbonlar, fotokimyasal terapi ve antifungal moleküller için fotosensitizerleri taşımak için kullanılmaktadırlar [46].

2.Metal ve İnorganik Taşıyıcı Sistemler:

Altın Nanopartiküller: Altın nanoparçacıklara kolloidal altın denmektedir. Nano boyutlu altın kolloidler mavi veya kırmızı renkte görünebilmektedir. Altın nanopartiküller geniş yüzey alanı ve yüksek elektron iletkenliği nedeniyle biyoteknoloji ve biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak uzun süreli sitotoksisite gibi dezavantajlara sahiptir [47].

Manyetik Nanopartiküller: Manyetik alanlar kullanarak manipüle edilebilen bir nanopartikül sınıfıdır. Bu gibi parçacıklar yaygın olarak manyetik bir malzeme (çoğunlukla demir) ve işlevselliği olan bir kimyasal bileşen (nikel ve kobalt) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır.

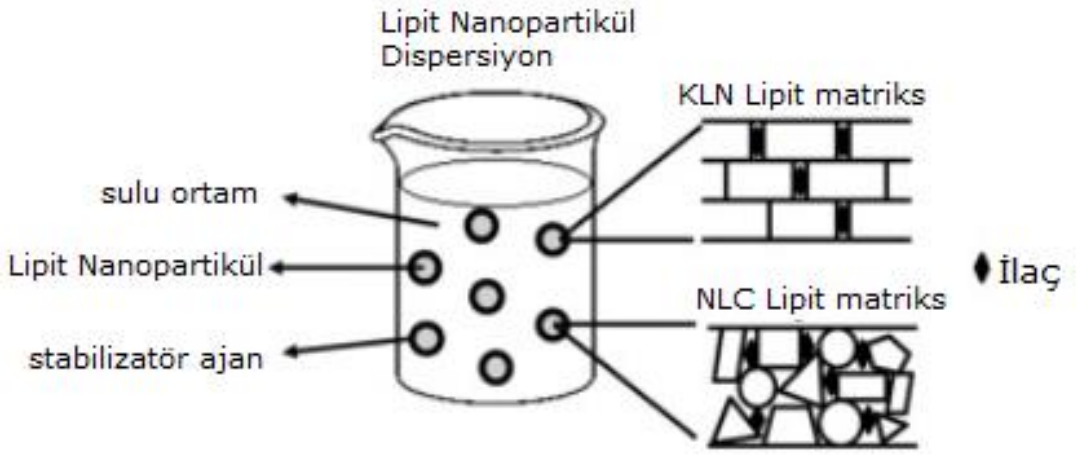
Nanoküreler: Nanokompozit materyallerin özel bir sınıfını oluşturmaktadırlar. Bunlar konsantrik parçacıklardan oluşur; burada, bir maddenin parçacıkları, özel prosedürler kullanılarak başka bir malzemenin ince bir tabakasıyla kaplanmaktadır. Çekirdeğin veya kabuk malzemesinin her ikisinden oldukça farklı olan ve özel özelliklere sahip, oldukça fonksiyonel malzemeler olarak bilinmektedirler. Bunların özellikleri ya oluşturan malzemeler ya da göbek-kabuk oranı değiştirilerek değiştirilebilmektedirler [48].

Kuantum Noktalar (QD): QD'ler nanometre boyutunda yarı iletken kristallerdir; yüzey kristalleri suda çözünebilmektedir ve biyouyumlu

olabilmektedir. Hedefleme moleküllerine tutturulabilir ve floresan problar olarak kullanılabilmektedirler [49].

3.Lipit Nanotaşıyıcı Sistemler:

Lipozomlar: Lipozomlar, lipit çift tabakalarından oluşan kendi kendini monte eden kapalı koloidal yapılardır ve içinde bir dış lipit çift tabakasının merkezi bir sulu boşluğu çevreleyen küresel bir şekle sahiptirler.



Şekil 2.14. KLN ve NLC yapıları

Katı Lipit Nanopartiküller (KLN): KLN lipit matrisi, katı bir lipiti veya neredeyse mükemmel bir kristal yapı oluşturan katı lipitlerin bir karışımını içermektedir [38].

Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar: Katı ve sıvı lipitlerin bir karışımından oluşan ve katı partikül boyutu nanometre aralığında olan katı bir lipit çekirdeği ile karakterize edilen koloidal taşıyıcılar olarak bilinmektedirler [44].

Pulmoner uygulama için nanotaşıyıcı sistemler popüler bir konudur; bununla birlikte, biyouyumluluk ve biyolojik bozunabilirlik, yeterli ilaç yüklemesi, ilacın bozunmaya karşı korunması, aerosolizasyon sırasında stabilite gibi birçok özelliğe sahip olması gerekmektedir. Son yıllarda lipit nanopartiküllerin bu gereklilikleri yerine getirebildiğini ve dolayısıyla pulmoner uygulama için uygun bir dağıtım sistemi olabileceğini görmekteyiz [38]. Lipozomlar, nanoemülsiyonlar ve polimerik

nanoparçacıklar gibi diğer nanotaşıyıcılara alternatif olarak KLN ve NLC'ye olan ilgi yalnızca akciğer uygulaması için değil genel olarak artmaktadır [38].

Pulmoner ilaç dağıtımı için lipit nanopartiküllerin birçok avantaja sahip olduğu görülmektedir. Bunlardan ilki, biyolojik olarak parçalanabilen, toksik olmayan, çoğunlukla endojen degradasyon ürünleri ile sonuçlanan lipitler seçilirse solunum yollarında KLN ve NLC'nin iyi tolere edilebilirliği sağlanabilmektedir [50]. Dahası, boyutundan dolayı nanopartiküller partikülllere kolayca tutunabilmekte veya aerodinamik açıdan uygun özelliklere sahip damlacıklar aerosol haline getirilebilmekte, böylece aktif bileşiğin akciğerin derinine ulaşması sağlanabilmektedir.

Pulmoner dağıtımda nanopartiküllerinin kullanımını araştıran birçok çalışma mevcuttur . Bu alandaki deneysel çalışmalar genellikle Langmuir film dengesi (LFB) gibi fizikokimyasal ölçüm sistemlerinde, boyut, şekil ve yüzey özellikleri açısından uygun şekilde tanımlanmış model NP'lerin kullanımı ile yapılmaktadır [68-70]. Tipik olarak, yüzey sıkıştırması sırasında fosfolipit tekli tabakaları için kaydedilen yüzey basıncı-alan (Π-A) izotermleri veya yüzey osilasyonları sırasında ölçülen Π-A histerezi, ara yüzey filmi üzerindeki NP'lerin etki mekanizmalarını aydınlatmak için analiz edilmektedir. Bu çalışmaların bulguları, NP'lerin hava-sıvı ara yüzeyindeki tekli tabakaya dahil edilebildiğini, yüzey deformasyonu sırasında tekli tabakanın mimarisini ve mekanik koşullarını değiştirebildiğini (ara yüzeyin reolojik özelliklerinin değişmesi) göstermektedir [69]. Bu çalışmalarda partiküllerin yüzey özelliklerinin (hidrofobik/hidrofilik), boyutlarının ve yüzey yüklerinin lipit tekli tabaka ile etkileşiminde güçlü bir etkiye sahip olduğu üzerinde durulmaktadır. Guzman ve arkadaşları 30 nm silika nanoparçacıkların (yani negatif yüklü hidrofilik NP'lerin) hava tabakası üzerinde DPPC, DPPC/DOPC ve DPPC/palmitik asit tekli tabakaları ile temel etkileşimlerini incelemiş ve yüzey katmanına dahil edilmiş NP'lerle kısmen hidrofobik komplekslerin oluşma olasılığını düşündürmüştür. Bu tür kompleksler, mevcut ara yüzey

alanını etkili bir şekilde azaltmakta ve daha önceki bir yoğunlaşma (LE-LC faz geçişi) ve yüzey sıkıştırma sırasında fosfolipit tekli tabakasının çökmesi ile sonuçlanmaktadır. NP'lerin ara yüzey filmine dahil edilmesi, BAM ve AFM sonuçları ile gösterilmiş ve ayrıca hava-su ara yüzünün reolojik özelliklerini etkilediği de gösterilmiştir [69]. Hidrofobik karbon siyahı nanopartikülleri (15-20 nm) için yapılan benzer çalışmalar, muhtemelen fosfolipit moleküllerinin polar olmayan kısımlarına çekilmesinin neden olduğu monomoleküler tabaka ile ilişkilerini göstermiştir. DPPC özelliklerinin değiştirilmesi, silika için karbon siyahı nanopartiküllerine kıyasla belirgin olarak daha güçlü olmuştur [68]. Diğer bir örnek çalışmaya sahip olan Farnoud ve Fiegel, DPPC monolayer üzerinde 1 mg/L konsantrasyonunda sıvı fazda bulunan negatif yüklü (karboksil modifiyeli) 200 nm polistiren parçacıkların etkilerini analiz etmiştir. NP'lerin elektrostatik etkileşimler yoluyla lipit ile etkileştiğini, özellikle floresan ve BAM mikroskobu ile gösterilebilen yüzey sıkışması sırasında yoğunlaşmış alanların oluşumunu etkilediğini göstermişlerdir (NP'lerin varlığında artan sayıda küçük alan oluşturulmuştur) [71]. Harishchandra ve arkadaşları DPPC, DPPC/DPPG ve DPPC/DPPG/SP-C (surfaktan protein C) tekli tabakaları ile 22 nm poliorganosiloksan NP'lerin etkileşimleri üzerinde durmuştur [72]. Bu tür hidrofobik NP'lerin, DPPC ile ara yüzeyde yapısal değişikliklere, daha büyük moleküler alanlara kayma izotermlerine ve birlikte var olan bölgeye (LE-LC) karşılık gelen platoyu modifiye ettiğine işaret etmiştir. Daha yüksek partikül konsantrasyonlarında, yüzey aktif malzemenin NP'ler üzerine adsorpsiyonu ve yüzey aktif madde ile kaplanmış NP'lerin alt faza ardışık olarak yer değiştirmesi gözlenmiştir. Yüksek NPs içeriğinde, ara yüzdeki DPPC miktarı, sıkıştırma altında yüksek yüzey basınçlarının elde edilmesine izin vermeyecek kadar azaltılmıştır. Çok komponentli bir PS modeli (DPPC/DPPG/SP-C) ile yapılan ölçümler ayrıca, test edilmiş NP'lerin, daha yüksek basınçta (50 mN/m'nin üzerinde) tek tabakadan protein dışlanmasının karakteristik bölgesi üzerindeki belirgin etkilerini göstermiştir. Floresan mikroskobu çalışmaları, NP'lerin, alan sınırları içine

girerek yüzey sıkıştırma sırasında alan oluşumunu etkilediğini ve böylece büyümelerini önlediğini doğrulamıştır. Ayrıca NP'lerin film genişletilmesi sırasında yayılmayı engelledikleri, böylece salınan fizyolojik sistemde pulmoner sürfaktanın işlevini bozabilecekleri de gösterilmiştir. Tatur ve Badia ise, sıkıştırma eğrilerini ölçerek ve mika üzerine aktarılan filmlerin BAM ve AFM analizlerini yaparak alkiltiolat kaplı altın NP'lerin (hidrofobik, 2 nm ± 0 5 nm) varlığında DPPC ve pulmoner sürfaktanın Langmuir tekli tabakalarını incelemiştir [73]. Yine, lipit-NP agregatları, fosfolipitin karşılık gelen yüzey konsantrasyonlarında sadece Π-A ilişkisini hafifçe etkilemekle birlikte, yoğunlaştırılmış alanların boyut ve şeklini değiştirme kapasitesi ile tespit edilmiştir. Ayrıca bu yazarlar, yüzey mimarisinde hidrofobik sürfaktan ile ilişkili proteinlerin (SP-B ve SP-C) rolünü gösteren çok bileşenli yüzey aktif madde (Survanta) için de LFB deneyleri yapmışlardır. Tüm bu çalışmaların sonuçları NP'ler ve pulmoner sürfaktan fosfolipitler arasındaki etkileşimlerin materyale özgü olduğunu doğrulamaktadır.

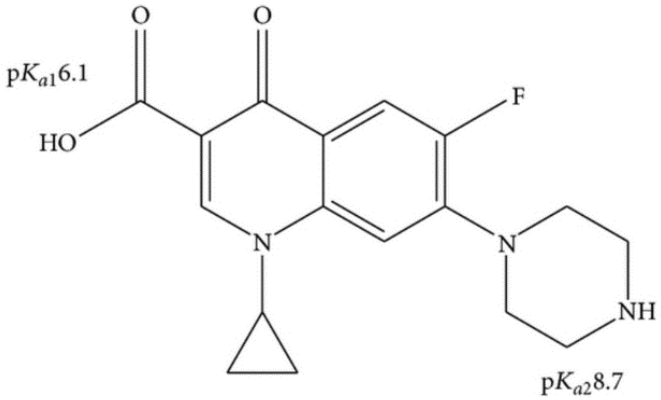
İnhalasyon terapisinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılması amaçlanan tüm NP'lerin biyo-uyumlu olması gerekir, yani, enflamasyonu indüklememeli ve biyolojik olarak bozunmamalı ya da en azından, istenmeyen sağlık etkilerine neden olmadan vücuttan kolayca temizlenebilmelidirler. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmasının avantajı, 100 nm'den küçük partiküllerin, zayıf kemotaktik sinyallemeye bağlı olarak alveolar makrofaj tarafından zayıf bir şekilde tanınmaları nedeniyle fagositozdan kurtulabilmelerinden kaynaklanmaktadır [74]. NP'ler epitelyal hücreler (transsitoz) tarafından alınabilmekte ve kana transloke edilebilmektedirler [75].

Çeşitli hastalıkların tedavisi için yukarıda anlatılan ilaç taşıyıcı sistemler kullanılabilmektedir. Pulmoner ilaç taşınımı için uygun olabilecek çeşitli ilaçlara örnekler aşağıda verilmiştir.

İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Kullanılabilecek Örnek İlaçlar

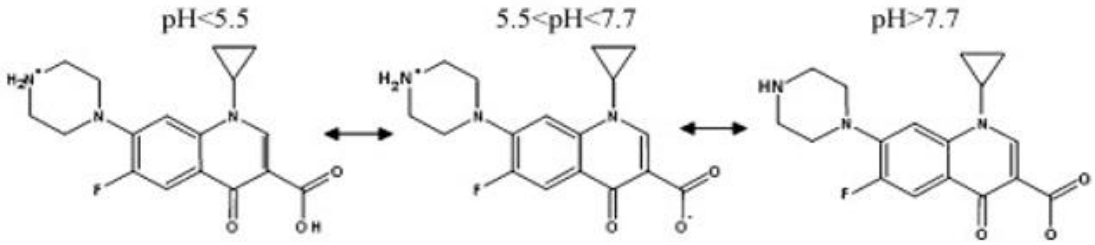
Tez kapsamında kullanılan ilaçlar farklı özelliklere sahip oldukları için seçilmiştir.

1. Siprofloksasin (Cipro) Etken Maddesinin Özellikleri



Şekil 2.15. Siprofloksasin molekül şekli [51]

6-Florokinolonlar yapısal olarak nalidiksik asit ile ilişkili, yaklaşık 10 yıl önce piyasaya sürülen ve geniş bir aralıktaki enfeksiyonlar için kullanılan sentetik bir antibiyotik grubudur. Saf siprofloksasin hava-su ara yüzeyinde bir film oluşturamamaktadır [52]. Siprofloksasin genel olarak iyi tolere edilebilmektedir ve tüm antibiyotiklerin en güvenilirlerinden biri olarak çok az reaksiyon vermektedir [53] .



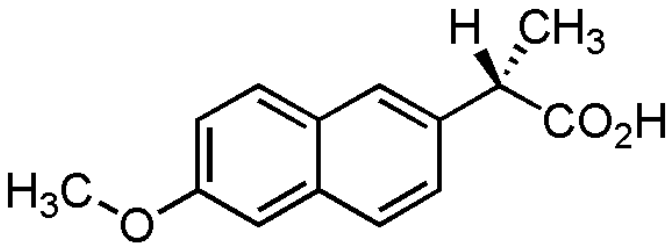
Şekil 2.16. Siprofloksasinin farklı pHlarda yapısı [58]

Cipro için çalışılan pH değeri oldukça önemlidir. Çünkü farklı pH aralıklarında Cipro'nun yükü ve çözünürlüğü değişmektedir [54].

Cipro'nun yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotik olmasının yanında kistik fibroz tedavisinde de kullanımından dolayı pulmoner ilaç dağıtımı yoluyla verildiği çalışmalar literatürde mevcuttur [80,81]. Conley ve arkadaşları(1997) tarafından yapılan bir çalışmada,

Cipro lipozomunun aerosol haline getirilmiş olarak verilmesinin, farelerde ilacın terapötik etkinliğini arttırdığını belirtmiştir [78]. Ayrıca, bazı çalışmalara Cipro lipozomlarının, alt solunum yolundaki ilacın sürekli terapötik dozunu sağlayabildiğini ve serbest ilacınkine kıyasla hücre içi dağıtımını arttırabildiğini göstermiştir [79]. Moazeni ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise lipozom yerine niozom kullanılarak Cipro'nun pulmoner dağıtımı incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda, sonuçlar niozomun, nebülizasyon yoluyla Cipro'nun pulmoner iletimi için bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini göstermiştir [76].

2. Naproksen (Nap) Etken Maddesinin Özellikleri



Şekil 2. 17. Naproksen molekül şekli [49]

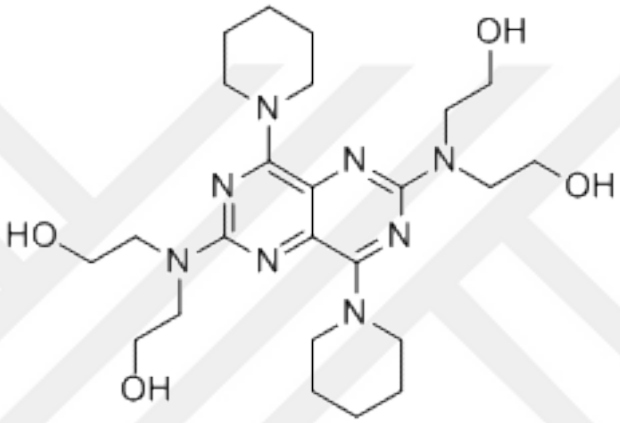
Naproksen, hafif ila orta şiddette ağrı, ateş, inflamasyon ve sertlik azalması için sıklıkla kullanılan non-steroid anti-inflamatuar (NSAID) bir ilaçtır [56]. Anti-inflamatuar dışında anti-piretik, analjezik ve son yıllarda yapılan çalışmalarda anti-kanser ilacı olarak kullanılmaktadırlar. Aromatik halkalar içerir ve zayıf karboksilik asittir. Böylece sulu ortamda, hem yüklenmemiş hem de anyonik formlar halinde bulunmaktadırlar [57].

Oral olarak uygulandığında Nap 8 saat gibi bir süre yararlı olmaktadır. Farmakolojik eylemin sürdürülmesi için tekrarlanması gerekmektedir. Kronik inflamatuar hastalıkları olan hastalara NSAID'lerle uzun süre tedavi yapılmaktadırlar [58]. Bu yüzden akciğerden alınması ilacın tedavi etkisini daha çok arttırmaya ve yan etkilerini azaltmaya yönlendirmektedir.

NSAID'ler zivitteriyonik fosfolipitler ve özellikle doğada tersinir ve kovalent olmayan fosfatidilkolin (PC) ile iyonik ve hidrofobik bağlar oluşturmak için güçlü bir afiniteye sahiptirler. NSAID'lerin hem biyolojik

hem de sitotoksik yanıtları etkileyebilecekleri alternatif mekanizmalardan biri, hücresel membranlarla etkileşim kurmak ve biyofiziksel özelliklerini değiştirmektir. NSAID'ler, hücre membranlarının akışkanlık, geçirgenlik ve biyomekanik özelliklerinde değişiklikler meydana getirebilmektedirler [59]. Genel olarak, negatif yüklü NSAID'lerin zwitterionik tabaka özellikleri üzerindeki etkisi beklendiği şekilde, yüklü moleküller su/tabaka ara yüzüne çok daha yakın bulunur ve yüklü grupların hidrasyonuyla birlikte yapının ufak bozulmasına neden olmaktadırlar[57].

3. Dipiridamol (Dip) Etken Maddesinin Özellikleri



Şekil 2.18. Dipiridamol molekül şekli [60]

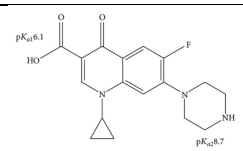
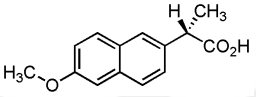
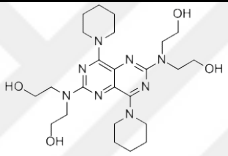
Dipiridamol anti-trombosit ve vazodilatasyon aktiviteleri için koroner kalp hastalıklarında kullanılmaktadır [61]. Ayrıca, süperoksit ve hidroksit radikal süpürücü olarak antioksidan etkisi göstermektedirler ve zincir kırma aktivitesi, E vitamini kadar güçlü, etkili bir biyolojik anti-oksidan oluşturmaktadır [62].

Dipiridamol, pKa değeri 6.4 olan zayıf bir bazdır ve suda, nötr pH'da veya altında (<4-6.7 g/ml) az çözünürlerken asidik pH'da (<3) kolaylıkla çözünebilmektedirler [63].

Antitümör ilaç koaktivatörü olan Dip, DPPC tekli tabakalarına dahil edilmeleri üzerine, özellikle yüksek konsantrasyonlarda doyma noktasına ulaşan LE-LC faz geçişinde telaffuz edilen genleşmeye neden olmaktadır. Genişleme, DPPC filminin baş grubu bölgesiyle etkileşime atfedilmektedir [80]. Başka bir deneyde, Dip ve DPPC'nin birlikte yayılması, çok düşük

ilaç konsantrasyonunda (~%0.2 mol), ilacın yüzey basıncında olduğu kadar geçiş basıncında da gözlemlenebilir değişiklikleri indüklediğini göstermiştir. Bir eşik konsantrasyonunun (%0.5 mol) üzerinde, Dip etken maddesinin LE-LC faz geçişi üzerinde ters etki yapmakta olduğu belirtilmiştir [81].

Çizelge 2. 1. İlaçların Özelliklerinin Özeti

İLAÇLAR	***Molekül Şekilleri***	***İyoniklik***	***Hidrofobisite***
Cipro (Antibiyotik)		Zivitteriyonik	Hidrofilik
Dip (Kardiyak)		Yüksüz	Hidrofobik
Nap (Antiinflamatuar)		Anyonik	Hidrofobik

2.5. Langmuir Tabakası Biyofiziksel Özelliklerinin İncelenmesi

Ara yüzeyde, hidrofobik veya ara yüzey aktifliği yüksek olan maddelerle lipit karışımları arasındaki etkileşimleri ve oluşturdukları langmuir tekli tabakalarının özelliklerini belirlemek son derece önemlidir. Bunun için birçok yöntem kullanılmaktadır.

2.5.1. Termodinamik Açıdan Karışabilirlik (Gibbs Serbest Enerjisi)

Ara yüzeyde tekli tabakayı oluşturan iki maddenin karışabilirliklerini incelemek için ara yüzey termodinamik olarak incelenmesi gerekmektedir. Bunun için Eşitlik 2.2'den ara yüzeyin Artık Gibbs Serbest Enerjisi hesaplanmaktadır.

$$\Delta G_{ex} = \int_0^{\pi} [A_{1,2} - (x_1 A_1 + x_2 A_2)] d\Pi \qquad \text{Eşitlik 2.2}$$

Burada, Π, tekli tabakanın yüzey basıncı; $A_{1,2}$, tekli tabakanın seçilen bir basınçtaki alanı; A_1 ve A_2, saf haldeki maddelerin seçilen basınçtaki

alanları; x_1 ve x_2, ara yüzeydeki tekli tabakayı oluşturdukları mol oranlarıdır.

Eşitlik 2.2'den hesaplanan artık Gibbs Serbest Enerjisinin pozitif olması, tekli tabakayı oluşturan maddelerin aralarında itme etkileşimi olduğunu ve karışabilen-ideal olmayan tekli tabaka oluşturabildiğini; negatif olması, tekli tabakayı oluşturan maddelerin aralarında çekme etkileşimi olduğunu ve karışabilen-ideal olmayan tekli tabaka oluşturabildiğini; sıfır olması ise tekli tabakayı oluşturan maddelerin karışabilen-ideal olmayan tekli tabaka oluşturabildiğini ya da karışamamakta olduğunu göstermektedir [64, 65].

2.5.2. Ara yüzeyden Madde Kaybı Hesabı

Ara yüzeye eklenen madde ile birlikte ara yüzeyde bulunan madde miktarında artma veya azalma olabilmektedir. Bu madde miktarı değişiminin hesaplanması gerekmektedir. Bunun için belirli bir yüzey basıncında her sıkıştırma için ara yüzeyde tekli tabakanın birinci sıkıştırmasında ara yüzeyde bulunan lipit miktarı %100 kabul edilerek, belirli bir basınçta değişen yüzey alanından ara yüzeyden kaybolan madde miktarı hesaplanmaktadır [66].

2.5.3. Elastisite Hesabı

Elastisite, kesme ve genişleme elastisitesi olmak üzere iki şekilde hesaplanmaktadır.

Kesme elastisitesi, yüzeyin tek yönlü sıkıştırılmasıyla, yüzey basıncındaki değişimin yüzey alanındaki değişime oranıyla Eşitlik 2.3'ten elde edilen reolojik bir parametredir. Kesme elastisitesi yüzeyi iki boyutlu olarak analiz ettiği için LB trough verilerinden yararlanılmaktadır.

$$\varepsilon = \frac{(\pi_1 - \pi_2)}{\ln(A_1 - A_2)} \qquad \text{Eşitlik 2.3}$$

A_1 alan değerindeki yüzey basıncı Π_1, A_2 alan değerindeki yüzey basıncı Π_2 'dir [64].

Genişleme elastisitesi ise yüzeyi her yönde sıkıştırarak elde edilmektedir. Bu da 3 boyutlu olarak yüzey analizi yapılan pendant drop cihazıyla elde edilen verilerden yararlanılarak hesaplanmaktadır. Alveollerin dinamik olarak nefes alış-verişini simule etmek için sabit frekansta pendant drop cihazı ile oluşturulan damlanın salınımı sinüzoidal olarak gerçekleştirilmektedir. Damlanın yüzey alanının değişimiyle deformasyon sağlanmaktadır ve dinamik elastisite bu şekilde hesaplanmaktadır.

$$\varepsilon^{*}=\varepsilon^{'}+i\,\varepsilon^{''} \qquad \text{Eşitlik 2.4}$$

ε^{*}, ara yüzey genişleme modülü; $\varepsilon^{'}$, depolama modülü (sistemdeki geri dönüştürülebilir enerji) ; $\varepsilon^{''}$, kayıp modülü (nefes almadaki kaybolan enerji) dür [67].

$$\varepsilon^{*} = \frac{\Delta\gamma}{\Delta lnA} = \frac{\Delta\gamma}{\Delta A/A_0} \qquad \text{Eşitlik 2.5}$$

Eşitlik 2.5'teki ;

$\Delta A = A-A_0=A_a \sin(wt)$ olarak ifade edilmektedir. Burada, w, osilasyon frekansını; A_a, alan genişliğini; A_0, denge alanını ifade etmektedir.

$\Delta\gamma=\gamma-\gamma_0= \gamma_a \sin(wt+\theta) = \gamma_a \sin(wt)\cos\theta + \gamma_a \cos(wt)\sin\theta$ olarak ifade edilmektedir. Burada, γ_a, yüzey gerilim genişliğini; γ_0, denge yüzey gerilimini; θ, faz açısını ifade etmektedir.

Sonuç olarak;

$$\varepsilon^{*} = \frac{\Delta\gamma}{\Delta lnA} = \frac{\gamma a \sin(wt)\cos\theta + \gamma a \cos(wt)\sin\theta}{Aa \sin(wt)/A_0} \qquad \text{Eşitlik 2.6}$$

2.5.4. Tekli Tabakanın Reolojik Cevabının Doğrusallığının İncelenmesi

Solunum döngüsü sırasında alveol sürfaktan filmi, 0.04-0.2 Hz frekans arasında değişen, yüzey basıncı 35-40 mN/m değerinde bir referans durum etrafında yaklaşık %30-40 periyodik alan pertürbasyonuna tabi tutulmaktadır [28]. Dikkate alınan tekli tabakalar için $\Delta A/A_0$ değerini arttırmak lineer olmayanlığı arttırmak demektir. Ancak DPPC tekli tabakası için $\Delta A/A_0$ değeri 0.2'den sonra bir pilatoya ulaşmaktadır [62].

Bu lineerliğin göstergesi olmaktadır. Partiküllerin eklenmesinin bu sürfaktan filminin lineerliğine etkisinin incelenmesi son derece önemlidir ve bu konuda literatürde çeşitli partiküller kullanılarak etkileşimler incelenmektedir [68-71]. Doğrusallık analizi, yüzey basıncı tepkisinin Fourier dönüşümü (FFT) kullanılarak etkili bir şekilde Eşitlik 2.7'den yapılmaktadır.

$$THD = \frac{\sqrt{\sum_{k>1} \Delta\sigma_k^2}}{\Delta\sigma_1} \qquad \text{Eşitlik 2.7}$$

3.DENEYSEL YÖNTEMLER

Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, farklı hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçların ve sentezlenen ilaç taşıyıcı sistem olan katı lipit nanopartikülün elde edilen akciğer yüzey aktif madde özütü ve akciğer yüzey aktif maddesi içinde en çok bulunan lipit olan DPPC ile etkileşimlerinin incelenmesi olarak özetlenebilir.

3.1. Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında katı lipit nanopartikül sentezleme aşamasında, stearik asit ve Tween 20 Merck'ten; Pluronik F 127 Aldrich'ten alınmıştır. LB ölçümleri ve salım için kullanılan tampon çözeltileri için sodyum klorür(NaCl) ve sodyum fosfat monobazik monohidrat (NaH2PO4.H2O) Sigma-Aldrich'ten; disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na2HPO4.12H2O) Merck'ten alınmıştır. Ara yüzeyle etkileşim özelliklerinin incelenmesi için akciğer yüzey aktif madde karışımında miktarca en çok bulunan fosfolipit, DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospohocholine), Sigma-Aldrich'ten; doğal akciğer yüzey aktif maddesi elde etmek için sığır akciğeri tarafımıza Sincan Et ve Süt Kurumu'ndan hediye edilmiştir.

Etkileşiminin inceleneceği ilaçlar olan naproksen, siprofloksasin ve dipirimidamol Sigma-Aldrich'ten alınmıştır. Çözeltilerinin hazırlanması için kullanılan çözücüler, etanol, metanol, hekzan ve kloroform Sigma-Aldrich'ten alınmıştır.

Deneylerin tümünde ultra saf su (Millipore) kullanılmış (18.2 mΩ.cm) ve deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (22 °C).

3.2. Katı Lipit Nanopartikül Sentezi

3.2.1. Mikroemulsiyon Hazırlama

KLN oluşturmak için ilk önce stabil ve şeffaf mikroemulsiyon hazırlanması gereklidir. Mikroemulsiyon (ME) için emulsifiye edici ajan ve lipit bileşenleri ayrı ayrı hazırlanır, istenilen sıcaklığa getirildikten sonra uygun yöntemlerle karıştırılır.

Lipit çözeltisi hazırlamada birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında lipit çözdürülmesi yöntemi kullanılmaktadır. Lipit olarak seçilen stearik asit etanol ile çözdürülüp sıcaklığı 70°C'ye çıkarılmıştır ve 10 dk boyunca bu sıcaklıkta manyetik karıştırma tekniği ile karıştırılmıştır.

Emulsifiye edici ajan çözeltisi hazırlamada ise, seçilen maddeler belirli oranlarda saf su ile karıştırılmış ve çözelti 70°C'ye getirilmiştir. Manyetik karıştırma yöntemi kullanılarak çözeltinin homojenizasyonu sağlanmıştır.

Aynı sıcaklıktaki emulsifiye edici ajan çözeltisi lipit çözeltisi üzerine hipodermik enjektör ile eklenmiş ve 10 dk daha manyetik karıştırma uygulanmıştır. Karıştırma yapılır yapılmaz şeffaf ME oluşumu gözlenebilmektedir.

3.2.2. KLN Oluşturma

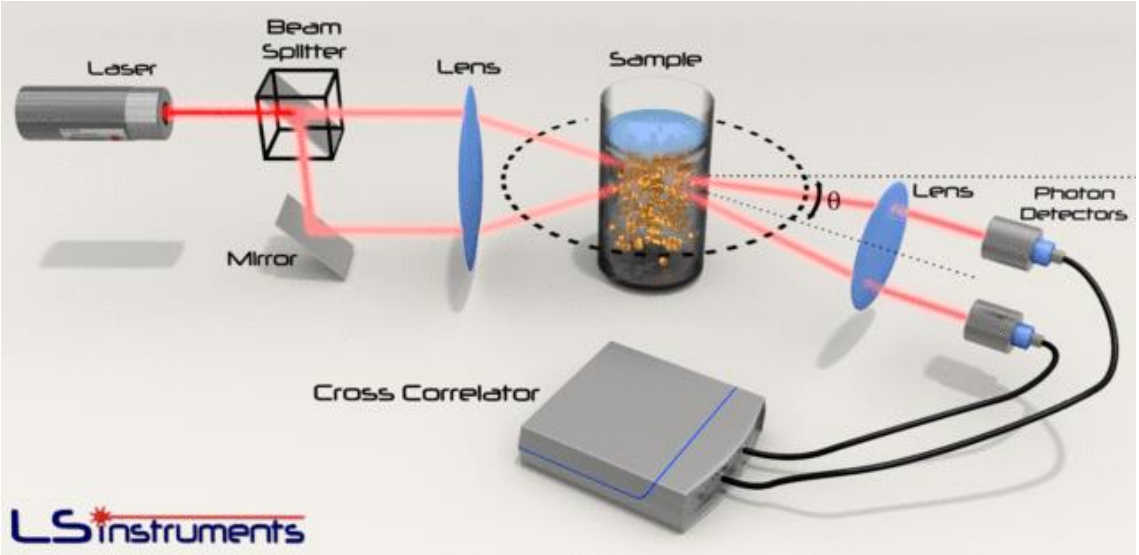
KLN oluşturma aşamasında hazırlanan ME, manyetik karıştırıcı üstündeki soğuk su banyosunda bulunan ve sıcaklığı 2-3°C'de sabit tutulan hacimce 1:20 olan saf su içine hipodermik enjektör yardımıyla enjekte edilerek 10 dakika boyunca karıştırılır. Oluşturulan tüm KLN'ler -20°C'de buzlukta saklanır. Yapılan tüm deneylerde KLN'ler sıvı çözelti olarak kullanılmıştır, liyofilize edilmemiştir.

3.3. Sentezlenen Katı Lipit Nanopartikülün Karakterizasyonu

Sentezlenen KLN'nin boyut ve yük analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Işık Saçınım Yöntemi (LS)

Boyut analizini yapmak için lazer dalga boyu 632.8 nm olan, Malvern CGS-3 serisine ait LS cihazı ve ALV-correlator kullanılmıştır. Işığın malzeme üzerine gelmesiyle oluşan etkileşim sonucu saçılan ışık miktarı ve şiddeti, malzemenin boyut ve şekli hakkında bilgi vermektedir.

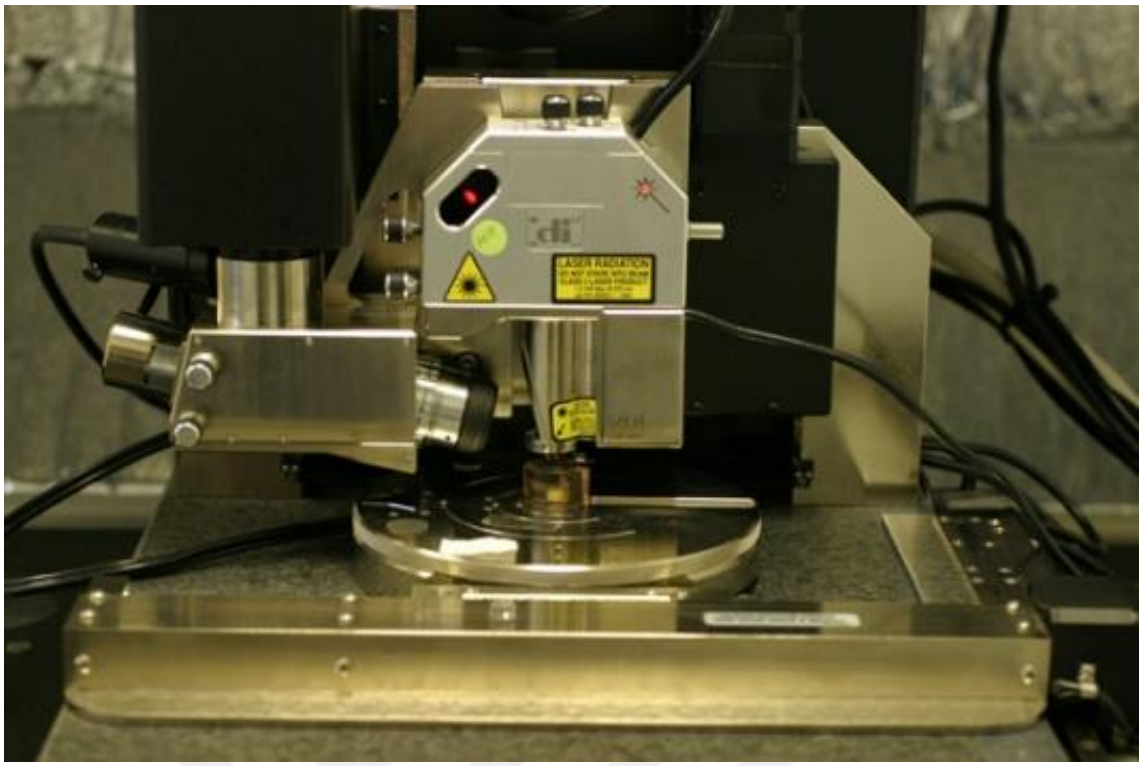


Şekil 3. 1. Işık saçınımının şematik gösterimi

Işık saçınım yöntemleri dinamik ve statik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Cihaz, ölçüme başlamadan yarım saat önce ışık yoğunluğunun istenen düzeye gelmesi için açılır. Örnek, 0.02 μm gözenek büyüklüğündeki filtrelerle süzülmüş toluenle dolu hazneye yerleştirilmeden önce toluenden kaynaklı safsızlık kontrolü yapmak için standart ölçümler yapılır.

3.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Sentezlenen KLN'nin boyut analizi, boyut dağılımı ve geometrileri hakkında bilgi sahibi olmak için ölçümler, (PSIA Corporation, XE-100E) non-contact modda ACTA 10M tipi Cr-Au cantilever'lar kullanılarak ve 0.37 Hz tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

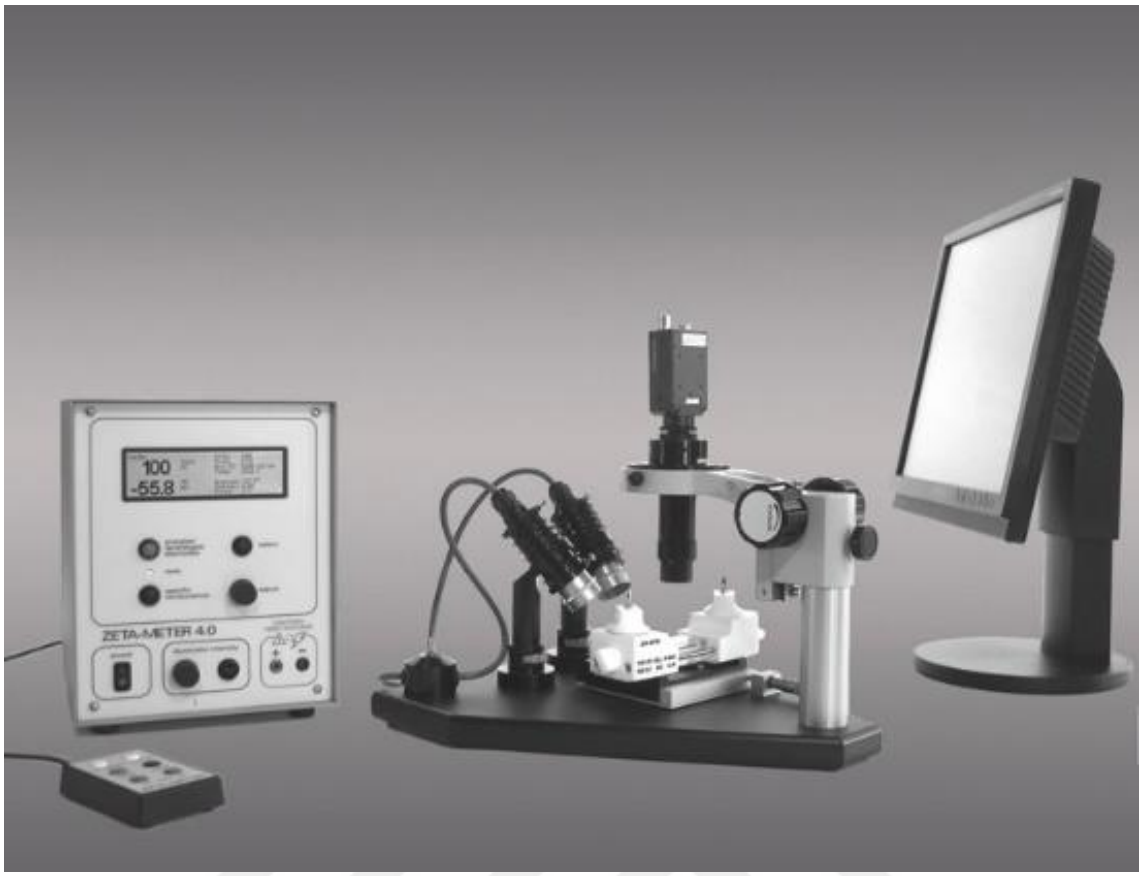


Şekil 3. 2. AFM'nin örnek koyulan yüzeyinin görünümü

AFM'de yüzeyi tarayan tip denilen problarla yüzeyin etkileşim kuvveti konsolun (cantilever) sapmasına, konsolun sapması da lazerin sapma yönünün değişmesine neden olur. Sapan lazer dedektörde toplanarak yüzeyin görüntüsü elde edilir.

3.3.3. Zeta Potansiyel Ölçümü

Kolloidal nanopartiküllerin sahip oldukları pozitif ya da negatif yükü ölçmek için ~75 mV potansiyel farkı uygulanarak zeta potansiyel ölçümleri Zeta Meter System 3.0, Zeta Meter Inc. ile alınmıştır. Ölçüm için kuartz-teflon karışımı GT-2 hücresi, molibden anot ve platin katot kullanılmıştır.



Şekil 3. 3. Zeta Potansiyel cihazı

Örnek çözeltiye elektrik alanı uygulandığında partiküller, kendi yükünün zıttı olan elektroda yönelirler. Uyarılan partiküllerden saçılan ışık elektroforetik mobilitelerine bağlı olarak bir Doppler kayması oluşturur. Bu kayma ile oluşan değer ile bir takım eşitlikler kullanılarak partiküllerin zeta-potansiyel değerleri cihaz tarafından hesaplanır.

3.4. Katı Lipit Nanopartiküllerin İlaç Tutma ve Salma Özelliklerinin İncelenmesi

3.4.1. İlaç Tutma Özelliği

Hazırlanan KLN'ye etken madde yüklenmesi sentez aşamasında gerçekleştirilmiştir. Etken maddenin KLN içindeki konumu sentez yöntemine bağlıdır. Kontrollü salım isteniyorsa KLN'nin çekirdek bölgesine yüklenmesi gerekmektedir.

Tez kapsamında KLN içine yüklenecek model ilaç olarak Naproksen kullanılmıştır. İlaç yükleme işlemi ME oluşturma sırasında lipit faza ilacın da eklenmesiyle ME oluşturma prosedürüne uygun olarak

gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan ilaçlı ME çözeltilerinden KLN hazırlandıktan sonra 2000 rpm'de 3'er dakika 2 kez santrifüjlenmiş ve -80°C'de 1 gün bekletilerek liyofilize edilmiştir. Sentez sırasında 5 mg Nap kullanılmıştır.

KLN'nin ilaç tutma kapasitesini bulmak için yüklenmeyen ilaç tayini, ilaçlı KLN hazırlandıktan sonra 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjleyip üstte kalan sulu çözeltiyi UV-vis spektrofotometresi ile analizleyerek gerçekleştirilmiştir. Üstteki kısmı alarak Nap çözeltisini, altta oluşan Nap yüklenmiş KLN çökeleğinden ayrılmaktadır.

3.4.2. İlaç Salma Özelliği

Nap yüklü KLN'nin salım özelliğini incelemek için UV-vis spektrofotometresi kullanılmıştır. İlaç tutma özelliği incelenirken anlatıldığı gibi KLN sentezi sonrasında yüklenemeyen Nap çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırdıktan sonra liyofilize edilen Nap yüklü KLN'lere 2 ml fosfat tampon çözeltisi eklenerek diyaliz membran içine doldurulmuş ve pH 7.4 olan 18 ml fosfat tampon çözeltisi içerisine yerleştirilerek oda sıcaklığında 100 rpm hızında 24 saat boyunca manyetik olarak karıştırılmıştır. Salınan Nap miktarını belirlemek için belli aralıklarla tampon çözelti içinden 500 µL örnek alınarak UV-vis spektrofotometresinde 232 nm dalga boyunda okuma yapılmış daha sonra örnek salım ortamına tekrar ilave edilmiştir.

3.5. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Yüzey aktif maddelerin ara yüzey davranışları, Langmuir – Blodgett (LB) cihazıyla iki boyutlu olarak analizlenmiştir. LB cihazı, yüzey basıncı veya yüzey gerilimi ölçümlerinde kullanılmıştır.



Şekil 3. 4. Langmuir – Blodgett (LB) cihazı

Cihazda bulunan platin iğne, hava/sıvı ara yüzeyinde sıvı tarafından iğneye uygulanan çekme kuvvetini ölçer. Bu kuvveti de yüzey gerilimine Eşitlik 3. 1 ile dönüştürür. Yüzey gerilimi ile yüzey basıncı arasındaki ilişki de Eşitlik 3. 2'de verilmiştir.

$$\gamma = \frac{F}{l.cos\theta} \qquad \text{Eşitlik 3.1}$$

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \qquad \text{Eşitlik 3.2}$$

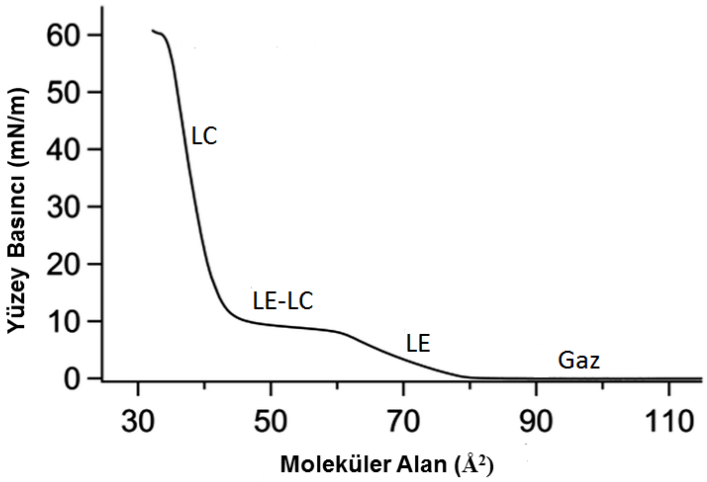
Langmuir tek tabakalarını oluşturan klasik malzemeler, iki ayrı moleküler bölgeden oluşan çözünmeyen amfifillerdir: suda kolaylıkla çözünebilen bir hidrofilik ("su seven") baş grubu ve polar olmayan çözücüler içinde çözünen bir hidrofobik ("sudan nefret eden") kuyruk.

Tüm deneyler hava-sıvı ara yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. Sıvı yüzey olarak pH 7.4 olan akciğer ara yüzeyini taklit eden 150 mM NaCl, 32 mM $NaH_2PO_4.H_2O$ ve 93 mM $Na_2HPO_4.12H_2O$ içeren fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün deneylerden önce cihaz saf su ile kalibre edilmiştir.

3.5.1. DPPC'nin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Model akciğer yüzey aktif maddesi olarak, akciğer yüzey aktif maddesinde en çok bulunan lipit olan DPPC kullanılmıştır. DPPC çözeltisi 90/10 hekzan/etanol ile 2 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış ve tekli tabaka oluşturmak için Hamilton şırınga kullanılarak LB tankına koyulan

pH 7.4 fosfat tampon çözeltisine enjekte edilmiştir. Çözücü uçması için 20 dakika beklenerek sabit sıkıştırma hızında yüzey sıkıştırılıp açılarak oluşturulan tekli tabakanın nefes alış-verişi gibi döngüsel davranışı iki boyutlu olarak incelenmiştir. DPPC için elde edilen izoterm literatürle uyumlu bulunup doğru ölçüm alınabildiği belirlenmiştir.



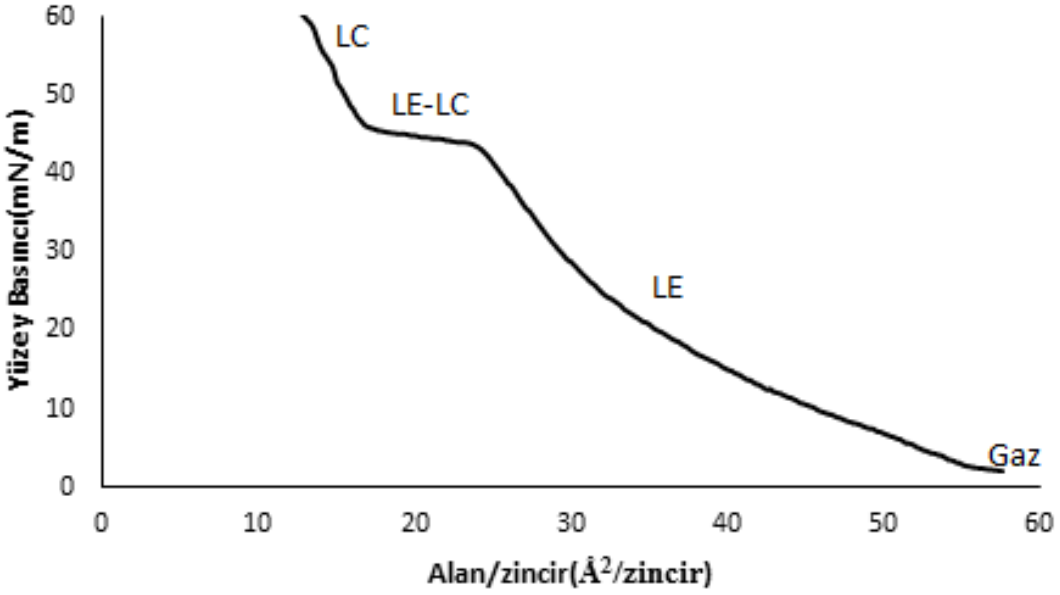
Şekil 3. 5. LB trough cihazında saf DPPC tekli tabakasının sıkıştırılması sırasında faz değişimi

3.5.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin (BNS) Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

'Bovine Natural Surfactant' (BNS) , sığır akciğerinden ekstraksiyon ile elde edilen doğal akciğer yüzey aktif maddesidir. Alınan sığır akciğerine önce 0.15 M NaCl çözeltisi ile lavaj yapılmış daha sonra 2140 rpm hızında 10 dakika santrifüj yapılarak üst kısım alınmış ve son olarak 20 000 rcf hızda 4 °C'de santrifüj yapılarak BNS pelet halinde elde edilmiştir. Pelet halindeki BNS buzdolabında muhafaza edilmiştir. Deney yapımında kullanmak için BNS, Bligh and Dyer Metoduna dayanarak hazırlanmıştır. Elde edilen BNS çözeltisiden belli bir miktar alınarak 3:1 (v/v) kloroform:metonol'de çözdürülmüş ve çözücü uçurularak kabın tabanında tabakalar halinde elde edilmiştir. Bu yöntem ile hidrofilik proteinler (SP-A ve SP-D) karışımdan uzaklaştırılmıştır. BNS'nin hidrofobik proteinlerden (SP-B ve SP-C) ve tüm lipitlerden oluştuğu düşünülmektedir.

Tüm deneyler için BNS çözeltisi 1 mg/ml konsantrasyonunda kloroform ile hazırlanmış ve DPPC ile aynı şekilde tekli tabaka oluşturulması

sağlanmıştır. Sıvı-hava ara yüzey özelliklerini incelemek için Langmuir-Blodgett ve Floresan Mikroskopi kullanılmıştır. Literatürle karşılaştırılmıştır.



Şekil 3. 6. LB trough cihazında saf BNS tekli tabakasının sıkıştırılması sırasında faz değişimi

3.5.3. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri ile Model İlaçların Etkileşiminin İncelenmesi

Daha önce de bahsedildiği gibi vücuda alınan ilaçlar ile akciğer yüzey aktif maddesinin birbirine etkisi son derece önemlidir. Çalışma kapsamında bu bölümün amacı da bu durumu iki boyutlu olarak incelemektir.

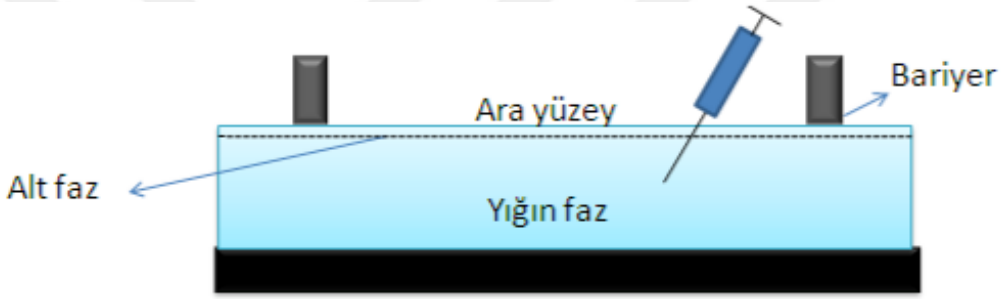
Model olarak kullanılan akciğer yüzey aktif maddesi (DPPC) ve sığır akciğerinden elde edilen doğal yüzey aktif madde (BNS) ile çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların (Nap, Cipro ve Dip) etkileşiminin incelenmesi iki boyutlu olarak Langmuir – Blodgett (LB) cihazıyla yapılmıştır.

Çalışma kapsamında yapılan tüm yüzey aktif madde ve ilaç etkileşim deneyleri, önce stabil yüzey aktif madde tekli tabakası oluşturulup üzerine ilacın farklı konsantrasyonlarda Hamilton şırıngası ile enjeksiyonuyla elde edilmiştir. Nap çözeltisi 0.276 mg/ml

konsantrasyonda kloroformda, Cipro çözeltisi 0.854 mg/ml ve Dip çözeltisi 0.34 mg/ml kosantrasyonda hacimce 3/1 kloroform/metanol'de hazırlanmıştır. Cipro ile 0.5 ve 0.83, Nap ile 0.03 ve 0.43, Dip ile %0.1 ve %4 mol oranlarında etkileşimleri incelenmiştir.

3.5.4. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri ile KLN Etkileşiminin İncelenmesi

Önceki bölümde de bahsedildiği gibi model ilaçların vücuda alınmasında taşıyıcı sistem olarak KLN kullanılmıştır. İlaçların vücuda alındığında etkileşimine bakıldığı gibi KLN'nin de akciğerlere geldiğinde yüzey aktif madde ile etkileşimi son derece önemlidir ve bu etkileşim de iki boyutlu olarak Langmuir – Blodgett (LB) cihazıyla incelenmiştir.

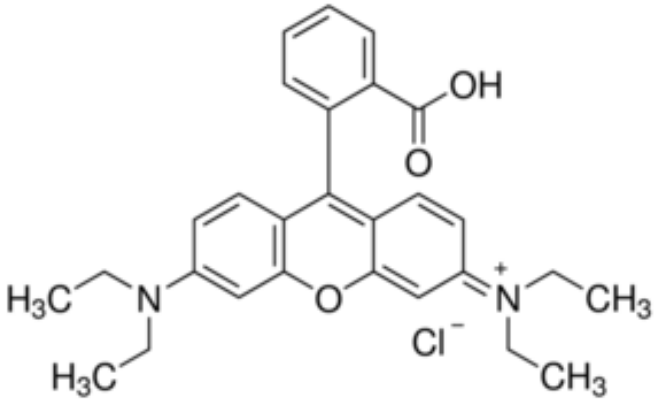


Şekil 3. 7. Ara yüzeyden yığın faza KLN enjeksiyonunun şematik gösterimi

KLN hazırlanması ve karakterizasyonu daha önceki anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Daha sonra LB trough cihazına yüzey aktif maddelerin tekli tabakası hazırlanmış ve Hamilton şırınga ile alt faza farklı oranlarda partikül enjekte ederek ölçümler alınmıştır.

3.6. Floresans Mikroskopi Ölçümleri

Tezde kullanılan floresans boya 3,6-bis(dietilamino)-9-(2-oktadesil) fenil klorid (R18)'dir. R18'i metanol içinde çözdürerek çözelti hazırlanmıştır. Bu boya hidrofobik ve tamamı ara yüzeyde kalabilir olduğu için kullanılmıştır. Ara yüzeydeki toplam mol oranının %1'i kadar boya kullanılmıştır.



Şekil 3. 8. 3,6-bis(dietilamino)-9-(2-oktadesil) fenil klorid (R18)'in molekül şekli

Mikroskopta görüntü oluşumu, boyanın LE ve LC fazlarda farklı çözünürlükleriyle elde edilmektedir [69]. R18, LC fazda dağılmadığı için bu fazın karanlık görünmesini, LE fazda dağılabildiği için ise bu fazın aydınlık görünmesine sebep olmaktadır.



Şekil 3. 9. Floresan Mikroskop

Çalışma kapsamında ölçümler LB minitrough cihazı ile FM cihazının birlikte kullanılmasıyla alınmıştır. LB tankı üzerine tekli tabaka oluşturularak

ilaçların ve KLN'nin Hamilton şırınga ile enjeksiyonuyla yüzey sıkıştırılarak farklı basınçlarda tekli tabakanın faz değişimleri gözlemlenmiştir.

3.7. İkili Sistemlerinin Termodinamik Açıdan Karışabilirliliklerinin İncelenmesi

Model yüzey aktif maddeler ile farklı oranlarda ilaç ve KLN ikili sistemlerinin karışabilirliklerinin incelenmesi için LB trough cihazı ile elde edilen değerler kullanılarak artık Gibbs serbest enerji denklemleri ile moleküller termodinamik açıdan incelenmiştir.

3.8. Yüzey Elastisitelerinin İncelenmesi

LB trough cihazı kullanılarak iki boyutlu inceleme yapılmış olduğu için kesme elastisitesi incelenmiştir. Kesme elastisitesi, yüzeyin tek yönlü sıkıştırılmasıyla yüzey basıncında meydana gelen değişim ile yüzey alanında oluşan değişimin oranını ifade eden bir parametredir. Ayrıca tekli tabakanın sıkıştırılması durumunda meydana gelen LE-LC faz geçiş bölgesi uzunluğu da yüzeyin elastisitesi hakkında bilgi vermektedir.

$$\varepsilon = -\frac{1}{A}\left(\frac{d\pi}{dA}\right) \qquad \text{Eşitlik 3. 3}$$

Burada, Π yüzey basıncı ve A alandır. Literatürdeki birçok çalışmada saf DPPC ve karışık tekli tabakalar için kesme elastisiteleri hesaplanmıştır [72].

Solunum işlemi sırasında, akciğerler 3D olarak sıkıştırılıp genişletilmekte oldukları için dilatasyon esnekliğini hesaplamak da gerekmektedir. Eşitlik 3. 4'e göre daha önce anlatıldığı gibi dilatasyonel esnekliği elde etmek için askıda damla tekniği (Kruss DSA10-MK2, Almanya) kullanılmıştır.

$$\varepsilon^* = \frac{d\gamma}{dA} \qquad \text{Eşitlik 3. 4}$$

burada, ɣ yüzey gerilimi ve A alandır. Dilatasyonel esneklik ölçümleri için öncelikle fosfat tampon çözeltisinden oluşan bir damla yaratılarak yüzey aktif madde çözeltilerinin enjeksiyonu ile damla üzerinde akciğer yüzey

aktif madde tekli tabakası oluşturulmuş ve daha sonra, KLN çözeltisi (KLN/yüzey aktif madde $40x10^{-9}$ partikül/molekül oranı) damlanın yığın fazına enjekte edilmiştir. Osilasyon, çözücü buharlaştırıldıktan ve yüzey gerilimi bir denge değerine ulaştıktan sonra başlatılarak veriler elde edilmiştir.

3.9. Tekli Tabakanın Reolojik Cevabının İncelenmesi

KLN'lerin akciğer sürfaktanlarının yüzey gerilim yanıtının lineerliği üzerindeki etkilerinin, solunum döngüsünü taklit eden ara yüzey alanının osilasyon pertübasyonlarına etkilerinin araştırılması amaçlanarak askıda damla (pendant drop) yöntemi kullanılmıştır. Sürfaktan tekli tabakasının dilasyonel reolojisi incelenerek subfazda KLN varlığının akciğer yüzey aktif maddesinin fizyolojik fonksiyonlarına etkisi araştırılmıştır. Tüm deneyler sabit 0.3 genlik (ΔA/A0) ve 0.1 Hz frekansında yapılmıştır. Tekli tabakalar için ΔA/A0 değerinin arttırılması, yanıtın doğrusal olmayanlığının artması anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, saf DPPC tekli tabakası için, 0.2'lik ΔA/A0 değerinden sonra bir plato gözlenmiştir [68].

Tekli tabakanın reolojik cevabının analizi için Fourier dönüşümü (FFT) kullanılarak, toplam harmonik distorsiyon (THD) değeri Eşitlik 3. 5 'ten hesaplanmıştır.

$$THD = \frac{\sqrt{\sum_{k>1} \Delta\sigma_k^2}}{\Delta\sigma_1} \qquad \text{Eşitlik 3. 5}$$

Burada, $\Delta\sigma_k$ k-Fourier katsayıları ve $\Delta\sigma_1$ ise temel harmoniğin genliğidir. THD'nin daha büyük değerleri, tek tabakanın doğrusal olmayan davranışları ile ilgilidir.

4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞILMASI

Akciğerler, geniş yüzey alanına sahip olması ve hava ile sürekli temas halinde olması nedeni ile özellikle ilaç taşınımı için avantajlı bölgelerdir. Akciğerlerden ilaç taşınım esnasında ilacın taşıyıcı partiküller ile verilmesi sonrası alveollere ulaşabilen taşıyıcı partiküllerin alveol yüzeyinde bulunan akciğer yüzey aktif maddesi ile olası etkileşiminin incelenmesi özellikle akciğerlerin fonksiyonel özelliklerinin nasıl değiştiğinin anlanması hayati fonksiyonları nedeni ile son derece önemlidir. Tez çalışması boyunca, akciğer yüzey aktif maddesi ile biyouyumluluğu yüksek, lipit bazlı taşıyıcı nanopartikül olan KLN'ler ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan oral yolla alımının yaygın olduğu ilaç etken maddeleri ile etkileşimlerinin incelenmesiyle pulmoner dağıtım için KLN ve ilaçların uygunluğunun araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, akciğer yüzey aktif madde modeli olarak akciğer sürfaktanında en çok bulunan fosfolipit olan DPPC ve gerçek sistemi daha iyi taklit eden sığır akciğerinden elde edilen doğal yüzey aktif madde (BNS) iki ayrı sistem olarak seçilmiştir.

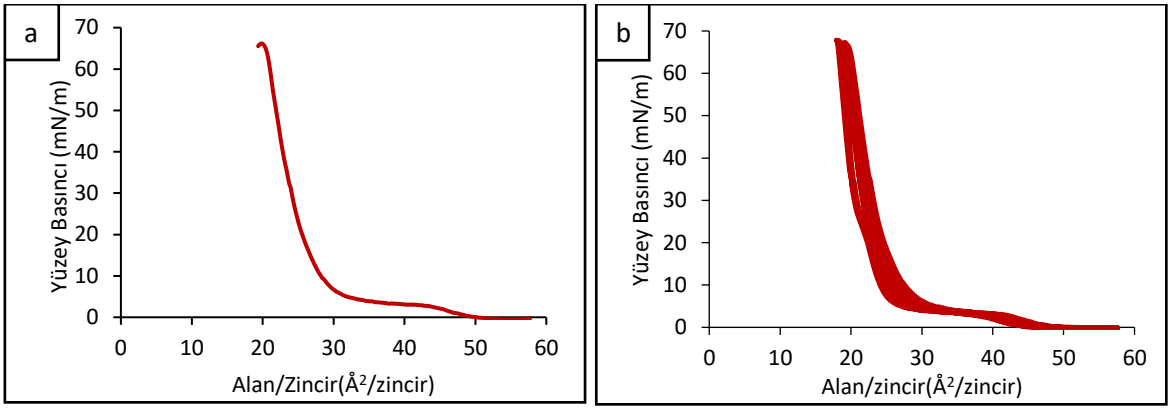
Çalışma kapsamında öncelikle kullanılması düşünülen akciğer yüzey aktif madde modellerinin ara yüzey özellikleri ayrıntılı şekilde incelenmiş daha sonra ilaçların ve KLN'nin bu özelliklere etkileri belirlenmiştir.

4.1. Akciğer Yüzey Aktif Madde Modellerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

4.1.1.Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) Modelinin Ara yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada, akciğer yüzey aktif maddesinde en çok bulunan fosfolipit olan DPPC akciğer yüzey aktif madde modeli olarak kullanılarak çalışılmaya başlanmıştır. Pulmoner sürfaktanın hava-sıvı ara yüzeyinde bulunmasından dolayı ara yüzey özelliklerinin incelenmesi sürfaktanın fonksiyonel işlevini öğrenmek açısından son derece önemlidir. Bu amaç doğrultusunda, akciğerlerin nefes alış-veriş prosesi sırasında sıkışıp genişlemesine benzer olarak sıkıştırılıp-genişletilen bir ara yüzeye sahip

olabilen Langmuir tekli tabakası oluşturularak DPPC tekli tabakasının davranışı detaylı şekilde incelenmiştir.



Şekil 4. 1. Saf DPPC tekli tabakasının PBS/hava ara yüzeyinde a)yüzey basıncı(Π)–alan(A) izotermi ve b)sıkıştırma-genişletme döngüsü

Çalışmada vücut koşullarını taklit edebilmesi açısından alt faz olarak PBS seçilmiştir. pH 7.4 fosfat tampon çözelti (PBS) üzerine 2 mg/ml konsantrasyonunda $20x10^{15}$ molekül miktarına sahip DPPC enjeksiyonu ile oluşturulan tekli tabakanın sabit hızla sıkıştırılmasıyla elde edilen zincir başına alan ile yüzey basıncı değişim izotermi ve sıkıştırma-genişletme döngüleri Şekil 4. 1'de verilmiştir. Elde edilen Π-A izoterminden, 5 mN/m yüzey basıncında DPPC tekli tabakasının sıvı genişlemiş (LE) fazdan sıvı yoğunlaştırılmış (LC) faza geçişinin göstergesi olarak alan değişimine rağmen yüzey basıncının değişmediği yani faz geçiş bölgesi olduğu görülmektedir. DPPC tekli tabakasının daha fazla sıkıştırılması sonucu 70 mN/m yüzey basıncını geçmesiyle tekli tabakada çökme (kollapse) olduğu gözlenmiştir. DPPC tekli tabakasının art arda sıkıştırılıp-genişletilmesiyle elde edilen çevrimlerden tekli tabakanın sıkıştırılmasıyla elde edilen maksimum yüzey basıncının 70 mN/m'ye çıktığını daha sonra genişletme ile alan değişimi olmadan basıncın 25 mN/m'ye düştüğünü görülmektedir. Bu özellik iyileşme indeksinin göstergesi olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca DPPC tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme izotermlerinin alanına bakarak histeresizin fazla olmadığı söylenebilmektedir. DPPC tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme döngüsünden geri yayılıma bakıldığında DPPC'nin yüksek sıkıştırılabilirlik ve yüzey gerilimini çok fazla

düşürme özelliklerinin yanında bu özelliğinin olmadığını görülmektedir. Elde edilen sonuçların literatürle uyumludur [82].

DPPC tekli tabakası, aynı yüzey basıncına ulaşmak için belirli bir yüzey konsantrasyonuna sıkıştırılması gerektiğinden, her sıkıştırma aşamasında, ara yüzeyden bir miktar molekül alt faza geçerek kaybolmaktadır. Akciğer sürfaktanının işlevini yerine getirebilmesi için ara yüzeyden kaybolan molekül miktarları önemlidir. Ara yüzeyden kaybolan moleküllerin yüzdesini zincir başına alanlar karşılaştırılarak tahmin edilebilmektedir. DPPC tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme döngülerinden LC faz bölgesinde seçilen 30 mN/m ve daha fazla sıkıştırıldığı ama çökme olmadığı 60 mN/m yüzey basınçlarında ara yüzeyde bulunan lipit miktarları birinci sıkıştırmadaki alan/zincir değerinde ara yüzeydeki lipit miktarını %100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçları Çizelge 4. 1'de verilmiştir.

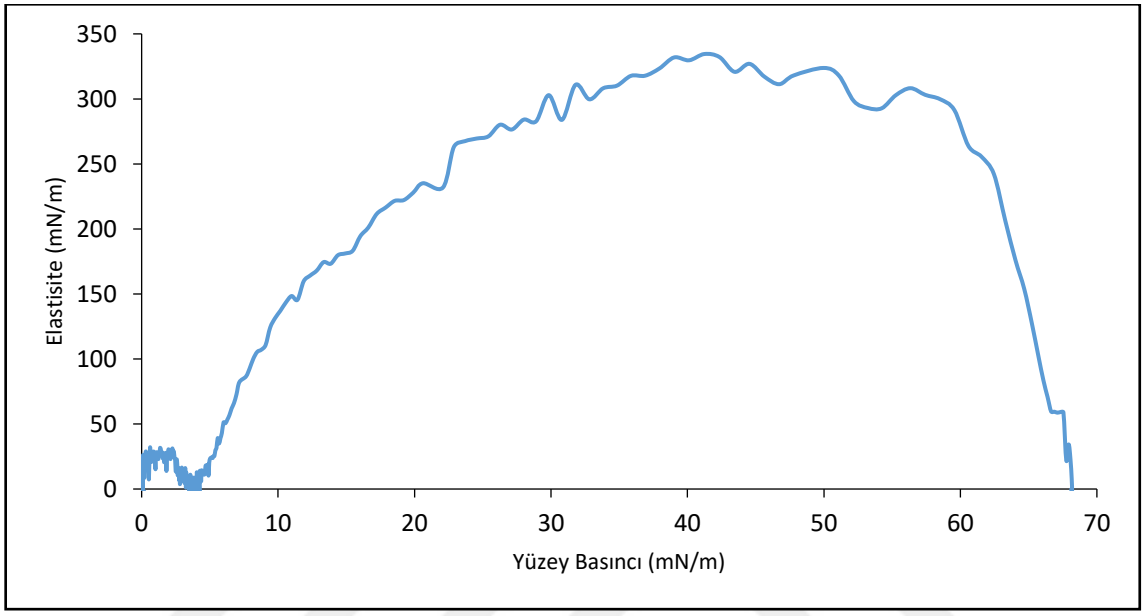
Çizelge 4. 1. Saf DPPC izoterminin sıkıştırılması sonucu 30 ve 60 mN/m yüzey basınçlarında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

Π = 30 mN/m	Alan/zincir (Å^2/zincir)	% Lipit Kaybı
1.sıkıştırma	25.84	-
2.sıkıştırma	24.92	3.55
3.sıkıştırma	24.38	5.68
4.sıkıştırma	23.95	7.34
5.sıkıştırma	23.57	8.79

Π = 60 mN/m	Alan/zincir (Å^2/zincir)	% Lipit Kaybı
1.sıkıştırma	23.55	-
2.sıkıştırma	22.59	4.07
3.sıkıştırma	22.22	5.64
4.sıkıştırma	21.79	7.56
5.sıkıştırma	21.33	9.43

Fosfat tampon çözeltisinde DPPC tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme izotermleri alınarak elde edilen sonuçlara bakıldığında, DPPC'nin yığın fazda çözünmemesine rağmen ara yüzeyden madde kaybına uğradığı görülmektedir. Bu durum ara yüzeyin sıkıştırılmasıyla birlikte alt faza geçen bir kısım maddenin genişleme ile tekrar ara yüzeye adsorbe olsa bile aynı miktarda olamamasından kaynaklanmaktadır. DPPC için elde edilen kayıp miktarları literatürle uyumlu çıkmıştır [66].

Solunum sırasında alveollerin sıkıştırılıp-genişletilmesinin sürekli olarak gerçekleşmesinden dolayı akciğer sürfaktanının elastik bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Bu sebeple, oluşturulan tekli tabakanın elastisitesinin incelenmesi önemli olmaktadır. DPPC tekli tabakası için elde edilen elastisite değerlerine ait grafik Şekil 4. 2'de verilmiştir.

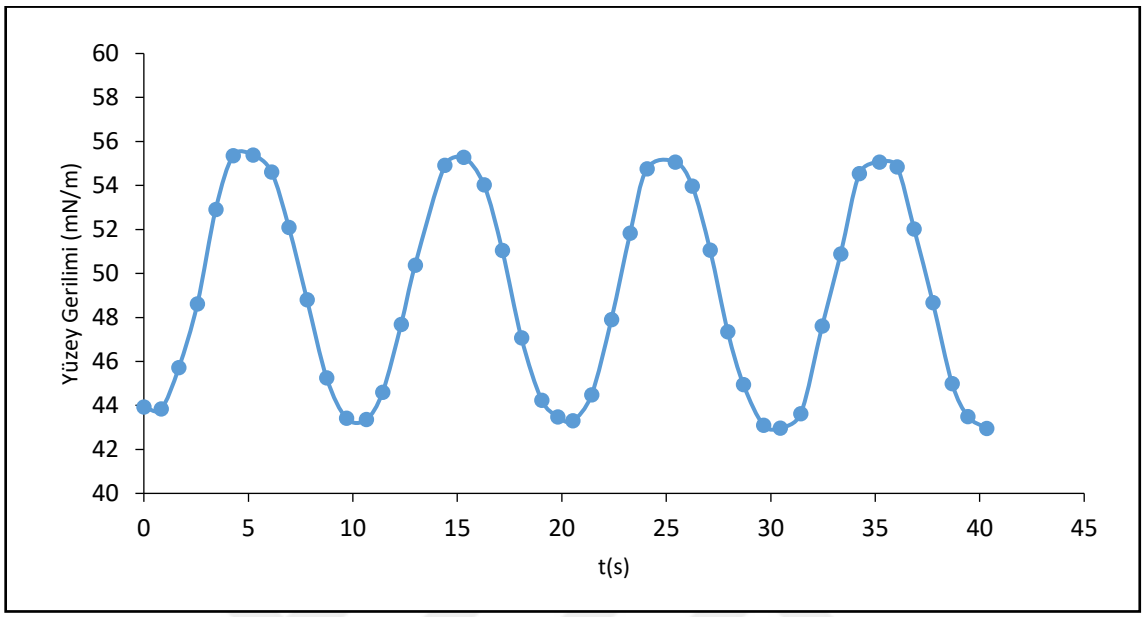


Şekil 4. 2. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen saf DPPC tekli tabakasının yüzey basıncı-elastisite grafiği

Elastisite değeri, tekli tabakanın sürekli sıkıştırılmasıyla depolanan elastik enerjiyle ilgili önemli bir özelliktir ve tekli tabakanın sertliği hakkında bilgi sağlamaktadır [69]. DPPC tekli tabakasının sıkıştırılması sırasında Π-A izoterminden elde edilen elastisite değerine baktığımızda literatürde verilen sonuçlarla uyumlu olarak LE ve LC faz bölgesinde iki ayrı maksimum değer verdiği görülmektedir. LE faz bölgesinde elde edilen maksimum elastisite değeri 25 mN/m iken LC faz bölgesinde elde edilen maksimum elastisite değerinin yaklaşık 350 mN/m olmaktadır [68]. Elastisite değerinin yüzey basıncının alan değerine oranı olmasından dolayı faz geçiş bölgesinde hesaplanan bu değerin sıfır çıkması beklendiği gibi gerçekleşmiştir.

Nefes alış-veriş döngüsü sürekli bir proses olduğu için iki boyutlu inceleme sağlayan LB trough cihazının yanında üç boyutlu inceleme

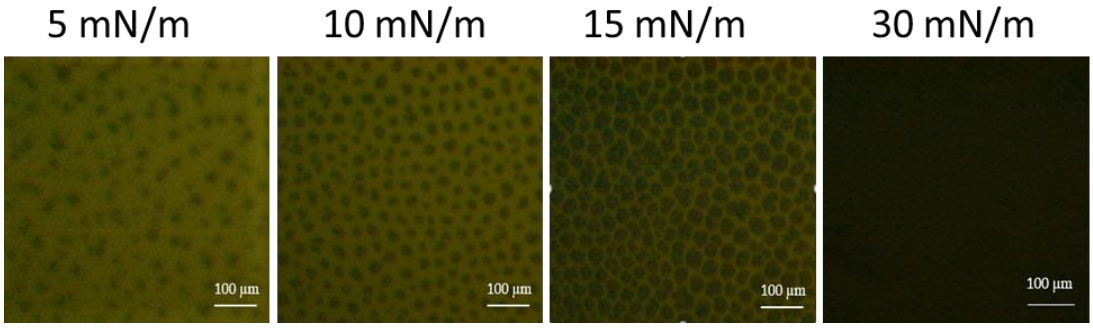
yapılmasını sağlayan askıda damla metodu kullanılarak DPPC tekli tabakasının analizi sağlanmıştır. Bu sayede gerçek sistem özelliklerine daha çok uyum sağlayan inceleme de yapılmış olmaktadır.



Şekil 4. 3. Saf DPPC tekli tabakası için askıda damla metodu ile elde edilen yüzey gerilimi-zaman grafiği

Askıda damla cihazı ile pH 7.4 fosfat tampon çözeltisinden oluşturulan damlanın üzerine 2 mg/ml konsantrasyonunda $1.6x10^{15}$ molekül miktarına sahip DPPC enjekte edilerek DPPC tekli tabakası oluşturulmuştur. Oluşturulan tekli tabakanın sabit 0.1 Hz frekansta ve 0.3 genlikte ($\Delta A/A_0$) ilk 40 saniyede elde edilen zamana karşı yüzey gerilimi osilasyon grafiği Şekil 4. 3'te verilmektedir. Bu grafiğe baktığımızda DPPC tekli tabakasının 43-55 mN/m yüzey gerilimleri arasında salınım yaptığı görülmektedir. Elde edilen osilasyon grafiğinden hesaplanan dilasyonel elastisite değerinin ortalama 49 mN/m yüzey gerilimi yani 23.8 mN/m yüzey basıncı için 200 mN/m olduğu bulunmuştur. Bu değerin, aynı yüzey basıncında LB trough ile elde edilen elastisite değerine (195 mN/m) yakın olması sistemin kararlı olduğunu göstermektedir.

Yapılan incelemelere ek olarak, ara yüzeyin FM görüntülerine bakılarak da solunum sırasında olduğu gibi sıkışan tekli tabakanın oluşturduğu LC faz adacıklarındaki değişim incelenmiştir.



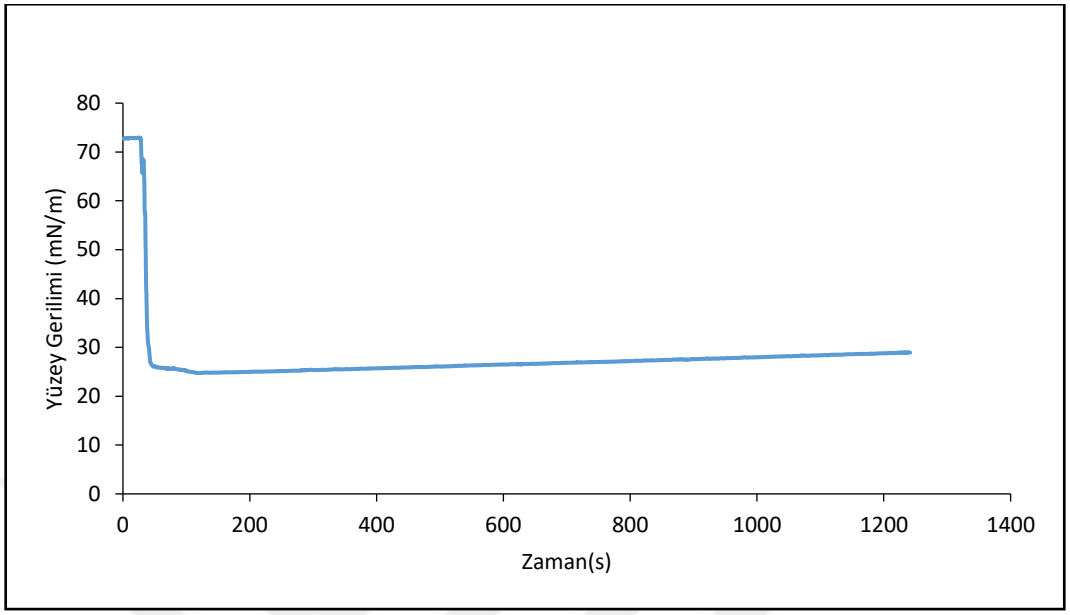
Şekil 4. 4. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak elde edilen saf DPPC tekli tabakasının farklı yüzey basınçlarında FM görüntüleri

Fosfat tampon çözeltisi üzerine 2 mg/ml DPPC ve %1'lik R18 boya karışımının Hamilton şırınga ile enjeksiyonu sonrası elde edilen farklı yüzey basınçlarında ara yüzeyin FM görüntüleri Şekil 4. 4'te verilmiştir. R18 boya kullanıldığı için aydınlık alanlar yani R18 boyanın yayılabildiği alanlar LE faz bölgesi, karanlık alanlar yani boyanın yayılamadığı alanlar LC faz bölgesi olmaktadır. 5 mN/m yüzey basıncında LE fazdan LC faza geçişi temsil eden karanlık alanlar görülmeye başlamaktadır. Oluşan DPPC tekli tabakasının basınç 5 mN/m'de adacıklar küçük ve miktar olarak daha az iken tekli tabakanın sıkıştırılması ile yüzey basıncın artması sonucu büyüyerek çoğalmakta olduğu görülmektedir. 30 mN/m yüzey basıncında DPPC tekli tabakası tamamen LC faz bölgesinde olduğu için tamamen karanlık bir görüntü elde edilmiştir [72].

4.1.2. Sığır Akciğerinden Elde Edilen Yüzey Aktif Madde(BNS) Modelinin Ara Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

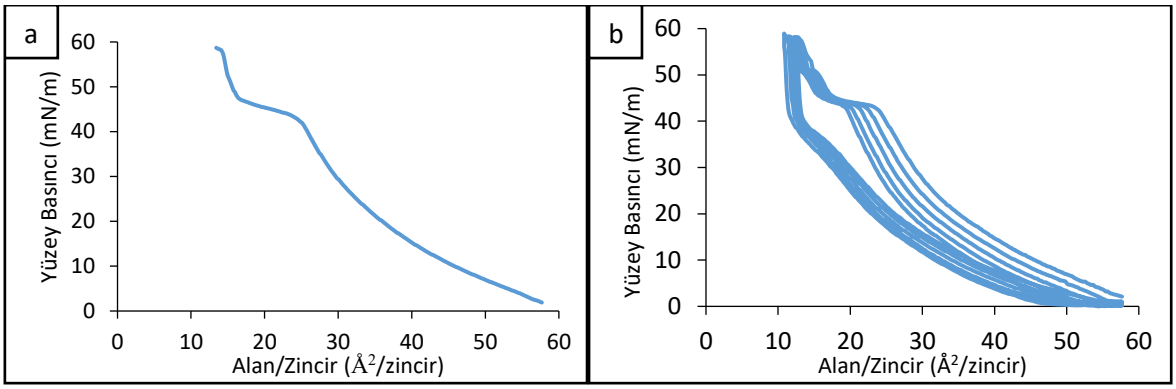
Akciğer yüzey aktif maddesinde en çok bulunan fosfolipitin DPPC olmasına rağmen akciğer yüzey aktif maddesinde yer alan diğer bileşenlerin özellikle de proteinlerin eksikliğinden dolayı tek başına DPPC ile çalışmak literatürde sunulan birçok çalışma ile sonuçlarımınız karşılaştırma imkanı verse de gerçek sitemi tam olarak simule edememektedir. Bu sebeple gerçek akciğer yüzey aktif maddesini daha iyi simule edebilmek için sığır akciğer lavajı ile elde edilen lipitleri ve

hidrofobik proteinleri (SP-B ve SP-C) içeren BNS karışımının ara yüzey özellikleri de ayrıntılı şekilde incelenmiştir.



Şekil 4. 5. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde zamanla yüzey gerilimi değişimi

Gerçek nefes alış-veriş döngüsünde yüzey gerilimini düşürmenin önemli olduğu ve bu akciğerlerde bulunan yüzey aktif maddeler tarafından gerçekleştirildiği için sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin zamanla yüzey gerilimine etkisi fosfat tampon üzerinde Langmuir tekli tabakası oluşturularak incelenmiş ve Şekil 4. 5'te görüldüğü gibi elde edilmiştir. Elde edilen sonuca bakılarak ölçümün 72.8 mN/m'den başladığını ve 1 mg/ml konsantrasyonundaki $82x10^{15}$ DPPC molekülü içeren BNS karışımının yüzey gerilimini yaklaşık olarak 30 mN/m'ye kadar düşürebildiği görülmektedir. Enjekte edilen BNS miktarı kullanılan LB through alanında uygun miktarı belirlemek için deneme yanılma yöntemi ile çeşitli miktarlar kullanılarak optimize edilmiştir.



Şekil 4. 6. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde a) yüzey basıncı-alan izotermi ve b) sıkıştırma-genişletme döngüsü

1 mg/ml BNS stok çözeltisinden $82x10^{15}$ DPPC molekülü içeren miktar alınarak PBS yığın fazının üstüne oluşturulan BNS tekli tabakasının sıkıştırılıp-genişletilmesiyle Şekil 4. 6 elde edilmiştir. Π-A izotermine bakıldığında DPPC tekli tabakası için 5 mN/m yüzey basıncında görülen faz geçişinin BNS tekli tabakası için yaklaşık 40-45 mN/m yüzey basıncında oluştuğu gözlenmiştir. Buna BNS karışımında bulunan proteinlerin yol açtığı bilinmektedir. DPPC tekli tabakasına göre LE faz bölgesinin daha uzun olması, LE-LC faz geçiş bölgesinin gecikmesi BNS tekli tabakasının daha akışkan bir yapıya sahip olduğunun göstergesidir. BNS tekli tabakasının sıkıştırılmaya devam etmesiyle zincir başına alanın yaklaşık 20 $Å^2$/zincir değerinde yüzey basıncının 60 mN/m olmasıyla çökme görülmektedir, bu da SP-B ve SP-C proteinlerinin sıkıştırılmasıyla yüzey basıncını DPPC kadar çok arttıramamasından kaynaklanmaktadır. Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur [88]. Elde edilen BNS tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme döngüsünden saf BNS tekli tabakası için iyileşme indeksine bakıldığında tekli tabakanın genişletilmeye başlamasıyla alan değerinin hemen değişmediğini ancak basıncının 40 mN/m'ye düştüğü görülmektedir. Yüzey alanı değişmeden yüzey geriliminin aniden çok fazla artması bir sonraki nefes alışını zorlaştırmakta olduğu için bu uzunluğun fazla olmaması istenmektedir. BNS tekli tabakası için elde edilen bu sonuç saf DPPC tekli tabakası için elde edilenden kısa olmasının sebebi, BNS karışımında bulunan proteinlerden

ve diğer lipitlerden dolayı gerçek sisteme daha çok benzemesinden kaynaklanmaktadır. Sıkıştırma-genişletme eğrileri arasındaki farka bakıldığında ise BNS tekli tabakası için histeresizin çok olmadığı söylenebilmektedir. Oluşturulan BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla çıkılan maksimum yüzey basıncında alan değerinin düşmemesi, ara yüzeyde bulunan maddelerin ayrılıp büyük bir kısmının alt faza geçmediğini göstermektedir. Son olarak BNS karışımında bulunan geri yayılımdan sorumlu olan hidrofobik proteinlerden dolayı BNS tekli tabakasının geri yayılım özelliğinin DPPC tekli tabakasından iyi olduğu görülmektedir.

DPPC tekli tabakasında yapıldığı gibi, sıkıştırmayla ara yüzeyden kaybolan madde miktarı BNS tekli tabakası için de incelenmiştir. BNS tekli tabakasının sıkıştırılması sırasında yüzey basıncı 30 ve 45 mN/m'de zincir başına alan değerlerine bakılarak ve birinci sıkıştırmadaki alan/zincir değerinde ara yüzeydeki lipit miktarını %100 kabul ederek ara yüzeyden alt faza geçen madde yüzdeleri Çizelge 4. 2'de verilmektedir.

Çizelge 4. 2. Saf BNS izoterminin sıkıştırılması sonucu basınç 30 ve 45 mN/m yüzey basınçlarında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

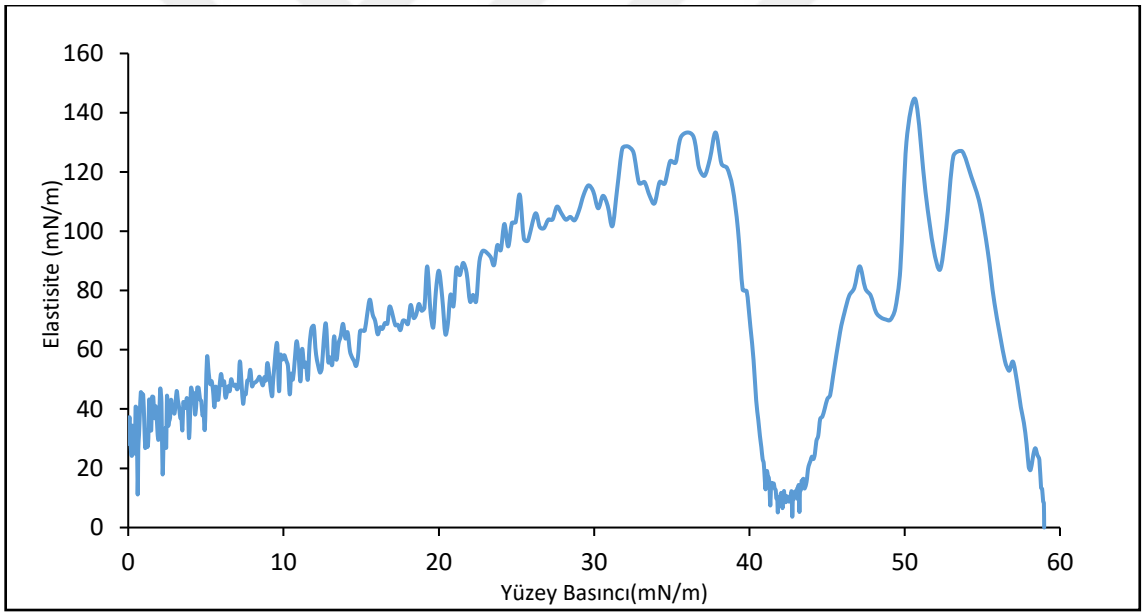
Π = 30 mN/m	Alan/zincir ($Å^2$/zincir)	% Lipit Kaybı
1.sıkıştırma	28.85	-
2.sıkıştırma	27.18	5.79
3.sıkıştırma	25.77	10.68
4.sıkıştırma	24.49	15.11
5.sıkıştırma	23.48	18.6

Π = 45 mN/m	Alan/zincir ($Å^2$/zincir)	% Lipit Kaybı
1.sıkıştırma	17.97	-
2.sıkıştırma	17.57	2.25
3.sıkıştırma	17.23	4.16
4.sıkıştırma	16.55	7.90
5.sıkıştırma	16.20	9.84

Fosfat tampon çözeltisinde BNS tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme izotermleri alınarak elde edilen sonuçlara bakıldığında saf DPPC tekli tabakasında olduğu gibi BNS tekli tabakasının da yığın fazda çözünmemesine rağmen ara yüzeyden madde kaybına uğradığı görülmüştür. 30 mN/m yüzey basıncında DPPC tekli tabakası için elde edilen kayıp miktarına baktığımızda BNS tekli tabakası için hesaplanan

değerden daha az olduğunu ancak bunun nedeninin BNS tekli tabakasının 30 mN/m yüzey basıncında LE faz bölgesinde olması ve yüksek yüzey basınçlarında faz geçişi vermesinden kaynaklandığı söylenebilmektedir. 45 mN/m yüzey basıncında BNS tekli tabakasının ara yüzeyinden molekül kaybına baktığımızda 30 mN/m yüzey basıncında DPPC tekli tabakası için elde edilen sonuçtan daha azdır, bu da BNS karışımında bulunan SP-B proteinin geri yayılım özelliğini iyileştirmesiyle gerçekleşmektedir. Beklendiği gibi aynı faz bölgesinde, doğal akciğer yüzey aktif madde karışımı olduğu için BNS tekli tabakasının kaybı DPPC tekli tabakasına göre daha az olmaktadır.

Tekli tabakanın sertliği hakkında bilgi alınmasını sağlayan elastisitenin de incelenmesi yapılarak Şekil 4. 7'de verilmiştir.

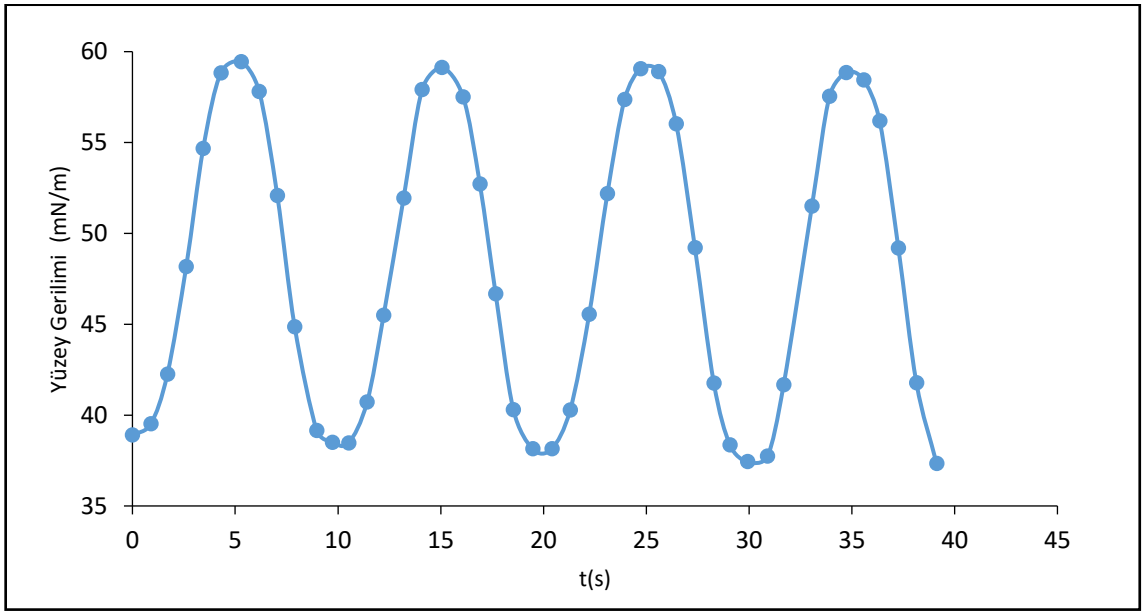


Şekil 4. 7. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde elastisitesi-yüzey basıncı grafiği

BNS tekli tabakası için yüzey basıncı-alan izoterminden elde edilen elastisite değerine bakıldığında DPPC tekli tabakası için olduğu gibi LE ve LC faz bölgesinde olmak üzere iki tane maksimum değere sahip olduğu görülmektedir. LC faz bölgesi için elde edilen elastisitenin maksimum değerinin yüzey basıncı yaklaşık 40 mN/m'de 125 mN/m olduğu görülmektedir. Faz geçiş bölgesi olan 45 mN/m yüzey basıncında ise

elastisite değerinin DPPC faz geçiş bölgesinde olduğu gibi sıfıra yaklaştığını ve sıkışmaya devam edildiğinde yüzey basıncının artmasıyla elastisitenin tekrar artmakta olduğu görülmektedir [85]. Bu artış, tekli tabakanın sıkıştırılmaya devam etmesiyle LC faz bölgesine geçmesiyle ortaya çıkmaktadır.

DPPC tekli tabakası için yapıldığı gibi BNS tekli tabakası için de gerçek sistem özelliğini daha iyi simule edebilmek için üç boyutlu analiz yapmaya olanak sağlayan askıda damla yöntemi kullanılmıştır.

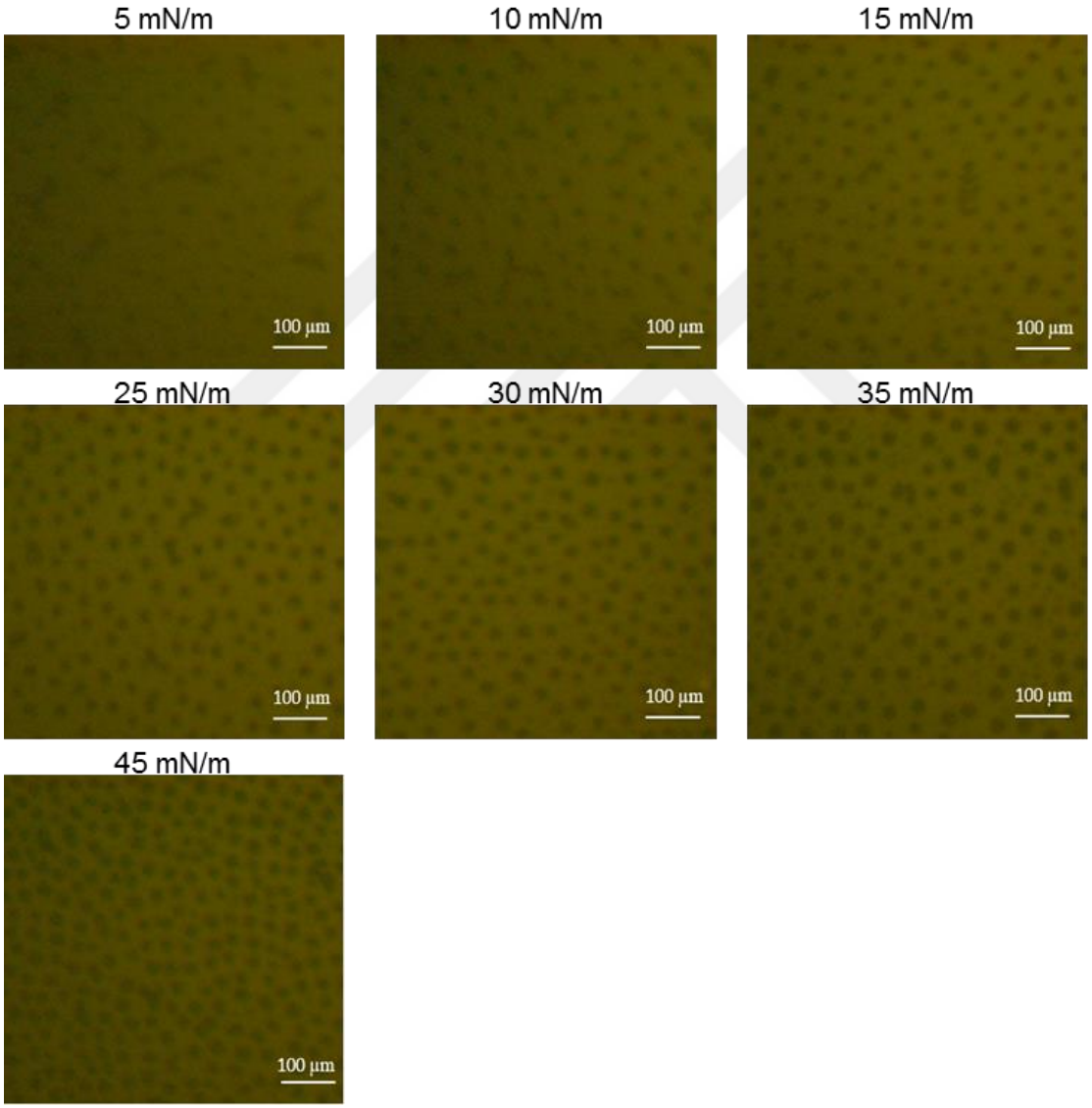


Şekil 4. 8. Saf BNS tekli tabakası için askıda damla metodu ile elde edilen yüzey gerilimi-zaman grafiği

1 mg/ml BNS çözeltisinden $1x10^{15}$ DPPC molekülü içeren miktar alınıp pH 7.4 PBS ile oluşturulan damlanın üzerine enjekte edilerek ara yüzeyde BNS tekli tabakası elde edilmiştir. Tekli tabakanın sabit 0.1 Hz frekansta ve 0.3 genlik değişiminde ($\Delta A/A_0$) osilasyonu sonucu ilk 40 saniyede elde edilen grafik Şekil 4. 8'te verilmektedir. Elde edilen grafiğe bakıldığında yüzey geriliminin 38-60 mN/m arasında salınım yaptığını görülmektedir. BNS tekli tabakası için elde edilen osilasyon grafiğinden hesaplanan dilatasyon elastisite değerinin ortalama 49 mN/m yüzey geriliminde yani 23.8 mN/m yüzey basıncı için 74 mN/m olduğu bulunmaktadır. Bu değerin, aynı yüzey basıncında LB trough ile elde edilen elastisite

değerine (55 mN/m) yakın olması sistemin kararlı olmasını göstermektedir.

Yapılan incelemelerden sonra saf BNS tekli tabakasının ara yüzeyinin görünebilirliğini sağlamak için FM analizi de yapılmıştır. Fosfat tampon çözeltisi üzerine 1 mg/ml BNS ve %1'lik R18 boya karışımının Hamilton şırınga ile enjeksiyonu sonrası elde edilen farklı yüzey basınçlarında FM görüntülerini Şekil 4. 9'da görülmektedir.



Şekil 4. 9. Sığır akciğerinden elde edilen yüzey aktif maddenin (BNS) PBS/hava ara yüzeyinde FM görüntüleri

Saf DPPC tekli tabakasında olduğu gibi, LC faza geçişin göstergesi olan koyu renkli görünen adacıkların yüzey basıncının artışı ile büyüyerek çoğaldığı görülmektedir. DPPC tekli tabakasında 30 mN/m yüzey

basıncında tekli tabakanın tamamen LC faz bölgesinde olduğunu ancak BNS karışımı için bunun olmadığı görülmektedir. Bunun sebebinin BNS karışımında bulunan SP-C'nin tekli tabaka akışkanlığından sorumlu olmasından kaynaklanmakta olduğu bilinmektedir [89]. Yani yüksek yüzey basıncında (45 mN/m) bile ara yüzeyin tamamen LC faz bölgesine geçmediği ve adacıklar net bir şekilde görüldüğü söylenebilmektedir. BNS tekli tabakasının yüzey basıncı-alan izoterminde de görüldüğü gibi yüzey basıncı 40-45 mN/m aralığında tekli tabaka faz geçiş bölgesinde bulunmaktadır.

Saf akciğer yüzey aktif madde modellerinin ara yüzey özellikleri ayrıntılı şekilde incelendikten sonra seçilen ilaçların inhalasyon yolu ile alınması sonrası bariyerleri aşarak alveollere ulaşıp akciğer yüzey aktif maddesiyle karşılaştığı düşünülerek akciğer yüzey aktif maddelerinin fonksiyonel davranışı üzerine etkileri incelenmiştir.

4.2. Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına İlaçların Etkisinin İncelenmesi

İnhalasyon yoluyla alınarak alveollere gelebilen ilaç moleküllerinin alveollerin yüzeyinde bulunan akciğer yüzey aktif maddesi ile etkileşiminin incelenmesi ilacın, akciğer sürfaktanının fonksiyonel yapısına etkisini anlayabilmek için önemlidir. Bu bölümde, tez çalışması için seçilen ilaç (Cipro, Dip ve Nap) etken maddelerinin alveollere ulaşmış olduğu düşünülerek akciğer yüzey aktif maddesi olarak kullanılan sentetik ve doğal yüzey aktif maddelerinin etkileşimleri ile sürekli nefes alış-veriş prosesini inceleyebilmek için Langmuir tekli tabakası oluşturularak ve bu tabakanın ara yüzey görüntüsü elde edilerek meydana gelen değişimler incelenmiştir.

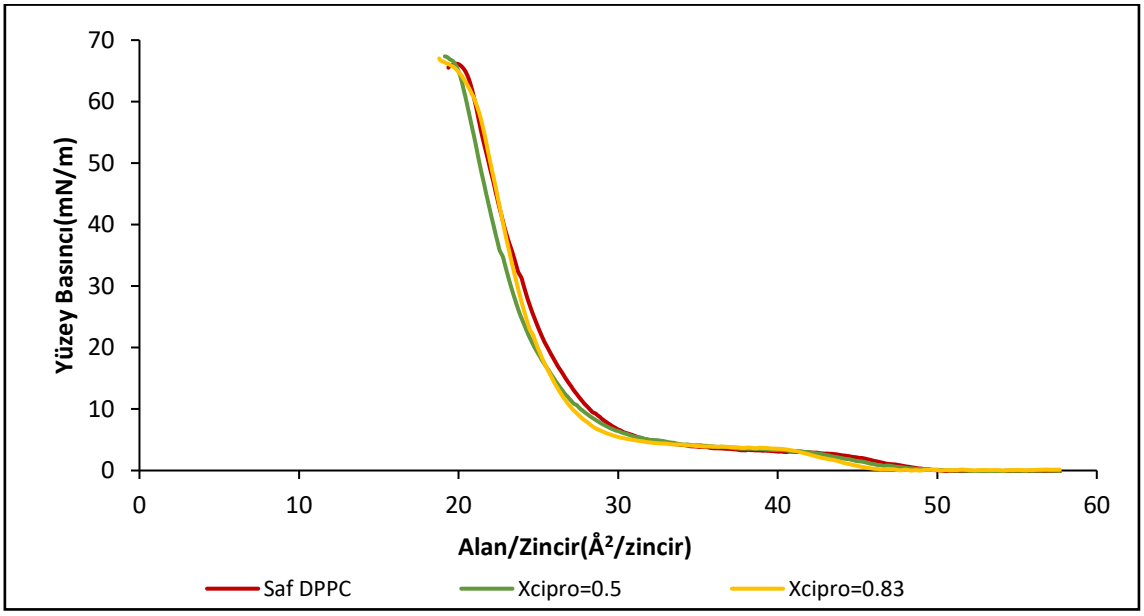
4.2.1. Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Siprofloksasin'in Etkisinin İncelenmesi

Sudaki çözünürlüğü yüksek ve pH 7.4 değerinde zivitteriyonik özelliğe sahip geniş spektrumlu en çok kullanılan antibiyotik olan Cipro'nun aeresol halinde alveollere gelmesiyle akciğer yüzey aktif maddelerinin fonksiyonuna etkisinin bilinmesi önemli olduğu için iki farklı model yüzey

aktif madde (DPPC ve BNS) üzerinde etkileri incelenerek ayrıntılı şekilde anlatılmıştır.

Siprofloksasin'in DPPC Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi

İlk olarak sentetik yüzey aktif madde modeli olan DPPC ile Cipro etken maddesinin etkileşimi literatür araştırmaları sonucu iki farklı oran seçilerek incelenmiştir [57]. Cipro'nun yüksek çözünürlüğü sebebiyle etkisini daha iyi anlayabilmek için düşük oran olarak molce %50 ve yüksek oran olarak da molce %83 seçilmiştir. Cipro'nun stok çözeltisi 3:1 kloroform/metanol ile 0.854 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır.

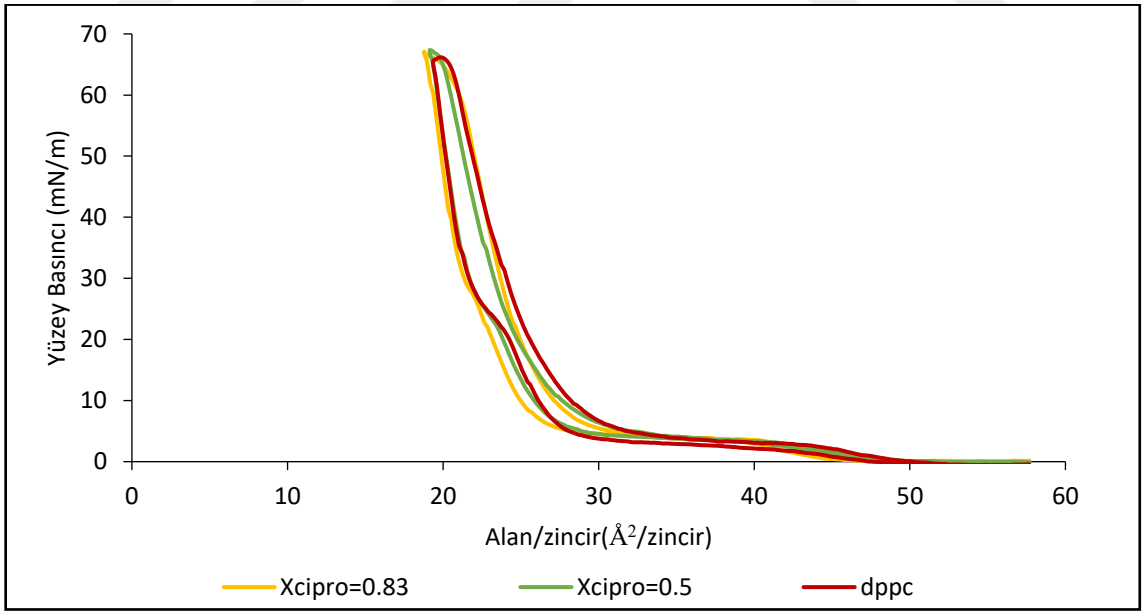


Şekil 4. 10. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda Π-A izotermleri

Suda çözünürlüğünün yüksek olmasından kaynaklı saf Cipro çözeltisinin hava-su ara yüzeyinde bir film oluşturamamaktadır [83]. DPPC enjeksiyonu ile PBS üzerinde stabil bir tekli tabaka oluşturulmasından sonra seçilen oranlarda Cipro çözeltisinin eklenerek tekli tabakanın sıkıştırılıp-genişletilmesiyle yüzey basıncı-alan izotermleri elde edilmiştir. Şekil 4. 10'a bakıldığında LE faz bölgesinde Cipro miktarının artmasıyla zincir başına ortalama alanın saf DPPC izotermine göre azaldığı yani izotermin sola kaydığı görülmektedir. Bu da ilacın bir dereceye kadar alt

fazda çözülmesinden kaynaklanmaktadır. Saf DPPC tekli tabakasının LE-LC faz geçiş bölgesinde olduğu 5 mN/m yüzey basıncı incelendiğinde, eklenen Cipro miktarının artmasıyla aynı alanda daha yüksek yüzey basıncına ulaştığı söylenebilmektedir. Bunun sebebinin pH 7.4'te zivitteriyonik özelliğe sahip olan Cipro ile DPPC molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Saf DPPC tekli tabakasının LC faz bölgesinde olduğu 20 mN/m ve üstündeki yüzey basınçlarına bakarsak bu etkinin daha az olduğu çünkü DPPC lipit diziliminin sıkıştırma ile daha sıkı olmasından kaynaklı Cipro ile etkileşimin azaldığı görülmektedir. 70 mN/m üzerinde yüzey basıncında çökmenin gerçekleştiği görülen saf DPPC tekli tabakasının, Cipro çözeltisinin eklenmesiyle değişmediği gözlenmiştir. Literatürde yapılan benzer çalışmalarla sonuçlar uyumludur [83].

Sağlıklı bir nefes alış-veriş prosesinin sürekli bir döngüye sahip olmasından dolayı ilacın sıkıştırma-genişletme döngüsüne etkisi oldukça önemlidir ve bunun için yapılan incelemeler Şekil 4. 11'de verilmiştir.



Şekil 4. 11. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Şekil 4. 11'de verilen sıkıştırma-genişletme çevrimlerine bakılarak iyileşme indeksinin göstergesi olan, DPPC tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla maksimum yüzey basınca çıkartıp daha sonra genişletme ile alan değişimi olmadan basıncın düşmesini Cipro çözeltisinin iki oranının da saf DPPC tekli tabakasına eklenmesiyle değişmediği görülmüştür. Saf DPPC tekli tabakasının geri yayılım özelliğinin, Cipro çözeltisinin iki oranının da tekli tabakaya eklenmesinin etkilemediği görülmektedir. DPPC ve DPPC/Cipro tekli tabakalarının sıkıştırma-genişletme izotermlerinin farkından da Cipro çözeltisinin saf DPPC tekli tabakasının histeresizini de değiştirmediği anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlardan, Cipro çözeltisinin eklenmesiyle DPPC tekli tabakasının döngüsel davranışını önemli derecede değiştirmediğini söylemek mümkün olmaktadır.

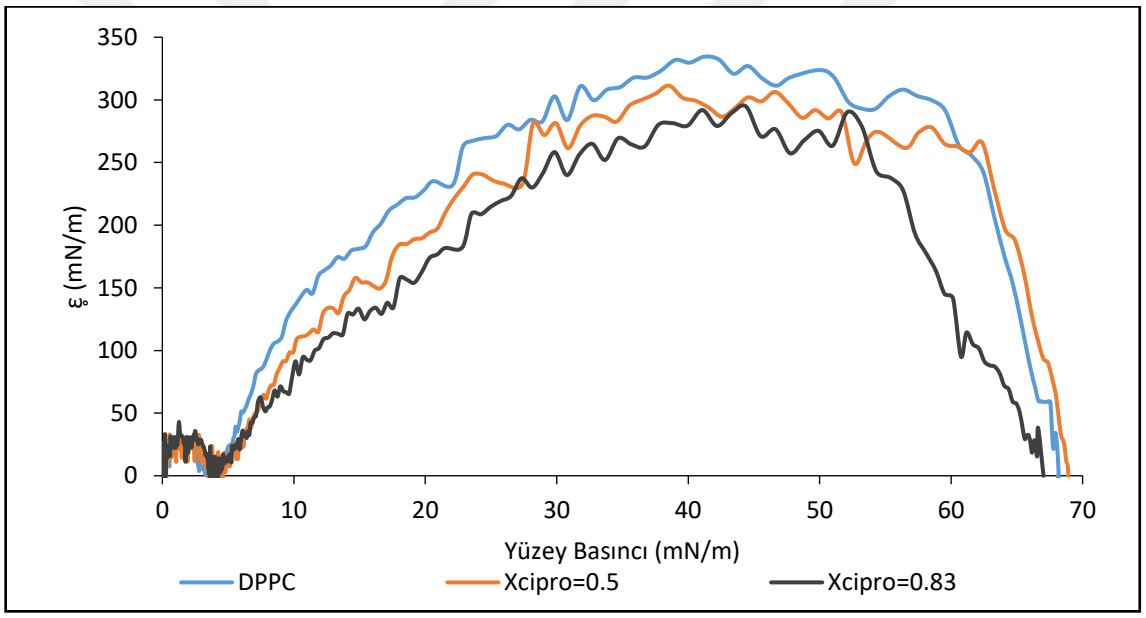
Tekli tabakanın sıkıştırılma aşamasında, ara yüzeyden kaybolan moleküllerin yüzdesini zincir başına alanlar karşılaştırılarak tahmin edilebilmektedir. Her çevrimin sıkıştırma izotermleri sırasında ara yüzeyden eksilen madde miktarları yüzdesi hesaplanarak Çizelge 4. 3'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de madde kaybı (%)			**60 mN/ m'de madde kaybı (%)**		
	DPPC	***Xcipro=0.5***	***Xcipro=0.83***	***DPPC***	***Xcipro=0.5***	***Xcipro=0.83***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	1.42	2.65	1.82	4.07	1.30	2.14
3.Sıkıştırma	3.59	4.25	3.44	5.64	2.56	2.92
4.Sıkıştırma	5.29	5.35	4.75	7.56	3.55	4.17
5.Sıkıştırma	6.77	6.03	5.37	9.43	4.42	4.76

Saf DPPC tekli tabakasının 5. sıkıştırılması sırasında ara yüzeyde bulunan lipit miktarının 30 mN/m yüzey basıncında yaklaşık %6.77'sinin, 60 mN/m yüzey basıncında %9.43'ünün kaybolduğu görülmektedir. Saf DPPC tekli tabakası için elde edilen bu değerlerin molce %50 Cipro eklenmesiyle 30 mN/m yüzey basıncında %6.03 ve 60 mN/m yüzey

basıncında %4.42 olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara bakıldığında Cipro eklenmesiyle elde edilen tekli tabakada meydana gelen sıkıştırmalar sırasındaki kayıp yüzdesinin saf DPPC tekli tabakası izotermleri arasındaki kayıp yüzdesine 30 mN/m yüzey basıncı için çok yakın olduğu hatta 60 mN/m yüzey basıncında bu kaybı azalttığı görülmektedir. Gözlenen bu durum DPPC ile Cipro molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimin tekli tabakanın sıkıştırılmasıyla artmasından kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak izotermi sola kaydırmasına rağmen hesaplanan tekli tabakaların kaybını azaltması gerçek nefes alış-veriş prosesini düşündüğümüzde ara yüzeyden madde kaybının olması istenmediği için güzel bir sonuç olmaktadır.

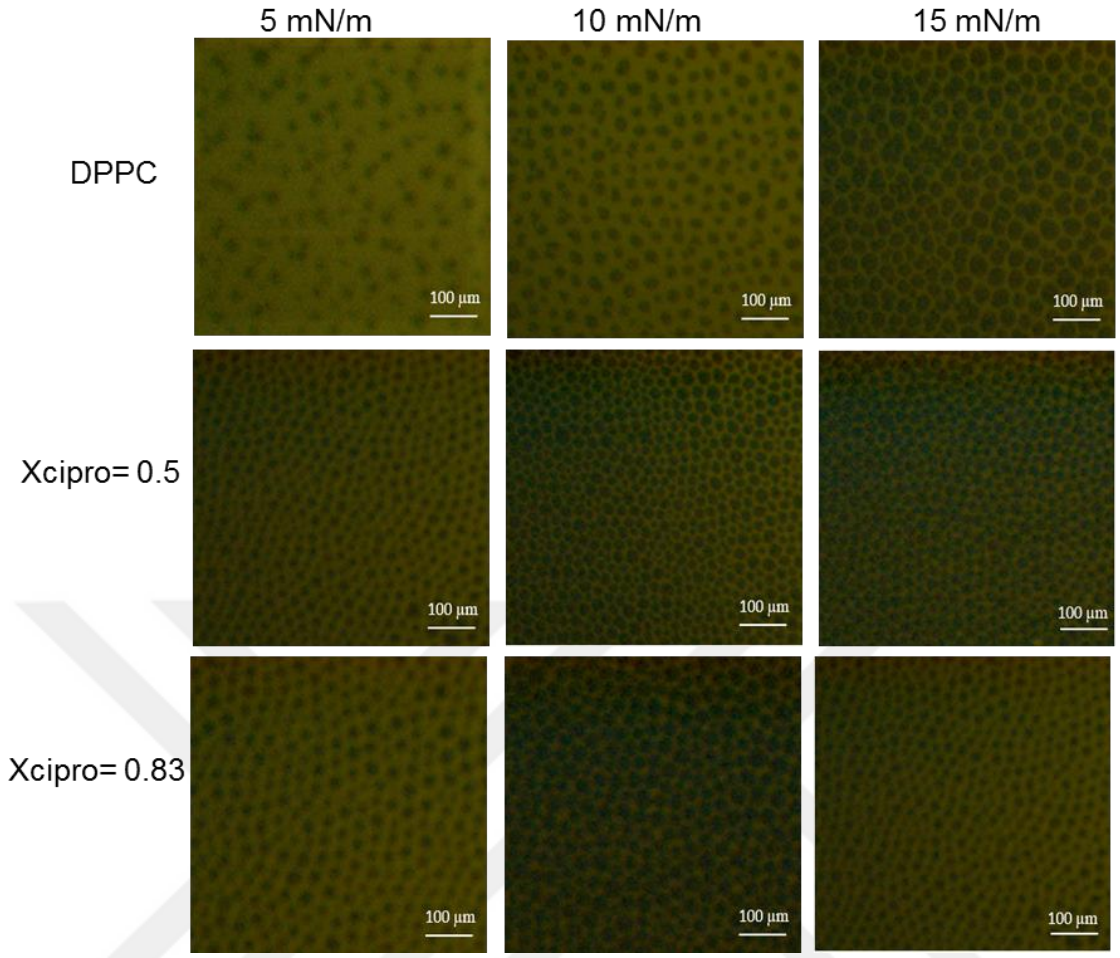


Şekil 4. 12. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda elastisitesi-yüzey basıncı grafiği

DPPC ve DPPC/Cipro tekli tabakalarının yüzey basıncı-alan izotermlerinden elde edilen elastisite değerlerine bakıldığında LE faz bölgesi için Cipro çözeltisinin eklenmesiyle saf DPPC tekli tabakasının elastisitesinin etkilenmediği görülmektedir. Bunun sebebinin LE faz bölgesinde DPPC lipit tabakasının serbest durmasından kaynaklı minimum enerjiyle moleküllerin kendi aralarında durmak istemesiyle moleküller

arasındaki etkileşimin az olması olarak düşünülmektedir. Elastisitenin yüzey basıncı farkının alan farkına oranı olmasından kaynaklı faz geçiş bölgesinde sabit kalan yüzey basıncı sebebiyle yüzey basıncı 5 mN/m'de tekli tabakaların elastisitelerinin sıfır olması eklenen Cipro çözeltilerinin DPPC faz geçiş bölgesini değiştirmemesinden kaynaklanmaktadır. LC faz bölgesine gelindiğinde 43 mN/m yüzey basıncında elde edilen maksimum elastisitenin saf DPPC tekli tabakası için 330 mN/m iken, 0.5 mol fraksiyonunda Cipro çözeltisinin eklenmesiyle 290 mN/m, 0.83 mol fraksiyonunda Cipro çözeltisinin eklenmesiyle ise 280 mN/m olduğu görülmüştür. Yani Cipro, oluşturulan DPPC tekli tabakasının kesme elastisitesini belirli bir miktar düşürmektedir. Elde edilen sonuçtan 0.83 mol fraksiyonunda Cipro çözeltisinin eklenmesiyle bile DPPC tekli tabakasının kesme elastisitesini maksimum %15 azalttığı görülmektedir.

Cipro çözeltisinin eklenmesiyle ara yüzeyde oluşan DPPC tekli tabakasının FM görüntülerinde meydana gelen değişimler Şekil 4. 13'te verilmiştir.

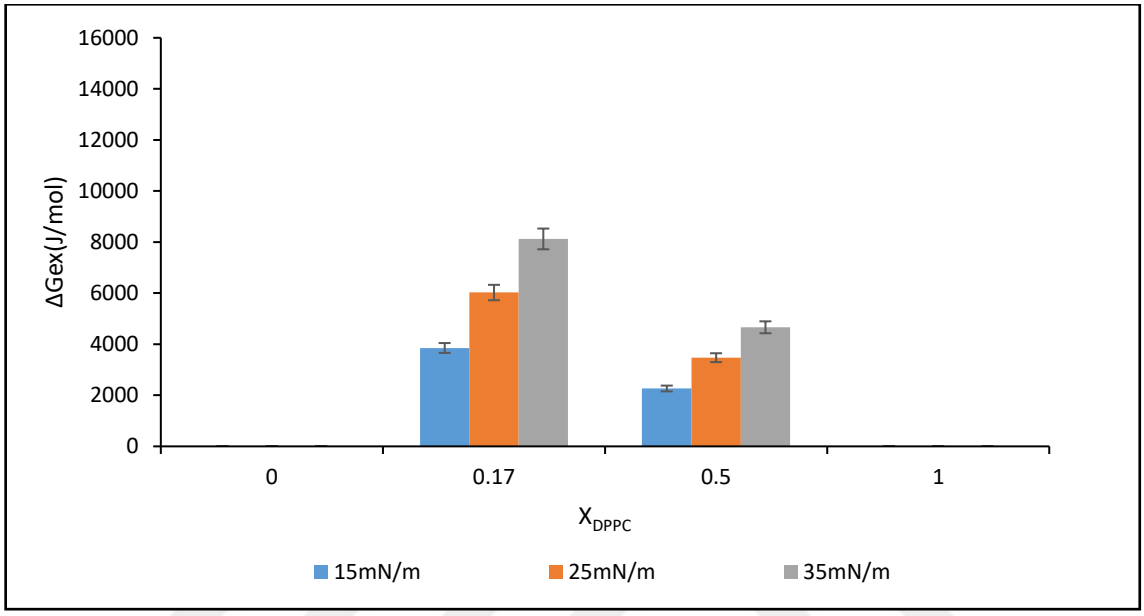


Şekil 4. 13. Fosfat tampon çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Xcipro=0.5 ve Xcipro=0.83 oranında Cipro enjeksiyonu ile farklı basınçlarında elde edilen FM görüntüleri

DPPC tekli tabakası varlığında 5 mN/m yüzey basıncında net bir şekilde görüldüğü gibi faz geçişinin göstergesi olan LC faz adacıklarının boyutunda Cipro çözeltisinin eklenmesiyle küçülme olmakta ve Cipro miktarının artmasıyla bu etki artmaktadır. Saf DPPC tekli tabakasının LC adacıklarının alanlarının boyutunda gözlenen bu azalma, Cipro moleküllerinin DPPC tekli tabakası ile etkileşimi sonucu tekli tabakanın akışkanlaşmasının göstergesi olduğu söylenebilmektedir.

LB trough ile elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinden Cipro eklenmesiyle izotermin çok değişmediği, döngülerden ara yüzeydeki madde kaybı hesabından artan Cipro miktarıyla kaybın azaldığı, elastisiteden ise Cipro eklenmesiyle oluşan elastisite değişiminin ihmal

edilebilir düzeyde olduğu, FM görüntülerinden yüzeyin akışkanlaşmasının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar DPPC ve Cipro'nun karışabilirliği hakkında ipucu vermektedir. Ancak ara yüzeyde DPPC ve Cipro'nun karışım özelliklerini daha detaylı incelemek için ara yüzey termodinamik açıdan incelenmiştir.



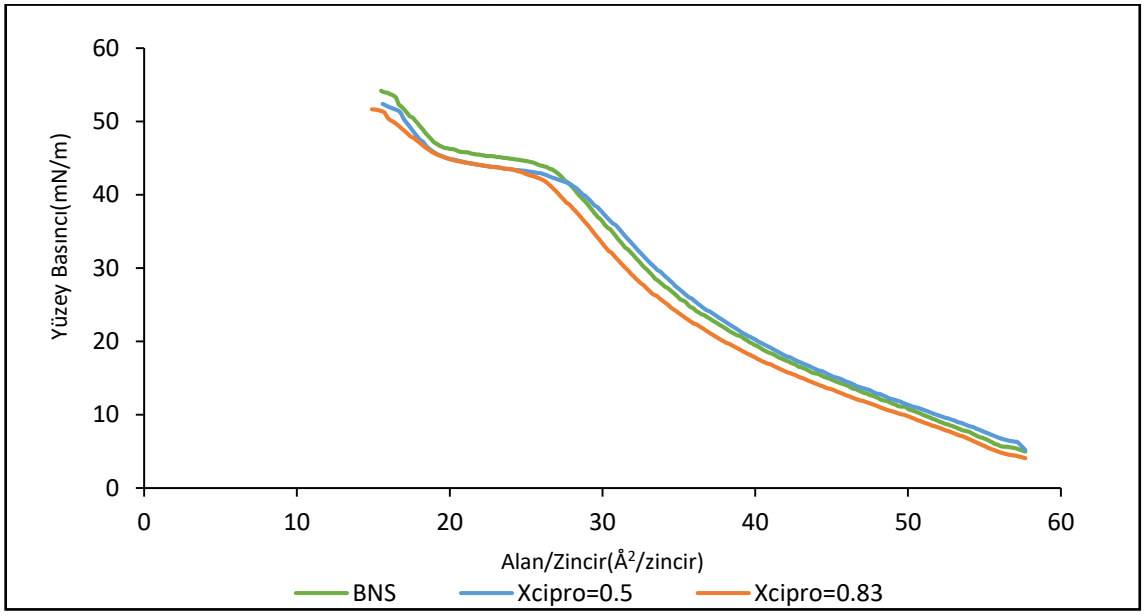
Şekil 4. 14. Fosfat tampon çözeltisinde DPPC tekli tabakası varlığında X_{Cipro}=0.5 ve X_{Cipro}=0.83 oranında Cipro enjeksiyonu sonrası farklı basınçlarında Gibbs Serbest Enerjileri

Fosfat tampon üzerine DPPC tekli tabakası oluşturulup daha sonra ilaç enjeksiyonu yapılarak elde edilen sistemin üçüncü sıkıştırma izotermleri kullanılarak Eşitlik 2. 2'den hesaplanan ΔGex değerlerinin bütün yüzey basınçlarında pozitif olduğu görülmektedir. Hesaplanan ΔGex değerlerinin pozitif olması DPPC ve Cipro molekülleri arasındaki itme etkileşimini göstergesidir. Tüm değerlerin pozitif olma sebebinin pH 7.4 fosfat tampon çözeltisinde Cipro'nun zivitteriyonik özellik göstermesiyle zivitteriyonik özelliğe sahip olan DPPC moleküllerinin etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [84]. Sabit yüzey basıncında Cipro miktarının artmasıyla etkileşimin artmasından dolayı ΔGex değerinin de arttığı görülmektedir. Düşük yüzey basıncında moleküller kendi aralarında serbest halde durmak istedikleri için minimum enerjiyle daha az ΔGex değeri elde

edilmektedir. Ancak basıncın artmasıyla sıkışan tekli tabakada alanın azalması sebebiyle moleküllerin baş grupları da etkileşime girmeye başlamakta ve ΔGex değeri giderek artmaktadır.

Siprofloksasin'in BNS Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi

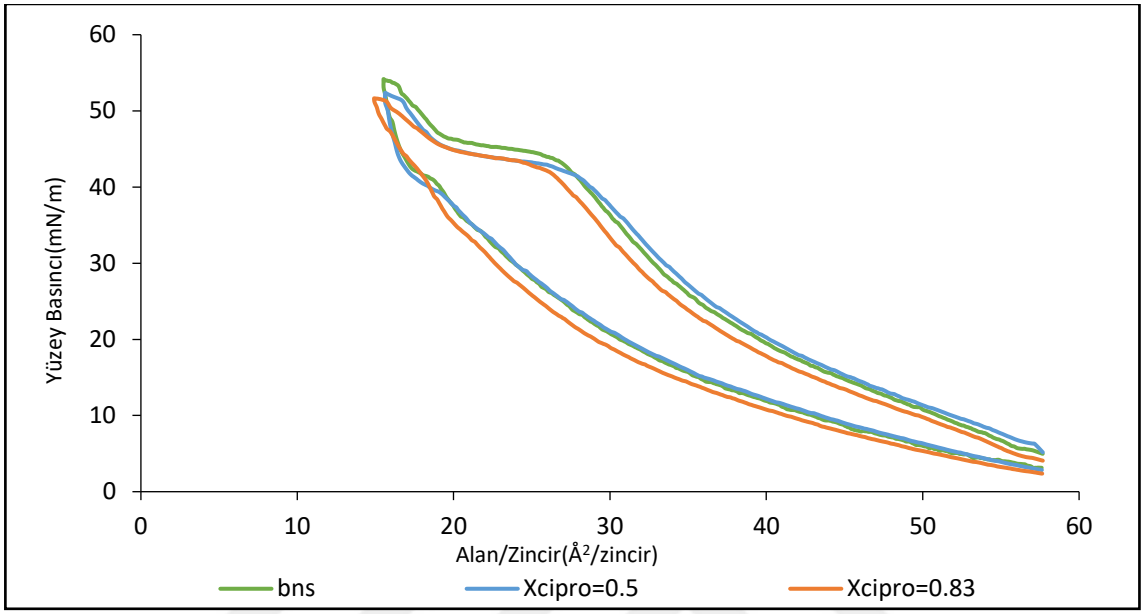
DPPC ile Cipro'nun etkileşimi ayrıntılı bir şekilde incelendikten sonra, gerçek solunum sistemini daha iyi yansıtmak amacıyla kullanılan BNS ile de Cipro etkileşimi benzer şekilde araştırılmıştır. Etkileşimi karşılaştırabilmek için aynı konsantrasyonda hazırlanmış aynı oranda (molce %50 ve 83) Cipro çözeltileri kullanılmıştır.



Şekil 4. 15. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda Π-A izotermleri

BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltinin farklı oranlarda eklenmesi sonucu elde edilen yüzey basıncı-alan izotermine bakıldığında Cipro çözeltisinin eklenmesiyle LE faz bölgesinde saf BNS izotermine göre ilacın alt fazda çözünmesinden kaynaklı olarak elde edilen izotermi bir miktar sola kaydırdığı yani aynı yüzey basıncına daha düşük alanda ulaşılabildiği görülmektedir. Eklenen Cipro miktarı arttıkça kayma da artmaktadır. Cipro'nun pH 7.4 değerinde zivitteriyonik olması ve BNS içinde negatif

yüklü proteinler (SP-B ve SP-C), zivitteriyonik DPPC ve negatif ve pozitif yüklü lipitler arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Cipro'nun BNS karışımı ile olan etkileşimi DPPC ile olan etkileşiminden daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 16. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Şekil 4. 16'da verilen saf BNS tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme döngüsüne bakarak iyileşme indeksinin Cipro çözeltisinin eklenmesiyle oluşturulan tekli tabaka için değişmediği görülmektedir. Cipro çözeltisinin eklenmesinin BNS tekli tabakasının geri yayılım özelliğini ve histeresizini de etkilemediği görülmektedir. Saf DPPC tekli tabakasının döngüsel davranışına benzer şekilde Cipro etken maddesinin enjeksiyonu ile BNS tekli tabakasının döngüsel davranışında değişime neden olmadığı söylenebilmektedir.

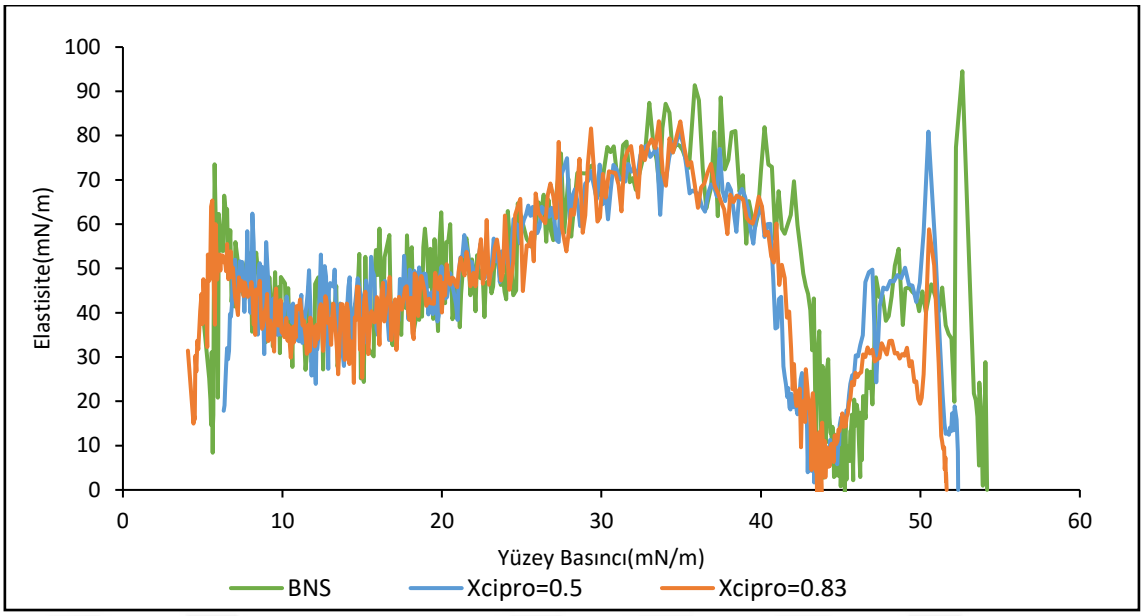
Her çevrimin sıkıştırma izotermleri sırasında ara yüzeyden kaybedilen madde miktarları yüzdeleri hesaplanarak Cipro etken maddesinin BNS tekli tabakasının ara yüzey kaybını nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Çizelge 4. 4. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de Kayıp (%)			**45 mN/m'de Kayıp (%)**		
	BNS	***Xcipro=0.5***	***Xcipro=0.83***	***BNS***	***Xcipro=0.5***	***Xcipro=0.83***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	8.20	8.38	9.53	6.84	12.16	11.47
3.Sıkıştırma	13.47	14.95	15.31	11.97	18.34	16.26
4.Sıkıştırma	18.50	21.48	20.07	20.55	22.31	21.33
5.Sıkıştırma	22.41	25.19	24.68	21.44	25.69	23.90

BNS tekli tabakasının LE faz bölgesinde olduğu 30 mN/m yüzey basıncında sıkıştırılıp-genişletme ile ara yüzeyde meydana gelen molekül kaybının giderek arttığı görülmektedir. Cipro çözeltisinin eklenmesiyle elde edilen DPPC/Cipro tekli tabakasının sıkıştırılıp-genişletilmesiyle ara yüzeyden alt faza geçen madde miktarı artmaktadır. Eklenen Cipro miktarının artmasıyla kaybın bir miktar arttığı ancak sonra düşük oranda Cipro ile aynı kaldığı görülmektedir. LC faz bölgesine geçmekte olduğu 45 mN/m yüzey basıncında ilacın ara yüzeydeki madde miktarını azalttığı net olarak gözlenmektedir. Bu da yüzeyin sıkışmasıyla ara yüzeyde alanın azalmasıyla BNS ve Cipro molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimin daha çok olmasından kaynaklanmaktadır. Cipro etken maddesinin, DPPC tekli tabakasına oranla BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla ara yüzeyden daha çok kayba yol açmasının sebebi ise BNS karışımında bulunan diğer yüklü lipit ve proteinlerden kaynaklı etkileşimi arttırması olarak açıklanabilmektedir.

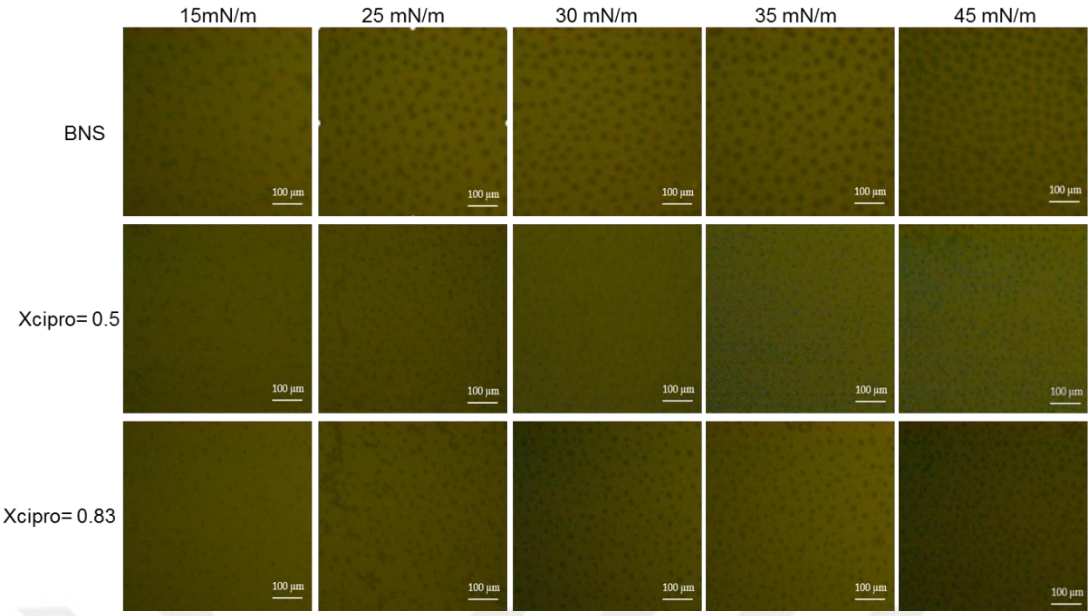
Ara yüzeyden bir miktar da olsa saf BNS tekli tabakasına göre daha fazla kayba yol açtığı görülen Cipro etken maddesinin ara yüzeyin elastisitesi üzerine etkisini incelemek de akciğer sürfaktanının fonksiyonel özelliğine etkisini yorumlayabilmek adına oldukça önemlidir. Bunun için de elde edilen tekli tabakaların LB trough ile elde edilen kesme elastisiteleri incelenmiştir.



Şekil 4. 17. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin 0.5 ve 0.83 mol fraksiyonunda elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri

Cipro çözeltisinin eklenmesi BNS tekli tabakası izoterminde kayba sebep olmasına rağmen BNS tekli tabakasının elastisite grafiğinde DPPC tekli tabakasında olduğu gibi LE faz bölgesinde ve faz geçiş bölgesinde değişiklik meydana getirmemiştir. Ancak LC faz bölgesinde BNS tekli tabakasının elastisitesinde azalma ortaya çıkmıştır. Bu, tekli tabakanın sıkıştırılmasıyla etkileşiminin artmasından kaynaklanmaktadır. LC faz bölgesine göre LE faz bölgesinde farkın hiç olmamasının nedeni LE faz bölgesinde lipit zincirlerinin duruşunun moleküller arası kohezyonu etkilemesi olduğu bilinmektedir [68].

Cipro çözeltisinin BNS tekli tabakasının elastisite değerine etkisi de incelendikten sonra FM cihazıyla hava/sıvı ara yüzey görüntüleri alınarak elde edilen sonuçlar Şekil 4. 18'de verilmiştir.

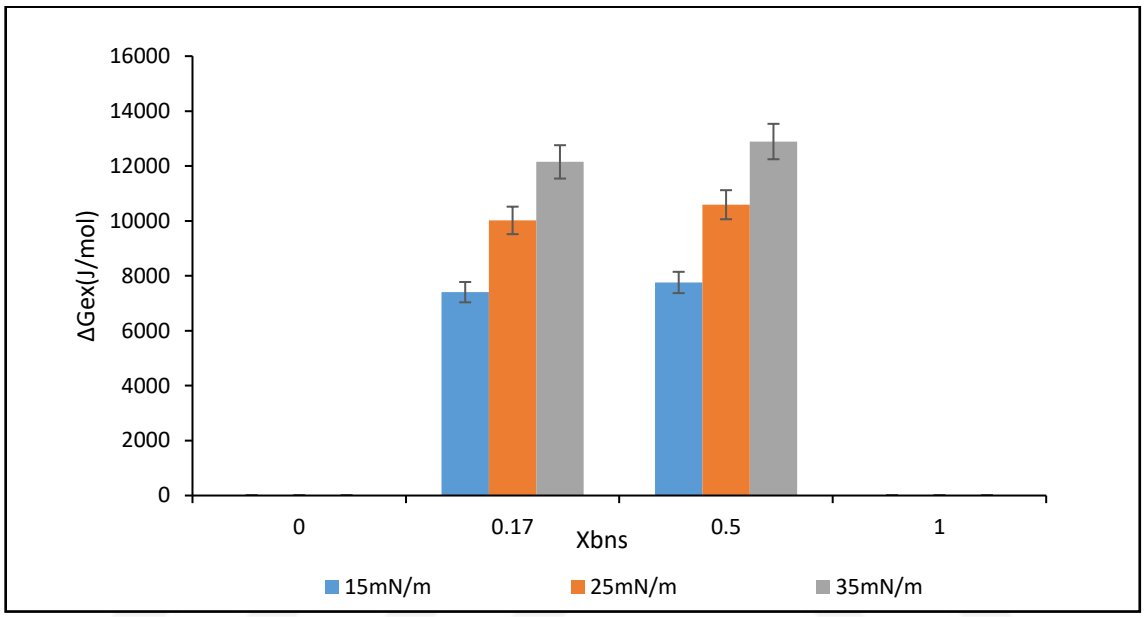


Şekil 4. 18. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin Xcipro=0.5, Xcipro=0.83 oranında enjeksiyonu ile farklı basınçlarda elde edilen FM görüntüleri

FM görüntülerine bakıldığı zaman, saf BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin eklenmesi sonucu LC adacıkları üzerine mevcut bir etkisinin meydana geldiği net bir şekilde görülebilmektedir. Meydana gelen bu etkinin, LC adacıkları boyutunu küçültme yönünde bir davranış gösterdiği, yani esas olarak tabakayı akışkanlaştırmakta olduğu ileri sürülebilmektedir. Şekil 4. 18'de yüksek yüzey basıncı altında elde edilen görüntülerde, Cipro çözeltisinin ortama eklenmesinin ardından yoğunlaşan BNS tekli tabakası ile Cipro molekülleri arasındaki etkileşimlerin artması sonucu adacıklara olan etkinin de arttığı görülebilmektedir. Aynı zamanda, ortamda bulunan Cipro molekülü miktarı ile doğru orantılı olarak bu etkileşimlerde artış meydana gelmektedir.

Şimdiye kadar yapılan Cipro çözeltisinin iki farklı oranında basınç-alan izotermleri, elastisite değerleri, ara yüzeyden kaybolan molekül yüzdeleri ve FM görüntüleri BNS ile etkileşim türünün belirlenmesi ve bileşenlerin karışabilirliği hakkında bilgi vermeye yardımcı olsa da karışımın ara yüzey özelliklerini termodinamik açıdan incelemek gerekmektedir.

Gibbs serbest enerjisi (ΔG), prosesin kendiliğinden oluşup oluşmadığını belirtmekte kullanılan termodinamik bir terim olarak bilinmektedir. Gibbs serbest enerji değerinin negatif olması prosesin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermektedir. Termodinamik olarak inceleme yapmak için sistemin ideallikten hangi yöne saptığını gösteren Artık Gibbs Serbest Enerji (ΔGex) hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4. 19'da verilmiştir.



Şekil 4. 19. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakası varlığında Cipro çözeltisinin X_{Cipro} =0.5 ve X_{Cipro} =0.83 oranında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında Gibbs Serbest Enerjileri

Cipro çözeltisinin BNS tekli tabakasına enjekte edilen iki oranı için de artık Gibbs serbest enerjisinin hesaplanmasıyla elde edilen verilere bakıldığında değerlerin tüm yüzey basınçları için pozitif olduğu görülmektedir. Bu değerin pozitif olması BNS ile Cipro molekülleri arasında itme etkileşiminin göstergesidir ve karışabilen ideal olmayan ara yüzey oluşturduklarını belirtmektedir. Cipro'nun çalışılan pH değerinde zivitteriyonik olmasıyla BNS karışımı içindeki aynı yüklü moleküllerle etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Yüzey basıncının artmasıyla elde edilen değerlerin artması sıkışan moleküller arasında daha çok etkileşimin olduğunu göstermektedir. DPPC ile olan etkileşiminin tersine, Cipro miktarı arttıkça ΔGex değeri neredeyse hiç değişmemektedir. BNS içinde

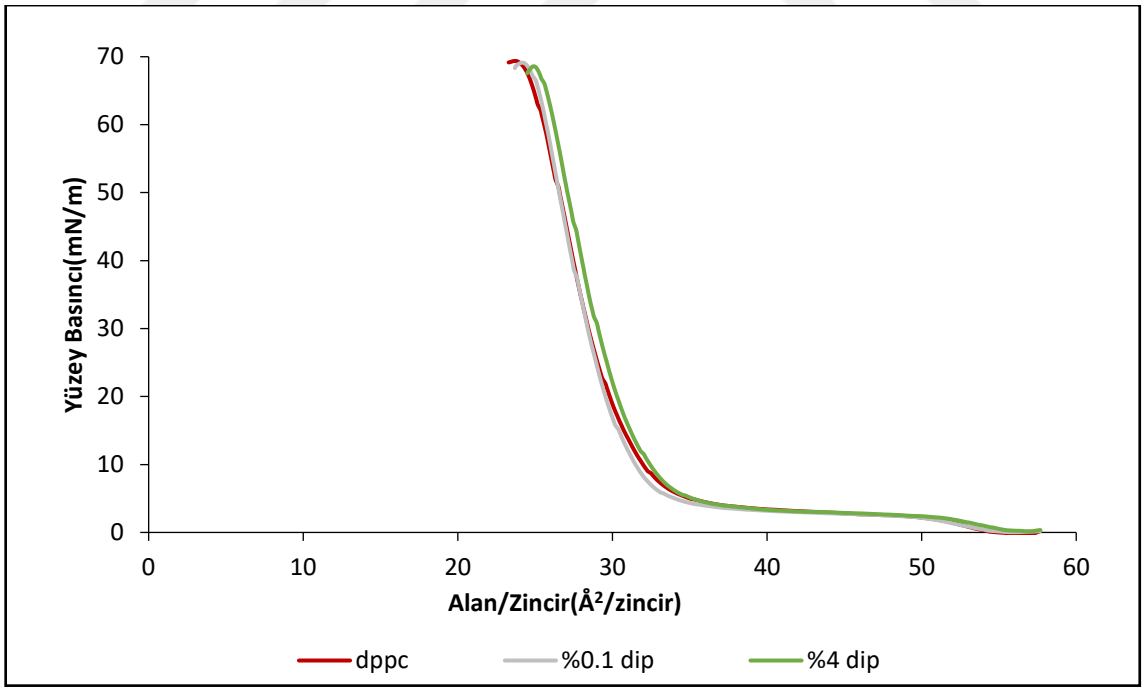
bulunan yüklü lipitler ve proteinler ile Cipro molekülünün etkileşiminin dengelenmesinden kaynaklanmaktadır.

4.2.2. Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Dipiradamol'ün Etkisinin İncelenmesi

Tıpta koroner vazodilatatör ve antitümör bileşiklerin koaktivatörü olarak kullanılan, pH 7.4'te hidrofobik olan neredeyse çözünürlüğü sıfır olan simetrik yapılı Dip etken maddesi, 3:1 oranında kloroform/metanol'de 0.34 mg/ml stok çözeltisi hazırlanarak sentetik yüzey aktif madde modeli olan DPPC ile etkileşimi ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Dip'in yarattığı etkiyi daha iyi anlamak için literatür araştırması sonucu karar verilen iki oran kullanılmıştır [80].

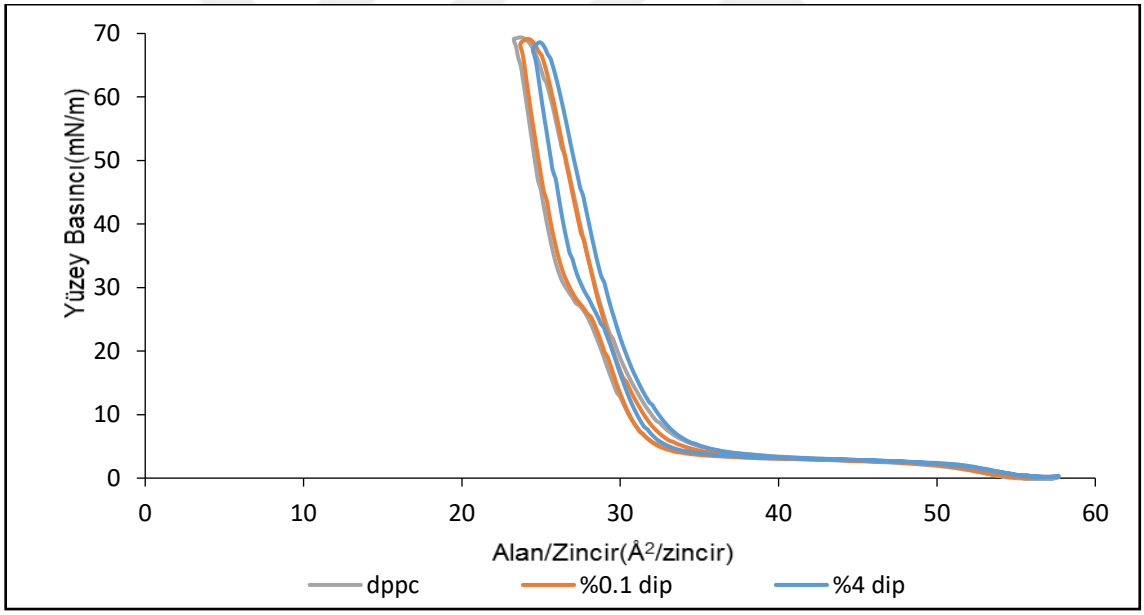
Dipiradamol'ün DPPC Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi

Literatürde yapılan çalışmalardan yola çıkarak molce %0.4 kritik Dip oranından dolayı bir yüksek (%4) bir düşük (%0.1) iki farklı oran seçilmiştir.



Şekil 4. 20. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında Π-A izotermleri

Şekil 4. 20'de PBS çözeltisi üzerinde DPPC tekli tabakası oluşturulduktan sonra iki farklı oranda Dip çözeltisinin tabaka üzerine enjeksiyonu ile oluşturulan sıkıştırma izotermleri gösterilmektedir. Görüldüğü gibi Dip çözeltisinin eklenmesiyle saf DPPC tekli tabaka izoterminde çok az bir etki olmaktadır. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda da olduğu gibi, %0.4 mol oranının altındaki Dip oranlarında DPPC izotermindeki değişim aynı yüzey basıncında daha düşük alana kayma şeklinde görülürken, %0.4 mol oranı üzerindeki oranlarda aynı alanda daha yüksek yüzey basınçlarına doğru görülmektedir [80]. Dip ile DPPC molekülleri arasında hidrofobik etkileşimin olmasından kaynaklı bu sonuçlar elde edilmektedir. Literatür araştırmaları sonucu Dip miktarlarının ayarlanmasıyla gerçekleştirilen çalışmada sonuçların uyumlu çıkması sistemin düzgün çalıştığını göstermektedir.



Şekil 4. 21. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Şekil 4. 21'de verilen PBS çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakası oluşturulduktan sonra 2 farklı oranda Dip çözeltisinin tabaka üzerine enjeksiyonu ile oluşturulan sıkıştırma-genişletme çevrimlerine bakarak saf DPPC tekli tabakası için iyileşme indeksinin Dip çözeltilerinin

eklenmesiyle değişmediği söylenebilmektedir. Ayrıca saf DPPC tekli tabakasının geri yayılım özelliğinin ve histeresizinin Dip çözeltilerinin eklenmesiyle etkilenmediği görülmektedir. Böylece Dip etken maddesinin akciğer yüzey aktif madde modelinin döngüsel davranışı üzerine bozucu bir etki yaratmadığını söylemek mümkün olmaktadır.

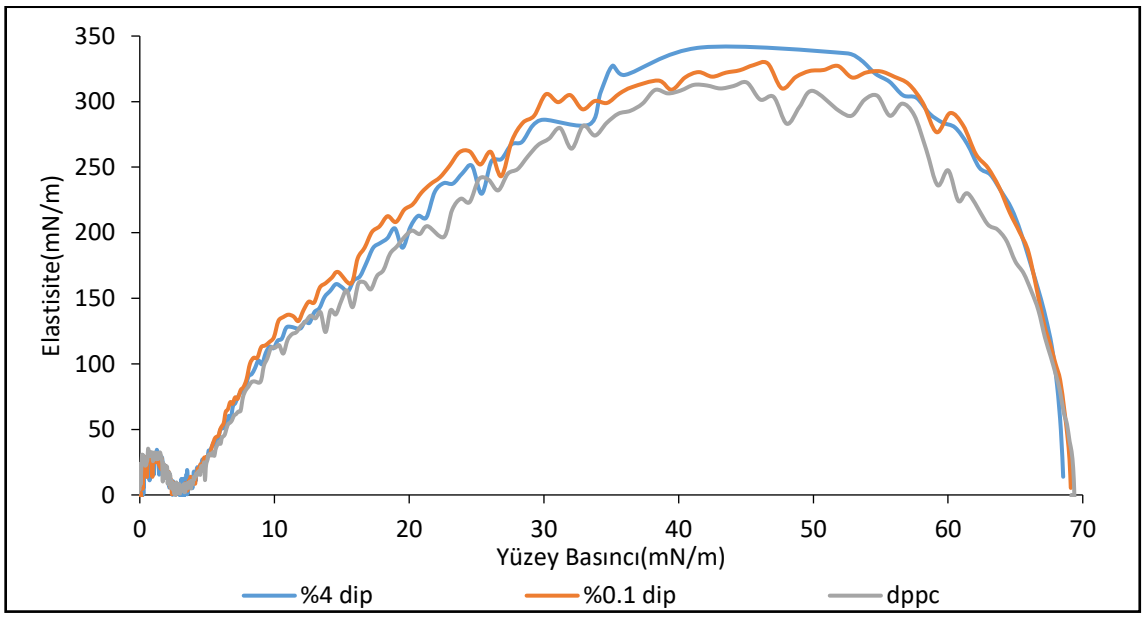
Dip etken maddesinin DPPC tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme sonucu ara yüzeyde bulunan miktarını nasıl etkilediğini sayısal olarak ifade etmek, Dip'in DPPC tekli tabakasının ara yüzey özelliklerini nasıl değiştirdiğini anlamak açısından önemli bir incelemedir. Her çevrimin sıkıştırma izotermleri sırasında ara yüzeyden kaybolan madde miktarları yüzdesi tekli tabakaların ilk sıkıştırma izotermleri referans alınarak hesaplanmış ve Çizelge 4. 5'te verilmiştir.

Çizelge 4. 5. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de kayıp (%)			**60 mN/m'de kayıp (%)**		
	DPPC	***%0.1 Dip***	***%4 Dip***	***DPPC***	***%0.1 Dip***	***%4 Dip***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	3.97	1.28	3.97	2.88	0.63	2.87
3.Sıkıştırma	5.96	2.54	5.95	4.66	1.55	4.62
4.Sıkıştırma	7.14	3.42	7.84	6.74	2.25	6.35
5.Sıkıştırma	9.58	4.16	9.65	8.45	3.65	8.77

Alınan çevrimlerde ilk beş döngüde sıkıştırma sırasında belirli bir yüzey basıncındaki alan değerlerine bakılarak elde edilen tekli tabakanın ilk izotermi için okunan değer %100 kabul edilerek diğer sıkıştırmalarda ara yüzeyden kaybolan madde miktarı yüzdeleri hesaplanmıştır. DPPC/Dip tekli tabakasının ara yüzeyde bulunan molekül yüzdelerine bakıldığında görüldüğü gibi %0.1 mol oranında 30 mN/m'de beşinci sıkıştırma sonunda ara yüzeyden alt faza geçen madde miktarı %4.16 olmuş iken 60 mN/m yüzey basıncında 3.65 olmuştur. %4 mol oranında ise iki basınç için de ara yüzeydeki madde miktarı neredeyse saf DPPC tekli tabakasının kayıp miktarıyla aynı olmaktadır. Sonuç olarak Dip çözeltisinin

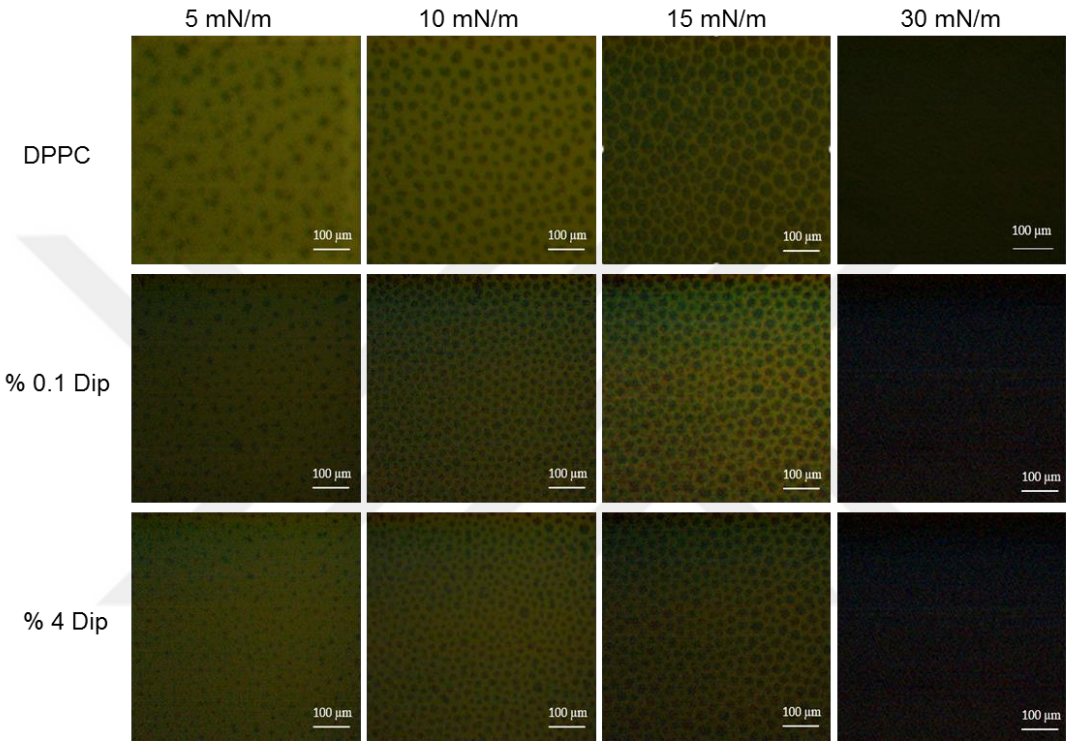
eklenmesiyle saf DPPC tekli tabakası ara yüzeyinde molekül kaybının azaldığı, Dip oranının artmasıyla da saf DPPC için elde edilen sonuçla aynı kayıp miktarına ulaşıldığı söylenebilmektedir. Bunun sebebi, hidrofobik özellikte olan ve çalışılan pH değerinde yüksüz özelliğe sahip Dip etken maddesinin DPPC moleküllerinin kuyruk gruplarıyla yaptığı hidrofobik etkileşimdir. Sonuç olarak Dip etken maddesinin saf DPPC tekli tabakası üzerine etkisinin olmadığını söylemek mümkündür. Pulmoner taşınım sırasında ilacın akciğer sürfaktanını olumsuz etkilememesine dikkat edildiği için elde edilen sonuç oldukça önemlidir.



Şekil 4. 22. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri

Fosfat tampon çözeltisi üzerinde hazırlanan saf DPPC tekli tabakası üzerine Dip çözeltilerinin eklenmesiyle hesaplanan elastisite değerleriyle elde edilen grafik Şekil 4. 22'de verilmiştir. Eklenen Dip çözeltilerinin LE faz bölgesinde ve faz geçiş bölgesinde Cipro çözeltisinin eklenmesiyle olduğu gibi DPPC tekli tabakasının elastisitesini etkilemediği görülmektedir. LC faz bölgesinde ise maksimum elastisite değeri saf DPPC tekli tabakası için 310 mN/m iken %0.1lik Dip çözeltisinin eklenmesiyle 322 mN/m'ye, %4lük Dip çözeltisinin eklenmesiyle 336 mN/m'ye çıktığı

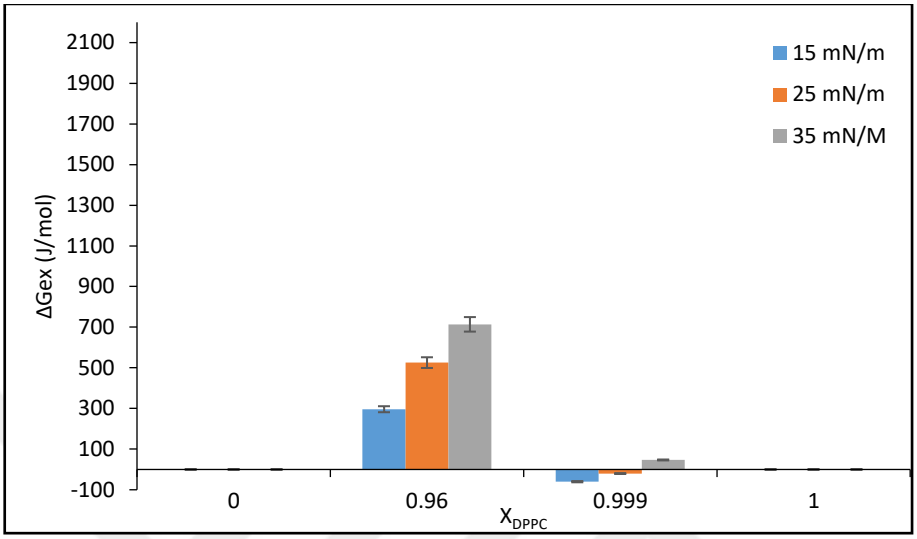
belirlenmiştir. Tekli tabakanın elastisitesinin yüksek olması, gerçek solunum prosesisin sürekli olmasından dolayı istenen bir özellik olması sebebiyle elde edilen sonuçlardan Dip moleküllerinin DPPC tekli tabakasıyla etkileşmesiyle tekli tabaka elastisitesini çok az da olsa arttırarak Dip molekülünün DPPC tekli tabakasını olumlu bir şekilde etkilediği görülmüştür.



Şekil 4. 23. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında farklı yüzey basınçlarında FM görüntüleri

Fosfat tampon çözeltisi üzerine 2 mg/ml DPPC ve %1'lik R18 boya karışımının Hamilton şırınga ile enjeksiyonu sonrası elde edilen farklı yüzey basınçlarında FM görüntülerini Şekil 4. 23'te görmekteyiz. Yüzey basıncının artışı ile LC faz adacıklarının küçülerek çoğaldığı, ancak saf DPPC tekli tabakası için elde edilen görüntüleri çok değiştirmediği gözlenmiştir. Bu da Dip çözeltisinin DPPC tekli tabakasına dahil edilmesiyle bir dereceye kadar tekli tabakanın akışkanlığını arttırdığını göstermektedir.

FM görüntülerinin elde edilmesinden sonra ara yüzeyde DPPC ile Dip moleküllerinin karışabilirliklerini termodinamik açıdan incelemek için elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinden faydalanılarak artık Gibbs serbest enerjileri hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4. 24'te verilmiştir.



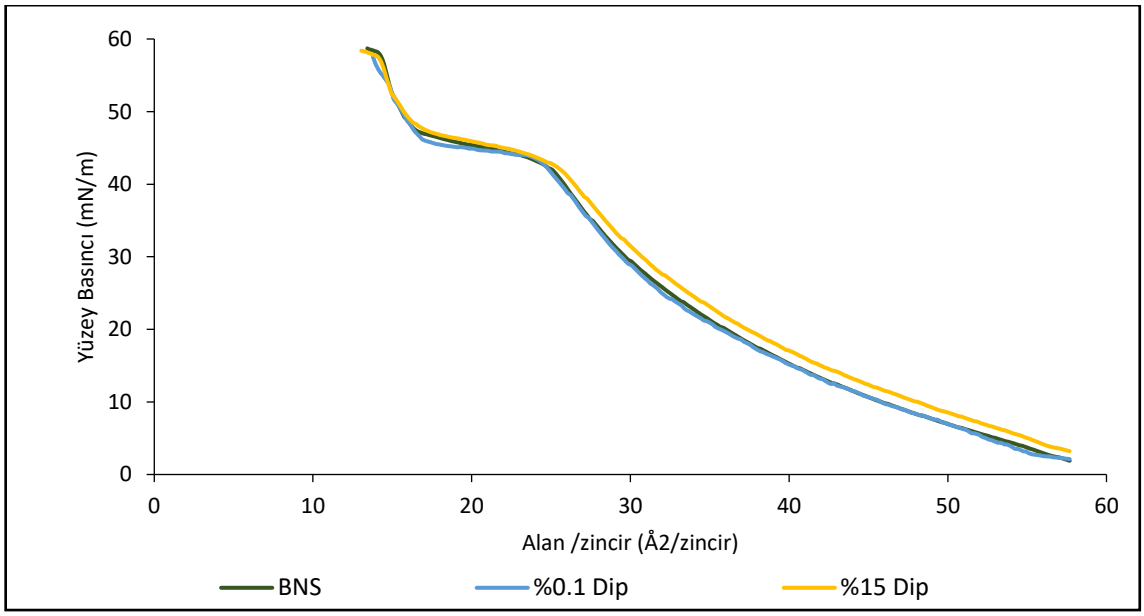
Şekil 4. 24. Fosfat tampon çözeltisinde saf DPPC tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 4 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında Gibbs Serbest Enerjileri

Şekil 4. 24'te görüldüğü gibi literatürde belirlenen kritik Dip çözeltisi oranının altında ve üstünde hesaplanan artık Gibbs enerjileri farklılık göstermektedir. Dip çözeltisinin %4 mol oranında tüm yüzey basınçlarında hesaplanan ΔGex değerlerinin pozitif olduğu ve yüzey basıncının artmasıyla ΔGex değerinin artması DPPC ile Dip molekülleri arasındaki sinerjik etkileşimin artmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen ΔGex değerinin pozitif olması, iki madde arasında itme etkileşiminin olduğunu gösterdiği bilindiği için %4 mol oranında kullanılan Dip çözeltisi ile DPPC molekülleri arasında itme etkileşimi baskın olmaktadır. Dip çözeltisinin %0.1 mol oranında düşük yüzey basıncında (15 mN/m) ΔGex değerinin negatif olması DPPC ile Dip molekülleri arasında çekme etkileşimi olduğunu göstermektedir. Daha sonra yüzey basıncının artmasıyla sıfıra yaklaşmakta ve pozitif değere geçtiği görülmektedir. Sıfıra çok yakın olan bu değerler %100 DPPC gibi de düşünülebilmektedir. Cipro etken maddesinin DPPC ile karıştırılmasıyla

hesaplanan değerlerle karşılaştırılırsa, Dip etken maddesi için bu değerlerin çok düşük olduğu görülmektedir. Bunun sebebi olarak da çalışılan pH değerinde Cipro'nun yüklü, Dip'in nötr olmasından kaynaklıdır.

DPPC model akciğer sürfaktanının yanı sıra doğal akciğer yüzey aktif madde sistemiyle de deneyler yapılmış ve Dip etken maddesi ile etkileşimi incelenmiştir.

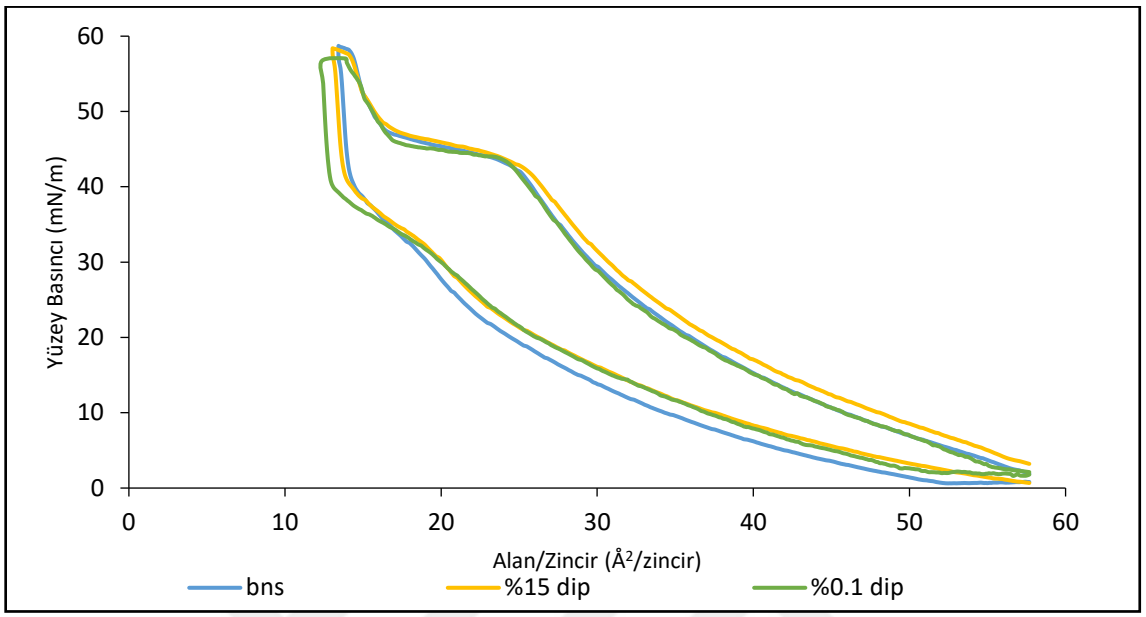
Dipiradamol'ün BNS Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi



Şekil 4. 25. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında Π-A izotermleri

DPPC tekli tabakasında olduğu gibi PBS üzerinde BNS tekli tabakası oluşturulduktan sonra 2 farklı oranda Dip çözeltisinin tabaka üzerine Hamilton şırıngası ile enjeksiyonu sonrası sıkıştırma izotermleri Şekil 4. 25'te görülmektedir. Elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinde görüldüğü gibi Dip çözeltisinin eklenmesiyle saf BNS tekli tabakası izoterminde çok az bir etki olmaktadır. DPPC tekli tabakası ile yapılan çalışmada literatürde olduğu gibi molce %0.4 Dip oranının alt ve üst değerleri için farklılıkların benzer olduğu belirtilmişti ve BNS tekli tabakası

için yapılan deneylerde benzer sonuçlar Şekil 4. 25'te görülmektedir. Dip çözeltisinin tekli tabakaya eklenmesinin saf DPPC tekli tabaka izotermine etkisiyle saf BNS tekli tabaka izotermine etkisi benzerlik göstermektedir.



Şekil 4. 26. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Oluşturulan BNS tekli tabakası üzerine Dip çözeltisinin enjeksiyonu sonrası elde edilen sıkıştırma-genişletme döngüleri Şekil 4. 26'da verilmektedir. Verilen sıkıştırma-genişletme çevrimlerine bakılarak Dip çözeltilerinin saf BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla maksimum yüzey basıncı olan 60 mN/m'ye çıkartıp daha sonra genişletme ile alan değişimi olmadan yüzey basıncını 40 mN/m'ye düşürmesi ve bunun iyileşme indeksini olarak bilinmesinden dolayı, Dip çözeltisinin BNS tekli tabakasının iyileşme indeksini değiştirmediği söylenebilmektedir. BNS tekli tabakasının içerdiği hidrofobik proteinlerden dolayı geri yayılım özelliği DPPC tekli tabakasından daha iyi olduğu bilinmekte olmasına rağmen Dip çözeltisinin BNS tekli tabakasının bu özelliğini de etkilemediği görülmektedir. Elde edilen şekildeki sıkıştırma-genişletme eğrilerinin farkına bakılarak da Dip eklenmesiyle BNS tekli tabakasının histeresizinin de değişmediği gözlenmiştir.

Alınan döngülerden DPPC ve Dip molekülleri arasındaki etkileşim sonrası ara yüzeydeki madde kaybı yüzdeleri hesaplanmıştır. Her çevrimin sıkıştırma izotermleri sırasında hesaplanan ara yüzeydeki madde miktarları yüzdeleri tekli tabakaların ilk sıkıştırma izotermleri referans alınarak hesaplanan değerler Çizelge 4. 6'da verilmiştir.

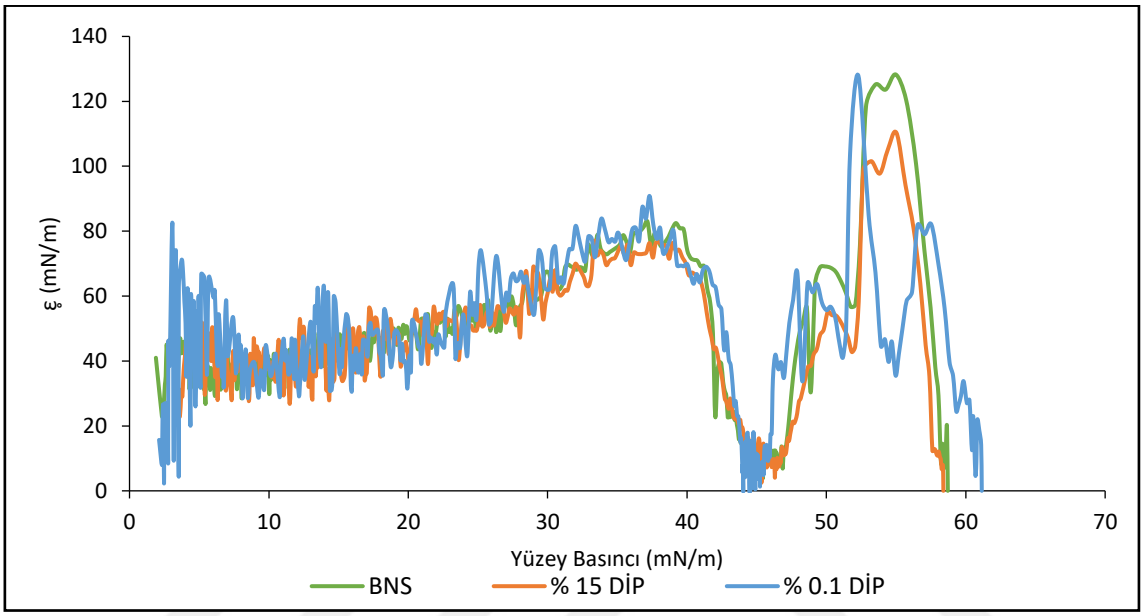
Çizelge 4. 6. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında pbs tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de kayıp (%)			**45 mN/m'de kayıp (%)**		
	BNS	***%0.1 Dip***	***%15 Dip***	***BNS***	***%0.1 Dip***	***%15 Dip***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	5.78	6.07	8.75	8.56	3.17	8.07
3.Sıkıştırma	10.98	10.38	13.21	11.58	5.13	12.00
4.Sıkıştırma	15.41	16.99	18.03	16.64	8.86	17.33
5.Sıkıştırma	18.62	21.84	21.75	18.75	10.73	21.53

Alınan çevrimlerde ilk beş döngü için hesaplanan ara yüzeydeki molekül yüzdelerine bakıldığında beşinci sıkıştırma sonunda 30 mN/m yüzey basıncında %0.1 mol oranında Dip çözeltisinin eklenmesiyle %21.84 kaybın olduğu, %15 mol oranında Dip çözeltisinin eklenmesiyle ara yüzeyde bulunan madde miktarının %21.75 oranında azaldığı görülmüştür. Eklenen Dip molekülü miktarının artmasıyla moleküllerin ara yüzeyden kaybolan molekül miktarının maksimum %3 oranında artarak son izotermde sabitlenmektedir. BNS tekli tabakasının LE faz bölgesinde olmasına rağmen kaybın sadece %3 oranında artması oldukça güzel bir sonuçtur. Yüzey basıncı 45 mN/m'de ise %0.1lik Dip çözeltisinin eklenmesiyle ara yüzeydeki molekül kaybı %10.73, %15'lik Dip çözeltisinin eklenmesiyle ise ara yüzeyde bulunan molekül miktarında %21.53 azalış olmuştur. 45 mN/m yüzey basıncında ise BNS moleküllerinin LC faz bölgesinde olmasına rağmen Dip etken maddesinin eklenmesiyle ara yüzey kaybının azalması istenen bir sonuç olarak elde edilmiştir. Ayrıca DPPC tekli tabakası ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırınca uyumlu olduğu ancak BNS karışımı ile hidrofobik Dip etken

maddesi arasındaki etkileşimin BNS karışımının hidrofobik proteinler içermesinden dolayı DPPC molekülü ile olan etkileşiminden daha güçlü olmasından kaynaklı etki daha fazla görülmektedir.

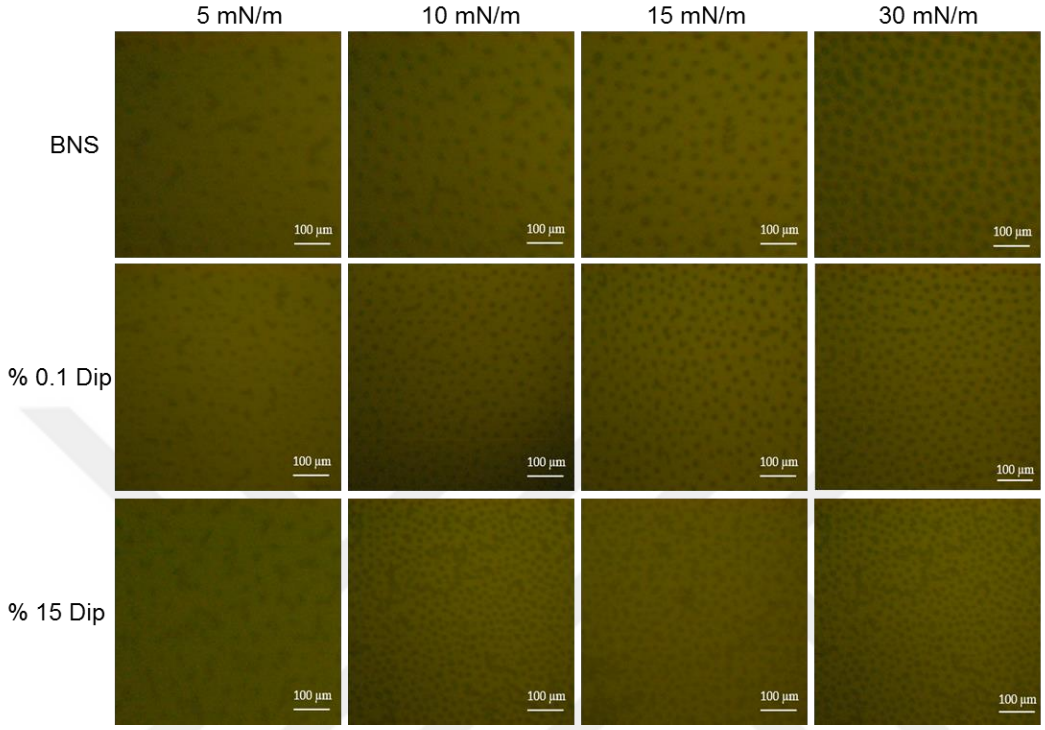
Alveollere ulaştığı düşünülen Dip etken maddesinin saf BNS tekli tabakasının sahip olduğu elastisiteye etkisi de incelenmiştir.



Şekil 4. 27. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında elastisitesi-yüzey basıncı grafikleri

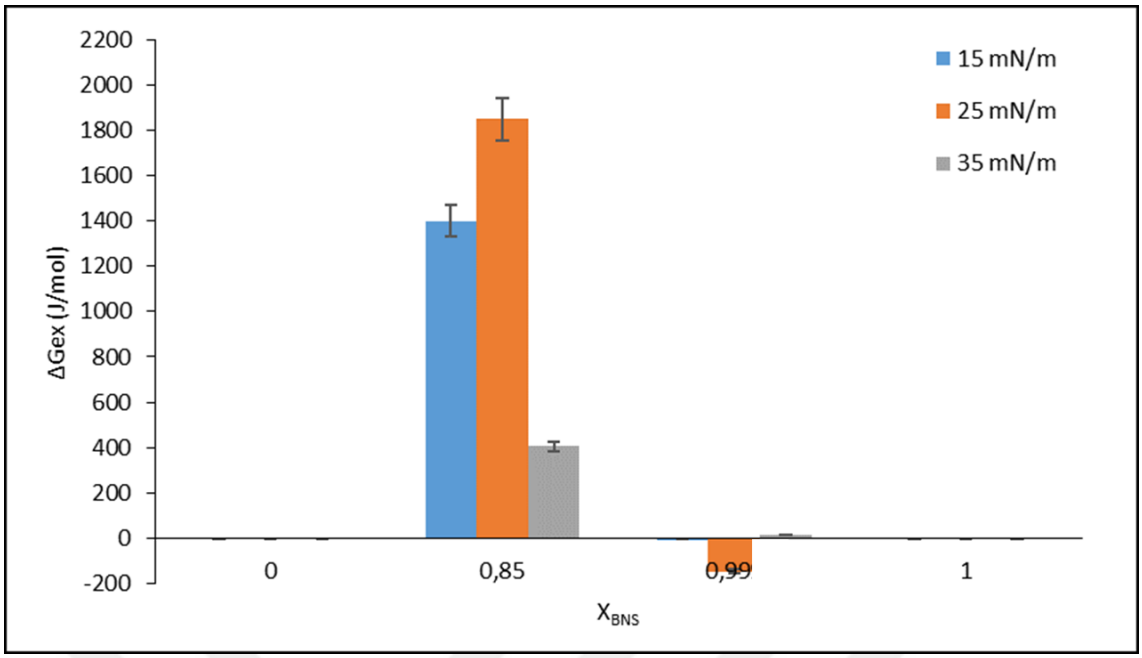
Şekil 4. 25'te bulunan BNS/Dip tekli tabakalarının sıkıştırma izotermlerinden hesaplanan elastisite-yüzey basıncı grafiği Şekil 4. 27'de verilmektedir. Elde edilen grafiğe bakıldığında LE faz bölgesinde Dip çözeltisinin saf BNS tekli tabakasının elastisitesini değiştirmediği söylenebilmektedir. Elastisite değerinin, BNS tekli tabakasının faz geçiş basıncı olan 40-45 mN/m yüzey basıncında sıfıra yaklaştığını, basıncın artmasıyla ise Dip etken maddesinin tekli tabakanın elastisitesini yok denecek kadar az miktarda düşürdüğü görülmektedir. Başka bir deyişle, Dip çözeltisinin eklenmesi BNS tekli tabakasının elastikiyetini değiştirmediği söylenebilmektedir.

Saf BNS tekli tabakasının elastisite değerini değiştirmediği görülen Dip etken maddesinin tekli tabakanın akışkanlığını nasıl etkilediğini anlayabilmek için FM görüntüleri alınmıştır.



Şekil 4. 28. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında farklı basınçlarda FM görüntüleri

Fosfat tampon çözeltisi üzerine 1 mg/ml BNS ve %1'lik R18 boya karışımının Hamilton şırınga ile enjeksiyonu sonrası elde edilen farklı yüzey basınçlarında FM görüntüleri Şekil 4. 28'de görülmektedir. Dip çözeltisinin eklenmesiyle LC adacıklarının küçüldüğü ancak sayısının arttığı söylenebilmektedir. Bu sonuç da Dip'in BNS tekli tabakasının akışkanlığını arttırdığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, DPPC ile Dip moleküllerinin arasındaki etkileşime benzer şekildedir.



Şekil 4. 29. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakası varlığında Dip çözeltisinin %0.1 ve 15 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında Gibbs Serbest Enerjileri

Kritik Dip oranının altında ve üstünde hesaplanan artık Gibbs serbest enerji değerleri, DPPC ve Dip molekülleri arasındaki etkileşim incelenirken hesaplanan değerlerde olduğu gibi farklılık göstermektedir. Dip çözeltisinin %15 mol oranında tüm yüzey basınçlarında ΔGex değerlerinin pozitif olduğu, 15 ve 25 mN/m yüzey basınçlarında değerin giderek arttığı ancak 35 mN/m yüzey basıncında değerin düştüğü görülmektedir. Pozitif ΔGex değeri, iki maddenin arasında itme etkileşimi olduğunu göstermektedir. Dip çözeltisinin %0.1 mol oranında düşük basınçta ΔGex değerinin negatif olması 15 mN/m yüzey basıncında bu oranda BNS ile Dip molekülleri arasında çekme etkileşimi olduğunu göstermektedir. BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla birbirine yaklaşan moleküller arasında 25 mN/m yüzey basıncında çekme etkileşimi artarak değerin büyümesi gözlemlenmektedir. BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasına devam ederek 35 mN/m yüzey basıncında tekli tabakanın ΔGex değerinin pozitif olması, basıncın artmasıyla moleküllerin baş gruplarının da etkileşime girdiğini ve BNS ile Dip molekülleri arasında düşük Dip çözeltisi mol oranında moleküller arasında itme etkileşimi olduğunu göstermektedir. Ancak elde

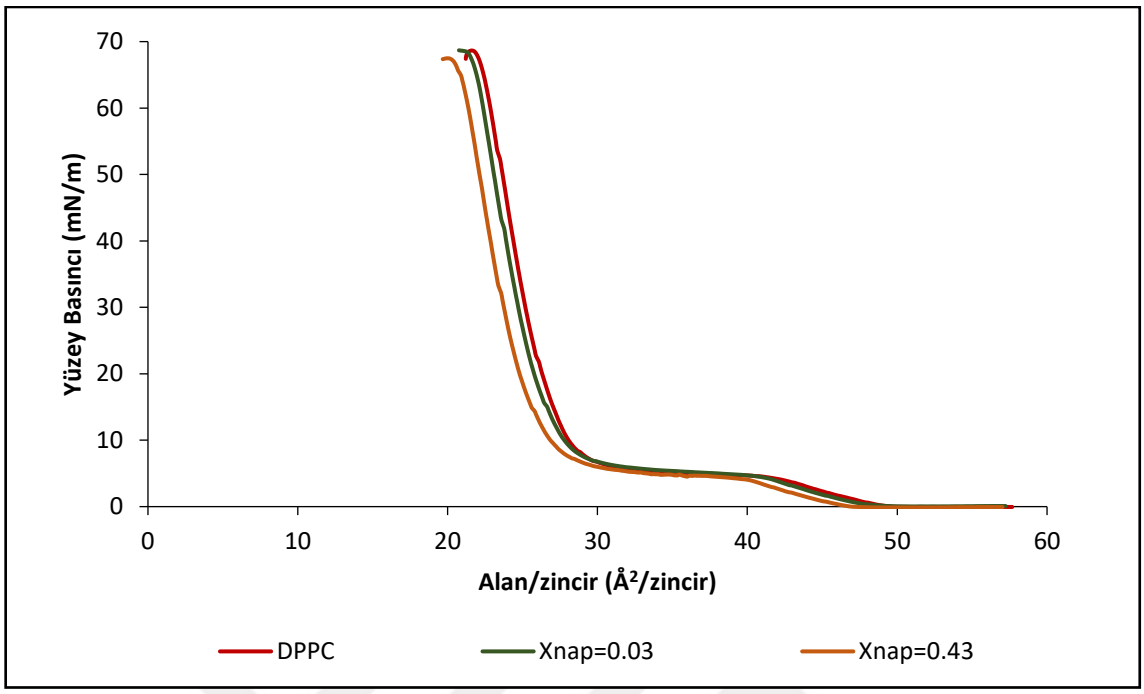
edilen bu değerlerin sıfıra çok yakın olmasından dolayı etkileşimin çok az olduğunu söylemek mümkündür. Dip etken maddesinin saf DPPC ile olan etkileşimi ile karşılaştırırsak saf BNS ile olan etkileşimin daha yüksek olduğu bunun sebebinin de BNS karışımının içindeki hidrofobik proteinlerden dolayı hidrofobik etkileşimin daha kuvvetli olmasından kaynaklanmaktadır.

BNS ve Dip çözeltisi için hesaplanan ΔGex değerleri BNS ve Cipro ile elde edilen değerden oldukça düşük çıkmıştır. Bunun sebebi, Dip çözeltisinin çalışılan pH değerinde (7.4) nötral formda olması, Cipro çözeltisinin ise zivitteriyonik formda olması olarak açıklanabilmektedir.

4.2.3. Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Naproksen'in Etkisinin İncelenmesi

Ağrı kesici olarak yaygın kullanıma sahip olmasına rağmen son yıllarda kanser hastalıklarında tedavi amaçlı kullanımı araştırılan Nap'ın tercih edilen oral yolla alımı yerine akciğerden alınmasıyla kanser tedavisi ve diğer tedaviler için daha uygun bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, çalışma kapsamında hidrofobik ve çalışılan pH değerinde anyonik özelliklere sahip olan Nap etken maddesinin akciğer sürfaktanının fonksiyonunu bozup bozmadığı araştırılmıştır.

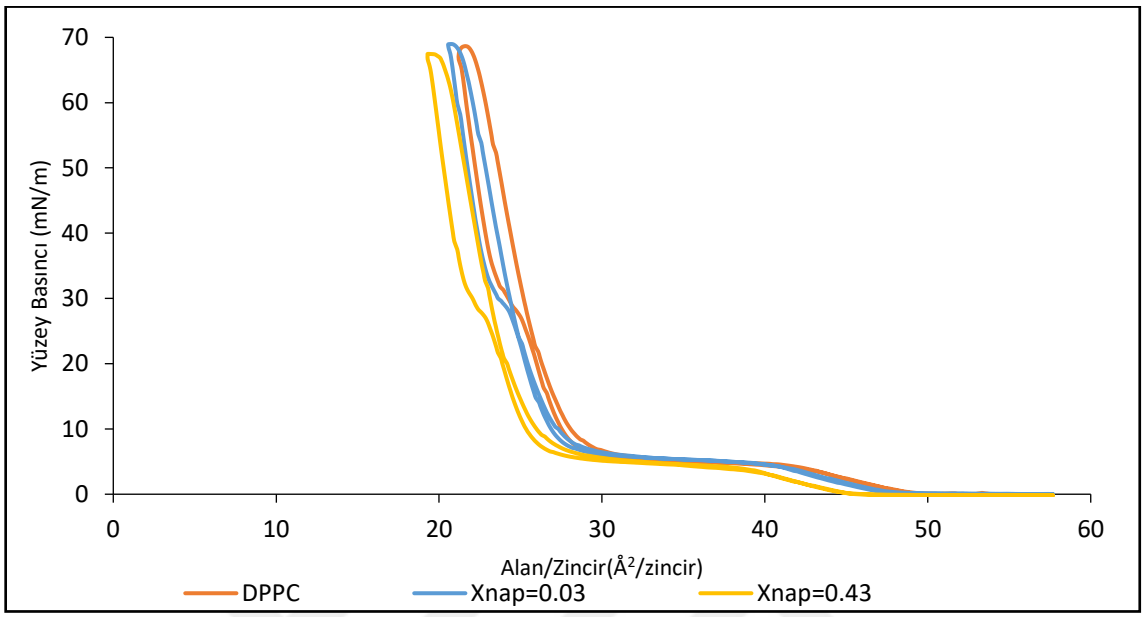
Naproksen'in DPPC Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi



Şekil 4. 30. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında Π-A izotermleri

Fosfat tampon çözeltisi üzerinde elde edilen DPPC ve DPP/Nap tekli tabakalarının sıkıştırılmasıyla elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerine bakıldığında LE faz bölgesinde Nap miktarının artmasıyla zincir başına ortalama alanın saf DPPC izotermine göre azaldığı yani izotermin sola kaydığı görülmektedir. Bu da DPPC/Cipro tekli tabakasında olduğu gibi Nap etken maddesinin hidrofobik olmasına rağmen PBS içinde çözünürlüğünün artmasıyla bir dereceye kadar alt fazda çözünmesinden kaynaklanmaktadır. LE-LC faz geçiş bölgesine bakılırsa eklenen Nap miktarının artmasıyla aynı alanda daha düşük yüzey basıncına ulaşmıştır. LC faz bölgesine bakıldığında Nap çözeltisinin eklenmesinin ve miktarının artmasının DPPC tekli tabakasını akışkanlaştırdığını yani sıkıştırılabilirliğini arttırdığını söylemek mümkündür.

Sağlıklı bir nefes alış-veriş sisteminde ilacın sıkıştırma-genişletme döngüsüne etkisi de önemli olduğundan bunun için yapılan incelemeler Şekil 4. 31'de verilmiştir.



Şekil 4. 31. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Şekil 4. 31'de verilen sıkıştırma-genişletme çevrimlerine bakılarak saf DPPC tekli tabakası için elde edilen iyileşme indeksini Nap çözeltisinin iki oranının da değiştirmediği söylenebilmektedir. Ayrıca eklenen Nap çözeltisinin iki oranının da geri yayılım özelliği bulunmayan DPPC tekli tabakasını etkilemediği görülmektedir. Tekli tabakanın sıkıştırma-genişletme döngüsünün alanına bakılarak DPPC tekli tabakasının histeresizini de değiştirmemektedir. Nap moleküllerinin varlığı DPPC tekli tabakasının izotermini sola kaydırmakta ancak döngüsel davranış özelliklerini etkilememektedir.

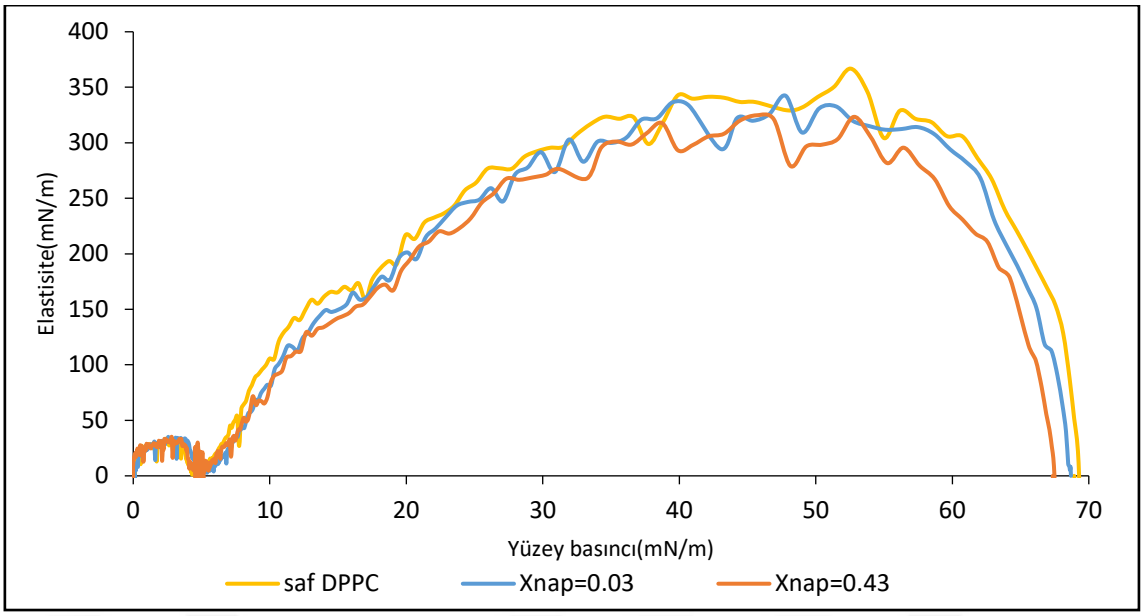
DPPC tekli tabakasının aynı yüzey basıncına ulaşması için belirli bir yüzey konsantrasyonuna sıkıştırılması gerektiğinden, her sıkıştırma aşamasında, ara yüzeyden kaybolan serbest DPPC moleküllerinin kaybını matematiksel olarak ifade edebilmek için ara yüzeyde bulunan madde miktarı yüzde olarak hesaplanmış ve Çizelge 4. 7'de verilmiştir.

Çizelge 4. 7. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de kayıp (%)			**60 mN/m'de kayıp (%)**		
	DPPC	***Xnap=0.03***	***Xnap=0.43***	***DPPC***	***Xnap=0.03***	***Xnap=0.43***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	3.05	1.39	2.06	2.22	1.47	1.12
3.Sıkıştırma	4.70	2.10	3.28	3.57	1.85	2.49
4.Sıkıştırma	6.41	2.36	3.95	4.82	2.08	2.87
5.Sıkıştırma	7.56	3.04	4.43	6.38	2.88	3.28

Çizelge 4. 7'de birinci izotermler %100 kabul edilerek hesaplanan beş sıkıştırma için 30 ve 60 mN/m yüzey basınçlarında 0.03 ve 0.43 mol oranında Nap çözeltisinin eklenmesinin saf DPPC tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla meydana gelen ara yüzeyden madde kaybını azalttığı görülmektedir. Bunun sebebi negatif yüke sahip olan Nap ile DPPC moleküllerinin elektrostatik etkileşimi ile ara yüzeyde meydana gelecek kaybı azaltmaktadır.

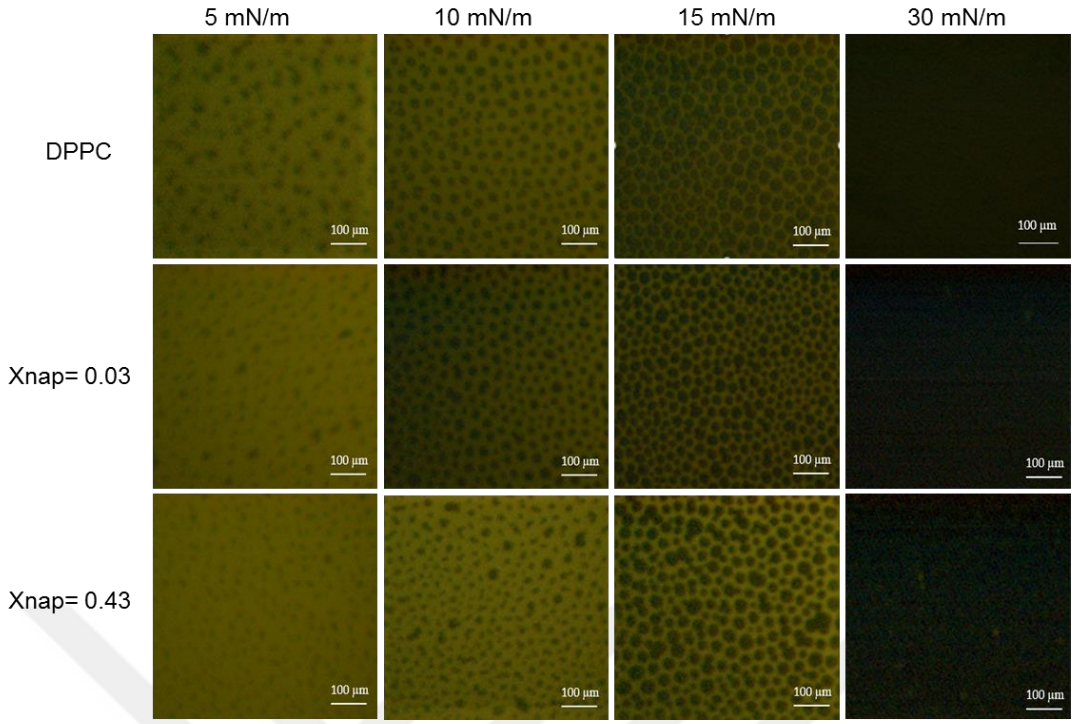
Solunum sırasında tekli tabakanın elastik olması son derece önemli bir özellik olduğu için, eklenen Nap çözeltisinin DPPC tekli tabakasının elastisitesine etkisini incelemek adına sıkıştırma izoterminden elde edilen kesme elastisitesi grafiğine geçilmiştir.



Şekil 4. 32. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında elastisite-yüzey basıncı grafikleri

Şekil 4. 32'de verilen elastisite-yüzey basıncı grafiğine bakılarak diğer ilaçlarda da olduğu gibi Nap çözeltisinin iki oranının da LE faz bölgesine ve faz geçiş bölgesine etkisinin olmadığı görülmektedir. LC faz bölgesinde DPPC tekli tabakasının maksimum elastisite değeri olan 331 mN/m'yi 0.03 mol oranında Nap çözeltisinin eklenmesi 330 mN/m'ye, 0.43 mol oranında Nap çözeltisinin eklenmesi 296 mN/m'ye düşürmektedir. Elde edilen maksimum %10'luk olan bu elastisite düşüşü ihmal edilebilir bir düzeydedir.

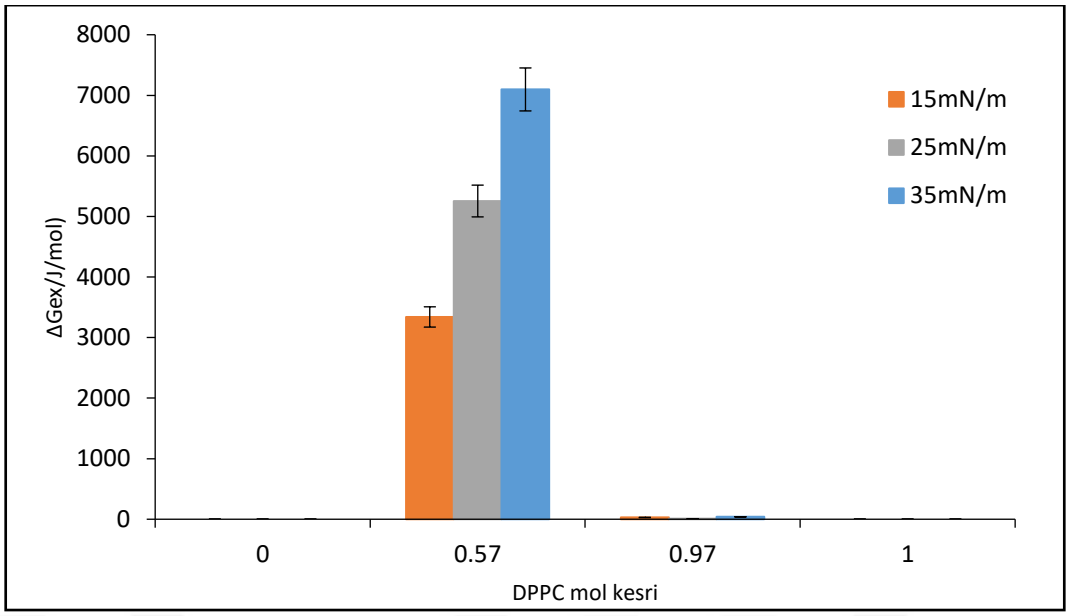
Nap etken maddesinin eklenmesiyle tekli tabakanın elastisitesinin değişmediği gözlemlendikten sonra tekli tabaka akışkanlığına etkisi de incelenmiştir.



Şekil 4. 33. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında farklı basınçlarda FM görüntüleri

Nap çözeltisinin belirlenen oranlarda DPPC tekli tabakasına eklenmesiyle elde edilen DPPC/Nap tekli tabakasının 4 farklı yüzey basıncına sıkıştırılmasıyla elde edilen FM görüntüleri Şekil 4. 33'te verilmiştir. Nap çözeltisinin eklenmesiyle her yüzey basıncında LC adacıklarının küçüldüğü görülmektedir. Eklenen Nap çözeltisinin, saf DPPC izoterminin eğiminde ve faz geçişinde değişiklik yapmadan sadece madde kaybına yol açtığını Şekil 4. 30'da görülmekteydi. Bu sonuçla uyumlu olarak FM görüntülerinden de anlaşıldığı gibi sadece akışkanlaştırmayı arttırdığı söylenebilmektedir.

DPPC/Nap tekli tabakasını termodinamik açıdan incelemek için ise artık Gibbs serbest enerjileri hesaplanarak Şekil 4. 34'te verilmiştir.

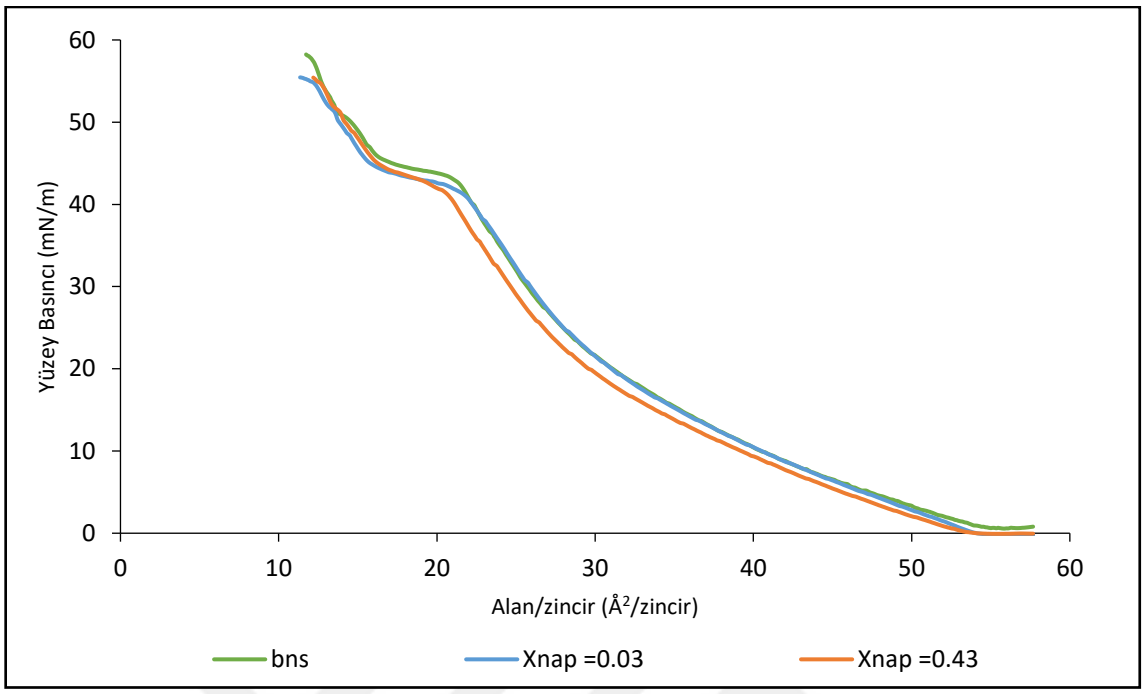


Şekil 4. 34. Fosfat tampon çözeltisinde saf DPPC tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında Gibbs Serbest Enerjileri

Yüzey basıncı 15, 25 ve 35 mN/m için hesaplanan tüm ΔG_{ex} değerlerinin pozitif olduğu ve yüzey basıncının artmasıyla bu değerin arttığı Şekil 4. 34'te görülmektedir. Düşük yüzey basıncında minimum enerjiye gereksinim duyan ve serbest halde yönlenen moleküller, basıncın artmasıyla baş gruplarında etkileşim olmaya başlamaktadır. Basıncın artmasıyla yani tekli tabakanın sıkıştırılmasıyla moleküllerin ara yüzeyde duruşlarını değiştirerek birbirlerine yakınlaşmalarını sağlamaktadır. Birbirlerine yaklaşan moleküller arasındaki etkileşim de giderek artmaktadır.

Pozitif ΔG_{ex} değerine sahip olunması, saf bileşen moleküllerinin etkileşiminin DPPC ve Nap molekülleri arasındaki etkileşimden daha güçlü olduğunu göstermektedir. Yani bileşenler kendi aralarında durmayı istemektedirler. Bir başka deyişle, tekli tabakayı oluşturan maddelerin aralarında itme etkileşimi olduğunu ve karışabilen-ideal olmayan tekli tabaka oluşturabildiğini göstermektedir.

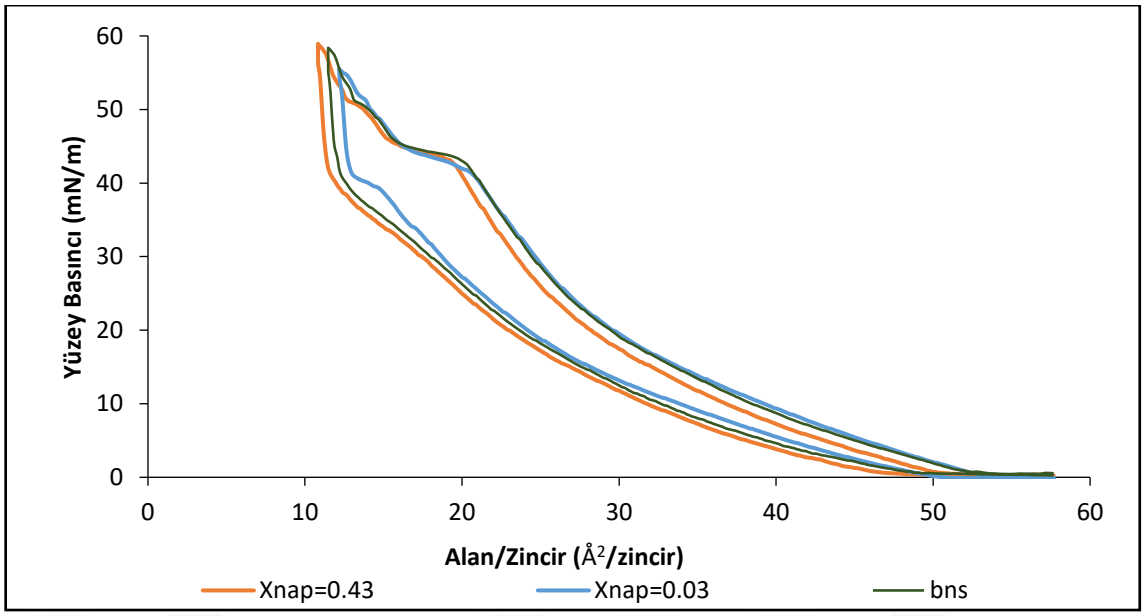
Naproksen'in BNS Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi



Şekil 4. 35. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında Π-A izotermleri

PBS üzerinde saf BNS tekli tabakası oluşturduktan sonra Nap çözeltisinin iki oranının enjeksiyonu ile saf BNS izotermi üzerinde meydana gelen etkiler incelenmiştir. Şekil 4. 35'te görüldüğü gibi 0.03 mol fraksiyonunda Nap çözeltisinin eklenmesi saf BNS izotermine çok benzemektedir. Ancak 0.43 mol fraksiyonunda Nap çözeltisinin eklenmesiyle elde edilen izotermin bir miktar sola kaydığı yani aynı yüzey basıncına daha düşük alanlarda ulaştığı görülmektedir. Bu, hidrofobik olan Nap etken maddesinin fosfat tampon çözeltisinde çözünürlüğünün artmasından kaynaklanmaktadır.

İzotermin incelenmesinden sonra saf BNS tekli tabaksının döngüsel davranışı üzerine Nap çözeltisinin etkisi de Şekil 4. 36'da verilmiştir.



Şekil 4. 36. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Saf BNS tekli tabakası üzerine Nap çözeltisinin eklenmesiyle elde edilen döngüsel davranış incelendiğinde BNS tekli tabakasının döngü profilinin değişmediği görülmektedir. BNS/Nap tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme izotermleri arasındaki alanlara bakılarak saf BNS tekli tabakası için görülen histeresizin ve faz geçiş bölgesinin Nap çözeltisinin eklenmesiyle değişmediğini söylemek mümkündür. Ancak elde edilen tekli tabakalar için döngüler Nap çözeltisinin eklenmesiyle sola doğru kaymakta, yani Π-A izoterminde olduğu gibi Nap'ın çözünürlüğünün artmasıyla gerçekleşen saf BNS tekli tabakasına göre madde kaybı olmaktadır.

BNS/Nap tekli tabakalarının döngüsel davranışından elde edilen sıkıştırma izotermlerinin saf BNS tekli tabakasına göre kayba yol açtığı görüldükten sonra tüm tekli tabakalar için birinci sıkıştırma izotermi sırasında ara yüzeydeki madde miktarı %100 kabul edilerek hesaplanan ara yüzeyden kaybolan madde yüzdeleri Çizelge 4. 8'de verilmiştir.

Çizelge 4. 8. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin

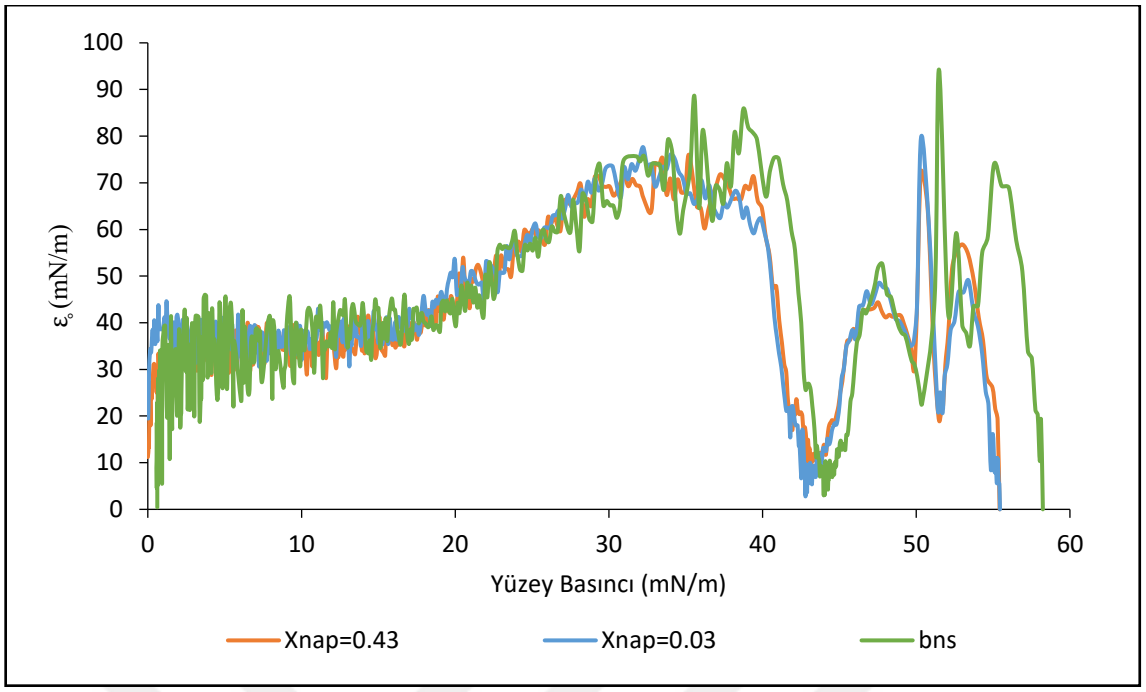
enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de kayıp (%)			45 mN/m'de kayıp (%)		
	BNS	***Xnap=0.03***	***Xnap=0.43***	***BNS***	***Xnap=0.03***	***Xnap=0.43***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	9.80	7.29	8.95	8.99	3.47	5.68
3.Sıkıştırma	14.19	12.41	14.11	12.88	6.12	8.69
4.Sıkıştırma	17.60	15.65	17.45	17.55	8.36	11.36
5.Sıkıştırma	19.55	18.85	19.20	18.45	10.42	15.44

Saf BNS ve BNS/Nap tekli tabakalarının sıkıştırılıp-genişletilmesiyle elde edilen verilere bakıldığında beşinci sıkıştırma sonucunda Nap çözeltisinin 0.03 mol oranında eklenmesiyle ara yüzeyde molekül kaybının 30 mN/m yüzey basıncı için %18.85 olduğu ve bu değerin 45 mN/m için %10.42'ye indiği görülmektedir. Ara yüzeyde bulunan molekül kaybının 0.43 mol oranında Nap çözeltisinin eklenmesiyle daha çok arttığı 30 mN/m yüzey basıncı için %19.20, 45 mN/m yüzey basıncı için %15.44 olduğu görülmektedir. 30 mN/m yüzey basıncında LE faz bölgesinde olmasına rağmen ara yüzey kaybının saf DPPC tekli tabakası için elde edilen kayıp ile neredeyse aynı olması, 45 mN/m yüzey basıncında ise bu kaybın Nap etken maddesinin eklenmesiyle azalması istenen bir özellik olmaktadır. Bunun sebebinin tekli tabakanın sıkıştırılmasıyla ara yüzeyde bulunan moleküller arasındaki etkileşimin artmasıdır.

Nap çözeltisinin eklenmesiyle ara yüzeydeki molekül kaybının saf BNS tekli tabakası varlığında saf DPPC tekli tabakası varlığına göre çok olmasının sebebi BNS içindeki hidrofobik ve pozitif yüklü proteinlerden kaynaklanmaktadır. Nap ile DPPC molekülleri arasındaki etkileşim, lipit ve protein karışımı olmasından dolayı BNS ile Nap molekülleri arasında olan etkileşimden daha azdır.

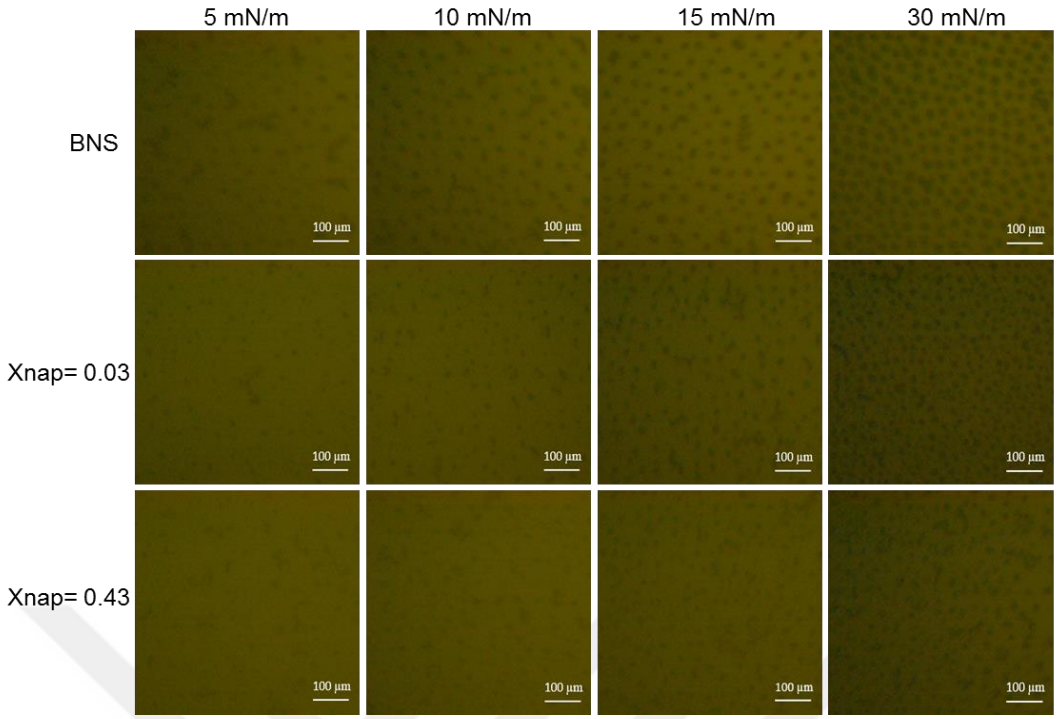
Nap çözeltisinin ara yüzeydeki saf BNS tekli tabakasının elastisitesi üzerine etkisi incelenerek Şekil 4. 37'de verilmiştir.



Şekil 4. 37. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında elastisite-yüzey basıncı grafikleri

Ara yüzeyde saf BNS tekli tabakasının elastisite değeri LE faz bölgesi olan yaklaşık yüzey basıncı 45 mN/m'ye kadar olan alanda maksimum 80 mN/m olduğu Şekil 4. 37'de görülmektedir. Nap çözeltisinin eklenmesiyle LE faz bölgesi için gözlenen profilin ve değerin değişmediği net bir şekilde görülmektedir. LC faz bölgesine geçişte ise Nap çözeltisinin eklenmesi faz geçişini daha düşük yüzey basıncından başlatmaktadır. Ancak LC faz bölgesi için de Nap çözeltisinin eklenmesinin BNS tekli tabakasının elastisite değerini değiştirmediğini söylemek mümkündür.

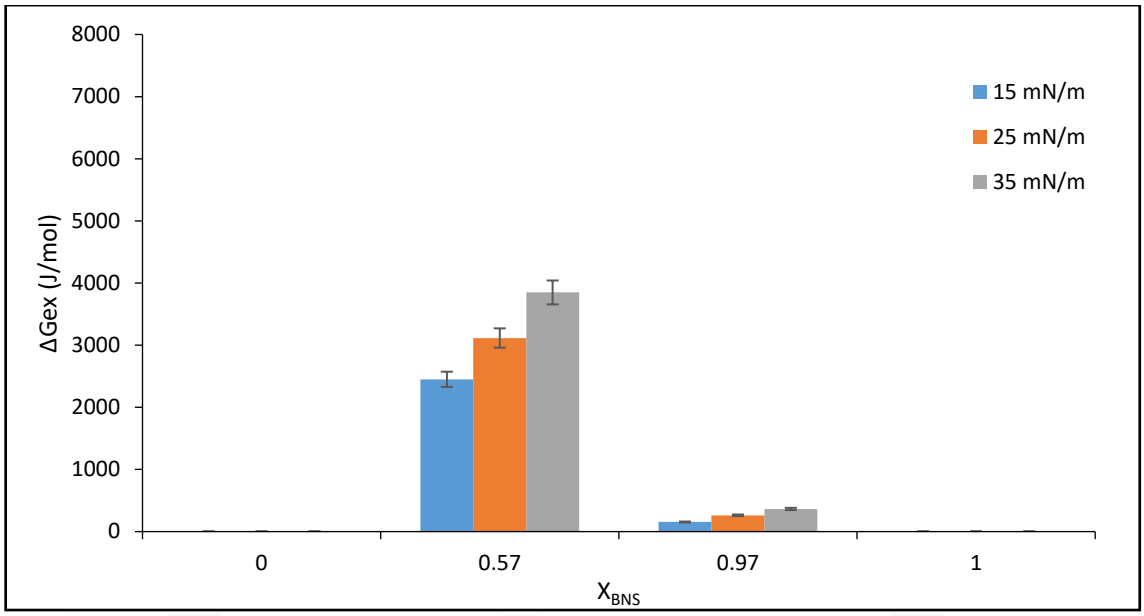
Nap çözeltisinin DPPC tekli tabakasının elastisitesine etkisi incelendikten sonra FM görüntülerinden de ara yüzeye etkisine görsel olarak bakılmış ve elde edilen görüntüler Şekil 4. 38'de verilmiştir.



Şekil 4. 38. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında farklı basınçlarda FM görüntüleri

Saf BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin iki oranının da eklenmesiyle elde edilmiş olan FM görüntülerinde, LC faz adacıklarının eklenen Nap molekülü miktarının artmasıyla küçüldüğü ve yüzey basıncı 30 mN/m'de bile akışkanlaşmanın olduğu net bir şekilde görülmektedir.

Nap çözeltisinin saf BNS tekli tabakası ara yüzeyinde madde kaybına sebep olarak tekli tabakanın sıkıştırılabilirliğini arttırdığı ve ara yüzeyi akışkanlaştırdığı görülen Nap molekülü ile BNS karışımının etkileşim özelliklerine bakmak için ise hesaplanan artık Gibbs serbest enerjileri Şekil 4. 39'da verilmiştir.



Şekil 4. 39. Fosfat tampon çözeltisinde saf BNS tekli tabakası varlığında Nap çözeltisinin 0.03 ve 0.43 mol oranlarında enjeksiyonu sonrası farklı yüzey basınçlarında Gibbs Serbest Enerjileri

BNS ve Nap moleküllerinin etkileşimiyle hesaplanan ΔG_{ex} değerlerinin eklenen Nap çözeltisinin iki oranında da bütün yüzey basınçları için pozitif olduğu Şekil 4. 39'da görülmektedir. Yüzey basıncının artmasıyla da değerin artmasının sebebi sıkıştırılan tekli tabakanın moleküllerinin ara yüzey duruşlarının değişmesiyle etkileşimin giderek artmasından kaynaklanmaktadır. Pozitif ΔG_{ex} değerine sahip olunması, saf bileşen moleküllerinin etkileşiminin BNS ve Nap molekülleri arasındaki etkileşimden daha güçlü olduğunu göstermektedir. Yani bileşenler kendi aralarında durmayı istemektedirler. Bir başka deyişle, tekli tabakayı oluşturan maddelerin aralarında itme etkileşimi olduğunu ve karışabilen-ideal olmayan tekli tabaka oluşturabildiğini göstermektedir. Eklenen Nap çözeltisinin oranının artmasıyla bu etkileşimin de artması bunun bir göstergesi olmaktadır. DPPC/Nap için elde edilen ΔG_{ex} değerlerine göre BNS/Nap için elde edilen ΔG_{ex} değerlerinin daha az olmasının sebebi negatif yüklü Nap ile BNS içinde bulunan pozitif yüklü proteinler arasındaki çekme etkileşiminden kaynaklanmaktadır.

Cipro, Dip ve Nap çözeltilerinin DPPC ve BNS tekli tabakalarının fonksiyonel yapılarına etkisi ayrıntılı bir şekilde incelenmiş ve genel olarak üç ilacın da tekli tabakaların akışkanlığını arttırdığı, kesme elastikiyetini ve döngüsel davranışlarını değiştirmediğini söylemek mümkündür. Yani sonuç olarak çeşitli hastalıklar için kullanılan ve oral olarak alımının yaygın olduğu bu üç ilacın da pulmoner dağıtımda kullanılmasının uygun olduğu görülmüştür.

İlaç çözeltilerinin alveollere ulaşarak ne gibi etkiler yarattığını inceledikten sonra, bu ilaçların taşıyıcı bir sistemle de akciğerlerden verilebileceği ve alveollere gelen taşıyıcı partikülün etkisinin de incelenmesi gerektiği düşünülerek çalışma kapsamında seçilen biyouyumlu olan ve stabilitesi yüksek lipit bazlı nanopartikül ile model sürfaktan tekli tabakalarının etkileşimleri ayrıntılı şekilde incelenmiştir.

4.3. Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakalarına Katı Lipit Nanopartiküllerin Etkisinin İncelenmesi

Pulmoner ilaç dağıtımı için kullanılacak ilaç taşıyıcı partikülün boyutu inhalasyon yoluyla partikülün alınmasından sonra karşılaştığı savunma mekanizmalarını geçerek alveollere gelebilmesi açısından son derece önemli bir faktördür. Alveollere ulaşan ilaç taşıyıcı sistemlerin akciğer yüzey aktif maddesi ile etkileşimini inceleyen birçok çalışma vardır [86, 87]. 1-3 μm'den küçük olan partiküllerin akciğerinin derinliklerine, 0.5 μm'den küçük olan partiküllerin alveollere ulaştığı çalışmalarla kanıtlanmıştır [38]. Literatürde kullanılan partiküllerden farklı olarak Katı Lipit Nanopartiküllerin (KLN) seçilmesinin sebebi hem biyouyumlu olması hem de kullanılan boyutun alveollere ulaşabilecek kritere sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

Kullanılan KLN'lerin sentezlendikten sonra istenilen özelliklere sahip olup olmadığını belirlemek için karakterizasyonu yapılarak elde edilen özellikleri Çizelge 4. 9'da verilmiştir.

KLN Karakterizasyonu

Mikroemülsiyon yöntemi ile KLN sentezledikten sonra Dinamik Işık Saçınımı (DLS) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yöntemleriyle partikül boyutuna ve dağılımına bakılmıştır.

DLS tekniğinde partikül boyutunun yanı sıra etrafındaki hidrasyon tabakası da boyuta eklenmekte ve alınan ölçüm hidrodinamik yarıçap olmaktadır. Bu sebeple KLN'lerin boyutunu, geometrisini ve dağılımını daha iyi karakterize edebilmek için AFM görüntüleri de alınmıştır.

AFM görüntülerinden küresele yakın ve homojen bir dağılım sağlandığı ve partikül boyutunun yaklaşık 75 nm olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. 9. Katı Lipit Nanopartikülün Fiziksel Özellikleri

	Bileşim	Malzeme Yüzdesi (%)	Çap (nm)		Zeta Potansiyel (mV)
			DLS	AFM	
KLN	Stearik asit	3.3	85±3	75±3	-11±1.5
	Pluronik F127	0.8			
	Tween 20	1.7			

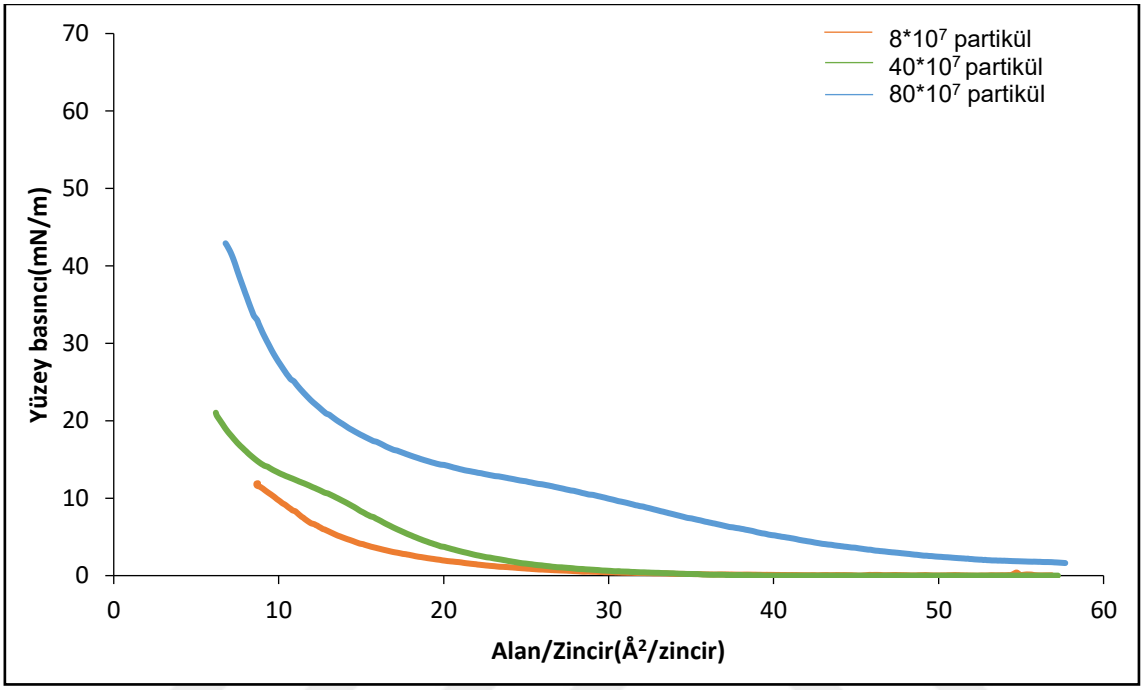
Tez kapsamında kullanılan KLN'lerin boyutuna bakarak alveollere ulaşabildiği düşünülmektedir. Ayrıca partiküllerin dayanımını incelemek için zeta potansiyel analizi yapılmıştır. KLN sentezinde kullanılan lipit olan stearik asitin pKa değeri 4'tür ve çalışılan pH'ta negatif yüklenmektedir. Emülsifiye edici ajan olan Pluronik F127 ve Tween 20 ise noniyoniktir. Bu sebepten sentezlenen KLN'nin zeta potansiyel değerinin beklenildiği gibi düşük olduğu görülmüştür.

Karakterizasyonu yapılan partiküllerin önce saf halde ara yüzeyde nasıl davrandığını anlamak için ara yüzey davranışları daha sonra ise alveole geldiği düşünülerek ara yüzeyde akciğer yüzey aktif maddesi varken sürfaktanın fonksiyonel özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.

KLN'nin ara yüzey davranışı

KLN'lerin ara yüzeye çıkarak tekli tabaka oluşturabilen lipit bazlı nanopartiküller olduğu Şekil 4. 40'tan görülmektedir. Tez kapsamında

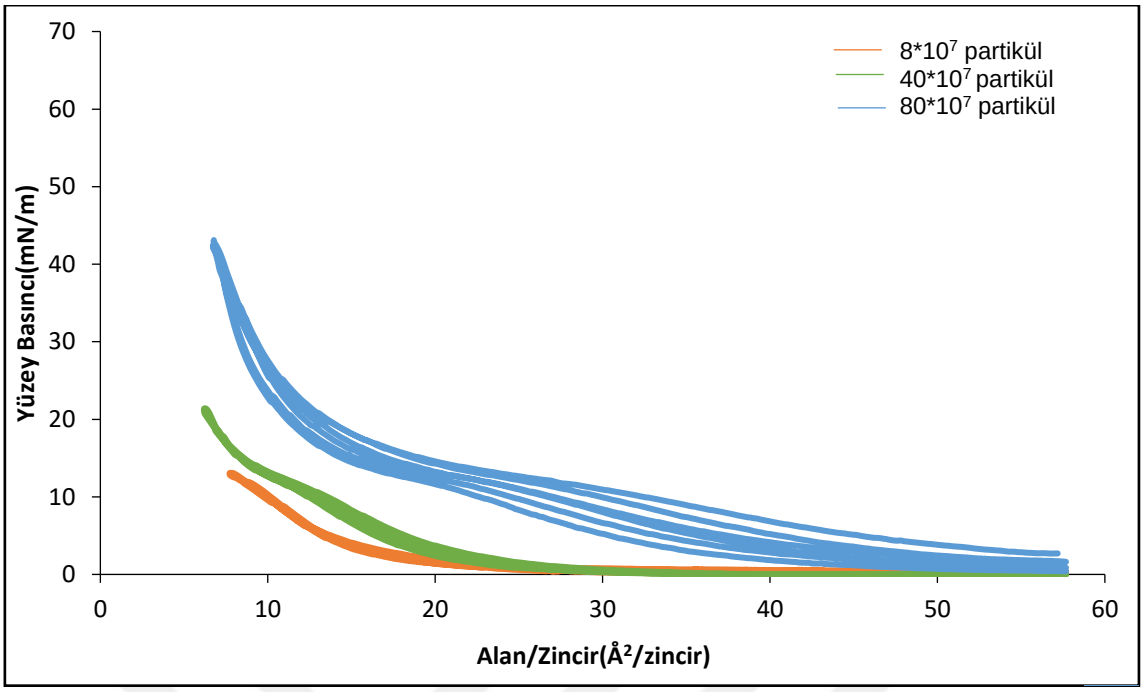
miktarın artmasıyla da etkileri görebilmek için 3 farklı partikül miktarında KLN kullanılarak ara yüzey özellikleri incelenmiştir. KLN'lerin 3 oranının da pH 7.4 fosfat tampon çözeltisine eklenmesiyle elde edilen yüzey basıncı-alan izotermleri Şekil 4. 40'ta verilmiştir.



Şekil 4. 40. Üç farklı orandaki saf KLN'nin yüzey basıncı(Π)-alan(A) izotermleri

Şekil 4. 40'ta kullanılan $8x10^7$, $40x10^7$, $80x10^7$ partikül miktarında KLN'lerin sıkıştırma izotermlerinde görüldüğü gibi, KLN miktarının artmasıyla yüzey geriliminin azalması doğru orantılıdır. Elde edilen grafiğe bakıldığında $8x10^7$ partikül içeren KLN'nin yüzey basıncını 11 mN/m'ye, $40x10^7$ partikül içeren KLN'nin yüzey basıncını 20 mN/m'ye, $40x10^7$ partikül içeren KLN'nin yüzey basıncını 40 mN/m'ye çıkardığı görülmektedir.

Ara yüzeye çıkarak yüzey gerilimini düşürebildiği görülen KLN'nin sıkıştırma sonrası alt faza geçip genişleme ile tekrar ara yüzeye çıkabilme yeteneğini görebilmek için döngüsel davranışını da incelemek son derece önemli olduğu için elde edilen sıkıştırma-genişletme çevrimleri Şekil 4. 41'de verilmiştir.

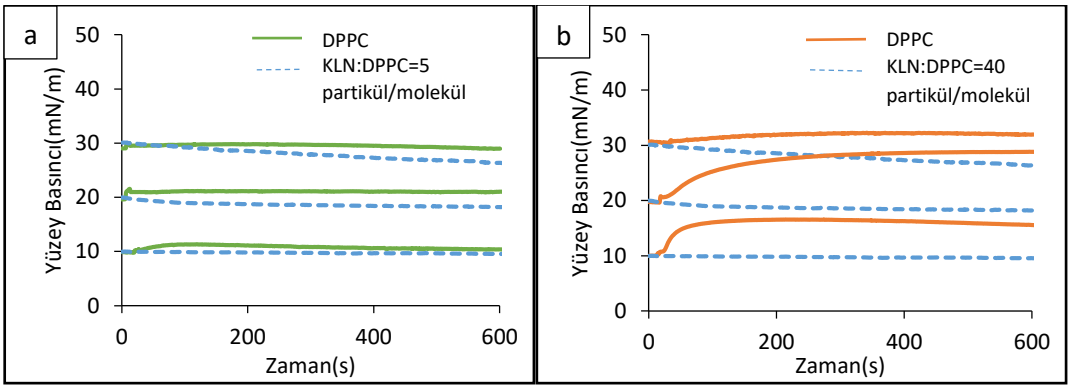


Şekil 4. 41. Fosfat tampon yığın fazında KLN'lerin sıkıştırma-genişletme çevrimleri

KLN tekli tabakasının döngüsel davranışına baktığımızda Şekil 4. 41'den, histeresizin çok az olduğunu söyleyebilmekteyiz. Sıkışan KLN tekli tabakasının alt faza geçip daha sonra yeniden ara yüzeye gelebildiğini yani geri yayılım özelliğine sahip olduğunu görmekteyiz.

Boş ara yüzeye adsorbe olabildiği gözlenen KLN'lerin gerçek solunum prosesi sırasında ara yüzeyde akciğer yüzey aktif maddesi varken ara yüzeye adsorpsiyon özelliğini incelemek de önemlidir.

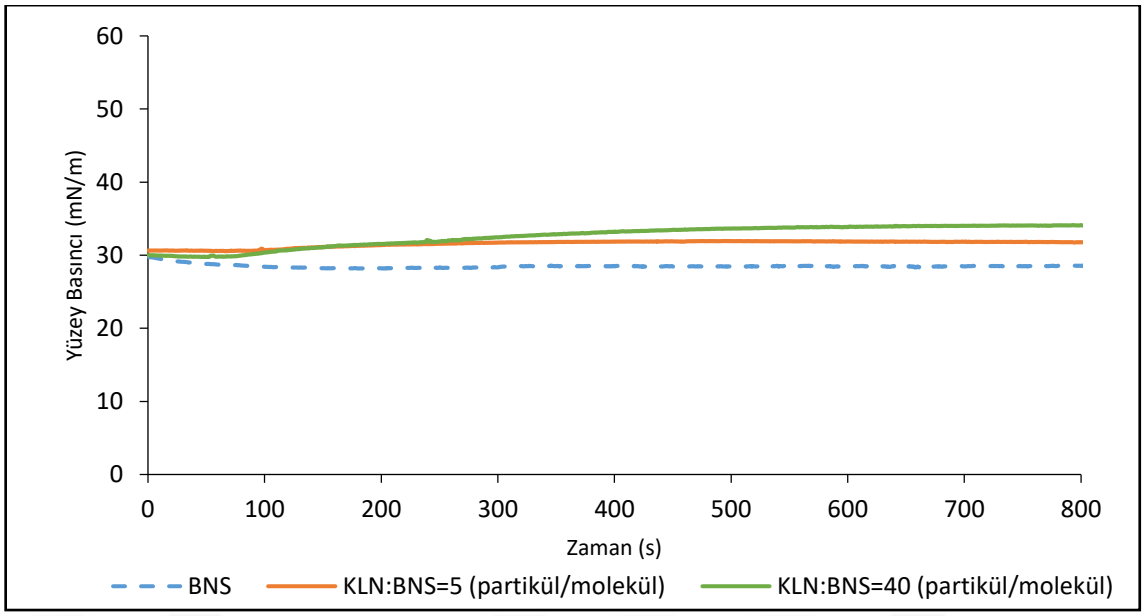
Bu sebeple, önce saf DPPC tekli tabakası varlığında ara yüzeye adsorpsiyon özelliğini incelemek için DPPC tekli tabakası oluşturup yüzey basıncını 10, 20 ve 30 mN/m' ye sabitleyip alt faza Hamilton şırınga ile KLN:DPPC=$5x10^{-9}$ partikül/molekül ve KLN:DPPC=$40x10^{-9}$ partikül/molekül oranlarında KLN enjeksiyonu ile elde edilen Π-t grafikleri Şekil 4. 42'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 42. Saf DPPC tekli tabakası varlığında a)KLN:DPPC=5x10^{-9} partikül/molekül ve b)KLN:DPPC=40x10^{-9} partikül/molekül oranlarında KLN enjeksiyonu sonrasında farklı yüzey basınçlarında Π-t grafikleri

Saf DPPC tekli tabakası varlığında çalışılan KLN:DPPC=5x10^{-9} partikül/molekül ve KLN:DPPC=40x10^{-9} partikül/molekül oranlarında KLN'nin farklı yüzey basınçlarında (10, 20, 30 mN/m) alt faza eklenmesiyle elde edilen zamanla yüzey basıncı değişimleri grafiğinde kesikli mavi çizgiler, KLN olmadan saf DPPC için elde edilen referans grafiklerdir. Görüldüğü gibi yüzeyde KLN olmadığında DPPC tekli tabakasının zamanla yüzey basıncının düştüğü ancak KLN varlığında yüzey basıncının arttığı söylenebilmektedir. Saf DPPC tekli tabakası 30 mN/m yüzey basıncına sıkıştırıldığında zamanla basıncın 26 mN/m'ye düştüğü görülmektedir. Ancak 30 mN/m yüzey basıncına sabitlenen DPPC tekli tabakası altından KLN:DPPC = 5x10^{-9} partikül/molekül oranında KLN eklendiğinde basıncın 28 mN/m'ye düştüğü, KLN:DPPC = 40x10^{-9} partikül/molekül oranında KLN eklendiğinde basıncın 32 mN/m'ye çıktığı görülmüştür. KLN miktarı arttıkça ara yüzey basıncı daha çok artmaktadır. Yani KLN'ler her oranda ve her basınçta DPPC tekli tabakasının olduğu ara yüzeye çıkabilmektedirler.

Ara yüzeyde DPPC tekli tabakası varken ara yüzeye gelebildiği görüldükten sonra saf BNS tekli tabakası oluşturup 30 mN/m yüzey basıncında sabitleyip alt faza Hamilton şırınga ile en düşük ve en yüksek partikül miktarına sahip KLN'ler enjekte edilerek inceleme yapılmış ve elde edilen Π-t grafiği Şekil 4. 43'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 43. Saf BNS tekli tabakası varlığında KLN:BNS=5x10^{-9} partikül/molekül ve KLN:BNS=40x10^{-9} partikül/molekül oranlarında KLN enjeksiyonu sonrasında 30 mN/m yüzey basıncında Π-t grafikleri

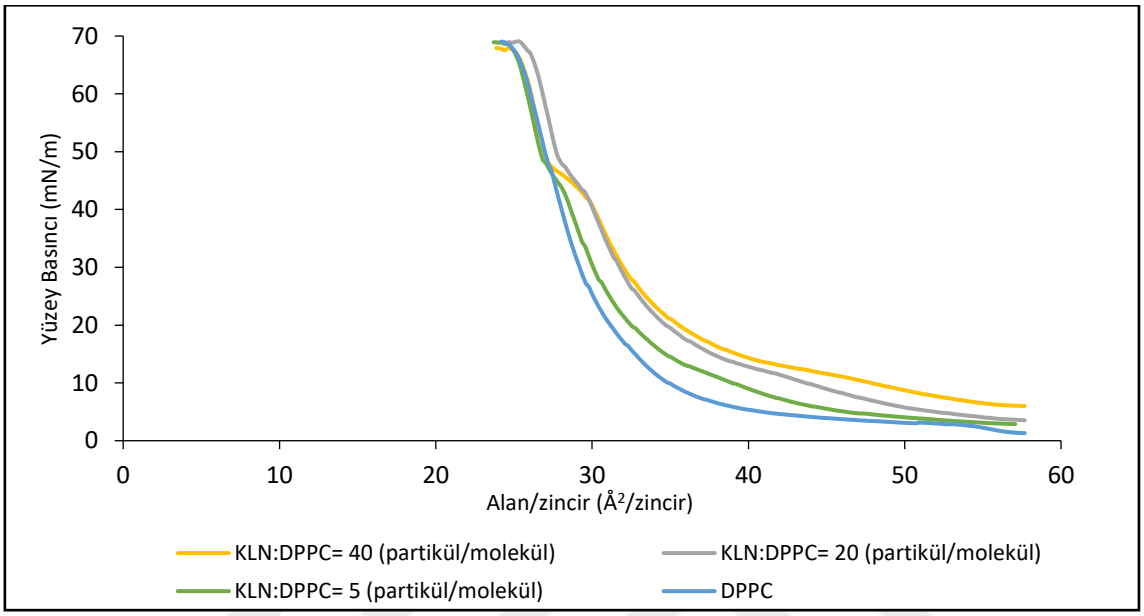
BNS tekli tabakasını 30 mN/m yüzey basıncına sıkıştırıp zamanla yüzey basıncı değişimine baktığımızda basıncın 13 dakikada 28.5 mN/m'ye düştüğü görülmektedir. Ancak BNS tekli tabakasını 30 mN/m'ye sabitleyerek alt faza KLN:BNS=5x10^{-9} partikül/molekül oranında KLN enjekte edildiğinde aynı sürede basıncın düşmediğini aksine 32 mN/m'ye çıktığı, KLN:BNS=40x10^{-9} partikül/molekül oranında KLN enjekte edildiğinde ise 34 mN/m'ye çıktığı gözlenmiştir. Bu da KLN'lerin, BNS tekli tabakasının yüksek basıncında bile ara yüzeye çıkabildiğini kanıtlamıştır. Ayrıca partikül miktarının artmasıyla ara yüzeye çıkma oranı da artmaktadır.

Bu sonuçlar doğrultusunda, alveollere gelebilen KLN'lerin akciğer yüzey aktif madde ile karşılaştığında ara yüzeye girebildiğini söylemek mümkündür.

KLN'nin ara yüzey özellikleri incelendikten sonra alveollere gelebilen KLN'lerin akciğer yüzey aktif maddenin fonksiyonel özellikleri üzerine ne gibi etkiler yarattığını gözlemleyebilmek için saf DPPC ve BNS tekli

tabakalarının varlığında meydana gelen ara yüzeydeki değişimler incelenmiştir.

KLN'nin DPPC Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi

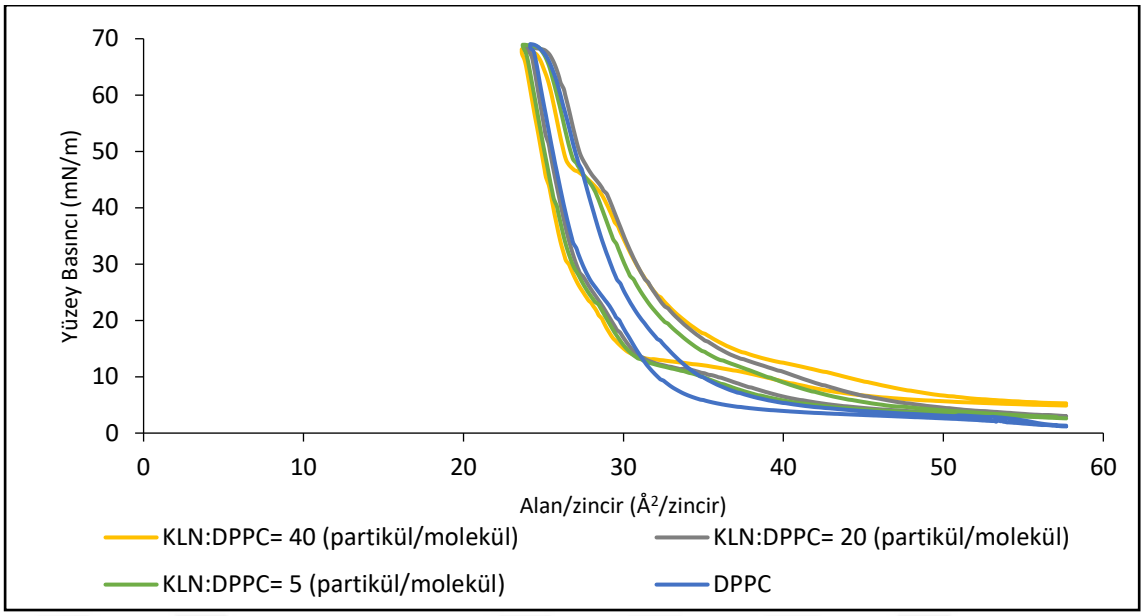


Şekil 4. 44. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının ($x10^{-9}$) enjeksiyonunun Π-A izotermleri

Üç farklı partikül miktarındaki KLN çözeltileri, Hamilton şırınga ile DPPC tekli tabakası altından enjekte edilerek tekli tabakanın sıkıştırılması sırasında yüzey basıncı-alan izotermleri elde edilmiştir. Üçüncü sıkıştırma izotermleri alınıp üst üste çizdirilerek Şekil 4. 44 elde edilmiştir. Şekilde gösterildiği gibi, literatürle tutarlı olarak, diğer saf DPPC tekli tabakasının izotermlerinde de elde edildiği gibi yaklaşık 5 mN/m yüzey basıncında bir faz geçişi göstermekte ve maksimum 70 mN/m'lik bir yüzey basıncına kadar sıkıştırılabilmektedir. KLN'lerin varlığında ise sıkıştırma başlangıcında yüzey basıncı artmaya başlamıştır. Bu, saf DPPC izoterminin LE faz bölgesinin daha büyük alanlara kaydırıldığı ve yoğunlaşmış faz bölgesindeki sistemler arasındaki farkın daha az olduğu anlamına gelmektedir. LE-LC faz geçiş bölgesinde, eğimin artması ile faz geçişinin kaybolması tekli tabakanın sıkıştırılmasına karşı direncin artması

olarak yorumlanabilmektedir. Saf DPPC tekli tabakası için LC faz bölgesi olan 40-45 mN/m yüzey basıncında alt faza KLN eklenmesiyle birlikte eğimde yani yüzey basıncı artışında bir azalma meydana gelmektedir. Bunun sebebinin zivitteriyonik DPPC tekli tabakası ile negatif yüklü KLN arasında kompleks bir yapı oluşması olarak düşünülmektedir. Bu durum, DPPC-protein komplekslerinde görülene benzemektedir. Literatürde değişik partiküllerle benzer sonuçlara ulaşılan çalışmalarda bu durum için 'kink' oluşumu ifadesi kullanılmaktadır [69, 87]. Böyle yüksek yüzey basınçlarından sonra, izotermin DPPC izoterminden daha düşük alan değerlerine doğru geçtiği ve ihmal edilebilir bir eğimle devam ettiği görülmektedir. Bununla birlikte, döngü devam ettikçe, alt fazdan geçen kompleksin bir kısmının ara yüzeyde yeniden ortaya çıkabileceği anlaşılmaktadır. KLN'lerin mevcudiyetinin çökme basıncını etkilemediği de bulunmuştur. KLN'ler en düşük partikül/molekül oranında (KLN:DPPC $5x10^{-9}$ partikül/molekül) alt faza enjekte edildiğinde, oluşan izotermdeki farkın az olduğu görülmektedir. Yani DPPC izotermine benzerliğinin daha çok olduğu söylenebilmektedir. Bununla birlikte, en yüksek partikül miktarıyla (KLN:DPPC $40x10^{-9}$ partikül/molekül), izotermin saf DPPC izoterminden farklı olduğu görülmüştür. Diğer bir deyişle, KLN'nin etkisi, partikül miktarı arttıkça izotermde gözlemlenebilmektedir.

Gerçek nefes alış-veriş döngüsünde ara yüzeyin gerilimini düşürmenin yanında tekli tabakanın iyileşme indeksi, histeresizi ve geri yayılım özelliklerinin de incelenmesi önemlidir. Bunun için sıkıştırma-genişletme çevrimleri de incelenmiştir.



Şekil 4. 45. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının ($x10^{-9}$) enjeksiyonunun sıkıştırma-genişletme çevrimleri

Sıkıştırma-genişletme çevrimlerine bakılarak saf DPPC için sıkıştırıldığında 70 mN/m yüzey basıncına çıktığı ve genişleme başladığında alan değişimi olmadan 30 mN/m'ye düştüğü ancak KLN'lerin eklenmesinin bunu etkilediği, yüzey basıncını 10 mN/m'ye kadar düşürdüğü görülmektedir. Sıkıştırma-genişletme çevrimlerinin alan değerine bakıldığında DPPC için bu alanın küçük olduğu ancak KLN'lerin eklenmesiyle alanın artarak histeresizin büyüdüğü söylenebilmektedir. KLN'ler eklendikten sonra sıkıştırılmasıyla çıkılan maksimum basınçta alan değerinin düşmemesi ara yüzeyden ayrılan malzemelerin büyük bir kısmının alt faza geçmediğini göstermektedir. Son olarak geri yayılım özelliklerine bakıldığında DPPC'nin döngüsünü KLN'lerin eklenmesinin etkilemediği gözlemlenmektedir. İncelenen döngüsel davranışta ara yüzeydeki molekül miktarını sayısal olarak ifade edebilmek için ara yüzeyden kaybolan molekül yüzdeleri hesaplanarak Çizelge 4. 10'da verilmiştir.

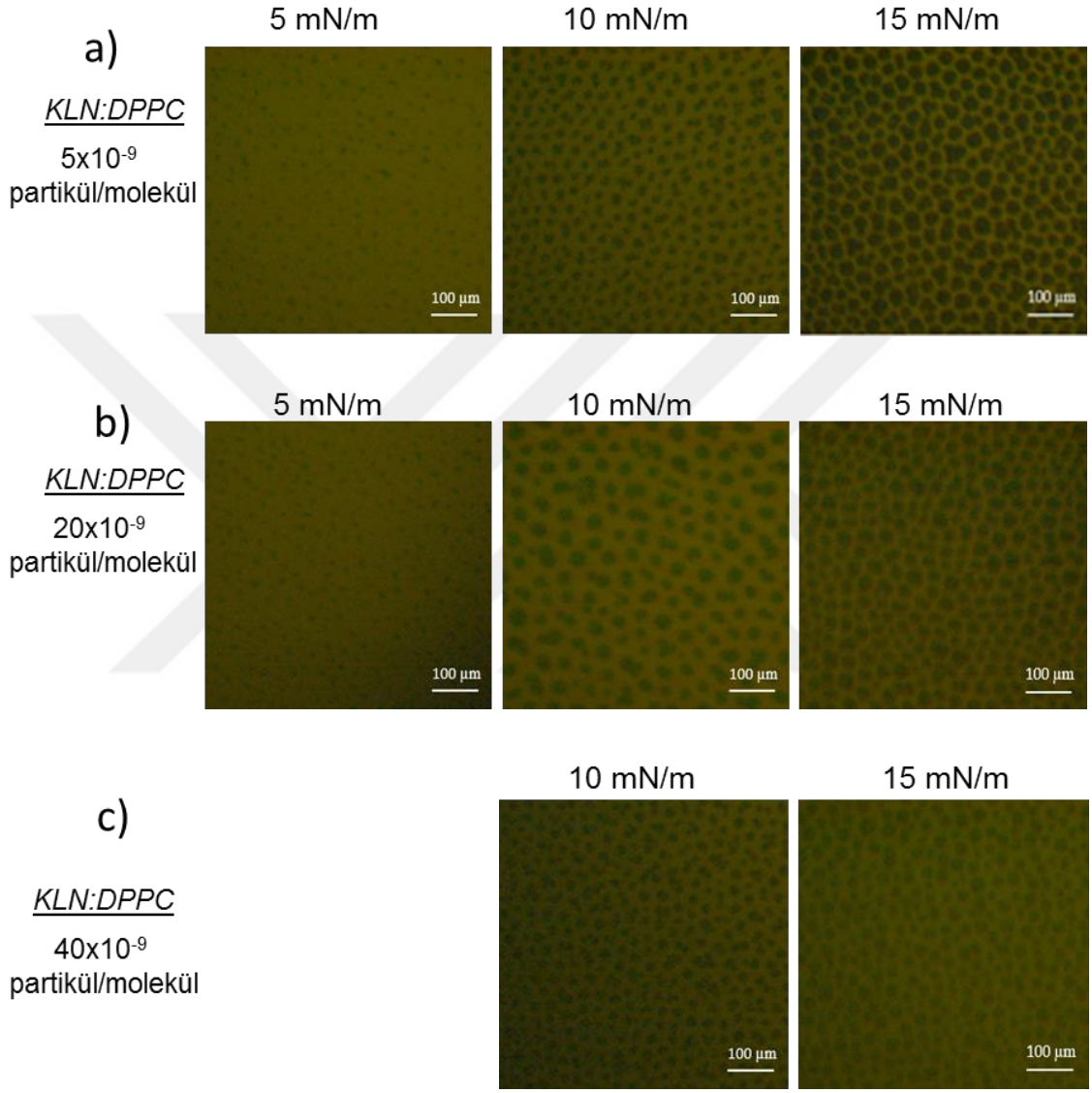
Çizelge 4. 10. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de KAYIP (%)				**60 mN/m'de KAYIP (%)**			
	DPPC	***KLN:DPPC (partikül/molekül)***			***DPPC***	***KLN:DPPC (partikül/molekül)***		
		$5X10^{-9}$	***$20X10^{-9}$***	***$40X10^{-9}$***		***$5X10^{-9}$***	***$20X10^{-9}$***	***$40X10^{-9}$***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	2.33	1.56	5.24	5.81	2.05	1.42	2.51	2.68
3.Sıkıştırma	3.48	3.7	8.36	9.36	3.26	3.05	4.17	4.87
4.Sıkıştırma	5.24	5.84	10.45	11.44	4.78	5.65	7.38	7.85
5.Sıkıştırma	7.35	7.65	12.30	13.75	6.40	7.35	9.45	10.20

Bu çalışmada, sıkıştırıp-genişletme boyunca KLN'lerin ara yüzeyde bulunan lipit tabakasının molekül yüzdesine etkisi incelenmiştir. 30 mN/m yüzey basıncında saf DPPC tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla ara yüzeydeki lipit kaybının %2.33'ten 7.35 'e kadar arttığı görülmektedir. Alt faza KLN eklenmesiyle elde edilen tekli tabakaların sıkıştırılıp-genişletilmesiyle meydana gelen kayıplar $5x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %1.56'dan 7.65'e, $20x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %5.24'ten 12.30'a ve $40x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %5.81'den 13.75'e kadar artmaktadır. 60 mN/m yüzey basıncında saf DPPC tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla ara yüzeydeki lipit kaybının %2.05'ten 6.40 'a kadar arttığı görülmektedir. Alt faza KLN eklenmesiyle elde edilen tekli tabakaların sıkıştırılıp-genişletilmesiyle meydana gelen kayıplar $5x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %1.42'den 7.35'e, $20x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %2.52'den 9.45'e ve $40x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %2.68'den 10.20'ye kadar artmaktadır. 60 mN/m yüzey basıncı için elde edilen bu değerlerin daha az olması yani ara yüzeydeki madde kaybını azaltmasının sebebi DPPC ile KLN'nin etkileşimi ile kompleks oluşturmasıyla 45 mN/m yüzey basıncında oluşan 'kink'ten kaynaklanmaktadır. Yüzey basıncı-alan izotermlerinde KLN'lerin ara yüzeye gelebildiği saf DPPC tekli tabakası ile karşılaştırılması sonucu görünmesine rağmen, ara yüzeyden madde kaybı sonuçlarından etkileşim sonucu oluşan tekli tabakanın kaybını arttırdığı anlaşılmaktadır.

Ancak, KLN eklenmesiyle gözlenen bu ara yüzey kaybı artışının miktarının kabul edilebilir düzeyde olduğu düşünülebilmektedir.

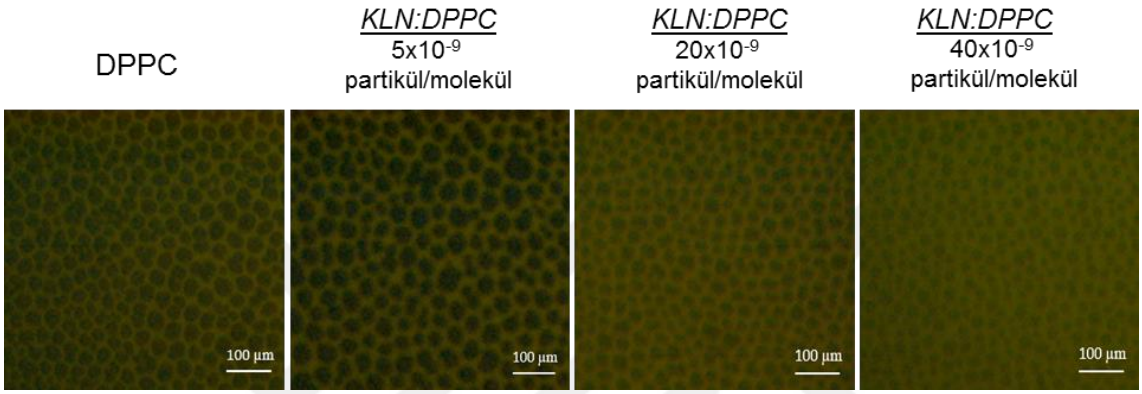
Bu çalışmalardan sonra KLN'lerin DPPC tekli tabakasının akışkanlığına etkisini incelemek için FM görüntüleriyle analiz yapılmıştır.



Şekil 4. 46. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza farklı oranlarda KLN eklenerek elde edilen farklı basınçlarda FM görüntüleri

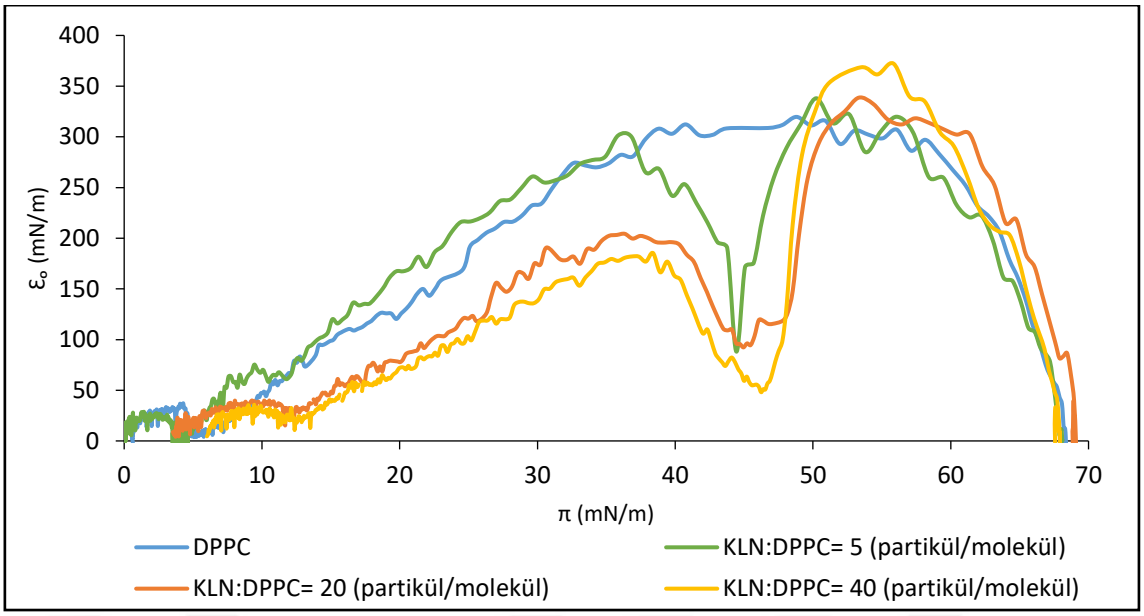
Fosfat tampon çözeltisi üzerinde DPPC tekli tabakası oluşturup alt faza KLN enjekte ederek farklı basınçlarda alınan FM görüntülerini Şekil 4. 46'da verilmiştir. Yüzey basıncı 5 mN/m'de DPPC tekli tabakası LE fazda olduğu için KLN eklenmesi FM görüntüsünde değişikliğe sebep olmamıştır.

Tekli tabakanın biraz daha sıkıştırılmasıyla yüzey basıncı 15 mN/m'de KLN eklenmesi ile LC adacıklarının küçüldüğü yani KLN'nin ara yüzeye girerek DPPC tekli tabakasını akışkanlaştırdığı net bir şekilde görülmüştür. Şekil 4. 46'da yüzey basıncı 15 mN/m için hem saf DPPC tekli tabakası hem de KLN ekli DPPC tekli tabakaları için FM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca enjekte edilen KLN miktarının artmasıyla etkinin arttığı gözlemlenebilmektedir.



Şekil 4. 47. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının enjeksiyonunun 15 mN/m yüzey basıncında FM görüntüleri

15 mN/m yüzey basıncında DPPC tekli tabakası varlığında KLN'lerin eklenmesinin LC faz adacıklarının boyutunda küçülmeye sebep olduğu daha net bir şekilde görülmektedir.

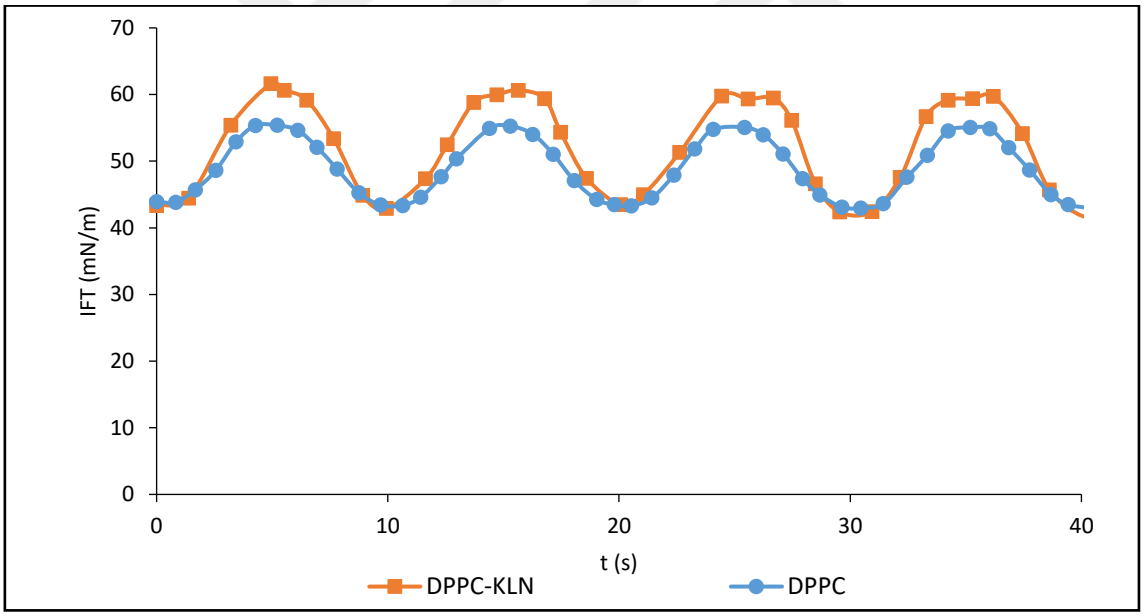


Şekil 4. 48. Saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza farklı partikül/molekül oranlarında (x10^{-9}) KLN eklenmesiyle elde edilen elastisite- yüzey basıncı grafikleri

Yüzey basıncı-alan izotermleriyle uyumlu olarak alt fazda KLN varlığı elastisiteyi etkilemektedir. Saf DPPC için maksimum elastisite değeri basınç 45 mN/m'de yaklaşık 300 mN/m'dir. Daha sonra elastisite tekli tabaka yıkıldığı için düşmektedir. 5 mN/m basınçta Π-A izoterminde görüldüğü gibi LE-LC faz geçiş bölgesi olduğu için elastisite değeri sıfıra düşmektedir. Alt faza KLN:DPPC = 5x10^{-9} partikül/molekül oranında KLN eklendiğinde elde edilen elastisite değerine bakıldığında faz geçiş bölgesine kadar saf DPPC için elde edilen sonuca benzediğini görmekteyiz. Ancak basınç 45 mN/m'de 'kink' olan bölgede yüzey basıncının daha düşük bir eğimle artmasından dolayı elastisitenin düştüğü ve sonra basınç artışıyla elastisite değerinin ilginç bir şekilde DPPC elastisitesini de geçtiği görülmektedir. Bu, sıkıştırmaya karşı tabaka direncinin azaldığını göstermektedir. KLN:DPPC=20x10^{-9} partikül/molekül ve KLN:DPPC=40x10^{-9} partikül/molekül oranlarında KLN eklendiğinde görülen etki KLN:DPPC=5x10^{-9} partikül/molekül oranında KLN eklendiğinde görülen etkiye göre daha fazladır, çünkü daha fazla partikül miktarı elastisiteye olan etkiyi arttırmaktadır.

LB trough ile hesaplanan elastisite kesme elastisitesi olarak bilinmektedir ve sistemi tek yönlü sıkıştırılmasıyla elde edilmektedir. Ancak gerçek nefes alış-veriş sisteminde ara yüzey her yönde sıkıştırılıp genişletilmekte olduğu için gerçek sisteme daha yakın olan dilatasyon elastisitesini incelemek için askıda damla metodu kullanılmıştır. Bu yöntem için, PBS damlası oluşturularak üzerine DPPC enjekte edilmiş ve yüzey gerilimi sabitlenince osilasyona başlanmıştır. KLN'nin etkisinin incelenmesi için ise oluşturulan DPPC tekli tabakası damlasına KLN eklenmiş ve aynı koşullarda osilasyon yapılmıştır. 0.1 Hz sabit frekansta ve 0.3 genlikte elde edilen veriler Şekil 4. 49'da verilmiştir.

İlaçların incelenmesi sırasında bu yöntemin kullanılmama sebebi, ilaçların kesme elastisitesi üzerine etkisinin olmaması sebebiyle bu yönteme ihtiyaç duyulmamasıdır.



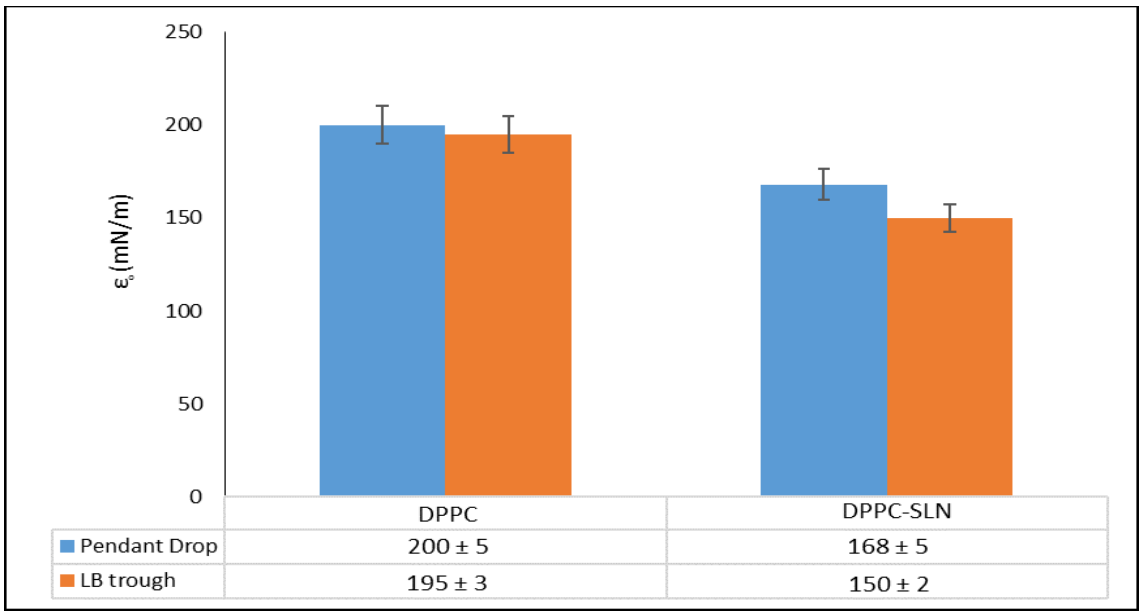
Şekil 4. 49. Fosfat tampon çözeltisi içindeki DPPC ve DPPC-KLN tekli tabakalarının $\Delta A/A_0$=0.3 genişleme genliği için v=0.1 Hz frekansında salınan yüzey gerilim-zaman izotermleri

Biyolojik olarak, yüzeyin yüksek genlikli deformasyonu, mevcut alanın % 30-40'ında ve 0.04-0.2 Hz arasındaki frekanslarda maruz kalmaktadır [30]. DPPC tekli tabakasına partiküllerin ilavesi genliği arttırmaktadır.

Fakat belirli bir A/A_0 değeri üzerindeki artış küçülerek bir plato bölgesi oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, Şekil 4. 49'da görüldüğü gibi genlik KLN'lerin eklenmesiyle bir miktar artmaktadır. Belirli bir deformasyon genliğinin üstünde, yanıt bozulmakta; bu da tekli tabakanın reolojik tepkisinin lineer olmadığı anlamına gelmektedir. Doğrusal olmayanlığın ortaya çıkışı, bir tek tabakalı malzeme boyunca malzemenin yeniden dağıtılmasıyla ilgilidir. Diğer bir deyişle, cevabın doğrusallığının kötüleşmesi, lipit moleküllerinin malzemesinin yeniden düzenlenmesi için önemli bir problem olan karışık tekli tabakaların homojenliği ile ilgilidir. Bu nedenle, sinüzoidal sistemin doğrusallığı, Toplam Harmonik Distorsiyonu (THD) hesaplamak için MATLAB programı kullanılarak Fourier dönüşümü (FFT) yardımıyla analiz edilmiştir [68].

Tekli tabakaların kesme ve dilatasyon elastisiteleri Şekil 4. 50'de gösterilmiştir. Sistem stabilitesini gösterme açısından bu sonuçlar büyük önem taşımaktadır.



Şekil 4. 50. DPPC ve DPPC-KLN tekli tabakalarının dilatasyon ve kesme elastisiteleri

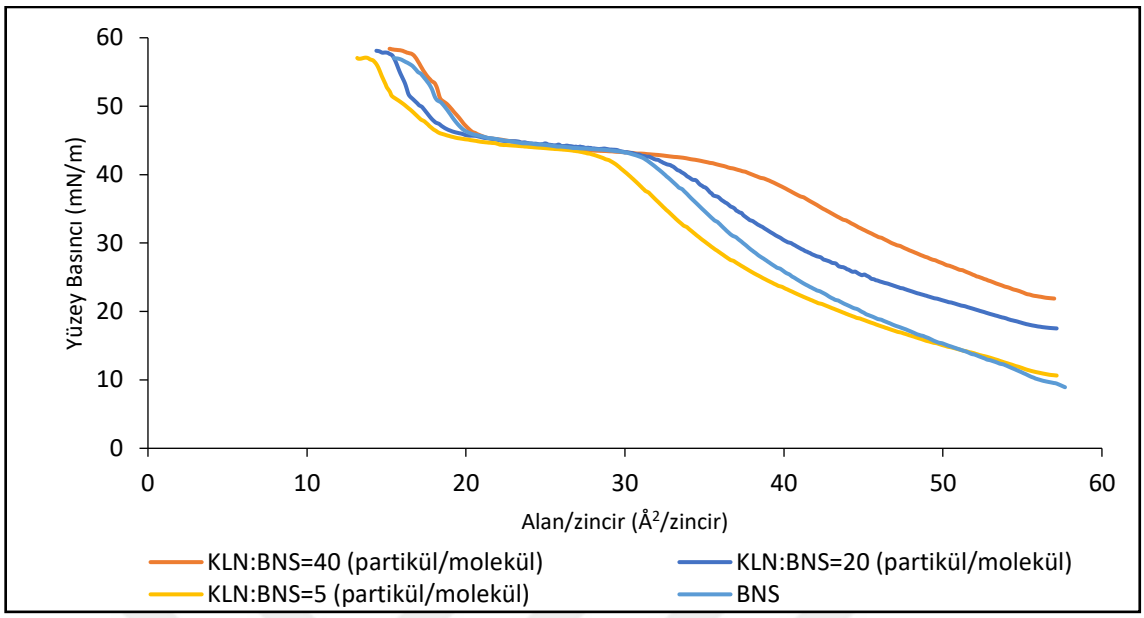
Saf DPPC tekli tabakası için, yüzey basıncı ortalama 24.3 mN/m olduğunda, dilatasyon elastisitesi 0.1 Hz frekansta 200 mN/m olarak elde edilmiştir. Bu sonuç, Wüstneck ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına benzer bulunmuştur. LB trough çalışmalarının sonuçları ile tutarlı olarak, KLN'lerin eklenmesiyle dilatasyon elastisitesinin 168 mN/m'ye azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar, Guzmán ve arkadaşları [73] tarafından yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmaktadır. KLN'lerin kullanımının, sürfaktan tekli tabaka elastisitesini az miktarda azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle, pulmoner uygulamada KLN'lerin tercih edilebileceği söylenebilmektedir.

Çizelge 4. 11. KLN eklenmesiyle DPPC tekli tabakasının THD değerindeki değişimi

	DPPC	**DPPC-KLN**
ν (Hz)	0.1	0.1
$\Delta A/A_0$	0.3	0.3
THD	0.138	0.149

Literatürde gösterildiği gibi, THD değeri DPPC için $\Delta A/A_0$=0.2'nin üzerinde bir plato sergilemekte ve çok fazla değişmemektedir [68]. Bu yüzden KLN'lerin varlığının DPPC için gözlenen bu platoya etkisini gösterebilmek için tez kapsamında $\Delta A/A_0$=0.3 genliğinde çalışılmıştır. Sonuç olarak, saf DPPC için 0.138 hesaplanan THD değeri, KLN varlığında 0.149 hesaplanmıştır. Hesaplanan THD değerlerine bakılarak KLN'nin enjeksiyonunun, sistemin doğrusallığını değiştirmediği görülmüştür.

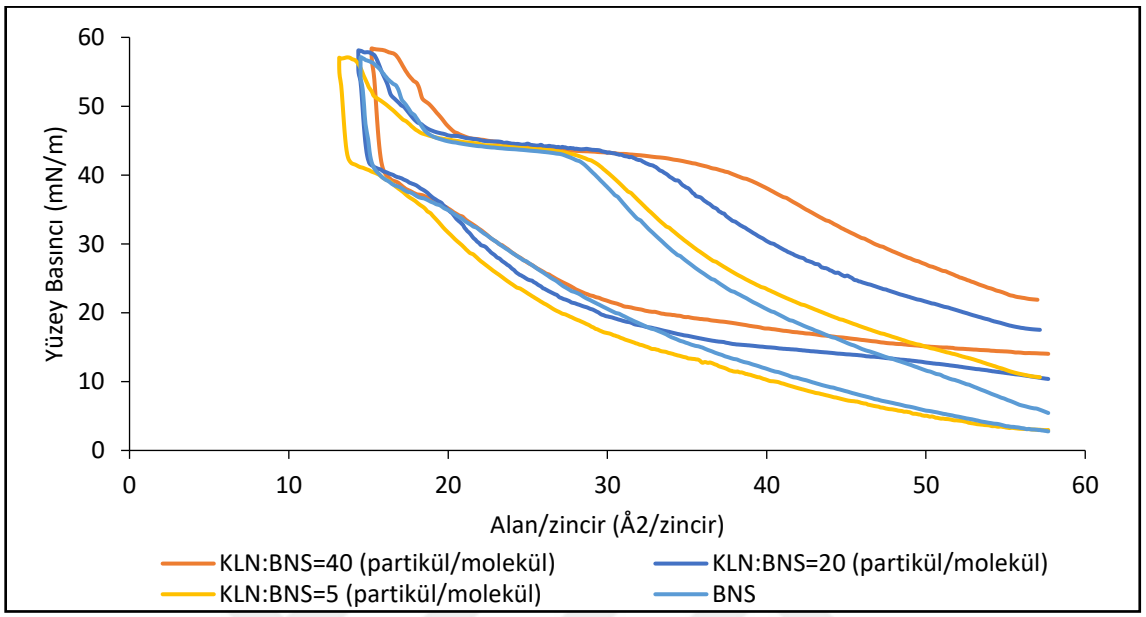
KLN'nin BNS Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi



Şekil 4. 51. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının ($x10^{-9}$) enjeksiyonunun Π-A izotermleri

Fosfat tampon çözeltisi alt fazı üzerine BNS tekli tabakası oluşturduktan sonra yığın faza 3 farklı oranda KLN enjeksiyonu Hamilton şırınga ile yapılıp sıkıştırma sonunda üçüncü izotermler alınıp üst üste çizdirilerek Şekil 4. 51 elde edilmiştir. DPPC tekli tabakasında olduğu gibi KLN varlığında, sıkıştırma başlangıcında yüzey basıncının artmaya başladığı görülmektedir. DPPC tekli tabakası ile KLN etkileşimi sonucu basınç 45 mN/m'de görülen değişim BNS tekli tabakasının faz geçişinin 45 mN/m basınçta gerçekleşmesinden dolayı görülmemektedir. KLN'ler BNS tekli tabakasının çökme basıncını da etkilememektedir. Saf DPPC tekli tabakası ile benzer şekilde saf BNS tekli tabakası için de KLN:BNS=$5x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN eklendiğinde elde edilen izotermin saf BNS izoterminden farkının az olduğunu ancak KLN:BNS=$40x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN eklendiğinde oluşan izotermin daha çok fark yaratmaktadır. Yani artan KLN miktarıyla gözlenen etkilerin de arttığı, grafikten net bir şekilde anlaşılmaktadır.

KLN'nin saf BNS tekli tabaka izotermine etkisinin yanında nefes alış-veriş döngüsü ile benzer tekli tabakanın döngüsel davranışına etkisi incelenerek elde edilen grafik Şekil 4. 52'de verilmiştir.



Şekil 4. 52. Fosfat tampon yığın fazında saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası oluşturarak alt faza farklı oranlarda ($x10^{-9}$) KLN ekleyerek elde edilen sıkıştırma-genişletme çevrimleri

BNS tekli tabakasının sıkıştırma-genişletme çevrimine KLN'lerin eklenmesinin tekli tabakanın iyileşme indeksini değiştirmediği görülmektedir. DPPC tekli tabakasında olduğu gibi sıkıştırma-genişletme çevrimlerinin alan değerlerine bakıldığında BNS için küçük olan alanın KLN'lerin eklenmesiyle büyüyerek histeresizi arttırdığı gözlenmektedir. Saf BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla çıkılan maksimum yüzey basıncında geldiği alan değerinin KLN'lerin eklenmesiyle düşmemesi, ara yüzeyde bulunan maddelerin ara yüzeyden ayrılarak alt faza geri dönüşümsüz olarak geçmediğini göstermektedir. Son olarak geri yayılım özelliklerine bakıldığında BNS karışımında bulunan proteinlerden kaynaklı olarak KLN'lerin eklenmesiyle değişmediği söylenebilmektedir.

Daha sonra sıkıştırma-genişletme döngülerinden elde edilen belli basınçlarda alan değerlerinden ara yüzeyden kaybolan madde yüzdeleri

hesaplanarak KLN'lerin eklenmesiyle oluşan tekli tabakaların kayıplarının nasıl değiştiği incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4. 12'de verilmiştir.

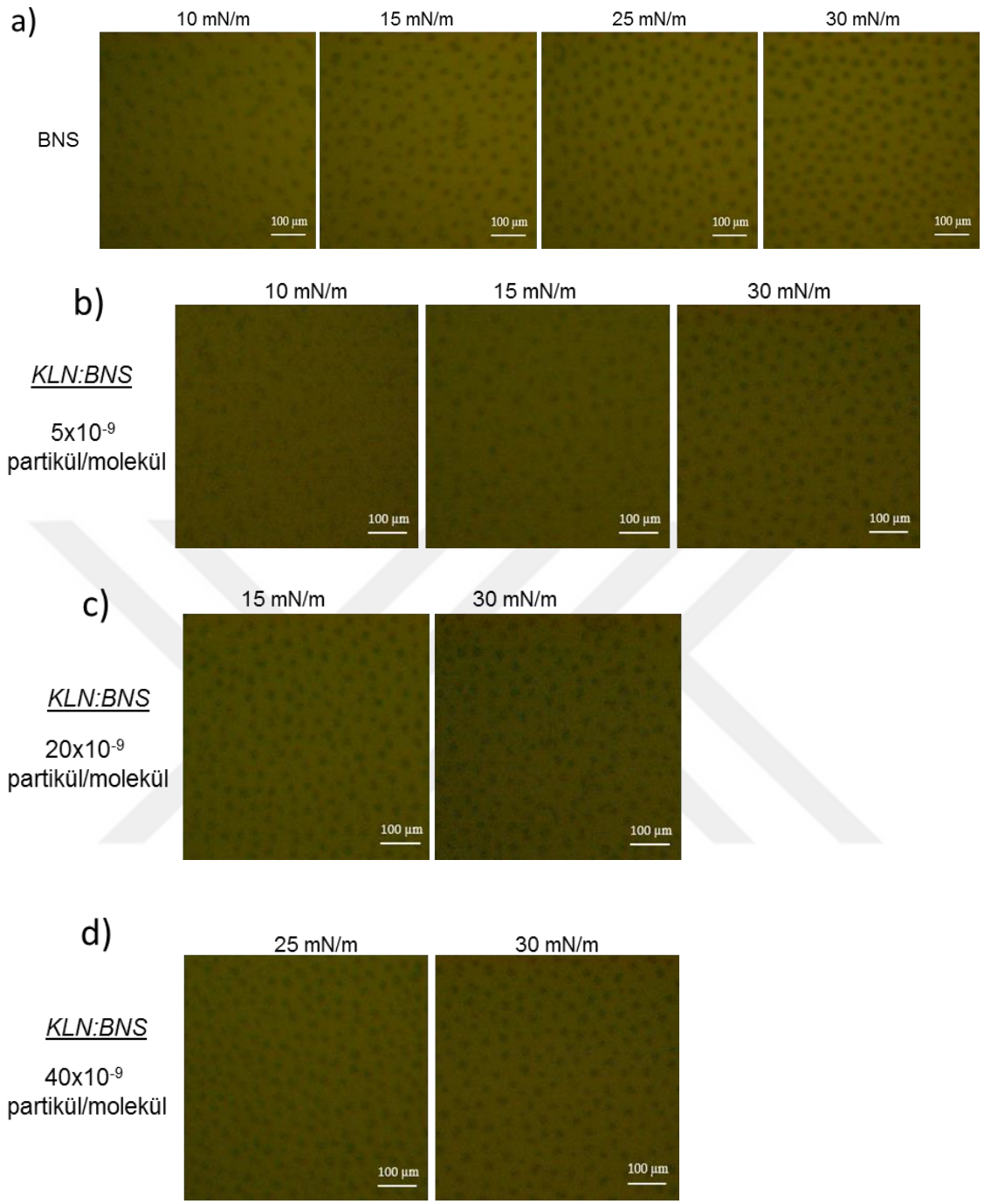
Çizelge 4. 12. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza KLN enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de KAYIP (%)				**45 mN/m'de KAYIP (%)**			
	BNS	***KLN:BNS (partikül/molekül)***			***BNS***	***KLN:BNS (partikül/molekül)***		
		$5X10^{-9}$	***$20X10^{-9}$***	***$40X10^{-9}$***		***$5X10^{-9}$***	***$20X10^{-9}$***	***$40X10^{-9}$***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	6.09	16.41	20.94	21.45	3.95	5.28	6.96	4.93
3.Sıkıştırma	10.99	23.18	28.07	28.18	7.10	10.23	11.14	7.22
4.Sıkıştırma	13.85	25.20	31.18	31.44	12.50	13.65	14.85	12.40
5.Sıkıştırma	15.20	27.36	33.56	34.54	14.75	15.42	15.98	14.30

Çizelge 4. 12'de gösterildiği gibi 30 mN/m yüzey basıncında saf BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla ara yüzeydeki lipit kaybının %6.09'dan 15.20'ye kadar arttığı görülmektedir. Alt faza KLN eklenmesiyle elde edilen tekli tabakaların sıkıştırılıp-genişletilmesiyle meydana gelen kayıplar $5x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %16.41'den 27.36'ya, $20x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %20.94'ten 33.56'ya ve $40x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %21.45'den 34.54'e kadar artmaktadır. 60 mN/m yüzey basıncında saf BNS tekli tabakasının sıkıştırılmasıyla ara yüzeydeki lipit kaybının %3.95'ten 14.75'e kadar arttığı görülmektedir. Alt faza KLN eklenmesiyle elde edilen tekli tabakaların sıkıştırılıp-genişletilmesiyle meydana gelen kayıplar $5x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %5.28'den 15.42'ye, $20x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %6.96'dan 15.98'e ve $40x10^{-9}$ partikül/molekül oranında KLN için %4.93'ten 14.30'a kadar artmaktadır.

30 mN/m yüzey basıncında daha çok kaybın olmasının sebebi BNS tekli tabakasının LE faz bölgesinde olmasından kaynaklanmaktadır. Biraz daha sıkıştırmayla faz geçiş bölgesi bitişinde yüzey basıncı 45 mN/m'de ara yüzeydeki molekül kaybının yüzdesinin 30 mN/m yüzey basıncına göre daha az olması molekül yoğunluğunun bu basınçta fazla olmasından

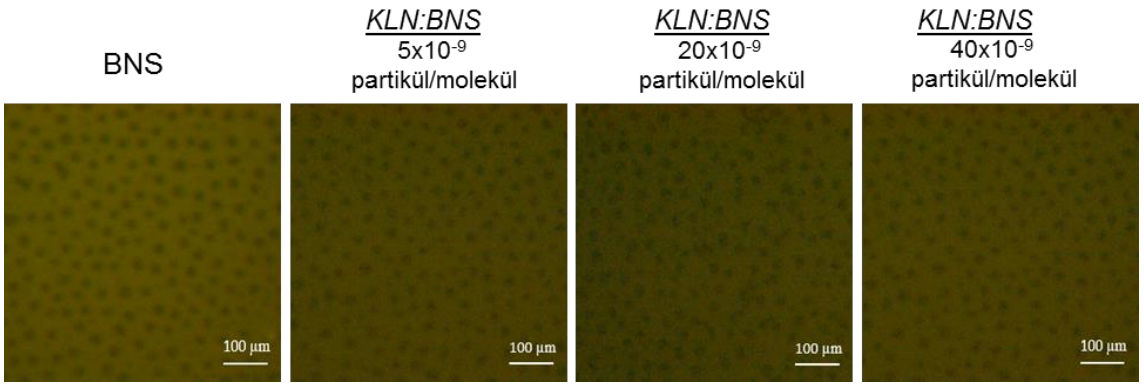
kaynaklı olmaktadır. Ayrıca BNS karışımı içindeki hidrofobik ve pozitif yüklü proteinler (SP-B ve SP-C) içermesinden dolayı 45 mN/m yüzey basıncında saf DPPC tekli tabakası ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında kaybın daha az arttığı görülmüştür. BNS karışımının gerçek sisteme daha uygun olmasından dolayı KLN'lerin pulmoner uygulama için uygun olduğu rahatlıkla söylenebilmektedir.



Şekil 4. 53. Fosfat tampon çözeltisi kullanılarak saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza farklı oranlarda KLN eklenerek elde edilen farklı basınçlarda FM görüntüleri

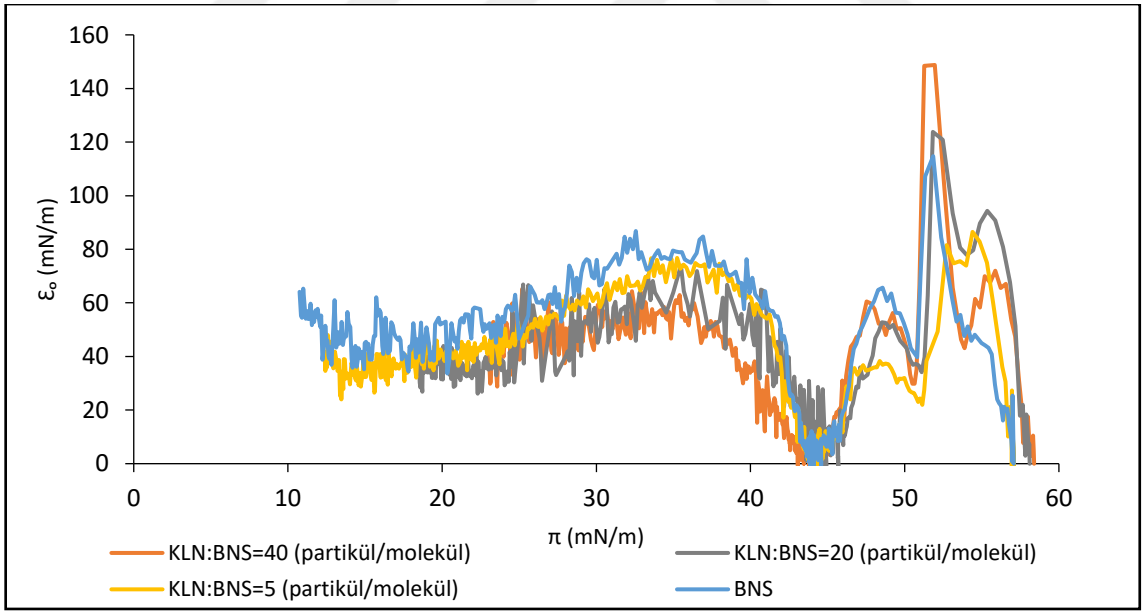
FM görüntülerine bakıldığında, verilen basınçlar için KLN:BNS=$5x10^{-9}$ partikül/molekül oranı için elde edilen görüntünün saf BNS için elde edilen ile çok benzer olduğu ancak oranın KLN:BNS=$40x10^{-9}$ partikül/molekül

olmasıyla etkinin daha belirgin olduğu ve LC adacıklarının boyutunun azalmasıyla tekli tabakanın akışkanlaştığını söylemek mümkündür.



Şekil 4. 54. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza KLN'lerin farklı oranlarının enjeksiyonunun 30 mN/m yüzey basıncında FM görüntüleri

Akışkanlaşmanın daha net görülebilmesi için 30 mN/m yüzey basıncında elde edilen görüntüler yan yana Şekil 4. 54'te verilmiştir.



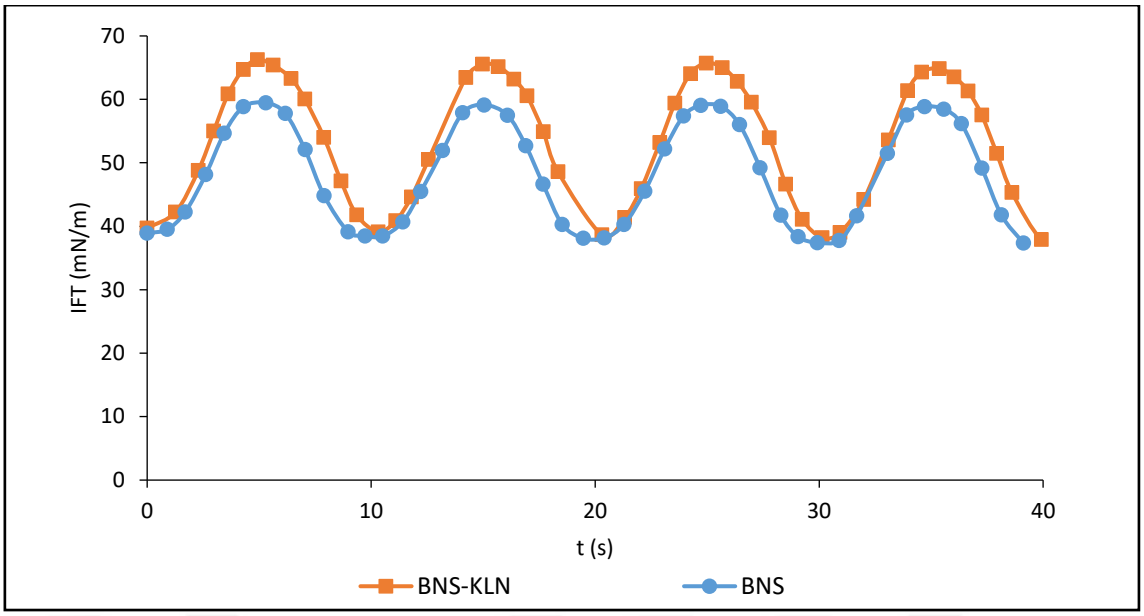
Şekil 4. 55. Saf BNS tekli tabakası ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza farklı oranlarda (x10^{-9}) KLN eklenmesiyle elde edilen elastisite - yüzey basıncı grafikleri

Saf BNS tekli tabakası alt fazında KLN olması saf DPPC tekli tabakasında olduğu gibi elastisiteyi çok fazla etkilememektedir. Saf BNS için faz geçişine kadar yaklaşık 35 mN/m yüzey basıncında maksimum elastisite

değeri 80 mN/m, faz geçişi bölgesi olduğu için basınç 45 mN/m'de sıfır olup daha sonra 50mN/m yüzey basıncına kadar artarak 115 mN/m elastisite değerine ulaşmıştır. Yığın faza KLN eklenmesiyle elastisitenin LE faz bölgesinde azaldığı ancak faz geçişi sonrası LC faz bölgesinde etkinin tam tersi olduğu gözlenmektedir. Bu DPPC tekli tabakasında olduğu gibi sıkıştırmaya karşı azalan tabaka direncini göstermektedir. Ancak etki miktarının çok fazla olmadığı net bir şekilde gözlenmektedir.

Gerçek nefes alış-veriş sistemine daha yakın olan dilatasyon elastisitesini incelemek için askıda damla cihazı kullanılmıştır. PBS damlası oluşturularak üzerine BNS enjekte edilmiş ve yüzey gerilimi sabitlenince osilasyona başlanmıştır. KLN'nin etkisinin incelenmesi için de oluşturulan BNS tekli tabakası damlacığına KLN eklenmiş ve aynı koşullarda osilasyon yapılmıştır. Gerçek sisteme yakın olması için 0.1 Hz sabit frekansta ve saf DPPC için geçerli olan platoya etkiyi görmek için 0.3 genlikte çalışılmıştır.

BNS ve KLN arasındaki etkileşimleri analiz etmek için salınım çalışmaları, DPPC/KLN tekli tabakalarını incelerken yapıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen salınım grafiği Şekil 4. 56'da gösterilmiştir. Bu grafikle elde edilen veriler Fourier dönüşümü (FFT) ile analiz edilmiş ve Çizelge 4. 13'te THD değerleri hesaplanmış ve verilmiştir.

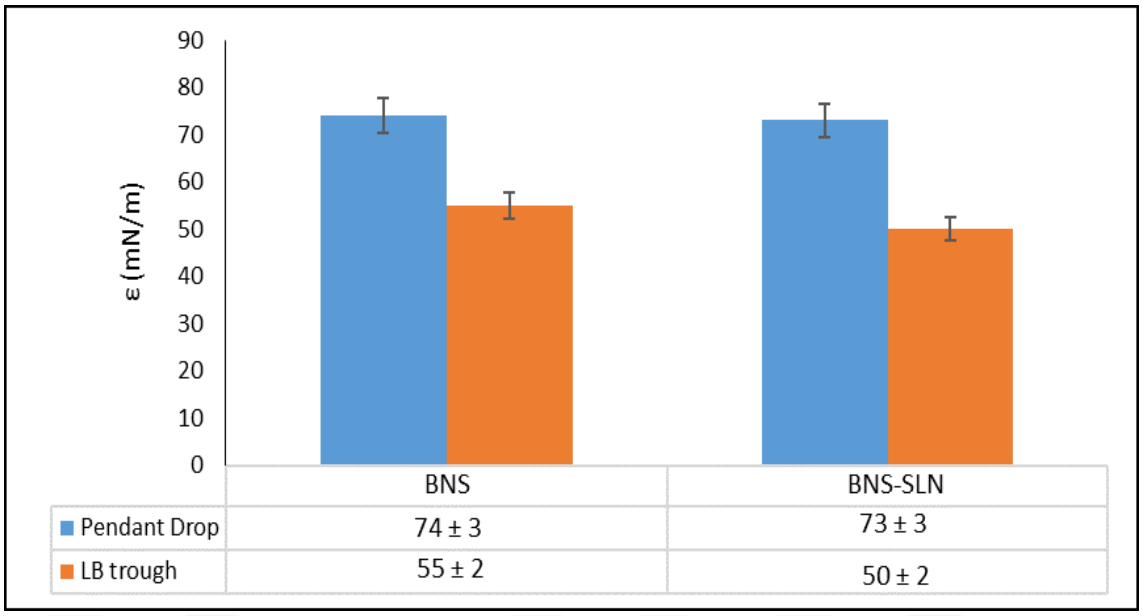


Şekil 4. 56. Fosfat tampon çözeltisi içindeki BNS ve BNS-KLN tekli tabakalarının $\Delta A/A_0$=0.3 genişleme genliği için v=0.1 Hz frekansında salınan yüzey gerilim-zaman izotermleri

Saf BNS ve BNS/KLN tekli tabakalarının yüzey gerilimi değerlerinde, sabit 0.1 Hz frekans ve 0.3 genlikteki ara yüzey alanının sinüzoidal değişikliklerine verilen yanıt incelenmiştir. DPPC/KLN'de olduğu gibi, BNS tekli tabakasına partiküllerin eklenmesi de genliği arttırmaktadır. Bununla birlikte, KLN eklenmesiyle, genliğin $\Delta A/A_0$ 0.3'te hafif arttığı gözlenmiştir.

Sinüzoidal sistemin doğrusallığı, Toplam Harmonik Distorsiyonu (THD) hesaplamak için MATLAB programı kullanılarak Fourier dönüşümü (FFT) uygulanarak analiz edilmiştir [68].

Tekli tabakaların kesme ve dilatasyon elastisiteleri Şekil 4. 57.'de gösterilmiştir. Sistem stabilitesini gösterme açısından bu sonuçlar büyük önem taşımaktadır.



Şekil 4. 57. BNS ve BNS-KLN tekli tabakalarının dilatasyon ve kesme elastisiteleri

Şekil 4. 57'de gösterilen, kesme (55 mN/m) ve dilatasyon (74 mN/m) elastisite değerlerinin yakınlığı, yüzey deformasyonunun bir sonucu olarak elastikiyetin değişmediğini göstermektedir. Bu sonuç, ara yüzeyde stabil bir sistemin varlığının göstergesi olmaktadır. Toplam harmonik bozulma (THD), Fourier spektrumları temelinde hesaplanmış ve sistemin reolojik cevabının doğrusal olmayanlığının belirlenmesini sağlamıştır.

Çizelge 4. 13. KLN eklenmesiyle BNS tekli tabakasının THD değerindeki değişimi

	BNS	**BNS-KLN**
f (1/s)	0.1	0.1
$\Delta A/A_0$	0.3	0.3
THD	0.141	0.153

Aynı frekans ve genlikte THD değerleri BNS tekli tabakası için 0.141, KLN enjekte edilmiş BNS tekli tabakası için 0.153 elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu değerler birbirine yakın olduğu için KLN'nin BNS tekli tabakasının reolojik cevabını bozmadığını söylemek mümkündür.

Genel olarak, KLN'lerin adsorpsiyonunun tekli tabaka yapısını bozmadığı sonucuna varılabilmektedir. Bir lipit tekli tabakanın doğrusal olmayanlığı, genişleme sırasında malzemelerin yeniden yayılması için azaltılmış yüzey difüzyonu ile ilişkili olmaktadır. Nanopartiküller, heterojen partikül-sürfaktan yapılarının tek tabaka halinde sıkıştırılması sırasında ortaya çıkan yüzey difüzyonunu önleyebilmektedir. Ancak bu çalışmanın sonuçlarında görüldüğü gibi ara yüzeydeki KLN'lerin varlığı, bu konuda olumsuz bir etki göstermemiştir.

THD değeri, sistem davranışını ayırt etmek için kullanılabilir ve bu nedenle, nanopartiküllerin, dilatasyon reolojisi ölçümlerine dayanarak, akciğer fonksiyonu üzerindeki potansiyel olumsuz etkilerine göre sınıflandırılması için uygun şekilde kullanılabilmektedir. Sonuç olarak, KLN'lerin DPPC ve BNS tekli tabakası üzerindeki etkisinin birbirine benzediği ve KLN'lerin varlığının tekli tabakanın reolojik cevabının doğrusallığını bozmadığı ortaya çıkmıştır.

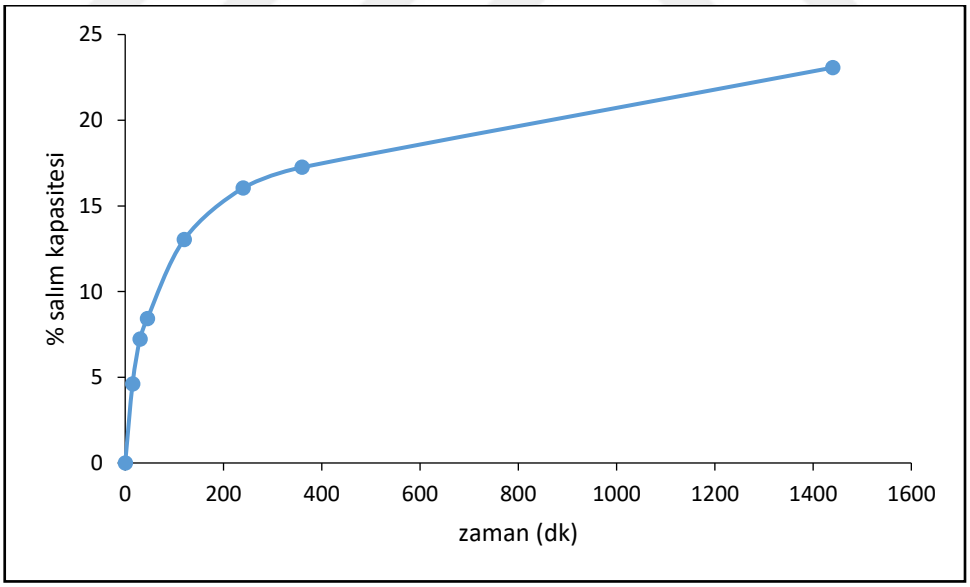
İlaçların ve ilaç taşıyıcı sistem olan KLN'lerin akciğer yüzey aktif maddeleri üzerine etkileri incelendikten sonra model bir ilaç yüklü KLN'nin alveole ulaştıktan sonraki davranışı, ilacı salımı ve akciğer yüzey aktif maddeye olan etkilerini incelemenin önemi bulunmaktadır. Bunun için öncelikle KLN içine ilaç yüklenerek, ilacın KLN'nin özelliğine etkisini anlayabilmek için ilaç yüklü KLN'nin karakterizasyonu yapılmış daha sonra KLN'nin salım profili hakkında ön bilgi edinebilmek amacıyla PBS ortamında salımı incelenmiştir. Bu ön bilgiler doğrultusunda da alveollere ulaşabilen ilaç yüklü KLN'lerin akciğer sürfaktanına etkisi araştırılmıştır.

4.4. Naproksen Yüklü Katı Lipit Nanopartikül'den İlaç Salım Çalışması

İlaç salımı için öncelikle KLN içine ilacın alınması sağlanmıştır. KLN oluşumu sırasında lipit fazına Nap eklenmesiyle ilaç yüklü KLN elde edilmiştir ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. İlk olarak UV-vis spektroskopisi kullanılarak ilaç tutma yüzdesi %95 olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatürde kullanılan katı lipit partiküllere Nap yüklendiğinde

elde edilenden daha yüksektir [88]. Bunun sebebi kullanılan KLN'nin özelliklerinin farklı olmasıyla bağlantılıdır. Nap etken maddesinin KLN içine alınmasıyla KLN'nin sahip olduğu uygun boyut ve yük değerlerine etkisini öğrenmek için DLS-SLS ve Zeta potansiyel analizleri yapılmıştır. Boş KLN'nin boyutu 77±3 nm iken Nap etken maddesinin varlığıyla 82±3 nm olmuştur. Zeta potansiyel ölçümlerinden de boş KLN için -11±1.5 mV iken Nap-KLN için bu değer -13±1 mV olmuştur. Sonuç olarak, Nap etken maddesinin KLN içine yüklenmesiyle KLN'nin boyutunda ve yükünde büyük bir değişim olmadığı söylenebilmektedir.

Nap-KLN santrifüjlenerek üstte kalan tutunamayan ilaç miktarı UV-vis spektroskopisi kullanılarak okunmuş ve KLN'nin NAP tutma kapasitesi hesaplanmıştır. Hidrofobik ilaç olduğu için beklendiği gibi KLN'ye girmesi kolay olmuştur ve ilaç tutma kapasitesi %95 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerin yüksek olması ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça verimli bir sonuçtur.



Şekil 4. 58. Nap yüklü Katı Lipit Nanopartikülden salınan Nap yüzdesinin zamanla değişimi

In-vitro koşullardaki Nap salım özellikleri ilk 24 saat için incelenmiştir. Nap salım miktarını analizlemek için UV-vis spektroskopisi kullanılmıştır. Salımda ilaç miktarını hesaplamak için kalibrasyon doğrusundan

y=0.2991x denkliği elde edilerek absorbans değerinden Nap miktarına geçiş yapılmıştır. Grafiğe bakıldığında 250 dakikada Nap'ın yaklaşık %15'ini salmış daha sonra azalan bir hızla salım devam etmiştir. 24 saatte yaklaşık %25'ini salmıştır. Salım miktarının az olma sebebi KLN'nin iç kısmında bulunan Nap etken maddesinin hidrofobik yapıya sahip olmasıyla salımının az olmasından kaynaklanmaktadır. Başlangıçta 30 μg Nap içeren KLN, 24 saatte 7 μg Nap salmıştır.

Salım profili in-vitro ortamda incelenen Nap yüklü KLN'lerin alveollere ulaşıp salınan miktarının yaklaşık olarak salım çalışmasında elde edilen miktarla aynı kabul edilerek akciğer yüzey aktif maddesine gelen bu miktarda ilaç ile KLN'nin etkisi incelenmiştir.

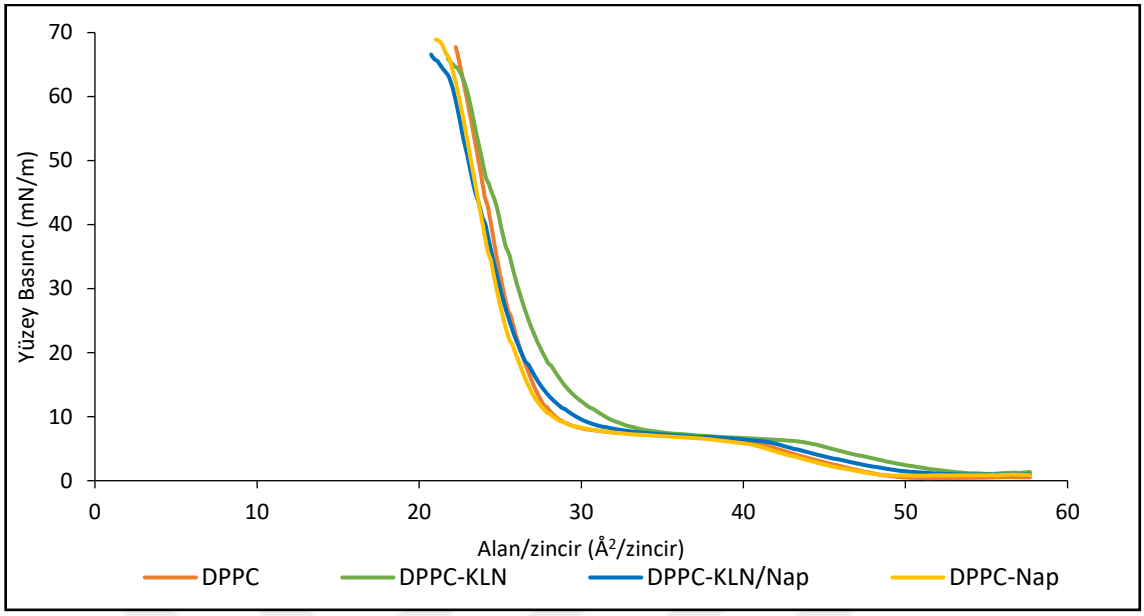
4.5. Fosfat Yığın Fazında DPPC ve BNS Tekli Tabakasına Katı Lipit Nanopartikül ve Naproksen Etkisinin İncelenmesi

Katı lipit taşıyıcıların pulmoner dağıtım için uygun olduğu sonucuna varıldıktan sonra model olarak seçilen Naproksen etken maddesinin hidrofobik özelliğinden ötürü KLN içine yüklenerek pulmoner yolla alınmasıyla alveole ulaştığı ve salım yaptığı düşünülerek akciğer yüzey aktif maddesinin özelliğine etkisinin incelenmesi son derece önemlidir.

Nap yüklü KLN'lerin akciğer yüzey aktif maddesi ile etkileşiminin incelenmesi için KLN'lerden Nap salımında 24 saat sonunda ulaştığı ilaç miktarı kadar (7μg) Nap ile LB trough çalışması yapılarak sürfaktan tekli tabakası üzerine Nap etken maddesi ve KLN'lerin etkisi birlikte incelenmiştir. Fosfat tampon çözeltisi üzerine sürfaktan tekli tabakası oluşturularak alt faza partikül, ilaç ve aynı anda partikül ve ilaç enjekte edilerek tekli tabakadaki değişimler incelenmiştir. Bunun sebebi, alveollere Nap yüklü KLN geldiğinde ve orda salabildiği kadar ilaç salındığında akciğer yüzey aktif maddesinin fonksiyonunun bu Nap ve KLN ile nasıl değiştiğini daha iyi anlayabilmektir.

İlk olarak sürfaktan model sistemi olan DPPC kullanılarak Nap yüklü KLN etkisi incelenmiş daha sonra ön bilgi doğrultusunda gerçek sistem olan BNS ile etkileşimi incelenerek yorumlanmıştır.

KLN ve Naproksen'nin DPPC Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi

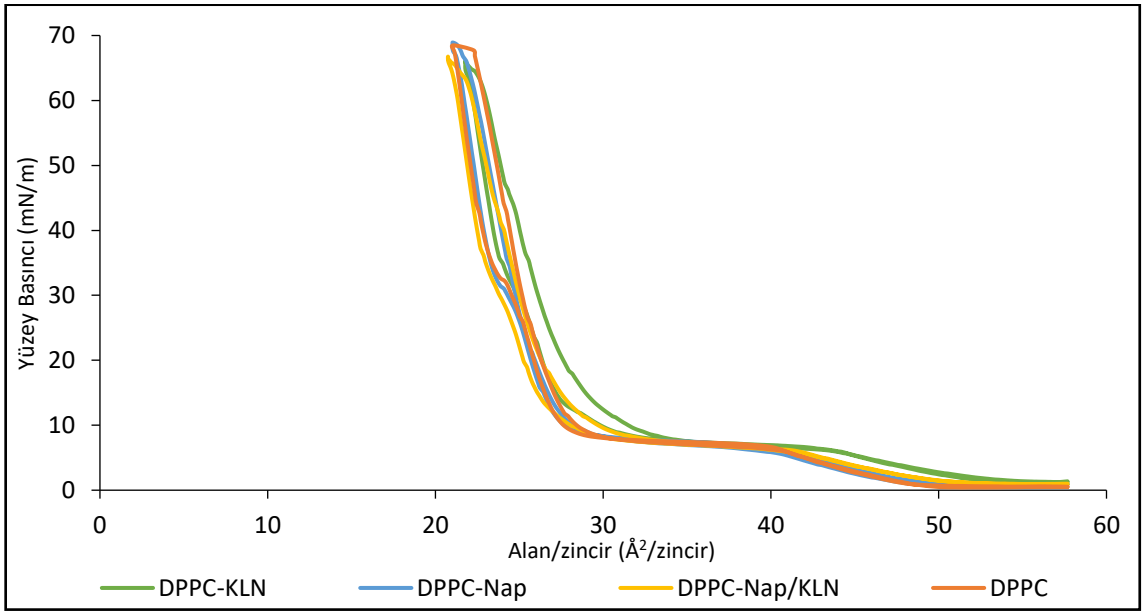


Şekil 4. 59. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun Π-A izotermleri (KLN:DPPC= $5x10^{-9}$ partikül/molekül, Nap=5.5 $x10^{-5}$ mg/ml)

Saf DPPC tekli tabakası oluşturduktan sonra KLN:DPPC $5x10^{-9}$ partikül/molekül oranında tek başına KLN eklendiğinde görülen etki boş KLN'lerin farklı oranlarının etkisinin incelenmesiyle anlatıldığı gibi tekli tabakaya giren KLN, saf DPPC izotermini bir miktar sağa kaydırmıştır ve basınç 45 mN/m'de eğimi azaltarak 'kink' oluşturmuştur. 24 saat sonunda salınan Nap miktarı kadar Nap etken maddesinin tek başına saf DPPC tekli tabakasına enjekte edildiğindeki etki de sadece Nap çözeltisinin etkisinin incelenmesi sırasında anlatıldığı gibi izotermi bir miktar sola kaydırmıştır. Burada kullanılan miktar sadece Nap çözeltisinin etkisinin incelendiği miktardan farklı ancak sonuçlarla uyumlu olarak bulunmuştur. Nap yüklü KLN'lerden salımı simüle eden Nap ve KLN'nin eş zamanlı olarak eklenmesiyle de beklendiği gibi saf materyallerin enjeksiyonunun etkilerine benzer olmuştur. Bu etki, KLN'nin etkisine benzer bir yüzey basıncı artışı ve faz geçiş bölgesinin eğiminde bir artış olmasına rağmen saf KLN enjeksiyonu ile elde edilenden daha az elde edilmiş ve aynı zamanda izoterm hafif bir şekilde saf Nap çözeltisinin enjeksiyonunun

etkisine benzer şekilde LC faz bölgesinde izotermin sola kaymasına sebep olmuştur. Bunun bir sebebi de negatif yüklü KLN ile çalışılan pH değerinde negatif yüklenen Nap etken maddesi arasındaki elektrostatik etkileşimler ve bunların zivitteriyonik DPPC ile etkileşimleri olarak açıklanabilmektedir.

Tekli tabakanın yüzey basıncı-alan izotermine etkilerinin yanı sıra nefes alış-veriş çevrimini taklit eden sıkıştırma-genişleme döngüsel davranışına Nap yüklü KLN etkilerinin analizi Şekil 4. 60'da verilmiştir.



Şekil 4. 60. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun sıkıştırma-genişletme çevrimleri (KLN:DPPC= $5x10^{-9}$ partikül/molekül, Nap=5.5 $x10^{-5}$ mg/ml)

Şekil 4. 60 incelediğinde KLN'lerin saf DPPC tekli tabakasına eklenmesinin tekli tabakanın iyileşme indeksini değiştirmediği görülmektedir. Tekli tabakaların sıkıştırma-genişletme çevrimlerinin alan değerlerine bakıldığında DPPC için bu alanın küçük olduğunu ancak KLN'lerin eklenmesiyle histeresizin arttığı, Nap'ın ve ikisinin eş zamanlı eklenmesiyle histeresizin etkilenmediği görülmektedir. KLN ve Nap etken maddesinin saf DPPC tekli tabakasının iyileşme indeksini ve geri yayılım özelliğini değiştirmediği söylenebilmektedir.

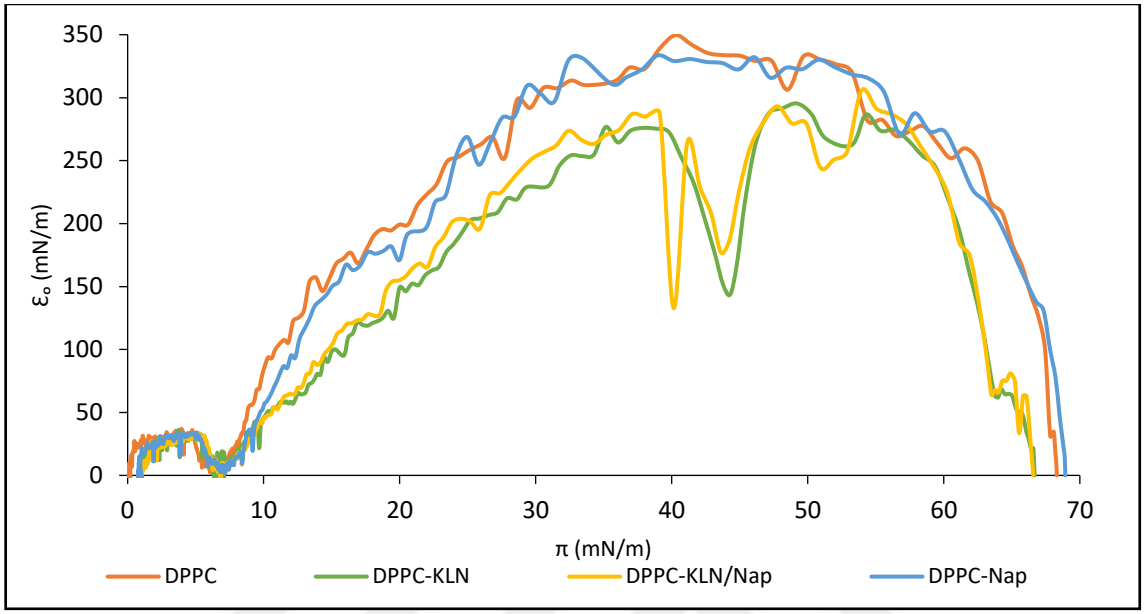
Yüzey basıncı-alan izotermleri KLN'lerin yüzey özellikleri üzerindeki etkileri incelendikten sonra, sıkıştırma-genişletme döngüsünden hesaplanan ara yüzey molekül yüzdeleri de, KLN'lerin ve Nap'ın DPPC tekli tabakası üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için incelenmiştir.

Çizelge 4. 14. 30 ve 60 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de KAYIP (%)				**60 mN/m'de KAYIP (%)**			
	DPPC	***DPPC/ KLN***	***DPPC/ Nap***	***DPPC/ Nap-KLN***	***DPPC***	***DPPC/ KLN***	***DPPC/ Nap***	***DPPC/ Nap-KLN***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	1.4	2.52	3.25	2.18	4.55	1.62	3.31	1.4
3.Sıkıştırma	4.69	3.77	5.57	3.27	7.53	3.24	5.43	2.47
4.Sıkıştırma	6.15	4.48	7.36	4.30	8.35	4.45	6.38	3.84

Tekli tabakaların sıkıştırılıp-genişletilmesiyle meydana gelen ara yüzeyden kaybolan molekül yüzdeleri Çizelge 4. 14'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde 30 mN/m yüzey basıncı için 4.sıkıştırma sonunda saf DPPC tekli tabakası için bu kaybın %6.15 olduğu, KLN eklenmesiyle bu değerin %4.48'e düştüğü, Nap eklenmesiyle 7.36'ya çıktığı ve ikisinin eş zamanlı eklenmesiyle %4.30'a düştüğü görülmüştür. 60 mN/m yüzey basıncı için ise saf DPPC tekli tabakası için bu kaybın %4.55 olduğu, KLN eklenmesiyle bu değerin %4.45'e, Nap eklenmesiyle 6.38'e ve ikisinin eş zamanlı eklenmesiyle %3.84'e düştüğü, görülmektedir. Bu çalışmada eklenen KLN miktarının KLN:DPPC $5x10^{-9}$ partikül/molekül oranı ile aynı olmasından dolayı önceki çalışma ile aynı sonuçları verdiği gözlenmiştir. Tek başına eklenen Nap çözeltisinde 0.89 mol oranında Nap eklendiği için beklendiği gibi iki farklı oranda Nap çözeltisinin incelendiğinde elde edilen sonuçla tutarlı olarak daha çok miktarda Nap olduğu için kaybın daha yüksek olduğu görülmüştür. Tek başına KLN veya Nap eklenmesinin etkisinin önceden çalışıldığı gibi olduğu ancak her ikisinin aynı anda enjeksiyonu ile KLN'de olduğu gibi ara yüzeyden kaybolan molekül miktarının azaldığı söylenebilmektedir.

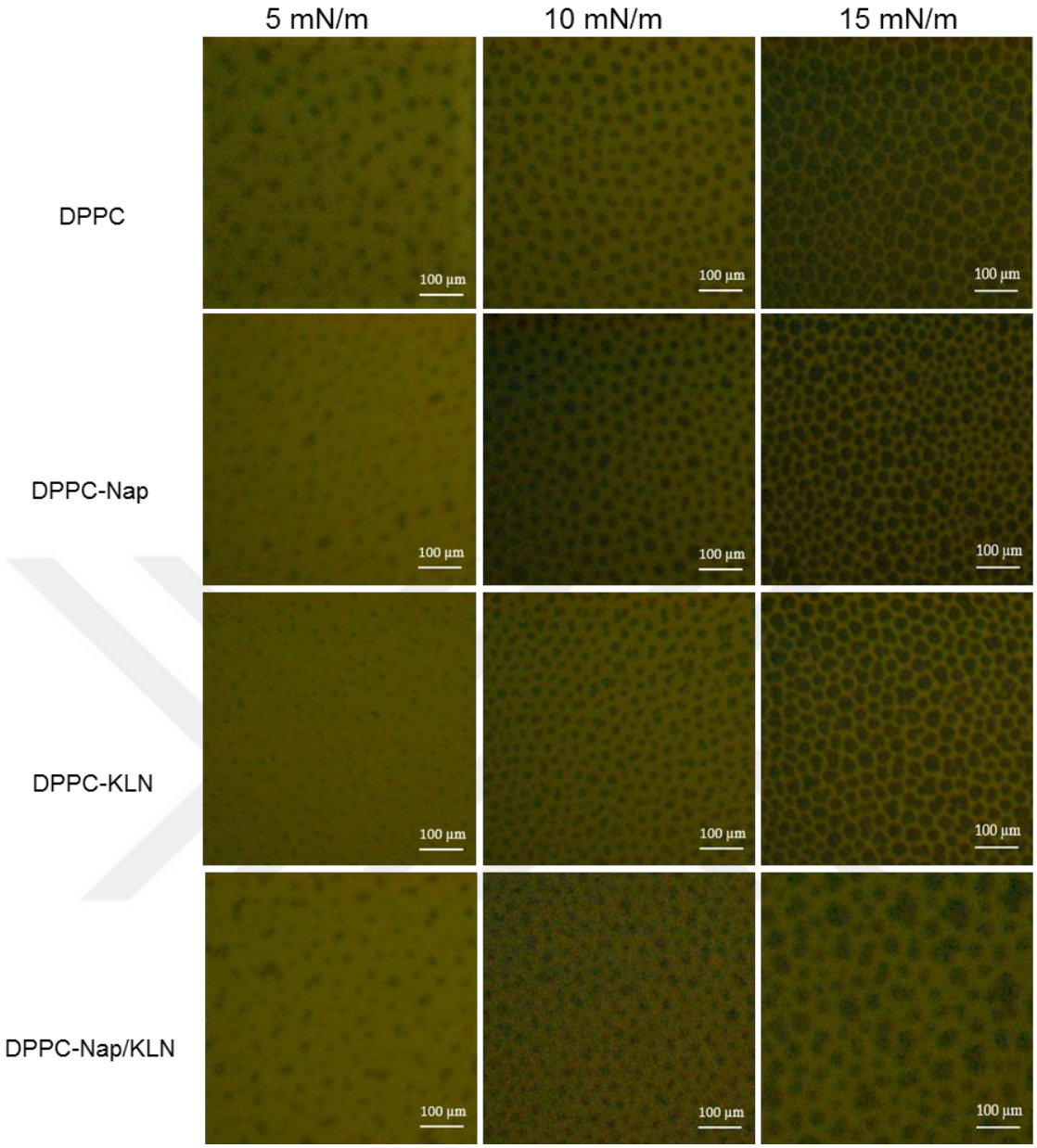
Ara yüzey kaybı incelendikten sonra tekli tabakaya eş zamanlı olarak Nap ve KLN eklenerek tekli tabakanın elastisitesinin değişiminin incelenebilmesi için Langmuir tekli tabakasından elde edilen kesme elastisite grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4. 61. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakanın ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun elastisite-basınç grafikleri

Elde edilen elastisite sonuçları Şekil 4. 61' de verilmiştir. İzotermde olduğu gibi benzer etkileşimler gözlenmiştir. Sadece Nap eklenmesinin DPPC tekli tabaka elastisitesini değiştirmediği, KLN eklenmesinin ise LC faz bölgesinde elastisiteyi azalttığı görülmüştü. İkisinin eş zamanlı eklenmesi ile beklendiği gibi LC faz bölgesinde KLN'nin etki göstermesiyle DPPC elastisitesini azaltmıştır, ancak saf KLN eklendiği kadar azaltmamıştır. Bunun sebebi, Nap'ın da KLN'nin de negatif yüklü oluşu ve aralarındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır.

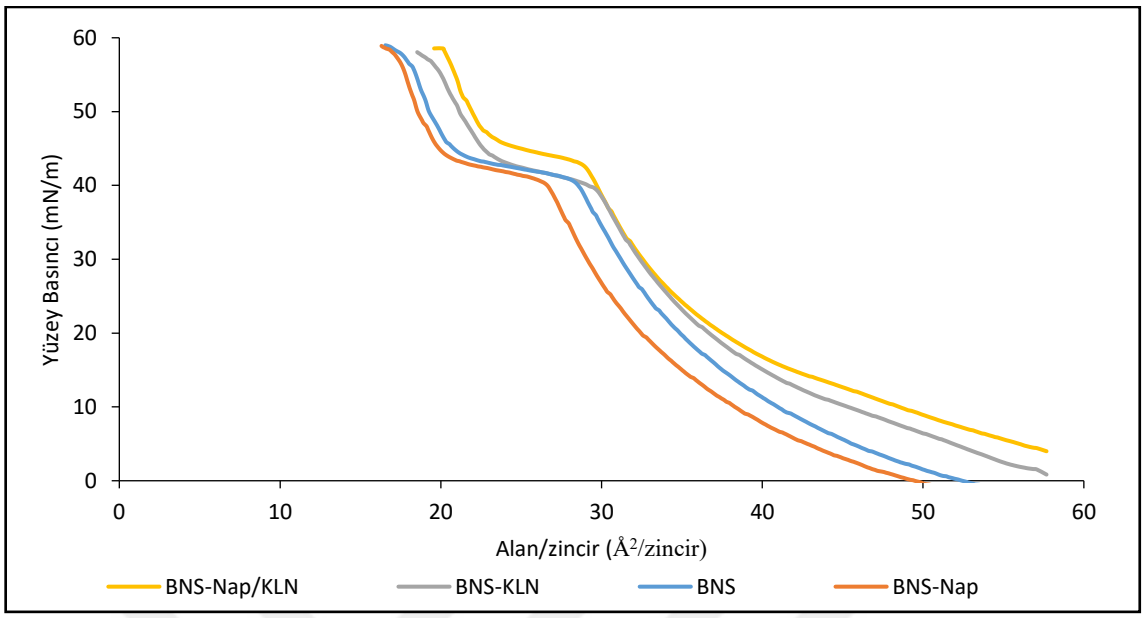
Sürfaktan tekli tabakasına ilaçların da KLN'nin de eklenmesiyle tekli tabakanın akışkanlığının arttığı görülmüştü. Nap ve KLN'nin eş zamanlı eklenmesiyle tekli tabakanın akışkanlığının değişimi de FM görüntüleri ile incelenmiştir.



Şekil 4. 62. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf DPPC tekli tabakasının ve DPPC tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun FM görüntüleri

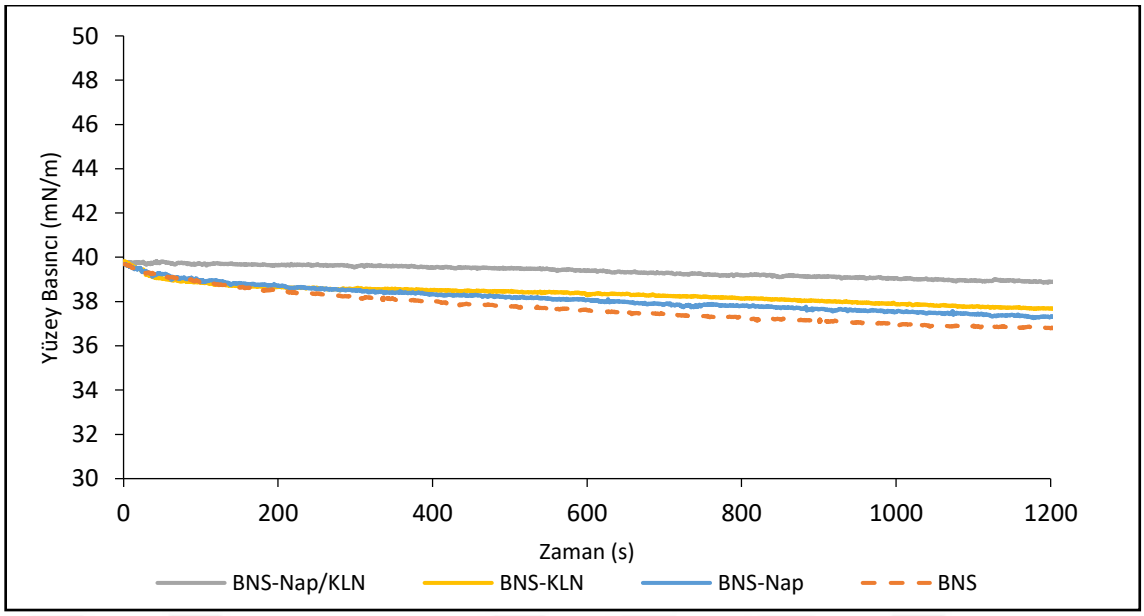
FM görüntüleri incelendiğinde, DPPC tekli tabakası varlığında saf Nap ve saf KLN enjeksiyonu önceki bölümlerde anlatıldığı gibi tekli tabakanın akışkanlığını arttırmaktadır ancak enjekte edilen miktarların azlığı sebebiyle etkinin çok fazla olmadığı görülmektedir. Nap ve KLN'nin eş zamanlı enjeksiyonu ile etkinin daha net görüldüğü söylenebilmektedir.

KLN ve Naproksen'in BNS Tekli Tabaka Ara Yüzeyi ile Etkileşiminin İncelenmesi



Şekil 4. 63. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun Π-A izotermleri ($0.18x10^{-4}$ mg/ml KLN, $3.36x10^{-4}$ mg/ml Nap)

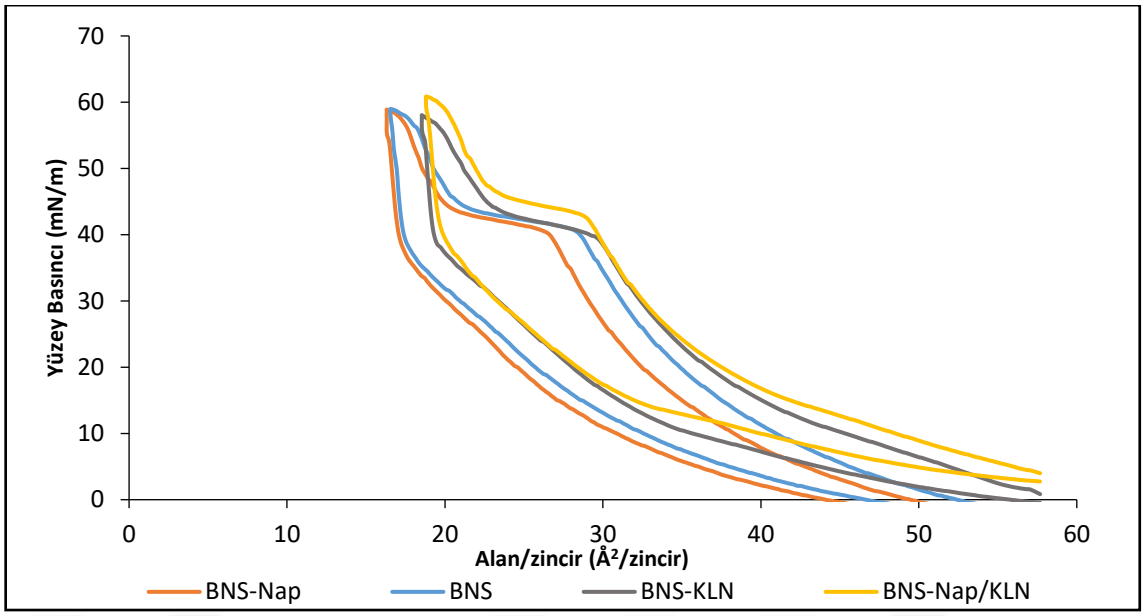
İzoterme bakıldığında sadece Nap'ın ve KLN'nin BNS üzerindeki etkisi DPPC tekli tabakasına olan etkiye benzer şekilde olduğu söylenebilmektedir. Ancak KLN ve Nap'ın eş zamanlı olarak enjeksiyonu sonucu BNS tekli tabakasına etkisinde faz geçişi basıncını arttırdığı ve KLN'nin tek başına enjeksiyonundan daha yüksek bir basınca çıkardığını söylemek mümkündür. Bunun sebebi, BNS içinde bulunan pozitif yüklü SP-B ve SP-C proteinleriyle negatif yüklü KLN ve Nap'ın etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Bu etkileşimi daha iyi anlamak için faz geçişinin başlangıcı olan yaklaşık 40 mN/m yüzey basıncında ara yüzeye adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi yapılmıştır. Elde edilen grafik Şekil 4. 64'te verilmektedir.



Şekil 4. 64. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında 40 mN/m basınçta yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjekte edildiğinde Π-t grafikleri ($0.18x10^{-4}$ mg/ml KLN, $3.36x10^{-4}$ mg/ml Nap)

Zamanla yüzey basıncı değişimi grafiğine baktığımızda basıncı 40 mN/m'ye sabitlenen BNS tekli tabakasının 20 dakikada yüzey basıncının 36 mN/m olduğu görülmektedir. Ara yüzeyde BNS tekli tabakası varlığında aynı yüzey basıncında alt fazdan sadece Nap eklenmesiyle yüzey basıncı 36.7 mN/m'ye, KLN eklenmesiyle 37.4 mN/m'ye düşerken, ikisinin eş zamanlı enjeksiyonuyla 39 mN/m'ye düşmüştür. Bunun sebebi de negatif yüklü Nap ve KLN'nin, BNS içindeki pozitif yüklü proteinlerle elektrostatik etkileşime girmesinden kaynaklanmaktadır.

Saf BNS tekli tabakası varlığında Nap ve KLN'nin eş zamanlı enjeksiyonu ile, tekli tabakanın döngüsel davranışının değişimi incelenerek Şekil 4. 65'te verilmiştir.



Şekil 4. 65. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun sıkıştırma-genişletme çevrimleri ($0.18x10^{-4}$ mg/ml KLN, $3.36x10^{-4}$ mg/ml Nap)

Şekil 4. 65 incelediğinde KLN'lerin eklenmesinin tekli tabakanın iyileşme indeksini değiştirmediği görülmektedir. Tekli tabakalarının sıkıştırma-genişletme çevrimlerinin alan değerlerine baktığımızda Nap'ın da KLN'nin de eklenmesinin BNS histeresizini değiştirmediği görülmektedir.

Yüzey basıncı-alan izotermleri KLN'lerin yüzey özellikleri üzerindeki etkileri incelendikten sonra, sıkıştırma-genişletme döngüsünden hesaplanan ara yüzeyden kaybolan molekül yüzdeleri de, KLN'lerin ve Nap'ın BNS tekli tabakası üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için incelenmiştir.

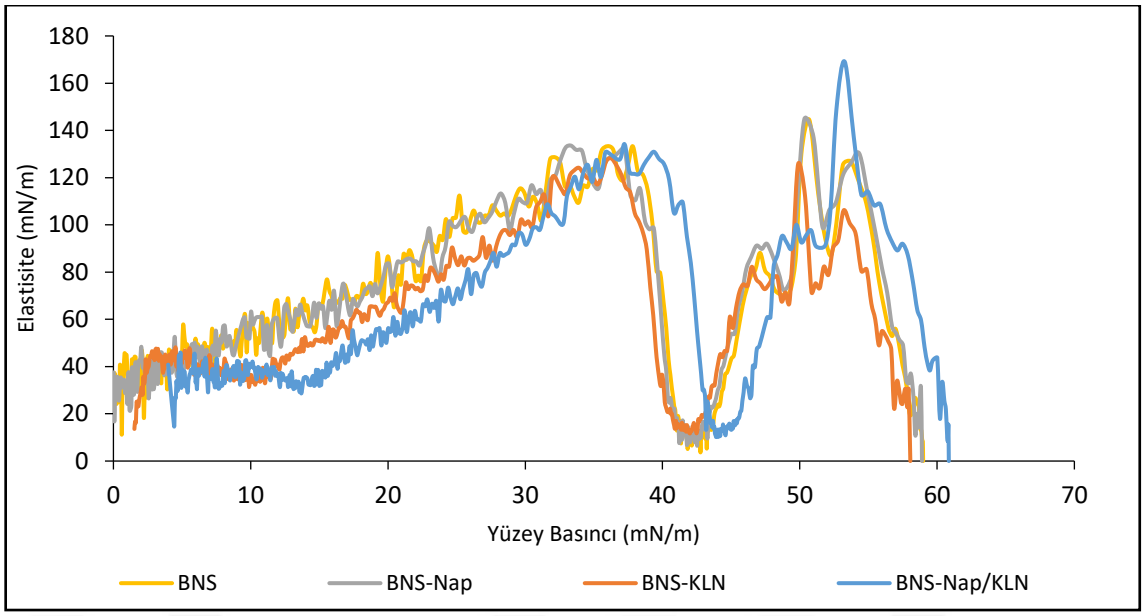
Çizelge 4. 15. 30 ve 45 mN/m yüzey basıncında PBS çözeltisinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonu sonrası sıkıştırılması sırasında ara yüzeyden madde kaybı yüzdeleri

	30 mN/m'de KAYIP (%)				**45 mN/m'de KAYIP (%)**			
	BNS	***BNS/ KLN***	***BNS/ Nap***	***BNS/ Nap-KLN***	***BNS***	***BNS/ KLN***	***BNS/ Nap***	***BNS/ Nap-KLN***
1.Sıkıştırma	-	-	-	-	-	-	-	-
2.Sıkıştırma	9.89	8.35	7.5	5.09	9.63	5.19	8.25	6.39
3.Sıkıştırma	15.21	14.43	12.26	15.05	15.9	9.35	10.90	15.12
4.Sıkıştırma	19.31	18.41	15.38	16.28	18.32	12.47	13.01	18.71

Çizelge 4. 15'te verilen tekli tabakaların sıkıştırılıp-genişletilmesiyle meydana gelen ara yüzeyden kaybolan molekül yüzdeleri incelendiğinde 30 mN/m yüzey basıncı için 4.sıkıştırma sonunda saf BNS tekli tabakası için hesaplanan kaybın tek başına KLN enjeksiyonu ile bir miktar düştüğü ama saf BNS kaybına çok yakın olduğu görülmektedir. Tek başına Nap eklenmesiyle ise kaybın yaklaşık %3-5 oranında azaldığı iki basınç için de gözlenmektedir. KLN ve Nap çözeltisinin eş zamanlı enjeksiyonu ile ise saf DPPC tekli tabakası ile etkisinden elde edilen sonuca benzer olarak ara yüzeyden madde kaybını bir miktar azalttığı ancak BNS karışımında bulunan katyonik proteinlerin etkisiyle etkileşimin daha çok olmasıyla kayıp miktarındaki azalmanın daha az olduğu söylenebilmektedir.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda ilaç yüklü KLN'lerin alveollere gelmesi sonucu salım yaptığında hem Nap etken maddesi hem de KLN'lerden kaynaklı meydana gelecek akciğer sürfaktanının ara yüzeyde bulunan miktarını çok etkilemediğini söylemek mümkündür.

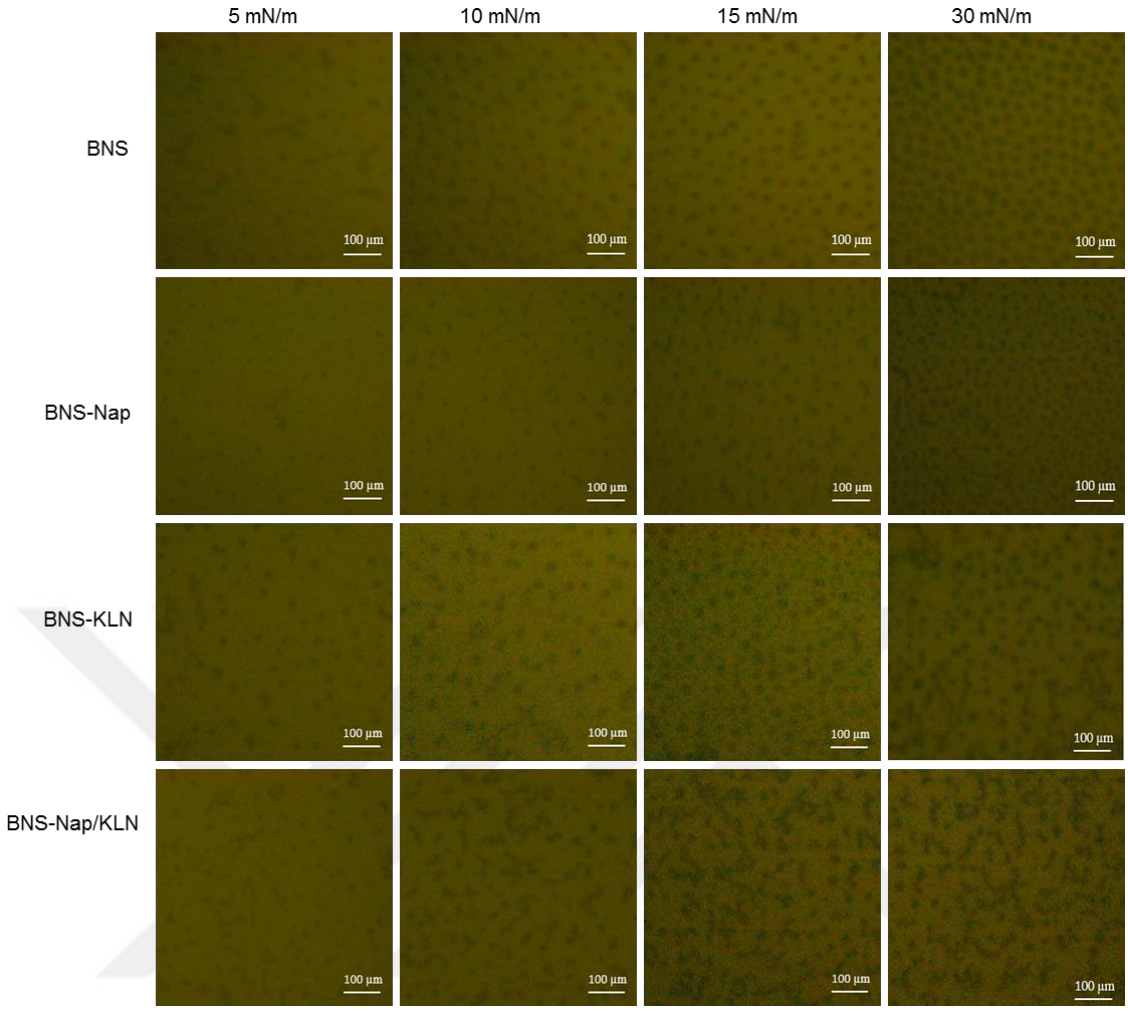
Ara yüzeydeki molekül miktarı analizinden sonra tekli tabakanın elastisitesi de incelenmiş ve Şekil 4. 66'da verilmiştir.



Şekil 4. 66. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun elastisite-yüzey basıncı grafikleri

Şekil 4. 66'da verilen grafiğe bakıldığında saf BNS için LE fazdaki maksimum elastisite değerinin 36mN/m yüzey basıncında yaklaşık 127 mN/m olduğu, Nap ve KLN'nin bu değeri değiştirmediği sadece bu değere gelene kadar olan kısımda elastisiteyi KLN'nin azalttığı görülmektedir. Nap ve KLN'nin birlikte enjeksiyonu BNS tekli tabaka elastisitesini azaltmaktadır ve izotermden görüldüğü gibi faz geçiş basıncını değiştirdiği için elastisite grafiğini sağa yani yüksek yüzey basıncına kaydırmaktadır.

BNS tekli tabaka elastisitesi incelendikten sonra ara yüzeyin FM görüntüleri de elde edilerek Şekil 4. 67'de verilmiştir.



Şekil 4. 67. Fosfat tampon çözeltisi üzerinde saf BNS tekli tabakasının ve BNS tekli tabakası varlığında yığın faza NAP, KLN ve eş zamanlı KLN ve NAP enjeksiyonunun FM görüntüleri

FM görüntülerinden, DPPC tekli tabakası ile etkileşiminin incelenmesinde olduğu gibi BNS tekli tabakası varlığında saf Nap ve saf KLN enjeksiyonu tekli tabakanın akışkanlığını arttırmaktadır ancak enjekte edilen miktarların azlığı sebebiyle etkinin çok fazla olmadığı görülmektedir. Nap ve KLN'nin eş zamanlı enjeksiyonu ile etkinin daha net görüldüğü ve BNS içinde bulunan diğer lipitler ve pozitif yüklü proteinler ile negatif yüklü KLN ve Nap'ın elektrostatik etkileşimlerinin daha çok olması sebebiyle DPPC tekli tabakasına göre daha güçlü bir etki olduğu görülmüştür.

Yapılan tez çalışması sonucunda, genellikle oral kullanımı yaygın olduğu bilinen Cipro, Dip ve Nap ilaç aktif maddelerinin pulmoner uygulama ile

vücuda alınması sonucu alveollere gelmesiyle akciğer yüzey aktif maddesinin fonksiyonel yapısını değiştirmediğini, yani bu ilaçların pulmoner yolla alımının uygun olduğu görülmüştür. Böylece akciğerlerin sadece akciğer hastalıklarının tedavisinde değil, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasının uygun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu ilaçların sadece çözelti olarak değil partikül ile de verilmesinin mümkün olduğu bilindiğinden, çalışmada incelenen lipit bazlı biyouyumlu katı nanopartikül ile verilmesi durumunda akciğer yüzey aktif maddesinin sadece elastikiyetini bir miktar azalttığı ancak ilaç ile beraber bunun ihmal edilebilir bir boyutta olduğu söylenebilmektedir. Bu durumda katı lipit nanopartiküllerin de ilaç taşıyıcı sistemler olarak pulmoner uygulamada kullanılmasının gelecek vaat eden bir yöntem olduğu ileri sürülebilmektedir.

5. SONUÇLAR

Tez çalışmasında, günümüzde en çok kullanılan ilaç alım yolu olan oral yolla ilaç alımının birçok dezavantaja sahip olması sebebiyle inhalasyon yolu ile ilaç alımının önemi üzerine durulmuştur. İnhalasyon yolu ile alınan ilaçların akciğerlere gelmesi ile akciğerlerin geniş yüzey alanı ve sürekli hava ile temas etmesi sebebiyle avantajlarının çok olması ve biyoyararlanımı arttırdığı üzerinde durulmaktadır. Bu kapsamda, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ve farklı özelliklere sahip ilaçların inhalasyon yolu ile alveollere gelmesi sonrasında alveol yüzeyinde bulunan akciğer yüzey aktif maddesi ile etkileşimleri incelenmiştir. Bulunan sonuçlar;

- Vücut koşullarında zivitteriyonik, hidrofilik özelliklere sahip, geniş spektrumlu antibiyotik olan Cipro etken maddesinin alveollere geldiğinde akciğer yüzey aktif maddesine etkisi incelenmiştir. LB trough ile elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinden Cipro eklenmesiyle izotermin çok değişmediği, döngülerden elde edilen ara yüzeydeki madde kaybı hesabından artan Cipro miktarıyla kaybın azaldığı, elastisiteden ise Cipro eklenmesiyle oluşan elastisite değişmediği, FM görüntülerinden yüzeyin akışkanlaşmasının arttığı, artık Gibbs serbest enerjisinden ilaç-sürfaktan arasında itme etkileşimi olduğu görülmüştür.
- Vücut koşullarında yüksüz, hidrofobik özelliklere sahip, kalp ilacı olan Dip etken maddesinin alveollere geldiğinde akciğer yüzey aktif maddesine etkisi incelenmiştir. LB trough ile elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinden Dip eklenmesiyle izotermin değişmediği, döngülerden elde edilen ara yüzeydeki madde kaybı hesabından artan Dip miktarıyla kaybın çok değişmediği, elastisiteden ise Dip eklenmesiyle oluşan elastisite değişmediği sonucuna varılmıştır. FM görüntülerinden yüzeyin akışkanlaşmasının arttığı, artık Gibbs serbest enerji değerlerinden

ise ilaç-sürfaktan arasında itme etkileşimi olduğu ancak bu etkileşimin çok az olduğu görülmüştür.

- Vücut koşullarında aniyonik, hidrofobik özelliklere sahip, anti-inflamatuvar olan Nap etken maddesinin alveollere geldiğinde akciğer yüzey aktif maddesine etkisi incelenmiştir. LB trough ile elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinden Nap eklenmesiyle kaybın biraz artarak izotermin sola kaydığı, döngülerden elde edilen ara yüzeydeki madde kaybı hesabından artan Nap miktarıyla kaybın azaldığı, elastisiteden ise Nap eklenmesiyle oluşan elastisite değişmediği sonucuna varılmıştır. FM görüntülerinden yüzeyin akışkanlaşmasının arttığı, artık Gibbs serbest enerji değerlerinden ise ilaç-sürfaktan arasında itme etkileşimi olduğu görülmüştür.

Oral olarak alımının yaygın olduğu bu üç ilacın da pulmoner dağıtımda kullanılmasının uygun olduğu görülmüştür. Böylece akciğerlerin sadece akciğer hastalıklarının tedavisinde değil, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasının uygun olduğu gösterilmiştir.

İlaç çözeltilerinin alveollere ulaşarak ne gibi etkiler yarattığını inceledikten sonra, bu ilaçların taşıyıcı bir sistemle de akciğerlerden verilebileceği ve alveollere gelen taşıyıcı partikülün etkisinin de incelenmesi gerektiği için çalışma kapsamında biyouyumluluğu ve stabilitesi yüksek lipit bazlı nanopartikül ile model sürfaktan tekli tabakalarının etkileşimleri de incelenmiştir. Ayrıca model olarak seçilen Nap etken maddesi yüklü KLN'lerin ilaç salım profilleri incelenerek ilaç yüklü KLN'nin alveollere gelmesi sonrası oluşacak değişimler de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar;

- Karakterizasyonu yapılan negatif yüklü lipit bazlı KLN'nin inhalasyon yolu ile alınması sonucu alveollere gelebildiği partikül boyutundan anlaşılmaktadır. LB trough ile elde edilen yüzey basıncı-alan izotermlerinden KLN eklenmesiyle izotermin sağa kaydığı ve 45 mN/m yüzey basıncında 'kink' meydana getirdiği, döngülerden elde edilen ara yüzeydeki madde kaybı hesabından

artan KLN miktarıyla kaybın bir miktar arttığı, elastisiteden ise KLN eklenmesiyle oluşan elastisitenin 'kink' bölgesinde azaldığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca elde edilen FM görüntülerinden yüzeyin akışkanlaşmasının arttığı görülmektedir. Askıda damla yöntemi ile ulaşılan sonuçlara bakılarak sürfaktan tekli tabakasının reolojik cevabının doğrusallığını bozmadığı söylenebilmektedir.

- Son yıllarda kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda anti-inflamatuvar ilaçların kullanımının artması nedeniyle nanopartiküllere yüklemek için Nap etken maddesi seçilmiş ve salımlar vücut koşulları ile uyumlu pH 7.4 PBS içinde yapılmıştır. Bu koşullarda Nap yüklenmesiyle yük ve boyut özelliklerinin değişmediği görülen Nap yüklü KLN'nin %95 kapsüllenme verimine sahip olduğu ve 24 saatte yaklaşık %25 Nap salım yüzdesine ulaştığı görülmüştür.
- Nap yüklü KLN'den Nap salımı sonuçlarından elde edilen değerler göz önüne alınarak yapılan LB trough deneylerinden yüzey basıncı-alan izotermlerinden eş zamanlı KLN ve Nap'ın eklenmesiyle ikisinin de etkilerinin görüldüğü sonucu elde edilmiştir.

Bu durumda katı lipit nanopartiküllerin de ilaç taşıyıcı sistemler olarak pulmoner uygulamada kullanılmasının gelecek vaat eden bir yöntem olduğu ileri sürülebilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Veldhuizen, E.J.A., Haagsman, H.P., Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and Dynamics, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467, 255-270, **2000**.

[2] Goerke, J., Pulmonary surfactant functions and molecular composition, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408, 79-89, **1998**.

[3] Creuwels, L.A.J.M., Golde, L.M.G. van, Haagsman, H.P., The Pulmonary Surfactant System: Biochemical and Clinical Aspects, *Lung*, 175, 1-39, **1997**.

[4] Ochs, M., et al., The number of alveoli in the human lung, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(1), 120-4, **2004**.

[5] Pinheiro, M., Silva, A.S., Pisco, S., Reis, S., Interactions of isoniazid with membrane models: Implications for drug mechanism of action, *Chemistry and Physics of Lipids*, 183, 184-190, **2014**.

[6] Backer, L.D., Cerrada, A., Perez-Gil, J., Smedt, S.C.D., Raemdonck, K., Bio-inspired materials in drug delivery: Exploring the role of pulmonary surfactant in siRNA inhalation therapy, *Journal of Controlled Release*, 220, 642-650, **2015**.

[7] McCabe, A.J., Duncan, T.W., Holm, B.A. and Glick, P.L., Surfactant – A review for pediatric surgeons, *Journal of Pediatric Surgery*, 35, 1687 – 1700, **2000**.

[8] Butt, H.J., Kappl M., Surface and Interfacial Forces, *Wiley–VCH*, **2010**.

[9] Tadros, F.T., Applied Surfactants, *Wiley–VCH*, *Weinheim*, 634, **2005**.

[10] Zhaoa, J., Dai, C., Dinga, Q., Dua, M., Fengb, H., Weib, Z., Chen, A., Zhao, M., The structure effect on the surface and interfacial properties of zwitterionic sulfobetaine surfactants for enhanced oil recovery, *RSC Advance*, 5, 13993-14001, **2015**.

[11] Chakraborty, M., Kotecha, S., Pulmonary surfactant in newborn infants and children, *Breathe*, 9, 476-488, **2013**.

[12] Yu, S., Harding, P.G., Smith, N., Possmayer, F., Bovine pulmonary surfactant: Chemical composition and physical properties, *Lipids*, 18, 522-529, **1983**.

[13] Holm, B.A., Wang, Z., Egan, E.A., Notter, R.H., Content of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine in Lung Surfactant: Ramifications for Surface Activity, *The Journal Of Pediatric Research*, 39, 805-811, **1996**.

[14] Frey, S.L., Chi, E.Y., Arratia, C., Majewski, J., Kjaer, K., Lee, K.Y.C., Condensing and Fluidizing Effects of Ganglioside GM1 on Phospholipid Films, *Biopyhsical Journal*, 94(8), 3047–3064, **2008**.

[15] Goerke, J., Gonzales, J., Temperature dependence of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayer stability, *Journal of Applied Physiology*, 51, 1108-1114, **1981**.

[16] Blanco, O. and Perez-Gil, J., Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant, *European Journal of Pharmacology*, 568, 1–15, **2007**.

[17] Perez-Gil, J., Casals, C., Marsh, D., Interactions of Hydrophobic Lung Surfactant Proteins SP-B and SP-C with Dipalmitoylphosphatidylcholine and Dipalmitoylphosphatidylglycerol Bilayers Studied by Electron Spin Resonance Spectroscopy, *Biochemistry*, 34, 3964-3971, **1995**.

[18] Haagsman, H.P., Diemel R.V., Surfactant-associated proteins: functions and structural variation, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129, 91 – 108, **2001**.

[19] Baoukina, S., Tieleman, D.P., Computer simulations of lung surfactant, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858, 2431–2440, **2016**.

[20] Kingma, P.S. and Whitsett, J.A., In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D, *Current Opinion in Pharmacology*, 6, 277–283, **2006**.

[21] Hawgood, S., Benson, B.J., Schilling, J., Damm, D., Clements, J.A., White,R.T., Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28–36 in surfactant lipid adsorption, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 84, 66–70, **1987**.

[22] Persson, A., Chang, D., Rust, K., Moxley, M., Longmore, W., Crouch, E.C., Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D),a collagenous surfactant-associated protein, *Biochemistry*, 28, 6361–6367, **1989**.

[23] Johansson, J., Curstedt, T., Jornvall, H., Surfactant Protein-B - Disulfide Bridges, Structural-Properties, And Kringle Similarities, *Biochemistry*, 30, 691 7-6921, **1991**.

[24] Ding, J., Takamoto, D.Y., von Nahmen, A., Lipp, M.M., Lee, K.Y., Waring, A.J., Zasadzinski, J.A., Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability, *Biophysical Journal*, 80(5), 2262-72, **2001**.

[25] Perez-Gil, J., Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid–protein interactions, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7-8), 1676-1695, **2008**.

[26] Perez – Gil, J., Serrano, A.G., Protein – lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system, *Chemistry and Physics of Lipids*, 141, 105– 118, **2006**.

[27] Banerjee, B., Bellare, J.R., Scoring of surface parameters of physiological relevance to surfactant therapy in Respiratory Distress Syndrome, *Journal of Applied Physiology*, 90, 1447 – 1454, **2001**.

[28] Bose, T., Latawiec, D., Mondal, P.P., Mandal, S., Overview of nano-drugs characteristics for clinical application: The journey from the entry to the exit point, *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 2527, **2014**.

[29] Wüstneck, R., Perez – Gil, J., Wüstneck, N., Cruz, A., Fainerman, V.B., Pison, U., Interfacial properties of pulmonary surfactant layers, *Advances in Colloid and Interface Science*, 117, 33 – 58, **2005**.

[30] Zuo, Y.Y., Veldhuizen, R.A.W., Neumann, A.W., Petersen, N.O., Possmayer, F., Current perspectives in pulmonary surfactant – inhibition, enhancement and evaluation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, **2008**.

[31] Stoner, C.L., Cleton, A., Johnson, K., Oh, D.M., Hallak, H., Brodfuehrer, J., Surendran, N., Han, H.K., Integrated oral bioavailability projection using in vitro screening data as a selection tool in drug discovery, *International Journal of Pharmaceutics*, 269, 241-249, **2004**.

[32] Dressman JB, Thelen K, Jantratid E. Towards quantitative prediction of oral drug absorption, *Clinical Pharmacokinetics*, 47, 655-667, **2008**.

[33] Graff LC, Pollock GM. Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, 1187-1195, **2005**.

[34] Leonard AK, Sileno AP, Brandt GC, Foerder CA, Quay SC, Costantino HR. In vitro formulation optimization of intranasal galantamine leading to enhanced bioavailability and reduced emetic response in vivo, *International Journal of Pharmaceutics*, 335, 138-146, **2007**.

[35] Illum L., Nasal drug delivery: possibilities, problems and solutions, *Journal of Controlled Release*, 87, 187-198, **2003**.

[36] Altube, M.J., Cutro, A., Bakas, L., Morilla, M.J., Disalvo, E.A., Romero, E.L., Nebulizing novel multifunctional nanovesicles: the impact of macrophage-targeted-pH-sensitive archaeosomes on pulmonary surfactant, *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 8083-8095, **2017**.

[37] Weber, S., Zimmer, A., Pardeike, J., Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(1), 7-22, **2014**.

[38] W. Yang, W., Peters, J.I., Williams, R.O., III,Inhaled nanoparticles – a current review, *International Journal of Pharmaceutics*, 356, 239-247, **2008**.

[39] Beck-Broichsitter, M., Schmehl, T., Seeger, W., Gessler, T., Evaluating the controlled release properties of inhaled nanoparticles using isolated, perfused, and ventilated lung models, *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1-16, **2011**.

[40] Goldberg, M., Gomez-Orellana, I., Challenges for the oral delivery of macromolecules, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 289–295, **2003**.

[41] McMartin, C., Hutchinson, L.E.F., Hyde, R., Peters, G.E., Analysis of Structural Requirements for the Absorption of Drugs and Macromolecules from the Nasal Cavity, *Journal of Pharmaceutical Sciences-Us*, 76, 535–540, **1987**.

[42] Ramesan, R.M., Sharma, C.P., Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery, *Expert Review of Medical Devices*, 6, 665–676, **2009**.

[43] Hussain, A., Arnold, J.J., Khan, M.A., Ahsan, F., Absorption enhancers in pulmonary protein delivery, *Journal of Controlled Release*, 94, 15–24, **2004**.

[44] Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D.M., Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clinical Cancer Research*, 14(5) March 1, **2008**.

[45] Conniot, J., Silva, J.M., Fernandes, J.G., Silva, L.C., Gaspar, R., Brocchini, S., Florindo, H.F., Barata, T.S., Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking, *Frontiers in Chemistry 2*, 105, **2014**.

[46] Uchechi, O., Ogbonna, J.D.N., Attama, A.A., Chapter 6 from the book Application of Nanotechnology in Drug Delivery, *Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery*, 193-223, **2014**.

[47] Alaqad, K., Saleh, T.A., Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6(4), **2016**.

[48] Kalele, S., Gosavi, S.W., Urban, J., Kulkarni, S.K., Nanoshell particles: synthesis, properties and applications, *Current Science*, 91(8), 1038-1052, **2006**.

[49] Cai, W., Shin, D.W., Chen, K., Gheysens, O., Cao, Q., Wang, S.X., Gambhir, S.S., Chen, X., Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects, *Nano Letters*, 6(4), 669–676, **2006**.

[50] Pilcer, G., Amighi, K., Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 392, 1-19, **2010**.

[51] Xing, X., Feng, J., Lv, G., Xu, B., Adsorption Mechanism of Ciprofloxacin from Water by Synthesized Birnessite, *Advances in Materials Science and Engineering*, 11, 1-7, **2015**.

[52] Bensikaddour, H., Fa, N., Burton, I., Deleu, M., Lins, L., Schanck, A., Brasseur, R., Dufrene, Y.F., Goormaghtigh, E., Mingeot-Leclercq, M.P., Characterization of the Interactions between Fluoroquinolone Antibiotics and Lipids: a Multitechnique Approach, *Biophysical Journal*, 94, 3035-3046, **2008**.

[53] Adikwu, E., Brambaifa, N., Cıprofloxacın Induced Chondrotoxicity And Tendinopathy, *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 7 (3), 94-100, **2012**.

[54] Avisar, D., Lester, Y., Mamane, H., pH induced polychromatic UV treatment for the removal of a mixture of SMX,OTC and CIP from water, *Journal of Hazardous Materials*, 175, 1068–1074, **2010**.

[55] Rao, K.T., Rao, L.V., A Validated Stability-Indicating UHPLC Method for Determination of Naproxen and Its Related Compounds in Bulk Drug Samples, *American Journal of Analytical Chemistry*, 4(6), 7, **2013**.

[56] Shivhare, P., Rai, N., Rangrej, J.M., Lariya, S.K., Formulation and Characterization of Naproxen Containing Niosomes: A Research, *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research Human*, 4(1), 252-269, **2015**.

[57] Kopec, W., Telenius, J., Khandelia, H., Molecular dynamics simulations of the interactions of medicinal plant extracts and drugs with lipid bilayer membranes, *FEBS Journal*, 280, 2785–2805, **2013**.

[58] Vanessa Azevedo de Mello e Eduardo Ricci-Júnior, Encapsulatıon Of Naproxen In Nanostructured System: Structural Characterızatıon And In Vıtro Release Studıes, *Quimica Nova*, 34(6), 933-939, **2011**.

[59] Lichtenberger, L.M., Zhou, Y., Jayaraman, V., Doyen,J.R., O'Neil, J.G., Dial, E.J., Volk, D.E., Gorenstein, D.G., Boggara, M.B., Krishnamoorti, R., Insight into NSAID-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: Characterization of interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 994–1002, **2012**.

[60] Nepomuceno, M.F., Mamede, M.E.O., Macedo, D.V., Alves, A.A., Silva, L.P., Tabak, M., Antioxidant effect of dipyridamole and its derivative RA-25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1418(2), 285-294, **1999**.

[61] Fitzgerald, G.A., Dipyridamole, *New England Journal of Medicine*, 316, 1247, **1987**.

[62] Iuliano, L., Violi, F., Ghiselli, A., Alessandri, C., Balsano, D., Reaction of dipyridamole with the hydroxyl radical, *Lipids*, 27(5), 349-353, **1992**.

[63] Zhou, R., Moench, P., Heran, C., Lu, X., Mathias, N., Faria, T.N., Wall, D.A., Hussain, M.A., Smith, R.L., Sun, D., pH-Dependent Dissolution in Vitro and Absorption in Vivo of Weakly Basic Drugs: Development of a Canine Model, *Pharmaceutical Research*, 22(2), **2005**.

[64] Gzyl, B. and Paluch, M., Mixed Monolayers of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine and Ethyl Palmitate at the Air/Water Interface, *Applied Surface Science*, 246, 356-361, **2005**.

[65] Nakamura, S., Nakahara, H., Krafft, M.P., Shibata, O., Two-Component Langmuir Monolayers of Single-Chain Partially Fluorinated Amphiphiles with Dipalmitoylphosphatidylcholine, *Langmuir*, 23, 12634-12644, **2007**.

[66] Kuo, R.R., Chang, C.H., Yang, Y.M., Maa, J.R., Induced removal of dipalmitoyl phosphatidylcholine by the exclusion of fibrinogen from compressed monolayers at air/liquid interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 257, 108–115, **2003**.

[67] Hannisdal, A., Orr, R., Sj blom, J., Viscoelastic Properties of Crude Oil Components at Oil-Water Interfaces. 1. The Effect of Dilution, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28, 81-93, **2007**.

[68] Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M., Ravera, F., Effect of Hydrophilic and Hydrophobic Nanoparticles on the Surface Pressure Response of DPPC Monolayers, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115, 21715–21722, **2011**.

[69] Guzmán, E., Liggieri, L., Santini, E., Ferrari, M., Ravera, F., DPPC–DOPC Langmuir monolayers modified by hydrophilic silica nanoparticles:Phase behaviour, structure and rheology, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 413, 174–183, **2012**.

[70] Guzmán, E., Santini, E., Ferrari, M., Liggieri, L., Ravera, F., Interfacial Properties of Mixed DPPC−Hydrophobic Fumed Silica Nanoparticle Layers, *The Journal of Physical Chemistry C*, 119, 21024-21034, **2015**.

[71] Farnoud, A.M., Fiegel, J., Low concentrations of negatively charged sub-micron particles alter the microstructure of DPPC at the air–water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 415, 320-327, **2012**.

[72] Harishchandra, R. K., Saleem, M., & Galla, H., Nanoparticle interaction with model lung surfactant monolayers, *Journal of The Royal Society Interface*, 7(Suppl_1), **2009**.

[73] Tatur, S., & Badia, A., Influence of Hydrophobic Alkylated Gold Nanoparticles on the Phase Behavior of Monolayers of DPPC and Clinical Lung Surfactant, *Langmuir*, 28(1), 628-639, **2011**.

[74] Zhang, J., Wu, L., Chan, H., & Watanabe, W., Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 441-455, **2011**.

[75] Dickinson, P. A., Howells, S. W., & Kellaway, I. W., Novel Nanoparticles for Pulmonary Drug Administration, *Journal of Drug Targeting*, 9(4), 295-302, **2001**.

[76] Moazeni, E., Gilani, K., Sotoudegan, F., Pardakhty, A., Najafabadi, A.R., Ghalandari, R., Fazeli, M.R., Jamalifar, H., Formulation and in vitro evaluation of ciprofloxacin containing niosomes for pulmonary delivery, *Journal of Microencapsulation*, 27, 7, 618–627, **2010**.

[77] Cayli, Y. A., Sahin, S., Buttini, F., Balducci, A. G., Montanari, S., Vural, I., & Oner, L., Dry powders for the inhalation of ciprofloxacin or levofloxacin combined with a mucolytic agent for cystic fibrosis patients, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(8), 1378-1389, **2017**.

[78] Conley J, Yang H, Wilson T, Blasetti K, Ninno VD, Schnell G. Aerosol delivery of liposome-encapsulated ciprofloxacin: Aerosol characterization and efficacy against Francisella tularensis infection in mice, *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 1288–99, **1997.**

[79] Wong, J. P., Yang, H., Blasetti, K. L., Schnell, G., Conley, J., & Schofield, L. N., Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular Francisella tularensis infection, *Journal of Controlled Release*, 92(3), 265-273, **2003**.

[80] Caetano, W., Ferreira, M., Tabak, M., Sanchez, M.I.M, Oliveir Jr., O.N., Krüger, P., Schalke, M., Lösche, M., Cooperativity of phospholipid reorganization upon interaction of dipyridamole with surface monolayers on water, *Biophysical Chemistry*, 91(1), 21-35, **2001**.

[81] Haas, H., Caetano, W., Borissevitch, G., Tabak, M., Sanchez, M. M., Oliveira, O., … Goldmann, M. (2001). Interaction of dipyridamole with phospholipid monolayers at the air–water interface: Surface pressure and grazing incidence X-ray diffraction studies, *Chemical Physics Letters*, 335(5-6), 510-516, **2001**.

[82] Zhang, H., Fan, Q., Wang, Y.E., Neal, C.R., Zuo, Y.Y., Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy, *Biochim Biophys Acta*, 1808(7), 1832-42, **2011**.

[83] Montero, M.T., Hernandez-Borrell, J., Borrell, J., Keough, K.M.W., Fluoroquinolone-Biomembrane Interactions: Monolayer and Calorimetric Studies, *Langmuir*, 14, 2451-2454, **1998**.

[84] Yang, L., Qin, X., Jiang, X., Gong, M., Yin, D., Zhang, Y., & Zhao, B., SERS investigation of ciprofloxacin drug molecules on TiO2 nanoparticles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(27), 17809-17815, **2015**.

[85] Kang, N., Policova, Z., Bankian, G., Hair, M.L., Zuo, Y.Y., Neumann, A.W., Acosta, E.J., Interaction between chitosan and bovine lung extract surfactants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 291–302, **2008**.

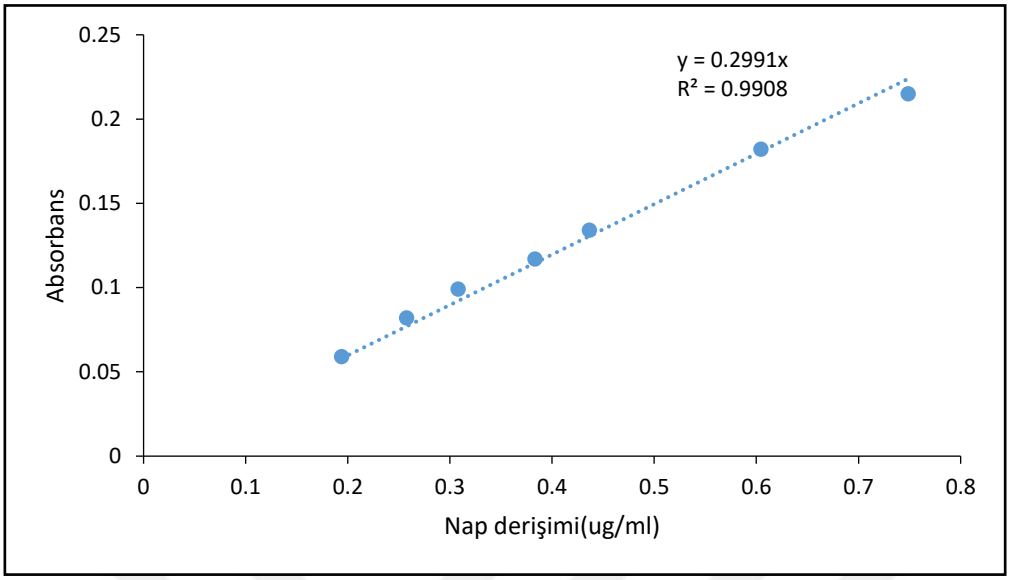
[86] Kodama, A.T., Kuo, C.C., Boatwright, T., Dennin, M., Investigating the Effect of Particle Size on Pulmonary Surfactant Phase Behavior, *Biophysical Journal*, 107, 1573–1581, **2014**.

[87] Dwivedi, M., Harishchandra, R., Koshkina, O., Maskos, M., & Galla, H., Size Influences the Effect of Hydrophobic Nanoparticles on Lung Surfactant Model Systems, *Biophysical Journal*, 106(1), 289-298, **2014**.

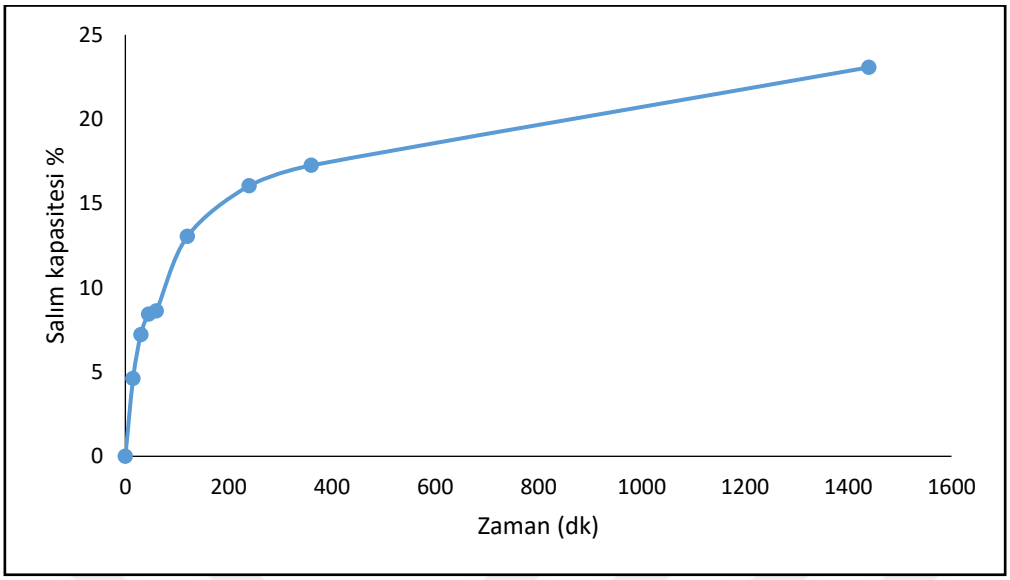
[88] Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Rostamkalaei, S.S., Asadi, M., Asare-Addo, K., Nokhodchi, A., The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 145, 626-633, **2016**.

[89] Aydogan, N., Uslu, B., Tanaci, H., Biophysical investigation of the interfacial properties of cationic fluorocarbon/ hydrocarbon hybrid surfactant: Mimicking the lung surfactant protein C, *Journal of Colloid and Interface Science*, 360, 163–174, **2011**.

EK 1: Naproksen analizi için UV-vis kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği



EK 2: Naproksen yüklü KLN'den ilaç salım grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Merve Gökdemir

Doğum Yeri : Isparta

Medeni Hali : Bekar

E-posta : mervegkdmr33@gmail.com

Adresi : Yukarıyurtçu mah. 4438. Cad. Toki 358 Konut Sitesi B-1 Blok No:10K İç Kapı No:3 ETİMESGUT/ANKARA

Eğitim

Lisans : 2009-2014, Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

Yüksek Lisans : 2015-2018 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi derecede

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

Lipit bazlı nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu (optik ve floresan mikroskop, dinamik-statik ışık saçılımı, UV-vis, LB trough, AFM)
Sürfaktan ile ilaç ve nanopartikül etkileşimlerinin incelenmesi
Nanopartiküllerden ilaç alım/salımı

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Poster sunumu; 'Investigation on the Interactions of Drug molecules with the Pulmonary Surfactant' BIOMED 2017

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 05/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Çeşitli Hastalıkların Tedavisinde Kullanılan İlaçların ve İlaç Yüklü Taşıyıcıların Alveoller ve Akciğer Yüzey Aktif Maddesi ile Olası Etkileşiminin İncelenmesi
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 147 sayfalık kısmına ilişkin, 16/05/2018 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:
1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

05/06/2018

Adı Soyadı: Merve Gökdemir
Öğrenci No: N14223878
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği
Programı: Yüksek Lisans
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Nihal Aydoğan
(Unvan, Ad Soyad, İmza)