

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOPOLİMER – KİL NANOKOMPOZİTLERİNDEN  
KONTROLLÜ PROTEİN SALIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Hakan KAYGUSUZ**

**Anabilim Dalı : Kimya**

**Programı : Kimya**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER**

**OCAK 2011**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOPOLİMER – KİL NANOKOMPOZİTLERİNDEN  
KONTROLLÜ PROTEİN SALIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Hakan KAYGUSUZ  
(509081216)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 Aralık 2010**

**Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Ocak 2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER (İTÜ)  
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU (İTÜ)  
Prof. Dr. Seniha GÜNER (İTÜ)**

**OCAK 2011**



*Aileme,*



## ÖNSÖZ

Lisans öğrenimim boyunca ve bu çalışmayı yürütürken engin bilgi birikimi, tecrübeleri ve nazik tavrıyla bana yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. F. Bedia Erim Berker'e,

Bana yardımcı olan ve gerektiğinde bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Gönül Özen, Prof. Dr. İsmail Yılmaz, Doç. Dr. Rıza Demirbilek ve Doç. Dr. Nevin Öztekin'e,

Ortak çalışma yürütme imkanı bulduğum, pek değerli çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Selda Başkan Kahraman ve Araş. Gör. Filiz Tezcan Tekeli'ye,

Dostlarım Hakan Bildirir, Ceyhun Yalçın, Orkun Sevinç, Bahadır Gacal, Ayşe Özdem Sezgin ve ismini burada yazamadığım diğer tüm arkadaşlarıma,

Sesil'e,

Her şey için anneme ve babama,

Çok teşekkür ederim.

Aralık 2010

Hakan KAYGUSUZ

Kim., Fiz Müh.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
SEMBOL LİSTESİ .....	xii
ÖZET.....	xix
SUMMARY .....	xxi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORİK KISIM .....</b>	<b>3</b>
2.1 Standart İlaç Uygulamaları ve Kontrollü Salım .....	3
2.2 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması.....	6
2.2.1 Salım mekanizmasına göre.....	6
2.2.1.1 Difüzyon kontrollü sistemler	6
2.2.1.2 Kimyasal kontrollü sistemler	7
2.2.1.3 Elektro-mekanik kontrollü sistemler	8
2.2.2 İlacın hapsedilme Yöntemine göre kontrollü salım sistemleri.....	8
2.2.2.1 Rezervuar Sistemler	8
2.2.2.2 Matris Sistemler	9
2.2.2.3 Diğer Sistemler	9
2.3. Kontrollü Salımın Kinetiği.....	9
2.4. Kontrollü Salım Araçlarında Kullanılan Maddeler.....	10
2.5. Kontrollü Salım Aracı Olarak Aljinat Hidrojeli.....	11
2.5.1 Aljinik asitin kimyasal özellikleri.....	11
2.5.2 Aljinat jellerinin kimyasal yapısı ve çapraz bağlanma.....	12
2.5.3 Aljinatın fiziksel özellikleri.....	13
2.5.4 Aljinatın kullanım alanları .....	13
2.6 Kontrollü Salımda İlaç Olarak Kullanılan Sığır Serum Albümini.....	15
2.7 Kontrollü Salımda Yardımcı Katkı Maddesi Olarak Kil .....	16
2.7.1 Killerin sınıflandırılması .....	16
2.7.2 Killerin kullanım alanları .....	17
2.7.3 Montmorillonit .....	17
2.7.4 Proteinlerin killere adsorpsiyonu .....	18
2.8 Proteinlerin Kantitatif Analizi.....	19
2.8.1 Lowry Yöntemi .....	19
2.8.2 Biuret Yöntemi.....	20
2.8.3 Bradford Yöntemi .....	20
<b>3. DENYESEL KISIM .....</b>	<b>23</b>
3.1 Malzemeler .....	23
3.2 Cihazlar .....	23
3.3 Yapay Mide Sıvısının Hazırlanması .....	24
3.4 Yapay Bağırsak Sıvısının Hazırlanması .....	24

3.5 Kürelerin Hazırlanması .....	25
3.5.1 Kilsiz kürelerin hazırlanması .....	25
3.5.2 Killi kürelerin hazırlanması.....	25
3.5.3 Proteinsiz kürelerin hazırlanması .....	25
3.6 Su Tutma Deneyleleri .....	26
3.7 Morfoloji Gözlemleri .....	26
3.8 FTIR .....	26
3.9 BSA Salımı.....	27
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>28</b>
4.1 XRD Sonuçları .....	28
4.2 Boyut ve Yüzey Analizleri .....	28
4.3 FTIR .....	29
4.4 Su Tutma Sonuçları .....	29
4.5 Hapsetme Verimleri .....	31
4.6 Salım Sonuçları .....	32
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>36</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>40</b>

## **KISALTMALAR**

<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>FTIR</b>	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy
<b>SEM</b>	: Scanning Electron Microscopy
<b>SGF</b>	: Simulated Gastric Fluid
<b>SIF</b>	: Simulated Intestinal Fluid
<b>UV-VIS</b>	: Ultraviolet-Visible
<b>XRD</b>	: X-Ray Diffraction



## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Bazı ilaçlar için TI değerleri.....	4
Çizelge 2.2 : Aljinik asitin bazı özellikleri. ....	12
Çizelge 2.3 : Aljinik asit ve tuzlarının gıda katkı kodları.....	14
Çizelge 2.4 : Sığır serum albüminine ait bazı özellikler.....	15
Çizelge 4.1 : Küre formülasyonlarına ait hapsedme verimleri.....	32
Çizelge A : Hazırlanan formülasyonlara ait çizelge.....	41



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Standart ilaç uygulamalarında toksik ve etken doz.....	4
Şekil 2.2 : Kontrollü salım uygulamalarında ilacın dozajı.....	5
Şekil 2.3 : Difüzyon kontrollü sistemlerde salım mekanizması.....	7
Şekil 2.4 : Kimyasal kontrollü sistemlerde salım mekanizması.....	8
Şekil 2.5 : Salım kinetikleri .....	10
Şekil 2.6 : Aljinik asitin yapısı.....	11
Şekil 2.7 : Kil tabakalarına protein yerleşiminin mekanizmaları.....	19
Şekil 2.8 : Brilliant Blue G-250'nin molekül yapısı.....	21
Şekil 2.9 : Brilliant Blue R-250'nin molekül yapısı.....	21
Şekil 4.1 : %3 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF'de su tutma sonuçları.....	29
Şekil 4.2 : %10 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF'de su tutma sonuçları.....	30
Şekil 4.3 : %3 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te su tutma sonuçları.....	30
Şekil 4.4 : %10 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te su tutma sonuçları.....	31
Şekil 4.5 : %3 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF'de salım sonuçları.....	33
Şekil 4.6 : %10 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF'de salım sonuçları.....	33
Şekil 4.7 : %3 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te salım sonuçları.....	34
Şekil 4.8 : %10 Ca <sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te salım sonuçları.....	34
Şekil B : Kil, Kil + BSA ve Kil + BSA + Aljinata ait XRD spektrumları.....	45
Şekil C.1 : Soldan sağa, CKB-3-0-0 ve CKB-3-1-0 kürelerine ait optik mikroskop görüntüleri.....	47
Şekil C.2 : Soldan sağa, CKB-3-2-0 ve CKB-3-2-1 kürelerine ait optik mikroskop görüntüleri.....	47
Şekil D.1 : SGF içindeki bütün su tutma sonuçları.....	49
Şekil D.2 : SIF içindeki bütün su tutma sonuçları.....	49
Şekil E.1 : CKB-3-0-0 kuru küresine ait SEM görüntüsü .....	51
Şekil E.2 : CKB-3-0-0 kuru küresine ait yakınlaştırılmış SEM görüntüsü.....	51
Şekil E.3 : CKB-3-1-0 kuru küresine ait SEM görüntüsü.....	52
Şekil E.4 : CKB-3-1-0 kuru küresine ait yakınlaştırılmış SEM görüntüsü.....	52
Şekil E.5 : CKB-3-2-0 kuru küresine ait SEM görüntüsü.....	53
Şekil E.6 : CKB-3-2-0 kuru küresine ait yakınlaştırılmış SEM görüntüsü .....	53
Şekil F : CKB-3-0-1 kuru küresine ait FTIR spektrumu.....	55
Şekil G : CBK-3-0-0 küreleri kurutma aşamasında iken örnek bir fotoğraf.....	57
Şekil H : Kurutulmuş CBK-3-0-0 küreleri.....	59



# **BİYOPOLİMER-KİL NANOKOMPOZİTLERİNDEN KONTROLLÜ PROTEİN SALIMI**

## **ÖZET**

Günümüzde protein ve peptit yapısındaki ilaçlar çok önemli tedavi edici ilaçlar olarak geliştirilmektedir. Bu tip ilaçların insan vücuduna verilmesinde en önemli engel, protein ve peptit yapısının mide ortamı asitliğinde dayanıklı olmayıp kolaylıkla bozunabilmesidir. Bu nedenle protein yapısındaki ilaçlar klasik olarak vücuda enjeksiyon yoluyla verilmektedir. Ancak oral yolla ilaç alımının enjeksiyon yoluyla ilaç alımına göre kolaylığı ve kullanıcı açısından istenilirliği son yıllarda protein yapısındaki ilaçların oral olarak etkin bir şekilde vücuda verilmesi konusunda araştırmaları yoğunlaştırmıştır. Protein yapısındaki ilaçların vücutta etkin olması, kontrollü salımının yapılacağı bir ortamın içine kapatılması, mide asitliğinden etkilenmeden alkali barsak ortamına geçmesi ve bu ortamda kontrollü bir şekilde salınması ile gerçekleştirilebilir.

Bu çalışmamızda protein olarak seçilen sığır serum albüminin (BSA), aljinat jel küreleri içine hapsedilerek yapay olarak hazırlanan mide ve bağırsak sıvısı ortamına kontrollü salımı incelenmiştir. BSA'nın aljinat küreleri içine ilave edilen kilin ara yüzeylerine girip nanokompozit bir yapı oluşturulması sağlanıp, BSA'nın salım hızı yavaşlatılmış ve BSA'nın bozunmadan ve düşük salımla mide ortamından geçip, bağırsak ortamında kontrollü salımını gerçekleştirecek deneysel parametreler saptanmıştır.



## **CONTROLLED PROTEIN RELEASE FROM BIOPOLYMER – CLAY NANOCOMPOSITES**

### **SUMMARY**

Protein based drugs and their applications are developing research areas nowadays. Most common problem in such drugs is denaturation of protein and peptide structure in acidic gastric media. In order to avoid this, protein and peptide based drugs are applied by injection. However oral applications are more convenient and demanded by patients. Oral usage of protein and peptide based drugs require an encapsulation, directly passage through stomach and a release in basic intestinal track.

In the present work, a model protein, bovine serum albumin (BSA), is encapsulated in clay-modified alginate gel beads. Release behavior, swelling kinetics and other properties of these beads are investigated. It is shown that BSA molecules are placed between clay layers, forming a nanocomposite structure, and this led suggested formula to be more efficient in encapsulation of BSA. Moreover, this also provided slower release and lower losses in gastric fluid.



## 1. GİRİŞ

Kontrollü salım, kısaca bir ilaç etken maddesinin, bir hapsedici araç içine yerleştirildikten sonra, belirli bir salım ortamına zaman içinde yavaşça aktarılması anlamına gelir. Bu aktarım çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmekte ve aktarım hızı da çoğu zaman istenen şekilde ayarlanabilmektedir.

Standart ilaç uygulamalarının getirdiği zahmet ve ekonomik güçlükler nedeniyle, kontrollü salım temel avantajları sayesinde ön plana çıkmış ve gelişme göstermiş bir teknolojidir. Bu teknoloji, disiplinlerarası bir çalışmanın ürünüdür. Kontrollü salım; kimya, tıp, biyoloji ve mühendisliğin birçok dalından yararlanan bir teknolojidir.

Kontrollü ilaç salımındaki ilaç sözcüğü, günlük hayatta bilinen ilaç tanımını da kapsayacak şekilde, daha geniş bir tanıma işaret eder. Hormonlar, besin katkıları, gübreler de bu tanıma dahil olabilir. Kontrollü salım dendiğinde ise, bu tanıma kompleks yapıcı bileşiklerle; kuantum noktaları gibi spesifik moleküller de dahil olabilir. Kontrollü salım genel bir tanım olup, aynı zamanda yavaşlatılmış salım ya da zamanlı salım gibi isimler de alabilir.

Son yıllarda protein ve peptit yapısında çok sayıda yeni ilaç geliştirilmektedir. Protein yapısı mide asitliğinde kolaylıkla bozulduğundan bu ilaçlar injeksiyon yoluyla vücuda verilmektedir. Özellikle insülin gibi sürekli kullanım gerektiren protein yapısındaki ilaçların küçük moleküllü ilaçlar gibi oral yoldan alınabilmesi kolaylığı ve kullanıcı istekleri doğrultusunda bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların temel amacı, protein yapısındaki ilaçları toksik olmayan bir tutucu ortama hapsedip vücuda oral yolla verdikten sonra mide asitliğinden etkilenmeden ve bu ortama salınmadan alkali bağırsak ortamına geçebilmesi ve bu ortamda kontrollü olarak salımının sağlanabilmesidir.

Biz de bu çalışmamızda protein olarak seçilen sığır serum albumini (*Bovine Serum Albumin*, BSA), aljinat jel kürelerin içine hapsederek kontrollü salımını amaçladık. Aljinat, kahverengi yosundan elde edilen doğal bir polisakkarittir. Toksik özelliği olmadığından gıda ve ilaç sanayinde kullanılan bir maddedir. Aljinat iki değerlikli

iyonlarla, en çok uygulanan şekli ile kalsiyum iyonu ile jel oluşturma özelliği gösterir. Bu çalışmada aljinat jelleri içine kattığımız kilin BSA ile nanokompozit yapısı oluşturması ile, BSA'nın aljinat kürelerden mide ortamında çok az salımı, bağırsak ortamında kontrollü salımını hedefleyecek deneysel parametreleri saptadık. Ayrıca aljinat jel küreciklerinin yapay mide ve bağırsak sıvısı ortamında şişme kinetikleri incelendi.

Bu tez çalışmasında kontrollü salım, salım ortamı olarak aljinat, katkı maddesi olarak kil ve model proteinimiz BSA hakkında genel bilgiler ve deneysel çalışma sonuçlarımız sunulmaktadır.

## 2. TEORİK KISIM

Kontrollü salımın gerekliliği ve yöntemlerini daha iyi anlamak için, öncelikle standart ilaç uygulamaları hakkında bilgi vermek, daha sonra kontrollü salımın temellerini ele almak ve ikisini kıyaslamak yararlı olacaktır.

### 2.1. Standart İlaç Uygulamaları ve Kontrollü Salım

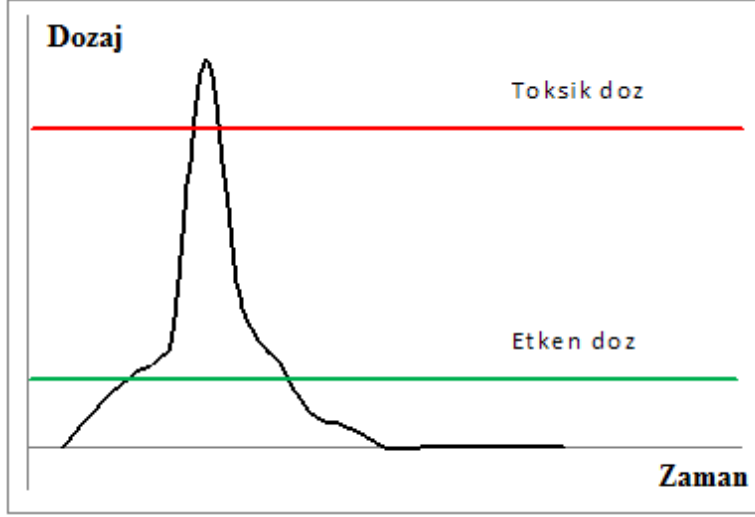
Standart uygulamalarda, ilaç etken maddesi ortama tek bir defada ve standart dozda verilir. Bu uygulamalara günlük yaşamdan pek çok örnek verilebilir. Başlıca örnekler listelenebilir;

- Hap, şurup gibi oral yolla ilaç kullanımı,
- Damara ya da deri altına ilaç ve hormon enjeksiyonu,
- Çeşitli preparatların deri üzerine uygulanması,
- Tarımsal ilaç ve gübrelerin bitkilerin üzerine ya da toprağa verilmesi.

Bu örneklerde görülebileceği gibi, standart uygulamaların ortak özelliği, ilacın tek bir defada ve tek bir dozda verilmesidir. Hiçbirinde belirli bir sürece yayılmış bir uygulama söz konusu değildir. Bunun yanında, ilacın dozajını kolayca ayarlamak da mümkün değildir. Piyasada ticari olarak mevcut pek çok ilaç, hormon ve zehrin dozajı önceden ayarlanmış olarak satılmaktadır. Kullanım amacına bağlı olarak ara dozlarda ilaç ya da benzeri maddelerin tedariği, günümüzde mümkün değildir.

Bilindiği üzere, bütün kimyasal maddelerin toksik bir dozajı vardır. Toksik dozajın üzerinde, maddenin canlı üzerinde olumsuz etkileri baskın hale gelir ve zehirlenme baş gösterir. Dolayısıyla toksik dozajın aşılması gerekir. Bu madde bir ilaç olarak kullanılacaksa, bu değişikene bir de etkin dozaj eklenir. Etkin dozaj, etken maddenin ilaç özelliği gösterdiği minimum derişime verilen isimdir. Bu dozajın altında, canlı tedavi amacıyla bu maddeden yararlanamaz. Önceden standart olarak hazırlanmış

formülasyonlarda, vücut içinde etkin ve toksik dozajlar arasında kalmanın kolayca ayarlanabilmesi söz konusu olmayabilir. Bu durum Şekil 2.1’de açıklanmıştır. Şekilde apsis eksenini zamanı, ordinat eksenini konsantrasyonu ifade etmektedir.



**Şekil 2.1** : Standart ilaç uygulamalarında toksik ve etkin doz

Görüldüğü üzere, standart ilaç uygulamasında, etkin maddenin konsantrasyonu kısa süre içinde etkin doza ulaşmasına rağmen, her canlıda değişebilen toksik dozu geçebilmektedir. Toksik dozda bulunma süresi kısa olabileceği gibi, uzun da olabilir. Bu durumda istenmeyen etkiler görülecektir. Aynı zamanda etkin dozajın altına da kısa sürede inebilmesi söz konusudur.

Bunu kontrol etmek pek çok ilaç için oldukça zordur. Tıpta, aktif ilaç maddeleri için kullanılan minimum toksik konsantrasyon ile minimum etkili konsantrasyonun oranından oluşan terapötik indis (TI) önemli bir tanımdır. TI değerinin küçük olması, ilacın daha büyük risk taşıdığı anlamına gelir.

**Çizelge 2.1** : Bazı ilaçlar için TI değerleri [1]

İlaç	TI
Trifenilamin	19000
Difenilhidramin	2300
Penisilin	> 100
Aprobarbital	5,3
Digitoxin	1,2 – 2,0

Buradaki bir diğerk tanım da dozaj indisidir. Dozaj indisi, bir dozaj çevriminde ulaşılan maksimum konsantrasyon ile minimum konsantrasyonun bir oranı olup, olabildiğince küçük olması istenir. TI ve DI değerleri ile standart ilaç uygulamalarında oynamak çoğu zaman çok zor iken, kontrollü salım ile bu ayarlanabilir. İyi bir kontrollü salım sistemi düşük DI ve TI değerlerine sahip olmalıdır [2]

Standart ilaç uygulamalarında, dozaj sorunlarının yanı sıra başka sorunlar da görülebilir. Bunlardan en önemlisi, düzenli olarak ilaç kullanımı gereklidir. Örneğin diyabet hastaları sürekli olarak insülin iğnesi kullanmak durumundadırlar. Bunun hem maliyet, hem de zorluk açısından dezavantajları bulunmaktadır. Kimi ilaçların ve/veya hormonların bu şekilde düzenli kullanımı zahmet ve güçlük sebebidir.

Kontrollü salım sistemlerinde, yukarıda sözü edilen sorunlar büyük ölçüde giderilmiş durumdadır. Dozajın uygun aralıkta ve uzun bir süre sabit tutulması, en büyük avantajlardan biridir. Kontrollü salım sistemlerinde, ilaç etken maddesi sürekli olarak salım ortamına salındığı için, etken madde kısa sürede vücut tarafından uzaklaştırılsa dahi, sürekli yenisi ortama verildiği için dozaj sabit tutulabilir. Üstelik bu dozaj, toksik dozaj ve etken dozaj arasında tutularak, en etkin tedavi gerçekleştirilebilir. Bu durum Şekil 2.2’de açıklanmıştır.



Şekil 2.2 : Kontrollü salım uygulamalarında ilacın dozajı

Şekilde görüldüğü üzere, uzun bir süre zarfı içinde ilaç etken maddesi vücutta bulunmaktadır. Bunun yanında, etkin doz ve toksik doz arasında olacak şekilde ayarlanan ilaç etken maddesi, çok daha etkin bir tedavi sağlayacaktır.

Standart ilaç uygulamalarında, ilacın bir anda verilmesi verimsiz sonuçlara neden olabilmektedir. Toksik değerlere ulaşmanın yanında, vücudun ilacın fazlasını kullanamayıp boşaltım sistemiyle uzaklaştırması gerçekleşebilir. Gıda ürünlerine eklenen antioksidan gibi maddelerin fazlası kullanım görmeden deaktive olabilir, gübre maddelerinin fazlası ortamda bulunan bakteri ve diğer canlılarca kullanılabilir. [3]. Bütün bunlar verimsizliğe ve yüksek maliyete neden olmaktadır. Kontrollü salımda, ilaç istenen dozajda sürekli olarak ortama verildiği için verim yüksektir [4].

Kontrollü salımın bir diğer avantajı, tek seferde uygulama ile, uzun bir süre yeniden uygulamaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Bu şekilde hem bakım giderleri düşürülecek, hem de deri altına enjeksiyon gibi hastalara acı veren uygulamaların sıklığı düşürülerek, çok daha konforlu bir tedavi sağlanabilecektir.

Kontrollü salımda, ilaçla yüklenmiş salım materyali, doğrudan amaçlanan ortama yerleştirilebilir. Bu da doku amaçlı tedaviyi kolaylaştıran bir özelliktir. Örnek olarak, deri altına yerleştirilen bir kontrollü salım materyali, deri hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir. Bu da kontrollü salımın bir başka avantajı olarak ele alınabilir.

## **2.2 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması**

Literatürde pek çok kontrollü salım sistemi rapor edilmiştir [5]. Kontrollü salım sistemlerinin sınıflandırılması temel olarak ikiye ayrılabilir. Bunlar salım mekanizmasına göre ve ilaç etken maddesinin hapsedilme yöntemine göre. Ayrıca kontrollü salım aletinin biçimine göre de sınıflandırma yapılabilir. Kontrollü salım aletleri kapsül, film, ya da biçimsiz olabilirler.

### **2.2.1 Salım mekanizmasına göre**

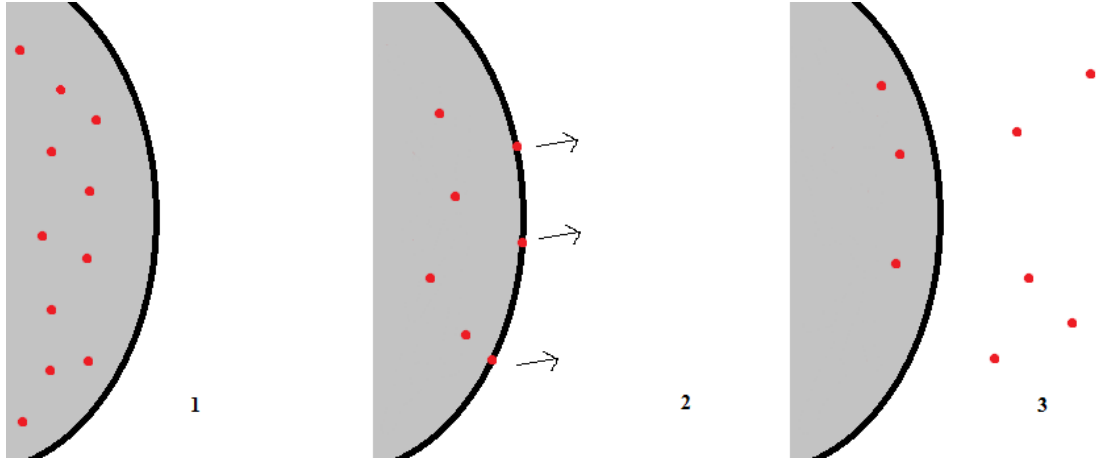
Bir ilaç etken maddesinin yerleştirildiği kontrollü salım aracı, dört temel yolla ilacı dışarı salar. Bunlar taşıma mekanizmalarına göre aşağıdaki başlıklarda toplanabilir.

- Difüzyon kontrollü sistemler,
- Kimyasal kontrollü sistemler,
- Mekanik sistemler.

### 2.2.1.1 Difüzyon kontrollü sistemler

Bu sistemlerde temel prensip, ilaç etken maddesinin hapsedildiği salım araçından difüzyonla dışarı çıkışıdır. Burada temel etken difüzyon olduğu için, ilacın büyüklüğü, ilacın yükü kontrollü salım aletine ait yüzey mekaniği, por genişliği gibi değişkenler salım hızını etkiler.

Difüzyon kontrollü sistemlerde salıma ait temsili bir gösterim Şekil 2.3'te yer almaktadır.



Şekil 2.3 : Difüzyon kontrollü sistemlerde salım mekanizması

Şekilde görüldüğü üzere, ilaç yerleştirilmiş bir kontrollü salım aleti, salım ortamına konulduğunda, ilaç etken maddeleri yüzeye doğru ilerler. Yüzeydeki membrandan salım ortamına difüze olurlar. Salım ortamı stabil ise salım bir dengeye ulaşacaktır. İlaç sürekli harcanıyorsa, ilacın salım ortamında tamamen ayrılması beklenir.

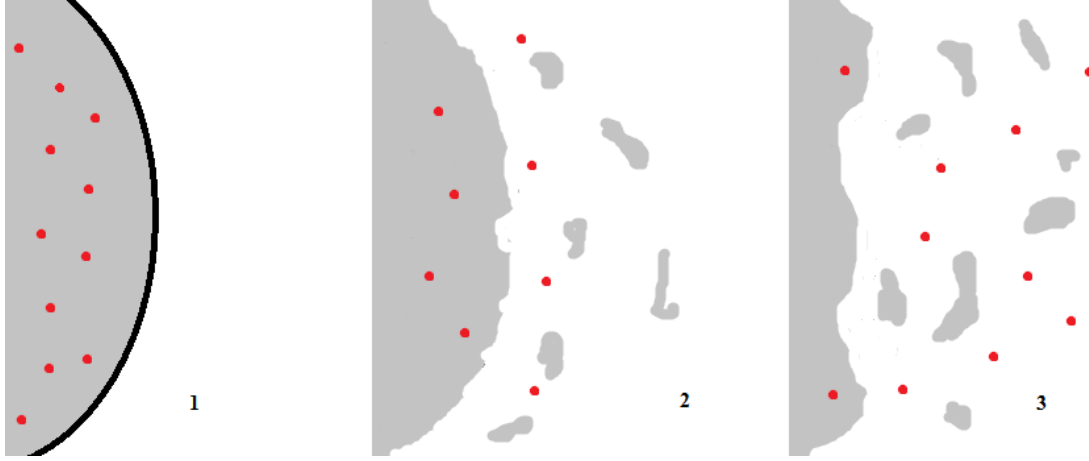
### 2.2.1.2 Kimyasal kontrollü sistemler

Kimyasal kontrollü sistemlerde, ilaç etken maddesinin hapsedildiği matris, salım ortamında bozunmaya uğrayarak parçalanır. Böylece ilaç etken maddesinin önündeki bariyer kaldırılarak, salım ortamına geçmesi sağlanır.

Bu bozunma aşağıda belirtilen yollarla olabilir:

- pH değerine bağlı olarak,
- Organik reaksiyonlar sonucunda,
- Dolgu maddesinin çözünmesine bağlı olarak,
- Ortamdaki spesifik bir türe bağlı olarak.

Kimyasal kontrollü sistemlerde salıma ait temsili bir gösterim Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4 : Kimyasal kontrollü sistemlerde salım mekanizması

Bundan başka, ilaç etken maddesi, bir polimere kovalent bağlanarak bir kontrollü salım aleti geliştirilebilir. Salım ortamına konulduğunda, ilaç ile türevlendirilmiş polimerdeki bağlar koparak ilaç ortama salınır.

### 2.2.1.3 Elektro-mekanik kontrollü sistemler

Mekanik sistemlerde, vücuda ya da salım ortamına yerleştirilen bir cihaz tarafından ilacın düzenli olarak salım ortamına pompalanması sağlanır. Bu cihazlar genellikle elektronik ve mekanik kontrollü polimerlerdir. Burada belli bir voltaj altında, ilaç etken maddesinin pompalanması söz konusudur.

### 2.2.2 İlacın hapsedilme yöntemine göre kontrollü salım sistemleri

Kontrollü salım sistemleri ayrıca ilacın hapsedilme yöntemine göre de sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma yine üç başlık altında toplanabilir:

- Rezervuar Sistemler
- Matris Sistemler
- Diğer

### 2.2.2.1 Rezervuar sistemler

Bu sistemlerde ilaç etken maddesi doğrudan ya da bir dolgu maddesi ile karıştırılmış halde iken; bir polimerik kaplama ile üzeri örtülmüş haldedir. Dışı polimer membran, çekirdeği ilaç olan bu sistemde salım difüzyon kontrollüdür. Dolayısıyla çözünmeyen ve dayanıklı polimerle kaplı olan bu sistemlerde salım hızı membranın por karakteristiklerine bağlıdır [6].

### 2.2.2.2 Matris sistemler

Bu sistemler, ilaç etken maddesinin salım ortamına homojen bir şekilde dağıtılmasıyla oluşur. Diğer bir deyişle, ilaç salım matrisinin içinde yer alır. Bu sistemlerde de hem difüzyonla, hem kimyasal erozyonla, hem de ikisinin birden etkili olduğu bir salım mekanizması geçerli olabilir. Hazırlanışının kolay oluşu sebebiyle, en yaygın formülasyonlar matris sistemleridir [7].

### 2.2.2.3 Diğer sistemler

Bunlardan başka, literatürde pek çok kontrollü salım sistemi rapor edilmiştir. Bunlar, kontrollü salım filmleri [8][9], kontrollü salım kolloidal çözeltileri (ya da mikrokapsülleri) ve polielektrolit kompleksler [10], ozmotik pompa [11] ve pH kontrollü sistemlerdir [12].

## 2.3 Kontrollü Salımın Kinetiği

Kullanılan kontrollü salım sistemi, salım ortamı, ilacın kimyasal yapısı, yarı ömrü ve ortamın sıcaklığı gibi pek çok değişken; salım kinetiği üzerinde etkilidir. Bu kadar çok değişkenin rol aldığı bir durumda tekrarlanabilirliği yüksek neticelerin elde edilmesinin güç olacağı düşünülebilir. Ancak genel olarak, salım kinetiği üç başlıkta ele alınabilmektedir [13]. Bunlar, sıfırıncı dereceden, birinci dereceden ve diğer dereceden salımlardır.

Sıfırıncı dereceden salım kinetiğinde, zamanın kuvveti sıfırdır. Diğer bir deyişle, salım hızı zamandan bağımsızdır ve sabittir.

$$\frac{dC}{dt} = k \quad (2.1)$$

Birinci dereceden salım kinetiğinde, zaman ile değişen bir salım hızı söz konusudur.

Bu durumda hız eşitliği aşağıdaki gibi yazılır:

$$\frac{dC_t}{dt} = k(C_o - C_t) \quad (2.2)$$

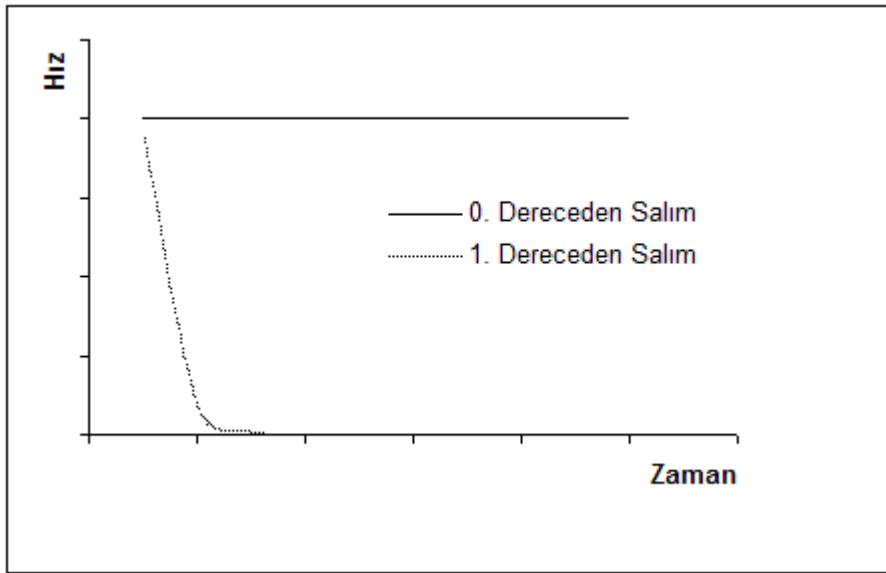
Bu eşitlik düzenlendiğinde,

$$\frac{dC_t}{dt} = kC_o e^{-kt} \quad (2.3)$$

Eksponansiyel ifadesi elde edilir. Bu da salım hızının zamanla eksponansiyel olarak azaldığına işaret eder.

Diğer salım kinetiklerinde, zamanın ve konsantrasyonların farklı derecelerden kuvvetleri söz konusu olabilir.

Salım kinetiklerinin ifade ettikleri Şekil 2.5'te açıklanmıştır.



**Şekil 2.5 :** Salım kinetikleri.

Görüldüğü üzere, birinci dereceden salım kinetiğinde zamanla hız sıfıra yaklaşmaktadır. Yani salım miktarı zamanla düşmektedir. Ancak 0. dereceden salımda, hız zamandan bağımsızdır. Dolayısıyla zaman içinde salınan ilaç miktarı sabittir.

Literatürde bazı bilgilerde, yalnızca 0. dereceden salım için kontrollü salım tanımı kullanılmaktadır. Bunun nedeni, zamanın bir değişken olarak aradan çıkması ve salınan ilaç miktarı kontrolünün daha çok elde olmasıdır. Zamanla hızı azalan salımlar için, yavaşlatılmış salım gibi terimler yeğlenir.

## 2.4 Kontrollü Salım Araçlarında Kullanılan Maddeler

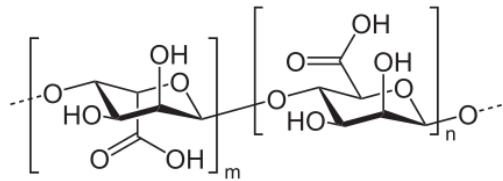
Prensip olarak kontrollü salım sistemlerinde her tür polimer kullanılabilir. Ancak yapılan çalışmalar belli başlı türler üzerinde yoğunlaşmış durumdadır. Çalışmalarda sentetik polimerler kadar, doğal kökenli polimerler, biyopolimerler de kullanılmaktadır. En sık kullanılan polimerler silikon kauçuğu, polietilen vinil asetat, polivinil klorür, poliüretan, poliamidler, polisakkaritler olarak sıralanabilir. [14]. Tekli olduğu kadar, aljinat-çitosan örneğinde olduğu gibi, çoklu polimer sistemleri de kullanılabilir [15].

## 2.5 Kontrollü Salım Aracı Olarak Aljinat Hidrojeli

Aljinat, kahverengi yosunların hücre duvarlarından ekstrakte edilen bir polisakkarittir. Bu yosunlardan aljinik asit şeklinde ekstrakte edilir. Daha sonra uygun reaktiflerle muamele edilerek, istenen tuzu haline dönüştürülebilir. Aljinik asitin tuzlarına aljinat adı verilir. Aljinat, yapısı itibariyle bir biyopolimer ve polisakkarit olduğundan, toksik değildir. Hatta gıda ambalajlarında ya da doğrudan gıda katkısı olarak günümüzde kullanılmaktadır. Yenilebilir bir maddedir. Aljinatın doğal kökenli bir madde oluşu, düşük toksikite ve yüksek biyobozunurluk gibi avantajları beraberinde getirmektedir [16].

### 2.5.1 Aljinik asitin kimyasal özellikleri

Aljinik asit, (1-4) bağlı  $\beta$ -D-mannuronat ve onun C-5 epimeri  $\alpha$ -L-guluronat homopolimerlerinin lineer bir kopolimeridir ve bir polisakkarittir. Şekil 2.6'da aljinik asitin yapısı verilmiştir.



Şekil 2.6 : Aljinik asitin yapısı

Bu homopolimer zincirleri ardışık olarak dizilebileceği gibi, farklı kısımlar halinde, farklı oranlarda, ve hatta rastgele olarak konumlanmış olabilir. Bu yerleşim de her kopolimerde olduğu gibi, aljinatın fiziksel özelliklerini doğrudan etkileyen bir özelliktir.

Aljinik asit, endüstriyel olarak *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* ve çeşitli laminaria türlerinden ekstraksiyonla elde edilir. Tüm bu türlerde aljinatin esas polisakkarit olduğu ve kütleinin %40'ını oluşturduğu bildirilmiştir [17]. Her bir canlıının aljinik asiti hangi düzende sentezlediği, hangi homopolimer bloğunun baskın olduğu değişkenlik taşır. Bu da elde edilen aljinik asitin tek bir molekül ağırlığında ve çözünürlükte olmadığını ortaya koyar.

Aljinik asite ait bazı özellikler çizelge 2.2'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2 : Aljinik asitin bazı özellikleri.**

Molekül formülü	$(C_6H_8O_6)_n$
Molekül kütlesi	10000 – 600000 g·mol <sup>-1</sup>
pK <sub>a</sub>	1,5 – 3,5
Görünüşü	Kirli beyaz toz

Aljinik asit uygun bazlarla muamele edildiğinde elde edilen tuz aljinattır. Aljinik asitin tek değerli katyonlarla verdiği tuzlar genelde suda çözünebilirken, iki ve çok değerli katyonlarla verdiği tuzlar suda çözünmeyen kararlı jeller oluştururlar. Aljinik asitin tuzlarından sodyum aljinat, alglerin hücre duvarlarından ekstrakte edilir ve ticari olarak en yaygın olan aljinat ürünüdür. Diğer pek çok aljinat formunun hazırlanmasında sodyum aljinat kullanılır.

Sodyum aljinat, aljinik asitin sodyum tuzu olup, yapısı itibariyle anyonik bir polimerdir. Suda çözünürlüğü mevcut olup, suda çözüldüğünde viskoz ve sarı renkli bir çözelti oluşturur.

### **2.5.2 Aljinat jellerinin kimyasal yapısı ve çapraz bağlanma**

Aljinat, divalent ve trivalent iyonların varlığında çapraz bağlanma ile jelleşir. Magnezyum(II) ve monovalent katyonlar varlığında jelleşme görülmez. [17]. Aksine, aljinik asitin monovalent tuzları çözünür özellik taşır.

Jelleşmede kalsiyum(II) ve baryum(II) en çok kullanılan katyonlardandır. Bunlar hem kontrollü salım çalışmalarında, hem dolgu maddesi kullanımında, hem de adsorpsiyon çalışmalarında kullanılırlar [1]. Bunun dışında, amaca uygun olarak, diğer katyonların kullanımı da söz konusu olabilir. Aljinat genelde biyolojik ve farmakolojik uygulamalarda kullanılan bir polimer olduğundan, toksik etkileri

nedeniyle; kurşun(II), nikel(II), kadmiyum(II) gibi katyonların kullanımı yaygın değildir.

Divalent katyonlarla sodyum aljinatın bir araya nasıl geldiği ve ne tür bir jel oluşturduğu literatürde araştırılmış konulardandır. Kalsiyum aljinatın sodyum aljinattan eldesi esnasında guluronik asit ünitelerindeki sodyum iyonlarının, kalsiyum iyonlarıyla yer değiştirdiği ve böylece karşılıklı olarak çapraz bağlı polimerlerin oluştuğu düşünülmektedir [18].

Kalsiyum aljinat jelleri, teorik olarak pek çok şekle sahip olabilir. Bunlardan film ve küre en çok bilinen formlardandır. Film daha çok kaplama amacıyla kullanılırken, küreler salım ve adsorpsiyon çalışmalarında tercih edilir. Ancak, literatürde film den ilaç salımının yapıldığı pek çok çalışma da bulunmaktadır [19, 20].

Bu çalışmada, kontrollü salım için küresel formda kalsiyum aljinat jelleri tercih edilmiştir. Çapraz bağlanmayı gerçekleştirici divalent metal iyonlarının bulunduğu çözeltiye sodyum aljinat çözeltisi damlatıldığında, çapraz bağlanmış jel kürecikler oluşur. Çapı 0,2 mm ve üstü kürelere makroküre, daha küçük olanlara ise mikro ve nano küre ismi verilir. Çapı 0,2 mm ve daha az olan kürecikleri elde etmek için, daha spesifik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yapıların eldesi için atomizasyon, emülsifikasyon gibi yöntemler bildirilmiştir [21].

### **2.5.3 Aljinatın fiziksel özellikleri**

Çapraz bağlanmış aljinatların fiziksel özellikleri kimyasal yapısı ile ilgilidir. Yapının bileşimi, tekrarlayan grup sayısı ve molekül ağırlığı burada önemlidir. En yüksek mekanik dayanıklılığa ve monovalent katyonlara karşı kararlılığa sahip olan küreciklerin  $\alpha$ -L-guluronik asit bileşiminin %70'ten fazla olduğu yapılar olduğu bildirilmiştir [21].  $\alpha$ -L-guluronik asit yüzdesi arttıkça daha sert ve sağlam yapılar elde edilirken, bu yüzde düştükçe daha elastik kürecikler oluşmaktadır [22]. Aljinat jelleri 0-100 °C aralığında kararlı olup, sıcaklık arttıkça sertlikte ve viskozitede azalma gözlenir [23].

Bir çalışmada, çapraz bağlı aljinat küreciklerinin gözeneklilikleri elektron mikroskopu ile 5 ile 100 nm arasında saptanmıştır [24].

#### 2.5.4 Aljinatın kullanım alanları

Aljinik asit ve tuzları sanayide ve günlük yaşamda pek çok uygulama alanı bulmuş maddelerdir. Bu tez çalışmasının da konusu olan kontrollü salım dışındaki kullanım alanları aşağıda listelenmiştir.

Aljinat toksik olmayışı ve jel özelliği sayesinde tıpta pek çok uygulama alanı bulmuştur. Günlük yaşamdan en bilinen örnek, mide ilaçlarıdır. Midede asit aşırılığı, reflü gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan şuruplar; basit bazlar ve sodyum aljinat içermektedir. Burada kalsiyum karbonat ve magnezyum karbonat gibi antiasitler, asitin fazlasını nötralize ederken, sodyum aljinat da midedeki sıvının üstünde yüzen bir jel oluşturarak, reflüye mekanik bir engel oluşturur. [25]

Aljinat dişçilikte de kullanılan bir maddedir. Diş kalıplarının çıkarılmasında ve basit dolgularda kullanımını bilinmektedir [26].

Bunların dışında, aljinat iyot-131 ve stronsiyum-90 gibi radyoaktif izotopların vücuttan uzaklaştırılmasında şelatlayıcı olarak da kullanılabilir [27]

Aljinat, gıda endüstrisinde de kendisine yer bulmuş bir maddedir. Gıdalarda temel olarak jelleştirici ve emülsiyon edici olarak kullanılır. Bunlardan başka viskozite sağlayıcı, termal olarak kararlı jel oluşturucu, köpük ve emülsiyon stabilizatörü, çökelme ajanı olarak; et, süt, sebze ve tatlılarda sıkça kullanılmaktadır [28].

Bunların dışında, et, balık ve tavuk gibi ürünlerin kaplanarak ömrünün uzatılmasında bir film olarak da kullanılmaktadır [29]

Aljinat gıda katkı maddesi olarak uluslararası E kodlamasına da sahiptir. Bunlar Çizelge 2.3'te verilmiştir.

**Çizelge 2.3 :** Aljinik asit ve tuzlarının gıda katkı kodları

E-Kodlaması	Katkı maddesi
E400	Aljinik asit
E401	Sodyum aljinat
E402	Potasyum aljinat
E403	Amonyum aljinat
E404	Kalsiyum aljinat

Bunlardan başka, aljinatın tekstil ve boya sektöründe boya katkısı, kağıt üretiminde sertlik sağlayıcı, inşaat sektöründe harç elastikiyeti artırıcı, tutkal katkısı ve genel olarak kıvam artırıcı olarak kullanıldığı bilinmektedir.

Aljinat ayrıca adsorpsiyon ve toksik maddelerin uzaklaştırılması çalışmalarında da kullanılmaktadır. Jel yapısındaki aljinat, ortamdaki toksik katyon ya da molekülleri adsorbe ederek içine hapseder ve ortamdan uzaklaştırır [30-33].

## 2.6 Kontrollü Salımda İlaç Olarak Kullanılan Sığır Serum Albümini

Bu çalışmada protein salımı incelenmek istenmiştir. Bilindiği üzere, vücuttaki hormonlar proteindir. Vücuttaki işleyişleri yöneten hormonların miktarındaki eksiklik, önemli rahatsızlıkları beraberinde getirebilir. Örneğin insülin eksikliği ya da yokluğu şeker hastalığına sebep olur. Dolayısıyla bu tür eksikliği olan kişilerin, dışarıdan hormon almaları gerekir.

Hormonların protein yapısında oluşu, burada geliştirilmek istenen kontrollü salım sisteminden bir model protein salımını gerektirir. Doğrudan tek bir hormon salımı hem maliyetli hem de daha dar çerçevede bir çalışmayı beraberinde getirir.

Sığır serum albümini, sığır serumundan elde edilir ve bir albümandır. Fraksiyon V adıyla da bilinir.

Albümin memelilerin kan plazmasında en çok bulunan proteindir. Vücudun diğer kısımlarında da bulunur. Bu proteinin temel görevi, yağ asitleri gibi molekülleri taşımak ve kan ve doku sıvıları arasında su dengesini sağlamaktır. Albümin, model protein olarak kullanımının yanı sıra, vücuda alınan ilaçları bağlar ve taşıma görevini üstlenir [34].

Sığır serum albümini, çok araştırılmış ve özellikleri iyi bilinen bir proteindir. Büyük molekül ağırlıklı bir proteindir. Sığır serum albüminine ait temel özellikler Çizelge 2.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 2.4 : Sığır serum albüminine ait bazı özellikler**

Amino asit sayısı	585
Molekül ağırlığı	66399
İzoelektrik nokta, pI	4,7 (Suda, 25 °C)
Görünüşü	Beyaz toz
Diğer adları	BSA, Fraksiyon V

## 2.7 Kontrollü Salımda Yardımcı Katkı Maddesi Olarak Kil

Kil doğada bol miktarda bulunan mineral grubunun genel adıdır. Killer tane boyutu 2 µm'den küçük ince taneli, toprağa benzeyen tortul kayaçlardır. Alumina ve silis içeriği yüksek bir mineraldir.[35] Killer çok geniş bir sınıflandırmaya sahiptir. Bu sınıflandırma kullanım alanına ya da kimyasal yapısına göre de değişebilir.

Killer, yukarıda bahsedildiği gibi belli bir parçacık boyutunun altında olan parçacıklardır. Kimyasal yapısında, esas bileşen olan hidrat alüminyum silikatlarla beraber, safsızlık olarak demir, magnezyum, potasyum, sodyum, kuvarz gibi minerallerle; organik kalıntılar ve çözüner tuzları da içerir. Dolayısıyla kil; çeşitli oranlarda kil mineralleri ile birlikte, yukarıda adı geçen safsızlıkların bir karışımıdır.

Kil mineralleri, tortul özelliğe sahiptir. Parçacık boyutları küçük olduğundan, yüksek yüzey alanına sahiptirler. Killerin yüksek yüzey alanları adsorpsiyon, negatif elektrik yükleri de katyon tutma özelliği kazandırır. Standart bir kilin termal kararlılığı 200°C'ye kadar, yüzey alanı 30-70 m<sup>2</sup>/g, tabakalar arası uzaklık 10-20 Å olarak verilir [35].

### 2.7.1 Killerin sınıflandırılması

Killer düzensiz, karmaşık ve büyük mineral dizilişine sahip; çok miktarda ve farklı türde safsızlık içeren maddelerdir. Ayrıca oluşum yerleri ve özelliklerinin farklı oluşu da sınıflandırılmalarını zorlaştıran etmenlerdendir.

Killer aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler [35]:

Mineralolojik Özelliklerine Göre

1. Kaolin
2. Montmorillonit
3. Mika
4. Klorit
5. İllit
6. Attapulgit

Kimyasal İçeriklerine Göre

1. Yüksek alüminyum içerikli

2. Boksit içerikli
3. Silikat içerikli
4. Demir içerikli
5. Kalsit içerikli
6. Karbonat içerikli

#### Türlerine Göre

1. Amorf grup
2. Kristal grup

#### Fiziksel Sınıflandırma

1. Plastik özelliğine göre
2. Tane boyutuna göre
3. Refraktif özelliğine göre
4. Rengine göre

### **2.7.2 Killerin kullanım alanları**

Killer su ile karıştırıldıklarında belli miktarda elastiklik kazandıran maddelerdir. Kuru kil ise yüksek sıcaklıkta işleme tabi tutulduğunda kalıcı fiziksel ve kimyasal reaksiyonlarla seramik malzemelere dönüşebilir. Bu özelliği sayesinde, kilin tarih boyunca porselen, çömlek ve tablet yapımında kullanılışı bilinmektedir. Bu günlük kullanımının yanında, kilin pek çok bilimsel ve sınai kullanım alanı da mevcuttur. Kilin sınai kullanım alanları burada sıralanamayacak kadar çok, geniş ve hayatın her alanına yayılmış durumdadır.

### **2.7.3 Montmorillonit**

Montmorillonit, Fransa'daki Montmorillon yerleşim bölgesinden adını almış bir kil türüdür. Montmorillonit, smektit ve filosilikat grubu killere aittir. Kimyasal formülü  $(\text{Na,Ca})_{0,33}(\text{Al,Mg})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  olarak verilir.

Su varlığında büyük oranda genişleyen montmorillonit, bu özelliği sayesinde pek çok kullanım alanı bulmuştur. Bunlar; yağların ve suların filtrasyonu, kıvamlandırma ve adsorban gibi alanlardır [36] Montmorillonitin bu özelliği, yüksek yüzey alanı

sayesinde. Killer genel olarak küçük parçacık boyu ve yüksek yüzey alanı özelliği ile bilinir. Ancak montmorillonitin yüzey alanı pek çok kil mineralinden yüksektir. Örneğin kaolinit kil mineralinde spesifik yüzey alanı 72,4 m<sup>2</sup>/g iken, montmorillonitin yüzey alanı 200 m<sup>2</sup>/g gibi değerlerdedir [37]. Bu özellikleri sayesinde, montmorillonit adsorpsiyon çalışmalarında tercih edilebilir.

#### **2.7.4 Proteinlerin killere adsorpsiyonu**

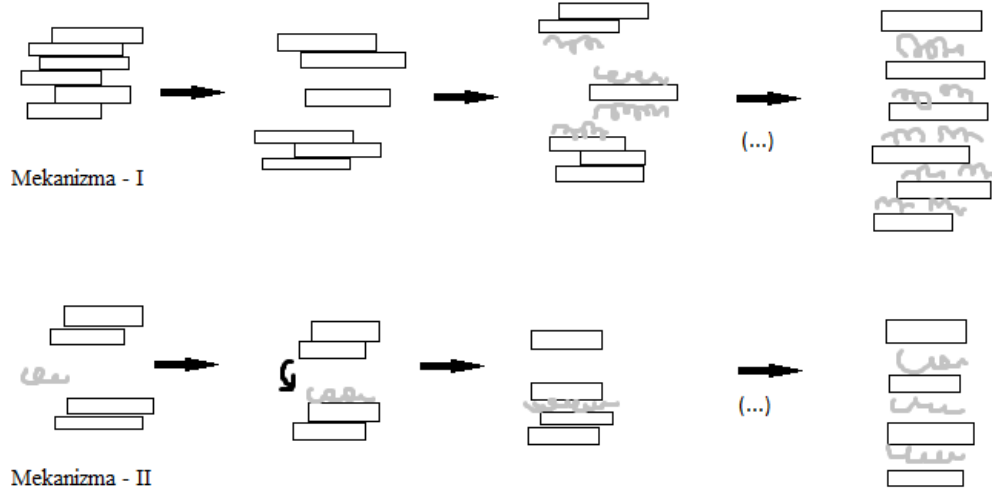
Proteinlerin killere adsorpsiyonu, literatürde çok eskiden beri bilinen bir olgudur [38,39]. Killerin yüksek yüzey alanları ve negatif yüzey yükleri bunun en önemli sebeplerindedir. Killerden montmorillonit üzerine protein adsorpsiyonu da literatürdeki çok eski çalışmalarda belirtilmiştir. [38] Literatürdeki kil-protein adsorpsiyonu çalışmalarından birçoğu zirai uygulamaları hedeflemektedir, zira kil-protein etkileşimi proteinlerin topraktaki bozunurluğunu ve dayanıklılığını belirleyen önemli bir olgudur [40,41].

Harter ve Stotzky tarafından yapılan çalışmalarda, proteinlerin homoiyonik H, Ca, Na, Al, La ve Th smektitlere olan adsorpsiyonu incelenmiş ve iki neticeye varılmıştır: Proteinlerin bir kısmı kolayca yüzeyden ayrılırken, diğer kısmı ayrılmamaktadır. Yapılan bu çalışmalar proteinlerin smektitlerin düzlemsel yüzeylerine adsorbe olduğunu ve düşük izoelektrik nokta değerlerinde (pI) dahi adsorpsiyonun gerçekleştiğini göstermiştir [42,43].

Son yıllarda biyonano malzemelerin kullanımının artışıyla beraber, bu tür çalışmalar kontrollü salımda da çok sık kullanılmaya başlanmıştır [44,45].

Proteinler, killerin negatif yük yoğunluğuna sahip yüzeylerine adsorbe olur. Literatürde kil adsorpsiyonu neticesinde, kil tabakaları arasındaki mesafenin açıldığı ve belli bir noktadan sonra tabakaların dağıldığı bildirilmiştir [46]. Bu durum, proteinlerin kil tabakaları arasına yerleştiğini ifade eder. Bu tür yapılara biyananokompozit adı verilir.

Proteinlerin kil tabakaları arasına nasıl yerleştiğini açıklamak için iki temel mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan ilki, kil tabakalarının önce ayrılıp aralarına organik molekülün girdiği, sonra tabakaların tekrar kapandığını öne sürmekte [47]; ikincisi de tabakaların ayrı ayrı iken birine protein adsorpsiyonu sonrasında diğerine ait bir tabakanın, protein adsorplanmış kil tabakasına göçünü öne sürmektedir[48]. Her iki mekanizma Şekil 2.7'de I ve II olarak gösterilmiştir [46].



**Şekil 2.7** : Kil tabakalarına protein yerleşiminin mekanizmaları.

## 2.8 Proteinlerin Kantitatif Analizi

Proteinler, monomerleri amino asit olan büyük molekül ağırlıklı polimerlerdir. Proteinlerin kantitatif analizi, basit yapılı moleküllerinki kadar kolay olmayabilir. Bunun için literatürde belli başlı kantitatif analiz metodları rapor edilmiştir. Bunlardan klasik yöntemler Biuret [49], Bradford [50], Lowry [51], Kjeldahl [52] ve BCA yöntemleridir. Bundan başka proteinlerin tamamen amino asitlerine ayrılması ve amino asitlerin analizi yöntemi [53,54] gibi yöntemler de literatürde rapor edilmiştir. Ayrıca doğrudan UV-VIS spektrometri yöntemi de kullanılabilir. Ancak kolaylığı nedeniyle klasik yöntemler pek çok laboratuvarında ve araştırmada kullanılmaktadır. Bu klasik yöntemlerden bazıları, aşağıda detaylı olarak anlatılacaktır.

### 2.8.1 Lowry yöntemi

Oliver H. Lowry tarafından bulunmuş bu test, bazik ortamda (pH=10-10,5) proteinlerin peptit bağlarındaki azotların bakır(II) iyonlarıyla kompleks oluşturması ilkesine dayanır. Lowry yöntemi, en çok kullanılan protein tayini yöntemlerinden biridir. Bu yöntemin çalışma prensibi, bazik ortamlarda iki ya da daha çok peptit bağı içeren bileşiklerin, bakır tuzlarıyla mor kompleksler oluşturmasına dayanır.

Lowry protein tayininde, sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), potasyum sodyum tartarat ve bakır(II) sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) karışımıdır. Protein varlığında mor renkli bir kompleks oluşur. Bu mor rengin varlığı, proteinlerin kalitatif analizi için de kullanılabilir.

Kantitatif analizde, kalibrasyon için standartlar hazırlanır ve 750 nm dalgaboyunda ölçülür. Daha sonra örnekler uygun seyreltmeler yapıp, Lowry reaktifleri eklendikten sonra aynı dalgaboyunda ölçülür.

### **2.8.2 Biuret yöntemi**

Lowry protein tayininin bir başka şekli Biuret yöntemidir. Bu yöntemin çalışma prensibi, yine bakır(II) ile proteinlerin peptit bağlarındaki azotların mor kompleks oluşturmasıdır. Biuret protein tayininde kullanılan reaktif, potasyum hidroksit (KOH), bakır(II) sülfat ( $\text{CuSO}_4$ ) ve sodyum potasyum tartarat karışımıdır. Biuret protein tayininde önce kalibrasyon için standartlar hazırlanır ve bunların absorbansı 550 nm dalgaboyunda ölçülür. Daha sonra örnekler uygun seyreltmeler yapıp, biuret rekatifi eklendikten sonra aynı dalgaboyunda ölçülür.

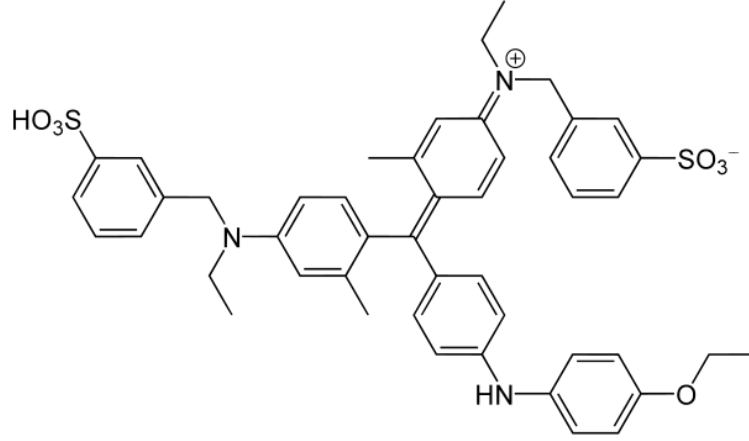
### **2.8.3 Bradford Yöntemi**

Bu çalışmada da kullanılan Bradford yöntemi, protein tayininde en çok kullanılan yöntemlerdendir.

Bradford protein tayin yöntemi, Coomassie Brilliant Blue G-250 boya molekülünün, protein varlığında ve asidik ortamda, absorbans kaymasına dayanır. Bu absorbans kayması daha kırmızı formdaki olan boyanın, protein bağlanmasıyla mavi hale dönüşüne dayanır. Burada boya öncelikle eşlenmemiş elektronlarını proteinin iyonlaşabilen gruplarına vererek proteinin hidrofobik bölgelerini ön plana çıkarır. Bu esnada proteinin hidrofobik bölgeleri, van der Waals kuvvetleriyle boyanın apolar uçlarına bağlanarak, oluşan mavi kompleksi sağlamlaştırır. Artan protein miktarıyla, oluşan mavi renk artar.

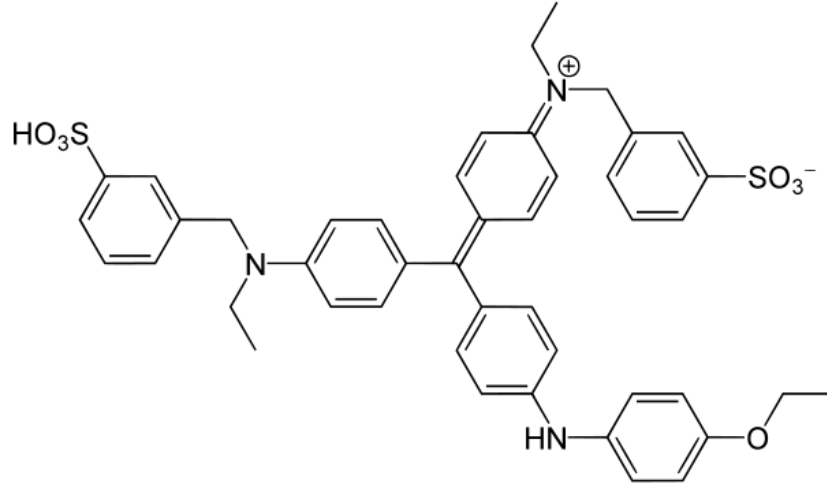
Mavi renkli kompleksin maksimum dalgaboyu 595 nm'de verilir.

Bu protein tayin yönteminde kullanılan boya Coomassie Brilliant Blue G-250'nin molekül yapısı, Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.8 :** Brilliant Blue G-250'nin molekül yapısı

Bu molekülden iki adet metil grubu çıkarılırsa, oluşan yeni molekül Coomassie Brilliant Blue R-250 olarak adlandırılır ve bunu da protein tayininde kullanmak mümkündür. Bu molekül de Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



**Şekil 2.9 :** Brilliant Blue R-250'nin molekül yapısı

Bradford yönteminde kullanılacak reaktif önceden hazırlanabileceği gibi, ticari olarak da bulunabilir. Bradford reaktifi, 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250'nin 50 mL %95'lik etanol içinde çözüldükten sonra, %85'lik (w/v) fosforik asit eklenmesiyle hazırlanır. Oluşan çözelti 1 litreye seyreltilir.

Bradford yönteminin kalibrasyonu yapıldıktan sonra, örnek analizi adımları aşağıda verilmiştir.

1. Her bir örnekten 100 µL alınarak test tüplerine konulur.
2. Örneklerin üzerine 5 mL Bradford reaktifi eklenir.

3. Bir başka tüpe 100 µL kör eklenir, üzerine 5 mL Bradford reaktifi konur.
4. Tüpler vorteks gibi bir karıştırıcı ile karıştırılır.
5. Beş dakika beklendikten sonra, spektrofotometrik yöntemle, 595 nm'de ölçüm yapılır.

Bradford yöntemi hassasiyet bakımından da ikiye ayrılır. Standart yöntem (20-150 mg protein) yukarıda anlatılan yöntemdir. Mikro yöntemde ise 1 ila 10 mg protein tayin edilebilir. Mikro yöntemin farkı, kalibrasyon çözeltilerinin derişimleri ile, eklenen Bradford reaktifi hacminin 1 mL olmasıdır [50].

Bradford protein tayini yöntemi, ortamda bulunabilecek çeşitli kimyasallardan gelen girişimlere karşı daha iyi bir sonuç vermesi ve daha hassas oluşu ile tercih edilen bir yöntemdir. En büyük dezavantajı da lineer bölgesinin dar oluşudur. Bu, ölçümden önce pek çok seyreltme yapılması gerekliliğini beraberinde getirir.

### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1 Malzemeler

Sodyum aljinat (Kahverengi yosundan, ağırlıkça %2 derişimdeki çözeltilsinin 25 °C’de viskozitesi ~250 cps, >%99 saflıkta) ve montmorillonit (Asitle muamele edilmiş K10, yüzey alanı 220-270 m<sup>2</sup>/g) Sigma-Aldrich’ten temin edilmiştir. Coomassie Brilliant Blue G-250 ve sığır serum albümini (*Bovine Serum Albumin*, BSA, fraction V) Merck’ten alınmıştır.

Bunlardan başka, potasyum dihidrojen fosfat (Merck, >%99), sodyum hidroksit (Merck, >%99), hidrojen klorür (Merck, %37’lik çözelti), sodyum klorür (J.T . Baker, >%99) ve kalsiyum klorür dihidrat (JT Baker>%99) kullanılmıştır. Bütün çözeltilerin hazırlanışında deiyonize su kullanılmıştır. Tüm kimyasallar ticari olarak bulunabilir ve ek saflaştırma uygulanmaksızın kullanılmıştır.

#### 3.2 Cihazlar

Deneylerde örneklerin UV ölçümlerini almak için kullanılan cihaz Shimadzu UV-1800 marka spektrofotometredir. Cihaz çift ışın yollu olup kullanılan lamba tungsten – döteryum lambalardır. (W, D<sub>2</sub>). Dalgaboyu çalışma aralığı 200 – 800 nm’dir.

Hazırlanan küreciklerin sulu ortamda çalkalanması için kullanılan cihaz Nüve ST402 marka su banyolu çalkalayıcıdır. Çalkalama hızı 150 – 1000 rpm arasındadır.

Taramalı elektron mikroskopisi (*Scanning electron microscopy*, SEM) gözlemleri için, JEOL-JSM-5919LV marka taramalı elektron mikroskopisi kullanılmıştır.

FT-IR analizlerinde Thermo Nicolet 6700 marka FT-IR spektrofotometre kullanılmıştır.

Bunlardan başka, çalışmada pH Metre (Metrohm 654), saf su cihazı (Elga Purelab Option-Q), ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex), santrifüj, vorteks ve hassas terazi kullanılmıştır.

### 3.3 Yapay Mide Sıvısının Hazırlanması

Bu çalışmada oral yoldan salım simülasyonu yapıldığı için, yapay mide sıvısı (*simulated gastric fluid*, SGF) ve yapay bağırsak sıvısı (*simulated intestinal fluid*, SIF) kullanılmıştır.

Yapay mide sıvısı; %0,2 (w/v) NaCl, %0,7 HCl ve %0,32 (w/v) pepsin enzimi içerir ve pH değeri yaklaşık 1,2'dir. [55] Yapay mide sıvısı formülasyonları ticari olarak bulunabildiği gibi, laboratuvarında da hazırlanabilir.

Yapay mide sıvısı, literatürdeki pek çok salım ve jel karakterizasyonu çalışmalarında pepsin içermeksizin kullanılmıştır. Pepsin kullanımı hem proteinlerin sindirip salım takibini zorlaştırdığı, hem de ek maliyet getirdiği için kullanılmayabilir. Yapay mide sıvısının bu formuna pepsinsiz yapay mide sıvısı adı verilir. Bu çalışmada da pepsinsiz mide sıvısı kullanılmıştır ve bundan sonra sadece yapay mide sıvısı olarak adlandırılacaktır.

Yapay mide sıvısı, 0,2045 g sodyum klorürün suda çözüldükten sonra üzerine 0,7 mL %37'lik HCl eklenmesi ve 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Daha büyük hacimlerde stok çözelti hazırlanabilir ancak, çözeltilerin derişiminin değişmesini önlemek için taze çözelti kullanımına özen gösterilmiştir.

### 3.4 Yapay Bağırsak Sıvısının Hazırlanması

Yapay bağırsak sıvısı; pankreatin içeren standart fosfat tamponu (pH = 6,8) olarak tanımlanmıştır. [55] Yapay bağırsak sıvısı formülasyonları ticari olarak bulunabildiği gibi, laboratuvarında da hazırlanabilir.

Yapay mide sıvısında olduğu gibi, yapay bağırsak sıvısında da enzim kullanılmamıştır. Bu nedenle pankreatinsiz yapay bağırsak sıvısı, bundan sonra yapay bağırsak sıvısı olarak adlandırılacaktır.

Yapay bağırsak sıvısının hazırlanışında, 0,6805 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,0896 g NaOH suda çözüldükten sonra 100 mL'ye tamamlanır. Bu noktada pH = 6,8 civarında olması gerekir. Eğer bu sağlanmıyorsa, gereken miktarda NaOH ya da HCl ilavesi ile çözeltinin pH değeri 6,8 olmak üzere ayarlanır.

### **3.5 Kürelerin Hazırlanması**

#### **3.5.1 Kilsiz kürelerin hazırlanması**

Aljinat-BSA kürelerinin hazırlanmasında farklı formülasyonlar kullanılmıştır. Öncelikle, sodyum aljinat deiyonize suda çözülmüş, hiç kabarcık ve katı kalmayana kadar beklendikten sonra, bu çözeltiye gereken miktarda sığır serum albümini eklenmiştir. Toplam çözelti hacmi 10 mL'dir. Homojen bir çözelti elde edilene dek karıştırıldıktan sonra, bu çözelti bir şırınga yardımıyla 30 mL kalsiyum klorür çözeltisine damlatılır. Bu esnada çözeltide hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir. Oluşan küreler hemen süzülür, 20 mL deiyonize su ile yıkanır. Kürelerin üzerindeki kaba su adi süzgeç kağıdı ile alındıktan sonra, bir laboratuvar buzdolabında kurumaya bırakılır. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılmamasının sebebi, BSA'nın bozulmasını önlemek içindir.

#### **3.5.2 Killi kürelerinin hazırlanması**

Aljinat-BSA-kil kürelerinin hazırlanması da, AB kürelerinin hazırlanmasına benzer bir yöntemle gerçekleştirilir. Burada öncelikle belli bir miktarda montmorillonit kili, manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyo vasıtasıyla deiyonize suda dağıtılır. Bu işlem 1 saat boyunca sürdürülür. Daha sonra, karışıma sığır serum albümini eklenerek 1 saat boyunca karışması sağlanır. Son olarak gereken miktarda sodyum aljinat eklenir ve karışım homojen olana dek karıştırma sürdürülür. Bu karışımın toplam hacmi 10 mL'dir. AB kürelerinin hazırlanmasında olduğu üzere, karışım bir şırınga vasıtasıyla 30 mL kalsiyum klorür çözeltisine damlatılır. Süzülen küreler 20 mL deiyonize su ile yıkanır, laboratuvar buzdolabında kurutulur.

#### **3.5.3 Proteinsiz kürelerin hazırlanması**

Su tutma deneylerinde ve morfolojik analizlerde kullanılan kürelerin hazırlanmasında, proteinli kürelerinin hazırlanmasında kullanılan yöntem kullanılmıştır. Tek fark, sığır serum albüminin eklenmemesidir.

Hazırlanan bütün formülasyonlar EK A'da gösterilmiştir. Formülasyonlardaki kısaltmalarda C, K, B sırasıyla kalsiyum, kil ve BSA'yı temsil etmektedir. Örnek olarak CKB-3-1-1 kısaltması, %3 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş, %1 BSA ve %1 kil içeren küreleri ifade eder.

### 3.6 Su Tutma Deneyleri

Su tutma deneylerinde, aljinat kürelerinin salım ortamlarına nasıl davranacağını araştırmak istenmiştir. Bu amaçla, çeşitli formülasyonlarda hazırlanmış bulunan aljinat kürelerinin uygun salım ortamlarında ne kadar su tuttuğu hesaplanmıştır. Bunun için yapılan denemelerde, çeşitli formülasyonlarda olmak üzere, 0,1 g kuru küre salım ortamına yerleştirilmiştir. Daha sonra, çeşitli zaman aralıklarında küreler süzülüş, üzerlerindeki kaba sıvı bir süzgeç kağıdı yardımıyla uzaklaştırılmış ve kürenin kütlesi ölçülmüştür. Kullanılan çözeltiler yapay mide sıvısı (SGF) ve yapay bağırsak sıvısıdır (SIF). Ölçümlerin sonunda su tutma, ya da şişme oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır:

$$ST = \frac{W_t}{W_o} \quad (3.1)$$

Burada ST, su tutma oranını,  $W_t$  anlık küre kütlesini,  $W_o$  da başlangıçtaki küre kütlesini temsil etmektedir.

### 3.7 Morfoloji Gözlemleri

Kürelerin boyut analizleri optik mikroskopi ile yapılmıştır. Optik mikroskop görüntüleri elde edilen kürelerin, ortalama boyutları ölçülmüştür. Kürelerin yüzey analizleri taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile gerçekleştirilmiştir.

BSA'nın kil tabakaları tarafından tutulduğunu doğrulamak için XRD yöntemi kullanılmıştır. Üç ayrı cam lam üzerinde kil, kil + BSA, kil + BSA + aljinat filmleri hazırlanmış, kurutulmuş ve bunlara ait XRD spektrumları ölçülmüştür.

Bu gözlemlerin yanında, yapay mide sıvısı ve yapay bağırsak sıvısının küre yüzeyine etkisini incelemek amacıyla, kilsiz ve %1 kil içeren, %3  $CaCl_2$  içinde jelleştirilmiş %2 aljinat küreleri, kurutulduktan sonra, 150'şer dakika SGF ve SIF içinde çalkalanmıştır. Bu küreler daha sonra süzülerek kurumaya bırakılmış, ve yüzey analizi SEM kullanılarak yapılmıştır.

### 3.8 FTIR

Kürelerin proteini hapsediğini doğrulamak için, ek bir analiz olarak Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Proteinli kurutulmuş

küreler, bir havanda iyice dövülerek toz haline getirilmiş ve sonra bu toz ek bir işleme tabi tutulmaksızın kızılötesi spektrumu alınmıştır.

### **3.9 BSA Salımı**

Önceden tartılmış ve kurutulmuş küreler, kapaklı bir cam şişeye yerleştirilmiş ve üzerine 30 mL salım ortamı eklenmiştir. Bu salım ortamları, oral yolla salımı taklit etme amacıyla, önce yapay mide sıvısı sonra yapay bağırsak sıvısı olmak üzere ayarlanmıştır. Mide sıvısı 0-3 saat, bağırsak sıvısı ise 3 saatten sonra olmak üzere kullanılmıştır. 3. Saat sonunda küreler mide sıvısından süzölmüş ve 30 mL bağırsak sıvısına alınmıştır.

Oral yolla alımı taklit etme amacıyla, salım ortamı 37 °C sabit sıcaklıkta, su banyolu çalkalayıcıda 250 rpm'de çalkalanmıştır.

Salım yapılırken, düzenli aralıklarla salım şişesinden 500 µL örnek alınmış ve aynı miktarda taze salım çözeltisi geri eklenmiştir.

Küreler hazırlanırken BSA'nın bir miktarı kaybedilebilir. Bu nedenle CaCl<sub>2</sub> çözeltisine, yıkama suyuna ve kurutma kağıdına difüzlenen BSA için ayrı ayrı örnekler alınmıştır. Örnekler aynı gün ölçülemeyecekse, -20 °C'de saklanarak, bozulmaları engellenmiştir.

Örneklerdeki BSA miktarı, Bradford protein tahlili yöntemi ile ölçölmüştür. Shimadzu UV-1800 marka UV-VIS spektrofotometre ile 595 nm'de, Coomassie Blue kullanılarak, protein miktarı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, küre hazırlanması esnasında kaybedilen BSA miktarları da bu yöntemle ölçölmüştür.

Bradford yöntemi öncesinde, özellikle yapay bağırsak sıvısı içinde aljinat küreleri parçalandığından, örnekler mikrosantrifüj kaplarında santrifüj edilir. Aynı zamanda, Bradford reaktifi tüplere eklendiğinde, etkili bir karıştırma için, tüpler 3 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1 XRD Sonuçları

EK B'e XRD grafiği görülmektedir. Buna göre, yalnızca kile ait maksimum pik  $2\theta=6,93$ ; proteinli kile ait maksimum pik  $2\theta=2,74$  değerindedir. Aljinatlı kil-protein karışımında ise pik yoktur.

Kil tabakalarının BSA varlığında ne kadar açıldığını hesaplamak için Scherrer eşitliği kullanılmıştır. Bu eşitlik aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$t = \frac{K\lambda}{B\cos\theta} \quad (4.1)$$

Burada t, tabakanın kalınlığını K kristal yapısına bağlı bir sabiti (0,89),  $\lambda$  X-ışınının dalga boyunu, B integral genişliğini,  $\theta$  ise Bragg kırınım açısını ifade eder.

Kile ve BSA-kil karışımına ait açılar farklıdır. BSA varlığında pikin açıkça küçük değerleğe doğru kaydığı görülmektedir. Bu, tabakalar arasında bir açılmaya işaret eder. Scherrer eşitliği ile bu açılmanın 1,92 nm olduğu hesaplanmıştır. Kil ve BSA'ya aljinat eklendiğinde ise hiç pik görülmemektedir. Bu, artık tabakaların birbirinden tamamen ayrılıp, dağıldığı anlamına gelir. Bu sonuçlar, proteinlerin kil tabakalarının arasına girip onları açarak ve aljinat varlığında killerin tamamen dağılarak nanokompozit bir yapı oluşturduklarına işaret eder.

### 4.2 Boyut ve Yüzey Analizleri

Hazırlanan küreler, kurutulmuş iken 1 mm ve üstü boyutlardadır. Boyutların analizi için farklı küre formülasyonlarından örneklerin görüntüleri optik mikroskop ile kaydedilmiş ve bilgisayarda ortalama tanecik boyutları hesaplanmıştır. Kullanılan küre formülasyonları CKB-3-0-0, CKB-3-1-0, CKB-3-2-0 ve CKB-3-2-1'dir. Kürelere ait ortalama yarıçap 1,11 mm olarak ölçülmüştür. Bu görüntüler EK C'de yer almaktadır.

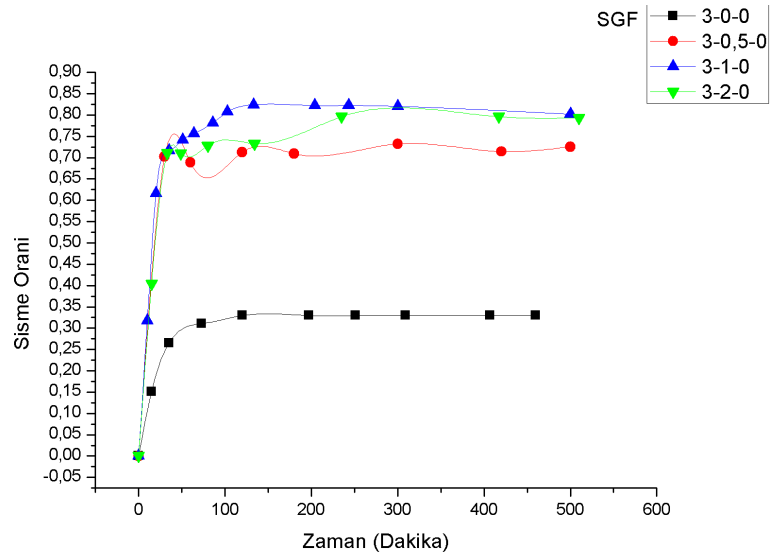
Seçilmiş küre formülasyonlarına ait yüzey görüntüleri EK E’de verilmiştir. Kuru haldeki kürelerin taramalı elektron mikroskopi görüntülerine bakıldığında, kilsiz aljinat kürelerin daha düzensiz, girintili çıkıntılı ve çatlaklı bir yüzeye sahip olduğu; killi aljinat kürelerin ise daha sıkı, tok ve düzgün bir yapıda olduğu görülmektedir. Bu görüntüler, kilin küre yüzeylerini de sağlamlaştırdığını göstermektedir. Kil, proteini adsorbe etmesinden başka, küre yüzeyini de sağlamlaştırarak hapsedme verimini artırmakta ve salım profilini yavaşlatmaktadır.

### 4.3 FTIR

Kürelerde BSA’nın hapsedildiğini ispatlamak için yardımcı bir yöntem olarak FTIR kullanılmıştır. EK F’de CKB-3-0-0 ve CKB-3-0-1 kürelerine ait FT-IR spektrumu yer almaktadır. 1530  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde görülmesi gereken karakteristik amid piklerinin yokluğu, yıkama ile yüzeyde protein kalmadığını ispatlamaktadır. Hidroksil pikleri ile amin pikleri çakışmış olduğundan, buradan bir çıkarım yapılamaz.

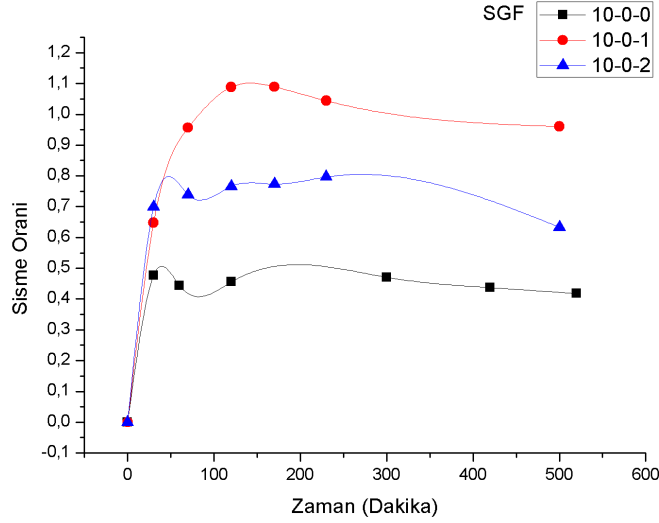
### 4.4 Su Tutma Sonuçları

Su tutma çalışmalarında, farklı aljinat – kil formülasyonları, 37 °C sıcaklıkta, farklı salım ortamlarında (SGF ve SIF) kullanılmıştır. Şekil 4.1’de, %3  $\text{CaCl}_2$  içinde jelleştirilmiş kürelerin, SGF içindeki su tutma sonuçları görülmektedir.



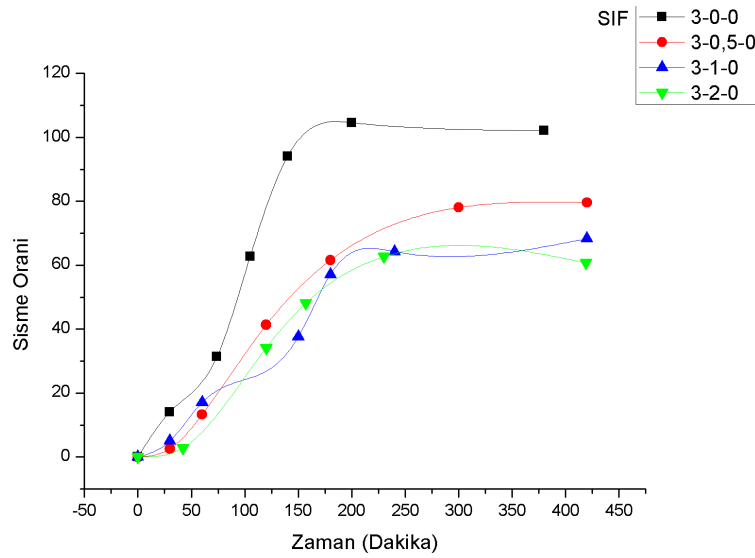
Şekil 4.1 : %3  $\text{Ca}^{2+}$  içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF’de su tutma sonuçları

%10 CaCl<sub>2</sub> içinde jelleştirilmiş kürelere ait, SGF’de su tutma sonuçları ise Şekil 4.2’de verilmiştir.



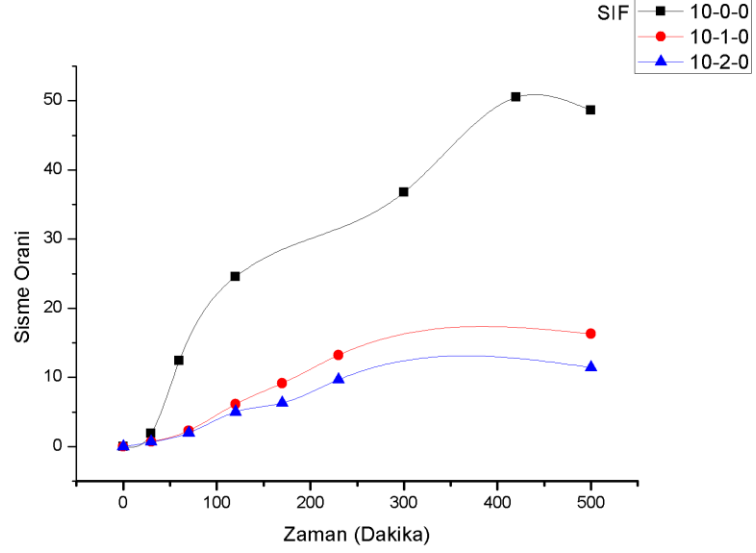
Şekil 4.2 : %10 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF’de su tutma sonuçları

Kürelerin SIF içinde ne kadar su tuttukları da incelenmiştir. %3 CaCl<sub>2</sub> içinde jelleştirilmiş kürelerin, SIF içinde su tutma sonuçları Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3 : %3 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF’de su tutma sonuçları

%10 CaCl<sub>2</sub> içinde jelleştirilmiş kürelerin, SIF içinde su tutma sonuçları da Şekil 4.4’te gösterilmektedir.



**Şekil 4.4 :** % 10 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te su tutma sonuçları

EK D'de, bütün şişme sonuçları, sırasına uygun olarak SGF ve SIF içinde karşılaştırılmalı olarak da görülebilmektedir. SGF içinde kürelerin yaklaşık iki katına kadar kütlelerini artırabildikleri, SIF içinde ise bu oranın çok daha fazla (%3 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleşen küreler için, 120 katına kadar) olduğu görülmektedir. Bunun yanında, SIF içinde bütün kürelerin bir süre sonra formlarını kaybedip parçalanmaya başladıkları da gözlemlenmiştir. Asidik ortamda açılmayan jel yapısı, bazik ortamda ve özellikle fosfat varlığında kendini koruyamamaktadır. SIF'teki fosfat, jellerdeki kalsiyumu çeker ve kalsiyum aljinatın tek değerlikli tuzuna dönüştürür. Bu olay da kürelerin dağılmasını hızlandıran bir süreçtir.

SIF ortamında, kürelerin SGF'ye oranla çok daha fazla su alması beklentilere cevap veren bir sonuçtur. Zira su girişiyle proteinin dışarı taşınması hızlanır.

#### 4.5 Hapsetme Verimleri

Kürelerin, konulan BSA'nın yüzde kaçını hapsettiğini bulmak için hapsetme verimleri hesaplanmıştır. Kürelerin hazırlanışı esnasında, sırasıyla jelleşme ortamı, yıkama suyu ve kurutma kağıdından alınan numuneler Bradford protein tayini yöntemiyle ölçülmüş ve bunlardaki protein miktarı; başlangıçta konulan protein miktarına oranlanarak hapsetme verimleri hesaplanmıştır. Hazırlanan küre formülasyonlarına ait hapsetme verimleri Çizelge 4.1'te verilmiştir.

**Çizelge 4.1 : Küre formülasyonlarına ait hapsetme verimleri.**

Formülasyon	Hapsetme Verimi
CKB-3-0-1	%40
CKB-3-0,5-1	%68
CKB-3-1-1	%72
CKB-3-2-1	%78
CKB-10-0-1	%46
CKB-10-2-1	%78

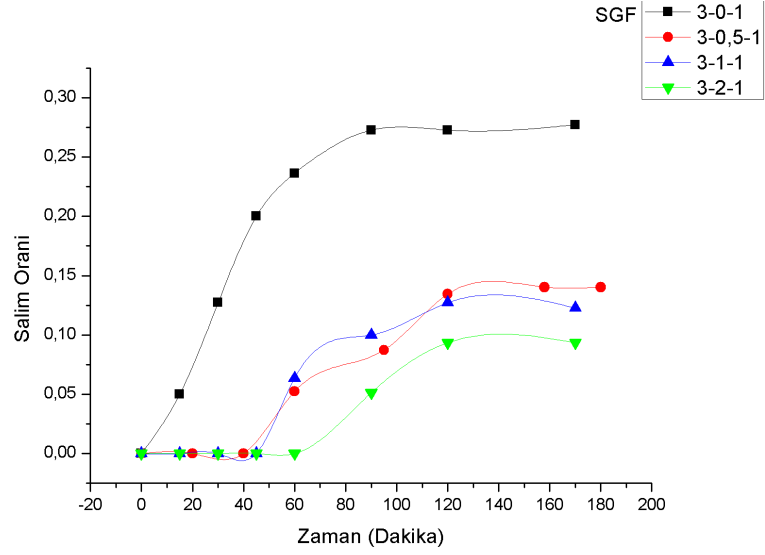
Çizelgede görüldüğü üzere,  $Ca^{2+}$  miktarının artışıyla, protein hapsetme verimi bir miktar artsa da, önemli artışlar kil miktarının değişmesiyle gözlenmiştir. Kilin proteini adsorplayıcı özelliği, hazırlanış esnasında proteinin dışarı kaçmasını önlemektedir.

#### **4.6 Salım Sonuçları**

Protein salım takibinde elde edilen absorbans – zaman grafiklerinden, toplam salım (Başlangıçta eklenen protein miktarına oranı) – zaman grafikleri oluşturulmuştur. Bunun için şu hesaplama yolu izlenmiştir:

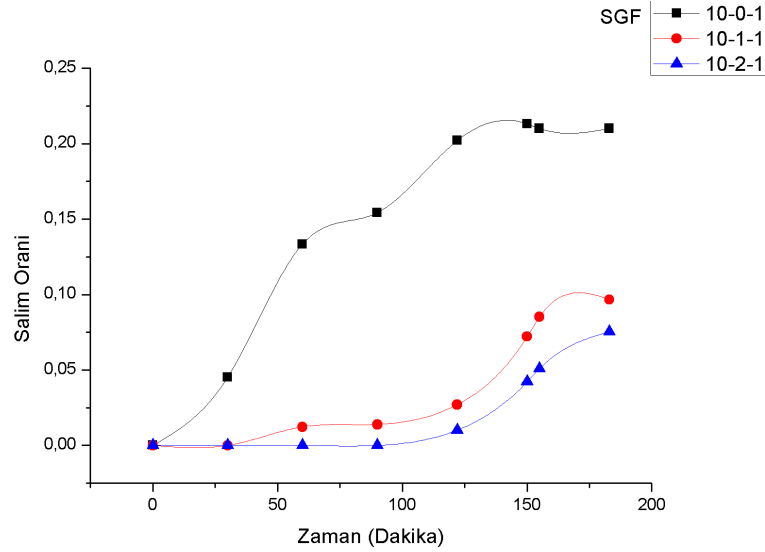
1. Absorbans değerleri, kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru ile konsantrasyona ve oradan da kütle miktarına geçilmiştir.
2. Her bir zaman aralığında kürelerin ne kadar protein saldığı, aradaki kütle farkından hesaplanmıştır.
3. Bu kütle artışları toplanmış ve başta eklenen protein miktarına oranlanarak grafik oluşturulmuştur.
4. Başta eklenen protein miktarından, jelleşme ve kuruma esnasında kaybolan protein miktarı çıkarılmıştır.

Şekil 4.5'te, %3  $CaCl_2$  içinde jelleştirilmiş küreler için, SGF içindeki toplam salım – zaman grafiği görülmektedir.



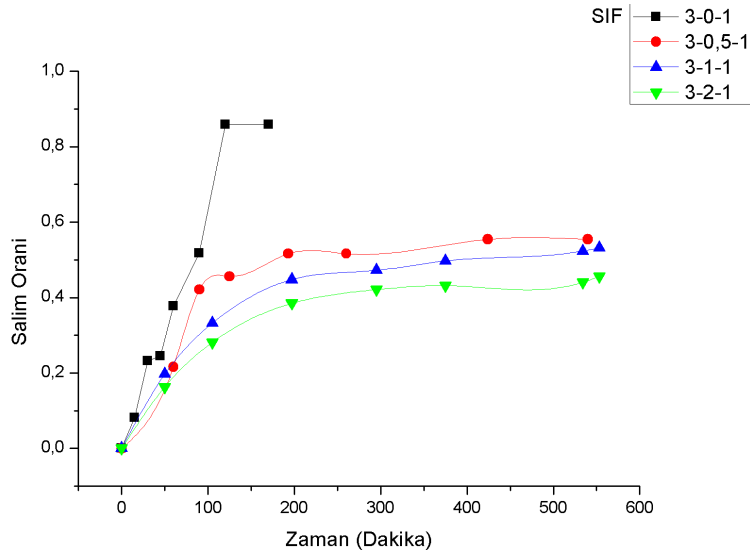
**Şekil 4.5 :** %3 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF'de salım sonuçları

Şekil 4.6'da ise, %10 CaCl<sub>2</sub> içinde jelleştirilmiş küreler için, SGF içindeki toplam salım – zaman grafiği görülmektedir.



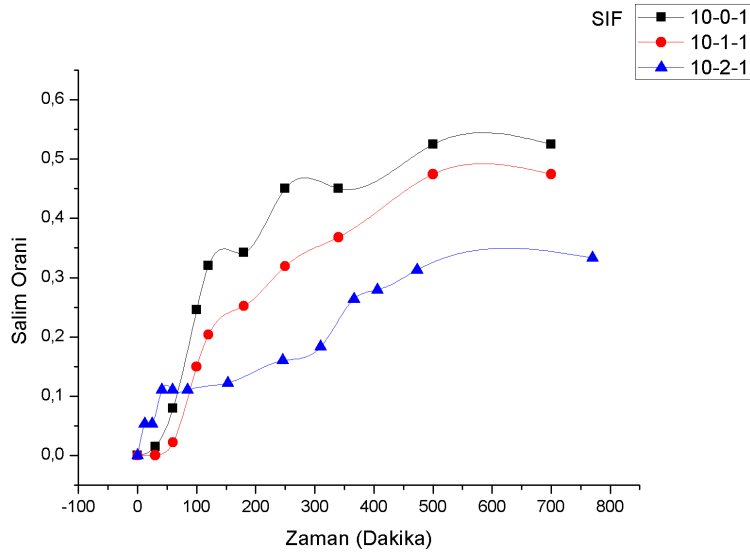
**Şekil 4.6 :** %10 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SGF'de salım sonuçları

Şekil 4.7'de, SIF içinde, %3 CaCl<sub>2</sub> içinde jelleştirilmiş kürelerin salım profilleri gösterilmektedir.



**Şekil 4.7 :** %3 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te salım sonuçları

Şekil 4.8'de ise, SIF içinde, %10 CaCl<sub>2</sub> içinde jelleştirilmiş kürelerin salım profilleri gösterilmektedir.



**Şekil 4.8 :** %10 Ca<sup>2+</sup> içinde jelleştirilmiş kürelerin SIF'te salım sonuçları

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan aljinat kürelerinin ve kil ile modifiye edilmiş aljinat kürelerinin hapsetme kapasitelerinde ve salım profillerinde önemli farklılıklar saptanmıştır. Kil ilavesi aljinatın düşük hapsetme kapasitesini yaklaşık %40 lardan %70 lere çıkarmaktadır. Bu kil ilavesinin önemli bir avantajıdır. Proteinin aljinat küreleri içine hapsedilmesi prosesi esnasında önemli protein kaybı bu şekilde azaltılmıştır.

Tüm salım profillerinde görülebilecek en önemli sonuç, asidik SGF ortamında protein salımının, SIF'e göre çok daha düşük oluşudur. Aljinat küreleri içine hapsediği BSA'nın küçük bir bölümünü mide sıvısına salmaktadır. Aljinat küreleri içine kil ilavesi hem salım miktarını hem de salım hızını önemli ölçüde düşürmektedir. Bağırsak sıvısında ise aljinat içine hapsedilen BSA hızla ve büyük oranda çıkmaktadır. Bağırsak sıvısı ortamında da aljinat içine ilave edilen kil salım hızını düşürmektedir. Killi küreciklerden salınan miktar başlangıçta tutulan miktara göre azalmasına rağmen killi küreciklerin tutma kapasitesi kil içermeyen kürelere göre çok fazla olduğundan, bu oranı vücuda salınan miktarda bir azalma gibi düşünmemelidir. Bu çalışmada kullanılan alginat ve kil ile modifiye alginat jellerinden protein salımının SGF sıvısında düşük olması buna karşılık SIF sıvısında artışı önemli bir sonuçtur. Protein yapısındaki ilaçlar mide ortamında denatüre olmakta ve proteinlerin emilimi ince bağırsaktan olmaktadır. Mide sıvısında görülen düşük salım profili, proteinin mideden geçerken adeta korunması anlamına gelir. Bunun yanında, kil miktarının artışının salım hızını düşürdüğü görülmektedir. Bunu da adsorpsiyon etkisi ile açıklamak mümkündür.

İlaç salım hedeflerinde, hızlı salınanın mutlak kötü, yavaş salınanın mutlak iyi olduğu düşünülmemelidir. Hangi salım profilinin tercih edilmesi gerektiği, tamamen uygulamadaki beklentilere bağlıdır. Bu çalışmada, aljinat ortamına hapsedilmiş BSA'nın mideden önemli oranda bozulmadan geçmesi ve kil ilavesi ile salım hızının değiştirilmesi nedeniyle, aljinat biyopolimeri-kil-BSA üçlüsünün oluşturduğu nanokompozit yapı, vücuda oral yoldan protein verilmesi için salım ortamı olarak önerilmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] **V. H-L. Lee and J. R. Robinson**, 1978. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, Ed., Dekker, pp. 71-122.
- [2] **Richard W. Baker**, 1986. *Controlled Release of Biologically Active Agents*, John Wiley & Sons Inc., pp. 2 – 36
- [3] **Z. Gerstl, A. Nasser and U. Mingelgrin**, 1998. Controlled Release of Pesticides into Soil from Clay-Polymer Formulations, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3797-3802
- [4] **M.D. Chavanpatil, A. Khdair, Y. Patil, H. Handa, G. Mao, J. Panyam**, 2007. Polymer-Surfactant Nanoparticles for Sustained Release of Water-Soluble Drugs, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 3379-3389.
- [5] **A.L. Kydonieus** (Ed.), 1980. *Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications*, CRC Press, Boca Raton
- [6] **S. Farrell, K.K. Sirkar**, 1997. A Reservoir-Type Controlled-Release Device Using Aqueous-Organic Partitioning and a Porous Membrane, *Journal of Membrane Science*, **130**, 265-274
- [7] **Paul A. Steward**, “Review of Pharmaceutical Controlled Release Methods and Devices” 1998. <[http://www.initium.demon.co.uk/rel\\_nf.htm](http://www.initium.demon.co.uk/rel_nf.htm)> alındığı tarih 15 Haziran 2010
- [8] **M. Marucci, J. Hjaertstam, G. Ragnarsson, F. Iselau and A. Axelsson**, 2009. Coated formulations: new insights into the release mechanism and changes in the film properties with a novel release cell, *J. Control. Release*, **136**, 206–212
- [9] **N.B. Shah and B.B. Sheth**, 1972. A method for study of timed-release films, *J. Pharm. Sci.* **61**, 412–416
- [10] **F. Caruso, R.A. Caruso and H. Möhwald**, 1998. Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating, *Science*, **282**, 1111–1114.
- [11] **N. Özdemir and J. Sahin**, 1997. Design of a controlled release osmotic pump system of ibuprofen, *International Journal of Pharmaceutics*, **158**, 91-97
- [12] **Y.J. Yang, X. Tao, Q. Hou, Y. Ma, X. Chen, J. Chen**, 2010. Mesoporous silica nanotubes coated with multilayered polyelectrolytes for pH-controlled drug release, *Acta Biomaterialia*, **6**, 3092-3100
- [13] **R. Wada, S. Hyon, Y. Ikada**, 1995. Salt formation of lactic acid oligomers as matrix for sustained release of drugs, *Journal of Controlled Release* **37**, 151-166

- [14] **K.W. Leong, R. Langer**, 1988. Oral particulate delivery: status and future trends, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **7**, 149-199.
- [15] **C. M. Setty, S. S. Sahoo and B. Sa**, 2005. Alginate-coated alginate-polyethyleneimine beads for prolonged release of furosemide in simulated intestinal fluid, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **31**, 435-446
- [16] **HY. Lin, HF. Liang, CK. Chung, MC. Chen, HW. Sung**. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. 2005. *Biomaterials*, **26**, 2105-2113
- [17] **I.W. Sutherland**, 1991., *Biomaterials; Novel Materials from Biological Sources*, Ed., D. Byrom, pp. 309-331.
- [18] **D.A. Rees**, 1981. Polysaccharide shapes and their interactions - some recent advances, *Pure Appl. Chem.*, **53**, 1-14.
- [19] **P. Sakellariou and R.C. Rowe**, 1995. Interactions in cellulose derivative films for oral drug delivery, *Prog. Polym. Sci.* **20**, 889-942.
- [20] **R. Bodmeier, O. Paeratakul**, 1990. Propranolol HCl release from acrylic films prepared from aqueous latexes, *International Journal of Pharmaceutics*, **59**, 197-204
- [21] **W. R. Gombotz, S. F. Wee**, 1998. Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **31**, 267-286.
- [22] **V.J. Chapman, D.J. Chapman**, 1980. "Seaweeds and Their Uses", Chapman And Hall, Ch. 6
- [23] **P. Gacesa**, 1988. Alginates, *Carbohydr. Polym.*, **8**, pp. 161-182
- [24] **I.L. Andersen, O. Skipnes, O. Smidsrod, K. Ostgaard, P.C. Hemmer**, 1977. *ACS Symp. Ser.*, **48**, pp. 361-381.
- [25] **Roche**, "Rennie Duo",  
<[http://www.roche.com.tr/roche/content/urunlerimiz/mide\\_sagligi/alt02.asp](http://www.roche.com.tr/roche/content/urunlerimiz/mide_sagligi/alt02.asp)>  
alındığı tarih 19 Eylül 2010
- [26] **Birmingham Üniversitesi Diş Hekimliği**, "Alginate"  
<<http://www.dentistry.bham.ac.uk/ecourse/pages/page.asp?pid=1549>>  
alındığı tarih 19 Eylül 2010
- [27] **Sutton, A., Harrison, G. E., Carr, T. E., and Barltrop, D.** 1971. Reduction in the absorption of dietary strontium in children by an alginate derivative. *Br.J.Radiol.* **44**[523], 567
- [28] **T.R. Raaman**, 2001. *IFT Annual Meeting 2001*. Ses. 18-3.
- [29] **M. Yeşiltaş, N. Erkan**, *Gıda Teknolojisi*, Su Ürünlerinin Kalitesinin Korunmasında Aljinat Kaplamaların Etkisi,  
<<http://www.gidateknolojisi.com.tr/n-318-aljinat-kaplamalarin-etkisi--.aspx>>  
alındığı tarih 21 Eylül 2010
- [30] **M.L. Apel and A.E. Torma**, 1993. Determination of kinetics and diffusion coefficients of metal sorption on Ca-alginate beads *Can. J. Chem. Eng.* **71**, 652-656
- [31] **L.K. Jang, D. Nguyen and G.G. Geesey**, 1995. Selectivity of alginate gel for

Cu vs. Co, *Water Res.* **29**, 307–313

- [32] **A. Banerjee, D. Nayak, S. Lahiri**, 2007. Speciation-dependent studies on removal of arsenic by iron-doped calcium alginate beads, *Applied Radiation and Isotopes*, **65**, 769-775
- [33] **D. Chen, Z. Lewandowsky, F. Roe and P. Surapaneni**, 1993. Diffusivity of  $\text{Cu}^{2+}$  in calcium alginate gel beads *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 755–760
- [34] **Sulkowska A.** 2002. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, **614**, 227-232
- [35] **U Malayoğlu, A. Akar**, 1997. Killerin Sınıflandırılmasında ve Kullanım Alanlarının Saptanmasında Aranılan Kriterlerin İrdelenmesi, *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir, 21-22 Nisan 1997*. 125-142
- [36] **Akın Y, Çelik MS**, 1995. Montmorillonit Tipi Killerin Elektrokinetik Davranışı, *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir, 21-22 Nisan 1997*. 135-142.
- [37] **L. A. G. Aylmore, I. D. Sills and J. P. Quirk.**, 1970. Surface Area of Homoionic and Montmorillonite Clay Minerals as Measured by the Sorption of Nitrogen and Carbon Dioxide, *Clays and Clay Minerals*, **18**, 91-96.
- [38] **L. E. Ensminger, J. E. Gieseking**, 1939. The adsorption of proteins by montmorillonite, *Soil Science*, **48**, 467-474
- [39] **B.K.G. Theng**, 1979. *Formation and Properties of Clay–Polymer Complexes*, Elsevier Sci. Pub, New York
- [40] **G. Rytwo, A. Mendelovits, D. Eliyahu, J. Pitcovski and E. Aizenshtein**, 2010. Adsorption of two vaccine-related proteins to montmorillonite and organo-montmorillonite, *Applied Clay Science*, **50**, 569-575
- [41] **E. Ruiz-Hitzky, M. Darder and P. Aranda**, 2005. Functional biopolymer nanocomposites based on layered solids, *J. Mater. Chem.* **15**, 3650–3662
- [42] **Harter, R.D. and G. Stotzky**. 1971. Formation of Clay-Protein Complexes, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **35**, 383-389.
- [43] **Albert, J.T. and R.D. Harter**. 1973. Adsorption of lysozyme and ovalbumin by clay: effect of clay suspension pH and clay mineral type *Soil Sci.*, **115**, 130-36.
- [44] **S.H. Cypes, W.M. Saltzman and E.P. Giannelis**, 2003. Organosilicate-polymer drug delivery systems: controlled release and enhanced mechanical properties. *J. Controlled Release*, **90**, 163–169.
- [45] **S. Gunasekaran, S. Ko, L. Xiao**, 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications, *Journal of Food Engineering*, **83**, 31-40
- [46] **G. Lagaly, M. Ogawa and I. Dékány**, 2006. Clay Mineral Organic Interactions. Developments in Clay Science, *Developments in Clay Science*, **1**, 309-377
- [47] **N. Larsson and B. Siffert**, 1983. Formation of Lysozyme-Containing Crystals of Montmorillonite, *Journal of Colloid Interface Science*, **93**, 424–431
- [48] **Breen, J.O. Rawson and B.E. Mann**, 1996. Adsorption of polycations on clays: An in situ study using Cs-133 solution-phase NMR, *Journal of Materials Science*, **6**, 253–260.

- [49] **E. Layne**, 1957. Spectrophotometric and turbidometric **methods** for measuring proteins, *Methods Enzymol.*, **3**, 447–455
- [50] **M.M. Bradford**, 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- [51] **OH. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall**, 1951. JBC--Table of Contents (Nov 1 1951, 193,(1)) Protein Measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
- [52] **H.A. Mckenzie and H.S. Wallace**, 1954. The Kjeldahl determination of nitrogen, *Aust. J. Chem.* **7**, 55.
- [53] **Barr, J.R., V.L. Maggio, D.G. Patterson, G.R. Cooper, L.O. Henderson, W.E. Turner, S.J. Smith, W.H. Hannon, et al.** 1996. Isotope dilution mass spectrometric quantification of specific proteins: Model application with apolipoprotein A-I., *J. Clin. Chem.*, **42**, 1676–1682.
- [54] **W. Yan and S.S. Chen**, 2005. Mass spectrometry-based quantitative proteomic profiling, *Briefings Funct. Genomics Proteomics*, **4**, pp. 27–38.
- [55] **U.S. Pharmacopeia**,  
<[http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_ris1s126.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_ris1s126.html)> alındığı tarih 3 Haziran 2009.

## **EKLER**

- EK A** : Formülasyon Çizelgesi
- EK B** : XRD Sonuçları
- EK C** : Optik Mikroskop Görüntüleri
- EK D** : Bütün Su Tutma Sonuçları
- EK E.1** : SEM Görüntüleri
- EK E.2**: SEM Görüntüleri
- EK E.3**: SEM Görüntüleri
- EK F** : FTIR Spektrumu
- EK G** : Kürelerin Fotoğrafı



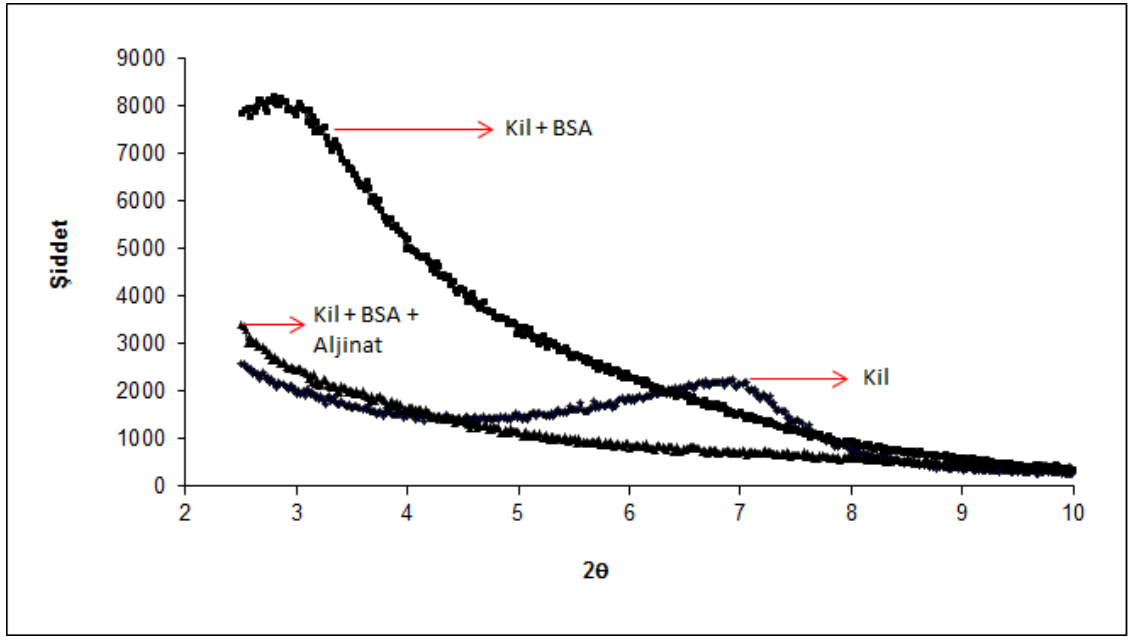
## EK A

**Çizelge A :** Hazırlanan formülasyonlara ait çizelge.

Formülasyon	Aljinat Derişimi (w/v)	Kil Derişimi (w/v)	Ca <sup>2+</sup> Derişimi (w/v)	BSA Derişimi (w/v)
CKB-3-0-0	%2	-	%3	-
CKB-3-0,5-0	%2	%0,5	%3	-
CKB-3-1-0	%2	%1	%3	-
CKB-3-2-0	%2	%2	%3	-
CKB-10-0-0	%2	-	%10	-
CKB-10-1-0	%2	%1	%10	-
CKB-10-2-0	%2	%2	%10	-
CKB-3-0-1	%2	-	%3	%1
CKB-3-0,5-1	%2	%0,5	%3	%1
CKB-3-1-1	%2	%1	%3	%1
CKB-3-2-1	%2	%2	%3	%1
CKB-10-0-1	%2	-	%10	%1
CKB-10-1-1	%2	%1	%10	%1
CKB-10-2-1	%2	%2	%10	%1



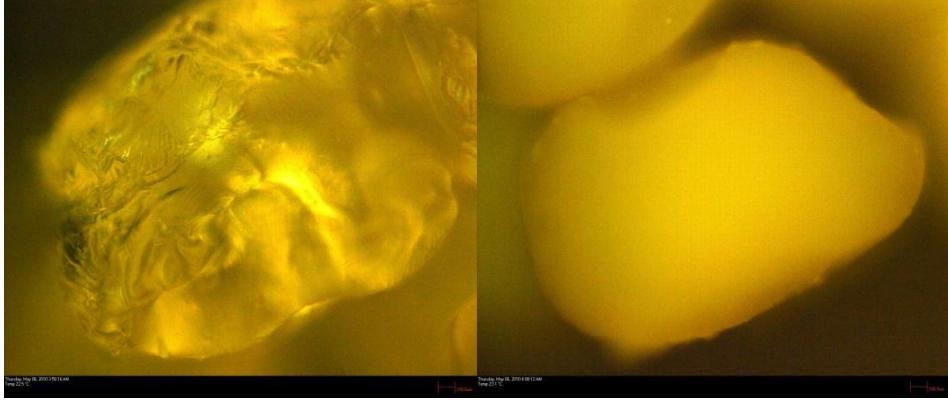
## EK B



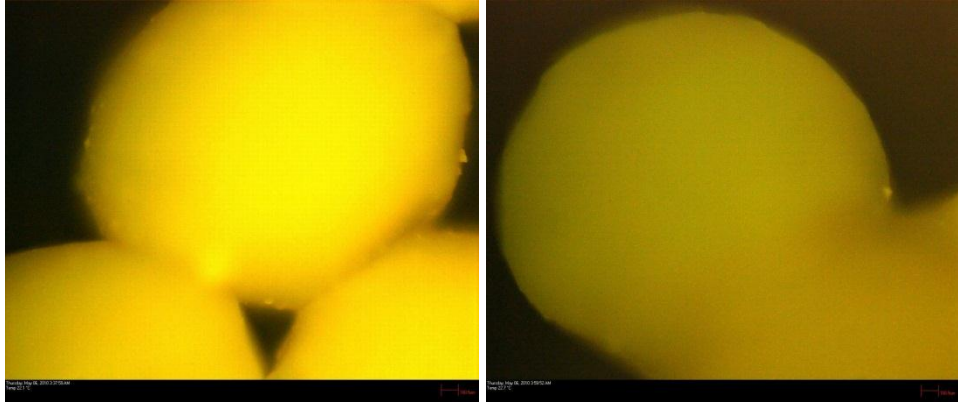
Şekil B : Kil, Kil + BSA ve Kil + BSA + Aljinata ait XRD spektrumları.



## EK C



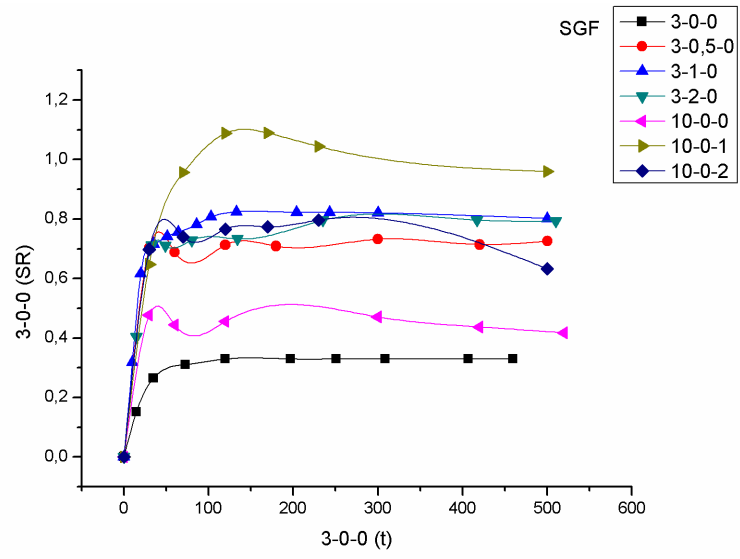
**Şekil C.1** : Soldan sağa, CKB-3-0-0 ve CKB-3-1-0 kürelerine ait optik mikroskop görüntüleri.



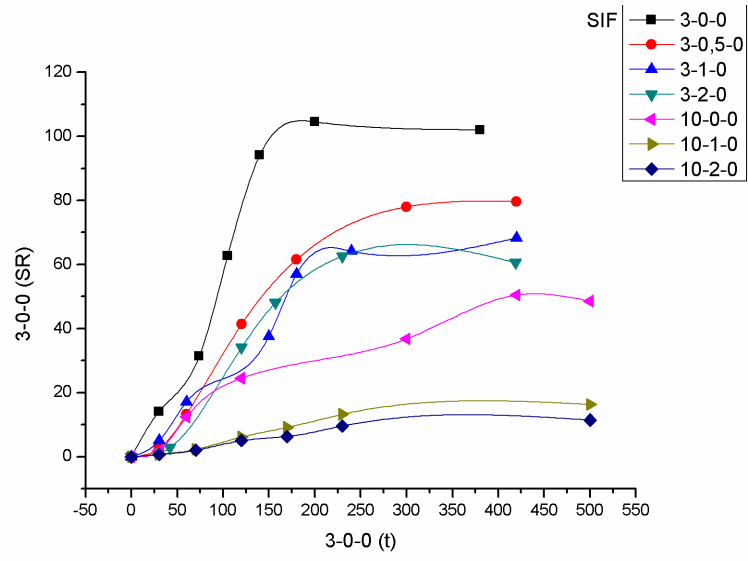
**Şekil C.2** : Soldan sağa, CKB-3-2-0 ve CKB-3-2-1 kürelerine ait optik mikroskop görüntüleri.



## EK D



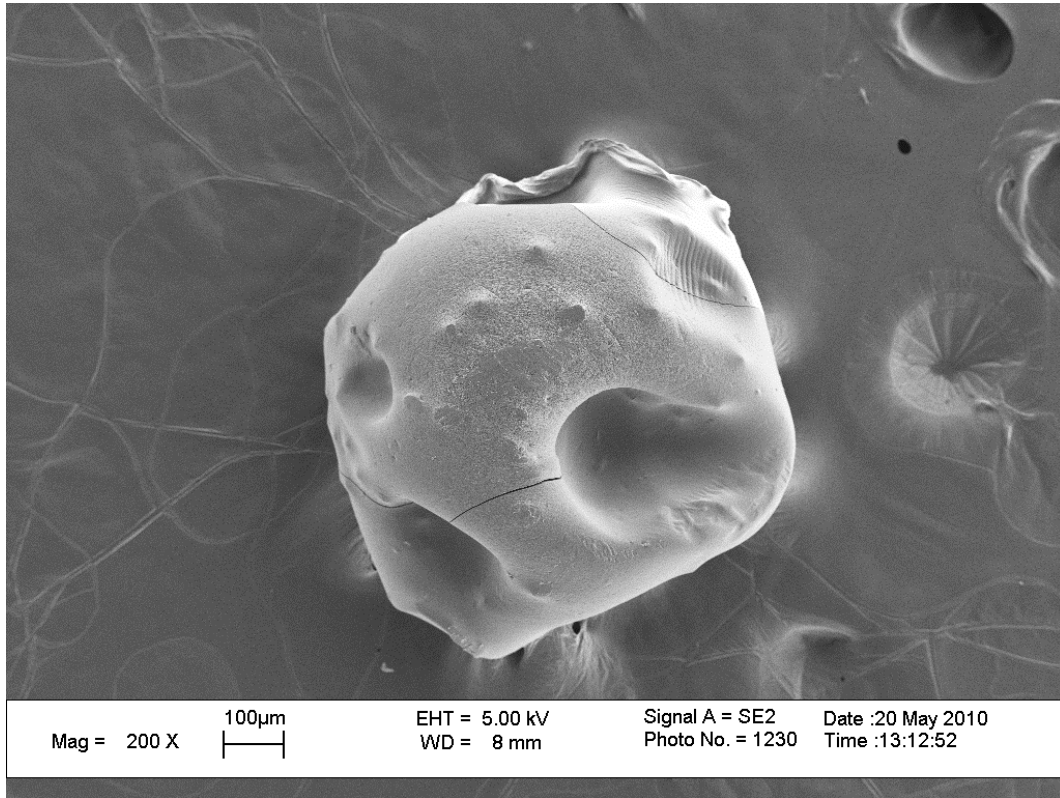
Şekil D.1 : SGF içindeki bütün su tutma sonuçları.



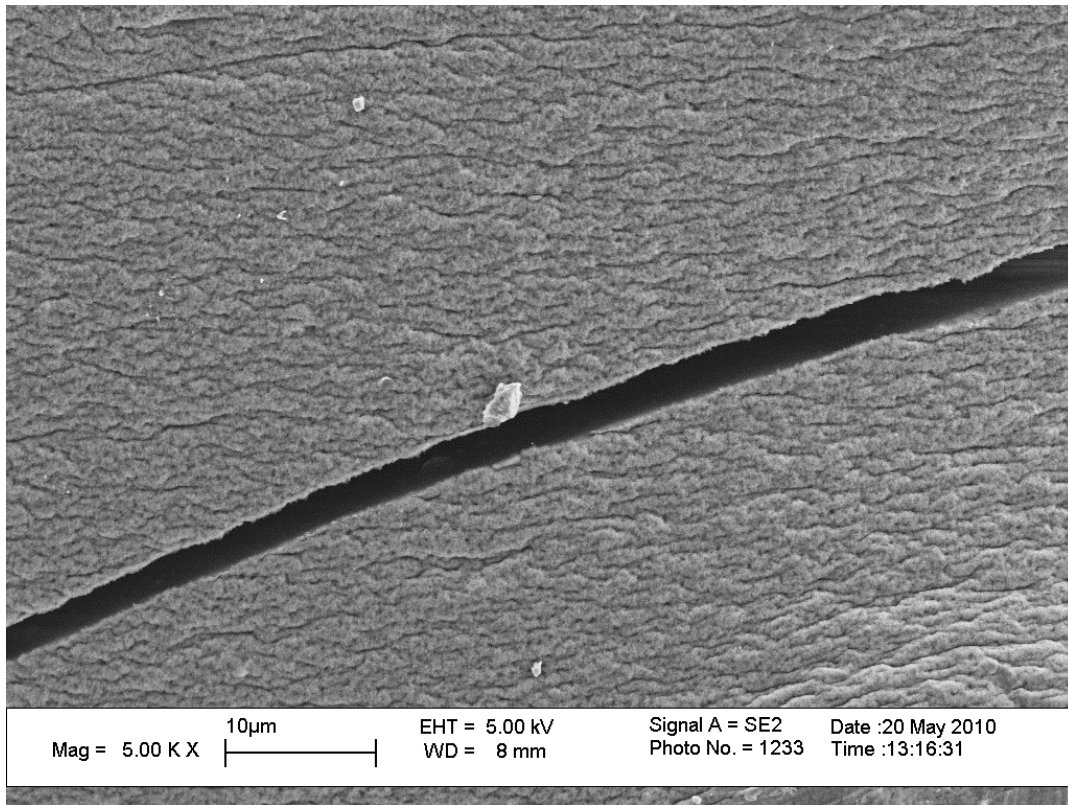
Şekil D.2 : SIF içindeki bütün su tutma sonuçları.



## EK E.1

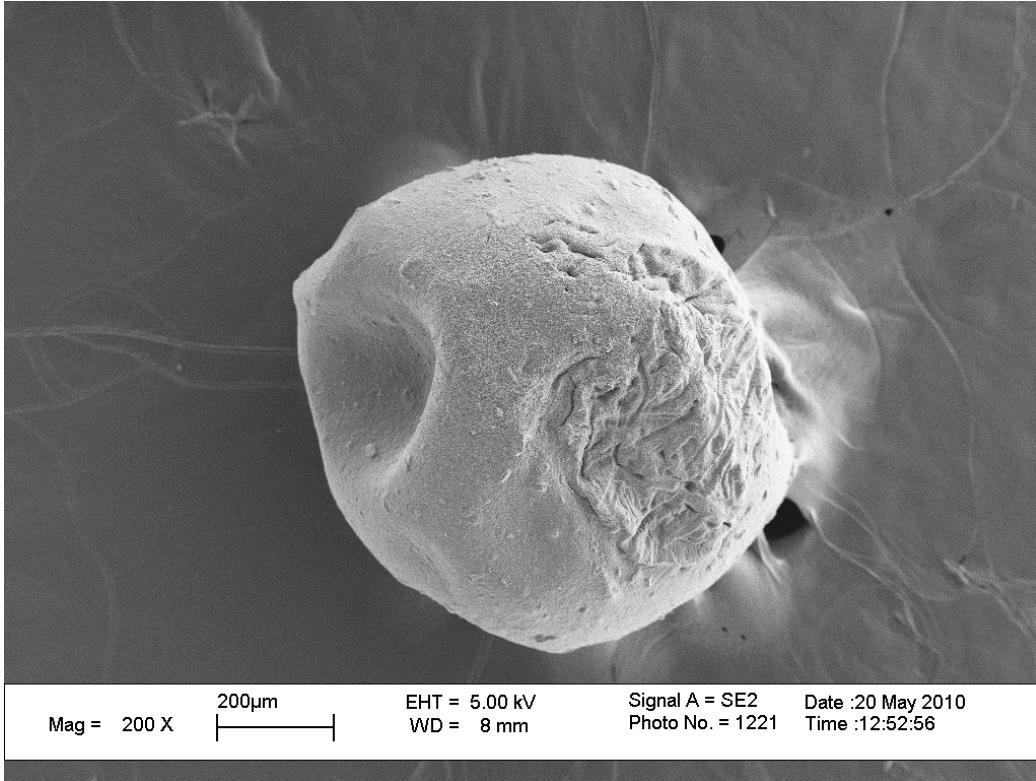


Şekil E.1 : CKB-3-0-0 kuru küresine ait SEM görüntüsü.

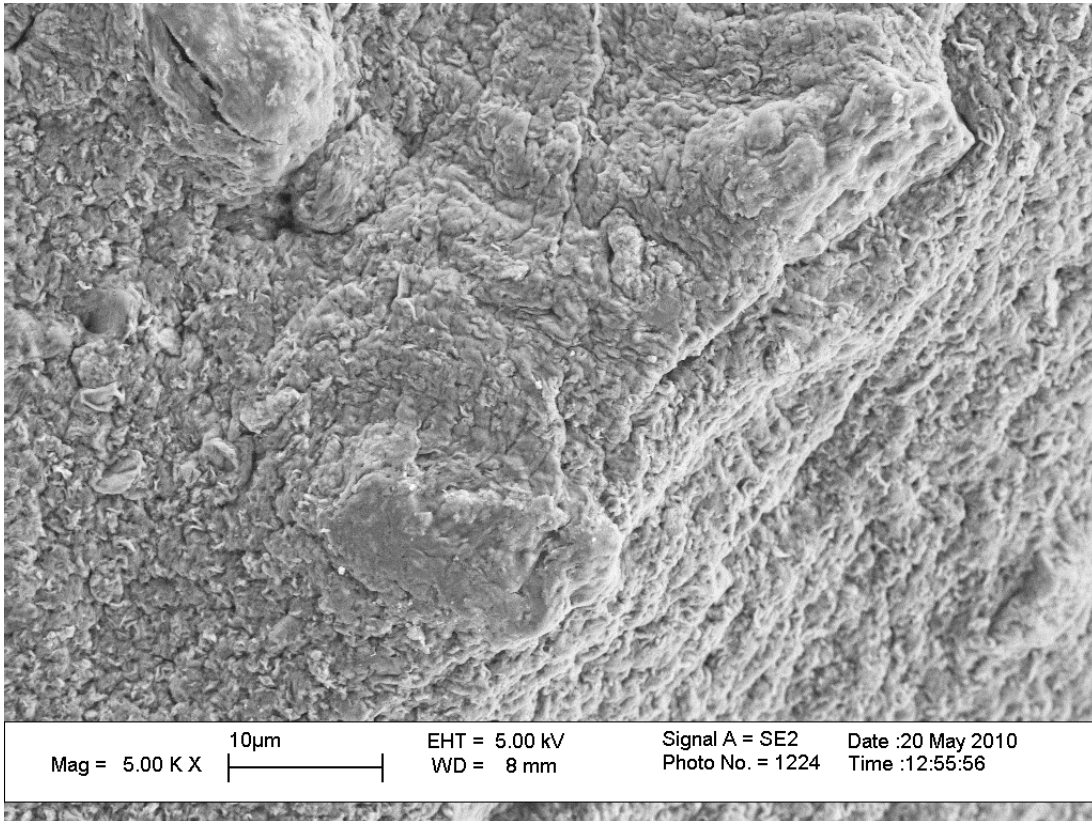


Şekil E.2 : CKB-3-0-0 kuru küresine ait yakınlaştırılmış SEM görüntüsü.

## EK E.2

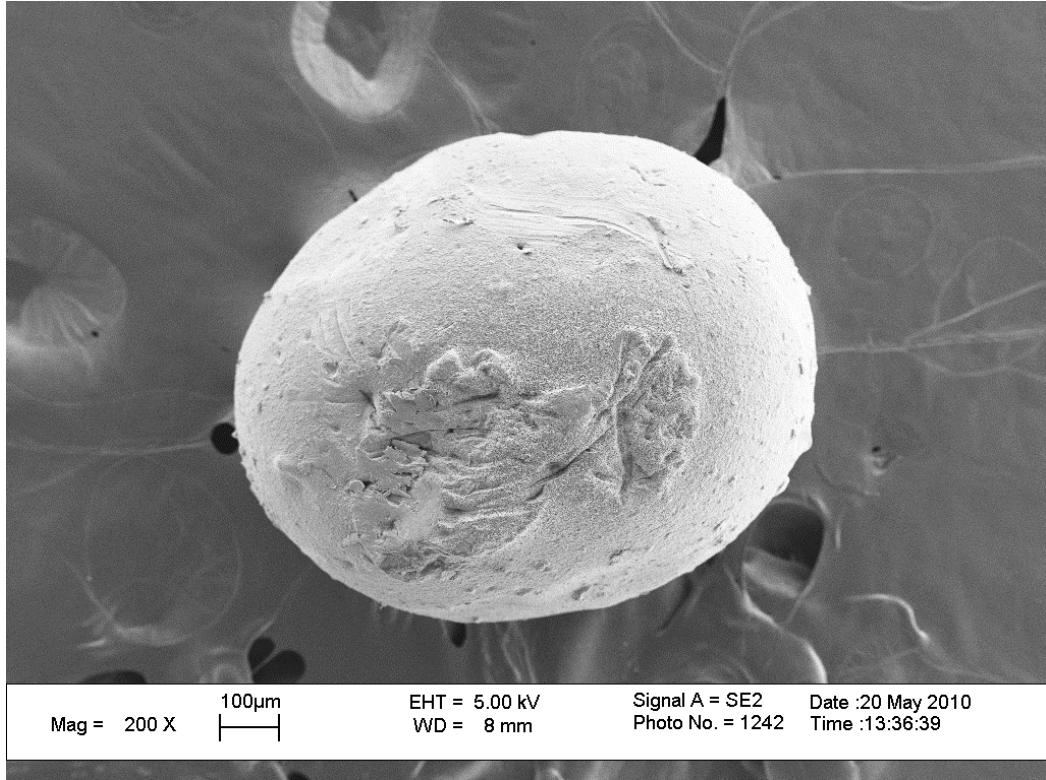


Şekil E.3 : CKB-3-1-0 kuru küresine ait SEM görüntüsü.

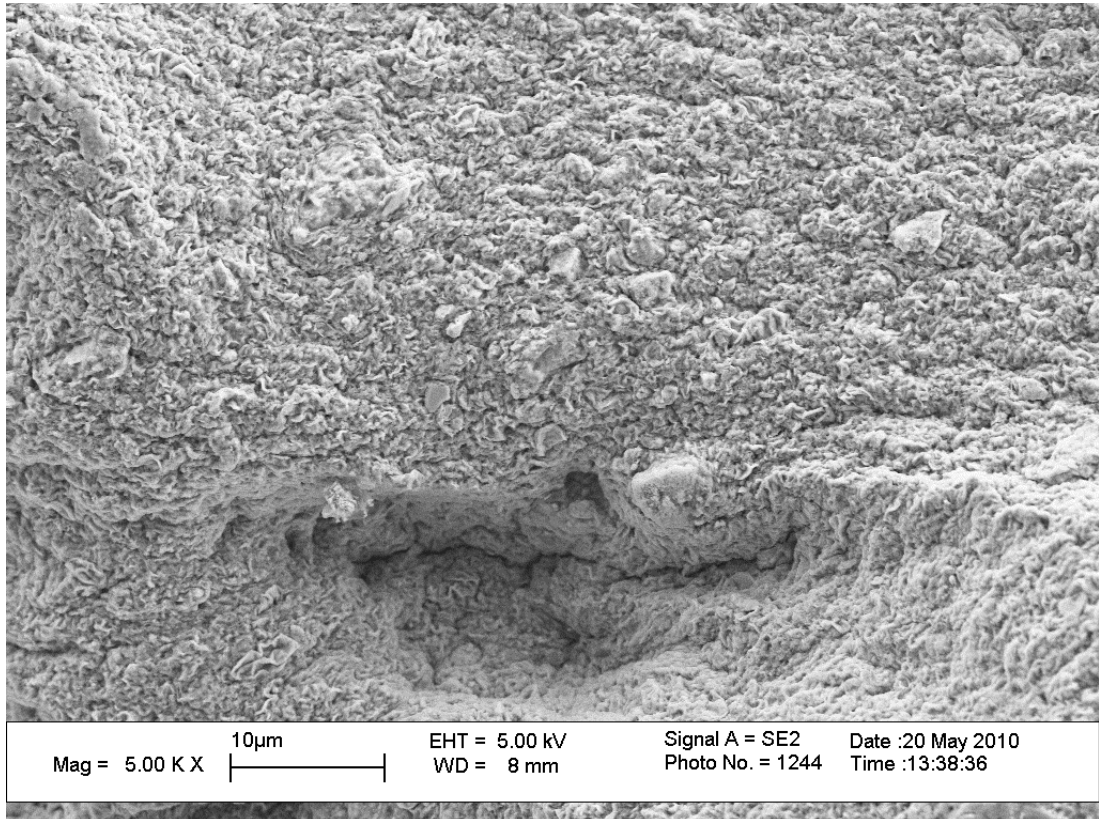


Şekil E.4 : CKB-3-1-0 kuru küresine ait yakınlaştırılmış SEM görüntüsü.

### EK E.3



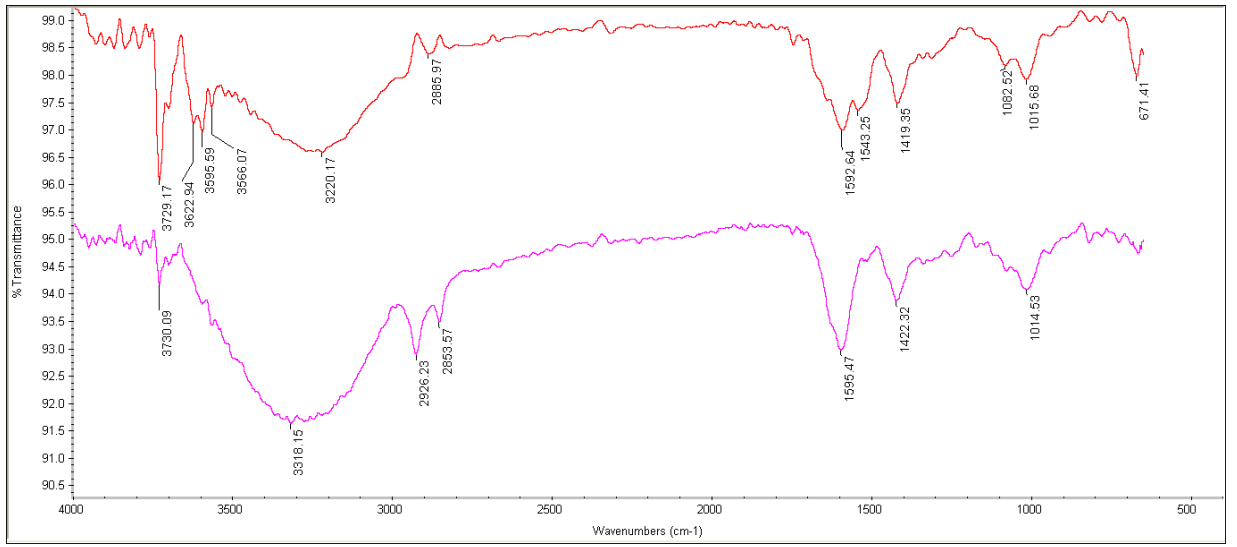
Şekil E.5 : CKB-3-2-0 kuru küresine ait SEM görüntüsü.



Şekil E.6 : CKB-3-2-0 kuru küresine ait yakınlaştırılmış SEM görüntüsü.



## EK F



Şekil F : CKB-3-0-1 kuru küresine ait FTIR spektrumu.



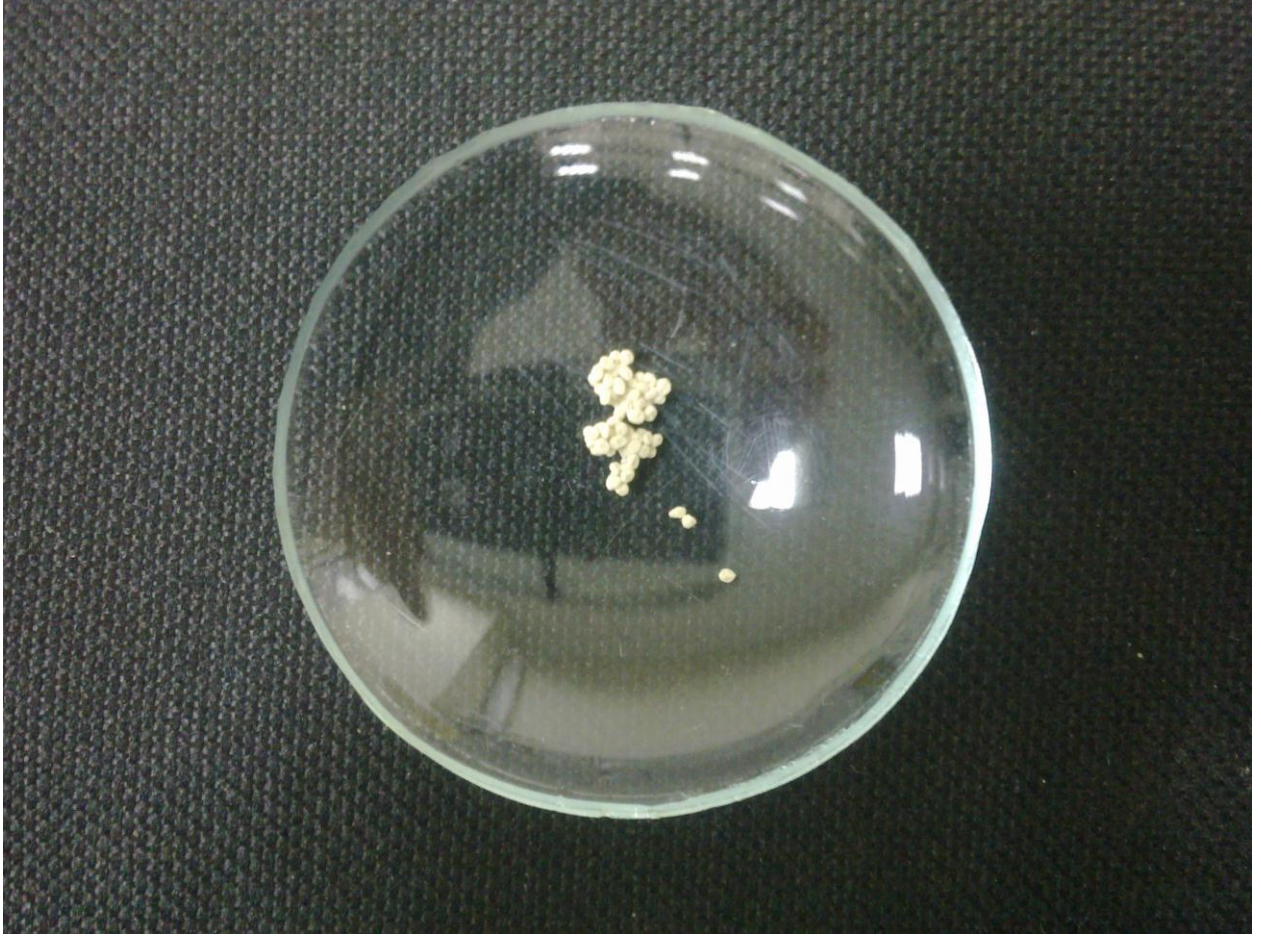
## EK G



Şekil G : CBK-3-0-0 küreleri kurutma aşamasında iken örnek bir fotoğraf.



**EK H**



**Şekil H** : Kurutulmuş CBK-3-0-0 küreleri.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Hakan Kaygusuz

**Doğum Yeri ve Tarihi:** İstanbul, 10.06.1986

**Yüksek Lisans:**

Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2011

**Lisans:**

Fizik Mühendisliği, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2009.

Kimya, İstanbul Teknik Üniversitesi, 2008.

### **Yayın ve Uluslararası Bildiriler:**

G. Özen, **H. Kaygusuz**, M.L. Öveçoğlu

*Formation and transformation of the molecular units in tellurium based oxide glasses*

Frontier Developments in Optics and Spectroscopy, ed. B. di Bartolo ve O. Forte, Google Books

D. Tatar, **H. Kaygusuz**, F. Tezcan et al.

*Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanophosphors synthesized by combustion and thermal decomposition*

NSTI Nanotech 2008, Vol 1, Technical Proceedings, p. 959-961, 2008

**H. Kaygusuz**, FB. Erim

*Controlled release of proteins from doped alginate hydrogels*

Particles 2010, Florida, ABD

AÇ Bozdoğan, **H. Kaygusuz**, et al.

*Bazı AMX<sub>3</sub> kristallerinin Bridgeman yöntemi ile büyütülmesi ve karakterizasyonu*

TPS 25th International Physics Congress, Türkiye, 2008

**H. Kaygusuz**, G. Karaduman, G. Özen, FB. Erim, ML. Öveçoğlu

*Structural analysis of TeO<sub>2</sub>-WO<sub>3</sub> glasses by Raman spectroscopy*

TPS 25th International Physics Congress, Türkiye, 2007

Bunların haricinde, 6 Adet ulusal bildirisi bulunmaktadır.