MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WHEY PROTEIN/E VİTAMİNİ İLE KAPLANAN WHEY PROTEIN/PVA NANOFİBER İSKELENİN KAS ERİMESİ TEDAVİSİNDEKİ POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

KUDRET İREM DENİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

EŞ-DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Songül ULAĞ

İSTANBUL, 2022

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

WHEY PROTEIN/E VİTAMİNİ İLE KAPLANAN WHEY PROTEIN/PVA NANOFİBER İSKELENİN KAS ERİMESİ TEDAVİSİNDEKİ POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

KUDRET İREM DENİZ
533320008

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı
Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Oğuzhan GÜNDÜZ

EŞ-DANIŞMAN
Dr. Öğr.Üyesi Songül ULAĞ

İSTANBUL, 2022

TEŞEKKÜR

"Whey Protein/E vitamini ile kaplanan Whey Protein/PVA nanofiber iskelenin kas erimesi tedavisindeki potansiyelinin incelenmesi" isimli tezimi yazarken her türlü yol gösterici olan, her zaman beraber çalışmaktan gurur duyduğum başta sayın Prof. Dr. Oğuzhan Gündüz'e ve her zaman beni cesaretlendiren, bilgi ve birikimi ile her türlü yardımını benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk duyduğum sayın Dr. Öğr. Üyesi Songül Ulağ'a sonsuz teşekkürü minnet borcu bilirim.

Bilgi ve birikimi ile sorunlarıma farklı yönden bakmamı sağlayan ve manevi desteğini hep yanımda hisettiğim Dr.Semra Ünal'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tezin yazılma sürecinde yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini bir an bile eksik etmeyen biricik anne, babama, kardeşlerime ve bu süreçte her türlü destekleriyle yanımda olan değerli arkadaşlarım Hatice Karabulut, Elif Osmanoğlu ve Zehra Nur Mutlu'ya çok teşekkür ederim.

FYL-2021-10378 kodlu tez çalışmama verdiği maddi destekten dolayı Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ekim 2022 **Kudret İrem DENİZ**

İÇİNDEKİLER

SAYFA

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iv
ABSTRACT v
SEMBOL LİSTESİ vi
KISALTMALAR viii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ x
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
1.1. Yaşlılığa Bağlı Hastalıklar 2
1.1.1. Sarkopeni ve tedavisi 4
1.2. Proteinler 5
1.2.1. Whey protein 6
1.3. Vitaminler 7
1.3.1. E vitamini 8
1.4. Polimerler 9
1.4.1. PVA 10
1.5. Nanofiber 10
1.5.1. Elektro-eğirme 12
1.6. Enkapsülasyon 14
1.6.1. Elektro-püskürtme 15
2. AMAÇ VE YÖNTEM 18
2.1. Malzemeler 18
2.1.1. Polivinil alkol (PVA) 18
2.1.2. Whey protein 18
2.1.3. Tween 80 19
2.1.4. E vitamini 19
2.1.5. Glutaraldehit (GA) (%50) solüsyonu 19
2.2. Kullanılan Cihazlar 20

2.3. Deney Aşamaları 21
2.3.1. Solüsyonların hazırlanması 21
2.3.1.1. Nanofiber üretimi için solüsyon hazırlanması 21
2.3.1.2. Kapsülasyon ve kaplama işlemi için solüsyon hazırlanması 22
2.3.2. Elektro-eğirme yöntemi ile nanofiber üretimi 22
2.3.3. İskele yapılarının çapraz bağlanması 23
2.3.4. Elektro-püskürtme yöntemi ile iskelelerin kaplama yapılması 24
2.3.5. Solüsyonların ve iskele yapılarının karakterize edilmesi 25
2.3.5.1. İskele yapılarının morfolojik analizi 25
2.3.5.2. Solüsyonların fiziksel karakterizasyonu 27
2.3.5.3. İskele yapılarının kimyasal analizi 28
2.3.5.4. İskele yapılarının termal özelliğinin analiz edilmesi 30
2.3.5.5. İskele yapılarının mekanik özelliklerinin incelenmesi 30
2.3.6. İlaç salımı 31
2.3.7. Şişme testi 31
2.3.8. Hücre kültürü analizi 32
2.3.8.1. Hücre kültürü analizi 32
2.3.8.2. Hücre kültürü 32
2.3.8.3. MTT testi 33

3. BULGULAR Ve TARTIŞMA 34
3.1. İskele Yapılarının Morfolojik Analizi 34
3.2. Solüsyonların Karakterize Edilmesi 38
3.3. İskelelerin Kimyasal Özellikleri 39
3.4. İskelelerin Termal Özellikleri 41
3.5. İskelelerin Mekanik Özellikleri 43
3.6. İskelelerin Şişme Davranışları 44
3.7. İskelelerde İlaç Salımı 46
3.8. Hücre Analizi Testi 48

4. SONUÇLAR 51
KAYNAKÇA 52
ÖZGEÇMİŞ 57

ÖZET

WHEY PROTEIN/E VİTAMİNİ İLE KAPLANAN WHEY PROTEIN/PVA NANOFİBER İSKELENİN KAS ERİMESİ TEDAVİSİNDEKİ POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Dünya nüfusu giderek yaşlanmaktadır bu da beraberinde yaşlılıkla gelen hastalıkların artmasına sebep olmaktadır. Her gün milyonlarca birey yaşlılığa adım adım yaklaşırken bu hastalılara karşı tedavi yöntemlerimizi geliştirmeliyiz. Çoğu yaşlılık hastalıklarının ve bu rahatsızlıkların yan etkilerinin bilindik bir tedavileri yoktur. Onlardan biri de Sarkopeni ya da halk arasındaki ismiyle yaşlılığa bağlı kas erimesi rahatsızlığıdır. Bu rahatsızlığın tedavisi yoktur ancak kas doku kaybını azaltmak için doktorlar fiziksel aktiviteyi ve günlük protein, antioksidan ve vitamin almayı önerirler. Whey proteini, gıda sektöründe çok önemli yan ürünlerden birisidir. Whey protein düzenli kullanımda, vücuttaki kas miktarını artırmak ya da kas güçlendirmek gibi etkileri olduğu araştırmalarla kanıtlanmıştır. Aynı zamanda çok önemli bir antioksidan olan E vitamininde son zamanlarda kas çalışmalarında kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışmamızda, sarkopeni rahatsızlığına alternatif tedavi olması için kas doku oluşumuna katkı sağlayabilecek iskele üretiminin yapılması amaçlanmıştır. PVA ve Whey proteinden elektroeğirme sistemi ile elde edilen nanofibeler daha sonra E vitaminin, whey protein ile enkapsülasyonundan oluşan nano/mikropartiküllerle kaplanmıştır. Bu iskeleler üzerinde çeşitli deneyler yapılarak bu tedavi yöntemi için uygun olup olmadığı tartışılmıştır. Morfolojik analizleri taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal özellikleri fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile elde edilmiştir. Termal özellikleri ise differansiyal taramalı kalorimetre ile ölçülmüştür ve mekanik analiz olarak çekme dayanımı ölçülmüştür. Vücut içi ortam taklit edilerek ilaç salımı, şişme davranışı ve son olarak hücre canlılığı testi başarıyla yapılmıştır. Sonuç olarak üretilen iskelelerin, whey protein ile enkapsüle edilen E vitamini ile kaplanması çekme mukavemetini arttırmış, ilaç salımını yavaşlatmış, şişme ve hücre testlerinde kabul edilebilir sonuçlar vermiştir. Üretilen iskelelerin klinik çalışmalar için uygun olduğu testler ile kanıtlanmıştır.

Ekim 2022 **Kudret İrem DENİZ**

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF WHEY PROTEIN/VITAMIN E PARTICLESCOATED WHEY PROTEIN/PVA NANOFIBER FOR THE TREATMENT OF MUSCLE LOSS

Age of the world population is increasing with each passing day, which leads to an increase in diseases that come with aging. Aging is an inevitable phase of human life. We must improve our treatment methods against these diseases. There is no known treatment method for these diseases and their side effects. One of the these diseases is sarcopenia or other common name muscle wasting disorder due to old age. Although there is no cure, doctors recommend physical activity and daily intake of protein, antioxidants and vitamins to reduce side effects. Whey protein is one of the most important by-products in the food industry. It has been proven by research that whey protein has effects such as increasing the amount of muscle tissue or strengthening the muscles in regular use. At the same time, it has been seen that vitamin E, which is a very important antioxidant, has been used in muscle studies recently. In this study, it is aimed to produce scaffolds that can contribute to muscle tissue formation as an alternative treatment for sarcopenia. Nanofibers obtained from PVA and whey protein by electrospinning system were then coated with nano/microparticles consisting of encapsulation of vitamin E with whey protein. Various experiments have been carried out on these scaffolds and it has been discussed whether they are suitable for this treatment method. Morphological analyzes were obtained using scanning electron microscopy. Its chemical properties were obtained by Fourier transform infrared spectroscopy. Its thermal properties were measured with a differential scanning calorimeter and its tensile strength was measured as a mechanical analysis. By imitating the intrabody environment, drug release, swelling behavior and finally cell viability test were performed successfully. As a result, coating the scaffolds with vitamin E encapsulated with whey protein increased the tensile strength, slowed down the drug release, and gave acceptable results in swelling and cell tests. It has been proven by tests that the produced scaffolds are suitable for clinical studies.

October 2022 **Kudret İrem DENİZ**

SEMBOL LİSTESİ

MW **:** Moleküler ağırlık g : Gram

g/cm^3 **:** gram/hacim

µm **:** Mikrometre

mm **:** Milimetre

nm **:** Nanometre

°C **:** Santigrat derece

dk **:** Dakika

µl **:** Mikrolitre

ml **:** Mililitre

mg/ml **:** miligram/mililitre

g/ml **:** gram/mililitre

µg/ml **:** mikrogram/mililitre

CFU/ml **:** Coloni-Forming Units(Koloni oluşturan birimler)/mililitre w/v : ağırlık/hacim

v/v **:** hacim/hacim

M **:** Molar

cm **:** Santimetre

cm^2 **:** Santimetre kare

mm/dk **:** milimetre/dakika

ml/s **:** mililitre/saniye

kV **:** kilovolt

Tm **:** Erime sıcaklığı

Tg **:** Camsı geçiş sıcaklığı

MPa **:** Mega paskal N : Newton

C **:** Karbon

H **:** Hidrojen

O **:** Oksijen

CO2 **:** Karbondioksit

CH2 **:** Metilen

N **:** Azot

Ge/KBR **:** Germanyum kaplı potasyum bromür

KISALTMALAR

PVA **:** Polivinil alkol

Vit.E **:** E vitamini

WP **:** Whey Protein

GA **:** Glutaraldehit

SEM **:** Taramalı elektron mikroskobu

UV **:** Ultraviyole

FTIR **:** Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

IU **:** Internasyonel-Uluslararası Ünite

DSC **:** Diferansiyel taramalı kalorimetre

RPM **:** Dakikadaki devir sayısı

PBS **:** Fosfat tampon çözeltisi

MTT **:** ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide))

DIOC6 **:** (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür)

PI **:** Propidyum iyodür

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1. a) Genç ve Sağlıklı Kol Kası, b) Sarkopenik Kol Kası. 1
Şekil 1.2. Nanofiber Üzerini Nano/Mikro Partikl İle Kaplama İşlemi. 2
Şekil 1.3. Nanaofiberlerin Kullanım Alanları. 11
Şekil 1.4. Basit Elektrospinning Düzeneği. 13
Şekil 1.5. Taylor Cone Görünümü. 14
Şekil 1.6. Enkapsüle Edilmiş Materyal. 15
Şekil 1.7. Basit Elektropüskütme Sistemi 16
Şekil 2.1. WP Görseli. 19
Şekil 2.2. Elektro-Eğirme Cihazı. 23
Şekil 2.3. Cam Desikatör İle Çapraz Bağlama Düzeneği. 24
Şekil 2.4. Elektro-Püskürtme Cihazı. 25
Şekil 2.5. SEM Elektron Mikroskopu. 26
Şekil 2.6. SEM'de Görüntülemek İçin Numunelerin Kaplama Cihazı. 27
Şekil 2.7. Taşınabilir Elektrik İletkenlik Cihazı. 28
Şekil 2.8. Fourier Dönüşümü Kızıl Ötesi Spektrofotometre Ölçüm Cihazı. 29
Şekil 2.9. DSC Termal Ölçüm Cihazı. 30
Şekil 2.10. UV-1280 Spektrofotometre Ölçüm Cihazı. 31
Şekil 3.1. a) %13PVA, b) %13PVA/%0.5 WP, c) %13PVA/%3 WP Nanofiber Yapılarının SEM İle Elde Edilmiş Görüntüleri. 35
Şekil 3.2. Partiküllü İskelelerin SEM Görüntüsü. 37
Şekil 3.3. WP (a), Vit.E (b), PVA/WP+1.35% Vit.E (c), PVA/WP+2.7%Vit.E (d), PVA 13% (e), PVA+1.35% Vit.E (f), PVA+2.7% Vit.E (g) FT-IR Analizleri. 39
Şekil 3.4. PVA/WP+1.35% Vit.E (a), PVA/WP+2.7%Vit.E (b), PVA 13% (c), PVA+1.35% Vit.E (d), PVA+2.7% Vit.E (e) FT-IR Analizleri. 40
Şekil 3.5. Vitamin E (a) ve PVA/WP+1.35% Vit.E (b) FTIR Spektrumları. 41
Şekil 3.6. PVA/WP+%2.7 Vit.E (a), PVA/WP+%1.35 Vit.E (b), PVA/WP (c), PVA+%2.7 Vit.E (d), PVA+%1.35 Vit.E (e), PVA (f), Vit.E (g) DSC Eğrileri. 42
Şekil 3.7. PBS'de Bekletilen İskelelerin Şişme Grafikleri. 45
Şekil 3.8. İlaç Salım Grafiği 47
Şekil 3.9. Tüm İskeleler Üzerinde Test Edilen İnsan Kök Hücrelerinin Çoğalması ve Canlılığın Sonuçları. 50

TABLO LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1. Bazı Hayvansal ve Bitkisel Kaynaklı Gıdaların Esansiyel Amino Asit Miktarları. 6

Tablo 1.2. Bazı Gıda Ürünlerindeki E Vitamini Miktarı. 8

Tablo 2.1. Kullanılan Cihazlar. 20

Tablo 2.2. Nanofiber Konsantrasyonları. 21

Tablo 2.3. Nanopartikül Konsantrasyonları 22

Tablo 2.4. FT-IR Numune İSİMLERİ. 29

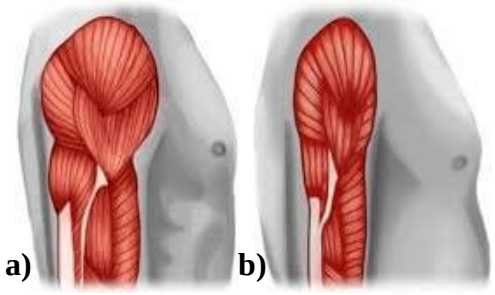
Tablo 3.1. Solüsyonların Fiziksel Özelikleri. 38

Tablo 3.2. PVA/WP, PVA/WP+1.35% Vit.E, PVA/WP+2.7%Vit.E, PVA 13%, PVA+1.35% Vit.E ve PVA+2.7% Vit.E İskelelerinin Çekme Testi Sonuçları. 43

Tablo 3.3. Hücre Analizi Numune Kodları. 48

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sarkopeni, daha iyi bilinen ismiyle yaşlanmaya bağlı kas erimesi, iskelet kas kütlesinin ve kuvvetinin kaybı ile belirlenen; fiziksel sakatlık, yaşam kalitesinin düşüklüğü ve hatta ölüm gibi olumsuz sonuçlara yol açma riski ile belirlenen bir sendrom olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.1). Sarkopeninin bilinen bir tedavisi yoktur ancak kas kütle kaybının vücuda olan etkilerini azaltmak için egzersiz ve fiziksel aktiviteler, hormon tedavileri ve beslenme tedavileri gibi yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Yaşlılarda enerji alımının azalması sağlık sorunlarına yol açabilir. Özellikle düşük vücut ağırlığına sahip kişilerde malnütrisyon ya da yetersiz beslenme sarkopenin ilerlemesinde başlıca rol oynar. Düzenli ve kaliteli beslenme ile beraber sporun, her yaşta ki birey için çok önemidir. İleri ki yaşlarda kas kütle kaybı ile beraber gelen hareketsizlik isteğinin önüne geçmek için beslenmenin ve yeterli enerji alımının önemi giderek artmakta, ve beslenmenin kalitesi kas gelişimine yardımcı olmaktadır. Protein, vitamin ve mineraller sarkopeni tedavisine katkı sağlayabilir.



Şekil 1.1. a) Genç ve Sağlıklı Kol Kası, b) Sarkopenik Kol Kası.

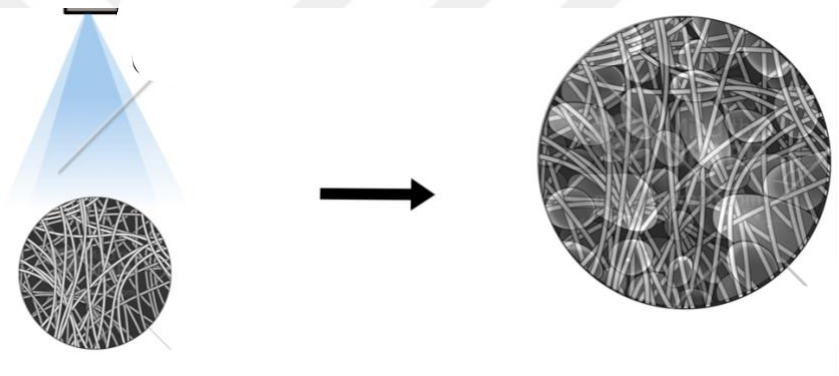
* "Frailty and sarcopenia: the potential role of an aged immune system" isismli makaleden alınmıştır.

Son yıllarda, sarkopeniyi ya da etkilerini azaltmak için birçok çalışma yapılmıştır. Protein ile yapılmış epidemiyolojik çalışmalarda, protein alımı ile kas kütlesinin korunması arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir [1]. Aynı şekilde, yapılan bir çalışmada ise, sarkopeni tedavisinde antioksidanların (selenyum, E vitamini ve C vitamini) ek besin olarak kullanılması tavsiye edilmiştir [2]. Günlük yaşamımızda da insanların spor aktivitelerinde, kas kütlesini arttırmak için genellikle peynir altı suyundan (WP) elde

edilmiş protein tozunu diyetlerine ekledikleri ve bu şekilde protein tozunun kas kütlelerini arttırdıklarını gözlemleyebiliriz.

WP'nin, uzun süre iskelet kası yaşlanmasını iyileştirmede etkili bir besin takviyesi olduğu kabul edilir. WP, peynir üretim sürecinin değerli yan ürünüdür. WP, yüksek besin ve biyolojik değerleri nedeniyle gıda ve sağlık endüstrilerinde çeşitli kullanımları vardır. E vitamini (Vit.E), insanlar için temel yağda çözünen bir mikro besindir. Vit.E eksikliği insanlarda kas gücü kaybı ve kas zayıflığı ile ilişkilidir. Ayrıca çalışmalar vit.E'nin iskelet kasını iyileştirmek için hayati bir rol oynadığını doğrulamıştır [3].

Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak, sarkopeni hastalığına ya da kas üzerindeki etkilerini azaltmak için alternatif bir tedavi yöntemi üretmek amaçlanmıştır. Şekil 1.2'deki gibi WP ve E vitamini yüklenen nano/mikropartikül ile kaplanan nanofiber iskelesi üzerine testler uygulayarak ve hücre analizi yapılarak incelemeler yapılmıştır.



Şekil 1.2. Nanofiber Üzerini Nano/Mikro Partikl İle Kaplama İşlemi.

WP kullanılarak yapılan spreyle kurutulmuş nanokapsüller suda çözünür. Bu nedenle uzun süreli kontrollü salım çalışmaları için uygun değildirler. Bu çalışmada ilk adım olarak PVA ve WP ile elektroeğirme yöntemi ile nanofiber elde edilecek. İkinci adım olarak ise üretilen nanofiber iskeleleri, elektro-püskürtme yöntemi ile WP tarafından enkapsüle edilen Vit.E nano/mikro partikülleri ile kaplanacak ve vücut içinde WP ve Vit.E'nin vücutta kontrollü salınım ve yavaş bozunma sağlaması amaçlanmıştır.

1.1. Yaşlılığa Bağlı Hastalıklar

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaşlı nüfusu giderek artmaktadır. Buna bağlı olarak, yaşlılık beraberinde gelen hastalıklar da aynı oranda artmaktadır. Son yıllarda gerçekleşen bu artış tıpın gelişmesiyle tıpta bu konuyla ilgili ayrı bir disiplin gelişmesine

sebep olmuştur. Bu yeni disiplin "Geriatri" bölümüdür. Geriatri bölümü, dahiliyenin bir yan dalıdır ve sadece 65 yaş ve üzeri yaşlı hastalara bakmaktadır. Yaşlı hastayla sık karşılaşan doktor ve hemşire ekibinin, geriatrik sendromlar hakkında bilgili olmaları çok önemlidir. Geriatrik Sendrom terimi, Bernard Isaacs'in "Geriatrik Devler" teriminden gelmektedir bu terim, yaşlının sosyal, fiziksel ve mental yetersizliğini ifade etmek için kullanılmıştır. "Dev" tabirinin kullanılması ise oldukça fazla yaşlıyı sıkıntıya sokması ve yaşlının bağımsız yaşamını etkilemesinden dolayıdır [4,5].

Sendromun klinik terimi, hastalığın bütününü oluşturan bulgu ve semptomlar veya herhangi hastalığa ya da anomaliye bağlı semptomlar bütünü olarak tanımlanabilir. Sendromlarda hastalıktan farklı olarak çoğunlukla bilinmeyen etiyoloji ve/veya patogenez söz konusudur [6].

Kişilerin yaş almasıyla beraber ortaya çıkan sağlık sorunları, kas ve iskelet sistemindeki ağrılar, kronik hastalıklar, teşhisi konulamayan klinik durumlara ve semptomlara geriatrik sendrom denir [7]. En sık karşılaşılan geriatrik sendromlar şunlardır;

- Düşme
- Yetersiz beslenme
- Depresyon
- Görme kabı
- İşitme kaybı
- Kemik erimesi
- İdrar Kaçırma
- Kas yoğunluğunun azalması
- Kırılgan yaşlılık
- Demans

Geriatrik sendromların görüldüğü andan itibaren erken tanısı koruyucu önlemlerin alınmasında ve uygun tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde önemli rol oynar. Semptomlar göz önünde bulundurularak kapsamlı geriatrik değerlendirme yapılmalıdır.

Sarkopeni olarak bahsettiğimiz kas kaybı bu semptomlardan en önemlilerinden biridir. Kırılgan yaşlıklık sendromunun baş semptomlarından biridir. Kırılgan vücut yapısı 3 temel değişime dayanmaktadır. Sarkopeni ile beraber hastalarda immun yetersizlik ve nöroendokrin düzensizlikleri görülür ve bunlardan her biri birbirini tetiklemektedir.

1.1.1. Sarkopeni ve tedavisi

Sarkopeni yaşlılıkla beraber gelen rahatsızlıklarda önemli bir rol oynar. Bunun nedeni kas kaybının beraberinde vücuda getirdiği olumsuzluklardır. Hastanın hareketsizliği, yetersiz beslenmesi sarkopeniyi tetikler, hasta kas kaybettikçe daha çok hareketsizleşir, güç kuvvet kaybeder ve bu sosyal yaşamını etkiler hastayı depresyona bile sürükleyebilir.

Geriatrik rahatsızlıkların erken teşhisi ve tedavisi tüm hastalılarda olduğu gibi çok önemlidir. Son zamanlarda, sarkopeni ve sarkopeni ile birlikte gelen etkilerin tedavisinde genellikle hormonal tedavi yöntemleri, egzersiz ve fiziksel aktivite, beslenme tedavisi yöntemleri gibi yöntemler kullanılmaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi, yetersiz beslenmenin sarkopeni patogenezinde önemli bir rol oynadığı buna bağlı olarak, kas kütlesi ve fiziksel fonksiyonlarda beslenmenin önemi oldukça büyüktür. Kaslar, her türlü aktivite ve basit motor harektleri için enerjiye ihtiyaçları vardır. İnsanlarda uzun süre açlığın sonucunda yağ kullanımından sonra kas dokuları da kullanılır. Mitokondri enerji metabolizmasında yetersiz enerji olduğunda kas fibrillerinde zayıflığa yol açtığı görülmüştür[8]. Bunların yanı sıra, yaşlı bireylerin enerji alımını kötü etkileyen başka sebepler de vardır. Bu sebepler; yemek yerken çiğneme hareketlerinde zorlanma ve depresyon. Bu gibi nedenler birleşerek başka sağlık sorunlarına yol açabilmektedir.

Sarkopeni, hasta yaşlılarda vücutlarının ihtiyaçlarının çok altında protein, vitamin ve enerji alımı ile ilişkilendirilebilir. Beslenmenin önemi yaşlı bireylerde gün geçtikçe artmakta ve kas gelişimine yardımcı olan yeterli enerji alımı ile önceliklikli olarak beslenmeye protein, antioksidanlar ve D, E vitaminine sahip besinler tüketilmesi önemli hale gelmiştir. Bu gıdaların günlük beslenmeye takviye edilmesi sarkopeni tedavisine katkıda bulunabilir. Kas dokusuna iyi geldiği düşünülen gıdaları (proteinler, D vitamini, antioksidanlar ve E vitamini gibi) fiziksel aktivitelerle beraber tüketilirse kas kütlesi kaybını önleyeceği ön görülmüştür. Serbest radikaller teorisi yaşlılık teorilerinden biridir ve bu teoride sarkopeni patogenezinde oksidatif stresin rol aldığı öngörülmüştür. Bu öngörüden dolayı sarkopeni tedavisinde E vitamini ve C vitamini gibi antioksidanların

kullanılması tavsiye edilmiştir [9]. Daha önceki çalışmalardan birinde, üst seviyelerde plazma antioksidan seviyesine sahip hastalarda daha düşük oranda sakatlığa rastlanmış ve kas gücünde artış gözlenmiştir [10]. Düşük protein alımı yaşlılarda kas kütlesinin azlamasında önemli bir faktördür. Önerilen mevcut protein miktarı yaşlılar için günlük 0,8 g/kg şeklindedir. Ancak bu miktar yaşlılarda tüketilmesine rağmen kas protein sentezini uyarmada yetersiz kalmaktadır [11]. Daha önce yapılan çalışmalardan birinde yaşlılar bireylerde günlük protein alımının 0.8g/kg'den 1.0g/kg'e artırılması kas kütlesini korumak için gereken minimum miktar olduğu kararlaştırılmıştır [12]. Protein kalitesi protein türüne göre farklılık gösterir ve kas gücünü artırmada proteinin türü oldukça önemlidir. Proteğin türünün kas gücü üzerine etkisi incelenen bir çelışmada, aynı miktarda bitkisel ve hayvansal protein tüketen bireyler arasında hayvansal protein ile beslenen bireylerin kas gücü daha güçlü bulunmuştur [13]. Hayvansal protein içeren çalışmalara bakacak olursak; yapılan araştırmada yaşlılar iki ana gruba ayrılmış ve müdahale grubuna takviye edici gıda olarak diğer gruba nazaran daha az karbonhidrat ve yağ alımının dışında günde 2 kere 20 g whey protein, 3 g lösin ve 800 IU D vitamini takviyesi, kontrol grubuna ise izokalorik ürünler yani bazı önemli maddelerin dışında yağlı ve karbonhidratlı besinler verilmiştir. Bu şekilde beslenen katılımcılar 7. Haftanın ve 13. Haftanın sonunda değerlendirilmiş ve protein ve D vitamini ile beslenen müdahale grubunun sandalyeye oturma testi yapıldığında test sonuçlarının daha iyi olduğu ve apendiküler kas kütlesinde artış olduğu gözlenmiştir [14].

1.2. Proteinler

Proteinler vücudumuzun yapı taşlarından biridir. Canlı organizmanın önemli bir bölümünü oluştururlar, tüm hücrelerde ve bütün hücrelerin en önemli kısımlarında yer alırlar. Tüm canlıların temel özelliklerinden olan büyüme, çoğalma ve kendi kendini onarabilme olaylarının proteinlerle yakından ilişkisi vardır. Vücudumuz protein depolayamadığı için günlük protein tüketimi miktarı oldukça önemlidir. Tüketilen proteinin kalitesi de alınan proteinin vücuda olan etkisinde farklılıklar yaşatır.

Proteinin kalitesini içeriğindeki aminoasit bileşimleri ve esansiyel aminoasit miktarı belirler. Proteinler bütün bitkisel ve hayvansal kaynaklı yiyeceklerde bulunur ve bu iki kaynaktan elde edilir buna bağlı olarak proteinleri hayvansal kaynaklı ve bitkisel kaynaklı iki gruba ayırabiliriz. Hayvansal kaynaklı gıdalardan elde edilen protein miktarı bitkisel

kaynaklılara göre daha fazladır. Hayvansal proteinler, protein kalitesi olarak da bitkisel kaynaklı proteinler göre daha kalitelidir. Bunun sebebi içeriklerindeki amino asit çeşitleri ve esansiyel aminoasit oranıdır. Örnek olarak, tablo 1.1'de gösterildiği gibi kuru fasulyenin, etten daha çok oranda proteine sahip olmasına rağmen et kadar değerli bir besin maddesi olmamasının nedeni yapısında gerektiği kadar esansiyel amino asit olmamasıdır [15].

Tablo 1.1. Bazı Hayvansal ve Bitkisel Kaynaklı Gıdaların Esansiyel Amino Asit Miktarları.

Amino Asit	Et (sığır)	Süt	Yumurta	Buğday	Mısır
Vanilin	313	463	428	276	303
Lösin	507	782	551	517	783
İzolosin	301	399	393	204	230
Lizin	556	450	436	179	167
Metiyonin	169	156	210	94	120
Fenilalanin	275	434	357	282	305
Treonin	287	278	320	183	225
Triptofan	103	98	113	47	20

* Tablo Gıda teknolojisi proteinler- Siirt Üniversitesi'nden alınmıştır

Hayvansal proteinler en önemlilerinden biri WP'dir. Günümüzde, içeriğindeki esansiyel aminoasitler ve kullanabilirliğinin kolaylığında ötürü gıda sektörü başta olmak üzere birçok sektörde çok fazla kullanım alnı vardır.

1.2.1. Whey protein

Süt iki değerli protein içerir; Whey protein ve Kazein. İnek sütünde %80 kazein, %20 WP vardır. Anne sütünde ise yüzdelik olarak %60 WP, kazein ise %40 oranında bulunur. Ayrıca, diğer protein türlerinden farklı olarak kolayca sindirilebilir bir yapıya sahiptir [16]. WP yüksek besin değerine sahip olduğu da bilinmektedir. WP gıda sektörünün en önemli yan ürünlerinden biridir. Birçok paketli ürünün içerik listesine bakıldığında WP'ye rastlanır. Oysa WP, peynir üretiminden sonra elde edilen peynir altı suyunun toz hale gelmesinden oluşur yani WP bir ürün değil yan üründür ona rağmen kullanıldığı alanlardan dolayı şu an gıda sektöründe peynirden daha çok aranır hale gelmiştir. Gıda sektöründe kullanıldığı bazı alanlar aşağıdaki gibidir;

- Hayvan besini

- Pastacılık alanı
- Gıda ambalaj sektörü
- Gıda katkı maddesi
- Maya üretimi
- Bebek maması ürünleri
- Unlu mamüllerde
- Et ürünlerinde
- İçecek sektörü

Gelişen teknoloji ile beraber WPnin kullanım alanları gün geçtikçe artmaktadır. Bileşiminde kaynaklı besleyici özelliklerinden dolayı, WPnin sağlık üzerine olumlu etkileri vardır. Bazı hastalıkların tedavisinde takviye edici gıda maddesi olarak hastaların günlük diyetlerine eklendiği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bazı kanser türleri, HIV, hipertansiyon, sarkopeni vb. gibi birçok hastalıkla yapılan çalışmalarda kullanılmıştır [17-20]. WPnin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı nano/mikrokapsüllerden enkapsüle edilen maddelerin kontrollü olarak salınımında ve yeni mikrokapsüllerin oluşturulmasında mükemmel avantajlar sağlamaktadır. WPnin iyi emülsifikasyon, jelleşme ve film oluşturma özelliklerinden faydalanılarak yapılan bir çalışmamızda WP hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar için nano/mikro enkapsülasyon teknolojisinde çok iyi bir kaplama materyali olarak kendini kanıtlamıştır [21]. Ayrıca bu çalışma sonucunda WPnin hidrofilik ve hidrofobik materyaller için kaplayıcı bir ajan olarak kullanabilirliği de kanıtlanmıştır.

WP ile yapılan enkapsülasyon çalışmalarında en sık rastladığımız teknik elektro hidrodinamik atomizasyon tekniği ya da diğer adıyla elektro-püskürtme yöntemidir.

1.3. Vitaminler

Vitaminler normal vücut fonksiyonları ile sağlıklı yaşam ve büyüme için gerekli organik yapılardır. Biyokimyasal fonksiyon için çok az miktarlarda gerekli olan organik bileşiklerdir. Metabolizmada esansiyeldirler, doğal gıda maddelerinde küçük miktarlarda bulunurlar, organizmaya enerji sağlamayan bir grup kompleks organik yapılardır. Vücut

kendi üretemediği için diyetle dışarıdan alımı sağlanmalıdırlar. Vitaminler çözünürlüklerine göre ikiye ayrılırlar; suda çözünenler (Vitamin B ve kompleksleri ve Vitamin C) ve yağda çözünenler (Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E ve Vitamin K).

1.3.1. E vitamini

Yağda çözünen vitamin çeşitlerinde biri olan E vitamini aynı zamanda en büyük besinsel antioksidandır. İnsan vücudunda, oksijen etkisi ile değişebilecek vücut bileşenlerini (protein, hücre zarı vb.) korur. E vitaminin olumlu etkileri nedeniyle dışarıdan ilaç olarak temin edildiğinde önerilen günlük tüketim miktarı 400- 600 IU dir. Bu ihtiyaca göre 800 -1600 IU kadar çıkabilir. E vitamini içeren doğal kaynaklarından bazıları tablo 1.2'deki gibidir.

Tablo 1.2. Bazı Gıda Ürünlerindeki E Vitamini Miktarı.

Yiyecek 100 gr. da mg.	
Tereyağı	2-3
Margarin	15
Sıvı yağlar	75
Tavuk	2-3
Yumurta	15
Kırmızı et	2 -3
Fasülye	15
Tahıl	70- 80
Sebze-meyve	150

* https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/61136/mod_resource/content/0/E%20vitamini%20.pdf

E vitamininin yaşlanmaya ve yaşlanmaya bağlı hastalıklarda gösterdiği olumlu etki birçok çalışmaya konu olmuştur [22-24]. E vitamini yetersizliğinde kaslarda yağ birikir ve kaslarda dejenerasyon ya da kas distrofisine neden olur. E vitaminin tek başına kas sağlığını korumadaki rolünden nadiren bahsedilse de whey protein ile kullanıldığı bir çalışmada sarkopeni hastalarındaki etkisi gösterilmiştir. Yaşlılıkla beraber oluşan kas zayıflıklarında düzenli E vitamini takviyeleri alındığında kas aktivitelerinin zamanla iyiye doğru gideceği yapılan çalışmalarda öngörülmüştür [25].

1.4. Polimerler

Monomer adı verilen küçük moleküllerin artarda dizilerek oluşturduğu büyük moleküllü yapılara polimer denir. Polimerler milyarlarca ya da milyonlarca monomer içerebilir. Teknolojinin gelişmesiyle polimer çeşitliliği de artmaktadır. Suni polimerler ya da bilinen adıyla plastik malzemeler son yirmi yıl içerisinde hacim olarak neredeyse metal malzemelerle eşit oranda kullanılmaya başlanmıştır. Bunun başlıca nedenleri polimerin nispeten metallerden daha ucuz olmaları, kullanıldığı alana göre üretilebilmeleri, kolay işlenebilirlikleri, yüksek kimyasal ve korozyon direncine sahip olmaları ve hafifliklerdir.

Gelişen polimer teknolojisiyle polimer kullanım alanları da gelişmektedir. Fotoğrafçılıktan yapı sektörüne, sağlık sektöründen tekstil sektörüne kullanımı oldukça fazladır. Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde polimerlerin nanoteknoloji alanında kullanımı da çok yaygınlaşmıştır. Özellikle, polimerlerin, nanofiber üretiminde kullanımı oldukça yaygındır.

Polimerlerin temel sınıflandırması, doğal polimerler ve sentetik polimerler olarak bilinen iki grubu içerir. Doğal polimerler, çevremizde bulunabilen polimer bileşikleridir. Sentetik polimerler, yapay olarak üretilen polimer bileşikleridir. Doğal polimerler ile sentetik polimerler arasındaki temel fark budur. Biyomedikal alanda yapılan çalışmalarda sentetik polimerler doğal polimerlerden daha çok tercih edilir. Bunun nedeni, doğal polimerlerin biyobozunur özellikleri iyi olmalarına rağmen vücutta istenmeyen bir bağışıklık tepkisini tetikleyebilirler. Bu özelliğinin yanında sentetik biyopolimerler, sterilize edilebilirler, ısıya ve hidrolize dayanıklıdırlar. Bu özellikler de doku mühendisliğine biyopolimer olarak tercih edilmelerinde önemli bir etkendir.

1.4.1. PVA

Biyomedikal alanda sık kullanılan sentetik polimerlerlerden en önemlilerinden biri polivinil asetattan hidroliz yoluyla elde edilen polivinil alkoldür (PVA). PVA, biyolojik organizmalar tarafından ve suda kolayca parçalanabilen, hidrofil yapılı bir polimerdir. Bu polimer, biyopolimerler ve hidrofilik özelliklere sahip diğer polimerler gibi diğer polimer bileşikleri ile harmanlanarak yaygın olarak kullanılır; uyumlu yapısı ve hidrofilik özelliklerinden dolayı fiber yapıların mekanik özelliklerini geliştirmek için çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır [26]. PVA, canlı dokular için iyi huylu, zararsız ve toksik olmayan, yaygın olarak kullanılan bir polimerdir. Fiziksel özelliklerdeki bakımında insan doklarına benzerlik göstermesi insan dokuları ile uyumlu olmasını sağlar. Biyouyumlu PVA, protein moleküllerini absorbe edebilen ve minimum hücre adezyonu ile angaje olabilen ve toksik etkileri olmayan bir yapıya sahiptir, bu nedenle PVA membranları biyomedikal uygulamalar için yaygın olarak geliştirilmiştir.

PVA, kolay işlenebilirlik ve suda çözündürüldüğünde elde edilen jelsi dokusundan dolayı fiber doku oluşturulması kolaylaşır. Biyomalzeme olarak kullanılmak istenen PVA'dan elde edilmiş nanofiber yapının suda çabuk çözünürlüğü istenmeyen bir özelliktir. Çapraz bağlama yapılması ürünü daha kompleks bir yapı haline getirir ve suda çözünmeyi zorlaştırır.

1.5. Nanofiber

Nanofiberler, fiber çapları 1 μm'den daha az olan ipliksi yapılardır. Fiberlerin çapı mikrometre ve nanometre boyutuna düştüğünde fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri oldukça gelişir. Böylece, daha yüksek yüzey alanı, düşük porozite,ve yüksek mekanik rijitlik gibi özelliklere sahip olurlar. Bu boyutlara indiğinde fiberler daha çok kullanım alanına sahip olurlar. Şekil 1.3'de de gösterildiği gibi biyomedikal ürünler, filtrasyon sistemleri, geliştirilmiş kompozit yapımı, nanosensörler, polimerik piller, kontrollü ilaç salımı uygulamalarında, katalizör desteği ve doku mühendisliği alanlarında birçok alanda uygulamaya sahiptirler [27].



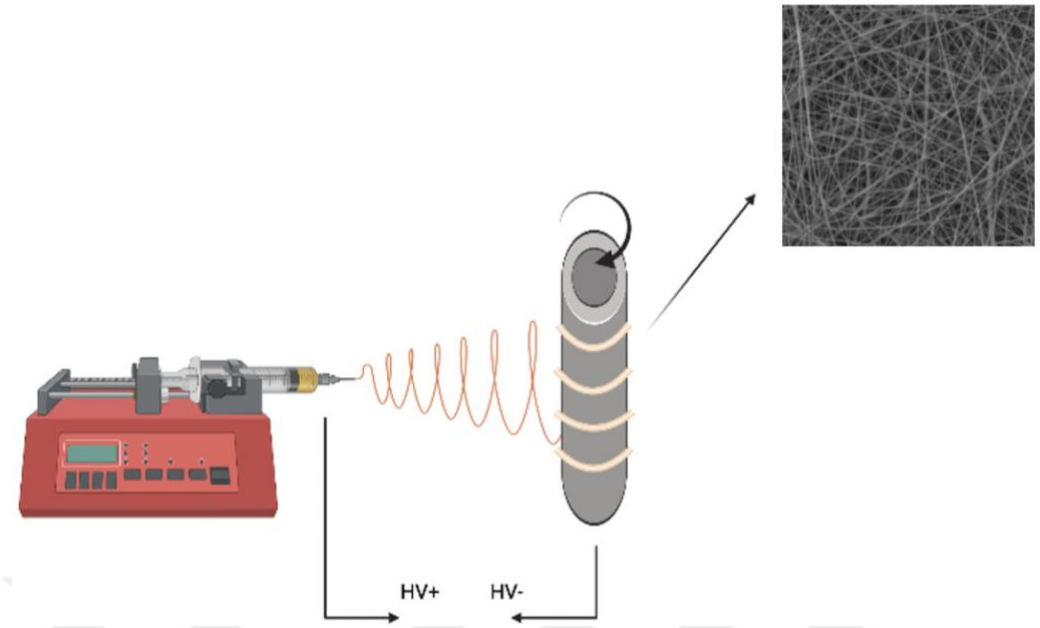
Şekil 1.3. Nanaofiberlerin Kullanım Alanları [27].

Fiber kullanımının doku mühendisliğinde kulllanımı gelişen teknolojilerle gün geçtikçe büyümekte ve daha etkin hale gelmektedir. Fiber bileşimi ve üretim tekniği değiştirilerek istenilen etkin maddenin ya da ilacın salım kinetiğini elde etme imkânı sunmaktadır. Uygulama kolaylığı, nispeten düşük maliyetli olması, yüksek yüzey alanı gibi birçok ilgi çekici özelliklerinden dolayı doku mühendisliğinde önemi bir yere sahiptir. Nanofiberler, hücrelerin canlılığını koruyabilmesi için daha elverişli bir ortam sunar. İnsana ait dokular da biyolojik açıdan fiberli yapılardan oluşmaktadır. Bu açıdan, nanofiberlerle mekanik açıdan benzemeleri onları daha biyo-uyumlu yapar.

Nanofiber üretmek için birçok farklı teknik vardır. Bunlardan bazıları ise şu şekildedir; kalıp sentez, çekme, faz ayrışması, kendiliğinden birleşme ve elektroeğirme yöntemleridir.

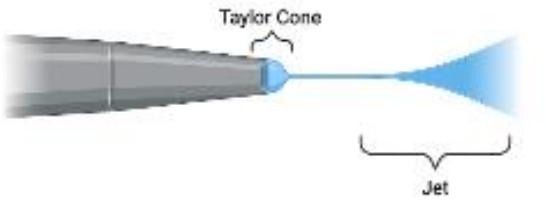
1.5.1. Elektroeğirme

Elektro eğirme sistemi, 1990'ların başından itibaren nanoteknolojinin gelişmesiyle ve mikron boyutundan daha küçük fiberlerin üretilmesine olanak sağlamasıyla ve ayrıca, kolay kullanılabilirliğiyle çok fazla tercih edilen bir nanofiber üretim tekniğidir. Sentetik, doğal ya da biyobozunur veya biyobozunur olmaya birçok polimer türü bu sistem ile nanofiber haline getirilebilir. Elektro eğirme sistemi ile üretilen nanofiberler, diğer biyomalzemelere kıyasla üstün mekanik özellikleriyle oldukça dikkat çekerler. Bu tez aşamasında kullanıma en uygun teknik elektro eğirme sistemidir. Bu sistem yapmak istediğimiz çalışmaya ve kullanmak istediğimiz polimere en uygun tekniktir. Diğer tekniklere göre avantajları; yüksek yükleme kapasitesi, sisteme yüklenilen polimerden en fazla fiber elde etme verimi, uygulama kolaylığı, çoğu doğal ve sentetik polimer ile çalışma imkanı, birkaç nanometre ve mikrometre boyutlarında değişen fiber yapı eldesi, mekanik olarak dayanıklı ve esnek fiber eldesi, saflaştırma işlemine gerek duyulmadan tektür fiber eldesi, oldukça uzun fiber elde edebilme kabiliyeti ve düşük maliyetli olması gibidir. Faket elektroeğirme sistemi kullanım kolaylığı sağlarken aynı zamanda stabil olmayan jet oluşumu ve birçok parametrenin fiber oluşumunu ve yapısını önemli ölçüde etkilemesi yöntemin dezavantajı olarak sayılabilir [27].



Şekil 1.4. Basit Elektroeğirme Düzeneği.

Şekil 1.4'de gösterildiği gibi elektroeğirme sistemi basit olarak 3 kısımdan oluşmaktadır; yüksek voltaj kaynağı, polimer solüsyonun bulunduğu şırınga ve topraklanmış metal silindir kollektörden (toplayıcı levha) oluşmaktadır. Bu sistemde genellikle voltaj kaynağında doğru akım kullanılmaktadır. Eriyik hale getirilen polimer çözeltisi enjektöre eklenir ve bu enjektör şırınga pompasına konulur Şırınganın ucu ile sistemdeki iğne arasına kılcal pipet geçirilir ve şırınga pompası yardımıyla polimer solüsyonu sabit ve kontrol edilebilir bir hızla sistemdeki iğneye ulaşır. Sisteme genellikle 1-30 kV arası elektrik uygulandığında, uygulanan elektrik alan iğnenin ucundaki polimer damlacığına etki eder ve yerçekimi, yüzey gerilmesi ve elektriksel gerilme gibi sistemdeki kuvvetler iğnenin ucundaki polimerin Taylor konisi şeklini alır (şekil 1.5). Uygulanan elektrik alan polimer solüsyonun yüzey gerlimini aştığında elektriklenmiş jet hızla uzayarak silindir kollektör üzerinde uzun ve ince ipliksi yapı oluşurturur. Bu sıvı jetin devamlı uzaması ve çözücünün buharlaşmasına ve sonucunda katı halde nanofiber elde edilmesini sağlar.



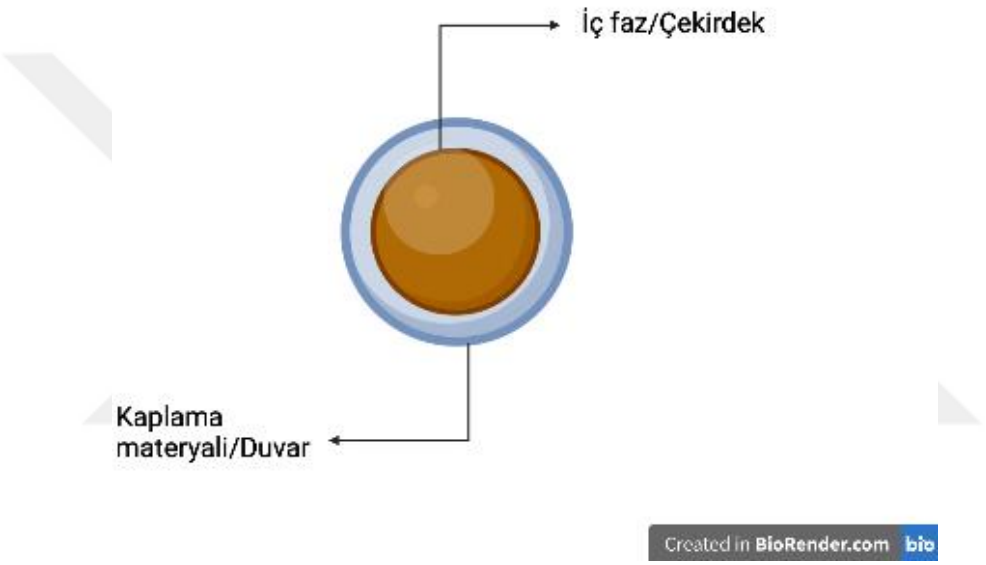
Şekil 1.5. Taylor Konisi Görünümü.

Elektro eğirme yönteminde fiber oluşumunu, yapısını ve nano/mikro çap yapını etkileyen başlıca üç parametre vardır. Sisteme uygulanan voltaj, kollektör ve iğne arasındaki mesafe ve çözeltinin akış hızı. Sisteme uygulanan voltaj ile fiber çapı ters orantılıdır. Düzgün yapılı bir nanofiber elde etmek istiyorsak sistemde Taylor konisini elde etmek gerekir. Her elektro eğirme sitemi için bir eşik değeri vardır (genellikle 6 kV) ve bu voltaj değerinin altında Taylor konisi oluşmaz. Ayrıca, voltaj arttıkça fiber çapı azalmaktadır ve bu olay yapılan çalışmalarda da gözlemlenmiştir [28]. Nanofiberi etkilen bir diğer parametre ise kollektör ve metal iğne arasındaki mesafedir. Bu mesafe hem elektrik alan şiddetini hem de polimer solüsyonun sistem içerisindeki uçuş süresini etkilemektedir. Aradaki mesafeyi doğru ayarlamak çok önemlidir. Eğer mesafe çok kısa ise bu durumda çözücünün uzaklaşması için gerekli zaman kalmaz ve fiber katı bir hal alamaz veya mesafe fazla uzun olursa polimer damlacığından fazla kusurlu fiberler elde edilebilmektedir. Son olarak, çözeltinin akış hızı da fiberi etkileyen önemli bir faktördür. Yüksek akış hızı sonucunda fiberin kolektöre ulaşmadan önce uygun kuruma zamanı olmaz bu nedenle boncuklu lifler görülür. Aynı şekilde, düşük akış hızı nedeniyle sistemde Taylor konisini oluşturacak yeterli polimer olmazsa sistem fiber üretemez. Bu parametrelerin her biri fiber üretiminde çok önemli parametrelerdir. İstenilen fiber yapısı için uygun şartlar sağlanmalıdır.

1.6. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon işlemi, katı, sıvı ve gaz formdaki maddelerin çeşitli kaplama malzeleri ile kaplandığı fiziko-kimyasal bir işlemdir. Enkapsülasyon işlemi, kaplamak istediğimiz ürünün diğer maddelerle doğrudan temas halini keser ve bu da ürünün dış ortamdan izole olmasına ve korunmasına, taşınmasına ve salınımına yardımcı olur. Şekil 1.6'da gösterildiği gibi bu işlem için en az bir aktif bileşenin (çekirdek/iç faz da denebilir) ve en

az bir çeşit kaplama materyali (duvar/kabuk da denebilir) gereklidir. İç faz etken maddenin bulunduğu kısım, kaplama materyali ise koruyucu maddedir. Başka bir deyişle, bu kaplama materyali tarafından çeşitli teknikler kullanılarak aktif bileşenin koruma altına alınması olayıdır. Bu işlemde temel amaç; gıda maddeleri,aroma maddeleri, ilaçlar gibi birçok aktif bileşenin stabil kalmak suretiyle salımını kontrollü olarak gerçekleştirmektir [29]. Elde edilmek istenen enkapsülasyonun hangi kaplama malzemesiyle kaplanmak istenmesi ve hangi yöntemle üretilmek istenmesi önemlidir. Kaplama materyalinin, biyouyumlu ve biyobozunur olmasının yanı sıra enkapsüle edilmek istenen aktif bileşenin stabil olması gereklidir.



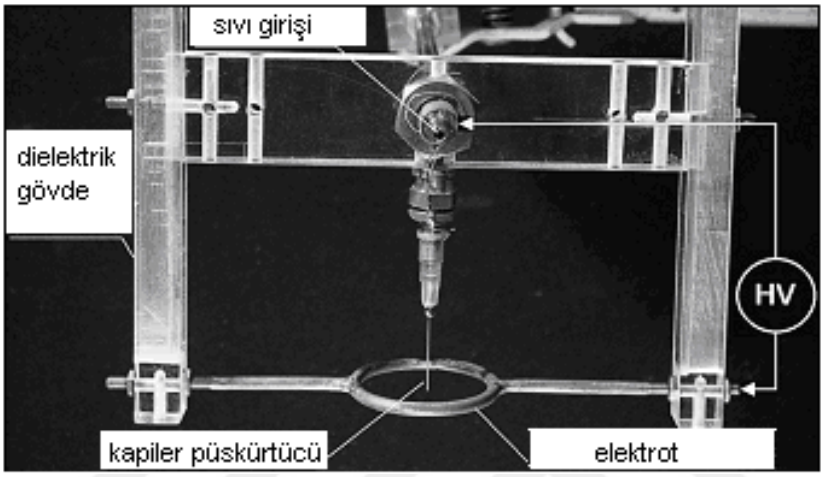
Şekil 1.6. Enkapsüle Edilmiş Materyal.

Etken maddenin, koruyucu taşıyıcıların tarafından kaplanması ya da kapsüllenmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en önemlileri; termal faz ayrımı, dondurarak kurutma, eriyik dispersiyonu, solvent buharlaştırma, elektro eğirme teknikleridir.

1.6.1. Elektropüskürtme

Elektropürkürtme tekniği, nanoteknloji başta olmak üzere gıda, tekstil gibi alanlarda kullanılmaktadır. Nanoteknolojisinin günden güne gelişmesiyle daha çok kullanılmaya başlamıştır. Nano/mikro partiküller, enkapsülasyon ve nanofiber kaplama yapabilme özelliklerinden dolayı bu tezde kullanılmak için seçilmişitir.

Elektrohidrodinamik atomizasyon (EDHA) teknolojisi olarak da bilinen elektronik püskürtme yöntemi, yüksek voltaj altına nano/mikro partiküller oluşturabilirken, yaygın olarak kullanılan diğer enkapsülasyon tekniklerinin aksine organizmalar üzerinde hasara yol açabilen ısı ve basınç uygulamaları ile agresif çözücülerin kullanılmaması, kullanım kolaylığı, yüksek viskoziteye sahip bileşenlerin dahi kapsüle edilebilmesi, üretilen kapsüllerin küçük boyutlarda ve stabil olması gibi avantajlara sahip bir tekniktir.



Şekil 1.7. Basit Elektropüskütme Sistemi [30].

Elektropüskürtme yöntemi çalışma prensibi açısından elektro eğirme sistemine çok benzerdir. Elektropüskürtme sistemi şekil 1.7'de gösterildiği gibi basitçe kapiler bir püskürtücü ve çember şeklinde bir elektrottan oluşmaktadır. Kısaca çalışma şekli şu şekildedir; eriyik haldeki polimer çözeltisi şırıngaya eklenir ve bu enjektör şırınga pompasına konulur Şırınganın ucu ile sistemdeki iğne arasına kılcal pipet geçirilir ve şırınga pompası yardımıyla polimer solüsyonu sabit ve kontrol edilebilir bir hızla sistemdeki iğneye ulaşır. Sisteme genellikle 1-30 kV arası elektrik uygulandığında, uygulanan elektrik alan iğnenin ucundaki polimer damlacığına etki eder ve yerçekimi, yüzey gerilmesi ve elektriksel gerilme gibi sistemdeki kuvvetler iğnenin ucundaki polimerin Taylor konisi şeklini alır (şekil 1.5). Uygulanan elektrik alan polimer solüsyonun yüzey gerlimini aştığında elektriklenmiş jet hızla uzayarak çember kollektör üzerinde nano/mikro partikül yapı oluşurturur. Bu sıvı jetin devamlı olması çözücünün buharlaşmasına ve sonucunda katı halde partikülelde edilmesini sağlar.

Elektropüskürtme yönteminden sonra oluşan ürünün özelliklerini şu iki parametre belirler; kullanılan solüsyonun formülasyonu ve sistemi etkileyen parametrelerdir.

Sistemi etkileyen parametreler elektro eğirme sisteminde olduğu gibi sisteme uygulanan voltaj, kollektör ve iğne arasındaki mesafe ve çözeltinin akış hızıdır. Bunun dışında elektro püskürme sistemi açık bir sistem olduğu için çevre şartlarına karşı çok hassasdır. Elektropüskürtme yöntemi kullanlırken sistem parametreleri ve çevre şartları stabil tutulmalıdır.

2. AMAÇ VE YÖNTEM

Bu tezin amacı, whey protein ve E vitamini eklenerek çeşitli yöntemlerle üretilen iskelenin kas kaybı üzerindeki etkileşimin incelenmesidir. Bu amaca yönelik yapılan çalışmaların aşamaları şu şekildedir;

1. WP, WP/PVA ve WP/E Vitamini İçeren Solüsyonların Hazırlanması.
2. Elektroeğirme Yöntemi Kullanılarak WP/ PVA ile Nanofiber Üretimi
3. EDHA Kullanılarak WP/PVA Nanofiber İskeleleri Kaplama Yapılması
4. Oluşturulan WP/E Vitamini ile Kaplanmış WP/PVA Nanofiber İskelelerinin Karakterize Edilmesi
5. E Vitaminin WP/PVA Nanofiber İskelelerinin İçinde Kontrollü Salımını Test Etmek
6. Kök Hücre Kültürü Analizi Yapılması

2.1. Malzemeler

2.1.1. Polivinil alkol (PVA)

PVA, kimyasal ve termal dayanımı yüksek, biyouyumlu, çapraz bağlanma oluşturabilen sentetik bir polimerdir. PVA (MW= 89.000–98.000) polimeri, WP'nin nanofiber yapı oluşturma özelliğini arttırmak için kullanıldı. PVA polimeri tedariği Sigma Aldrich'den edilmiştir.

2.1.2. Whey protein

WP (MW=14.178 kDa) (Şekil 2.1), kas büyümesi üzerindeki etkileri sebebiyle bu çalışmada kullanılmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada nanofiber oluşumunda ve E vitaminini enkapsüle etmek için de kullanılır. WP Sigma Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilmiştir.



Şekil 2.1. WP Görseli.

2.1.3. Tween 80

Sigma Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilen Tween 80 solüsyonu kullanılmıştır.WP nin solüsyon içinde daha iyi çözünmesi için kullanılmıştır.

2.1.4. E vitamini

E vitamini bu çalışmada WP ile enkapsüle edilerek kullanılmıştır. Deneylerde E vitamini olarak; Evicap marka 400 IU'luk E vitamini kapsülleri kullanılmıştır.

2.1.5. Glutaraldehit (GA) (%50) solüsyonu

İskeleler üzerinde çapraz bağlanma yaparak yapının sulu ortamda bozunmasını önlemesi ve yapıyı hidrofilik ortama karşı dirençli hale getiren GA) (%50) solüsyonu kullanılmıştır. GA solüsyonu Sigma Aldrich'ten (Almanya) tedarik edilmiştir.

2.2. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve laboratuvar ekipmanları Tablo 2.1'de sunulmuştur.

Tablo 2.1. Kullanılan Cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	**Ne için Kullanıldıkları**
Elektrospin Cihazı (NS24, Inovenso Co., Turkiye)	Nanofiber üretmek için kullanılır.
Elektropüskürtme Cihazı (NS24, InovensoCo, Turkiye)	Üretilen nanofiberi kaplamak için kullanılır.
Şırınga Pompası (NE-300, New Era Pump Systems, Inc., ABD)	Solüsyonu cihaza iletmek için kullanılır.
Etüv (MMM, ECO-111-NAS, Almanya)	Nanofiberlerin çapraz bağlama işleminde kullanılır.
SEM (EVO MA-10, Carl Zeiss, ABD)	Nanofiber, nano/mikropartiküllerin ve iskelelerin morfolojik yapılarını incelemek için kullanılır.
Püskürtmeli Kaplama cihazı (Quorum SC7620, ABD)	Bu cihaz sayesinde kaplanan iskeleler elektron mikroskop cihazında görüntülenebilir hale getirilmiştir.
FT-IR (FTIR, 4600 Jasco, Japonya)	İskelelerin kimyasal yapısını ve tüm kimyasal bağlarını detaylı incelemek için kullanılır.
DSC (DSC60-Plus, Shimadzu, Japonya)	Yapıların termal davranışlarını incelemek için cihazı (DSC60-Plus, Shimadzu, Japonya) diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak ölçümler gerçekleşmiştir.
Manyetik Karıştırıcı (Wise Stir®, MSH-20A, Wertheim, Almanya)	Solüsyonların ve ekstrelerin homojen olarak karışıp hazırlanmasında kullanılır.
Hassas Terazi (Precisa XB 220A SCS, Almanya)	Tüm tartım işlemlerinde kullanılır.
Homojenizatör (DAIHAN Scientific co., HG-15A, Gangwon-do, Korea)	Solüsyonların homojen bir şekilde karıştırılabilmesi için kullanılmıştır.
Optik Mikroskop (BX51M, Olympus, Japonya)	Nanofiber, nano/mikropartiküllerin ve iskelelerin morfolojik yapılarını incelemek için kullanılır.
Çekme cihazı (DVT, Devotrans, İstanbul, Türkiye)	Mekanik özelliklerinin test edilebilmesi için kullanılır.
Dijital Mikrometre cihazı (293-100 Mitutoyo, Japonya)	İskelelerin kaınlıkları ölçülmüştür.
Spektrofotometre cihazı (UV- VIS Shimadzu UV-1280, 190 nm-600 nm)	İlaç (E vitamini) salınımı incelemek amacıyla kullanılır.
Thermo çalkalayıcı inkübatör (BIOSAN TS-100)	Vücut ortamını taklit ederek iskelelerden E vitamini salımını sağlaması amacıyla kullanılır.
Çoklu Mikroplaka okuyucusu (VarioSkan Plate Reader, ThermoScientific)	Hücre analizlerinde, hücre büyümesi ölçmek için kullanılır.

2.3. Deney Aşamaları

2'de bahsedildiği gibi çalışmanın aşamaları şu şekildedir;

1. WP, WP/PVA ve WP/E Vitamini İçeren Solüsyonların Hazırlanması.
2. Elektroeğirme Yöntemi Kullanılarak WP/ PVA ile Nanofiber Üretimi
3. EDHA Kullanılarak WP/PVA Nanofiber İskeleleri Kaplama Yapılması
4. Oluşturulan WP/E Vitamini ile Kaplanmış WP/PVA Nanofiber İskelelerinin Karakterize Edilmesi
5. E Vitaminin WP/PVA Nanofiber İskelelerinin İçinde Kontrollü Salımını Test Etmek
6. Kök Hücre Kültürü Analizi Yapılması

2.3.1. Solüsyonların hazırlanması

2.3.1.1. Nanofiber üretimi için solüsyon hazırlanması

Nanofiber numunelerinin hazırlanabilmesi için tablo 2.2'deki verilere göre farklı konsantrasyonlara sahip PVA ve WP karışımları hazırlanmıştır. İlk olarak PVA (%13) cam behere aktarılmış ve üzerine saf su eklenmiştir. Karışım, manyetik karıştırıcıda yaklaşık 120 °C de 30-40 dakika arasında homojen çözünmeyi sağlayacak şekilde karıştırılmıştır. Solüsyon soğuduktan sonra üzerine 5-6 damla Tween 80 eklenip tekrar 15-20 dakika manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Son olarak, solüsyonun üzerine farklı konsantrasyonlarla WP eklenmiş ve karışım manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika boyunca homojen bir solüsyon olana kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyonlar, elektro eğirme prosesine girmeye hazır hale getirilmiştir.

Tablo 2.2. Nnaofiber Konsantrasyonları.

	PVA	**WP**
1	%13	-
2	%13	%1
3	%13	%3

2.3.1.2. Kapsülasyon ve kaplama işlemi için solüsyon hazırlanması

E vitamini kapsülasyonu ve Nanofiber kaplama işlemi için solüsyon hazırlanabilmesi için tablo 2.3'deki verilere göre farklı konsantrasyonlara sahip WP ve E Vitamini karışımları hazırlanmıştır. İlk olarak WP (%20) cam behere tartılıp konulmuş ve üzerine saf su eklenmiştir. Solüsyon, manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında homojen bir karışım hale gelene kadar karıştırılmıştır. Homojen WP karışımının üzerine farklı konsantrasyonlarda E vitamini eklenmiştir ve homojenizatör kullanılarak 15.000 rpm de 5-6 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan solüsyon, elektro püskürtme prosesine girmeye hazır hale getirilmiştir.

Tablo 2.3. Nanopartikül Konsantrasyonları

	WP	**E Vitamini**
1	%20	%1.35
2	%20	%2.7

2.3.2. Elektroeğirme yöntemi ile nanofiber üretimi

Nanofiber üretimi için hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltiler, şırıngaya (Labor-Teknik, İstanbul) çekilerek ve elektroeğirme cihazının pompalama sistemi kısmına monte edilmiştir. Bu araştırmada, akış hızı her solüsyonda aynı olacak şekilde standart 1 ml/saat olarak sabitlenmiştir. Fakat bazı solüsyonlarda bu akış hızı değeri elektro-eğirme işlemi esnasında yeterli gelmeyebilir ve tıkanmaların meydana gelebilir. Bunun sonucunda, akış hızı bazı solüsyonlarda 1 – 1.5 ml/saat olarak değiştirilmiş ve fiber yapının üretilmesi gerçekleşmiştir. Elektroeğirme cihazı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Elektro-Eğirme Cihazı.

Elektroeğirme sisteminde kullanılan iğne ucu 19 numaradır. İşlem süresince uygulanan voltaj miktarı 25-30 kV arasında değişmektedir. Homojen ve etkili bir nanofiber yapısı üretmek için tüm çözeltilerde belli bir voltaj miktarı aralığı ile çalışılmıştır. İğne ucu ve toplayıcı arasındaki mesafe 120 mm olarak ayarlanmıştır. Taylor koniği elde etmek için doğru voltaj miktarının bulmak önemlidir. Taylor koniği yaklaşık olarak 28 kV değerinde yakalanmıştır.

Elektroeğirme sisteminin toplanma yüzeyinde fiber dokularını toplamak için yağlı kağıt yapıştırılmıştır ve bu yağlı kağıt sayesinde iğnenin uç tarafından fiber iskelelrini yakalamak daha kolay hale gelmiştir. İğne ile toplayıcı silindir yüzey arasındaki mesafe 10 cm olarak belirlenmiştir. Deneyeler tüm sonuçların daha stabil olması adına tüm değerler sabitlenerek yapılmıştır.

2.3.3. İskele yapılarının çapraz bağlanması

Üretilen nanofiber numuneleri yağlı kâğıttan çıkarılıp dairesel bir filtre kağıdına yerleştirildi. Cam petri kabına yaklaşık 5 ml %50 GA çözeltisi eklendi ve cam petri kabı cam desikatörün alt yüzeyine yerleştirildi. Nanofiberlerin olduğu filtre kâğıdı dikkatli bir

şekilde cam desikatörün üst kısmına konularak kapağı kapatıldı. Cam desikatörün dış yüzeyi bantla sıkıca kapatılarak etüv içinde solüsyonun çıkması engellendi. Daha sonra inkübatöre konan cam desikatör 60 °C'de 3 saat bekletildi. Çapraz bağlama işlemi Şekil 2.5'de gösterilmiştir.



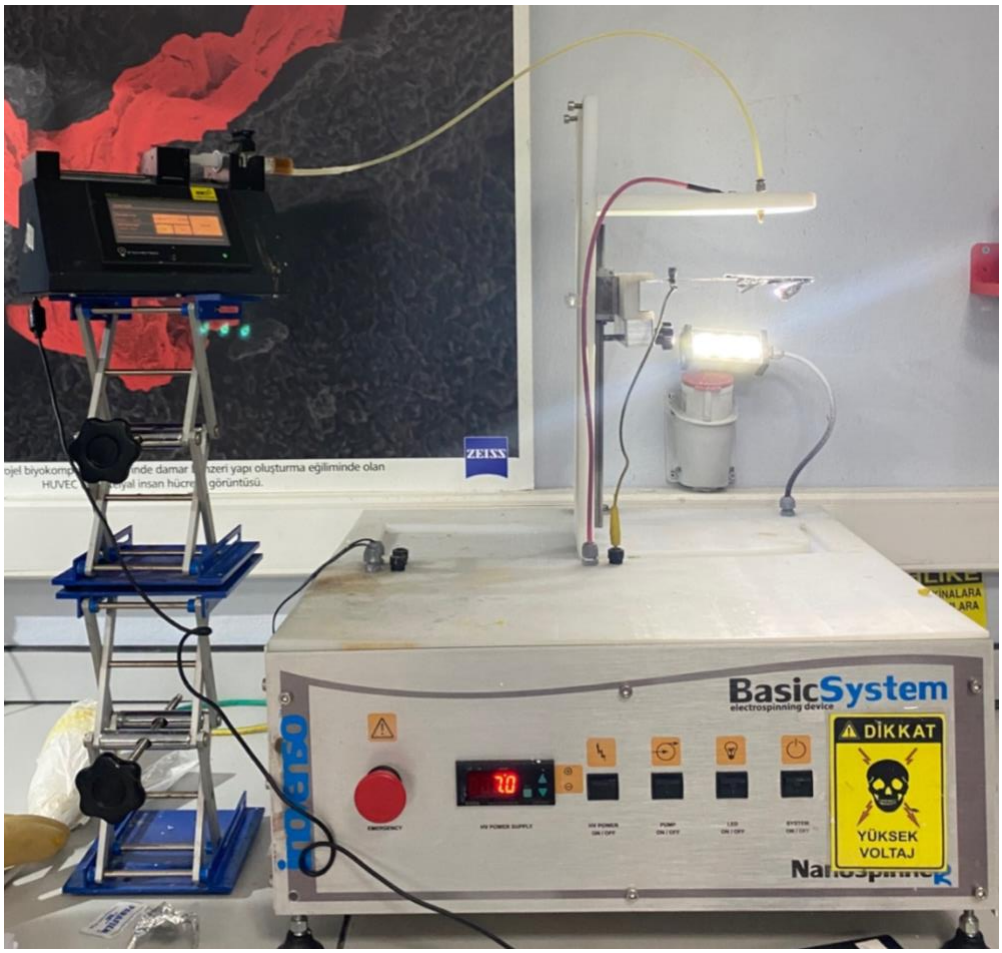
Şekil 2.3. Cam Desikatör İle Çapraz Bağlama Düzeneği.

2.3.4. Elektropüskürtme yöntemi ile iskelelerin kaplama yapılması

Elektro püskürtme sisteminde kullanmak için hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler, enjektöre çekilmiştir ve elektropüsürtme cihazının pompalama sistemi kısmına monte edilmiştir. Bu deney aşamasında, ortalama akış hızı standart 0.01 ml/saat olarak belirlenmiştir. Fakat bu akış hızı miktarı bazı solüsyonlarda elektropüskürtme sırasında akış hızının düşük olduğu Taylor koniği oluşturamadığı ve bunun sonucunda tıkanmalara sebep oldğundan dolayı, 0.02 – 0.05 ml/saat olarak değiştirilmiş ve nano/mikropartiküllü yapı elde eldilmiştir. Elektropüskürtme cihazı Şekil 2.6'de gösterilmiştir.

Elektropüskürtme sisteminde kullanılan iğne; 0.3mm iç ve 0.8mm dış çapa sahip iğne ucu kullanılmıştır. Elektropürkürtme sisteminde uygulanan voltaj değeri çok önemlidir. Eğer belirli bir değerin altında kalırsa Taylor koniği oluşmaz ve bunun sonucunda elde edilmek

istenen nano/mikra malzeme elde edilemez. Bu yüzden çalışma sırasında uygulanan ortalama voltaj değeri 20-25kV değerleri arasındadır.



Şekil 2.4. Elektropüskürtme Cihazı.

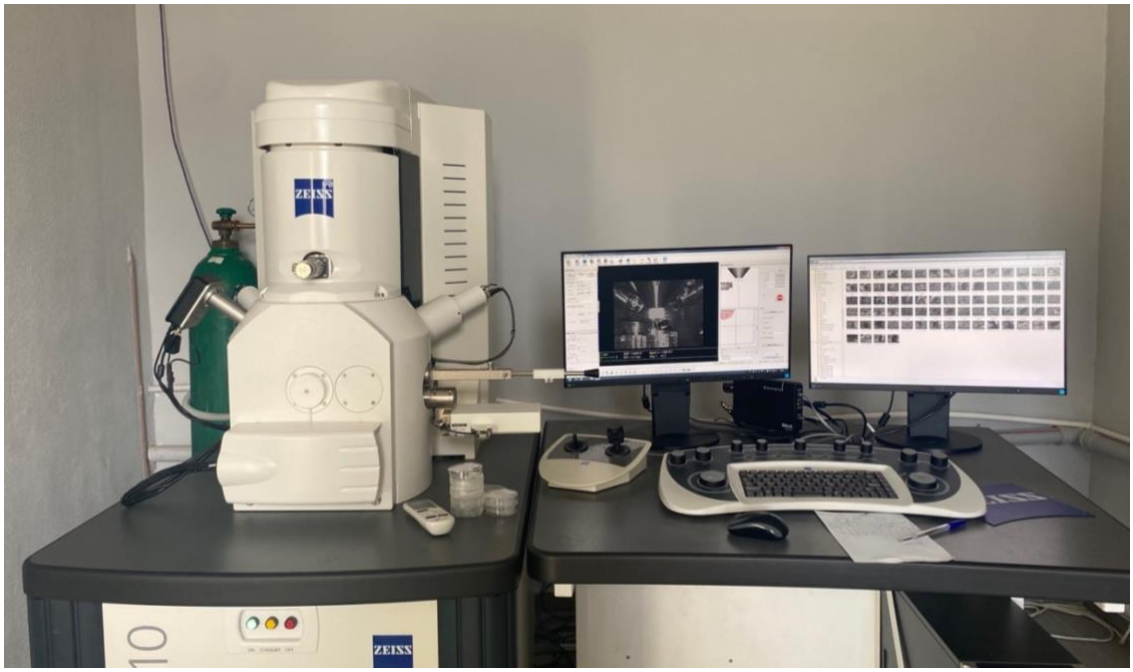
Elektropüskürtme sistemindeki toplama plakasında partiküllerin iğnenin uç tarafından daha kolay yakalayabilmek için toplama plakası alüminyum folyo ile sarılmıştır. Taylor koniğin oluşturduğu iğne ile toplayıcı yüzey arasındaki mesafe 10 cm olarak sabitlenmiştir. Deney sonuçlarının stabil olması için tüm deneyler boyunca parametrelerin hepsi aynı değerlerde tutulmaya çalışılmıştır.

Stabil nano/mikropartikül yapıları elde edildikten sonra çapraz bağlanmış nanofiber yapıları biriktirme yüzeyinde bulunan aleminyum folyo üzerine sabitlendi ve yaklaşık 2 saat nanopartiküllerle kaplama işlemi yapıldı.

2.3.5. Solüsyonların ve iskele yapılarının karakterize edilmesi

2.3.5.1. İskele yapılarının morfolojik analizi

Elektroeğirme yöntemiyle üretilen nanofiber yapıları elektron mikroskopu (SEM) (Şekil 2.5) kullanılarak karakterize edildi. SEM ile görselleri elde edilen nanofiber dokuları arasında 3 ve 4 numaralı numuneler düzensiz yapılı oldukları için deneye 1 ve 2 numaralı numune ile devam edilmeye karar verildi. Daha sonra, elektropüskürtme yöntemi ile kaplanan nanofiber ve üzerindeki nano/mikro partikül yapıları SEM kullanılarak karakterize edildi.



Şekil 2.5. SEM Elektron Mikroskopu.

SEM elektron mikroskobunda görüntülenme yapılmadan önce, üretilen eş eksenli numuneler kaplama cihazı ile (SC7620, Quorum) (Şekil 2.6) 18 nm kalınlığında altın/palladyum ile kaplanmıştır. Kaplanan numunler SEM elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Bu görüntülenme sonucunda, partikül ve fiber çap ölçümleri ve bunların dağılımları her bir örnekten rastgele 50-60 fiber ve/veya partikül seçilerek optik mikroskopu görüntü yazılımı (Olympus AnalySIS, ABD) kullanılarak ortalama çap boyutları ölçülmüştür.



Şekil 2.6. SEM'de Görüntülemek İçin Numunelerin Kaplama Cihazı.

2.3.5.2. Solüsyonların fiziksel karakterizasyonu

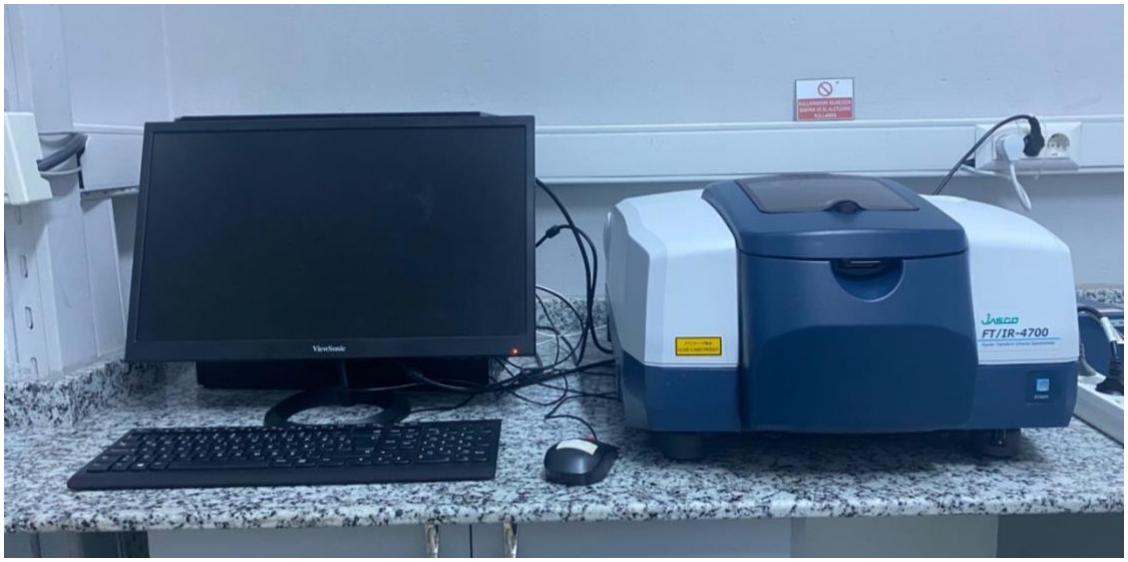
Hazırlanan nanofiber solüsyonlarının viskozite, yüzey gerilimi ve elektriksel iletkenlikleri gibi fiziksel değerleri bu aşamada elde edilecektir. Piknometre ile solüsyonların yoğunluğu ölçülmüştür. Yüzey gerilimini ölçmek için güç tensiyometresi (Biolin Scientific, Sigma 703D, Finlandiya) Wilhelmy methodu ile ölçülmüştür. Viskozite ölçme için viskozimetre (Brookfield, DV-E, ABD) kullanılmıştır. Solüsyonların elektriksel iletkenlikleri ölçmek için taşınabilir iletkenlik cihazı Şekil 2.7'de (WTW, Cond 3110, Almanya) ile ölçülecektir.



Şekil 2.7. Taşınabilir Elektrik İletkenlik Cihazı.

2.3.5.3. İskele yapılarının kimyasal analizi

Tablo 2.4'de İsimleri belirtilen nano/mikropartiküller kaplanmış nanofiber yapılarının kimyasal yapılarının tayini için Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrofotometre (Şekil 2.8) uygulanarak 4000-400 cm^{-1} tarama aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte analiz işlemi standart Ge/KBr detektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm oluşturulan spektra ölçümleri Spectra Manager® yazılımı ile kaydedilmiştir.



Şekil 2.8. Fourier Dönüşümü Kızıl Ötesi Spektrofotometre Ölçüm Cihazı.

Tablo 2.4. FT-IR Numune İsimleri.

	Numune İsimleri
1	%13 PVA
2	%13 PVA / %1 WP
3	%13 PVA + %1.35 E vitamini
4	%13 PVA + %2.7 E vitamini
5	%13 PVA / %1 WP + %1.35 E vitamini
6	%13 PVA / %1 WP + %2.7 E vitamini

2.3.5.4. İskele yapılarının termal özelliğinin analiz edilmesi

Nano/mikropartiküller kaplanmış nanofiber yapısının termal yapılarının tayini için diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı (Şekil 2.9) kullanılmıştır. Numunelerin her biri öncesinde tartılıp daha sonra tartılan bu numuneler alüminyum ölçüm kaplarına yerleştirilmiştir. 10 °C / dk oranı ile 25 °C ila 400 °C arası bir ısıtma uygulanmış aynı anda azot gazı altında bekletilmiştir. İskele yapılarının termal cam geçiş sıcaklığı (Tg), erime sıcaklığı (Tm) ve ısısal davranışları Shimadzu DSC- 60Plus cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.



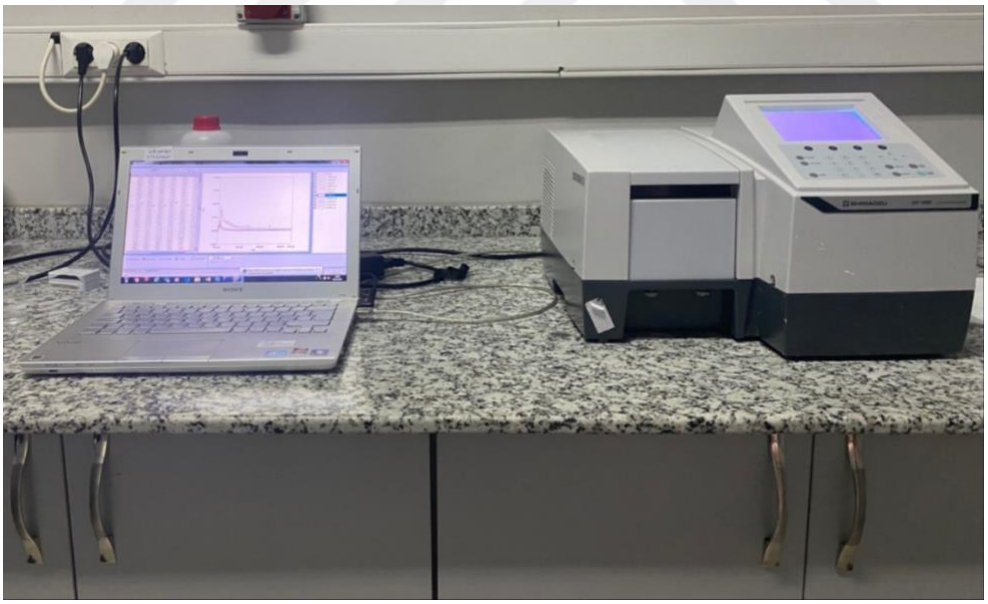
Şekil 2.9. DSC Termal Ölçüm Cihazı.

2.3.5.5. İskele yapılarının mekanik özelliklerinin incelenmesi

Üretilen iskelelerin mekanik özelliklerinin tespit etmek için çekme testi (Şekil 2.9) yapılmıştır. Çekme testi öncesinde, dijital mikrometre ile numunelerin kalınlıkları ölçülmüş ve çekme mukavemetini ölçmek için oluşturulan özel bir bilgisayar programına ölçüm sonuçları girilip (Bluehill 2, Elancourt, Fransa) test başlatılmıştır. Test sonuçları da bu program sayesinde elde edilmiştir.

2.3.6. İlaç salımı

İlk adım olarak ilaç salımında ilacın kalibrasyon eğrisi belirlenmelidir. Bu araştırmada ilacımız E vitaminidir. E vitamininin 5 farklı konsantrasyonu (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 ve 1 µg/mL) oluşturulmuş, oluşturulan bu numuneler vücut ortamını taklit etmesi amacıyla thermo çalkalayıcı inkübatör (BIOSAN TS-100) sıcaklığı 37 °C'ye ve çalkalama hızı ise 360 rpm olarak ayarlanmıştır. Salım profili, UV-1280 spektrometre kullanılarak yaklaşık olarak 208 nm' de incelenmiştir. Daha sonra ki adım ise, üretilen her iskeleden 5 mg tartılarak 1.5 ml'lik eppendorf tüplere konulup üzerlerine 1 ml PBS (pH:7.4) solüsyonu eklenmiştir. İlaç salımı için hazırlanan bu numuneler çalkalayıcı inkübatöre konulmuş ve 15 dk, 30 dk, 60 dk ve her bir saat artan aralıklarla ölçümler UV-1280 spektrofotometre ile 190 ve 400 nm aralıklarında gerçekleştirilmiştir. Her ölçüm sırasında eppendorf tüplerin içindeki 1 ml'lik PBS solüsyoun ölçümü yapılıp yerine yeni 1 ml PBS solüsyonu eklenmiştir. İlaç salımı grafiklerini elde etmek için ise yaklaşık 208 nm aralığında en yüksek salınım değeri veren kalibrasyon eğrisinin absorbans değerlerinden çizilerek elde edilmiştir. Bu test için kullanılan cihazlar Şekil 2.10'da gözterilmiştir.



Şekil 2.10. UV-1280 Spektrofotometre Ölçüm Cihazı.

2.3.7. Şişme testi

Üretilen iskelelerin vücut ortamında biyolojik bozunma oranını belirlemek için yapay oluşturulan in vitro ortamda şişme oranı test edilmiştir. İlk adım olarak, her iskeleden

üçer örnek tartılıp not edilerek eppendorf tüplere konulmuştur üzerlerine 1 ml PBS (pH:7.4)_solüsyonu eklenmiştir. İkinci adım olarak, hazırlanan numuneler sıcaklığı 37 °C'ye çalkalama hızı 360 rpm e ayarlanmış olan termal çalkalayıcı inkübatöre konulup 24 saatte bir tartılmıştır bu deney 7 gün devam etmiştir. Ölçümü alındıktan sonra her iskele yeniden aynı PBS içeren eppendorf tüplere geri koyulup, bir sonraki test için aynı şartlar sağlanarak termal çalkalayıcı inkübatöre koyulmuştur. Son adım olarak, ilk ağırlık üzerinden şişme yüzdesi hesaplanmıştır.

2.3.8. Hücre kültürü analizi

Hücre kültürü testi dört ana bölüme ayrılmıştır ve test sırasında kullanılan bütün solüsyonlar PAN Biontech tarafından tedarik edilmiştir;

2.3.8.1. Hücre kültürü için numune hazırlama

Hücre kültürü testi öncesinde tüm numuneler çapı 1cm olacak şekilde küçük daireler şeklinde kesildi. Kesilen numuneler 90 dakika boyunca UV yöntemiyle II Laminar flow kabin içerisinde steril edildi. UV işleminden sonra steril numunler 96'lık well plate içerisine eklenip üzerlerine 20 µL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) solüsyonu eklendi.

2.3.8.2. Hücre kültürü

Kas oluşumuna etki etmesi düşünülerek hazırlanan bu iskeleler kas hücresine dönüşebilen kök hücreye (mezenkimal kök hücre ATCC-PCS-500-011) ekilmiş ve hücre canlılığı incelenmiştir. İskeleler hücre üzerine ekilmeden önce karbondioksit etüvlü thermo inkübatörde, içerisinde %1 penisilin-streptomisin ve fetal sığır serumu, içeriğinde ise DMEM yüksek glikoza sahip 4.5 g/L D-Glukoz, L- Glutamin ve sodyum piruvat olan ortamda büyütülmüştür. Büyütülen hücreler DMEM ile eritilip, şişelere ekildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaşınca tripsin/EDTA yardımıyla pasajlandı. Daha sonra pasajlanan hücreler santrifüj öncesinde hemositometre yöntemiyle sayıldı ve ardından 5 dk boyunca 1500 rpm'de santrifüj edildi. Pellet kısmı ortam içerisinde çözüldü ve hücreler 96'lık plakalara aktarılmak için hazır hale getirildi. Ekim işlemi için hücreler, kuyucuk başına 2.500 hücreye sahip steril malzemeler 150 uL/kuyucuk için hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaka üzerine ekildi. Bu işlem birinci, ikinci ve üçüncü gün boyunca tekrar etti.

2.3.8.3. MTT testi

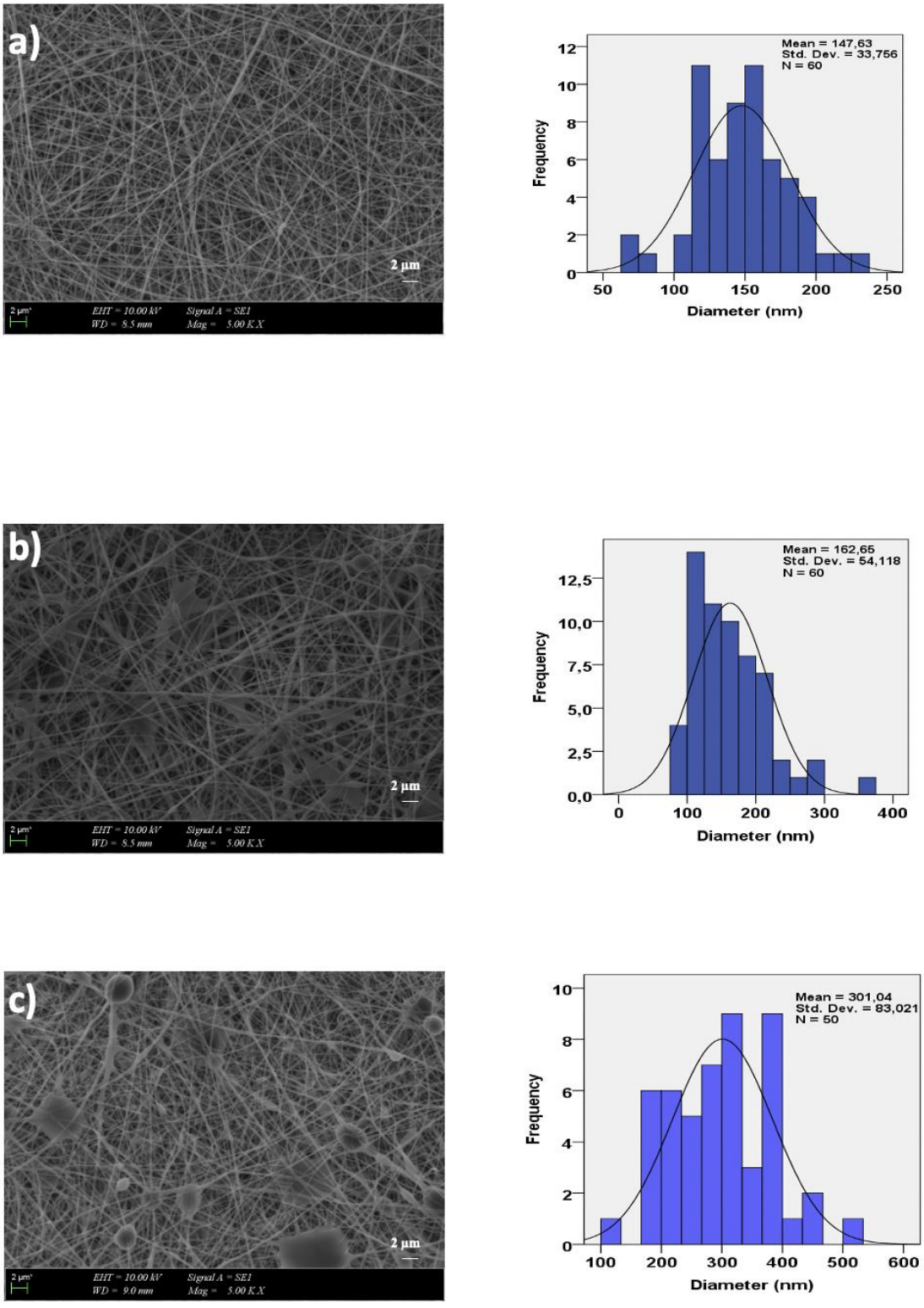
10 µL MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide)) çözücüsü 7 gün tamamlandıktan sonra ortam üzerinde eklenerek 37°C'de 4 saat boyunca %5 CO2 ortamında inkübe edildikten sonra hücre yapısındaki formasan kristalli yapılar azaltıldı. İnkübasyondan sonra var olan hücre için yapılmış ortam, DMSO (dimetil sülfoksit) ile değiştirildi. Daha sonra plaka karanlık bir ortamda oda sıcaklığında karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Absorbans değerleri 570 nm'de çoklu mikroplaka okuyucusu (VarioSkan Plate Reader, ThermoScientific) tarafından ölçüm işlemi tamamlandı.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Yaşlılığa bağlı kas erimesi rahatsızlığını tedavi etmek amacıyla kullanılmak istenen ve bu amaca uygun şekilde hizmet ettiğini kanıtlamak için WP/E vitamini nano/mikro kapsülleri ile kaplanmış PVA ve PVA/WP'den elde edilmiş nanfiber yapı iskelelerinin morfolojik, mekanik, kimyasal ve biyolojik özellikleri açısından incelenmiş ve sonuçlar tartışılmıştır.

3.1. İskele Yapılarının Morfolojik Analizi

Üretilen iskele yapılarının taramalı elektron mikroskobu ile yüzey ve kesit morfolojileri belirlenmiştir. İlk olarak Şekil 3.1'deki nanofiber yapıları daha sonra Şekil 3.2'deki iskele yapıları incelenmiştir. Uygun nanofiber solüsyon konsantrasyonuna ve uygulama parametrelerine SEM görüntülerine göre karar verilmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi, elektroeğirme işleminde, çekme kuvveti, iletkenlik ve viskozite arasındaki sınırlı aralıktaki rekabet, liflerin morfolojisini ve çaplarını etkiler. WP eklendikçe solüsyonun viskozitesi de artmış olur. Şekil 3.1 c'de görüldüğü üzere %13 PVA ve %3 WP'den elde edilmiş nanofiber yapısında istenmeyen boncuklu ve damlacığa benzer yapılar olduğu gözlemlenmiştir. Bu istenmeyen yapıların WP oranının fazla kullanımından dolayı olduğu düşünülmektedir. Diğer nanofiber yapılarının stabil olması da bu teoriyi destekler niteliktedir. Daha önceki çalışmalarda da öngörüldüğü gibi, Doğal veya denatüre haldeki WP'nin elektroeğirme için yeterli dolaşma veya etkileşime sahip olmadığını varsayıyoruz ve bu çalışmalar da aynı zamanda solüsyona WP ekledikçe nanofiber yapısının bozulduğu da gözlemlenmiştir [31,32]. Şekil 3.1'a ve Şekil 3.1 b'de görüldüğü üzere %13 PVA ve %13 PVA ve %0,5 WP'den üretilen nanofiber yapıları elektroeğirme tekniği ile başarıyla elde edilmişlerdir. Şekil 3.1 a'daki sadece PVA'dan elde edilmiş nanofiber yapısının çok daha ince olduğu ve nanofiberlerdeki WP oranları arttıkça nanofiber çaplarında büyüme ve yapılardaki boncuklanma oranı da aynı şekilde artmıştır.



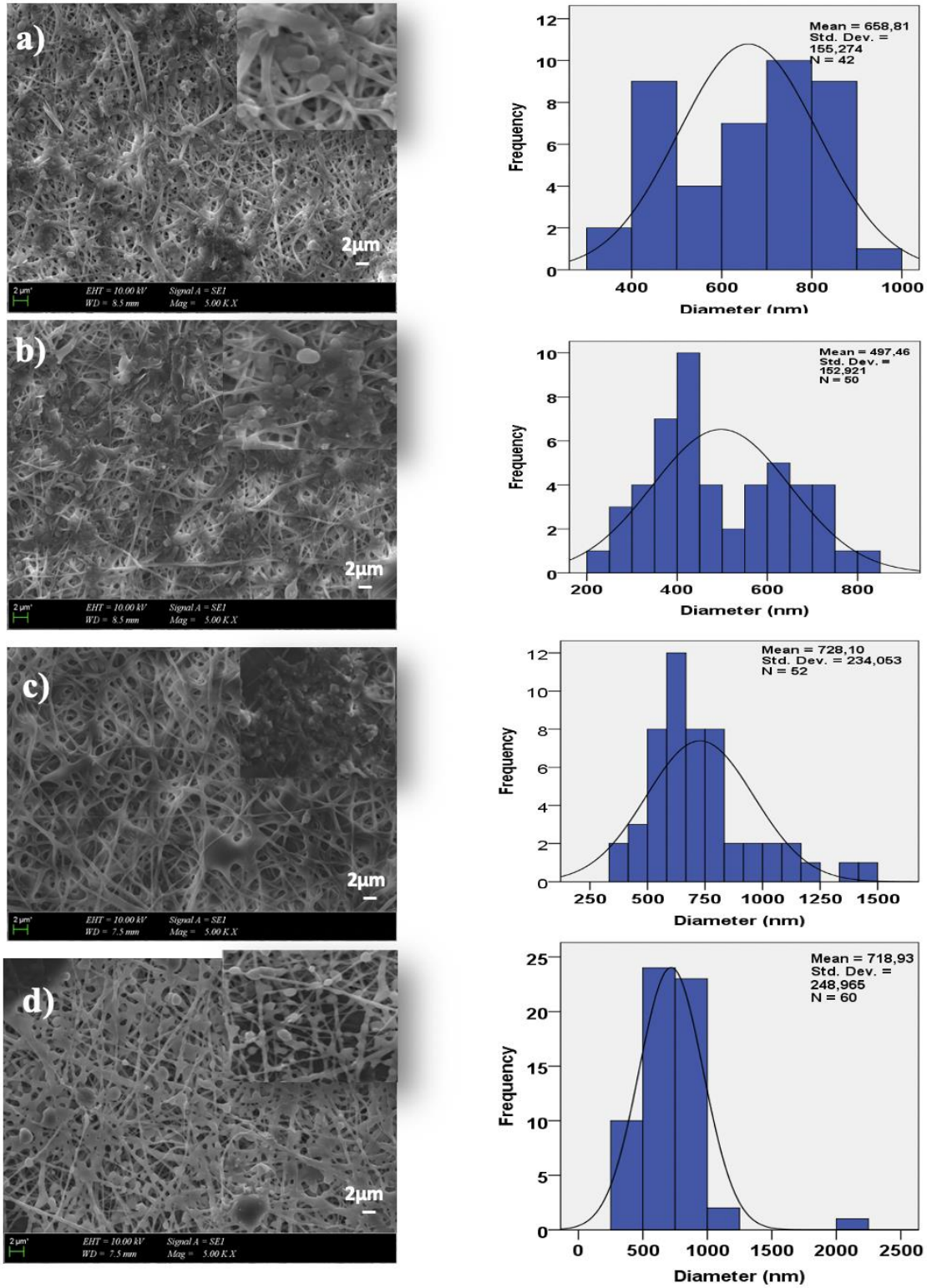
Şekil 3.1. a) %13PVA, b) %13PVA/%0.5 WP, c) %13PVA/%3 WP Nanofiber Yapılarının SEM İle Elde Edilmiş Görüntüleri.

%13 PVA + %3 WPden oluşan nanofiber yapısının bu çalışma için uygun olmadığı SEM görüntülerinden sonra karar verilmiştir ve %13 PVA ve %13 PVA+%0.5 WP içeren nanofiber solüsyonları ile çalışmaya devam edilmeye karar verildi.

Şekil 3.2'de gösterilen iki saat boyunca WP ve E vitamini nano/mikro kapsülleri tarafından elektropüskürtme yöntemiyle kaplanmış iskeler incelendiğinde, partiküllerin başarıyla elde edildiği gözlemlenmiştir. WP ile enkapsüle edilmiş E vitamini ile kaplanan nanofiberler incelendiğinde, üzerlerindeki partiküllerin ortalama çapı yaklaşık 0,645 µm olan küresel bir yapıda olduğu ve partiküllere E vitamini ilavesinin ve E vitaminin miktarının partikül morfolojisinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir. Şekil 3.2 b'deki üzeri %2,7 E vitamini solüsyonu ile kaplanan %13 PVA'dan elde edilmiş nanofiberin üzeindeki partiküllerin boyutu diğer iskelelerden daha küçük olduğu gözlemlendi. En büyük partikül çaplarına sahip olan iskelelerin ise WP eklenerek elde edilen nanofiberli iskelelerde olduğu gözlemlenmiştir. Bu partikül boyutları ortalama olarak şu şekildedir;

- PVA+1.35%Vit.E, 0,6588±0,155 µm
- PVA+2.7%Vit.E, 0,4974 ±0,152 µm
- PVA/WP+1.35%Vit.E, 0,7184±0,215µm
- PVA/WP+2.7%Vit.E, 0,7281±0,253 µm

Nanofiberler üretildikten sonra çapraz bağlama yapılmıştır bunun nedeni PVA ve WP materyallerinin hidrofilik olmasıdır ayrıca üzerlerine kaplanacak materyalinde hidrofilik olmasıdır. Elektropürkürtme tekniği ile kaplama işlemi sırasında nanofiberlerin erimesi gözlemlenmiştir ve böylece çapraz bağ yaparak nanofiberleri daha kompleks bir yapıya getirerek suda çözünmeyen bir malzeme haline getirilmek istenmiştir. Buna rağmen, Şekil 3.2 c'de PVA/WP+1.35 %Vit.E'nin SEM görüntüsü incelendiğinde damlacıklı yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, çapraz bağlama işlemi sırasında oluşan bir nedene bağlanmıştır. Diğer iskeleler incelendiğinde Şekil 3.2 d'de PVA/WP+2.7 %Vit.E'li iskelenin nano/mikropartiküllerin nanofiber boyunca dağılımı daha düzenli görünmektedir.



Şekil 3.2. Partiküllü İskelelerin SEM Görüntüsü.

3.2. Solüsyonların Karakterize Edilmesi

Nanofiberleri oluşturan polimer çözeltilerinin fizikokimyasal özellikleri nanolfiberlerin morfolojisini ve bükülebilirliklerini etkiler. Tablo 3.1'e göre, PVA ve PVA/WP çözeltilerinin nanofiber davranışının ve döndürülebilirliğinin yorumlanması için iletkenlik, yüzey gerilimi, viskozite ve pH değerleri ölçülmüştür. PVA çözeltilerinin iletkenliği ve viskozitesi, konsantrasyonunun fonksiyonu sabit bir PVA konsantrasyonunda, artan WP konsantrasyonu, çözeltilerin iletkenliğinde bir artmaya neden oldu. Elektro eğirme için gerekliliklerden biri solüsyon bileşenlerinin iletkenliklerinin katkıda bulunduğu eğirme çözeltisinin belirli bir genel elektrik iletkenliği seviyesinde olmalıdır [33]. Literatürde elektrik iletkenliği ve nanofiber yapısı arasındaki ilişki için şöyle bahsedilmiştir; daha yüksek elektriksel iletkenliğe sahip bir çözelti, bir jetin ekseni boyunca daha yüksek uzamasına neden olur ve böylece daha küçük çaplı elektrospun lifleri verir [33]. Fakat bu çalışmada tam tersi görünür, bunun sebebi WP eklendikçe artan nanofiber çapını viskozite ile bağdaştırabiliriz.

Tablo 3.1. Solüsyonların Fiziksel Özelikleri.

	Elektrik İletkenliği (µS/cm)	**Yüzey Gerilimi (mN/m)**	**Viskozite (mPa.s)**	**pH**
%13 PVA	487	64.022±1.35	1738±4,58	6.43
%13 PVA/WP	790	42.39±3.1	2293±16.07	7.02

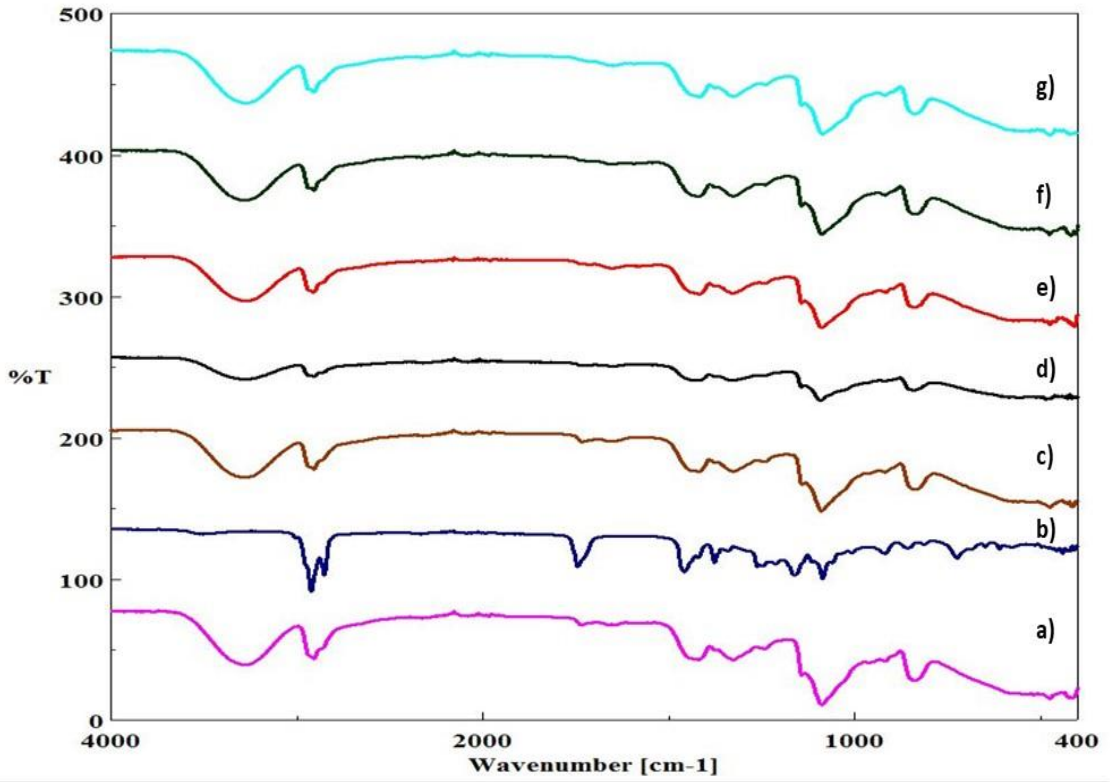
Yüzey gerilimi, polimerin konsantrasyonu ve viskozitesi düşük olduğunda solüsyonun eğrilebilmesini kontrol eder [34**].** PVA ve WP karışımının yüzey geriliminin düşmesine öncelikle proteinlerin neden olduğu varsayılmıştır. Literatürde, test edilen tüm proteinler, çözeltilerin yüzey gerilimini düşürmesine rağmen, yüzey aktivitesinin kapsamının bu proteinler arasında değişiklik gösterdiği ortaya çıktı [35]. WP'in soya proteini, bezelye proteini ve pirinç proteini gibi bitki proteinlerine kıyasla daha düşük bir yüzey aktivitesine sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür [36]. Deneyde de görüldüğü gibi, WP eklenen solüsyonun yüzey gerilimi düşmüştür.

Viskozite, polimerlerin konsantrasyonunun ve moleküler ağırlığının bir fonksiyonudur. Bu, artan protein konsantrasyonu ile viskozitedeki artışı ve ayrıca daha yüksek viskoziteyi açıklar.

Protein çözeltilerinin iletkenliği esas olarak amino asit profili ve ortamın pH'ı ile ilgilidir. PVA solüsyonuna WP eklediğinde, pH değerinin yükseldiği görülmüştür.

3.3. İskelelerin Kimyasal Özellikleri

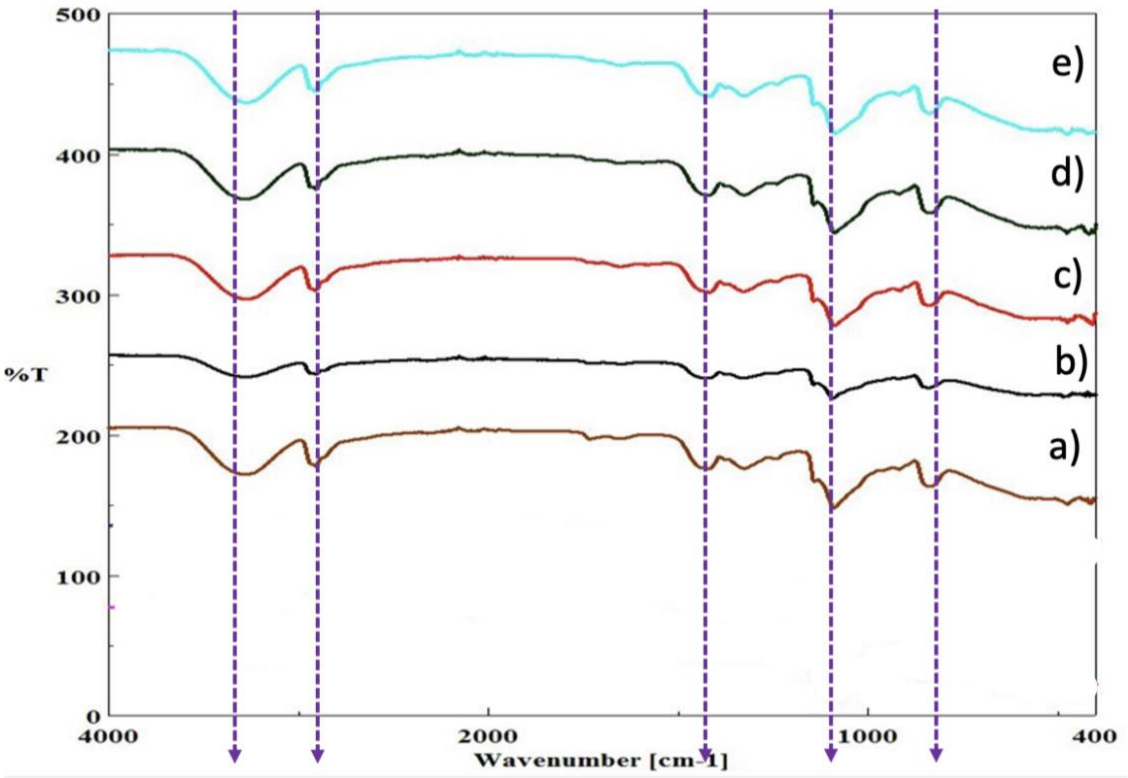
Nanofiberler, E vitamini, Whey protein ve WP/E vitamini ile kaplanmış nanofiber yapılarının fourier transform kızılötesi spektroskopisi kimyasal yapıların belirlenebilmesi için kullanılmıştır. Analiz yapılması istenilen dalga boyu aralığı 400-4000 cm^{-1} olarak belirlenmiştir. Şekil 3.3'de çeşitli konsantrasyonlara sahip malzemelerin absorbans-dalga boyu pikleri verilmiştir.



Şekil 3.3. WP (a), Vit.E (b), PVA/WP+1.35% Vit.E (c), PVA/WP+2.7%Vit.E (d), PVA 13% (e), PVA+1.35% Vit.E (f), PVA+2.7% Vit.E (g) FT-IR Analizleri.

Toz WP ve kapsül olarak E vitamini spektrumları karşılaştırma amacıyla dahil edilmiştir. Saf WP tozlarından elde edilmiş spektrumlar Şekil 3.3a'daki gibidir. Şekil 3.3a'da WP

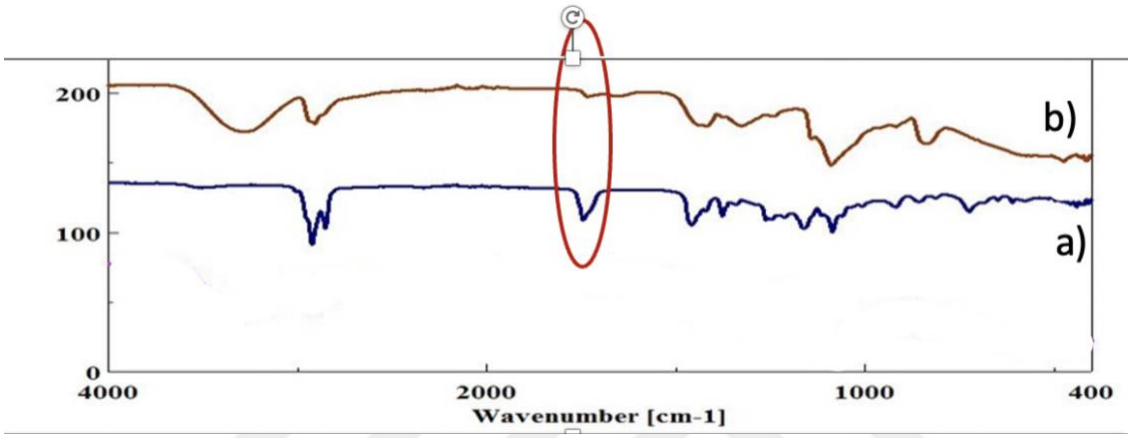
spektrumunda, 3282 cm^{-1} civarında N-H germe bandı ve 1642 ve 1527 cm^{-1} 'deki karakteristik absorpsiyon bantları sırasıyla amid I ve amid II'nin varlığını gösterdi, bu pikler WP için karakteristik tepe noktalarıdır. Ayrıca 2950 cm^{-1} civarında C-H germe ve bükme (1481,06-1386,57 cm^{-1}) dalga boyları gözlemlenmiştir. Şekil 3.3e'de görülen sap PVA nanofiberinin dalga boyları ise şu şekildedir; 3200 cm^{-1} civarında OH germe bandı ve 2950,55 cm^{-1} civarında C-H germe ve 1480-1390 cm^{-1} civarında ise C-H bükme dalga boyları görülmüştür. Diğer tepe noktaları sırasıyla 1085,73 cm^{-1} ve 916,02 cm^{-1} ve 835,03 cm^{-1} 'deki C=O germe, CH2 sallanma ve C–C germedir [37].



Şekil 3.4. PVA/WP+1.35% Vit.E (a), PVA/WP+2.7%Vit.E (b), PVA 13% (c), PVA+1.35% Vit.E (d), PVA+2.7% Vit.E (e) FT-IR Analizleri.

Şekil 3.4'de görüldüğü gibi nanopartiküllü iskelelerin spektrumlarında, OH ve NH germe titreşimlerinin FTIR aralığında (yani ~3000'den ~3700 cm^{-1}'e) bir kayma gözlemlendi. Karışımlardaki bu bandın maksimumu, PVA için maksimum bant ile WP için maksimum arasındaydı, ancak WP'nin NH germe bandının dalga boyu maksimumuna daha yakındı. Bu, PVA'dan gelen OH grupları ile WP'den gelen NH grupları arasındaki hidrojen bağlarının, bant tepelerinin kaymasında muhtemelen bir rol oynayabileceğini göstermektedir [38]. Şekil 3.4'de nanopartiküllü iskelelerin spektrumları incelendiğinde.

Amid I ve Amid II piklerinde kaymaların olduğu gözlemlendi. Amid I titreşiminin ikincil yapıya duyarlılığı, kızılötesi spektroskopi ile protein katlanması, açılması ve toplanmasının izlenmesini mümkün kılar. Amid I veya II zirvelerinin bantlarındaki bir kayma, hücre içi proteinlerin ikincil yapılarındaki değişikliklerin bir göstergesidir [39]. Diğer araştırmacıların bildirdiği gibi, Amid II bandının daha yüksek dalga boylarına doğru kayması, PVA'nın hidroksil grupları ile WP'nin amino grupları arasında güçlü etkileşimlerin olabileceğini düşündürmektedir [40].



Şekil 3.5. Vitamin E (a) ve PVA/WP+1.35% Vit.E (b) FTIR Spektrumları.

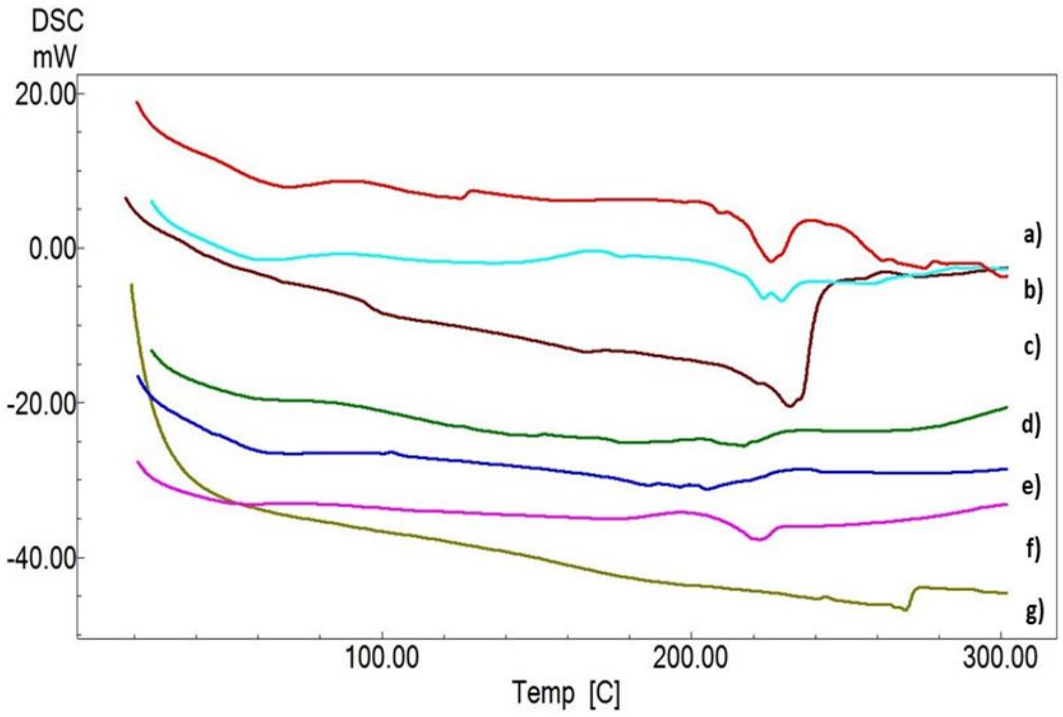
E vitamini spektrumunda da görüldüğü gibi (Şekil 3.3b), metil asimetrik ve simetrik bükülme tepe noktaları sırasıyla 1466 cm^{-1} ve 1378 cm^{-1}'de görülür; Fenolün C–O gerilmesi 1260 cm^{-1}'de görülür; eter grubu 1093 cm^{-1}'degörünür; C=O titreşimi 1722,12 cm^{-1} görünür; C–H gerilmesinin absorpsiyon zirvesi 2847 cm^{-1} ve 2918 cm^{-1} 'de görünür. Bununla birlikte, düşük E vitamini konsantrasyonu nedeniyle PVA/WP+2.7%Vit.E, PVA+1.35% Vit.E ve PVA+2.7% Vit.E aynı spektrum aralığında vitamin-E'nin ana absorpsiyon bantlarını belirlemek zordur. Fakat Şekil 3.5'de görüldüğü üzere PVA/WP+1.35% Vit.E isimli iskelede çok küçükte olsa ~ 1700 cm^{-1} 'de C=O titreşimi görülmüştür.

Genel olarak nanopartikül ile kaplı iskelelre bakıldığında aynı tepe noktalarını verkleri görülür. Bu da elektroeğirme yoluyla elde edilen iskele spektrumları, kompozit nanoliflerde hem WP hem de PVA'nın bir arada bulunduğunu gösterir.

3.4. İskelelerin Termal Özellikleri

Amorf katılarda, kalite ve fiziksel özelliklerindeki değişikliklerle ilgili olan, kalorimetrik olarak saptanabilen iki ana geçiş vardır; cam geçişi ve entalpi gevşemesi. Malzemelerin Tg, cam geçiş sıcaklığını ve Tm, erime sıcaklığını belirlenmiştir. PVA, PVA/WP nanopartiküllü nanoliflerinin bu termal özellikleri DSC ile değerlendirilmiştir. Kapsül olarak E vitamini spektrumları karşılaştırma amacıyla dahil edilmiştir.

Şekil 3.6'da görüldüğü gibi E vitamininin Tg noktası 60 ° C civarında belirlenmiştir. Tm noktası ise 270 ° C civarlarında belirlenmiştir. Öte yandan, iskelelerde Tg noktası belirlenememiştir. Saf PVA'da yaklaşık olarak 225°C civarlarında erime noktası gözlemlenmiştir. İskelelerin yapılarının konsantrasyonlarının çoğu PVA olmasına rağmen Şekil 3.6a, Şekil 3.6b ve Şekil 3.6c'de de erime noktalarında kayma görülmüştür. Bunun sebebi içeriklerindeki Vitamin E ve WP olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, yapısında WP bulunmayan isklelerde Tg ve Tm noktalarının belirlenmeyişi de bu teoriye katkı sağlar.



Şekil 3.6. PVA/WP+%2.7 Vit.E (a), PVA/WP+%1.35 Vit.E (b), PVA/WP (c), PVA+%2.7 Vit.E (d), PVA+%1.35 Vit.E (e), PVA (f), Vit.E(g) DSC Eğrileri.

3.5. İskelelerin Mekanik Özellikleri

Mekanik özellikler, kas hücreleri için kullanılacak bu iskelelerin hücre içindeki uygulamalar sırasında çevresel strese ve bariyer özelliklerine karşı korumak için gereklidir. Hücre içerisinde kullanılacak iskelelerin uygun sertlik ve yumuşaklığa sahip olması beklenir. Fazla sert veya yumuşak olması istenmeyen özelliklerdendir. Bu iskelelerin çekme mukavemeti belirlenmiştir. PVA/WP+1.35% Vit. E, PVA/WP+2.7%Vit.E, PVA 13%, PVA+1.35% Vit.E ve PVA+2.7% Vit.E iskelelerinin çekme testi sonuçları tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. PVA/WP, PVA/WP+1.35% Vit.E, PVA/WP+2.7%Vit.E, PVA 13%, PVA+1.35% Vit.E ve PVA+2.7% Vit.E İskelelerinin Çekme Testi Sonuçları.

Scaffolds	Tensile strength (MPa)	Strain at break (%)
13wt.% PVA	9.04 ± 1,02	6.04 ± 5.27
13wt.% PVA + 1.35wt.% Vit E	8.14 ± 1.61	15.4± 0.28
13wt.% PVA + 2.7wt% Vit E	8.48± 0.42	5.69± 2.02
13wt.% PVA + 0.5wt.%WP	8.68± 0.10	5.21± 1.58
13wt.% PVA + 0.5wt.%WP+ 1.35wt.%Vit E	8.26± 1.82	19.12± 11.38
13wt.% PVA + 0.5wt.%WP+ 2.7wt% Vit E	8.38 ± 2.27	5.71 ± 0.9

Tablo 3.2'deki sonuçlar incelendiğinde PVA ve PVA/WP'den elde edilmiş nanofiberler kaplandıktan sonra çekme mukavemetlerinde çok ciddi değişimler görülmemiştir.Saf PVA ile elde edilen nanofiber iskelesinin gerilme dayanımı 9.04 ± 1,02 MPa çıkmıştır. Daha sonra saf PVA ile elde edilen iskeleler partikül ile kaplandıktan sonra çekme dayanımlarında çok büyük değişiklikler olmamıştır. Sırasıyla PVA+1.35% Vit.E ve PVA+2.7% Vit.E yapılarının çekme dayanımları, 8.14 ± 1.61 MPa ve 8.48± 0.42MPa olarak belirlenmiştir.

Öte yandan, PVA ve WP'den elde edilen nanofiberin WP eklendikten sonra gerilme dayanımının düştüğü görülmüştür.Sırasıyla PVA/WP, PVA/WP+1.35% Vit.E ve PVA/WP+2.7%Vit.E iskelelerinin gerilme dayanımları, 08.68± 0.10 MPa, 8.26± 1.82 MPa ve 8.38 ± 2.27 MPa olarak ölçülmüştür.

Her iskelenin %1.35 E vitamin ile kaplanan nanofiberinin kopma uzaması en yüksek değeri vermiştir. Kopma uzamasındaki artış dokuların güçlenmesine neden olan yapıların kütle artışından kaynaklanıyor olabilir.

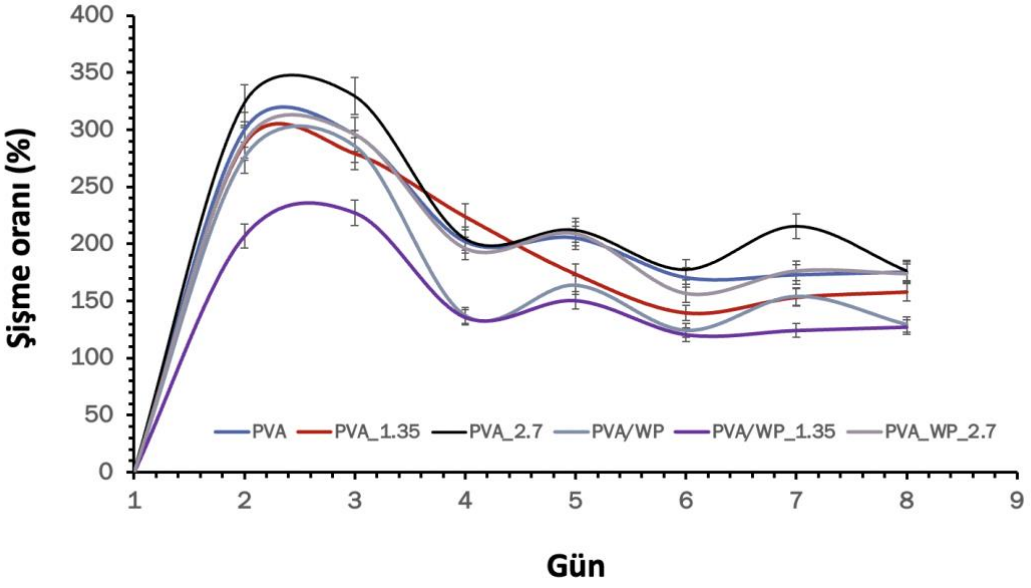
3.6. İskelelerin Şişme Davranışları

Biyomedikal uygulamalar için iskele yapılarının şişme davranışı hücrenin düzgün büyümesi ve çoğalması için besinlerin difüzyonu üzerindeki etkisinden dolayı çok önemli bir yerdedir. Şişme gücü jelatinleştirilmiş solüsyonların özelliklerinde önemli bir rol oynar ve kullanılan malzemelerin yapısal bütünlüğü, su emme şişme kapasitesi ve moleküller arası hidrojen bağlarının gücü ile ilgilidir [41]. Bir iskelenin şişme oranı, iskeleyi elde ettiğimiz materyallerin hidrofilikliğine ve yapısının sertliğine bağlıdır. Çapraz bağlı hidrofilik polimer ağlarından oluşan nanofiberler, suda çözünmek yerine şişme davranışı gösterir. Şişme özelliği, kontrollü ilaç salımı için iskelelerin çevreye duyarlı şişmesinde faydalıdır. İskeleler, şişme sırasında kütle transferinde yer alan difüzyon katsayılarını etkileyen bir dizi poroziteye sahiptir. Bu yapmış olduğumuz testte, iskelelerin su absorbsiyon yetenekleri PBS (pH:7.4) solüsyonu kullanılarak incelenmiştir.

Şekil 3.7 incelendiğinde, PVA'dan elde edilmiş nanofiber yapısının ve kaplanan PVA nanofiberlerinin, nanofiber yapılarında WP' bulunduran iskelelere göre PBS solüsyonunu hızla emdiği ve yüksek şişme davranışı gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bulguya göre WP'nin şişme gücünü azalttığı varsayılmıştır. Literatürde de yapılan bir çelışmada WP

eklenen nanofibelerin şişme becerisi düşmüştür [42]. Nanofiber yapılarında WP bulundurmayan nanofiberlerin ilerleyen günlerde bu şişme davranışı sabit bir hızları devam etmektedir. PVA ve PVA/WP'den elde edilmiş nanofiber ve kaplanmış iskeleler karşılaştırıldığında %2.7 E vitaminine sahip iskeleler daha yüksek şişme davranışına sahiptir. Aynı şekilde PVA nanofiberi de örnekler arasında yüksek şişme davranışa sahip bir diğer iskeledir. Gösterdiği bu yüksek şişme davranışın sebebi hidrofiliklik ve gözeneli yapısına bağlanabilir.

Diğer nano/mikro partikül ile kaplanmış iskeleler incelendiğinde, PVA/WP + 1.35 E vit. nanofiberleri 1. Günden itibaren düşük şişme davranışı göstermiş ve 7. Güne kadar bu davranışı devam etmiştir. 7. Günün sonunda en yüksekten en düşük şişme kabiliyetli iskeleler sırasıyla şu şekildedir; PVA+%2.7 Evit, PVA, PVA/WP+%2.7 Evit, PVA+ %1.35 Evit, PVA/WP, PVA/WP+1.35 Evit'dir.



Şekil 3.7. PBS'de Bekletilen İskelelerin Şişme Grafikleri.

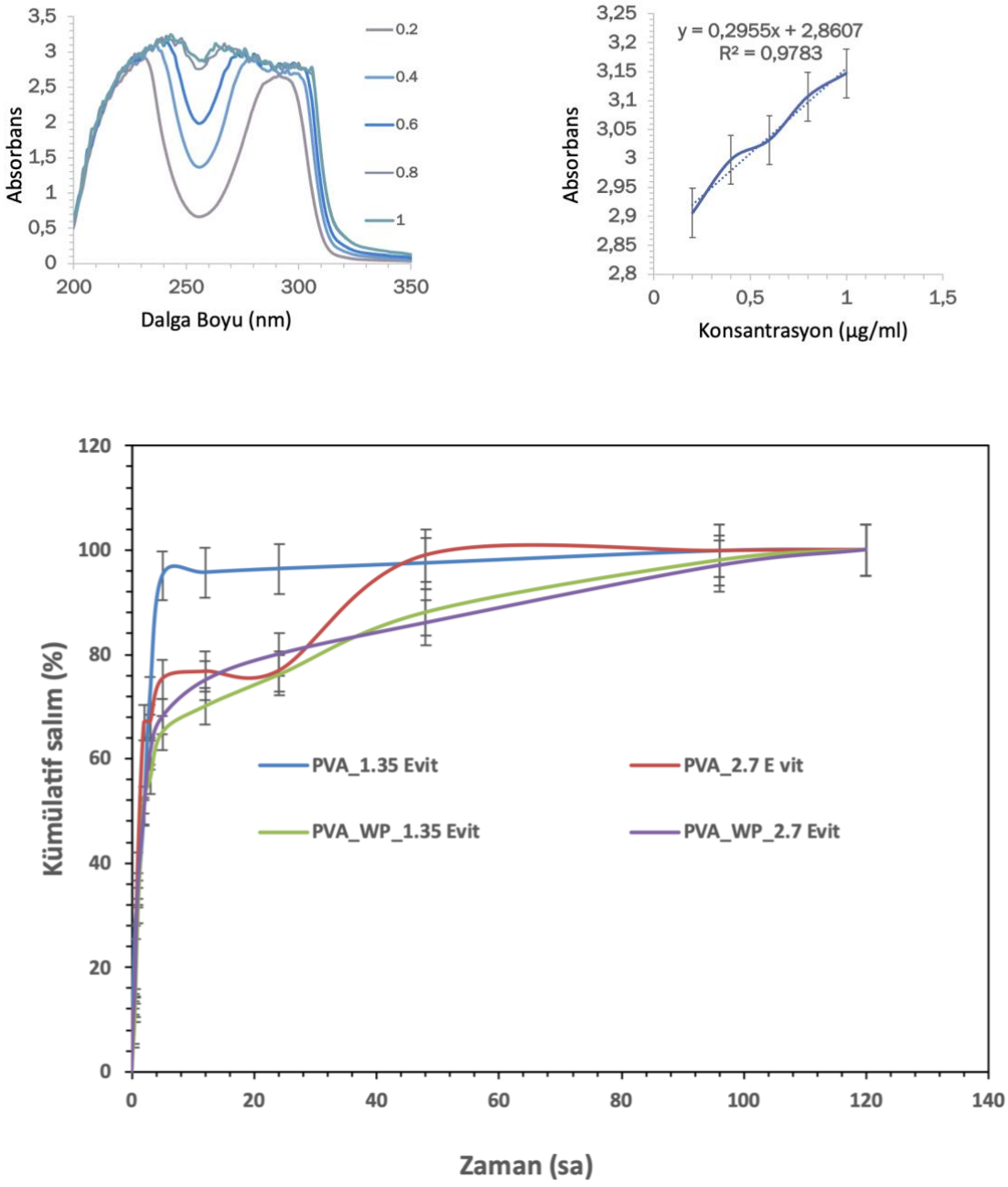
Çeşitli konsantrasyonlu E vitamini ile kaplanmış iskeleler arasında bu şişme davranışı farklılıklarının sebebinin kaplama işlemi sırasında elektropüskürtme işleminde tek bir yere çok fazla partikül gitmesinden ve diğer alanların daha az partikül ile kaplanmasından ve bu olayın gözeneklilik olayını etkilediği böylece bu şişme davranışı farkının böyle oluştuğu varsayılmıştır.

Bu sonuçlar bize kaplama işleminde kullanılan E vitaminin oranının iskelelerin şişme davranışını etkilemediğini ve böylece çok önemli olmadığını gösterir.

3.7. İskelelerde İlaç Salımı

Aktif maddenin hidrofilik matris sisteminden salınması, çözünme, dağılım ve bozunma mekanizmalarının karmaşık etkilerinin bir sonucudur. Genel olarak, verilen bileşenlerin göçü, salım ortamının fiziksel şekli (küremsi, film, jel, vb.), salım durumu (statik veya dinamik) ve polimer matris özellikleri (gözenekli veya birikmiş) ile ilgilidir. Hidrofilik polimerler hızla degredasyona uğrayabildikleri için biyoaktif maddeler ve ilaçların kontrollü salınımında kullanılan uygun taşıyıcılardır. Ayrıca çözücüleri genellikle su olduğundan biyoaktif maddeler ve ilaçların toksik çözücülerle teması engellenerek muhtemel bozulmalar engellenmiş olur [43]. Ancak, ani ilaç salımı, yüksek konsantrasyonların toksisitesi ve biyoaktif bileşenin kısa yarı ömrü gibi olumsuz etkilere sahiptir ve kontrolsüz ilaç salımına neden olur. Kullandığımız malzemeler E vit. Hariç hepsi hidrofilliktir. Hidrofiliklik ilaç salımının hızlı bir şekilde olmasına neden olur. İlaç salım hızını düşürmek ve vücut içinde salımını daha uzun süre devam edebilmesi için nanofiberler WP ile enkapsüle edilmiş E vit. İle kaplanmıştır. Ayrıca, E vit'in WP ile enkapsüle edilmesi ilaç dolaşım süresini uzatabilir, bu da sürekli ilaç salma davranışı sağlayabilir, biyoyararlanımı ve stabiliteyi iyileştirebilir [44]. Bunların dışında kullanılan numunenin gözenekliliği ve ilaç salımı yapılan ortamın pH'ı da salım davranışını etkiler.

Salım çalışmalarında, insan gastrointestinal sisteminde ilaçların ya da bizim deneyimizde E vitamininin salımını simüle etmek için pH 7.4 değerlerinde çözünme ortamı seçildi. E vitamininin nötr pH koşulu altında ilaç salım deneyleri, ultrasonik banyo kullanılarak 37 °C'de 15 dakika ile 8000 dakika arasında (15-30 dakika ve 1 saat aralıklarla) gerçekleştirilmiştir. Kümülatif salım yüzdesi, kalibrasyon eğrisinden elde edilen konsantrasyonlar kullanılarak hesaplandı ve salım grafiği hazırlanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. İlaç Salım Grafiği

İlaç, 232nm civarında tepe noktası verdiği gözlemlenmiştir. Nanofiber yapılarında sadece PVA olan iskeleler, PVA ve EP olan iskelelerden daha hızlı ilaç salımı yapmıştır. Nanofiberde WP varlığı ilaç salımını yavaşlatmıştır. En hızlı ilaç salımı yapan PVA+%1.35 E vit. İskelesi salımın 5.saaatinde %95 salım göstermiştir. Öte yandan daha yüksek E vitamini konsantrasyonlu olan PVA+%2.7 E vit. İskelesi 5. Saatinde %75 salım göstermiştir.

İskeleler incelendiğinde WP eklenmiş nanofiberli numunelerin ilaç salımı daha yavaş ve kontrol edilebilir bir hızla salım yaptığı gözlemlenmiştir.. Özellikle, E vitaminin konsantrasyonun daha fazla olduğu PVA/WP+%2.7 E vit. İskelesi daha stabil ve yavaş PBS solüsyonu içinde salındığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, aynı E vitamini kaplama konsantrasyonuna sahip PVA+%2.7 E vit. İskelesi de diğer PVA nanofiberli iskeleye göre daha yavaş salınmıştır.

E vitaminin hidrofobik yapısı salımı yavaşlatmış ve daha kontrol edilebilir bir salım gerçekleştirmişitr. Ayrıca PVA/WP nanofiberi içeren iskelelerde daha stabil bir salım göstermişlerdir. Literatürde'de yapılan bir çalışmada E vitamini varlığı salımı daha stabil hale getirmiştir. [45].

3.8. Hücre Analizi Testi

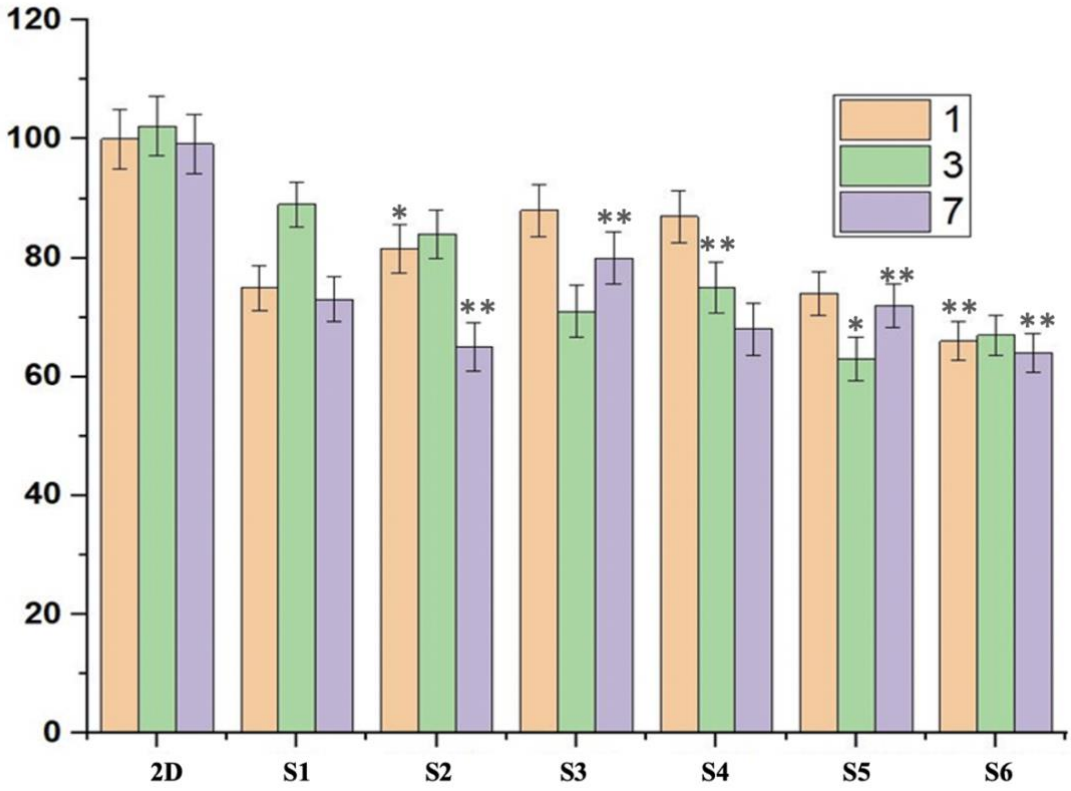
Üretilen nano/mikropartikül ile kaplanmış nanofiber iskelelerinin hücre ile etkileşimlerini öğrenmek için hücre testi analizi yapılmaktadır. Hücre olarak, kas hücresine dönüşebilen mezenkimal kök hücre (ATCC-PCS-500-011) kullanılmıştır. Ürettiğimiz yapay iskele ve kök hücre arasındaki etkileşimi, hücreninin iskele üzerindeki yaşayabilirliğini ve biyouyumluluğunu test etmek için çok önemli bir adımdır. Tablo 3.3'de numune isimlerileri verilmiştir. Şekil 3.8'de ki grafik incelendiğinde ilk olarak üretilen nanofiber yapılarını karşılaştırdığımızda, saf PVA'dan elde edilmiş S1 numunesinin hücre canlılık oranı 1.gün %75 civarlarında. 3. Gün bu oran daha da yükseliyor ve %90'ları buluyor son 7. Gündeki ölçümde ise tekrar %70 civarlarına düşerek hücre canlılığında bir azalma gözleniyor. Öte yandan WP eklenen nanofiber iskelesinin canlılık değerleri ise şu şekildedir; 1.gün %85 civarlarında, 3.gün biraz daha artarak yine %85 civarlarında olduğu görülmüştür ve 7. Gün bu oranın %70'in altına düştüğü gözlemlenir. Bu sonuca bakarak S1 ve S2 karşılaştırıldığında, WP'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin nanofiber yapılarının biyouyumluluğunu dereceli şekilde arttırdığı söylenebilir. Nanofiberlerin 7.günü hariç diğer günlerdeki ölçümlerinde %75 ve üstünde hücre canlılığı gördüğümüz için bu iskelelere biyouyumlu vetoksisite oranına göre (B/T 16886.5–2003 (ISO 10993–5: 1999)) toksik değil diyebiliriz [46].

Tablo 3.3. Hücre Analizi Numune Kodları.

Numune İsimleri	**Numune Kodları**

%13 PVA	S1
%13 PVA/%0.5 WP	S2
%13 PVA + %1.35 E Vitamini	S3
%13 PVA + %2.7 E Vitamini	S4
%13 PVA/%0.5 WP + %1.35 E Vitamini	S5
%13 PVA/%0.5 WP + %2.7 E Vitamini	S6

Nanopartiküllü numuneler incelendiğine, %2,7 E vitamini oranı ile kaplanmış nanofiber numunelerinde (S4, S6), %1.35 E vitamini ile kaplananlara (S3, S5) kıyasla kademeli bir görülmüştür. S3 ve S5 numunesi incelendiğinde sadece bu numunelerde 7.gün hücre canlılığı değerlerinde artış görülmüştür. 7.gün'de S3 ve S5 sırasıyla yaklaşık olarak %80 ve %75 olarak değerlendirilmiştir. Bu deneyde S3 numunesini diğer numunelere kıyasla 1 ve 7.günde yüksek hücre canlılık değerleri vermiştir. Bunların yanısıra %2.7 E vitaminli S4 ve S6 numara kodlu numuneler incelendiğinde, S6 numaralı numunenin hücre canlılık oranının %75 altında olduğu gözlemlenir bu da S6 numunesinin biyouyumluluğunun düşük olduğunu gösterir. S4 nolu numunenin 1. Gün %90 civarlarında 3.günü %75-80 değerleri arasında ve 7.günde %75'in altına düştüğü görünür.



Şekil 3.9. Tüm İskeleler Üzerinde Test Edilen İnsan Kök Hücrelerinin Çoğalması ve Canlılığın Sonuçları. "*" işareti p <0.05 ve "**" işareti p <0.01 anlamlı farkı temsil etmektedir.

Bütün numuneler incelendiğinde S6 kodlu %13 PVA/%0.5 WP + %2.7 E Vitamini numunesinin biyouyumluluğunun diğer numunelere göre daha az olduğu varsayılmıştır. Öte yandan S1,S2,S3,S4 ve S5 numuneleri başarılı bir şekilde hücre canlılığı göstermiş ve biyouyumlulukları kanıtlanmıştır.

4. SONUÇLAR

Bu çalışmada başarılı bir şekilde elektroeğirme ve elektropüskürtme yötemleri kullanılarak PVA ve WP'den nanofiber elde edilip daha sonra iki farklı konsantrasyonlarda WP ile kaplanmış E vitaminleri ile üretilen nanofiberler kaplanmıştır. Üretilen iskelerin, morfolojik, kimyasal, termal testleri yapılmış daha sonra ilaç salımı, şişme ve hücre testi analizleri incelenmiştir. Tez çalışmasını incelendiğinde, üretilen iskelelerin biyouyumluluk ve mekanik özellikler bakımından umut verici sonuçlara sahip oldukları söylenebilir. İskele yapılarının biyouyumluluk testi mezenkimal kök hücre ile kültürlenmesi sonucunda belirlenmiştir. Nanofiber yapıların kaplanması iskelelerin çekme dayanımını oldukça arttırmış ve vücut içi basınca dayanacak kadar yüksek olduğu gerilim-gerinim tablosundan gözlemlenmiştir. Üretilen iskelelerin şişme davranışları incelendiğinde E vitamininin bu şişme profilini olumsuz etkilemediği gözlenmiş ve çıkan sonuçların vücut içi kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir. İlaç salımı incelendiğinde E vitamini konsantrasyonun çok olduğu iskelelerde ilaç salımının daha yavaş olduğu ve WP'li nanofiber yapısına sahip iskelelerde daha stabil ilaç salımı gerçekleştirği ilaç salım grafiğinde görülmüştür. İskelelerin antimikrobiyal etki göstermeleri ve biyouyumlulukları biyomalzemenin uygulanabilirliği açısından umut vadeder.

KAYNAKÇA

[1] Biolo G, De Cicco M, Dal Mas V, et al. Response of muscle protein and glutamine kinetics to branched-chain– enriched amino acids in intensive care patients after radical cancer surgery. Nutrition. 2006;22(5):475-482.

[2] Bayram, H. M., & GÜNEŞ, F. Sarkopeni ve Beslenme Yaklaşımı. Geriatrik Bilimler Dergisi, 3(1), 27-36.

[3] Muscaritoli M, Anker S, Argiles J, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG)"cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". Clin Nutr. 2010;29(2):154-159.4. Şahin, Sevnaz, and M. Cankurtaran. "Geriatrik sendromlar." *Ege Tıp Dergisi* 49.3 (2010): 31-38

[4] Isaacs, Bernard. *The challenge of geriatric medicine*. Oxford University Press, USA, 1992.

[5] Inouye, Sharon K., et al. "Geriatric Syndromes: Clinical, Research, and Policy Implications of a Core Geriatric Concept: (See Editorial Comments by Dr. William Hazzard on pp 794–796)." *Journal of the American Geriatrics Society* 55.5 (2007): 780-791.

[6] https://www.okanhastanesi.com.tr/geriatrik-sendromlar-ve-saglikli-yaslilik-

[7] Bayram, H. M., & GÜNEŞ, F. Sarkopeni ve Beslenme Yaklaşımı. *Geriatrik Bilimler Dergisi*, *3*(1), 27-36.

[8] Calvani R, Miccheli A, Landi F, et al. Current nutritional recommendations and novel dietary strategies to manage sarcopenia. J Frailty Aging. 2013;2(1):38-53.

[9] Semba RD, Lauretani F, Ferrucci L. Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. Arch Biochem Biophys. 2007;458(2):141- 145.

[10] Keller, K. (2019). Sarcopenia. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, *169*(7), 157-172.

[11] Gaffney-Stomberg E, Insogna KL, Rodriguez NR, Kerstetter JE. Increasing dietary protein requirements in elderly people for optimal muscle and bone health. J Am Geriatr Soc. 2009;57(6):1073-1079.

[12] Lord C, Chaput J, Aubertin-Leheudre M, et al. Dietary animal protein intake: association with muscle mass index in older women. J Nutr Health Aging. 2007;11(5):383-387.

[13] Bauer JM, Verlaan S, Bautmans I, et al. Effects of a vitamin D and leucine-enriched whey protein nutritional supplement on measures of sarcopenia in older adults, the PROVIDE study: a randomized, double-blind, placebocontrolled trial. J Am Med Dir Assoc. 2015;16(9):740- 747.

[14] Gıda teknolojisi proteinler- Siirt Üniversitesi

[15] Tang, Jason E., et al. "Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men." *Journal of applied physiology* (2009).

[16] Smithers, G. W., et al. "Anti-cancer effects of dietary whey proteins." (1998).

[17] Ha, Ewan, and Michael B. Zemel. "Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people." *The Journal of nutritional biochemistry* 14.5 (2003): 251-258.

[18] Rehberger, B. "Latest research on the health and nutritional benefits of whey protein." *Eur Dairy Magazine* 6 (2006): 16-18.

[19] Morato, Priscila N., et al. "A dipeptide and an amino acid present in whey protein hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane in Wistar rats." Food chemistry 139.1-4 (2013): 853-859.

[20] Deniz, Kudret Irem, Songul Ulag, and Oguzhan Gunduz. "Investigation of the properties of encapsulated hydrophilic and hydrophobic drugs in whey protein microparticles." *Materials letters* 324 (2022): 132664.

[21] Cesari, Matteo, et al. "Antioxidants and physical performance in elderly persons: the Invecchiare in Chianti (InCHIANTI) study." *The American journal of clinical nutrition* 79.2 (2004): 289-294.

[22] Chin, Siok-Fong, et al. "Tocotrienol rich fraction supplementation improved lipid profile and oxidative status in healthy older adults: A randomized controlled study." *Nutrition & metabolism* 8.1 (2011): 1-14.

[23] Ble, Alessandro, et al. "Lower plasma vitamin E levels are associated with the frailty syndrome: the InCHIANTI study." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 61.3 (2006): 278-283.

[24] Bo, Yacong, et al. "A high whey protein, vitamin D and E supplement preserves muscle mass, strength, and quality of life in sarcopenic older adults: A double-blind randomized controlled trial." *Clinical Nutrition* 38.1 (2019): 159-164.

[25] DeMerlis, C. C., and D. R. Schoneker. "Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA)." *Food and chemical Toxicology* 41.3 (2003): 319-326.

[26] Sunar, Bürde Süheyla, and Canan Hasçiçek. "Elektroeğrilmiş nanoliflerin ilaç taşıyıcı sistem olarak ve doku mühendisliğinde kullanımı." *Marmara Pharmaceutical Journal* 21.3 (2017): 425-435.

[27] Megelski, Silke, et al. "Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers." *Macromolecules*35.22 (2002): 8456-8466.

[28] Aydın, Özlem, and İsmigül ÜNLÜEL. "Enkapsülasyon Teknikleri ve Kontrollü Salım." Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi 32: 640-648.

[29] Jaworek, A. T. S. A., and Arkadiusz Tomasz Sobczyk. "Electrospraying route to nanotechnology: An overview." Journal of electrostatics 66.3-4 (2008): 197-219.

[30] Manasco, Joshua L., et al. "Cyclodextrin fibers via polymer-free electrospinning." *RSC advances* 2.9 (2012): 3778-3784.

[31] Sullivan, Stephanie T., et al. "Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers." *Food Hydrocolloids* 35 (2014): 36-50.

[32] Bhardwaj, Nandana, and Subhas C. Kundu. "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique." Biotechnology advances 28.3 (2010): 325-347.

[33] Deitzel, Joseph M., et al. "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles." Polymer 42.1 (2001): 261-272.

[34] Haynes, Charles A., and Willem Norde. "Globular proteins at solid/liquid interfaces." Colloids and surfaces B: Biointerfaces 2.6 (1994): 517-566.

[35] Fang, Zhongxiang, Ruobing Wang, and Bhesh Bhandari. "Effects of type and concentration of proteins on the recovery of spray-dried sucrose powder." Drying Technology 31.13-14 (2013): 1643-1652.

[36] Abureesh, Mosab Ali, Akeem Adeyemi Oladipo, and Mustafa Gazi. "Facile synthesis of glucose-sensitive chitosan–poly (vinyl alcohol) hydrogel: Drug release optimization and swelling properties." International journal of biological macromolecules 90 (2016): 75-80.

[37] Drosou, Christina, Magdalini Krokida, and Costas G. Biliaderis. "Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties." *Food Hydrocolloids* 77 (2018): 726-735.

[38] Gounga, Mahamadou Elhadji, SHI-YING XU, and Zhang Wang. "Film forming mechanism and mechanical and thermal properties of whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan content." *Journal of food biochemistry* 34.3 (2010): 501-519.

[39] Aceituno-Medina, Marysol, et al. "Development of novel ultrathin structures based in amaranth (Amaranthus hypochondriacus) protein isolate through electrospinning." *Food Hydrocolloids* 31.2 (2013): 289-298.

[40] Peppas, N. A., et al. "Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology." Annual review of biomedical engineering 2.1 (2000): 9-29.

[41] Liu, Fei-Yan, et al. "Influence of protein type, content and polymerization on in vitro starch digestibility of sorghum noodles." *Food Research International* 142 (2021): 110199.

[42] Liu, Jiasong, et al. "Effects of whey protein on the in vitro digestibility and physicochemical properties of potato starch." *International Journal of Biological Macromolecules* 193 (2021): 1744-1751.

[43] Dong, Zhijian, et al. "Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation." *Journal of Food Engineering* 104.3 (2011): 455-460.

[44] Hwang, Duhyeong, Jacob D. Ramsey, and Alexander V. Kabanov. "Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval." *Advanced drug delivery reviews* 156 (2020): 80-118.

[45] Shojaee, Saeed, et al. "The influence of vitamin E succinate on the stability of polyethylene oxide PEO controlled release matrix tablets." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111 (2013): 486-492.

[46] Yang, Xiaomin, et al. "Cytotoxicity and wound healing properties of PVA/ws-chitosan/glycerol hydrogels made by irradiation followed by freeze–thawing." Radiation Physics and Chemistry 79.5 (2010): 606-611.

ÖZGEÇMİŞ Kudret İrem DENİZ

2019 yılında Gaziantep Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden mezun oldum. Lisans eğitimimde analitik düşünmeyi, çeşitli bilgisayar programlarını kullanmayı, ekip çalışmasının parçası olmayı ve karmaşık problemlerle nasıl başa çıkılacağını öğrendim.

2019 yılında BTA Cakes & Bakes'te kalite güvence ve hijyen bölümünde 4 aylık stajımı tamamladım. Staj süresince insan ilişkileri, gıda güvenliği ve kriz yönetimi konularında kendimi geliştiriyorum. Marmara Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği bölümünden yüksek lisans yaptım. Ayrıca Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji ve Biyomalzemeler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde araştırmacıyım.

DENEYİMLER

Laboratuvar Asistanı 04.2021- Devam

Marmara Üniversitesi, NBUAM, İstanbul (Türkiye)

Laboratuvar Asitanı (Erasmus) 02.2022-07.2022

Brescia Üniversitesi, LPA Laboratory, Brescia (İtalya)

Kalite Güvence ve Hijyen Stajyer Mühendisi 01.2019-07.2019

BTA Cakes&Bakes, Kalite Güvence ve Hijyen, İstanbul (Türkiye)

EĞİTİM

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği - Yüksek Lisans

Marmara Üniversitesi 08.2020-11.2022

Gıda Mühendisliği - Lisans

Gaziantep Üniversitesi 08.2014-07.2019

KİŞİSEL BECERİLER

- İngilizce (İleri Düzey)
- Korece (Başlangıç)
- Matlab
- P&ID
- Sketch Up
- Microsoft Office