

**AKCİĞER ARA YÜZEY MODELİNDE KAN PROTEİNLERİ –  
SENTETİK SURFAKTANT/LİPİD KARIŞIMLARININ DİNAMİK  
ADSORPSİYON DAVRANIŞINA MOLEKÜL YAPISI  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**EFFECT OF THE MOLECULE STRUCTURE TO THE  
DYNAMIC ADSORPTION BEHAVIOR OF BLOOD PROTEINS  
– SYNTHETIC SURFACTANT/LIPID MIXTURES AT THE  
INTERFACE MODEL OF LUNG**

**GÖKÇE DİLLİ**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ


olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Başkan

:   
Prof. Dr. Levent YILMAZ

Üye (Danışman)

:   
Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN


Üye

:   
Prof. Dr. Tülay DURUSOY

Üye

:   
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye

:   
Yrd. Doç. Dr. Selis ÖNEL

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 27/06/2012 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca ...../...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Ailem'e...*

# AKCİĞER ARA YÜZEY MODELİNDE KAN PROTEİNLERİ – SENTETİK SURFAKTANT/LİPİD KARIŞIMLARININ DİNAMİK ADSORPSİYON DAVRANIŞINA MOLEKÜL YAPISI ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gökçe Dilli

## ÖZ

Endüstride bir çok alanda sıklıkla kullanılan yüzey aktif maddeler (surfaktantlar), akciğerlerimizde de doğal olarak bulunmakta ve yaşamın sürdürülebilmesi için kritik önemi olan solunumu sağlamaktadır. Ağır yaralanma, şiddetli kanama ve travma sonucu kan proteinlerinin alveol hava boşluğuna sızmaları ve alveol ara yüzeyine akciğer surfaktant karışımından daha hızlı ve geri dönüşümsüz bir şekilde adsorbe olarak surfaktant karışımını inaktive etmeleri nedeniyle solunum düzgün şekilde gerçekleştirilememekte ve ölümcül olan yetişkin tip solunum zorluğu sendromu (ARDS) görülmektedir. Günümüzde ARDS tedavisi etkili bir şekilde yapılamamaktadır. Solunumun çok hızlı gerçekleşen ve sürekli devam eden döngüsel bir proses olduğu düşünüldüğünde, geliştirilen alternatif ilaçların dinamik davranışı ve kan proteinleriyle etkileşimi büyük önem kazanmaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmada ara yüzeyde akciğer yüzey aktif madde karışımındaki SP-B proteininin bazı özelliklerini gösterebildiği ve karışımın yüzey gerilimini düşürebilmesini sağlayan başlıca lipid olan dipalmitolfosfatidilkolin (DPPC) ile karışıp sinerjik etkileşime girebildiği bilinen  $C_{43}H_{90}NO_{10}^{+}C_8F_{17}O_3S^{-}$  (IPL) molekülünün, RDS'de tedavi amacıyla kullanılan ve gerçek akciğer karışımına içerik açısından yakın olan Infasurf® ilacının ve surfaktant inaktivasyonuna yol açan kan proteinleri arasında en problematik olan fibrinojen proteininin (FB) çeşitli koşullarda dinamik adsorpsiyon özellikleri, ara yüzey özellikleri ve birbirleri ile etkileşimi incelenmiştir. Dinamik adsorpsiyon ölçümleri askıda damla (pendant drop) cihazı ile gerçekleştirilmiş ve farklı ara yüzeylerde IPL molekülünün difüzyon katsayısının Infasurf®'e oranla çok daha büyük olduğu ve dolayısıyla ara yüzeye daha hızlı adsorbe olabildiği belirlenmiştir. Askıda damla yöntemiyle gerçekleştirilen farklı deney modellerinde Infasurf®'e benzer olarak IPL molekülünün tek başına ya da belirli karışım oranlarında DPPC ile birlikte bulunduğu fibrinojenin inaktivasyonuna uğramadığı, tam tersine fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olmasını kısmi olarak engellediği görülmüştür. Örneğin 50 ppm

derişimindeki fibrinojen çözeltisinin yüzey gerilimini düşürebilmesi için geçen sürenin (indüksiyon periyodu) 25 saniye sürdüğü belirlenmiştir. Aynı protein konsantrasyonu için ara yüzeyde IPL bulunurken bu sürenin 40 saniye, molce %80 DPPC - %20 IPL karışımı bulunurken ise 71 saniyeye yükselmesi IPL'nin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu yavaşlattığını ve DPPC ile sinerjik etkileşime girebildiğini göstermektedir. Aynı süre, Infasurf® ara yüzeyde bulunurken 35 saniye olarak ölçülmüştür. Çalışma kapsamında maddelerin hava/sıvı ara yüzeyinde gösterdikleri özellikler, birbirleri ile etkileşimleri ve fibrinojenin ara yüzeyde oluşturulan surfaktant tabakasının özelliklerine etkisi Langmuir – Blodgett (LB) cihazı ile incelenmiştir. Askıda damla ölçümlerine paralel olarak, surfaktant inaktivasyonu modellendiğinde IPL'nin sisteme katılması ile fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonu IPL'nin molekül yapısı sayesinde kısmi olarak engellenmiş, DPPC'nin dögüsel davranışı iyileştirilmiş, ara yüzeydeki madde kaybı azaltılmıştır. Akciğer ara yüzey modeli olarak Infasurf® kullanıldığında ise alt faza IPL enjekte edilmesiyle, fibrinojenin Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerine yaptığı negatif etkinin giderildiği belirlenmiştir. Yapılan FT-IR analizleri ile IPL'nin ara yüzeyde bulunduğu durumlarda ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarının %92 oranına kadar azaltılabildiği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer yüzey aktif maddesi, dinamik adsorpsiyon, yüzey aktif madde/lipid karışımları, fibrinojen, yüzey aktif madde/protein etkileşimi, yüzey gerilimi

Danışman: Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

# **EFFECT OF THE MOLECULE STRUCTURE TO THE DYNAMIC ADSORPTION BEHAVIOR OF BLOOD PROTEINS – SYNTHETIC SURFACTANT/LIPID MIXTURES AT THE INTERFACE MODEL OF LUNG**

**Gökçe DİLLİ**

## **ABSTRACT**

In addition to their wide usage in industrial applications, surfactants also naturally occur in lungs and provide breathing, which is a critical function for sustaining our lives. Respiration cannot be maintained fluently because of the serum proteins to inactivate the lung surfactant mixture by adsorbing faster and in an irreversible way to the alveoli interface, which is caused by severe bleeding, injury, and trauma. This is a mortal syndrome called as Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS). At the present time ARDS treatment cannot be achieved effectively. Since respiration is a rapid and continuously occurring cyclic process; investigation of dynamic behavior of newly developing surfactant replacements and their interaction with serum proteins is vital. Within the scope of this study, interfacial properties and interactions of  $C_{43}H_{90}NO_{10}^+C_8F_{17}O_3S^-$  (IPL), Infasurf<sup>®</sup> and fibrinogen, the most problematic serum protein, are investigated. IPL is a newly designed and synthesized molecule, which can mimic selected properties of SP-B and shows positive synergistic interaction when mixed with DPPC. On the other hand, Infasurf<sup>®</sup> is an effective surfactant mixture which is used in surfactant replacement therapy in case of Respiratory Distress Syndrome (RDS). ARDS shares similar symptoms with RDS; however, it cannot be treated completely as in RDS. Dynamic adsorption measurements have been performed by pendant drop method and it has been determined that the IPL molecule has a much higher diffusion coefficient than that of Infasurf<sup>®</sup> at different interfaces and so can be adsorbed at the interface more quickly. Furthermore, it is observed that when presented alone or mixed with DPPC at certain mole ratios; similar to Infasurf<sup>®</sup>, IPL not only remains unsubjected to fibrinogen inactivation but also partially prevents the adsorption of fibrinogen at the interface. For example, the induction period obtained for 50 ppm fibrinogen after the injection is determined as 25 seconds. For the case, when IPL presents at the interface, the induction period is determined as long as 40 seconds for the same protein concentration. This period is

increased up to 71 seconds in the presence of %80 DPPC - %20 IPL mixture at the interface. These results show that IPL can delay the adsorption of fibrinogen when alone or mixed with DPPC. For the same conditions, in case where Infasurf<sup>®</sup> presents at the interface, induction period is measured as 35 seconds. Interfacial properties and interactions of IPL, DPPC-IPL mixtures and Infasurf<sup>®</sup>, and effect of fibrinogen on interfacial properties of preadsorbed surfactant layers are also investigated by using Langmuir – Blodgett (LB) mini trough. Parallel to results which are obtained from pendant drop measurements; when IPL is included in the system, fibrinogen adsorption to interface is partially prevented owing to IPL's unique molecular structure. In addition, hysteresis behavior of DPPC in enriched and lipid loss from interface due to adsorption of fibrinogen is decreased by the inclusion of IPL in the interface. It is determined that the negative effect of fibrinogen on the interfacial properties of the natural lung model created by Infasurf<sup>®</sup> is eliminated when IPL is injected to the sub phase. This is also confirmed by FT-IR analyses, which indicate that there is up to 92% decrease in the amount of adsorbed fibrinogen when IPL is presented at the interface.

**Keywords:** Lung surfactant, dynamic adsorption, surfactant/lipid mixtures, fibrinogen, surfactant/protein interaction, surface tension

Advisor: Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering, Chemical Engineering Section

## TEŞEKKÜR

Lisans öğrenimimin 3. sınıfından itibaren yanında çalışma fırsatı bulduğum için çok şanslı olduğum ve beraber çalışmaktan onur ve gurur duyduğum, bana her adımda sabır ve anlayışla destek olan, araştırmayı, düşünmeyi, azmetmeyi ve sabretmeyi aşıl原因; bilimsel açıdan olduğu kadar sosyal açıdan da hayatımın her alanında bana yol gösteren ve üzerimde çok emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN'a,

Deneylerimde kullandığım Infasurf® doğal yüzey aktif madde karışımını hediye ederek çalışmamıza büyük bir katkıda bulunan ONY, Inc. firmasına,

Bana her konuda koşulsuz destek sağlayan, gösterdikleri sonsuz sevgi, anlayış, güler yüz, sabır ve emek ile bir parçası olmaktan gurur duyduğum ve kendimi bir üyesi olduğum için her zaman çok şanslı hissettiren, bir araya gelince hep baştan saymamıza rağmen aslında net olarak 12 kişiden oluşan canım aileme, ama özellikle kahrımı çeken canım anneme ve canım babama, uzakta olsalar da hep yanımda hissettiğim ablama, ve İdil'ime,

Aradan yıllar geçmesine rağmen "dostluk böyle bir şeymiş" dedirten, uzak-yakın fark etmeden her derdime deva bulan Seda'ma, Pınar'ıma, Selin'ime ve Gözde'me,

Tez çalışmamda adım adım yanımda olan, birlikte çalışmaktan ve vakit geçirmekten büyük mutluluk duyduğum, artık ailem gibi gördüğüm biricik arkadaşlarıma (ters alfabetik sıra ile);

Tez yazım aşamasında neredeyse her anımı beraber geçirdiğim, süper aşçılığının yanında balon şişirebilmedeki yeteneği ile Yiğit'e ve bu süreçte bana sabırla katlanan, hep yanımda olan, güler yüz ve özveriyle hep yardım eden Vicdan'(ım)a; Her türlü soruma, sorunuma, derdime, tasama bıkmadan içtenlikle yardım eli uzatan, süper zihni sinir projeleri sahibi Hande Hoca'ma; Yardımları için Elif'e; Kütüphanede bayılmadan durmamı sağlayan ve bana her konuda destek olan Ender'e; Hep yanımda olduğunu bildiğim ve artık konuşmadan dahi anlaşabildiğim Dicle'me,

her şey için;

**TEŞEKKÜR EDERİM**  
iyi ki varsınız...



# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZ</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xix</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xx</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Kolloid ve Yüzey Bilimi .....	4
2.2. Yüzey Aktif Maddeler .....	5
2.3. Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri .....	9
2.3.1. Akciğer Yüzey Aktif Maddesi, Bileşenleri ve Özellikleri .....	12
2.3.1.1. Lipidler .....	15
2.3.1.2. Proteinler .....	19
2.3.1.2.1. Hidrofilik Proteinler .....	19
2.3.1.2.2. Hidrofobik Proteinler .....	22
2.3.2. Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımı ile Bağlantılı Solunum Sendromları .....	27
2.3.2.1. Sürfaktant İnaktivasyonu ve Serum Proteinleri .....	29
2.3.2.2. Tedavide Kullanılan İlaçlar ve Geliştirilen Karışımlar .....	32
2.4. Dinamik Adsorpsiyon ve Difüzyon Katsayısının Hesaplanması .....	36
<b>3. DENEYSEL YÖNTEMLER</b> .....	<b>46</b>
3.1. Kimyasal Maddeler .....	46
3.2. IPL (Ion Pair Lipid); $C_{42}H_{88}NO_{10}^{+}C_8F_{17}O_3S^{-}$ Molekülünün Sentezi .....	47
3.3. Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	47
3.3.1. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	52
3.3.1.1. DPPC'nin Dinamik Davranışının Belirlenmesi .....	52

3.3.1.2. IPL Molekülünün Dinamik Davranışının Belirlenmesi .....	52
3.3.1.2.1. IPL Molekülünün Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	53
3.3.1.2.2. IPL Molekülünün Tampon Fazından Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi.....	54
3.3.1.3. DPPC/IPL Karışımlarının Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi.....	55
3.3.1.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	55
3.3.1.5. Fibrinojenin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	56
3.3.2. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	57
3.3.2.1. DPPC'nin Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	57
3.3.2.2. IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	58
3.3.2.2.1. Organik Fazdaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	58
3.3.2.2.2. Fosfat Tampon Fazındaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	59
3.3.2.3. DPPC/IPL Karışımlarının Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	60
3.3.2.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	61
3.4. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin Ara Yüzey Özelliklerinin İki Boyutlu Sistem ile İncelenmesi.....	62
3.4.1. IPL'nin Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	63
3.4.2. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi .....	64
3.4.2.1. DPPC'nin, IPL'nin ve DPPC – IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi .....	66
3.4.2.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®'ün) Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi.....	67
3.4.3. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	67
3.4.3.1. DPPC'nin, IPL'nin ve DPPC/IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	67
3.4.3.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	68
3.4.3.2.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	69
3.4.3.2.2. Fibrinojen Tabakasına Infasurf® Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	69
3.4.3.2.3. Hava/Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Infasurf® ve Fibrinojenin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	70

3.4.3.2.4. Hava/ Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Önceden Etkileştirilmiş Infasurf® - Fibrinojen Çözeltilisinin Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	71
3.4.4. Üçlü Sistemlerde Ara Yüzey Özelliklerinin ve Etkileşiminin Belirlenmesi .....	71
3.4.4.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen ve IPL'nin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi .....	71
3.4.4.2. Önceden Etkileştirilmiş Infasurf®/Fibrinojen Tabakasına IPL Adsorpsiyonunun İncelenmesi .....	72
3.4.5. Ara Yüzeye Adsorbe Olan Fibrinojen Miktarındaki Değişimin Belirlenmesi ....	73
<b>4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI .....</b>	<b>75</b>
4.1. Molekül Yapısının Tasarımı .....	75
4.2. Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	78
4.2.1. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	78
4.2.1.1. DPPC'nin Dinamik Davranışının Belirlenmesi .....	78
4.2.1.2. IPL Molekülünün Dinamik Davranışının Belirlenmesi .....	82
4.2.1.2.1. IPL Molekülünün Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	82
4.2.1.2.2. IPL Molekülünün Tampon Fazından Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi.....	88
4.2.1.3. DPPC/IPL Karışımlarının Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi.....	89
4.2.1.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi .....	91
4.2.1.5. IPL ve Infasurf®'ün Dinamik Davranışlarının Kısa ve Uzun Zaman Aralığında İncelenmesi .....	93
4.2.1.6. Fibrinojenin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	96
4.2.2. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	99
4.2.2.1. DPPC'nin Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	99
4.2.2.2. IPL Molekülün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	101
4.2.2.2.1. Organik Fazdaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	101
4.2.2.2.2. Fosfat Tampon Fazındaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	105
4.2.2.3. DPPC/IPL Karışımlarının Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	111
4.2.2.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	118

4.3. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin Ara Yüzey Özelliklerinin İki Boyutlu Sistem ile İncelenmesi.....	124
4.3.1. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi .....	125
4.3.1.1. DPPC, IPL, DPPC IPL Karışımlarının AraYüzey Özelliklerinin Belirlenmesi	125
4.3.1.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi.....	130
4.3.2. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	132
4.3.2.1. DPPC'nin, IPL'nin ve DPPC/IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi .....	132
4.3.2.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi.....	144
4.3.2.2.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	144
4.3.2.2.2. Fibrinojen Tabakasına Infasurf® Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	148
4.3.2.2.3. Hava/Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Infasurf® ve Fibrinojenin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	151
4.3.2.2.4. Hava/Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Önceden Etkileştirilmiş Infasurf® - Fibrinojen Çözeltisinin Adsorpsiyonunun İncelenmesi.....	154
4.3.3. Üçlü Sistemlerde Ara Yüzey Özelliklerinin ve Etkileşiminin Belirlenmesi.....	160
4.3.3.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen ve IPL'nin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi .....	160
4.3.3.2. Önceden Etkileştirilmiş Infasurf®/Fibrinojen Tabakasına IPL Adsorpsiyonunun İncelenmesi .....	162
4.4. Ara Yüzeye Adsorbe Olan Fibrinojen Miktarındaki Değişimin Belirlenmesi ....	163
<b>5. SONUÇLAR.....</b>	<b>171</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>175</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>186</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>188</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 (A) Sıvı – Gaz, (B) Sıvı – Sıvı ara yüzeylerinin şematik gösterimleri .....	5
Şekil 2.2 Yüzey aktif maddelerin yapısı ve çözeltideki davranışları .....	6
Şekil 2.3 Yüzey gerilimini oluşturan kuvvetler.....	7
Şekil 2.4 Akciğer ve alveollerin anatomik yapısı.....	9
Şekil 2.5 Alveollerde gaz transferi .....	10
Şekil 2.6 Laplace Yasası'nın alveollere uygulanışı .....	11
Şekil 2.7 (a) Eksositoz yapan çok katmanlı cisimcik, (b) Tübüler miyelin .....	13
Şekil 2.8 Akciğer yüzey aktif maddesinin sentezi, alveol ara yüzeyine yayılımı ve geri dönüşümü.....	13
Şekil 2.9 Akciğer yüzey aktif maddesinin içeriği (Lyra et.al, 2007) .....	16
Şekil 2.10 DPPC'nin molekül yapısı .....	17
Şekil 2.11 SP-A ve SP-D proteinleri .....	20
Şekil 2.12 SP-B proteininin yapısı (a), ve ara yüzeyde duruşu (b) .....	24
Şekil 2.13 SP-C proteininin yapısı (a), ve ara yüzeyde duruşu (b) .....	25
Şekil 2.14 Akciğer yüzey aktif madde karışımında bulunan proteinlerin yerleşimleri .	26
Şekil 2.15 Sağlıklı bir insanın ve ARDS hastasının akciğer filmi ve alveolleri .....	29
Şekil 2.16 Proteinlerin ara yüzeye adsorpsiyon basamakları .....	31
Şekil 2.17 Fibrinojen proteini .....	31
Şekil 2.18 Fibrinojen proteininin ara yüzeyde aldığı konformasyonlar.....	32
Şekil 2.19 Dinamik adsorpsiyonda surfaktant monomerlerinin ara yüzeye taşınım modelleri: Difüzyon kontrollü model (a), Kinetik - difüzyon karışık kontrollü model (b). .....	37
Şekil 2.20 Serum albumin (HSA), $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG), $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CA) proteinlerinin dinamik adsorpsiyon ölçümleri (He et al., 2008). .....	40
Şekil 2.21 PEO zincirlerinin yüzeye etkileşimlerinin farklılığında protein adsorpsiyonuna karşı gösterdikleri etkiler: ara yüzeyde yüksek etkileşime sahip PEO zinciri (a), etkileşimi daha az olan PEO zinciri (b).....	44

Şekil 3.1 IPL molekülünün sentezi (a): Brij 56, (b): trietilamin, (c): perfloro-1-oktansulfonil florür, (d): $C_{42}H_{88}NO_{10}^+C_8F_{17}O_3S^-$ (IPL), (e): tuz.....	47
Şekil 3.2 Dinamik adsorpsiyon deneyleri için oluşturulan deney sisteminin (a) şematik gösterimi, (b) Askıda damla cihazı .....	49
Şekil 3.3 Askıda damla profilinin geometrisi ve hesaplamada kullanılan simgeler ....	50
Şekil 3.4 Dinamik adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi için oluşturulan akış şeması .....	51
Şekil 3.5 DPPC'nin dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi .....	52
Şekil 3.6 (a) IPL molekülünün kloroform fazından ara yüzeye dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi, (b) IPL'nin dağılma etkisinin giderilmesi için kurulan deney sistemi .....	54
Şekil 3.7 IPL molekülünün fosfat tampon fazından ara yüzeye dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi.....	55
Şekil 3.8 Infasurf®'ün fosfat tampon fazından ara yüzeye dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi.....	56
Şekil 3.9 Fibrinojen proteininin dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi.....	57
Şekil 3.10 DPPC ve IPL'nin dinamik davranışına fibrinojen etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi.....	58
Şekil 3.11 Fosfat tampon fazındaki IPL'nin dinamik davranışına fibrinojen etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi .....	59
Şekil 3.12 IPL ile fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu için kurulan deney sistemi.....	60
Şekil 3.13 Infasurf® ile fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu için kurulan deney sistemi .....	61
Şekil 3.14 Langmuir – Blodgett Cihazı .....	62
Şekil 3.15 Ara yüzey özelliklerinin iki boyutlu system ile belirlenmesi için oluşturulan akış şeması .....	65
Şekil 3.16 LB cihazında hava/sıvı ara yüzeyine mikro şırınga ile örnek yayılması ....	66
Şekil 3.17 LB cihazı kullanılarak sıkıştırma izoterminin elde edilişi .....	67

Şekil 3.18 DPPC, IPL ve DPPC – IPL karışımlarının ara yüzey özelliklerine fibrinojenin etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi .....	68
Şekil 3.19 Infasurf <sup>®</sup> ’ün ara yüzey özelliklerine fibrinojenin etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi.....	69
Şekil 3.20 Fibrinojen tabakasına Infasurf <sup>®</sup> adsorpsiyonunun incelenmesi için kurulan deney sisteminin şematik gösterimi.....	70
Şekil 3.21 Infasurf <sup>®</sup> ve Fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonunun incelenmesi için kurulan deney sistemi.....	70
Şekil 3.22 Infasurf <sup>®</sup> tabakasına fibrinojen ve IPL’nin yarışmalı adsorpsiyonunun incelenmesi için kurulan deney sistemi .....	72
Şekil 4.1 IPL yüzey aktif maddesinin molekül yapısı .....	75
Şekil 4.2 IPL molekülü için sulu çözeltideki yüzey gerilimi (mN/m) – logC (mmol/L) grafiği .....	77
Şekil 4.3 Değişik konsantrasyon değerleri için DPPC’nin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde dinamik yüzey gerilimi ölçümleri.....	79
Şekil 4.4 Yüksek konsantrasyon aralığında DPPC için $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi: (a) literatürde kloroform/su ara yüzeyinde verilen (He et al., 2008), (b) çalışma kapsamında kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilmiş.....	80
Şekil 4.5 Orta ve düşük konsantrasyon aralığında DPPC için $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi: (a) literatürde kloroform/su ara yüzeyinde verilen (He et al., 2008), (b) çalışma kapsamında kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen .....	81
Şekil 4.6 IPL molekülü için fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde elde edilmiş $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi.....	83
Şekil 4.7 C <sub>13</sub> DMPO’nun su/hekzan ara yüzeyinde Q = 1000 (A), Q = 0.001 (B) oranları için dinamik yüzey gerilimi ölçümleri: (a) $1.0 \times 10^{-8}$ mol/cm <sup>3</sup> , (b) $2.0 \times 10^{-8}$ mol/cm <sup>3</sup> , (c) $3.0 \times 10^{-8}$ mol/cm <sup>3</sup> , (d) $5.0 \times 10^{-8}$ mol/cm <sup>3</sup> (Ferrari et al., 1997).....	84
Şekil 4.8 IPL molekülü için Q = 0.001 olacak şekilde ayarlanmış sistemde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	85
Şekil 4.9 IPL molekülünün kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen referans $\gamma$ (mN/m) – konsantrasyon (mM) eğrisi.....	86

Şekil 4.10 0.005 mM IPL çözeltisi için dağılıma etkisi görülen durumda ve sistem ters çevrildiğinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi	87
Şekil 4.11 IPL molekülü için kloroform / fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilmiş $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi	89
Şekil 4.12 Saf DPPC, saf IPL ve molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımlarının kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi	90
Şekil 4.13 Infasurf® için kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi	92
Şekil 4.14 IPL ve Infasurf®'ün fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine dinamik adsorpsiyonlarının karşılaştırılması	93
Şekil 4.15 IPL ve Infasurf® için kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman ( $s^{1/2}$ ) izotermi	94
Şekil 4.16 Fibrinojen için kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) izotermi	97
Şekil 4.17 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde DPPC bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği	100
Şekil 4.18 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda IPL bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği	102
Şekil 4.19 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda IPL bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği	103
Şekil 4.20 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda IPL bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 100 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği	104
Şekil 4.21 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde IPL bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği	106



Şekil 4.22 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği .....	107
Şekil 4.23 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 100 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği.....	108
Şekil 4.24 0.09 mM IPL ile (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonunda fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafikleri: (◆) yarışmalı adsorpsiyon, (■) saf IPL, (▲) saf fibrinojen.....	109
Şekil 4.25 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda molce %90 - %10 DPPC – IPL karışımı bulunurken (◆) alt faza (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonda fibrinojen çözeltisi (▲) eklendiğinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafikleri.....	112
Şekil 4.26 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda molce %80 - %20 DPPC – IPL karışımı bulunurken (◆) alt faza (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonda fibrinojen çözeltisi (▲) eklendiğinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafikleri.....	114
Şekil 4.27 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda molce %70 - %30 DPPC – IPL karışımı bulunurken (◆) alt faza (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonda fibrinojen çözeltisi (▲) eklendiğinde elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafikleri.....	116
Şekil 4.28 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde Infasurf® bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği .....	118
Şekil 4.29 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde Infasurf® bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği .....	119
Şekil 4.30 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde Infasurf® bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 100 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafiği .....	120

Şekil 4.31 Infasurf® ile (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonunda fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu sonucu elde edilen $\gamma$ (mN/m) – zaman (s) grafikleri: (◆) yarışmalı adsorpsiyon, (■) saf Infasurf, (✖) saf fibrinojen .....	122
Şekil 4.32 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde DPPC tekli tabakasının sıkıştırılması ile elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi .....	125
Şekil 4.33 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde IPL tekli tabakasının sıkıştırılması ile elde edilen basınç ( $\pi$ ) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi.....	126
Şekil 4.34 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımları tekli tabakasının sıkıştırılması ile elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi.....	128
Şekil 4.35 Saf Infasurf® için elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi.....	130
Şekil 4.36 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde (a) saf Infasurf® için elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi, (b) elde edilen sıkıştırma izoterminin literatürle karşılaştırması (Zhang et al., 2011).....	131
Şekil 4.37 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş DPPC tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi.....	133
Şekil 4.38 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş DPPC tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen döngüsel davranış .....	134
Şekil 4.39 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan izotermi .....	135
Şekil 4.40 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş molce %90 DPPC - %10 IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi .....	136
Şekil 4.41 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı için elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi, (b) molce %90 DPPC - %10 IPL karışımının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi .....	138

Şekil 4.42 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş molce %80 DPPC - %20 IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi .....	139
Şekil 4.43 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %80 DPPC - %20 IPL karışımı için elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi, (b) molce %80 DPPC - %20 IPL karışımının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi .....	141
Şekil 4.44 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş molce %70 DPPC - %30 IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi .....	142
Şekil 4.45 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %70 DPPC - %30 IPL karışımı için elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi, (b) molce %70 DPPC - %30 IPL karışımının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi.....	143
Şekil 4.46 Saf Infasurf <sup>®</sup> tabakasının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	145
Şekil 4.47 saf Infasurf <sup>®</sup> tabakasının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) dögüsel davranış .....	146
Şekil 4.48 Fibrinojen tabakasının alt fazına Saf Infasurf <sup>®</sup> enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi.....	148
Şekil 4.49 Fibrinojen tabakasının alt fazına saf Infasurf <sup>®</sup> enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) dögüsel davranış.....	149
Şekil 4.50 (a) saf Survanta için elde edilen dögüsel davranış, (b) alt fazda albumin bulunurken saf Survanta için elde edilen dögüsel davranış (Stenger et al., 2009).	150
Şekil 4.51 Fosfat tampon fazına Saf Infasurf <sup>®</sup> ile 550 ppm fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi.....	151
Şekil 4.52 Saf Infasurf <sup>®</sup> ile fibrinojen fosfat tampon fazına aynı anda enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) dögüsel davranış .....	152

Şekil 4.53 Fosfat tampon fazına 1 saat etkileştirilmiş Saf Infasurf® ile 550 ppm fibrinojen karışımının enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	154
Şekil 4.54 1 saat etkileşmiş Saf Infasurf® ile 550 ppm fibrinojen karışımının fosfat tampon fazına enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) dögüsel davranış .....	155
Şekil 4.55 Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerine fibrinojen etkisinin incelenmesi amacıyla kurulan sistemlerde elde edilen $\pi$ (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2$ /zincir) izotermi ...	156
Şekil 4.56 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyindeki fibrinojen tabakasının alt fazına IPL enjekte edilmesiyle, (b) fosfat tampon/hava ara yüzeyindeki IPL tabakasının alt fazına fibrinojen enjekte edilmesiyle elde edilen, (c) 0.005 mM IPL ile 550 ppm fibrinojenin fosfat tampon fazına aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi (Uslu, 2009). .....	157
Şekil 4.57 Fosfat tampon fazına 1 saat etkileştirilmiş IPL ile 550 ppm fibrinojen karışımının enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	159
Şekil 4.58 Saf Infasurf tabakasının alt fazına 0.0002 mM IPL ve 550 ppm fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	160
Şekil 4.59 Saf Infasurf tabakasının alt fazına 0.005 mM IPL ve 550 ppm fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	161
Şekil 4.60 1 saat etkileştirilmiş Infasurf® - fibrinojen karışımının alt fazına IPL enjekte edilmesiyle elde edilen $\pi$ (mN/m) – zaman (s) izotermi .....	162
Şekil 4.61 (a) Boş kağıt için çalışma kapsamında elde edilen spektrum, (b) literatürde boş kağıt için elde edilen spektrum (Feustel et al., 2009).164	
Şekil 4.62 Fibrinojen için elde edilen FT-IR spektrumu .....	164
Şekil 4.63 Ara yüzeyde sadece fibrinojen (---), molce %90 DPPC - %10 IPL (---), %80 DPPC - %20 IPL (---) ve %70 DPPC - %30 IPL (---) karışımları bulunurken, alt faza fibrinojen enjeksiyonu sonucunda elde edilen FT-IR spektrumları .....	165
Şekil 4.64 Ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunurken (---), fibrinojen alt fazına Infasurf® enjeksiyonu (---), Infasurf® alt fazına fibrinojen enjeksiyonu (---) sonucunda elde edilen FT-IR spektrumları .....	167

Şekil 4.65 Ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunurken (---), önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına yarışmalı olarak 0.005 mM IPL ve fibrinojen enjekte edilmesi sonucunda (---), önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına yarışmalı olarak 0.0002 mM IPL ve fibrinojen enjekte edilmesi sonucunda (---) elde edilen FT-IR spektrumları .....	168
Şekil 4.66 FT-IR analizi ile incelenen deney sistemleri ve ara yüzeydeki % fibrinojen miktarları.....	170

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1 Akciğer yüzey aktif maddesinin fizyolojik fonksiyonları.....	14
Çizelge 2.2 SP-A ve SP-D proteinlerinin temel fonksiyonları.....	21
Çizelge 2.3 SP-B ve SP-C proteinlerinin temel fonksiyonları.....	22
Çizelge 2.4 Doğal, modifiye edilmiş ve sentetik surfaktantların içerikleri.....	33
Çizelge 2.5 Infasurf <sup>®</sup> , Curosurf <sup>®</sup> ve Survanta <sup>®</sup> 'nin biyofiziksel özellikleri.....	35
Çizelge 3.1 Ara yüzeyde bulunan fibrinojen miktarının belirlendiği ara yüzeyler .....	74
Çizelge 4.1 Hesaplanan dağılım katsayısı ( $k_p$ ) değerleri .....	86
Çizelge 4.2 Fibrinojenin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde konsantrasyona bağlı olarak indüksiyon periyotları .....	98
Çizelge 4.3 DPPC, IPL ve DPPC-IPL karışımları için surfaktant inaktivasyonu modellenmesi sonucu enjeksiyon anından itibaren yüzey geriliminin düşmeye başladığı ana kadar geçen sürelerin karşılaştırılması .....	117
Çizelge 4.4 Infasurf <sup>®</sup> ve fosfat tamponda çözünen IPL için surfaktant inaktivasyonu modellenmesi sonucu enjeksiyon anından itibaren yüzey geriliminin düşmeye başladığı ana kadar geçen sürelerin karşılaştırılması .....	121
Çizelge 4.5 DPPC, IPL ve farklı mol oranlarında DPPC – IPL karışımları ara yüzeyde bulunurken, ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarındaki değişim .....	166
Çizelge 4.6 Ara yüzeyde Infasurf bulunurken alt faza IPL ve fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarındaki değişim .....	169

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$a$	Ara yüzeyde yüzey aktif madde başına düşen birim alan
ARDS	Yetişkin Solunum Zorluğu Sendromu
C	Yığın faz konsantrasyonu
$C_{su}$	Yüzey aktif maddelerin su fazındaki konsantrasyonu
$C_{su,0}$	Sulu çözeltinin başlangıç konsantrasyonu
$C_{yağ}$	Yüzey aktif maddelerin yağ fazındaki konsantrasyonu
D	Difüzyon katsayısı
$D_a$	Görünür difüzyon katsayısı
$D_{eff}$	Efektif difüzyon katsayısı
$\Delta P$	Ara yüzeydeki basınç farkı
$\Delta \rho$	İki faz arasındaki yoğunluk farkı
$\varepsilon_a$	Adsorpsiyon bariyeri
F	Sıvı tarafından iğneye uygulanan çekme kuvveti
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
$g$	Ara yüzey serbest enerjisi
$\gamma$	Yüzey gerilimi
$\gamma_0$	Ara yüzeyin başlangıç koşulundaki yüzey gerilimi
$\gamma_{eq}$	Ara yüzeyin denge koşulundaki yüzey gerilimi
$k_p$	Dağılım katsayısı
KMK	Kritik misel konsantrasyonu
K/G	Katı – gaz ara yüzeyi
K/K	Katı – katı ara yüzeyi

K/S	Katı – sıvı ara yüzeyi
LB	Langmuir – Blodgett
LC	Sıvı yoğunlaşmış faz
LE	Sıvı genişlemiş faz
NRDS	Yeni Doğan Solunum Zorluğu Sendromu
P	Basınç
$\pi$	Pi sayısı
$\pi$	Ara yüzey basıncı
Q	Yağ fazının hacminin su fazının hacmine oranı
R	Gaz sabiti
r	Yarıçap
$r_1, r_2$	Damla yüzeyindeki eğimlilik yarıçapları
$r_{Apex}$	$z = 0$ olduğu durumdaki yarıçap
RDS	Solunum Zorluğu Sendromu
S/G	Sıvı – gaz ara yüzeyi
S/S	Sıvı – sıvı ara yüzeyi
t	Zaman
T	Sıcaklık
$T_m$	Zincir erime sıcaklığı
$\Gamma$	Yüzey artık konsantrasyonu
$V_{su}$	Su fazının hacmi
$V_{yağ}$	Yağ fazının hacmi
z	Damla yüksekliği



**Kimyasallar:**

$\beta$ -CA	$\beta$ -kazein
$\beta$ -LG	$\beta$ - laktoglobulin proteininin
Betain	$C_5H_{11}NO_2$
Brij 56	$CH_3(CH_2)_{15}(PEO)_{10}OH$
BLES	Sığır akciğer lavajı
CTAB	Setiltrimetil amonyum bromür
$C_iE_j$	n-alkil poliglitol eter
$C_nDMPO$	Alkildimetilfosfinoksit
Curosurf	Domuz akciğer surfaktant özütü
DPPC	Dipalmitilfosfatidilkolin
DSPC	Disearoyl fosfatidilkolin
FB	Fibrinojen
HD	Hekzadekanol
HSA	Serum albumin
Infasurf®	Buzağı akciğer lavajı
IPL	Ion Pair Lipid; $C_{42}H_{88}NO_{10}^+C_8F_{17}O_3S^-$
PA	Palmitik asit
PC	Fosfatidilkolin
PE	Fosfatidiletanolamin
PEO	Polioksietilen zinciri
PEO2000-DSPE	PEO aşılantmış distearoyl fosfatidiletanolamin
PFOS	Perflorooktansülfonat
PG	Fosfatidilgliserol
PI	Fosfatidillinositol

POPG	Palmitoyl-oleyl fosfatidilgliserol
PS	Fosfatidilserin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Survanta	Sığır akciğer surfaktant özütü

## 1. GİRİŞ

Buldukları ortamda ara yüzeye adsorbe olarak yüzey gerilimini düşüren yüzey aktif maddeler, yapıcı hidrofobik ve hidrofilik gruplardan oluşmaktadırlar. Günlük hayatta tekstilden temizlik malzemelerine kadar geniş bir kullanım alanına sahip olan bu maddeler, doğal halde vücudumuzda da bulunmakta ve yaşamın sürdürülebilmesi için kritik öneme sahip olan nefes alış-verişini düzenlemektedir. Gaz transferinin gerçekleştiği alveollerde bulunan akciğer yüzey aktif madde karışımı akciğerlerimizde alveol Tip – II hücreleri tarafından sentezlenmekte ve alveol hava/sıvı ara yüzeyine bir film tabakası halinde yayılmaktadır. Solunumun sürdürülebilmesi için, her bir nefes alış – veriş döngüsünde alveollerin yüzeyinde oluşan basınç farkının düşürülmesi gerekmektedir. Akciğer yüzey aktif madde karışımı, her döngüde alveol ara yüzeyine kısa sürede adsorbe olarak yüzey gerilimini düşürür ve böylece solunumun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar (Creuwels et al., 1997; Goerke, 1998).

Akciğer yüzey aktif madde karışımı %90 oranında lipid ve %10 oranında protein içeren kompleks bir karışımdır (Lyra et al., 2007). Lipidlerin kütlece yaklaşık %40'ını doymuş yağ asitleri içeren dipalmitilfosfatidilkolin (DPPC) oluşturmaktadır. Karışımda en yüksek orana sahip olan DPPC, yüzey geriliminin düşürülmesinde büyük rol oynamaktadır. Lipidler, yüzey geriliminin düşürülmesinde görev alırken, proteinler karışımda genel olarak yüzey filminin düzenlenmesinde ve geri-yayılımının iyileştirilmesinde görev almaktadırlar (Perez-Gil et al., 2006). Karışımda bulunan proteinler hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Hidrofilik proteinler olan SP-A ve SP-D genel olarak bağışıklık sisteminde görev alırken; hidrofobik özelliğe sahip olan SP-B ve SP-C proteinleri, lipidlerin adsorpsiyonunu ve yayılımını arttırmaktadır (Wüstneck et al. 2005). Ayrıca bu iki proteinin karışımda bulunmaları lipidlerin ara yüzeydeki kararlılıklarını korunmasını sağlamaktadır (Whitsett et al., 2002). Yüzey geriliminin yeterince düşürülmesi ve solunum için optimum koşulların sağlanması, özellikle fosfolipidlerin, nötral lipidlerin, SP-B ve SP-C proteinlerinin bir arada bulunmasından kaynaklanmaktadır (Mulugeta et al., 2006).

Akciğer yüzey aktif madde karışımındaki bütün bileşenlerin işlevlerini sorunsuz olarak yerine getirmesi sonucunda solunum sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmektedir. Ancak akciğerlerde ağır yaralanma, şiddetli kanama, şok ya da enfeksiyon oluşumu nedeniyle, yüzey aktif madde karışımının mekanizmasında aksaklıklar oluşabilmekte ve karışım özelliklerini kaybedebilmektedir. Bu durumların yanı sıra, plazma proteinlerinin alveol boşluğuna sızmaları ve alveol ara yüzeyine yüzey aktif madde karışımından önce geri dönüşümsüz olarak yayılmaları sonucu surfaktant karışımı inaktivasyona uğramaktadır. Yetişkin tip solunum zorluğu sendromu (ARDS) olarak adlandırılan ve ölüm oranı yüksek olan bu hastalık için günümüzde hala etkin ve kesin bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir (Fernsler and Zasadzinski, 2009). Kullanılan ilaçlar hayvanlardan özütlenen doğal akciğer yüzey aktif madde karışımlarıdır. Ancak bu karışımlar, yüksek üretim ve saflaştırma maliyetleri, örnekten örneğe değişebilen içeriği ve patojen geçiş riski taşımaktadırlar. Günümüzde etkin sonuç alınamasa da, tedavi amacıyla en çok kullanılan ilaç, içerik olarak akciğer yüzey aktif madde karışım bileşenlerini içeren ve sığır akciğerinden özütleme yoluyla elde edilen Infasurf<sup>®</sup>tür (Zhang et al., 2011). Ancak doğal karışımların taşıdıkları risklerden dolayı günümüzde geliştirilmesi beklenen tedavi yöntemi, sentetik karışımların kullanılmasıdır. Sentetik yapıların güvenilir, maliyeti düşük ve hidrofobik surfaktant proteinleri ile akciğer yüzey aktif madde karışımındaki lipidleri taklit edip, doğal karışımın biyofiziksel işlevini yerine getirebilme yeteneğine sahip olması beklenmektedir (Seurnyck-Servoss et al., 2007). Solunum, alveollerin genişleyip daralmasıyla çok hızlı bir şekilde gerçekleşen ve sürekli devam eden döngüsel bir prosestir. Dolayısıyla ARDS için tedavi amacıyla geliştirilen ilaçların, akciğer yüzey aktif maddesini oluşturan bileşenlerin ve kan proteinlerinin dinamik adsorpsiyon özelliklerinin dikkatle incelenmesi gerekmektedir.

Yapılan tez çalışmasında, hava/sıvı ara yüzeyinde akciğer yüzey aktif madde karışımındaki SP-B proteinin belirli özelliklerini taklit edebilen ve DPPC ile sinerjik etkileşime girebilen  $C_{43}H_{90}NO_{10}^{+}C_8F_{17}O_3S^{-}$  (IPL) molekülünün dinamik adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi ve farklı deney sistemleri kullanılarak surfaktant inaktivasyonuna neden olan fibrinojen proteini ile etkileşimlerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Kullanılan molekülün fibrinojenle yarışmalı adsorpsiyona girebilmesi

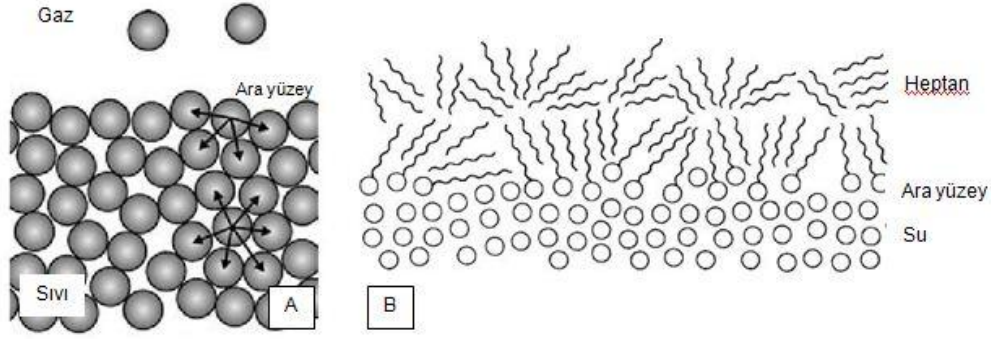
ve ayrıca ara yüzeyde bulunurken kan proteinlerinin ara yüzeye adsorbe olmalarını engellemesi istenmektedir. IPL'nin yapısında bulunan florokarbon ve hidrokarbon zincirlerinin hidrofobikliği arttırarak adsorpsiyon hızını yükselteceği; polioksietilen zincirinin ise kan proteinlerine karşı sterik bariyer oluşturarak ara yüzeye adsorpsiyonlarını engelleyebileceği düşünülmektedir. Tez kapsamında askıda damla metodu kullanılarak yapılacak dinamik adsorpsiyon ölçümlerinde iki farklı ara yüzey modeli oluşturulacaktır. Bunlardan ilki, IPL ile DPPC'nin değişik mol oranlarındaki karışımları; diğeri ise doğal akciğer yüzey aktif maddesi olan ve RDS'de etkin olarak kullanılan Infasurf®'tür. Kullanılan her iki ara yüzey modeli için de amaç, IPL'nin kullanılmasıyla fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu engelleyen bir sistem elde edebilmektir. Ara yüzeyde sadece IPL bulunurken elde edilen sonuçların doğal akciğer yüzey aktif madde karışımı olan Infasurf® ile karşılaştırılarak; IPL'nin ara yüzeye yaptığı katkıyı belirlemek de tezin önemli amaçlarındanıdır. Ayrıca, IPL ile Infasurf®'ün ayrı ayrı hava/sıvı ve kloroform/sıvı ara yüzeylerinde uzun ve kısa zamanlı dinamik davranışlarının incelenip difüzyon katsayılarının belirlenmesiyle dinamik adsorpsiyon karakterizasyonlarının yapılması planlanmaktadır. Solunumun sürekli devam eden döngüsel bir proses olduğu düşünüldüğünde yüzey aktif maddelerin ara yüzey özellikleri ve döngüsel davranışları, dinamik adsorpsiyon özellikleri kadar önem kazanmaktadır. Oluşturulan ara yüzeylerin döngüsel davranışları Langmuir-Blodgett (LB) minitrough cihazı kullanılarak hava/sıvı ara yüzeyinde incelenecektir. ARDS durumunda kan proteinleri ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak adsorbe olmaktadır. Dolayısıyla, ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarının azaltılması kritik bir olgudur. IPL'nin surfaktant inaktivasyonuna karşı DPPC'nin ve Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerini iyileştirmesi ve hava/sıvı ara yüzeyine adsorbe olan fibrinojen miktarını azaltmak tez kapsamında belirlenen önemli amaçlardandır. Bu kapsamda değişik deney sistemleri kurulacak ve böylelikle IPL'nin surfaktant inaktivasyonuna ve ARDS'ye karşı Infasurf®'ün özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılabilme potansiyeli de belirlenecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kolloid ve Yüzey Bilimi

Yüzey Bilimi, çalışmalarında iki fazın ara yüzeyinde oluşan fiziksel ve kimyasal olayları konu alan bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Prutton, 1994). Kolloid ve Yüzey Bilimi ise dağınık durumdaki (kolloidal) maddelerin ara yüzeylerde meydana getirdikleri olayları incelemektedir. Peter A. Rehbinder, Kolloid ve Yüzey Bilimi'ni, "dağınık sistemlerin kimyası, fiziği ve fiziko kimyası ile ara yüzey olayları" olarak tanımlamıştır. Ara yüzey olgusu, dağınık sistemlerin karakteristik özelliklerini belirlediğinden ve kontrol edebildiğinden, dağınık faz ile ara yüzey olayları birbirlerinden ayrı düşünülemez (Shchukin et al., 2001).

Yüzey ya da ara yüzey birbirleriyle karışmayan iki faz arasındaki sınır olarak tanımlanabilir. (Myers, 2006). Örneğin; su ve yağ gibi karışmayan iki sıvıyı ayırabilen alan 'sıvı – sıvı ara yüzeyi'dir. Katı – katı ara yüzeyi ise iki katı fazı birbirinden ayırır (Butt et al., 2003). Matematiksel olarak ara yüzey iki boyutlu olarak kabul edilmekte, kalınlığı ihmal edilmektedir. Buna göre, ara yüzey iki yığın fazı ayıran ve bir faz ile diğeri arasında geçişi sağlayan sonsuz incelikte bir çizgi ya da düzlem olarak düşünülebilir. Beş basit ara yüzey tanımlaması vardır: (1) katı – gaz (K/G), (2) katı – sıvı (K/S), (3) katı – katı (K/K), (4) sıvı – gaz (S/G), ve (5) sıvı – sıvı (S/S) ara yüzeyleri (Şekil 2.1). Geleneksel olarak, bir gaz ve bir yoğunlaşmış fazdan oluşan sınırlar (örneğin, K/G ve S/G ara yüzeyleri) sadece "yüzey" olarak tanımlanır. Fazların arasındaki sınırlar, sistemin tümünün davranışını ve karakteristiğini belirleyecek özelliklere sahiptir. Dolayısıyla çok fazlı sistemlerin bilimsel ve ticari uygulamalarının devam edebilmesi, sistemdeki ara yüzey etkileşimlerinin ya da faz sınırlarının kontrol edilebilirliğine bağlıdır (Myers, 2006).



Şekil 2.1 (A) Sıvı – Gaz, (B) Sıvı – Sıvı ara yüzeylerinin şematik gösterimleri

Bir sistemin ara yüzeyinde sahip olduğu kimyasal, fiziksel ve elektriksel özellikleri, yığın fazdakilerden oldukça farklılık gösterir ve bu durumun önemli derecede etkili olduğu koşullar bulunmaktadır. Örneğin faz sınırının alanı, sistemin toplam hacmine göre çok büyük olduğunda, madde miktarının büyük bir kısmı faz sınırlarında bulunacağından, bu durumda sistem özelliklerini ara yüzeyde bulunan madde belirler. Emülsiyonlarda ve köpüklerde gördüğümüz bu koşulda ara yüzeyde yüzey aktif maddeler bulunmakta ve önemli parametreleri kontrol etmektedirler.

Bir diğer koşul ise; yığın fazdaki etkileşimlere göre ara yüzeyde meydana gelen olayların etkisinin daha baskın olduğu ve sistemin bütününün davranışının ara yüzey tarafından kontrol edilmesidir (örn. deterjanlar). Bu gibi durumlarda da yine yüzey aktif maddelerin davranışı önem kazanmaktadır (Rosen, 2004). Dolayısıyla sistemlerin davranışlarını belirleyebilen ve kontrol eden yüzey aktif maddelerin yapılarını ve özelliklerini anlamak ara yüzey olayları çalışmaları için birincil hedeftir.

## 2.2. Yüzey Aktif Maddeler

Surfaktant (**Surface Active Agent**) olarak da adlandırılan yüzey aktif maddeler, karakteristik yapılarında, buldukları kimyasal çevreye (çözücü) karşı ilgisi yüksek liyofilik bir grup ile aynı ortama karşı ilgisi düşük olan liyofobik grupları bir arada bulunduran (amfifilik) ve kimyasal bileşikler arasında 'benzersiz' bir sınıfta yer alan moleküllerdir (Şekil 2.2). Sulu çözeltiler için liyofilik terimi yerine suyu seven anlamına gelen hidrofilik terimi, liyofobik terimi için ise suyu sevmeyen anlamına gelen hidrofobik terimleri kullanılmaktadır (Myers, 1999). Surfaktant moleküllerinin

kuyruk grubunu oluşturan hidrofobik kısım polar değildir ve genellikle 8 – 18 karbon atomu içeren düz ya da dallanmış yapıdaki hidrokarbon/florokarbon zincirinden oluşurken, hidrofilik olan baş kısım polar yapıdadır. Su molekülleri arasında oluşan hidrojen bağları, kuyruk grubunu suyun dışında tutmak istedikleri için bu kısım hidrofobik olarak nitelendirilir. Baş grubunun iyonik ya da polar yapısı sayesinde ise yüzey aktif maddeler su molekülleri ile dipol – dipol etkileşimi gibi güçlü etkileşimlerde bulunmakta ve çözünebilmektedirler (Tadros, 2005).



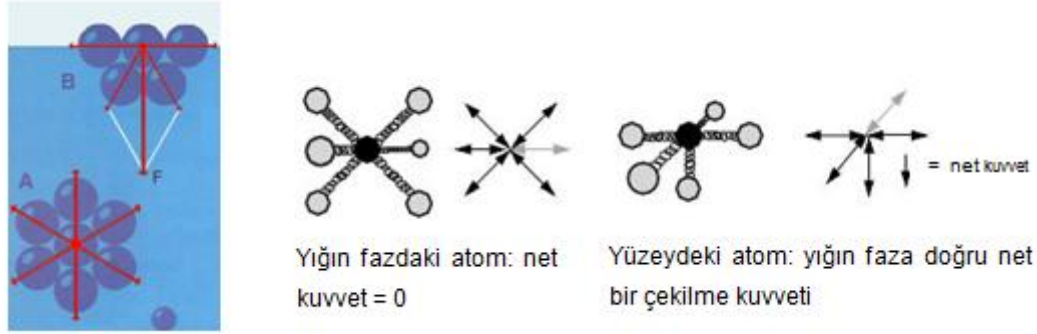
Şekil 2.2 Yüzey aktif maddelerin yapısı ve çözültideki davranışları

Yüzey aktif maddeler buldukları ortamda hava – sıvı ara yüzeyine adsorbe olarak yüzey gerilimini düşürmekte, ya da çeşitli kümeleşmeler oluşturmaktadırlar. Her iki durumda da amaç, sistemin enerjisini düşürmek ve kararlı hale getirmektir. Örneğin, moleküllerin ara yüzeye adsorbe olmalarında itici kuvvet; faz sınırının, yani ara yüzeyin, serbest enerjisini düşürmektir. Ara yüzey serbest enerjisi, yüzey oluşturmak için gereken enerji olarak tanımlanırken, birim alana bölünmüş hali ise yüzey gerilimi olarak adlandırılır ve kısaca ara yüzeyi genişletmek için gerekli iş miktarı olarak tanımlanmaktadır (Eşitlik 2.1). Eşitlik 2.1’de  $g$  ara yüzey serbest enerjisini,  $a$  birim alanı,  $T$  ve  $P$  ise sırasıyla sıcaklık ve basıncı ifade etmektedir.

$$\gamma = \left( \frac{\partial g}{\partial a} \right)_{T,P} \quad (2.1)$$



Bir sıvıda yığın fazda bulunan atom ya da moleküllere komşu diğer moleküller, birbirlerine her yöne doğru kuvvet uygularlar. Yığın fazdaki molekülün çevresi tamamen diğer moleküllerle kaplı olduğu için o molekülün üzerinde oluşan net kuvvet sıfırdır. Ancak, yüzeydeki moleküller için aynı durum söz konusu değildir. Bu durumda moleküller yüzeyde oldukları için üzerlerine etkiyen kuvvet yatay yönde ve buna ek olarak çözültü içerisindeki diğer moleküller tarafından aşağı doğru olmaktadır. Yatay kuvvetlerin toplamı yine sıfırdır, fakat dikey yönde başka kuvvet olmadığı için moleküller sıvının içine çekilmeye çalışırlar. Dolayısıyla yüzeyde bulunan moleküllerin üzerinde oluşan net kuvvet, aşağı doğru çekme kuvvetidir. Yüzey gerilimi olgusu da bu durumdan doğmaktadır (Şekil 2.3). Yüzey gerilimi ( $\gamma$ ) ile gösterilir ve SI birim sisteminde birimi  $\text{mN m}^{-1}$  dir.



Şekil 2.3 Yüzey gerilimini oluşturan kuvvetler

Bütün bu tanımlamalara bakıldığında, yüzey aktif maddeler düşük derişimlerde bile ara yüzeye adsorbe olan ve o ara yüzeyi genişletmek için gerekli olan işi büyük bir ölçüde azaltan moleküllerdir (Rosen, 2004). Sürfaktantlar yağ veya sudaki çözünebilirlikleri gibi işlevsel özelliklerine göre ya da hidrofilik grup ile hidrofobik grupları arasındaki bağlayıcı grubun yapısı gibi kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılabilirler gibi (Myers, 1999) daha genel olarak hidrofilik baş gruplarının sahip olduğu yüke göre 4 ana grupta kategorize edilmektedirler:

- Anyonik surfaktantlar: Karboksilat, sülfonat ya da sülfat gruplarında olduğu gibi bu gruptaki yüzey aktif maddelerin hidrofilik grubu negatif yük taşımaktadır. Örneğin, birçok alanda kullanılan sodyum dodesilsülfat (SDS),  $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ , bu grupta yer almaktadır.
- Katyonik surfaktantlar: Hidrofilik kısımları pozitif yüklü yüzey aktif maddelerdir. Altın nanopartiküllerin sentezlenmesinde, bakteriler ve mantarlara karşı antiseptik olarak ve saç bakım ürünleri gibi birçok alanda kullanılan hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB),  $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$ , katyonik yüzey aktif maddelere örnek olarak verilebilir.
- İyonik olmayan surfaktantlar: Bu gruptaki yüzey aktif maddeler yüklü değildir. Temizlik malzemelerinde ve kişisel bakım ürünlerinde sıkça kullanılan Brij serisi,  $C_xH_y(OCH_2CH_2)_nOH$  bu gruptaki surfaktantlardandır. Ayrıca kozmetik sanayisinde ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanım alanı bulan polimer yapıdaki Pluronikler de bu sınıfa dahil edilmektedirler.
- Amfoterik (Çiftkutuplu) surfaktantlar: Amfoterik yapıdaki yüzey aktif maddeler, yapılarında hem pozitif hem de negatif yükü bir arada bulundurmaktadırlar, ancak sahip oldukları net yük değeri sıfırdır. Örneğin kalp ve karaciğer rahatsızlıklarına karşı tedavide kullanılan Betain,  $C_5H_{11}NO_2$  amfoterik özellikteki yüzey aktif maddeler arasında yer almaktadır.

Doğada bulunan ve kullanılan yüzey aktif maddelerin büyük bir kısmı anyonik yapıda olmakla beraber, iyonik olmayan surfaktantlar da sıklıkla kullanılmaktadır. Katyonik yüzey aktif maddeler genellikle toksik özellik göstermekte ve ayrıca doğada biyolojik olarak bozunmamaktadır. Bu durum katyonik surfaktantların kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Amfoterik yüzey aktif maddeler ise göreceli olarak diğer gruplara göre daha pahalıdır ve özel uygulamalarda kullanılmaktadır (Butt et al., 2003)

Yüzey aktif maddeler günlük hayatta ve endüstriyel alanda birçok kullanım alanına sahiptirler. En çok deterjan ve temizlik malzemelerinde olmak üzere surfaktantların uygulama alanları arasında kozmetik endüstrisi, kişisel bakım ürünleri, tekstil ve elyaf sanayisi, deri ve kürk üretimi, boya ve vernik üretimi, kağıt sanayisi, metal işleme endüstrisi, tarım, gıda ve ambalaj sanayisi, petrol ürünleri, plastik ve kompozit

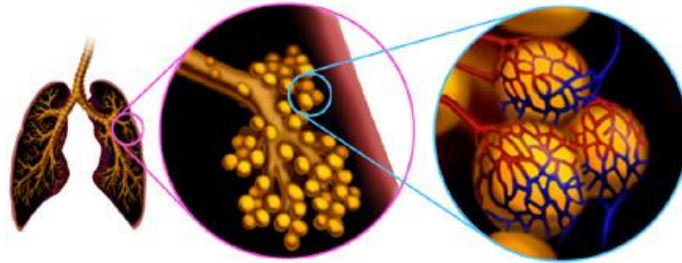
malzemeler, ilaç sanayisi bulunmaktadır (Myers, 2006). Kullanım buldukları uygulamalar göz önünde bulundurulduğunda yüzey aktif maddelerin hayatımızın her alanında yer aldığı görülmektedir.

Endüstriyel alanda yer aldıkları birçok uygulama dışında, yüzey aktif maddeler biyolojik sistemler içinde de çok önemli bir yere sahiptir. Hücre membranlarının büyük bir bölümünü oluşturan fosfolipidler ve sindirim sisteminde görev yapan safra tuzları, canlı sistemlerde doğal olarak bulunan yüzey aktif maddelere verilebilecek örneklerdendir (Peetla and Labhasetwar, 2007; Hofmann et al., 1987; Miller et al., 2008).

Bu örneklerin yanı sıra, yüzey aktif maddeler vücudumuz için kritik öneme sahip olan akciğerlerimizde de üretilmektedir. 'Akciğer yüzey aktif maddeleri' alveollerimizde özel bir karışım halinde bulunarak etkin bir şekilde nefes alıp – verebilmemizi sağlamaktadırlar. Nefes alış – verişinin yaşamın sürdürülebilmesi için kritik basamak olduğu düşünüldüğünde, yüzey aktif maddelerin özelliklerinin ve davranışlarının doğru olarak anlaşılmasının önemi ortaya çıkmaktadır.

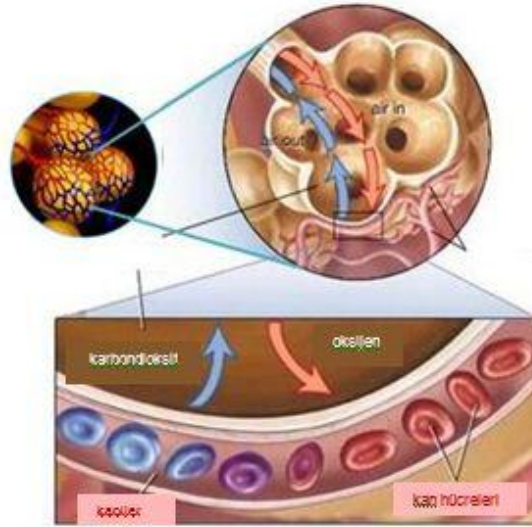
### 2.3. Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri

Akciğer, vücut ağırlığından bağımsız olarak vücut hacminin %6'sını kaplayan, geniş iç yüzey alanıyla nefes alış – verişini verimli bir şekilde sağlayan ve dolayısıyla çevreyle sürekli temas halinde bulunan büyük bir organdır. Sıcak kanlı canlıların oksijen ihtiyacı çok yüksek derecededir ve bu ihtiyacın karşılanabilmesi için büyük bir yüzey alanı gerekmektedir. İnsan akciğeri için elde edilen bulgulara göre 1 cm<sup>3</sup> hacmindeki ciğer dokusu, 300 cm<sup>2</sup> lik bir gaz transfer alanına sahiptir (Creuwels et al., 1997).



Şekil 2.4 Akciğer ve alveollerin anatomik yapısı

Akciğerler; iletimi sağlayan bronşlar, bronşçuklar ve bronşçukların ucunda yer alan alveol adı verilen üzerleri kılcal damarlarla kaplanmış hava keseciklerinden oluşmaktadır. Akciğerin ve alveollerin anatomik yapıları Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Yetişkin bir insanda bulunan alveol sayısı yaklaşık 300 milyon kadardır ve bu miktar neredeyse bir tenis kortunu kaplayabilecek büyüklüktedir. Bronş ve bronşçuklar gaz alış-verişine katılmamakta, sadece iletim görevi yapmaktadırlar. Gaz transferi alveollerde difüzyon ile gerçekleşmektedir. Hava ile birlikte alınan oksijen alveollerden kılcal damarlara difüze olurken, karbon dioksit ise kılcal damarlardan alveollere geçmekte, buradan da vücut dışına atılmaktadır (Şekil 2.5).



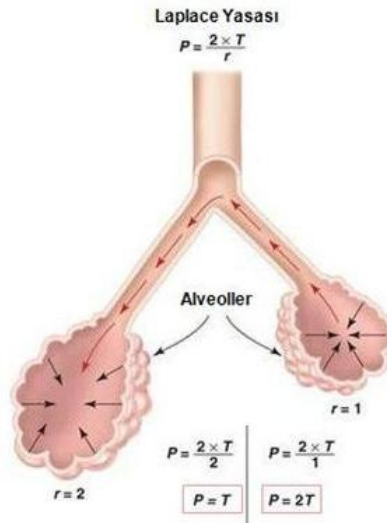
Şekil 2.5 Alveollerde gaz transferi

Alveoller içleri hava ile dolu, eğrilikleri yüksek, küçük baloncuklar (kesecikler) dir. Nemli yüzeylerindeki moleküllerin birbirleri ile etkileşmeleri sonucu belirli bir yüzey gerilimine sahiptirler. Nefes alma sırasında alveoller büyümekte ve dolayısıyla yüzey alanları artmaktadır. Artan yüzey alanına karşılık yüzey gerilimi de artmakta ve bu yüzey gerilimi keseciklerin patlamasına ve ciğerin çökmesine neden olabilecek büyüklüğe ulaşmaktadır (Creuwels et al., 1997).

Bu durumun açıklanmasında büyük rol oynayan Young - Laplace Yasası'na göre, iki akışkan arasındaki yüzey eğimli ise, bu iki faz arasında net bir basınç farkı vardır. Küresel geometriler için kullanılan bu yasa, ince bir sıvı filmi ile kaplı elastik bir membran olan alveollere de uygulanmaktadır. Young – Laplace Yasası, nefes alış – veriş sırasında alveollerin iç ve dış yüzeyleri arasında oluşan basınç farkını ( $\Delta P$ ), alveollerin yüzey gerilimi ( $\gamma$ ) ve yarıçapına ( $r$ ) bağlamaktadır (Eşitlik 2.2).  $\Delta P$  terimi aynı zamanda 'Laplace basıncı' olarak da kullanılmakta ve Eşitlik 2.2, Laplace Yasası olarak da bilinmektedir (McCabe et al., 2000, Butt et al., 2010).

$$\Delta P = \left( \frac{2\gamma}{r} \right) \quad (2.2)$$

Alveol yüzeyinde bulunan sıvı tabakası alveolde belirli bir yüzey gerilimi yaratmaktadır. Laplace Yasası'na göre basınç farkı; yüzey gerilimi ile doğru, alveollerin yarıçapı ile ise ters orantılıdır. Bu durumda Şekil 2.6'da görülen küçük alveoldeki basınç, büyük alveoldekinden daha fazla olacaktır. Dolayısıyla küçük alveölü şişirmek için yapılması gereken iş, büyük alveölü şişirmek için gerekenden çok daha fazladır.



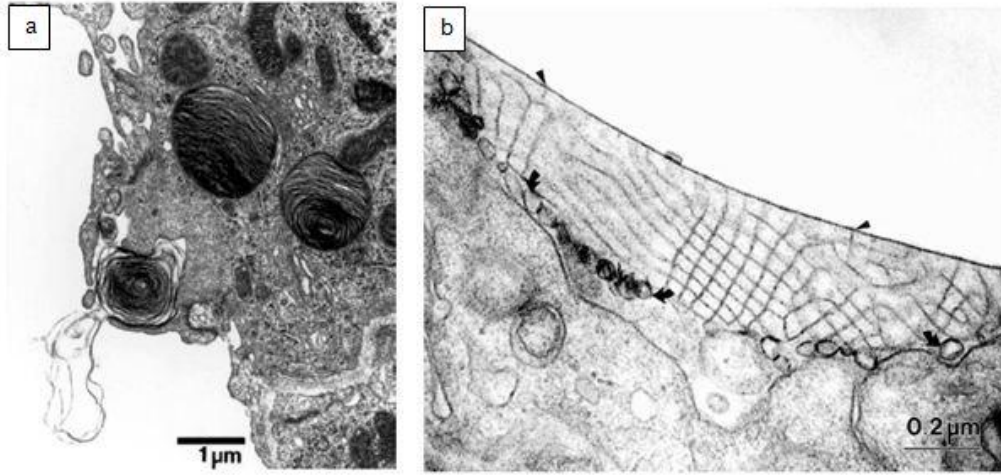
Şekil 2.6 Laplace Yasası'nın alveollere uygulanışı

Fiziksel olarak düşünülduğünde bu basınç farkı sonucunda, küçük alveolden büyük alveole hava akışının olması ve alveol daha da küçüldükçe basınç artacağından küçük alveolün yıkılması beklenmektedir. Ancak gerçekte nefes – alış verişi sürekli devam etmekte ve alveollerimiz sağlıklı bir şekilde büyüyüp – küçülebilmektedir. Eşitlik 2.2'ye göre yüksek basınç farkının azaltılabilmesi için yüzey geriliminin düşürülmesi gerekmektedir. Vücudumuzda bu düzen, alveol yüzeyinde oluşan yüzey gerilimini çok düşük değerlere düşürebilen maddelerin varlığıyla sağlanmaktadır. Bu madde bütün memeli canlıların akciğerlerinde bulunan akciğer yüzey aktif maddesidir (Creuwels et al., 1997).

### **2.3.1. Akciğer Yüzey Aktif Maddesi, Bileşenleri ve Özellikleri**

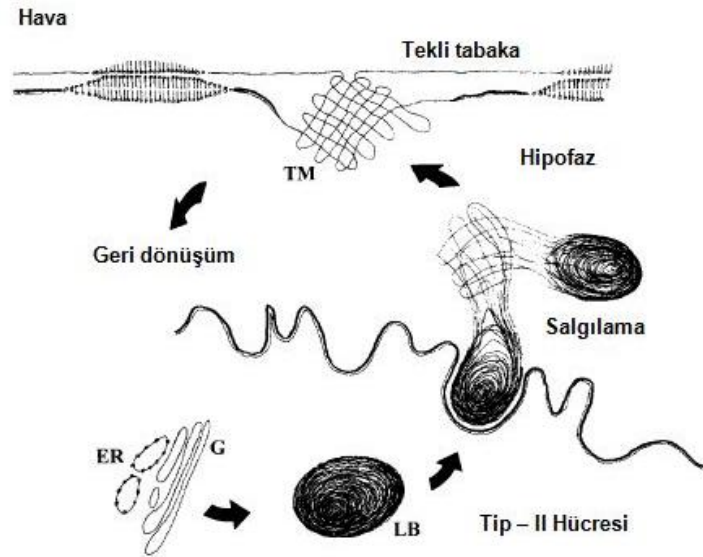
Memeli akciğerlerinde alveolar yüzey ince ve sulu bir tabaka ile kaplıdır. Düşük sıcaklık elektron mikroskopisi ile fare akciğerlerinde yapılan çalışmaların sonucunda bu tabakanın kalınlığı ortalama olarak 0.2 µm olarak belirlenmiştir (Bastacky et al., 1995). Akciğer yüzey aktif madde karışımını ve sulu bir fazı içeren bu tabaka, akciğer yüzey aktif maddesinin salgılanması, morfolojik olarak değişmesi, adsorpsiyonu, desorpsiyonu ve geri dönüşümü için gerekli ortamı sağlamaktadır (Zuo et al., 2008).

Alveol hava – sıvı ara yüzeyinde yer alan bu film tabakasının içinde bulunan ve lipid ile proteinleri içeren kompleks bir karışım olan akciğer yüzey aktif maddesi, akciğerlerimizde alveol Tip – II epitelyal hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Sentezlenen karışım, Tip – II hücrelerinde bulunan multiveziküler (çok katmanlı) cisimcikler (lamellar body) tarafından depo edilir ve bu şekilde ortama verilir. Şekil 2.7 (a)'da eksositoz yapan veziküler cisimcik görülmektedir (Rooney et al., 2001). Bu cisimcik alveolün sulu fazında hidrasyona uğrar ve 3 boyutlu kafes yapısında bir matriks olan tübüler miyelin haline dönüşür (Şekil 2.7.b).



Şekil 2.7 (a) Eksositoz yapan çok katmanlı cisimcik, (b) Tübüler miyelin

Tübüler miyelin yüzey aktif madde bileşiminin tümünü içermektedir. Bu yapı, alveol hava – sıvı ara yüzeyine adsorbe olarak yayılır ve solunum normal bir şekilde sürdürülür. Tübüler miyelin yapısı akciğer yüzey aktif maddelerin ara yüzeye yayılabilmeleri için bir rezervuar görevi görmektedir ve yapısı bakımından benzersizdir. Yüzey aktif maddelerin sentezi, yüzeye yayılımı ve geri dönüşümü Şekil 2.8’de özetlenmiştir (McCabe et al. 2000).



Şekil 2.8 Akciğer yüzey aktif maddesinin sentezi, alveol ara yüzeyine yayılımı ve geri dönüşümü

Yaşamımızın normal bir şekilde devam ettirilebilmesi için kritik olan bu karışımın en önemli işlevi, solunum sırasında alveollerdeki hava – sıvı yüzey gerilimini değiştirebilmesidir. Bu karışım, nefes verirken yüzey gerilimini yaklaşık sifıra kadar indirebilmekte ve böylece alveollerin çökmesini önlemekte; nefes alırken ise alveol yüzeyinin genişlemesi için gereken işi minimize etmektedir (Zasadzinski et al., 2001). Bu kritik görevin yanı sıra, akciğer yüzey aktif madde karışımının vücudumuzda başka fonksiyonları da bulunmaktadır. Örneğin akciğerlerde çeşitli virüs, bakteri, mantar ve allerjenlerle etkileşim içinde olarak akciğer bağışıklık sistemine bariyer olarak katkıda bulunmaktadır (Wüstneck et al., 2005). Akciğer yüzey aktif maddelerinin diğer fonksiyonları Çizelge 2.1’de özetlenmiştir (Zuo et al., 2008).

Çizelge 2.1 Akciğer yüzey aktif maddesinin fizyolojik fonksiyonları

<b>Yüzey Gerilimi ile Bağlantılı</b>	<b>Yüzey Gerilimi ile Bağlantısız</b>
Yüksek gaz transfer alanı sağlamak	Spesifik ve nonspesifik savunma mekanizması oluşturmak
Nefes alırken ciğerin genişleme kapasitesini arttırmak	Patojenlere karşı bariyer görevi görmek
Nefes verirken alveolü stabilize etmek	Antibakteriyel ve antiviral aktivite göstermek
Hava yolunu stabilize etmek	Kasların düzgün şekilde gevşemesini sağlamak
Ödem oluşumunu önlemek	
Yüzeylerin birbirine yapışmasını önlemek	
Epitel hücrelerini korumak	
Mukosiliyer taşınımı sağlamak	
Sıvı yayılımı	
Partikül uzaklaştırılması	

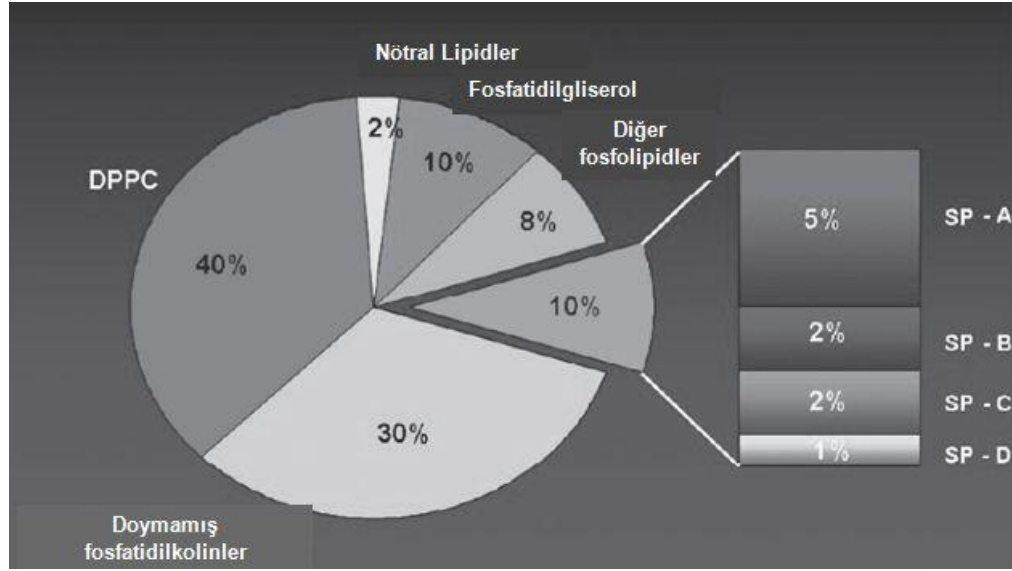


Akciğer yüzey aktif maddesinin fonksiyonelliği, çeşitli yapıları bir arada bulundurmasından kaynaklanmaktadır. Yapısı ve fonksiyonu bakımından benzeri bulunmayan bu karışımın nasıl çalıştığını anlamak için bileşenlerinin bilinmesi önemli bir adımdır.

Akciğer yüzey aktif madde karışımı protein ve lipidlerin kompleks bir karışımıdır ve bileşimi canlı türleri arasında az da olsa farklılık göstermektedir. Ancak genel olarak bu karışımın kütlece yaklaşık %90'ını lipidler, %8 - 10'unu ise proteinler oluşturmaktadır (Lyra et al., 2007). Her iki bölüm de kendi içinde heterojen olan karışımlardır ve her biri özellikleri bakımından akciğer yüzey aktif madde karışımını benzersiz kılan çeşitli bileşenler içermektedirler.

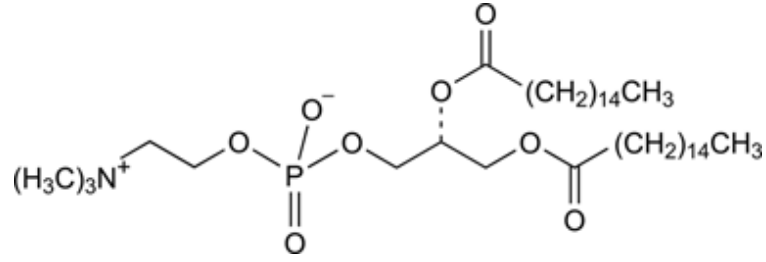
### **2.3.1.1. Lipidler**

Akciğer yüzey aktif madde karışımındaki lipidlerin büyük bir kısmını fosfolipidler oluşturmaktadır. Bir fosfolipid olan fosfatidilkolinin (PC) toplam lipid karışımında kütlece oranı %70 - %80'e yakındır ve bu oranın yaklaşık yarısını doymuş bir lipid olan dipalmitofosfatidilkolin (DPPC) oluşturmaktadır (Perez – Gil et al., 2006). Lipid karışımında PC'nin yanı sıra yaklaşık %8 – 10 oranında anyonik olan fosfatidilgliserol (PG), %3 – 5 oranında fosfatidiletanolamin (PE), %2 - 3 oranında fosfatidillinositol (PI) ve toplam %2'den daha az miktarda fosfatidilserin (PS), lizofosfatidilkolin ve sfingomiyelin bulunmaktadır (Şekil 2.9). Ayrıca nötral yapıda bulunan bir lipid olan kolestrol, lipid yüzdesinin önemli bir kısmını oluşturmakta ve dinamik koşullarda surfaktant karışımının yapısı ve fonksiyonu için önem teşkil etmektedir (Creuwels et al., 1997, Frerking et al., 2001).



Şekil 2.9 Akciğer yüzey aktif maddesinin içeriği (Lyra et.al, 2007)

Verilen oranlardan da görüldüğü gibi memelilerde akciğer surfaktant karışımının kütleye neredeyse 2/3'ünü oluşturan fosfolipidlerin, en baskın ve önemli bileşeni DPPC ( $C_{40}H_{80}NO_8P$ ) molekülüdür. Diğer biyolojik membranların içerikleriyle karşılaştırıldığında akciğer yüzey aktif maddesindeki DPPC oranı çok yüksek kalmaktadır. DPPC, her biri 16 - karbonlu iki adet doymamış hidrokarbon zinciri ve dördüncül amin grubuna bağlı bir adet fosfat grubundan oluşmaktadır. Hidrokarbon zincirleri hidrofobik kuyruk gruplarını oluştururken, negatif yüklü fosfat grubu ve pozitif yüklü dördüncül amin grubu birlikte hidrofilik baş grubunu oluşturmaktadırlar (Şekil 2.10). DPPC bu yapısı ile akciğer hava – sıvı ara yüzeyine hidrofobik zincirleri gaz fazına doğru yönelmiş, hidrofilik baş grubu ise sıvı fazda olacak şekilde adsorbe olmaktadır. Baş grubunun çift kutuplu yapısından dolayı DPPC, amfoterik yapıdadır ve net yükü 0'dır (Frerking et al., 2001).



Şekil 2.10 DPPC'nin molekül yapısı

Nefes alış – veriş sırasında değişen alveol yüzey alanına karşılık yüzey gerilimi de değişmektedir. Nefes verdiğimizde alveolün çökmemesi için yüzey geriliminin yaklaşık <2 mN/m'ye düşebilmesi ve alveol stabilitesinin korunması için nefes alırken maksimum 20 – 25 mN/m değerine çıkabilmesi gerekmektedir (Perez – Gil et al., 2010). DPPC molekülleri doymuş hidrokarbon zincirleri sayesinde yüksek derecede sıkıştırılabilir ve böylece yüzey gerilimini neredeyse sıfıra kadar düşürebilmektedirler.

Ancak, akciğer yüzey aktif madde karışımının işlevini düzgün şekilde yerine getirmesi sadece yüzey gerilimini düşürmesi ile gerçekleşmemektedir. Normal koşullarda çalışan bir akciğer surfaktant karışımının başka fiziksel özelliklerinin de bulunması gerekmektedir. Bunlar;

- 1) Hipofazdan ara yüzeye çok hızlı şekilde adsorbe olabilme ve saniyeler mertebesinde film tabakası oluşturabilmesi,
- 2) Ara yüzeyin sıkışması durumunda (nefes verme sırasında) yüzey geriliminin çok düşük değerlere (<2 mN/m) indirilmesi ve bu sırada yüzeydeki surfaktant tabakasının düşük film sıkıştırılabilirliği oranı (<0.01m/mN) gösterebilmesi
- 3) Yüzey yeniden genişlediğinde (nefes alma sırasında) surfaktant tabakasının etkili bir şekilde yenilenmesidir (Schürch et al., 2001).

Genel olarak yüzey geriliminin düşürülmesinin, ortamdaki fosfolipidlerin – özellikle DPPC'nin – sayesinde olduğu düşünülmektedir. Ancak fosfolipid karışımının hiçbir bileşeni yukarıda belirtilen görevleri tek başına yerine getiremez. Lipidler genel olarak akışkan sıvı – kristal halinde, ya da katı jel halinde bulunurlar. Jel fazından – sıvı fazına geçiş, 'faz geçiş sıcaklığında' (T<sub>m</sub>) gerçekleşir. Doymuş palmitat zincirleri

içeren DPPC'nin faz geçiş sıcaklığı 41°C'dir. Dolayısıyla, vücut sıcaklığında (37°C), DPPC tabakası jel halinde bulunmakta ve yüzeyde yıkılım göstermeden yüksek basınçlara kadar sıkıştırılabilmekte, böylece yüzey gerilimini neredeyse sıfıra kadar düşürebilmektedirler. Fakat bu fazda bulunması nedeniyle DPPC'nin nefes verdikten sonra tekrar alveol hava – sıvı ara yüzeyine adsorpsiyonu ve geri yayılımı çok yavaş olmaktadır (Daniels et al., 2003). DPPC'nin bu durumuna zıt olarak; karışımda bulunan diğer fosfolipidler, adsorpsiyon ve yayılım özelliklerinin iyi olmasına rağmen, farklı zincir yapısına sahip oldukları için yüksek basınçlara kadar sıkıştırılamamakta, dolayısıyla yüzey gerilimini yeterince düşürememektedirler (Takamoto et al., 2001). Bu durum, aslında DPPC'nin tek başına yüzey gerilimini yeteri kadar düşürmesine rağmen akciğer yüzey aktif madde karışımında neden diğer bileşenlerin de yer aldığını açıklamaktadır (Zasadzinski, 2001).

Yüzey geriliminin düşürülmesi DPPC molekülü sayesinde gerçekleşirken, yapıda bulunan daha akışkan yapıdaki doymamış fosfatidilkolin ya da nötral lipidler, DPPC'nin faz geçiş sıcaklığını düşürerek karışımın daha akışkan halde davranmasını sağlamaktadırlar (Daniels et al., 2003). Böylece DPPC'nin ara yüzeye adsorpsiyonu ve geri yayılım özellikleri iyileştirilmektedir. Ancak yine de karışımda sadece lipidlerin bulunması, yukarıda belirtilen üç önemli işlevi yerine getirmeye yetmemektedir. Diğer lipidlerin yanı sıra, asidik PG ve PI lipidlerinin ve proteinlerin eksikliğinde yüzey aktif madde karışımı fizyolojik olarak yetersiz kalmaktadır. Sonuç olarak, akciğer yüzey aktif maddesinin görevlerinin tam olarak yerine getirilmesi için karışımdaki tüm bileşenlerin eş zamanlı olarak çalışması gerekmektedir (McCabe et al., 2000). PG ve PI lipidlerinin hidrofobik proteinlerle etkileştiği ve yüzeydeki tabakayı stabilize etme özelliğine sahip oldukları bilinmektedir. Optimal yüzey aktiflik özellikle fosfolipidler, nötral lipidler, ve yüzey aktif proteinlerin varlığında görülmektedir. Nötral lipidlerden özellikle kolesterolün DPPC ya da DPPC – PG tabakasına dahil edilmesi adsorpsiyon hızının artmasını sağlamak ve yine bu sayede film tabakası daha akışkanlaşırken, geri – yayılımı düzenlenmektedir (Glasser et al., 2012). Deneysel verilere göre lipidler, yüzeyin sıkışması sırasında yüzey geriliminin maksimum derecede düşürülmesinde görev alırken, proteinler karışımda genel olarak yüzey filminin

adsorpsiyonunda, düzenlenmesinde ve geri – yayılımının iyileştirilmesi gibi kritik basamaklarda görev almaktadırlar (Perez – Gil et al., 2006).

### **2.3.1.2. Proteinler**

Akciğer yüzey aktif madde karışımında bulunan proteinlerin üstlendikleri görev bakımından özelliklerinin irdelenmesi çok önemlidir. Sürfaktant karışımında iki spesifik tip protein vardır: hidrofilik SP (Sürfaktant Protein) -A ve SP-D; hidrofobik SP-B ve SP-C proteinleri (Haagsman, et al., 2001). Boyut olarak daha büyük olan SP-A ve SP-D proteinleri suda çözünebilir glikoproteinlerdir ve bağışıklık sisteminde görev almaktadırlar. SP-B ve SP-C proteinleri ise, daha küçük boyutta polipeptitlerdir. Bu iki protein yüksek derecede hidrofobiktir ve alveollerin çökmemesi için yüzey geriliminin düşürülmesine yardımcı olmak, fosfolipidlerin ara yüzeye adsorpsiyonunu ve geri – yayılımını iyileştirmek, ayrıca yüzey aktif madde üretimini düzenlemek gibi alveollerin stabilitesini sağlayıcı önemli görevleri üstlenmektedirler. Bu dört önemli proteinin yanında, yeni keşfedilen ve vücutta üst hava yolunda bulunan yüzey aktif madde benzeri bir protein olan PLUNC (Palate, Lung, Nasal Epithelial Clone) bulunmaktadır. Bu protein yüzey geriliminin düşürülmesi bakımından SP-B ve SP-C proteinlerine benzemektedir ancak aynı zamanda, bağışıklık sistemindeki rolü ile SP-A ve SP-D proteinlerini andırmaktadır (Glasser et al., 2012).

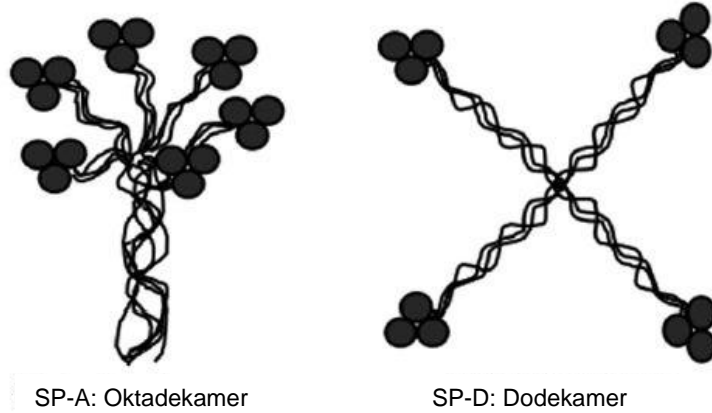
Sürfaktant proteinleri olan SP-A, B, C ve D; akciğer yüzey aktif maddesinin yapısında, fonksiyonunda ve metabolizmasında önemli görevler üstlenmektedirler. Bu dört önemli protein de Tip – II epitelyal hücreleri tarafından sentezlenmekte ve salgılanmaktadır. Toplam konsantrasyonları lipid konsantrasyonundan önemli ölçüde az olsa da, karışımın temel özelliklerinin sağlanmasında ve alveollerin çökmesinin önlenmesinde bu proteinlerin her birinin ayrı önemi bulunmaktadır ve dolayısıyla, temel özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir (Lyra et al., 2007).

#### **2.3.1.2.1. Hidrofilik Proteinler**

Hidrofilik proteinler olan SP-A ve SP-D, memeli lektinlerinin alt grubu olan kolektin grubuna aittir. Kolektinler suda çözünebilir proteinlerden oluşan ve karbonhidrat bağlayıcı karboksilik asit terminalli oligomerler ile NH<sub>2</sub> terminalli kolajen benzeri

kümeleşmeleri (domain) bir arada içeren yapılardır. Şekil 2.11'de görüldüğü gibi kolektin grubuna bağlı proteinler, şekilsel olarak buket formu (SP-A) ile haç formu (SP-D) olarak iki gruba ayrılırlar (Creuwels et al., 1997). Hidrofilik proteinlerin yapısal özellikleri, onlara kalsiyum, şeker ya da lipid moleküllerini çok güçlü bir şekilde bağlama yeteneğini kazandırır ve bu proteinlerin doğal bağışıklık sisteminde görev almasını sağlar (Crouch and Wright, 2001). SP-A ve SP-D proteinleri bakteri, virüs ve fungi ve daha birçok patojeni yapılarına bağlama özelliğine sahiptir. İnsan akciğeri yaklaşık 70 m<sup>2</sup>'lik yüzey alanı ile dış ortamla sürekli temas halindedir ve bu durum akciğerlerin sürekli olarak mikroorganizmalara maruz kalması anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, alveolar hava boşluklarında hidrofilik proteinlerin aktif olduğu bağışıklık sistemi, solunum için hayati olan steril koşulları sağlamakla yükümlüdür (Perez – Gil et al., 2006).

Yüzey aktif madde karışımının %5'ini oluşturan SP-A, karışımda miktarca en çok bulunan proteindir. 18 adet polipeptid zincirinin bir araya gelmesiyle oluşan, büyük ve kompleks yapıdaki SP-A, 248 tane amino asitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 28 – 36 kDa'dur. SP-A'nın yapısı 4 ana bölgeye ayrılabilir: aminotermal  $\alpha$  – heliks segmenti, üçlü – heliksli kangal kolajen segmenti, boyun bölgesi ve lektin içeren, C – tipi karbonhidrat tanıyıcı segment (Curley et al., 2001).



Şekil 2.11 SP-A ve SP-D proteinleri

SP-A proteini, yüzey geriliminin düşürülmesinde direk rol almazsa da, film oluşumunun ve yüzey aktivitesinin düzenlenmesinde görev almaktadır (Schürch et al., 1992).

Yapılan çalışmalara göre, SP-A, SP-B proteini varlığında alveol ara yüzeyine lipid adsorpsiyonunu, özellikle DPPC adsorpsiyonunu arttırmaktadır (van Golde, 1995). Ancak SP-A proteininin en önemli görevi yapısında akciğer yüzey aktif madde karışımını içeren tübüler miyelin yapısının oluşumuna katkıda bulunmaktır. SP-A eksikliği olan farelerde yapılan çalışmalarda, alveol sıvısında tübüler miyelin benzeri yapıların görüldüğü ancak bu yapıların geçici oldukları ve stabil olmadıkları belirlenmiştir (Korfhagen et al., 1996). SP- A proteininin alveollerdeki varlığı, özellikle yüzey aktif madde karışımı miktarının çok düşük olduğu ve prematüre bebeklerde görülen Solunum Zorluğu Sendromu (RDS) hastalığında ya da yüzey aktif madde karışımının serum proteinleri varlığında inaktive edilmesi gibi durumlarda çok önemlidir (Curley et al., 2001). Akciğer yüzey aktif madde karışımında bulunan diğer hidrofilik protein, SP-D proteinidir. Diğer proteinlerden farklı olarak SP-D'nin sadece küçük bir kısmı (<%10) yüzey aktif madde karışımındaki fosfolipidlerle bağlantılıdır ve SP-D üretimi sadece akciğerlere özgü değildir. Bu nedenlerden dolayı SP-D, tam olarak surfaktant proteinlerinden sayılmamaktadır (Persson et al., 1989). SP-A ve diğer kolektinler gibi aminoterminal segmenti, kolajen – benzeri domen, boyun bölgesi ve C – tipi lektin – benzeri karbonhidrat tanıyıcı kısım olmak üzere 4 ana bölgeden oluşan SP-D, 335 adet amino asit içermektedir ve moleküler ağırlığı 43 kDa'dur. SP-D proteini surfaktant karışımında yüzey aktivitesiyle ilgili fonksiyon göstermemekte, SP-A ile birlikte bağışıklık sisteminde görev almaktadır. SP-A ve SP-D proteinlerinin ana görevleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir (Creuwels et al., 1997).

Çizelge 2.2 SP-A ve SP-D proteinlerinin temel fonksiyonları

SP-A	SP-D
Tübüler miyelin oluşumunu sağlamak	Alveolar makrofajların aktive edilmesi
Tekli tabakaya fosfolipid adsorpsiyonunu sağlamak	Abakter mikroorganizmalara ve virüslere karşı koruma sağlamak
Fosfolipidlerin Tip-II hücreleri tarafından salgılanmasını ve alımını düzenlemek	Fosfatifilinositol metabolizmasında rol almak
Alveolar makrofajların aktive edilmesi	Bakterilerin kümeleşmesi
Bakterilerin ve virüslerin temizlenmesi	

### 2.3.1.2.2. Hidrofobik Proteinler

Hidrofobik surfaktant proteinleri B ve C; akciğerin fonksiyonunu yerine getirebilmesi ve stabilitesi için hayati önem taşıyan yapılardır. Daha önce belirtildiği gibi, 37°C'de lipidler esnek yapıya sahip değildir ve bu durum film oluşumunun yavaş olması ve yüzey aktif maddenin fonksiyonunu yeterince yerine getirememesi gibi sonuçlar doğurmaktadır. Bu proteinler, yüzey aktif madde karışımının adsorpsiyonunu ve yayılımını artırırken, karışımda bulunan ve yüzey geriliminin düşürülmesini sağlayan lipidlerin kararlılıklarını korunmasını sağlamaktadır (Whitsett et al., 2002). Yüzey geriliminin yeterince düşürülmesi ve optimum koşulların sağlanması, özellikle fosfolipidlerin, nötral lipidlerin, SP-B ve SP-C proteinlerinin bir arada bulunmasından kaynaklanmaktadır (Mulugeta et al., 2006). Her iki protein de alveol tip – II hücreleri tarafından salgılanmakta ve yüksek hidrofobik yapılarından dolayı olgun hallerinin tam olarak üretilmesi için özel hücre içi proseslerinden geçmektedirler (Beers et al., 1998; Voorhout et al., 1992). Aynı ayrı toplam yüzey aktif madde karışımının %1 – 1.5'ini oluştursalar da bu denli az miktarda olmalarına rağmen kritik görevlerde rol almaktadırlar (Weaver and Conkright, 2001). SP-B ve SP-C proteinlerinin ana görevleri Çizelge 2.3'de özetlenmiştir (Creuwels et al., 1997).

Çizelge 2.3 SP-B ve SP-C proteinlerinin temel fonksiyonları

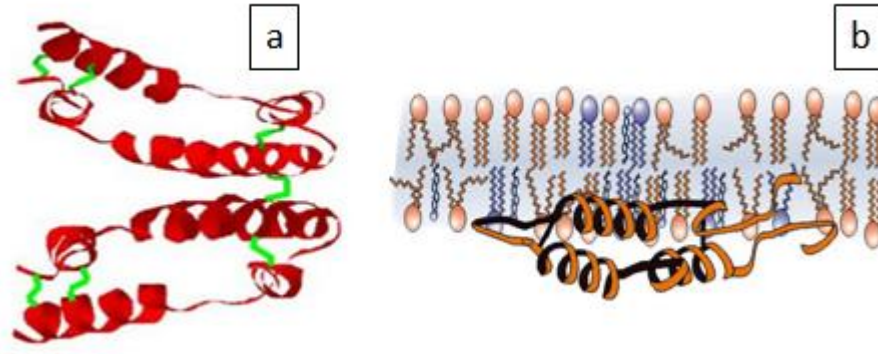
SP-B	SP-C
Fosfolipidlerin hava – sıvı ara yüzeyine hızlı bir şekilde girmesini sağlamak	Fosfolipidlerin hava – sıvı ara yüzeyine hızlı bir şekilde girmesini sağlamak
Tübüler miyelin oluşumunu sağlamak	Fosfolipid sıralamasını düzenlemek
Fosfolipid tabakasının moleküler olarak düzenlenmesine katkı sağlamak	

Surfaktant proteini B, 18 kDa moleküler ağırlığına sahip, pozitif yüklü (+7), disülfür köprüleri ile bağlanmış 2 adet özdeş polipeptid zincirinden, her bir polipeptid zinciri ise birçok amfifilik alfa helikslerinden oluşmaktadır (Şekil 2.12a). SP-B, 381 adet amino asitten oluşan bir öncül protein olarak sentezlenmekte, daha sonra trans – golgi ve lamellar cisimcik arasında hücre içi proseslerden geçerek dimerik yapıdaki 79 amino



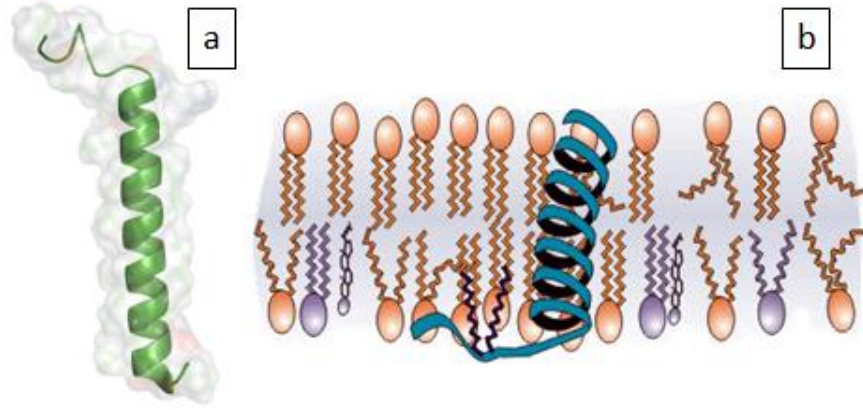
asitten oluşan aktif halini almaktadır (Haagsman et al., 2001). Yapılan çalışmalara göre kromozom 2'de mutasyonlar ya da SP-B miktarında azalma sonucunda yeni doğan bebeklerde ölümcül sonuçlar doğuran solunum hastalıkları meydana gelmektedir (Mingarro et al., 2008; Blanco and Perez – Gil, 2007). Bazı çalışmalar, SP-B'nin savunma mekanizmasında da görev aldığını ve bakterilerin öldürülmesine yardım ettiğini göstermektedir (Blanco and Perez – Gil, 2007). Dolayısıyla yaşamın sürdürülebilmesi için SP-B'nin varlığı kritiktir.

SP-B'nin en önemli fonksiyonu, yüzey aktif madde karışımındaki lipidlerin yüzey özelliklerini zenginleştirmektir. Geri yayılım ve tekli tabaka oluşumunun yavaş olması alveol düzenini bozmaktadır. SP-B ise fosfolipidlerin ara yüzeydeki tekli tabakaya yerleşmesini tetiklemekte ve yüzeyde film oluşumuna büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır. Katyonik yapıda olması, proteinin aktivitesi için ve eksi yüklü PG'lerle etkileşime girip ara yüzeye lipid adsorpsiyonunu arttırabilmesi için çok önemlidir (Yu and Possmayer, 1992; Camacho et al., 1996). Şekil 2.12(b)'de SP-B'nin ara yüzeydeki duruşu görülmektedir. SP-B, ara yüzeye paralel durmakta ve yüzeyde oluşan tekli tabakaya destek olarak tabakanın yıkılım basıncını arttırmaktadır. Bütün bunların yanı sıra, yüzey basıncı 40 – 45 mN/m'nin üzerine çıktığında, SP-B sayesinde ara yüzeyden kopan doymuş lipid miktarı çok az olmakta, kayıp lipidler ise yüzeyin tekrar genişlemesiyle yine SP-B sayesinde ara yüzeye tekrar dahil olabilmektedirler (Keough et al., 1998). SP-B'nin ortamda bulunması, özellikle jel – akışkan faz geçiş sıcaklığında tekli ya da ikili tabakaların düzenlenmesini arttırmaktadır. Bu özelliği artı yüklü SP-B'nin PG lipidlerinin baş gruplarıyla etkileşiminin bir sonucudur. 1 monomerik SP-B molekülü, 50-70 adet fosfolipid molekülünü etkileyebilmektedir. Ayrıca SP-A ile birlikte tübüler miyelin oluşturma özelliği SP-B'yi benzersiz kılmaktadır (Creuwels et al., 1997).



Şekil 2.12 SP-B proteininin yapısı (a), ve ara yüzeyde duruşu (b)

Yüzey aktif madde karışımında bulunan ve karışımın yüzey özelliklerini düzenleyen ve etkileyen hidrofobik proteinlerin ikincisi yapıca benzersiz olan SP-C proteindir (Şekil 2.13a). SP-C, diğer surfaktant proteinleri arasında sadece akciğere özgü olan tek proteindir ve ~4.2 kDa'lık moleküler ağırlığıyla diğer surfaktant proteinlerinin en küçüğüdür (Curley et al., 2001, Mulugeta et al., 2006). SP-C öncül proteini 197 adet amino asitten oluşmakta ve SP-B öncül proteiniyle birlikte aynı aşamalardan geçerek fosfolipidlerle birlikte lamellar cisimcikte saklanmaktadır. Olgun SP-C proteini yüksek derecede hidrofobiktir ve 35 adet amino asit içermektedir (Whitsett et al., 2002). 35 adet amino asitten yaklaşık 23 tanesi  $\alpha$  – heliks yapısını oluşturan hidrofobik karboksi-terminal bölümünde bulunurken, yaklaşık 12 adet amino asit ise hidrofilik amino kısmını oluşturur (Sieber et al., 1998). SP-C proteininin ara yüzeydeki duruşu Şekil 2.13(b)'de verilmiştir. Hidrofobik dizilerden oluşan ilk bölümün  $\alpha$  – heliks yapısı, DPPC ikili tabakası ile bağlantı kurma yeteneğine sahiptir. Bu kısmın uzun eksenini ara yüzeydeki lipidlerin alkil zincirlerine paralel olarak yerleşmektedir (Creuwels et al., 1997).

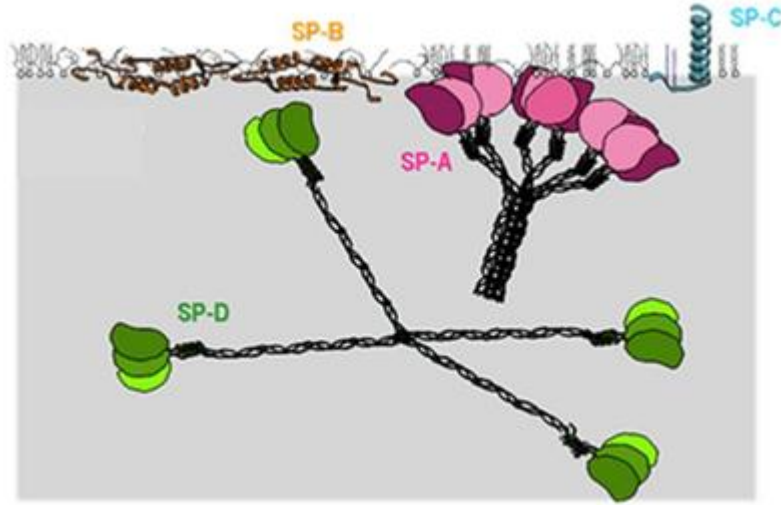


Şekil 2.13 SP-C proteininin yapısı (a), ve ara yüzeyde duruşu (b)

SP-C'nin esas fonksiyonu, lipid tabakasının biyofiziksel yüzey aktivitesini sağlamak ve nefes alma sırasında genişleme – daralmadan kaynaklanan yüzey değişimleri sırasında yüzey aktivitesini stabilize etmektir (McCabe et al., 2000). Ara yüzeye giren fosfolipid miktarını arttıran SP-C; SP-B'ye benzer olarak fosfolipid karışımlarına eklendiğinde, karışımın yayılabilme özelliğini ve kararlılığını arttırmaktadır (Whitsett et al., 2002). SP-C'nin ara yüzeyde bulunduğu düşünülmektedir, ancak 55 mN/m'den yüksek basınçlarda, yüzeyden ayrılmakta ve bir adet SP-C molekülüne karşılık 8-10 adet PC'yi beraberinde götürmektedir. Dolayısıyla SP-C, yüzeydeki tekli tabakanın kompozisyonunu doğrudan etkilemektedir (Taneva et al., 1994). Fosfolipidlerle SP-C karışımlarının özellikleri incelendiğinde, 1 SP-C molekülünün 20-35 lipid molekülüne bağlanabildiği ve bu sayede SP-C'nin lipid tabakalarının dizilimini ve sıkışabilirliğini düzenlediği bulunmuştur (Shiffer et al., 1993; Simatos et al., 1990). Canlı dışı çalışmalarda SP-C'nin yüzey gerilimini sıfıra kadar düşürebilme yeteneğine sahip olmasına ek olarak plazma proteinlerinin inhibe edici özelliklerine karşı koyabildiği de saptanmıştır (Ikegami et al., 1998).

Hidroforik proteinler, nefes alış-veriş döngüsü sırasında yüzeyin viskoelastik özelliklerini de düzenlemektedirler. SP-B yüzey tabakasının yanıl kararlılığını arttırarak yüzey gerilimini düşürürken, SP-C, yoğunlaşmış DPPC tabakasının esnekliğini arttırmakta ve böylece DPPC'nin kötü histeresis davranışını düzeltmektedir. Floresans özelliği taşıyan boyayla yapılan çalışmalarda proteinlerin varlığında yoğunlaşmış fazların daha homojen yayıldıkları ve bu sayede yüksek

basınçlarda tekli tabakanın dinamik ve esneklik özelliklerinin geliştiği gözlenmiştir. SP-B ve C'nin surfaktant lipidleriyle olan etkileşimleri, daha önce de belirtildiği gibi bu proteinlerin hidrofobik yapılarından kaynaklanmaktadır. Yüzey aktif madde karışımındaki PG ile proteinler arasında, proteinlerin katyonik yapıları sayesinde elektrostatik etkileşim oluşmaktadır (Keough et al., 1998). DPPC ve PG'den oluşturulan lipozomlar ile yapılan hücre dışı çalışmalarda her iki proteinin de lipidlerin yüzeye yayılma özelliklerini ve tekli tabaka oluşturma yeteneklerini arttırdığı; ancak SP-B'nin bu özellikleri yerine getirmede, SP-C'den daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu özelliklerin dışında hidrofobik proteinlerin sisteme yaptığı önemli bir diğer katkı, surfaktant karışımında bulunan lipidlerin kan proteinleri tarafından inaktive edilmesini önlemektir (McCabe et al., 2000). Şekil 2.14, akciğer yüzey aktif madde karışımında bulunan proteinlerin ara yüzeye yerleşimlerini bir arada göstermektedir.



Şekil 2.14 Akciğer yüzey aktif madde karışımında bulunan proteinlerin yerleşimleri

İçerdiği bileşenlere ve bu bileşenlerin sağladığı özelliklerine bakıldığında oldukça kompleks bir yapıya sahip olduğu görülen akciğer yüzey aktif maddesinin özelliklerini koruyabilmesi ve görevini eksiksiz olarak yerine getirebilmesi, nefes alış verişinin ve dolayısıyla yaşamın sağlıklı bir biçimde sürdürülebilmesi için büyük öneme sahiptir (Perez-Gil et al., 2006).

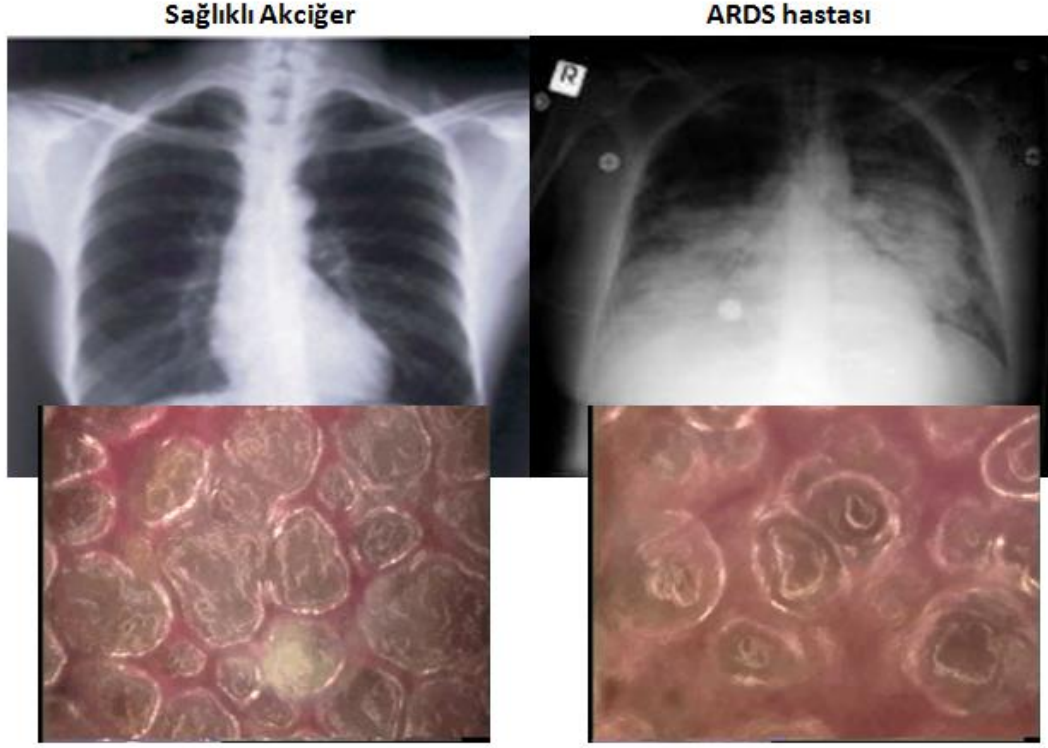
### **2.3.2. Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımı ile Bağlantılı Solunum Sendromları**

Akciğer yüzey aktif madde karışımının eksikliğinde, ya da karışım çeşitli etmenler tarafından geri dönüşümsüz olarak zarar gördüğü durumlarda çeşitli solunum sendromları ortaya çıkmaktadır. Birçok çeşidi olan solunum sendromları, surfaktant karışımının çalışma mekanizmasında aksaklıklara yol açmakta ve karışımın işlevini kaybetmesi yani inaktive olması nedeniyle ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Haitsma et al., 2001). Yüzey aktif madde karışımı ile birincil derecede bağlantısı bulunan ve tedavi açısından en sorunlu hastalıklar Yeni Doğan Solunum Zorluğu Sendromu (NRDS ya da RDS) ve Yetişkin Solunum Zorluğu Sendromudur (ARDS).

RDS, prematüre doğan bebeklerde akciğerlerin tam olarak gelişmemesi ve alveollerde yüzey aktif madde karışımının sentezlenememesi sonucu oluşan ve ölümcül nitelikte bir hastalıktır (Robertson et al., 2000). Yüzey aktif madde sentezi bebeklerde anne karnında 24. haftada başlar ve hamileliğin 32. haftasında sona erer. Dolayısıyla 32 haftadan erken doğan bebeklerde görülen RDS, surfaktant karışımının tam olarak sentezlenememesi sonucunda özellikle toplam fosfolipid, DPPC, PG ve SP-A konsantrasyonlarındaki düşüklük ve alveollerde yüksek yüzey gerilimi ile karakterize edilmektedir (McCabe et al., 2000). Sağlıklı doğan bebeklerin ciğerlerinde yaklaşık 100 mg/kg yüzey aktif madde karışımı bulunurken, prematüre bebeklerde bu miktar 5 mg/kg'dan daha düşüktür (Zuo et al, 2008). RDS nedeniyle ölen bebeklerin akciğerlerinde tübüler miyelin dışındaki bütün bileşenler bulunmaktadır. Tübüler miyelin özellikle SP-A ve SP-B üretimi için kritiktir ve erken doğum durumunda, bu proteinler ya fonksiyon göstermezler, ya da sentezlenememişlerdir (deMello et al., 1993). Son yıllarda RDS'den kaynaklanan ölüm oranı, akciğerlere doğrudan uygulanan yüzey aktif madde karışımları sayesinde düşük seviyelere indirilmiş ve tedavide yüksek oranda başarı sağlanmıştır (Zasadzinski et al., 2001). Ancak kullanılan surfaktant karışımları genellikle inek/buzağı ya da domuzların akciğerlerinden özütlenmektedir ve dolayısıyla hayvansal kaynaklıdır. Bu durumda özütlenen karışım; kontaminasyon içerme ve virüs taşıma riski, elde edilen her özütün birbiriyle aynı olmaması, içeriğinde farklılık göstermesi ve doğal yüzey aktif madde bileşenlerinin karışımdan izole edilmesinin pahalılığı gibi negatif yönleri sahiptir

(Aydoğan et al., 2011). Belirtilen tüm bu sebeplerden dolayı günümüzde tedavi için sentetik yüzey aktif madde üretimi ve kullanımı sıklıkla araştırılan ve geliştirilmesi beklenen bir konudur.

Yetişkin solunum zorluğu sendromu, RDS ile kıyaslandığında sadece yüzey aktif madde karışımı eksikliğinden değil, daha kompleks nedenlere dayanan ve RDS'ye göre daha yüksek ölüm riski taşıyan bir hastalıktır (Zasadzinski et al., 2001). Sepsis, zatüree, akut pankreatit, travma, ağır yaralanma, akciğerde ödem, şok ya da sigara dumanına maruz kalma gibi durumlarda ortaya çıkan ARDS, her yaş grubunda görülme riski taşımaktadır (Gregory et al., 1991). ARDS sonucunda, Tip – II hücrelerinin yüzey aktif madde üretme yeteneği düşmekte ve akciğerlerde toplam PC, DPPC ve PG miktarında azalmanın yanı sıra, SP-A, SP-B ve SP-C miktarlarında da önemli seviyede düşme görülmektedir. Bu durum da sağlıklı ciğerlere kıyasla hastalıklı akciğerde yüzey geriliminin yüksek olmasına neden olmaktadır. (McCabe et al., 2000). ARDS sonucunda, kişinin akciğer ve alveolleri bir zaman sonra oksijensiz kalmakta ve hasta hayatını kaybetmektedir. Şekil 2.15'te sağlıklı ciğer filmi ve alveoller ile ARDS'ye sahip hastanın ciğer filmi ile alveolleri görülmektedir. ARDS nedeniyle görülen ölüm oranı %36 ile %60 arasında değişmekte ve bu oran, hastalığın ne kadar tehlikeli olduğunu açıkça göstermektedir (Garber et al., 1996). Günümüzde ARDS için spesifik ve kesin bir tedavi hala geliştirilememiş; RDS ile birçok semptomu yakın olsa da kullanılan surfaktant tamamlayıcı ilaçlar beklenen etkiyi yerine getirememişlerdir. RDS için kullanılan en etkili ilaçlarla yapılan çalışmaların sonucunda görülen iyileşme miktarı hem çok az, hem de geçici olmuştur ve bu durum da ARDS'nin sadece surfaktant eksikliğinden değil; hem vücuttaki yüzey aktif madde karışımını, hem de dışarıdan tedavi amacıyla verilen surfaktantı işlemez hale getiren bir mekanizma sonucu olduğunu göstermektedir (McIntyre et al., 2000). Akciğer yüzey aktif maddesinin işlevini yitirerek yüzey gerilimini düşürme görevini yerine getirememesi durumu 'surfaktant inaktivasyonu' olarak adlandırılmaktadır (Lu, Taeusch and Robertson et al., 2000).



Şekil 2.15 Sağlıklı bir insanın ve ARDS hastasının akciğer filmi ve alveolleri (Halter et al., 2007).

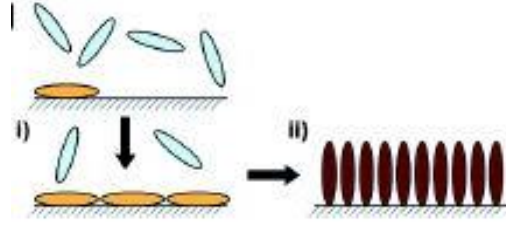
### 2.3.2.1. Sürfaktant İnaktivasyonu ve Serum Proteinleri

ARDS hastaları arasında yapılan araştırmalarda, hastalarda akciğer yüzey aktif maddesinin eksikliği ve özelliklerini yitirmesinin yanı sıra, alveol sıvılarındaki serum protein miktarının yükselmiş olduğu belirlenmiştir. Plazma proteinlerinin alveol boşluğuna sızmaları ARDS'de sıklıkla görülen bir durumdur. Akut yaralanmalar sonucunda dokularda endotel ve epitelyum membranlarının geçirgenliği artmakta ve plazma proteinleri alveollere yüksek konsantrasyonda dolmaktadır (Holter et al., 1986). Örneğin, serum proteinlerinden olan albumin miktarı bir referansta sağlıklı bir insanda 5 mg/mL iken, ARDS'li hastada bu miktar yaklaşık 25 mg/mL'ye yükselmiştir (Ishizaka et al., 2004). Serum proteinlerinin alveol boşluğuna sızmaları ve hava-sıvı ara yüzeyine adsorbe olmaları sonucu yüzey aktif madde karışımının adsorpsiyonuna karşı sterik ve elektrostatik enerji bariyerleri oluşturmakta; oluşan bariyerler karışımın ara yüzeye taşınımını inhibe etmekte ve adsorbe olan surfaktant miktarını azaltmaktadır. Ara yüzeyde yeterli miktarda surfaktant bulunmaması sonucunda ise

normal nefes alış-verişi için gereken koşullar oluşturulamamakta ve solunum zorlaşmaktadır (Stenger et al., 2008). Serum proteinleri alveole sızdığında, ara yüzey sistemde sadece akciğer yüzey aktif maddesi bulunduğunda ulaştığı maksimum basınca gelebilmek için daha fazla sıkışmaya ihtiyaç duyar. Bunun nedeni yüzeyden ayrılan proteinlerle birlikte yüzeyde varolan yüzey aktif maddenin de kaybolmasıdır. Ancak, ne kadar sıkışsa da yüzey hiçbir zaman normal alveolün ulaştığı düşük yüzey gerilimi değerine ulaşamaz ve nefes almak zorlaşır. İnhibitör olarak adlandırılan ortamdaki serum proteinleri, ara yüzeye surfaktant karışımından çok daha hızlı adsorbe olmakta ve yüzeyi kaplamakta ve surfaktant karışımının adsorpsiyonunu durdurmakta ya da yavaşlatmaktadırlar. Serum proteinleri ile akciğer yüzey aktif madde karışımındaki PG, PS ve yağ asitleri negatif yüklüdür. Negatif yükten doğan elektrostatik tabaka surfaktant kümelerini yüzeyden uzak tutan ekstra bir kuvvet oluşturmaktadır. Normalde, anyonik yüzey aktif lipidler, katyonik SP-B ve SP-C ile bir arada bulunmaktadırlar. Yüzeyde sadece surfaktant tabakası bulunduğunda, alt fazdaki kümelerle ara yüzey arasındaki etkileşim çekme şeklinde olurken, ara yüzeyde serum proteinleri bulunurken bu etkileşim itme haline dönmektedir. Böylece yüzey aktif madde karışımı yüzeye adsorbe olamamaktadır (Zasadzinski et al., 2005; Kim and Franses, 2006).

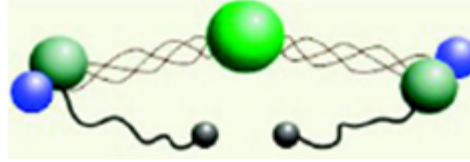
Yüzey aktif serum proteinlerinin yarattığı surfaktant inaktivasyonu, yüzey aktif madde karışımının işlevini yitirmesine ve ARDS'nin ciddi boyutlarda ilerlemesine neden olmaktadır (Gupta et al., 2000). Dolayısıyla, proteinlerin adsorpsiyon karakteristiklerinin ve özelliklerinin bilinmesi, onların ara yüzeye adsorpsiyonlarının engellenmesi ya da minimize edilebilmesi için önemlidir. Protein adsorpsiyonunun 3 ayrı aşamadan oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 2.16). İlk aşama, proteinlerin difüzyonla ara yüzeyin hemen altındaki alt-yüzeye gelmeleridir. Daha sonra ara yüzeye adsorbe olabilmek için ortamda oluşan enerji bariyerlerini yenerek üçüncü aşamada belirli konformasyonlarda ara yüzeye yerleşmektedirler (Hernandez and Franses et al., 2003).





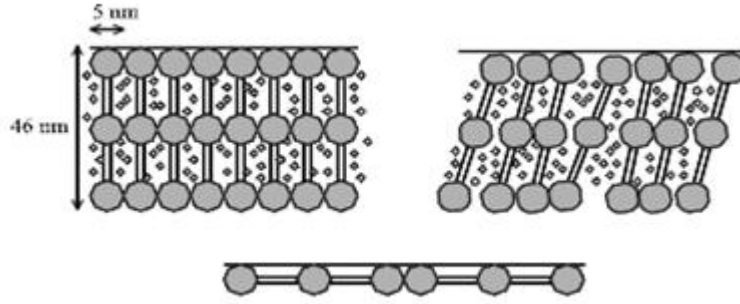
Şekil 2.16 Proteinlerin ara yüzeye adsorpsiyon basamakları

Surfaktant inaktivasyonunda serum proteinlerinden en güçlü etkiyi sırasıyla fibrin monomerleri > fibrinojen > hemoglobin > albumin yapmaktadır (Gupta et al., 2000). Bu sıralamaya bakıldığında, kandaki en problematik proteinin fibrin oluşumunun da yapıtaşı olan fibrinojen olduğu görülmektedir. Fibrinojen, molekül ağırlığı 340 kDa olan, 2 kollu büyük bir glikoproteindir. Her bir kolunda  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere ve birbirlerine disülfid bağları ile bağlı 3 adet polipeptid zinciri bulunmaktadır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Fibrinojen proteini

Esnek bir molekül olan fibrinojen, üç-düğümlü (trinodular) bir yapıya sahiptir ve boyutları 47 x 5 x 5 nm olarak belirlenmiştir. Plazmada 2.6 -3 mg/ml'lik konsantrasyonu ile en çok bulunan 3. protein olmasına karşın, daha önce de belirtildiği gibi surfaktant inaktivasyonunda en önemli inhibitör fibrinojendir (Wasilewska et al., 2009). Net yükü negatif olan ve oldukça yüksek yüzey aktivitesi gösteren fibrinojen yüzey gerilimini hava – su ara yüzeyinde hızlı bir şekilde ~50 mN/m'ye kadar düşürebilmektedir (Kim et al., 2007). Fibrinojenin ara yüzeyde alabileceği konformasyonlar Şekil 2.18'de gösterilmiştir.



Şekil 2.18 Fibrinojen proteininin ara yüzeyde aldığı konformasyonlar

Birçok yüzey aktif madde, ortamdaki protein konsantrasyonu 500 ppm'den daha düşük olsa bile protein varlığından etkilenmektedirler. Dolayısıyla serum proteinlerinin, özellikle fibrinojen ve albuminin, inhibe edici özelliğine karşı direnç gösterebilecek özelliklere sahip bir sentetik surfaktant, ARDS tedavisi için kritik öneme sahip olacaktır (Hernandez et al., 2002).

### 2.3.2.2. Tedavide Kullanılan İlaçlar ve Geliştirilen Karışımlar

Klinik surfaktant tedavisi yaklaşık 30 yıl önce, Fujiwara ve arkadaşlarının prematüre bebeklere, buzağı akciğerlerinden özütlenerek modifiye edilmiş surfaktant terapisini başarıyla uygulamasıyla başlamıştır ve günümüzde RDS tedavisi için standart bir tedavi olarak uygulanmaktadır. Bu tedavinin başarılı olmasıyla birlikte birçok klinik surfaktant geliştirilmiştir. Bu karışımlar, sahip olduğu protein miktarlarına göre 'birinci nesil protein içermeyen sentetik surfaktantlar', 'basit yapıda peptid ya da rekombine protein analogu içeren yeni nesil sentetik surfaktantlar', ve 'hayvansal kaynaklı modifiye edilmiş doğal surfaktantlar' olarak 3 gruba ayrılmaktadır. Ancak, protein içermeyen grup düşük performansı ve zayıf biyofiziksel özellikleri yüzünden kullanılmazken, peptid içeren sentetik surfaktantlar geliştirilmeyi beklemektedir. Bu gruplar içerisinde günümüzde tedavi amacıyla kullanılanı, hayvanlardan özütlenen karışımlardır (Zhang et al., 2011).

Günümüzde en çok kullanılan hayvansal kaynaklı surfaktantlar; Survanta<sup>®</sup>, Curosurf<sup>®</sup> ve Infasurf<sup>®</sup>'tür. Bu karışımlardan Survanta<sup>®</sup> inek akciğerinden, Curosurf<sup>®</sup> domuz akciğerinden ve Infasurf<sup>®</sup> ise buzağı akciğerler lavajlarından organik çözücüyle

özütlenmektedir. Her birinin lipid bileşiminde ana madde DPPC olsa da bileşimleri birbirinden farklıdır. Dolayısıyla ara yüzey özelliklerinde de farklılıklar bulunmaktadır. Bu ilaçlar kullanılıyor olsa da, hala lavajdan doğrudan alınan doğal akciğer yüzey aktif madde karışım kadar etkili işleyen bir surfaktant bulunamamıştır (Zasadzinski et al., 2010). Kullanılmakta olan surfaktant karışımlarının detaylı bileşimi ve sentetik karışımlarla karşılaştırılması Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4 Doğal, modifiye edilmiş ve sentetik surfaktantların içerikleri

Genel Adı	DPPC	DPPC: POPG (7:3)	Beractant	Poractant alfa	Calfactant	BLES	BNS
Ticari Adı	-	-	SURVANTA®	CUROSURF®	INFASURF®	BLES®	-
Kaynak	Sentetik	Sentetik	Sığır akciğeri	Domuz akciğeri	Buzağı akciğer lavajı	Sığır akciğer lavajı	Sığır akciğer lavajı
Fosfolipidler	100	100	84	99	91	96	85
PC/DPPC	100/100	70/70	71/50	69/47	79/43	77/41	69/36
PG	0	30	2.4	1.2	4.5	13	10
PE	0	0	3.4	4.5-7.4	2.8	2.6	3.0
PI+PS	0	0	1.3	4.5-8.4	4.0	1.0	2.0
LPC	0	0	1.5	1.0-7.0	<1.0	0.9	0.2
SM	0	0	3.4	1.8-7.9	0.8	1.4	2.0
Nötral Lipidler							
Kolesterol	0	0	<0.2	0	5-8	2-3	5-8
Serbest Yağ Asitleri	0	0	5.8-14	bilinmiyor	0.64	bilinmiyor	0.25
Hidrofilik Proteinler (SP-A)	0	0	0	0	0	0	8.0
Hidrofobik Proteinler	0	0	0.94	1.1	1.6-2.2	2.0	2.0
SP-B	0	0	0.04	0.4	0.9	0.5	1.0
SP-C	0	0	0.9	0.7	0.7-1.3	1.5	1.0

Hayvanlardan elde edilen dış kaynaklı surfaktant karışımlar, yüksek üretim ve saflaştırma maliyetleri, örnekten örneğe değişebilen içeriği ve patojen geçiş riski ile yerlerini sentetik karışımlara bırakmaya başlamışlardır. Ancak, geliştirilen daha ucuz maliyetli sentetik karışımlar beklenen etkiyi gösterememişlerdir. Bunun nedeninin karışımlardaki hidrofobik surfaktant protein eksikliğinin olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, günümüzde ihtiyaç duyulan sentetik karışımların güvenilir, maliyeti düşük ve hidrofobik surfaktant proteinleri ile akciğer yüzey aktif madde karışımındaki lipidleri taklit edip, doğal karışımın biyofiziksel işlevini yerine getirebilme yeteneğine sahip karışımlar olması beklenmektedir (Seuryneck-Servoss et al., 2007).

Klinik olarak onay almış ilk sentetik surfaktant, DPPC, hegzadekanol ve iyonik olmayan bir surfaktant olan tyloxapol'un karışımından oluşan Exosurf®'tür. Ancak Exosurf® yapısında herhangi bir akciğer yüzey aktif madde karışımına özgü protein içermemektedir (Zasadzinski et al., 2010). Survanta® ile Exosurf®'ün karşılaştırıldığı bir çalışmada, Exosurf®'ün ancak ortama SP-B ve SP-C apoproteinleri eklendikten sonra adsorpsiyon özelliklerini geliştirebildiği, yüzey ve fizyolojik aktivitenin iyileştirilmesinde SP-B ve C'nin hegzadekanol ve tyloxapol'den çok daha etkin olduğu kanıtlanmıştır (Hall et al., 1992). Geliştirilen bir diğer sentetik surfaktant –Surfaxin-DPPC, palmitoyl-oleoyl fosfatidil gliserol (POPG), palmitik asit ve Sinapultide'nin birleşiminden oluşmaktadır. Sinapultide, molekül yapısı sayesinde SP-B nin amfifilik kısımlarından birini taklit edebilen sentetik bir peptiddir. KL4 olarak da adlandırılan bu yapı, fosfolipidlerle hidrofobik ve elektrostatik olarak etkileşime girmekte ve böylece SP-B gibi davranarak ara yüzeydeki fosfolipid dizilimini düzenleyebilmektedir. Yapılan çalışmalara göre Surfaxin; surfaktant inaktivasyonuna karşı hayvansal kaynaklı olan Survanta® ve Curosurf®'ten daha etkili sonuç vermektedir (Lacaze-Masmonteil, 2003). Yapılan başka bir çalışmada, Exosurf®, Survanta®, Curosurf® ve Alveofact® surfaktantlarının ara yüzey özellikleri incelenmiş ve içeriğinde hidrofobik SP-B ve SP-C'yi içeren Curosurf® ve Alveofact®'in diğerlerine kıyasla yüzeye daha hızlı adsorbe olduğu ve yüzey gerilimini daha fazla düşürdüğü kanıtlanmıştır (Lalchev et al., 2004).

Yeni doğan buzağı akciğer lavajından elde edilen Infasurf® ise Curosurf®'ten farklı olarak yüksek oranda kolesterol içermektedir. Kolesterol, membran ve fosfolipid tabakalarının faz davranışları üzerinde etkilidir. Yapılan çalışmalar Infasurf®'ün yüksek kolesterol oranı sayesinde diğer hiçbir karışımda bulunmayan şekilde birden fazla fazı bir arada bulundurduğunu göstermiştir (domain-in-domain). Ayrıca, Çizelge 2.4'te görüldüğü gibi SP-B oranı en yüksek olan karışım Infasurf®'tür (Zhang et al., 2011). SP-B'nin ara yüzey özelliklerini düzenlemede, geri yayılımın sağlanmasında ve yüksek basınçlarda film tabakasının kararlılığının korunmasında büyük rolü olduğu düşünüldüğünde, Infasurf®'le elde edilen sonuçların daha etkili olması beklenmektedir (Zuo et al., 2011). Bebekler üzerinde yapılan bir çalışmada, Infasurf® kullanılan grup için dozlar arasındaki sürenin Survanta®'ya göre daha uzun olduğu yani, tedavi etkisinin daha uzun sürdüğü belirlenmiş ve Infasurf®'le tedavi edilmeye çalışan

hastaların Survanta®'ya göre tedaviden daha fazla yararlanabildiği bildirilmiştir (Bloom et al., 1997). 42 ARDS hastası çocukla yapılan başka bir araştırmada ise Infasurf® kullanımı ile oksijen alınımında hızlı bir gelişme, mekanik solunum süresinde kısalma gibi pozitif etkiler görülmüştür (Günther et al., 2001). Kullanımı en yaygın karışımların biyofiziksel özellikleri Çizelge 2.5'te listelenmiştir.

Çizelge 2.5 Infasurf®, Curosurf® ve Survanta®'nın biyofiziksel özellikleri

<b>Biyofiziksel Özellikleri</b>	<b>Infasurf® (calfactant)</b>	<b>Curosurf® (poractant alfa)</b>	<b>Survanta® (beractant)</b>
<b>Minimum yüzey gerilimine ulaşmak için gereken süre</b>	2 dakika	10 dakika	15 dakika
<b>Minimum dinamik yüzey gerilimi</b>	0 mN/m	0 mN/m	4 mN/m
<b>Gereken minimum konsantrasyon</b>	1 mg/ml	2 mg/ml	2 mg/ml

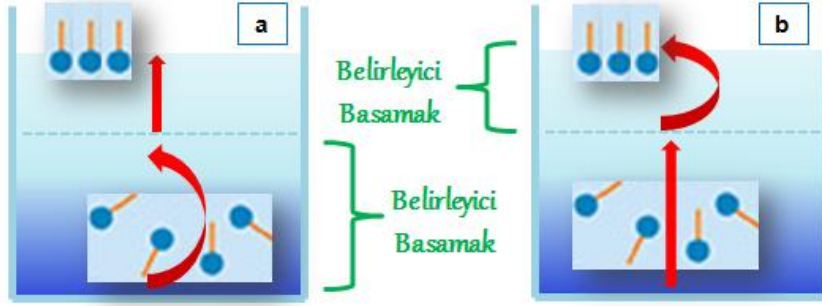
Surfaktant tedavisinde umut verici birçok gelişme görülse de ARDS için hala net bir çözüm bulunamamıştır. ARDS, RDS ile birçok ortak belirti gösterse de, RDS için kullanılan ilaçlar, ARDS için denendiğinde kesin tedaviye ulaşamamıştır. Çünkü ARDS'nin mekanizması RDS'ye göre çok daha kompleksdir (Stenger et al., 2008).

Surfaktant inaktivasyonu, fibrinojen ya da diğer yüzey aktif serum proteinlerinin ortamda bulunması ve ara yüzeyi işgal etmelerinin sonucunda oluşmaktadır. Etkin bir yüzey aktif madde, ara yüzeye hızlı adsorbe olabilmeli ve yüzey gerilimini istenen değerlere düşürebilmelidir. Alveol boşluğuna sızan kan proteinlerinin adsorpsiyon hızı, akciğer yüzey aktif madde karışımından daha fazla olduğu için, proteinler ara yüzeye daha çabuk ulaşır ve yerleşir. Bu durum, ortamda bulunan moleküllerin protein inaktivasyonuna uğramamaları için adsorpsiyon kinetiklerinin ve dinamik adsorpsiyon konseptinin ne kadar kritik olduğunun bir göstergesidir (Stenger et al., 2009).

## 2.4. Dinamik Adsorpsiyon ve Difüzyon Katsayısının Hesaplanması

İçinde yüzey aktif madde içeren bir çözeltide yeni oluşmuş ara yüzeyin başlangıçtaki yüzey gerilimi,  $\gamma_0$ , saf çözücünün yüzey gerilimine neredeyse eşittir. Sürfaktant molekülleri zamanla yüzeye adsorbe oldukça, yüzey geriliminde azalma görülür ve en sonunda  $\gamma$  denge değerine ulaşır ( $\gamma_{eq}$ ). Ancak denge değeri, surfaktantın tipi ve konsantrasyonuyla birebir ilişkilidir ve bu değere hemen ulaşamaz. Dinamik adsorpsiyon yani yüzey geriliminin zamanla ilişkisi, birçok proste kullanılan önemli bir parametredir ve kontrolünün en kritik olduğu sistemlerden biri de dinamik bir sistem olan solunumun gerçekleştiği alveollerdir. Aslında, içinde yüzey aktif madde bulunan herhangi bir proses için dinamik adsorpsiyon önemli bir özellik haline gelir. Adsorpsiyon süresince surfaktant molekülleri ilk olarak yığın fazdan alt faza difüze olurlar ve daha sonra ara yüzeye transfer olup, kendileri için en uygun olan oryantasyonu alırlar (Eastoe and Dalton, 2000). Sürfaktant monomerlerinin ara yüzeye taşınımı ve adsorpsiyonu için 2 ana model önerilmiştir (Şekil 2.19):

- 1) Difüzyon kontrollü model; monomerlerin yığın fazdan alt faza difüze olduğunu ve alt faza geldiği zaman doğrudan ara yüzeye adsorbe olduklarını varsayar. Bu modelde kısıtlayıcı, yani prosesi kontrol eden basamak, yığın fazdan alt faza difüzyon basamağıdır ve altfazdan ara yüzeye adsorpsiyon çok kısa sürede gerçekleşir.
- 2) Kinetik – Difüzyon karışık kontrollü model; monomerlerin yığın fazdan alt faza difüze olduğunu ancak hız – belirleyici, kısıtlayıcı basamağın monomerlerin ara yüzeye taşınması olduğunu varsayar. Bu modele göre, monomer alt faza difüze olduğunda, ortamda monomerin ara yüzeye adsorpsiyonunu engelleyici bir adsorpsiyon bariyeri (örneğin sterik etki) bulunmaktadır. Bu durumda molekül ara yüzeye adsorbe olmak yerine, yığın faza geri dönmeyi tercih eder ve adsorpsiyon sürecini uzatır.



Şekil 2.19 Dinamik adsorpsiyonda surfaktant monomerlerinin ara yüzeye taşınım modelleri: Difüzyon kontrollü model (a), Kinetik - difüzyon karışık kontrollü model (b).

Ward ve Tordai, yüzey geriliminin ilk andaki değeri ( $\gamma_0$ ) ve dengeye yaklaştığı zamanki ( $\gamma_{eq}$ ) limitleri kullanarak difüzyon kontrollü sistemde adsorpsiyon prosesini ve yüzey geriliminin zamanla değişimini tanımlayabilmek için bir takım yaklaşımlarla, yüzey geriliminin kısa zamanda ve uzun zamanda olmak üzere değişimini matematiksel olarak incelemişlerdir.

Kısa zamanlarda;

$$\gamma_{t \rightarrow 0} = \gamma_0 - 2nRTC\sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad (2.3)$$

Uzun zamanlarda;

$$\gamma_{t \rightarrow \infty} = \gamma_{eq} + \frac{nRT\Gamma^2}{C}\sqrt{\frac{\pi}{4Dt}} \quad (2.4)$$

Ward ve Tordai Denkliği olarak adlandırılan Eşitlik 2.3 ve 2.4'te  $C$ ,  $\Gamma$  ve  $D$  sırasıyla yığın faz konsantrasyonunu, yüzey artık konsantrasyonu ve yüzey aktif madde monomerinin difüzyon katsayısını göstermektedir. İyonik surfaktantlar için  $n = 2$ , iyonik olmayan surfaktantlar için ise  $n = 1$  olarak alınmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar, üretilen bu modelin kısa zamanlar için geçerli olduğu ancak uzun zamanlarda eşitlikten sapmalar oluştuğunu göstermiştir. Bu durumda difüzyon

kontrollü modelde eşitliklere uymayan sistemlerde monomerlerin alt faza geldikten hemen sonra değil de, ancak belirli bir enerji bariyerini aştıktan sonra ara yüzeye adsorbe olduğu anlaşılmıştır. Ara yüzeye adsorbe olabilmek için surfaktant monomerinin artan yüzey basıncına karşı bir iş yapması gerekmektedir. Çünkü basınç arttıkça alt fazdaki her monomer değil, sisteme özgü olan aktivasyon enerjisinden daha büyük enerjisi olan monomerler adsorbe olabileceklerdir. Bu enerji bariyeri,  $\varepsilon_a$ , içinde elektrostatik itme kuvvetlerini yenmek için gerekli enerji, ve daha önce ara yüzeye adsorbe olmuş surfaktantların baş gruplarından kaynaklanan etkiyi de barındırmaktadır (Jiang et al., 2006). Liggieri ve Ravera, ara yüzeydeki bu kinetik bariyerine Ward ve Tordai Denkliğini baz alarak yeni bir yaklaşım getirmişlerdir. Renormalize edilmiş difüzyon katsayısını tanımlayarak monomerlerin hem alt faza difüzyonunu hem de enerji bariyerini aşmalarını hesaba katmışlardır ve ayrıca görünür difüzyon katsayısını ( $D_a$ ) tanımlayarak da onu  $D$ 'ye Arrhenius tipi bir denklemlerle bağlamışlardır (Ravera et al., 1993).

$$D_a = \frac{D^{*2}}{D} = D \exp(-\varepsilon_a/RT) \quad (2.5)$$

Bu tanımlamayla birlikte Ward ve Tordai Denkliğinin yeniden düzenlenmiş hali kısa ve uzun zamanlar için sırasıyla Eşitlikler 2.6 ve 2.7'deki gibi olmaktadır:

$$\gamma_{t \rightarrow 0} = \gamma_0 - 2nRTC \sqrt{\frac{D_a t}{\pi}} \quad (2.6)$$

$$\gamma_{t \rightarrow \infty} = \gamma_{eq} + \frac{nRT\Gamma^2}{C} \sqrt{\frac{\pi}{4D_a t}} \quad (2.7)$$

Eşitlik 2.5 ve 2.7 beraber kullanıldığında,  $\varepsilon_a$ , uzun zamanlar için elde edilebilir (Jiang et al., 2006).

Örneğin, literatürde yapılan bir çalışmada, anyonik bir surfaktant olan  $C_{9p}PHCNa$  ile ticari olarak kullanılan katyonik  $C_{10}TABr$ 'in farklı oranlardaki ikili karışımları için

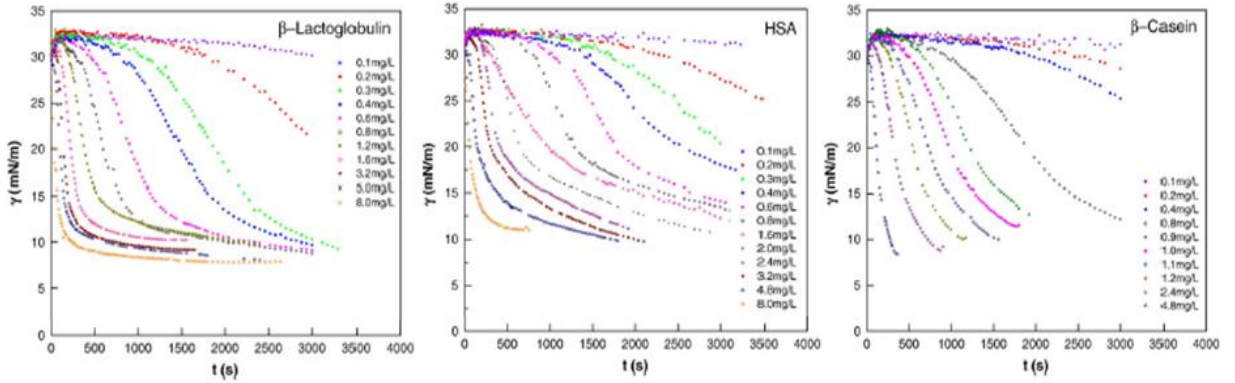


dinamik adsorpsiyon ölçümleri yapılmış ve ikili karışımların difüzyon katsayısı kısa ve uzun zaman denklikleri kullanılarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada adsorpsiyon bariyeri de Eşitlik 2.5 kullanılarak elde edilmiştir. Hesaplamalar için öncelikle farklı konsantrasyonlarda zamana bağlı olarak yüzey gerilimi ölçümleri alınmış, daha sonra kısa zamanlı davranışın incelenebilmesi için yüzey geriliminin zamanın kareköküne karşı değişimi grafiğe geçirilmiştir. Grafiğin eğimi Eşitlik 2.6'da yerine yerleştirilmiş ve böylece  $D_a$  hesaplanmıştır. Uzun zamanlardaki dinamik adsorpsiyon davranışının incelenebilmesi için ise Eşitlik 2.7'ye göre, yüzey gerilimi zamanın karekökü ile ters orantılı olarak grafiğe geçirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen  $D_a$  değerleri  $10^{-10}$   $m^2/s$  mertebesinde dir. Grafik eğiminden uzun zamanlar için de  $D_a$  hesaplanmış ve uzun zamanlarda elde edilen  $D_a$  değerinin kısa zamanlardakine oranla çok daha küçüldüğü sonucuna varılmıştır. Bunun nedeninin adsorpsiyon bariyeri olduğu düşünülmektedir. Adsorpsiyon bariyeri Eşitlik 2.5'e göre sıcaklıkla ters orantılı olarak değişmektedir. Dolayısıyla, farklı sıcaklıklar için difüzyon katsayısı bulunmuş ve bu değerler  $1/T$  değerlerine karşılık grafiğe geçirilerek, grafiğin eğiminden adsorpsiyon bariyeri ortalama 15 kJ/mol olarak hesaplanmıştır (Jiang et al., 2006).

Eastoe ve arkadaşları ise iyonik olmayan  $C_{10}E_4$  molekülü için adsorpsiyon bariyerini 5-12 kJ/mol olarak hesaplamışlardır. Ayrıca n-alkil poliglikol eterler ( $C_iE_j$ ) için  $i = 10$  ve  $12$ ,  $j = 4, 5, 6, 7$  ve  $8$  olarak değiştirilmiş ve bu moleküller için elde edilen dinamik adsorpsiyon katsayıları  $3.5 - 4.6 \times 10^{-10}$   $m^2/s$  aralığında olmuştur (Eastoe et al., 1997). Elde edilen bulgulara göre, bir sistem için adsorpsiyon bariyeri ile adsorpsiyon hızı ters orantılı olarak değişmektedir. Başka bir deyişle, bariyer ne kadar büyükse, adsorpsiyon hızı o kadar düşüktür.

Proteinlerin alveol boşluğuna sızmaları sonucu alveol ara yüzeyi hava – sıvı yerine sıvı – sıvı ara yüzeyi haline dönüşür. Proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kontrol edilebilmesi için ara yüzey özellikleri ve protein adsorpsiyon kinetiklerinin incelenmesi önemli bir konudur. Dinamik yüzey gerilimi ölçümleri ile incelenen adsorpsiyon kinetiği çalışmalarında, kloroform/su ara yüzeyinde yapılan çalışmalarda serum albumin (HSA),  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG),  $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CA) proteinlerinin düşük konsantrasyonlarında yüzey gerilimi zaman grafiklerinde bir plato bölgesi

oluşmaktadır (Şekil 2.20). Bu plato bölgesi 'indüksiyon periyodu' olarak adlandırılmakta ve bu süreçte proteinler yüzeye adsorbe olsa bile yüzey geriliminde bir değişikliğe sebep olamamaktadırlar. Belirli bir süreden sonra yüzeye adsorbe olmuş protein miktarı, yüzey gerilimini değiştirebilecek seviyeye ulaşmakta ve  $\gamma$ , denge değerine ulaşana kadar düşmektedir. İndüksiyon periyodu, protein konsantrasyonunun artmasıyla birlikte kısalmakta ve belirli bir değer üzerinde tamamıyla yok olmaktadır.



Şekil 2.20 Serum albumin (HSA),  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG),  $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CA) proteinlerinin dinamik adsorpsiyon ölçümleri (He et al., 2008).

Protein konsantrasyonunun artışı, yüzey gerilimi değerini her protein için spesifik olan ve proteinin ara yüzey aktivitesinin ölçütü olan minimum yüzey gerilimine yaklaştırmaktadır ve aynı zamanda minimum değere ulaşmak için gereken zamanı azaltmaktadır. Proteinlerin difüzyon katsayısı, Hansen – Joos Denkliği ile bulunabilir:

$$\left[ \frac{\partial \gamma}{\partial (1/\sqrt{t})} \right]_{t \rightarrow \infty} = RT\Gamma^2 \frac{\sqrt{\pi/4D_{eff}}}{c_0} \quad (2.8)$$

Eşitlik 2.8'deki parametreler  $D_{eff}$  parametresi dışında Eşitlik 2.4'teki parametrelerle aynıdır.  $D_{eff}$ , efektif difüzyon katsayısı, Eşitlik 2.4, 2.5 ve 2.6'da kullanılan 'görünür adsorpsiyon katsayısı',  $D_a$ , ile aynı fiziksel anlamı taşımaktadır. İki parametre de

sadece yığın fazda farklı konformasyonlardaki moleküllerin ara yüzeye taşınımını değil, ara yüzeydeki yüzey gerilimine bağlı olarak moleküllerin olası konformasyon değişimlerini de içermektedir. Literatürde  $\beta$  – kazein için difüzyon katsayısı  $1.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , HSA için ise  $6.4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  olarak bulunmuştur (Miller et al., 1998). Akciğer yüzey aktif maddesinin inaktive olması açısından en problematik kan proteini olan fibrinojenin difüzyon katsayısı ise  $2.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  olarak hesaplanmıştır (Aptel et al., 1988; Wasilewska et al., 2009).

Fosfolipidlerin ve proteinlerin bir arada bulunduğu canlı sistemlerde sıvı – sıvı ara yüzeyinde ara yüzey olaylarının ve adsorpsiyon kinetiğinin yorumlanabilmesi, ara yüzeydeki olguların anlaşılabilmesi ve kontrolün sağlanabilmesi adına büyük önem taşımaktadır. DPPC ile  $\beta$ - laktoglobulin proteininin bir arada bulunduğu bir sistemde, farklı DPPC ve protein konsantrasyonları için kloroform/su ara yüzeyinde dinamik adsorpsiyon çalışmaları yapılmış ve ara yüzey davranışları yorumlanmıştır. Yorumlar yüzey gerilimi – zaman ölçümlerine göre yapılmıştır. Çalışmaya göre, protein konsantrasyonu 0.1 mg/L iken, kullanılan DPPC konsantrasyonu 0.005 mM'dan düşük ise adsorpsiyonu protein kontrol etmektedir. Ancak DPPC için 0.001 mM – 0.1 mM konsantrasyon aralığında, ara yüzeyde homojen olmayan bir adsorpsiyon tabakası oluşmakta ve adsorpsiyon davranışı her iki madde tarafından belirlemektedir. Ancak, protein konsantrasyonu 0.8 mg/L'ye yükseltildiğinde, ara yüzey davranışında protein tamamen baskın hale gelmektedir (He et al., 2008). Akciğer ara yüzeyinde proteinlerin alveol boşluğuna sızması sonucu yüzey aktif madde karışımı işlevini yerine getirememektedir. Bu kapsamda düşünüldüğünde, ortamdaki protein ve lipid karışımının birbirlerinin adsorpsiyon özelliklerini ne derece etkiledikleri önemli bir konu haline gelmektedir.

Sıvı – sıvı ara yüzeyindeki adsorpsiyon çalışmalarında sistemin dinamik adsorpsiyon özellikleri ve adsorpsiyon kinetiği dışında, bir diğer önemli parametre ayrışma (dağılım) katsayısıdır. Eğer kullanılan yüzey aktif madde, her iki sıvı fazda da çözünebiliyorsa bu olay ayrışma (dağılım) olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen bulgulara göre, yüzey aktif maddelerin sıvı – sıvı ara yüzeyine adsorpsiyonu, moleküllerin ara yüzeyden diğer faza geçmeleri ile beraber gerçekleşebilmektedir.

Dolayısıyla, adsorpsiyon hızı ve miktarı; ortamda bulunan her iki fazın hacimce oranları, fazlar arasındaki ayrışma katsayısı ve termodinamik ara yüzey parametrelerine bağlıdır (Ferrari et al., 1997). Moleküllerin adsorpsiyon dinamiklerinin doğru şekilde incelenebilmesi için ayrışma katsayısının hesaplanması zorunludur. Genelde su ve yağ fazları arasında incelenen dağılım katsayısı,  $k_p$ , yüzey aktif maddenin iki fazdaki denge konsantrasyonlarının oranı olarak tanımlanmaktadır ve basitleştirilmiş olan Eşitlik 2.9 kullanılarak hesaplanabilir:

$$k_p = \frac{c_{yağ}}{c_{su}} = \frac{V_{su}}{V_{yağ}} \left( \frac{c_{su,0} - c_{su}}{c_{su}} \right) \quad (2.9)$$

Eşitlik 2.9'daki  $c_{yağ}$  ve  $c_{su}$  sırasıyla denge koşullarında surfaktantın yağ fazındaki konsantrasyonunu ve su fazındaki konsantrasyonunu,  $V_{su}$  ve  $V_{yağ}$  ise iki fazın hacimlerini göstermektedir (Catanoiu et al., 2011). Dağılım katsayısının elde edilmesi prensip olarak çok kolaydır: iki karışmayan fazın birbirleriyle dengeye geldikten sonra yığın konsantrasyonlarının ölçülmesi yeterlidir. Ancak, çok düşük konsantrasyonlarda bu durum zorlaşmaktadır. Dağılım katsayısının hesaplanması için Ravera ve arkadaşları tarafından bir method geliştirilmiştir. Bir yüzey aktif maddenin birbiriyle karışmayan iki sıvı (örneğin su ve yağ) arasındaki dağılım katsayısı bu metoda göre;

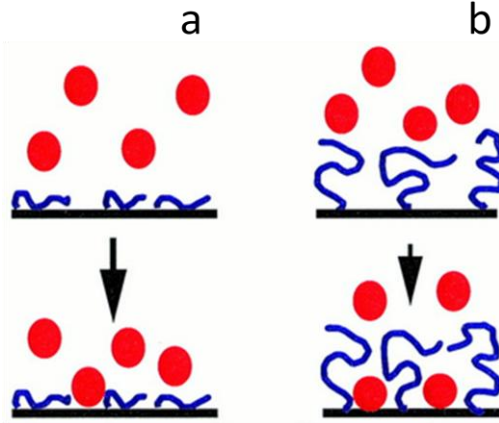
- 1) Yağ ile doyurulmuş su kullanılarak hazırlanan çözeltilerin denge yüzey gerilimleri ölçülür ve referans bir  $c - \gamma$  izotermi oluşturulur.
- 2)  $V_{su}$  hacminde  $c_{su,0}$  başlangıç konsantrasyonundaki sulu çözelti,  $V_{yağ}$  hacmindeki saf yağ fazı ile yeterli süre (gün) temas ettirilir ve böylece dağılım dengesi sağlanır.
- 3) Dengeye gelen sulu fazın denge yüzey gerilimi,  $\gamma_{eq}$ , ölçülür ve daha önce referans olarak hazırlanan izoterm kullanılarak konsantrasyon,  $c_{su}$  bulunur.
- 4) Son olarak  $k_p$ , yüzey aktif maddenin kütle denkleği kullanılarak hesaplanır:

$$k_p = \frac{V_{su}}{V_{yağ}} \left( \frac{c_{su,0}}{c_{su}} - 1 \right) \quad (2.10)$$

Bu yöntem izlenirken güvenilir sonuçlar alabilmek için dikkat edilmesi gereken kritik noktalardan ilki, tam dengenin elde edilmesidir. Konsantrasyon ölçümlerinin sağlıklı yapılabilmesi için fazlar arasında emülsiyon oluşmamalı ve sistem yüksek hızda karıştırılmamalıdır. Çoğu surfaktant için karıştırılmadan birkaç gün bekletme, denge koşullarının oluşturulması için yeterlidir.

Özellikle surfaktantların amfifilik karakterleri dikkate alındığında, dağılma etkisi sıvı – sıvı ara yüzeylerinde hiçbir zaman yok sayılmamalıdır. Yapılan çalışmalarda, dağılma katsayısının değişik ara yüzeylerde aynı molekül için birbirinden farklı olabileceği görülmüştür (Ravera et al., 2000).

Dinamik adsorpsiyon özelliklerinin önemli olduğu kadar, proteinlerin ara yüzeye adsorpsiyonunun engellenmesinde, seçilecek ve kullanılacak molekül yapısı ve onun özellikleri de önemlidir. Literatürde polioksietilen (PEO) zinciri içeren moleküllerin proteinlere karşı sterik bariyer oluşturarak adsorpsiyonlarını kısmi olarak engellediği belirlenmiştir. Polietilen glikol ya da PEO molekülleri hidrofilik yapıda ve hücrelerle uyumludur. Bu özellikleri, onları doku mühendisliğinde ya da yapay organlarda kullanılabilmelerini sağlamaktadır. Liu ve arkadaşları 10 adet tekrarlanan birimden oluşan PEO zinciri içeren Brij 56 ticari surfaktantı ile yaptıkları çalışmada; Langmuir tekniği ile ara yüzeyde değişik yoğunlukta PEO tekli tabakalarına fibrinojen adsorpsiyonunu incelemişler ve yüzeyde PEO sıkışma yoğunluğu arttıkça, proteinin ara yüzeye adsorpsiyonu önlenmektedir (Liu et al., 2007). Yüzeydeki PEO yoğunluğu kadar, kullanılan molekülün molekül ağırlığı da kritiktir. Polimer zincir uzunluğu ne kadar uzunsa, protein adsorpsiyonuna karşı oluşturulan bariyer de o kadar büyüktür ancak bu durumda adsorpsiyon süresi de uzamaktadır. Szleifer ve arkadaşlarına göre ise polimerin yüzey ile etkileşimi de protein adsorpsiyonuna karşı net bir etki sağlamaktadır (Şekil 2.21). Örneğin, yüzeye bağlanmış bir PEO zinciri, sterik etkiden çok, proteinlere karşı uzun sürede direnç göstermekte, protein yüzeyde boş yer bulamamaktadır. Ancak yüzeyle etkileşimi daha az olan polimer zincirleri, protein adsorpsiyonuna karşı kısa sürede güçlü sterik etki gösterirken uzun vadedeki engellemeleri daha kısıtlıdır (Satulovsky et al., 2000).



Şekil 2.21 PEO zincirlerinin yüzeyle etkileşimlerinin farklılığında protein adsorpsiyonuna karşı gösterdikleri etkiler: ara yüzeyde yüksek etkileşime sahip PEO zinciri (a), etkileşimi daha az olan PEO zinciri (b)

Yapılan bir başka çalışmada, yüzey aktif proteinlerin ara yüzeye adsorbe olarak oluşturdukları enerji bariyerinin, polimerlerin etkisiyle ortamda yüksek miktarda protein bulunması durumunda bile yenilebileceği önerilmiştir. Bu teoriye göre yüzey aktif madde kümeleşmelerinin ara yüzeye adsorbe olmasıyla birlikte azalan “dışarılanmış hacim” (excluded volume)’e bağlı olarak artan polimer entropisi sayesinde polimerler, yüzey aktif madde kümeleşmelerini ara yüzeye itirmektedir. Diğer bir deyişle ara yüzeye adsorpsiyonu arttırmaktadırlar. Bu etki, serum proteinleri tarafından yaratılan elektrostatik ve sterik itme etkisini yenebilecek büyüklüktedir ve PEO zinciri içeren moleküller tarafından başlatılmaktadır (Stenger and Zasadzinski, 2007).

PEO gibi suda çözünebilen polimerlerin partiküllere ya da biyomalzeme yüzeylerine aşılması biyoyumluluğun artmasına katkıda bulunurken, proteinlere karşı sterik itme etkisi yapmaktadır. Plazma proteinlerinin adsorpsiyonunun engellenmesi için yapılan çalışmada, PEO – aşılmalı lipid tabakalarına protein adsorpsiyonu incelenmiştir. Kuartz yüzey üzerine distearoylfosfatidilkolin (DSPC) ve PEO aşılmalı distearoylfosfatidiletanolamin (PEO2000-DSPE) karışımları alınmış ve dış katmandaki PEO’nun mol kesri değiştirilerek bu tabaka üzerine protein adsorpsiyonundaki değişimler araştırılmıştır. Alınan sonuçlara göre, plazma proteinleri boş kuartz yüzeyine oranla, DSPC / PEO-DSPE karışık kaplı yüzeye daha az adsorbe olduğu bulunmuştur (Xu and Marchant, 2000).

Bu araştırmaların ışığında, her bir segmenti özel olarak tasarlanmış, yapısında anyonik ve katyonik yapılı iyon – çifti baş gruplarını, florokarbon ve hidrokarbon kuyruk gruplarını ve kan proteinlerinin ara yzeye adsorpsiyonunu engelleyebilmesi için PEO grubunu içeren bir yzey aktif madde sentezlenmiştir (Uslu, 2009).

### 3. DENEYSEL YÖNTEMLER

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında yapılan deneylerde; IPL (Ion Pair Lipid);  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{10}\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{SO}_3^-(\text{CF}_2)_7\text{CF}_3]$   $\text{C}_{42}\text{H}_{88}\text{NO}_{10}^+\text{C}_8\text{F}_{17}\text{O}_3\text{S}^-$  molekülünün sentezi için Brij 56 ( $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{10}\text{OH}$ ) (Sigma,  $\text{H}_2\text{O} < 3.0\%$ ), trietilamin (Sigma-Aldrich, 99.5%) ve perfloro-1-oktansulfonil florür (Aldrich, 98%) maddeleri kullanılmış, reaksiyon dietileterde (J.T. Baker, anhydrous) gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemleri için ise dietileter, etanol (Riedel – de Haen), hekzan (Sigma - Aldrich) ve asetonitril (Riedel – de Haen) kullanılmıştır. IPL'nin fosfolipid varlığında dinamik adsorpsiyon ve ara yüzeyle etkileşim özelliklerinin incelenebilmesi için akciğer yüzey aktif madde karışımında miktarca en çok bulunan fosfolipid; DPPC'den (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, >99%, Sigma) yararlanılmış, akciğer ara yüzey modelini simüle etmek ve molekül yapısının etkisinin incelenebilmesi için kullanılan Infasurf<sup>®</sup> (CALFACTANT) ise ONY firmasından tarafımıza hediye edilmiştir. 35 mg/mL'lik, 6 mL hacminde olan Infasurf<sup>®</sup>, stoktan 1.5 µL çekilerek kullanılmıştır. Serum proteinleri ile adsorpsiyon ve etkileşim deneyleri için I – S Tip sığır plazmasından elde edilen Fibrinojen (Sigma, 65-85%) kullanılmıştır.

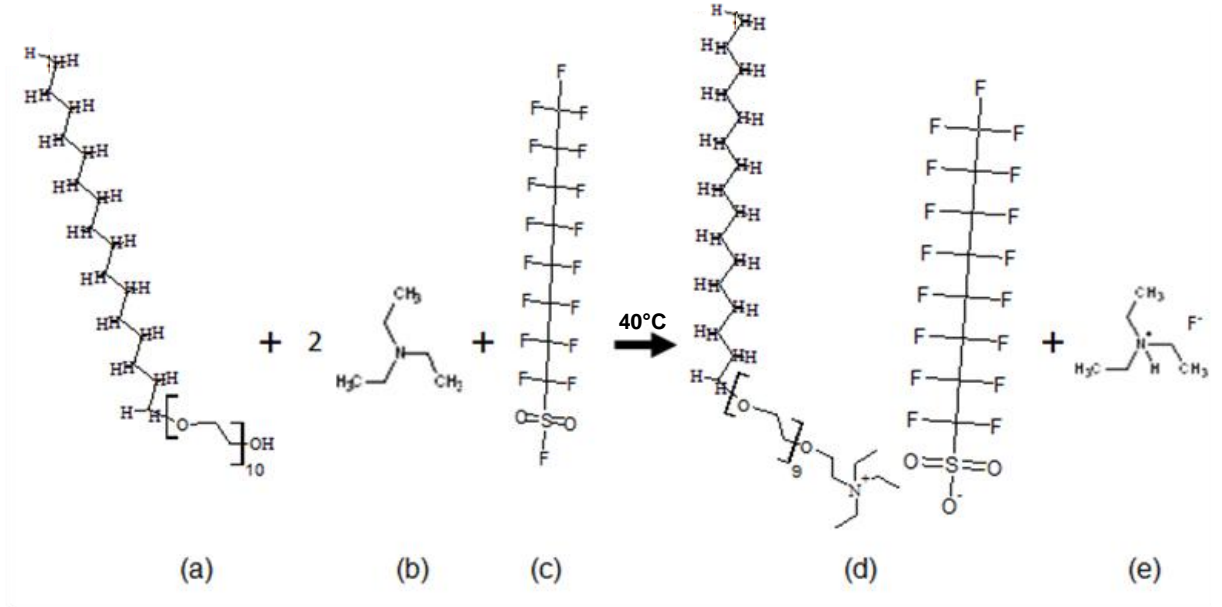
Askıda damla cihazında yapılan dinamik adsorpsiyon deneyleri için organik faz olarak kloroform (Sigma - Aldrich) tercih edilmiş ve kloroformun sudaki kısıtlı çözünürlüğü sebebiyle, su ile aynı ortamda tutularak iki faz birbirlerine doyurulduktan sonra (yaklaşık 24 saat) çözeltiler hazırlanmıştır (Li et al., 1999). LB – minitrough ve askıda damla cihazında ölçümler için kullanılacak olan tampon çözeltisi pH'ı 7.4 olan fosfat tampon olarak seçilmiştir. Fosfat tamponun hazırlanması için ise sodyum klorür (NaCl), sodyum dihidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma - Aldrich) ve disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck) tuzları kullanılmış ve tuz molaritesi deneysel sisteme göre 150 mM veya 200 mM olarak tercih edilmiştir. Deneylerin tümünde ultra saf su (Millipore) kullanılmış (18.2 mΩ.cm) ve deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (22 °C).



Kloroformun su ile doyurulması dışında kullanılan diğer çözücü ve kimyasallar herhangi bir ek işlem uygulanmadan, temin edildikleri halleri ile kullanılmıştır.

### 3.2. IPL (Ion Pair Lipid); $C_{42}H_{88}NO_{10}^+C_8F_{17}O_3S^-$ Molekülünün Sentezi

8 karbonlu florokarbon ile 16 karbonlu hidrokarbon zincir grupları kuyruk gruplarını oluşturmak üzere, katyonik amonyum ve anyonik sülfat baş gruplarını bir arada bulunduran iyon – çiftli hibrit bir yüzey aktif madde olarak tasarlanan  $C_{42}H_{88}NO_{10}^+C_8F_{17}O_3S^-$  (IPL)'nin sentezi tek basamaktan oluşmaktadır. Sentez şeması Şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1 IPL molekülünün sentezi (a): Brij 56, (b): trietilamin, (c): perfloro-1-oktansulfonil florür, (d):  $C_{42}H_{88}NO_{10}^+C_8F_{17}O_3S^-$  (IPL), (e): tuz

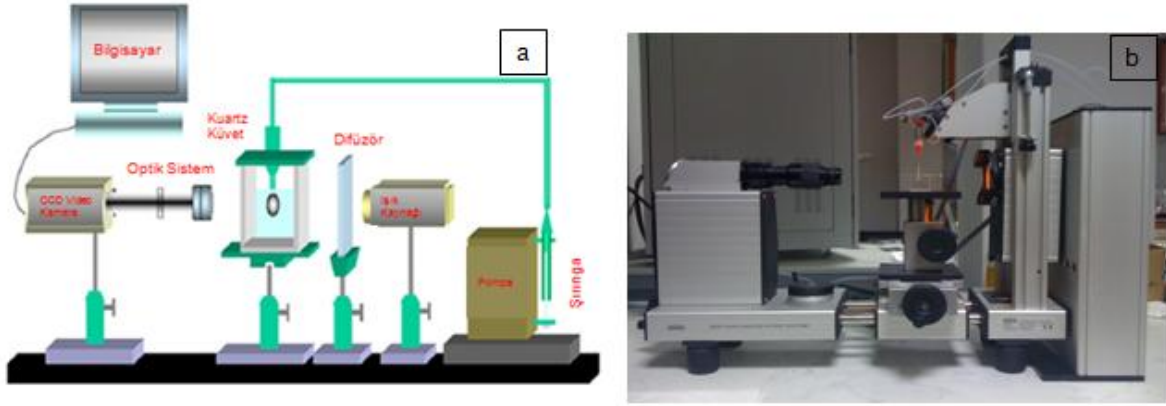
Sentez, prosedürü daha önce belirlenen şekilde gerçekleştirilmiş ve gerekli saflaştırmaların tamamlanması sonucunda elde edilen ürünün yüksek saflıkta olduğu  $^1H$ -NMR analizi ile belirlenmiştir (Unsal and Aydoğan, 2009; Uslu, 2009).

### 3.3. Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

Solunum, alveollerin genişleyip daralmasıyla çok hızlı bir şekilde gerçekleşen ve sürekli devam eden döngüsel bir süreçtir. Dolayısıyla ARDS için tedavi amacıyla

geliştirilen ilaçların, akciğer yüzey aktif maddesini oluşturan bileşenlerin ve kan proteinlerinin dinamik adsorpsiyon özelliklerinin dikkatle incelenmesi gerekmektedir. Bu kapsamda ilk olarak, adsorpsiyon hızı yüksek ve kan proteinleri ile yarışmalı adsorpsiyona girerek onların yüzeye adsorbe olmalarını önlemesi amacıyla tasarlanan IPL molekülünün, akciğer yüzey aktif madde karışımında lipidlerin büyük bir kısmını oluşturan DPPC'nin ve kan proteinleri arasında en çok soruna yol açtığı bilinen fibrinojen proteininin, fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde dinamik adsorpsiyon özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra bu moleküllerin birbirleriyle etkileşimleri araştırılmış, kısa ve uzun zamanda gösterdikleri dinamik adsorpsiyon özellikleri incelenmiştir. Dinamik adsorpsiyon çalışmalarının ikinci kısmında ise, RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan ve buzağı akciğer lavajından elde edilen Infasurf®'ün adsorpsiyon özellikleri tespit edilmiş ve daha sonra fibrinojen varlığındaki davranışı karakterize edilmiştir.

Dinamik adsorpsiyon ölçümleri 'Askıda Damla Tekniği' ile gerçekleştirilmiş ve bu teknik için Askıda Damla (Pendant Drop) Cihazı (Krüss DSA 10 - MK2, Almanya) kullanılmıştır. Bu metod, oluşturulan damlanın profiline bağlı olarak yüzey geriliminin, yüzey açısının, yüzey alanının ve hacminin belirlenmesini ve ayrıca bu parametrelerin zamana, sıcaklığa ve basınca göre değişiminin incelenmesini sağlamaktadır. Askıda damla tekniğinin en önemli avantajı, sistemin 3 boyutlu olmasıdır. Yani, oluşturulan damla ile alveoller modellenilebilmekte ve hatta alınacak ölçüme göre damlanın belirli bir periyotta hacmi artırılıp – azaltılarak solunum taklit edilebilmektedir. Dolayısıyla deneysel olarak gerçek sisteme yakın bir sistem elde edilebilmektedir. Ayrıca, bu cihaz ile hava – sıvı ara yüzeyinde ölçüm alınabildiği gibi sıvı – sıvı ara yüzeyinde de ölçüm alınabilmektedir (del Rio and Neumann, 1997). Askıda damla cihazı temel olarak örnek haznesi, kamera sistemi ve oluşturulan damlanın bilgisayara aktarılmasıyla, askıdaki damla profilinden yüzey gerilimini hesaplayan ve alınan verilerin kaydedilmesini sağlayan bilgisayardan oluşmaktadır. Şekil 3.2, tez çalışmasında dinamik adsorpsiyon ölçümlerinin yapılması için kurulan ve kullanılan deney düzeneğini göstermektedir (He et al., 2008).

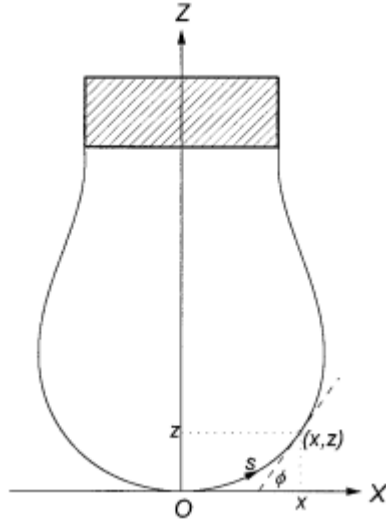


Şekil 3.2 Dinamik adsorpsiyon deneyleri için oluşturulan deney sisteminin (a) şematik gösterimi, (b) Askıda damla cihazı

Oluşturulan damlanın profili kullanılarak yüzey gerilimi, Young – Laplace denklemine dayanarak askıda damla için geliştirilen Eşitlik 3.1'den hesaplanmaktadır.

$$\frac{2}{r_{Apex}} - \left[ \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right] = \left[ \frac{\Delta\rho g}{\gamma} \right] z \quad (3.1)$$

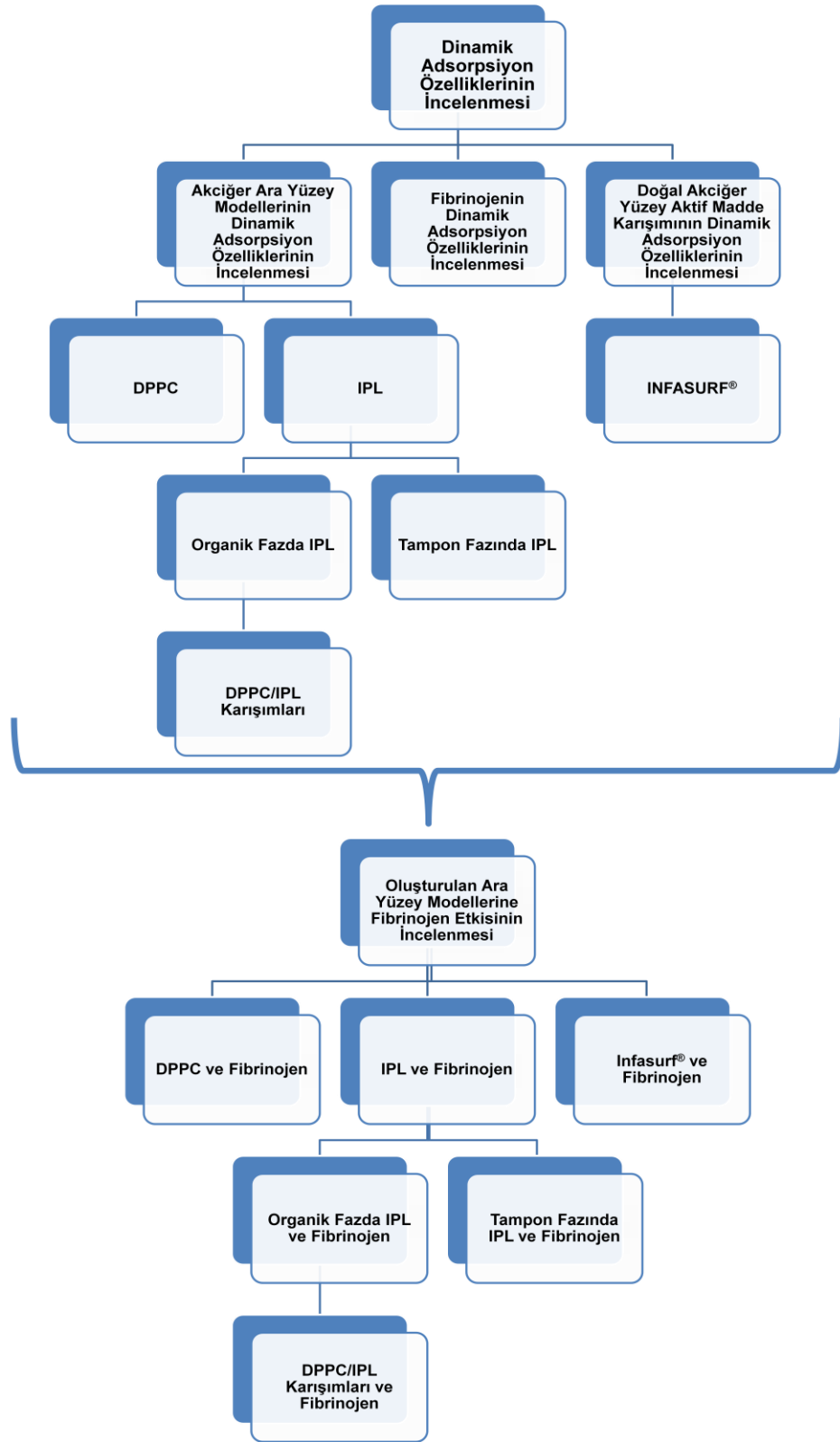
Eşitlik 3.1'de  $\gamma$  yüzey gerilimini,  $\Delta\rho$  ölçüm alınan ara yüzeyler arasındaki yoğunluk farkını,  $z$  oluşturulan damlanın yüksekliğini gösterirken  $r_{Apex}$  z'nin sıfır olduğu durumdaki yarıçap;  $r_1$  ve  $r_2$  ise damla yüzeyindeki eğimlilik yarıçaplarını göstermektedir (Yeow et al., 2008).



Şekil 3.3 Askıda damla profilinin geometrisi ve hesaplamada kullanılan simgeler

Dinamik adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesinde tüm deneyler, tampon/kloroform ara yüzeyinde yapılmış ve kloroformun sudaki kısmi çözünürlüğü dolayısıyla, kullanılacak kloroform, su ile yaklaşık 24 saat doyurulmuştur. Sistem, her deney öncesinde ultra saf su ( $18.2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$ ) ile kalibre edilmiş, doğru ölçüm alınabilmesi için gerekli kamera ayarları optimize edilmiştir. Cihazın temizlenmesi için her ölçümden önce, deney düzeneğinden saf su geçirilerek sistemde kirlilik kalmadığından emin olunmuştur. Ucunda damla oluşturulan iğne ise yine her ölçümden önce ve sonra olmak üzere, etanol ve saf su ile temizlenmiştir. Kalibrasyon aşamasından sonra, cihaza kloroform içinde hazırlanmış çözelti çektirilmiş; sıvı-sıvı ara yüzeyinin oluşturulabilmesi için kuartz küvet, tampon çözelti ile doldurulmuş ve küvetin içine daldırılmış olan iğnenin ucunda belirli hacimde damla oluşturularak yüzey geriliminin zamanla değişimi kaydedilmiş, ölçümler ara yüzey dengeye gelinceye kadar devam ettirilmiştir. Tüm deneyler oda sıcaklığında ( $22^\circ\text{C}$ ) gerçekleştirilmiştir. Alınan zaman ölçümleri  $\pm 1$  saniye hassasiyetindedir.

Tez kapsamında dinamik adsorpsiyon çalışmaları Şekil 3.4'te akış şeması ile gösterilen sistematik sıra izlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu sıralamanın takip edilmesiyle veri takibi kolaylaşırken, elde edilen sonuçların birbirine göre daha sağlıklı bir şekilde yorumlanması sağlanmıştır.

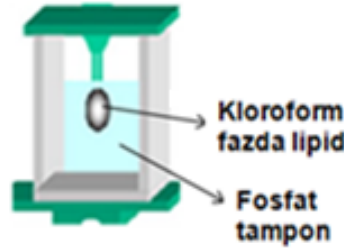


Şekil 3.4 Dinamik adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi için oluşturulan akış şeması

### 3.3.1. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

#### 3.3.1.1. DPPC'nin Dinamik Davranışının Belirlenmesi

DPPC'nin istenilen derişimdeki çözeltileri yaklaşık 24 saat su ile doyurulmuş kloroformda hazırlanmıştır. DPPC çözeltisi sistemde kloroformdan oluşan damla fazında bulunmaktadır. Dış faz için ise kuartz küvet 150 mM'lık fosfat tampon ile doldurulmuştur. DPPC'nin dinamik davranışının belirlenmesi için kurulan deney sisteminin şematik gösterimi Şekil 3.5'teki gibidir. Oluşturulan damlanın yüzey gerilimindeki değişim zamanla kaydedilmiş ve böylece DPPC için bir yüzey gerilimi – zaman izotermi oluşturulmuştur. Ölçümler 0.5, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002 ve 0.0004 mM DPPC derişimleri için tekrar edilmiş ve elde edilen veriler literatür ile karşılaştırılarak alınan ölçümlerin doğruluğundan emin olunmuştur.



Şekil 3.5 DPPC'nin dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

#### 3.3.1.2. IPL Molekülünün Dinamik Davranışının Belirlenmesi

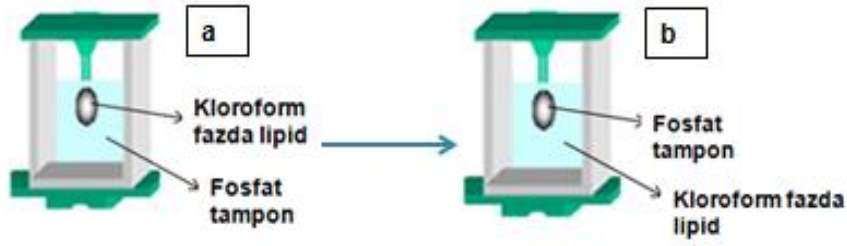
Tez kapsamında dinamik adsorpsiyon deneyleri askıda damla metodu ile fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. IPL yapısındaki gruplar sayesinde hem kloroform gibi organik bir çözücüde, hem de tampon çözelti gibi sulu çözeltilerde çözünebilmektedir. IPL'nin bu özelliği kullanılarak adsorpsiyon davranışı iki ayrı fazdan da belirlenebilmiştir. İlk olarak DPPC ile karışım oluşturabilmesi ve DPPC'nin adsorpsiyon özellikleri ile karşılaştırılabilmesi açısından IPL kloroformda çözdürülmüş ve ara yüzeye bu fazdan adsorbe olmuştur. IPL için kurulan diğer

deney sisteminde ise, IPL sulu fazdan (fosfat tampon fazından) ara yüzeye adsorbe olmuş ve böylece IPL'nin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine adsorpsiyon davranışı, deney sistemine tampon fazından dahil olan Infasurf® ile karşılaştırılabilmektedir.

### **3.3.1.2.1. IPL Molekülünün Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi**

IPL molekülünün organik fazdan fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine dinamik adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi için değişik konsantrasyonlarda IPL çözeltileri hazırlanmış ve DPPC ile aynı koşulda deneyler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6a). Ancak bu deney koşulunda, molekülün fosfat tampon fazındaki kısmi çözünürlüğünden ve bu fazın hacminin kloroformdan oluşan damla hacmine göre daha fazla olmasından dolayı tampon çözeltilisine geçtiği tespit edilmiştir. Dağılma (ayırışma) olarak adlandırılan bu durumda, IPL'nin dağılım katsayısı hesaplanmıştır (Ferrari et al., 1997; Ravera et al., 2000; Catanoiu et al., 2011).

Dağılma etkisinin görülmediği durumda IPL'nin dinamik davranışının belirlenmesi için deney sistemi ters çevrilmiş; yeni deney düzeneğinde damla tampon çözeltiliden oluşurken, IPL'nin çözüldüğü kloroform fazı, kuartz küvete doldurulmuştur. Böylece iki fazın hacim oranları değişmiş ve molekül literatürdeki örneklere uygun olarak kloroform/tampon ara yüzeyinde kalmıştır. Elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermelerinden IPL'nin dinamik davranışı karakterize edilmiştir. Bu inceleme için kullanılan IPL konsantrasyonları sırasıyla 0.05, 0.01, 0.005, 0.002, 0.0012, 0.0004 ve 0.0008 mM olarak belirlenmiş ve kurulan deney sistemi Şekil 3.6(b)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.6 (a) IPL molekülünün kloroform fazından ara yüzeye dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi, (b) IPL'nin dağılma etkisinin giderilmesi için kurulan deney sistemi

### 3.3.1.2.2. IPL Molekülünün Tampon Fazından Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

IPL suda çözünebilen bir yüzey aktif maddedir. Bu özelliği kullanılarak dış fazda tampon çözelti varken IPL'nin adsorpsiyon özellikleri tampon çözelti içinde de belirlenmiştir. Böylece aynı molekülün iki farklı fazda davranışı incelenmiştir. Ayrıca, bu deney sistemi Infasurf® ile IPL'nin karşılaştırılabilmesi adına kritiktir. IPL, yüksek yüzey aktivitesine sahip bir moleküldür ve ayrıca kan proteinlerinden fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olmasını kısmi olarak engellediği düşünülmektedir. Gerçekleştirilen bu basamak, ortamda fibrinojen ve IPL'nin birlikte olduğu sistem için bir ön çalışmadır. Bu amaçlarla kurulan sistem Şekil 3.7'deki gibidir. IPL küvetteki son konsantrasyonları 0.18 mM ve 0.09 mM olacak şekilde iki farklı konsantrasyon değeri için suda çözdürülmüş ve fosfat tampon çözelti ile dolu kuartz küvete enjekte edilmiştir. Cihaza ise su ile doyurulmuş kloroform çektirilmiş ve içinde fosfat tamponda IPL çözeltisi olan küvette bir damla oluşturulmuştur. Zamanla yüzey gerilimi ölçümleri alınmış ve sonuçlar Infasurf® izotermi ve ayrıca fosfat tampon fazında fibrinojenin de olduğu durumdaki izotermiyle karşılaştırılmıştır.





Şekil 3.7 IPL molekülünün fosfat tampon fazından ara yüzeye dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

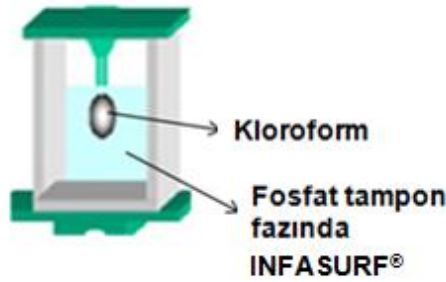
### 3.3.1.3. DPPC/IPL Karışımlarının Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

DPPC ile IPL'nin nasıl etkileştiğini anlamak, ve IPL'nin DPPC'nin dinamik davranışı üzerindeki etkisini incelemek tez kapsamındaki önemli hedeflerden birisidir. Bunun için molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarında karışımların istenilen derişimdeki çözeltileri yaklaşık 24 saat su ile doyurulmuş kloroformda hazırlanmış, ve cihaza çektilirilmişdir. Dış faz olarak yine kuartz küvet tampon çözelti ile doldurulmuş ve ikili karışımdan oluşan bu sistem için yüzey gerilimi – zaman ölçümleri alınmıştır. DPPC – IPL karışımlarının dinamik adsorpsiyon davranışlarının incelenmesi için kurulan deney sistemi saf DPPC'nin ve kloroform fazındaki IPL'nin dinamik adsorpsiyon davranışının incelenmesi için kurulan deney sistemi ile aynıdır (Şekil 3.5, Şekil 3.6a).

### 3.3.1.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

Doğal akciğer yüzey aktif madde karışımı olan Infasurf®'ün dinamik adsorpsiyon davranışının incelenmesi tez kapsamında yapılan temel deneylerden biridir. Bu şekilde RDS için tedavi amaçlı kullanılan bir karışım ile etkin bir surfaktant olduğu düşünülen IPL'nin özellikleri karşılaştırılacaktır. Bu deney sistemi için diğer sistemlerle karşılaştırabilmek adına, 24 saat su ile doyurulmuş kloroform askıda damla cihazına

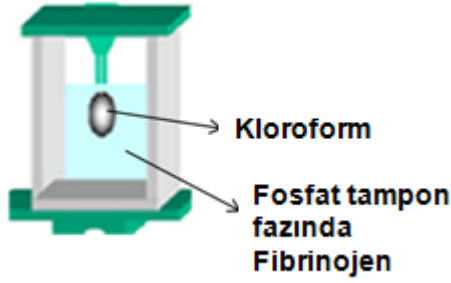
çektilirmiş ve içinde 200 mM'lık fosfat tampon bulunan kuartz küvete Infasurf® enjekte edilerek, çözeltinin içinde bir damla oluşturulmuştur (Şekil 3.8). Oluşturulan damlanın yüzey gerilimindeki değişim zamanla kaydedilmiş ve elde edilen izotermeler yorumlanmıştır. Bu deney 0.013, 0.026 ve 0.032 mg/mL olmak üzere 3 farklı Infasurf® konsantrasyonu ile gerçekleştirilmiş ve çalışmanın diğer kısımları için kullanılacak optimum Infasurf® konsantrasyonu 0.026 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu şekilde elde edilen uzun ve kısa zamanlı dinamik davranışı, IPL ile karşılaştırılmış ve böylece iki maddenin adsorpsiyon özellikleri kıyaslanmıştır.



Şekil 3.8 Infasurf®'ün fosfat tampon fazından ara yüzeye dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

### 3.3.1.5. Fibrinojenin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

Yüzey aktif olduğu bilinen serum proteinlerinden, en problematik olan protein surfaktant inaktivasyonuna yol açan ve ara yüzeye yerleşerek pıhtı oluşturan fibrinojendir. Dolayısıyla, fibrinojenin tek başına dinamik adsorpsiyon özelliklerinin bilinmesi, daha sonra sisteme eklendiğinde elde edilecek verilere yorum yapılabilmesi için kritiktir. Fibrinojenin adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi için kurulan deney sistemi Şekil 3.9'daki gibidir.



Şekil 3.9 Fibrinojen proteininin dinamik adsorpsiyon özelliğinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

Fibrinojen, gerçek sistemi taklit edebilmek adına pH'ı 7.4 olan 150 mM'lık fosfat tamponda çözdürülmüştür. Diğer deneyler ile tam olarak karşılaştırılabilmesi için cihaza su ile doyurulmuş kloroform çektirilmiş ve fibrinojenin 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 500 ppm derişimlerdeki çözeltilerinin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine adsorpsiyonu kloroform damlasının oluşturulduğu andan itibaren zamanla yüzey geriliminin değişimi ölçülerek incelenmiştir. Bu bölümde alınan tüm veriler, daha sonra fibrinojenin etkisinin incelendiği bölümler için temel niteliği oluşturmaktadır.

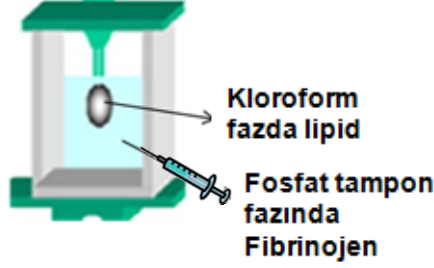
### 3.3.2. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

Tez kapsamında kullanılan moleküllerin her birinin tek başına fosfat tampon/kloroform ara yüzeyindeki davranışları belirlendikten sonra, dinamik koşullarda fibrinojen etkisinin anlaşılması amacıyla DPPC ile fibrinojen, IPL ile fibrinojen, DPPC-IPL karışımları ile fibrinojen ve Infasurf® ile fibrinojenin bir arada bulunduğu deney sistemleri kurularak, fibrinojenin ara yüzeydeki etkisi incelenmiştir.

#### 3.3.2.1. DPPC'nin Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

Bu kısım için öncelikle kloroform fazdaki damlada DPPC çözeltisi varken, ara yüzeyin dengeye gelmesi beklenmiş ve yüzey gerilimi inebileceği en düşük değere inip, zamanla değişim göstermezken, tampon faza değişik konsantrasyonlarda fibrinojen çözeltisi enjekte edilmiştir. Kurulan bu sistemle, iki madde ara yüzeye farklı fazlardan adsorbe olmakta ve dolayısıyla yüzey geriliminde oluşan değişim birbirleriyle yığın fazdaki etkileşimlerinden değil, sadece ara yüzeydeki etkileşimlerinden kaynaklı

olmaktadır. Lipid ve proteinlerin bir arada bulunduğu ara yüzeyler çalışılırken, kurulan bu deney sistemi literatürde de sıkça kullanılmaktadır (He et al., 2008) DPPC için kullanılacak lipid konsantrasyonu, literatürle de uyumlu olacak şekilde 0.005 mM olarak seçilmiştir.



Şekil 3.10 DPPC ve IPL'nin dinamik davranışına fibrinojen etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

Belirlenen konsantrasyondaki çözelti kullanılarak içi fosfat tampon çözeltisi ile dolu olan kuartz küvette bir damla oluşturulmuştur. Oluşturulan damlanın yüzey gerilimi sabitlendikten sonra, dışarıdan damlanın duruşu etkilenmeyecek şekilde Hamilton mikro şırınga ile son konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde fibrinojen çözeltisi enjekte edilerek yüzey gerilimindeki değişim incelenmiştir. Kurulan deney sisteminin modeli Şekil 3.10'da gösterilmektedir. Bu deneyler küvette son konsantrasyonları 50 ve 100 ppm olacak şekilde, fibrinojen çözeltileri tekrarlanmış ve değişen fibrinojen konsantrasyonu için ara yüzeydeki davranış karakterize edilmiştir.

### 3.3.2.2. IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

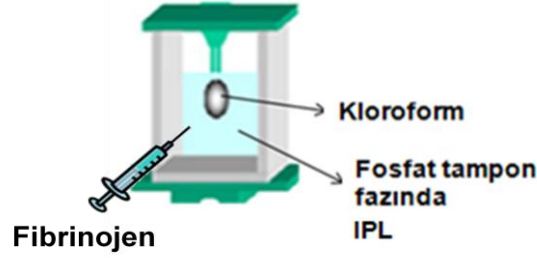
#### 3.3.2.2.1. Organik Fazdaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

Bu deney sistemi için bir önceki sistemde organik fazdaki IPL için elde edilmiş sonuçlardan, kullanılacak olan lipid konsantrasyonu seçilmiştir. IPL için de DPPC'de olduğu gibi konsantrasyon 0.005 mM olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyondaki çözelti damla fazında olacak şekilde fosfat tampon çözeltisi ile dolu olan kuartz küvette bir damla oluşturulmuştur. Oluşturulan damlanın yüzey gerilimi sabitlendikten sonra, küvetteki son konsantrasyonu ayrı ayrı 10, 50 ve 100 ppm olacak şekilde fibrinojen çözeltisi mikro şırınga yardımıyla fosfat tampon fazına enjekte edilerek

yüzey gerilimindeki değişim incelenmiştir. Kurulan deney sistemi Şekil 3.10'daki gibidir. Bu deneyler birkaç farklı fibrinojen konsantrasyonu ile tekrarlanmış ve değişen fibrinojen konsantrasyonu için ara yüzeydeki davranış belirlenmiştir.

Elde edilen veriler, sistemde sadece fibrinojen olduğunda elde edilen verilerle karşılaştırılıp, ara yüzeyde bulunan lipidlerin, dış fazdan enjekte edilen fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olmasını ne derecede engelledikleri belirlenmiştir.

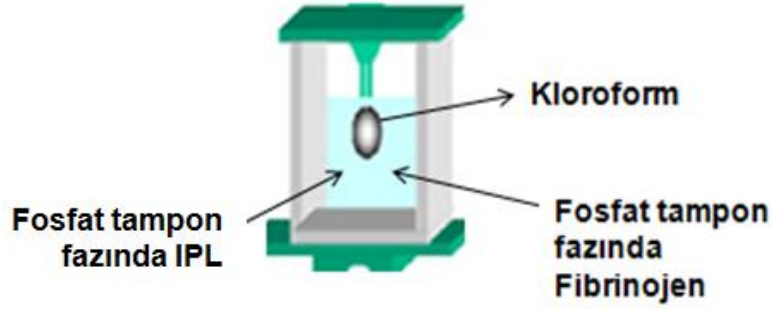
### 3.3.2.2. Fosfat Tampon Fazındaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi



Şekil 3.11 Fosfat tampon fazındaki IPL'nin dinamik davranışına fibrinojen etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

Bu kısımda IPL'nin organik faz yerine fosfat tampon fazından ara yüzeye adsorpsiyonuna fibrinojenin etkisi araştırılmıştır. IPL'nin fosfat tampon fazında da kullanılabilmesi, ara yüzey özelliklerine fibrinojen etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için değişik deney koşulları oluşturulabilmesini sağlamıştır. Kullanılan fibrinojen çözeltilerinin derişimi diğer kısımlarla aynı olacak şekilde 10, 50 ve 100 ppm'dir. IPL çözeltilisinin derişimi ise 0.09 mM olarak belirlenmiştir. İlk deney koşulunda IPL suda çözüldükten sonra tampon faza enjekte edilmiş ve bu çözelti içinde kloroform damlası oluşturulmuştur. IPL'nin damlaya adsorbe olması ve ara yüzeyin dengeye gelmesi beklenmiş; yüzey gerilimi sabit kaldıktan sonra hazırlanan fibrinojen çözeltisi fosfat tampon fazına enjekte edilmiştir (Şekil 3.11). Fibrinojenin enjekte edilmesinden sonra yüzey gerilimindeki değişim incelenmiş, izotermin profili ve ulaştığı değerlerden fibrinojenin ara yüzeye etkisi belirlenmiştir.

Kurulan diğer sistemde ise, IPL ve fibrinojenin küvete aynı anda enjekte edilmesiyle iki maddenin birbirlerine karşı yarışmalı adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kloroform damlası fosfat tampon çözeltisi içinde oluşturulmuş, ve damlanın yüzey gerilimi sabit iken, tampon fazına IPL ile fibrinojen aynı anda enjekte edilmiştir. Bu şekilde iki maddenin aynı fazdan ara yüzeye adsorpsiyonu incelenmiş, yüzey geriliminin zamanla değişimi ölçülerek elde edilen sonuçtan ara yüzeyde hangi maddenin baskın olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar IPL'nin ve fibrinojenin ara yüzeyde tek başlarına buldukları sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Kurulan deney sistemi Şekil 3.12'deki gibidir.



Şekil 3.12 IPL ile fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu için kurulan deney sistemi

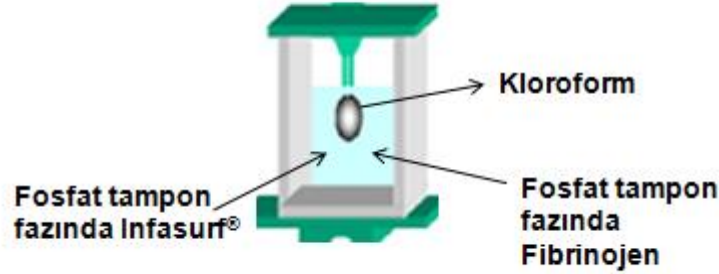
### 3.3.2.3. DPPC/IPL Karışımlarının Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

DPPC ve IPL için yüzey geriliminde yeterli derecede fark görülen konsantrasyon 0.005 mM olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu iki maddeden oluşan karışımlar da net konsantrasyonları 0.005 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışmanın bu kısmı için çözeltideki yüzey aktif madde konsantrasyonu 0.005 mM olacak şekilde molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarında karışımları 24 saat su ile doyurulmuş kloroformda hazırlanmış, ve cihaza çektilmiştir. Her bir karışım oranı için ayrı ayrı olmak üzere, iğnenin ucunda oluşturulan damlanın dengeye gelmesi beklenmiş ve yüzey gerilimi sabitlendikten sonra, fosfat tampon faza belirli hacimlerde fibrinojen çözeltisi enjekte edilerek yüzey gerilimindeki değişim incelenmiştir. Bu kısım için şematik deney sistemi damla fazında DPPC yerine DPPC/IPL karışımı olacak şekilde, Bölüm 3.3.2.1 ile aynıdır (Şekil 3.10). Bu deneyler

10, 50 ve 100 ppm fibrinojen konsantrasyonları ile tekrarlanmış ve değişen fibrinojen konsantrasyonu için ara yüzeydeki davranış karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar saf DPPC ve saf IPL için elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve karışımlardaki DPPC – IPL miktarına göre değişen sonuçlar yorumlanmıştır.

#### 3.3.2.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

Bu bölümde, Infasurf®'ün özelliklerine fibrinojen etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için IPL'nin tampona fazından sisteme verildiği deney koşulları ile aynı deney koşulları oluşturulmuştur. Bu koşulların ilkinde, fosfat tampon fazında bulunan Infasurf®'ün fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine adsorbe olması beklenmiş ve yüzey gerilimi dengeye geldikten sonra, tampon fazına küvetteki son konsantrasyonu 10, 50 ve 100 ppm olacak şekilde fibrinojen enjekte edilmiştir. Elde edilen yüzey gerilimi – zaman izoterminden Infasurf® yüzeye adsorbe olduktan sonra fibrinojenin ara yüzeye girip giremediği kısmi olarak belirlenmiş ve fibrinojenin yüzey gerilimine ne derecede etki edebildiği incelenmiştir. Böylece Infasurf® doğal yüzey aktif madde karışımı gibi kullanılmış ve bu deney düzeneği ile surfaktant inaktivasyonu modellenmiştir.

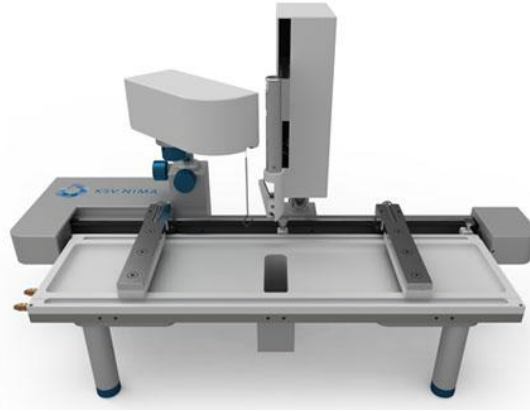


Şekil 3.13 Infasurf® ile fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu için kurulan deney sistemi İkinci sistem ise Infasurf® ile fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyon koşulundaki davranışlarının incelenmesi amacıyla kurulmuştur. Bu deney sistemi Şekil 3.13'te gösterilmiştir. Tampon çözelti ile dolu kuantal küvetin içinde kloroform damlası oluşturulmuş ve 0.026 mg/mL derişimindeki Infasurf® ile fibrinojen aynı anda küvete enjekte edilmiştir. Elde edilen yüzey gerilimi – zaman izoterminden sistemin

dinamik davranışı üzerinde hangi maddenin daha baskın olduğu incelenmiş ve elde edilen sonuçlar her birinin ara yüzeyde tek başlarına buldukları sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Böylece Infasurf®'ün ile fibrinojenin etkileşimi daha iyi anlaşılırken IPL ile de etkin bir kıyaslama yapılmıştır.

### **3.4. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin Ara Yüzey Özelliklerinin İki Boyutlu Sistem ile İncelenmesi**

Solunumun sürekli devam eden döngüsel bir proses olduğu düşünüldüğünde yüzey aktif maddelerin ara yüzey özellikleri ve döngüsel davranışları, dinamik adsorpsiyon özellikleri kadar önem kazanmaktadır. Dinamik adsorpsiyon ölçümleri, 3 boyutta analiz yapılabilen askıda damla tekniği ile yapılırken, maddelerin oluşturdukları tekli tabakaların yüzey davranışlarının karakterize edilmesinde Langmuir – Blodgett (LB) minitrough (Kibron, Finlandiya) cihazı kullanılmıştır. Yüzey basıncı ya da yüzey gerilimi ölçümleri için kullanılan LB cihazı, içi sıvıyla doldurulan bir tank, oluşturulan film tabakasının yüzeyinde istenilen hızda hareket edebilen Teflon® bariyerler ve elektrobals sistemine bağlı bir platin iğneden oluşmaktadır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Langmuir – Blodgett Cihazı

LB cihazının çalışma prensibi oldukça basittir: platin iğnenin, hava/sıvı ara yüzeyine indirilmesiyle sıvı tarafından iğneye uygulanan çekme kuvveti ölçülür ve bu kuvvet Eşitlik 3.2 kullanılarak yüzey gerilimine dönüştürülür. Yüzey gerilimi ise yüzey basıncına Eşitlik 3.3'teki gibi bağlıdır.



$$\gamma = \frac{F}{l \cdot \cos\theta} \quad (3.2)$$

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (3.3)$$

Bu cihaz özellikle yüzeye yayılmış film tabakaları (akciğer yüzey aktif maddesi gibi) ile çalışmak için uygundur. Yüzey alanındaki değişim ile değişen yüzey geriliminin ölçülmesi, nefes alış-veriş döngüsünü taklit edebilmek için çok uygundur ancak bu sistemle dinamik değil, daha çok statik özellikler incelenebilmektedir (Serrano and Perez-Gil, 2006).

Ara yüzey etkileşimlerinin incelenmesinde tüm deneyler hava/sıvı ara yüzeyinde gerçekleştirilmiş ve sıvı faz olarak fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Kullanılan tampon, Infasurf® içeren deneyler için içeriğinde 200 mM NaCl, 32 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 93 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O olacak şekilde hazırlanmış, diğer deneylerde ise 150 mM NaCl, 32 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 93 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O içeren tampon kullanılmıştır. pH'ı 7.4 olan bu iki tampon çözeltisinin kullanılma amacı, akciğer ortamının taklit edilebilmesidir (Kim and Franses, 2006). Her deney öncesinde cihaz ultra saf su (18 mΩ.cm) kullanılarak kalibre edilmiştir. Platin iğne her ölçümden önce ve sonra su, etanol, saf su ile temizlenmiş ve sterilize etmek için kızgın alevde yakılmıştır. Kullanılacak Teflon® tank ve bariyerler de aynı şekilde deney öncesinde su, etanol ve saf su ile temizlenmiş ve kurutulmuştur. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (22°C). Elde edilen sonuçlar ±0.01 mN/m hassasiyetindedir.

#### **3.4.1. IPL'nin Kritik Misel Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

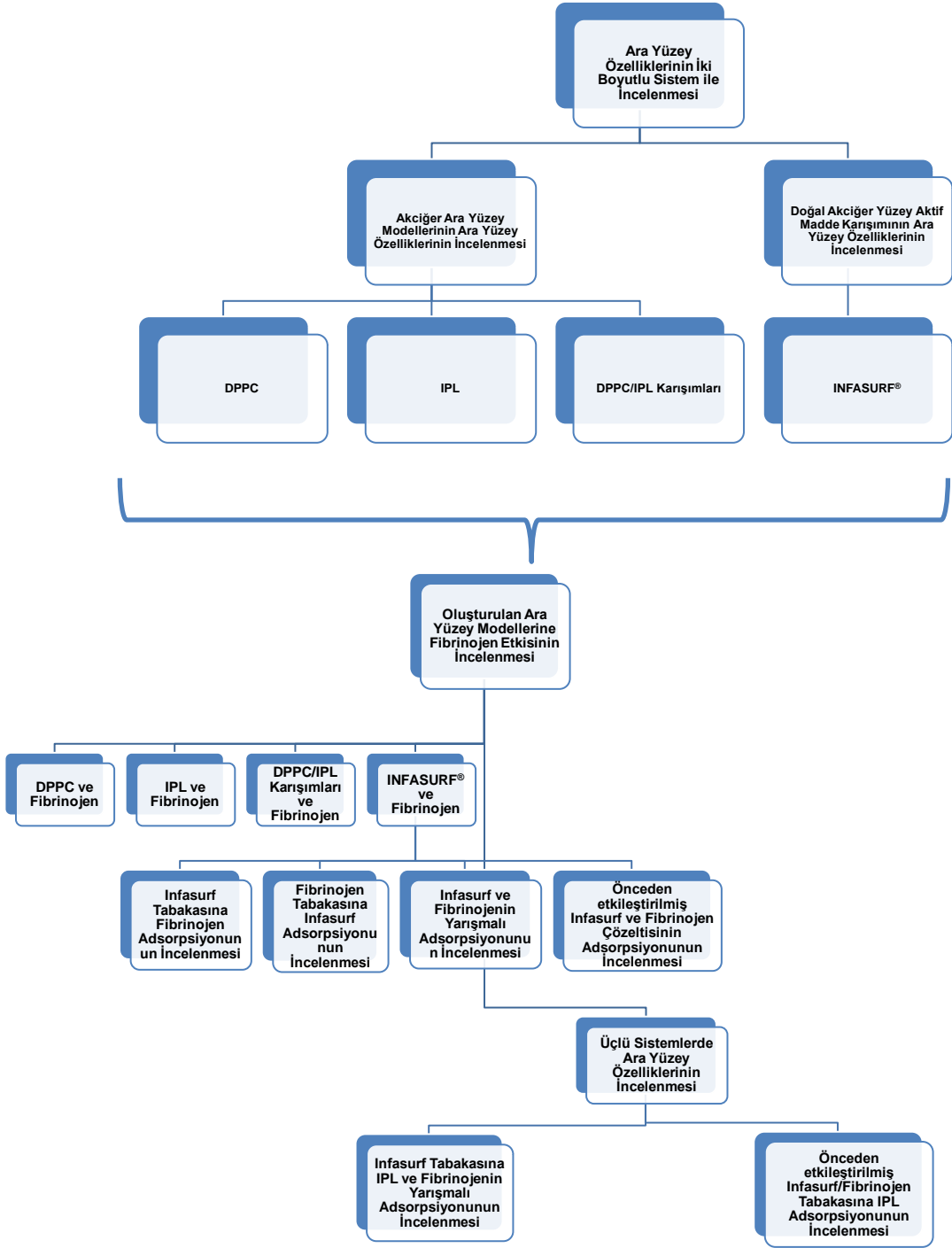
Yüzey aktif maddenin hidrofobikliğinin ve yüzey aktivitesinin bir göstergesi olan Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK), surfaktantlar için önemli bir parametredir. Çalışmada sentezlenen IPL molekülünün kritik misel konsantrasyonunun belirlenmesi için 7 farklı derişimde hazırlanan IPL'nin sulu çözeltilerinin hava/su ara yüzeyinde yüzey gerilimleri zamana karşı ölçülmüş ve her bir çözeltinin dengeye geldiği denge yüzey gerilimi kaydedilmiştir. Daha sonra konsantrasyon değerlerinin logaritması alınarak

yüzey gerilimi - logC grafiği elde edilmiştir. Bu grafikteki keskin kırılma noktası, IPL'nin KMK değerini vermektedir.

Kritik misel konsantrasyonunun belirlenmesi dışında, LB cihazı ile yapılan deneyler zamanla basınç değişimi ve değiştirilen yüzey alanına karşı basınç değişimi olarak ikiye ayrılmaktadır. Her deney için kullanılacak yığın faz 58 mL hacmindeki tanka doldurulmuş ve hava/sıvı ara yüzeyine enjekte edilecek maddeler uygun çözücülerinde çözdürüldükten sonra mikro şırınga ile yüzeye yayılmıştır. DPPC, IPL ve DPPC-IPL karışımları için hidrofobik çözücü olarak hacimce 90/10 oranında hekzan/etanol kullanılmış ve karışım yüzeye enjekte edildikten sonra belirli bir süre (~10 dakika) çözücünün uzaklaşması beklenmiştir. Fibrinojen için ise çözücü olarak 150 mM'lık fosfat tampon kullanılmıştır. Bir serum proteini olan fibrinojenin yüzey aktivitesi çözelti haline getirildikten 4 saat sonra azalmaktadır (Hernandez et al., 2002). Dolayısıyla yapılan deneyler bu durum dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde yüzey basıncının zamanla değişimi kaydedilmiş ve sistemde daha fazla değişim görülmediği noktada (basıncın dengeye gelmesinden sonra) Teflon® bariyerlerin 140.250 mm/dakika hızında sıkıştırılıp – açılmasıyla değişen yüzey alanına karşı basınç değişimi kaydedilmiştir. Elde edilen izotermler ile ara yüzeyde bulunan maddeler ile ilgili yorum yapılmıştır.

### **3.4.2. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi**

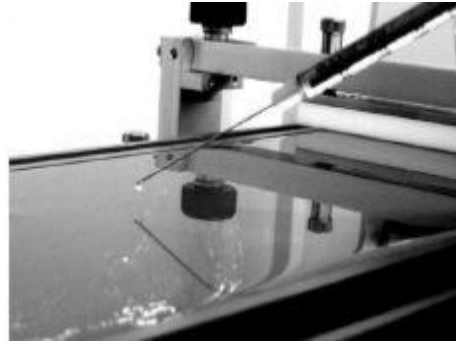
Tez kapsamında ara yüzey özelliklerinin 2 boyutta incelenmesi çalışmaları Şekil 3.15'te akış şeması ile gösterilen sistematik sıra izlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu sıralamanın takip edilmesiyle veri takibi kolaylaşırken, elde edilen sonuçların birbirine göre daha sağlıklı bir şekilde yorumlanması sağlanmıştır.



Şekil 3.15 Ara yüzey özelliklerinin iki boyutlu system ile belirlenmesi için oluşturulan akış şeması

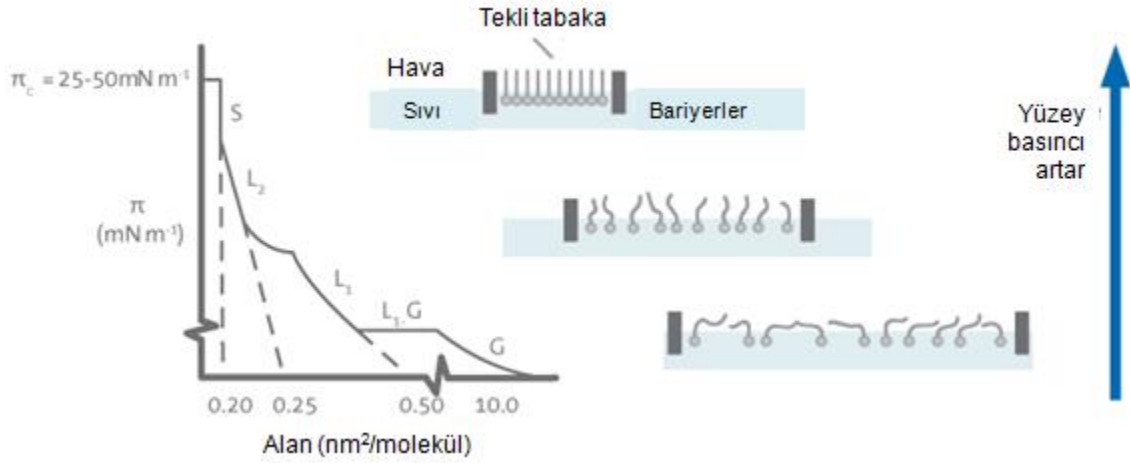
### 3.4.2.1. DPPC'nin, IPL'nin ve DPPC – IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

DPPC, IPL ve molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımları 90/10 (v/v) hekzan/etanol karışım ile çözdürülmüş ve tekli tabakanın oluşumu için tampon yığın fazının yüzeyine mikro şırınga ile yayılmışlardır (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 LB cihazında hava/sıvı ara yüzeyine mikro şırınga ile örnek yayılması

Çözücünün uçması beklendikten sonra sabit hızda sıkıştırılıp – genişletilmiş ve böylece yüzeyin dögüsel davranışı incelenmiştir. Şekil 3.17'de sıkıştırma izoterminin elde edişii şematik olarak gösterilmiştir. LB tankı yüzeyinde oluşan film tabakası 2 boyutlu olarak kabul edilmektedir. Nefes alış – verişi dögüsel bir prosestir, dolayısıyla tasarlanan bu deney sistemi ile solunum 2 boyutta modellenmiştir. DPPC için elde edilen karakteristik izoterm, literatürle karşılaştırılmış ve sistem ile doğru ölçüm alınabildiği belirlenmiştir. Bariyerlerin sıkıştırılıp – genişletilmesiyle elde edilen izotermeler, her bir sistemin karakteristik histeresiz davranışını vermiş ve her bir çevrimde ara yüzey davranışı incelenmiştir.



Şekil 3.17 LB cihazı kullanılarak sıkıştırma izoterminin elde edilişi

### 3.4.2.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®'ün) Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

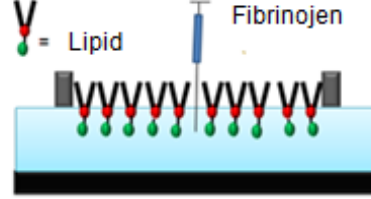
RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan Infasurf®'ün hava/fosfat tampon ara yüzeyine adsorpsiyon kinetiğinin ve döngüsel davranışının incelenmesi, çalışmanın diğer basamakları için kritik bir adımdır. Bu kısım için, 200 mM'lık tampon çözelti ile doldurulmuş LB tankına, 35 mg/mL'lik stok Infasurf® şişesinden 1.5 µL enjekte edilmiş ve enjekte edilme anı ile birlikte zamanla yüzey basıncı değişimi kaydedilmiştir. Basıncı sabitlendikten, yani ara yüzey dengeye ulaştıktan sonra, bariyerler sabit bir hızda sıkıştırılıp – genişletilmiş ve böylece Infasurf® için döngüsel davranış belirlenmiştir. Alınan veriler literatür ile karşılaştırılarak içerisinde protein ve lipidler bulunan ve doğal bir karışım olan Infasurf®'ün yüzey aktivitesinin ve davranışının düzgün olduğundan emin olunmuştur. Bu kısım için kurulan deney sistemi bir önceki bölüm ile aynıdır.

### 3.4.3. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

#### 3.4.3.1. DPPC'nin, IPL'nin ve DPPC/IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

Daha önce bahsedildiği gibi surfaktant inaktivasyonu, alveollerde akciğer yüzey aktif maddesi varken, kan proteinlerinin alveol boşluğuna sızması sonucunda

gerçekleşmektedir. Tez çalışmasının bu bölümünde, amaçlanan da inaktivasyon olayını modellemek ve sentezlenen IPL molekülünün bu duruma ne gibi bir etki yapacağını incelemektir. Bu amaç doğrultusunda kurulan deney seti Şekil 3.18’de gösterilmiştir.



Şekil 3.18 DPPC, IPL ve DPPC – IPL karışımlarının ara yüzey özelliklerine fibrinojenin etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

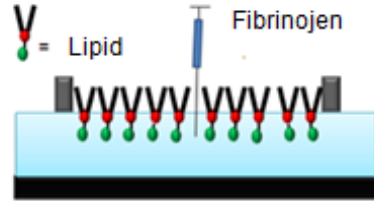
DPPC, IPL ve değişik mol oranlarındaki DPPC/IPL karışımlarının hava/fosfat tampon ara yüzeyinde tekli tabakaları oluşturulduktan sonra, yığın faza, ara yüzey bozulmadan tanktaki son konsantrasyonu 550 ppm olacak şekilde fibrinojen enjeksiyonu yapılmıştır. Her farklı madde için tanka fibrinojenin enjekte edilmesiyle birlikte basıncın zamanla değişimi ölçülmüş ve elde edilen veriler, ara yüzeyde fibrinojen yokken elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır. Ara yüzey dengeye ulaşır, yüzey basıncı sabit bir değere ulaştıktan sonra ise bariyerler sabit hızda sıkıştırılıp – genişletilerek ara yüzeyin dögüsel davranışı incelenmiştir. Elde edilen basınç – alan izotermi, ara yüzeyde sadece DPPC, IPL ya da farklı mol oranlarındaki DPPC/IPL karışımlarının bulunduğu sıkıştırma izotermi ile karşılaştırılmış ve fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olarak yüzeyi bozup bozmadığı, ara yüzeyden madde kaybına neden olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca bu deney sonuçları ile, IPL'nin DPPC ile karıştığında fibrinojenin DPPC üzerindeki etkisinin ne yönde değiştiği de incelenmiştir.

#### **3.4.3.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Bu bölümde kan proteinlerinin ara yüzeye adsorpsiyonunu belirli miktar engelleyen Infasurf®'ün ortamda fibrinojen varlığında gösterdiği ara yüzey özellikleri incelenmiştir. Bu iki maddenin birbirleri ile etkileşimlerinin detaylı olarak incelenebilmesi için kurulan deney setleri 4 alt bölümden oluşmaktadır.

### 3.4.3.2.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Ara yüzeyde sadece Infasurf® bulunduğunda elde edilen sonuçlarla karşılaştırma yapılabilmesi için, bu kısımda kullanılan Infasurf® miktarı, saf Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerinin incelendiği kısım ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır. 200 mM'lık fosfat tampon yığın fazına 1.5 µL Infasurf® enjekte edilmiş ve enjeksiyon anından itibaren kaydedilmeye başlayan basınç değeri sabitlenene kadar beklenmiştir. Daha sonra fosfat tamponda hazırlanan fibrinojen çözeltisi, tanktaki son konsantrasyonu 550 ppm olacak şekilde, önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına enjekte edilmiştir (Şekil 3.19). Zamanla yüzey basıncındaki değişim kaydedilmiş ve elde edilen izoterm, saf Infasurf® için elde edilen izotermle karşılaştırılmıştır. Basınç sabitlendikten sonra ise, diğer bölümlerde yapıldığı gibi ara yüzeydeki tabakanın sıkıştırılıp – genişletilmesiyle basınç – alan izotermi elde edilmiş ve alınan sonuçlar Infasurf®'ün döngüsel davranışı ile karşılaştırılmıştır.



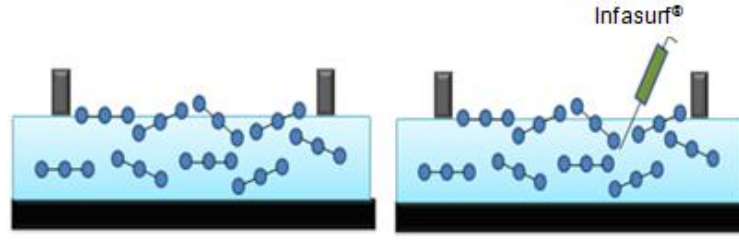
Şekil 3.19 Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerine fibrinojenin etkisinin incelenmesi için kurulan deney sistemi

Kurulan bu sistem ile aslında Infasurf®, doğal akciğer yüzey aktif madde karışımı olarak kullanılmış yani, gerçek sistem taklit edilmiştir. Ara yüzeyde protein ve lipidlerden oluşan bu karışım varken, fibrinojenin sistem üzerindeki etkisi incelenmiş ve ara yüzeyin negatif yönde etkilenmesini önleyecek alternatif çözüm yolları geliştirilmiştir.

### 3.4.3.2.2. Fibrinojen Tabakasına Infasurf® Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Infasurf® ve fibrinojenin etkileşimlerinin daha iyi anlaşılması için bir önceki bölümde kurulan sistem değiştirilmiş ve bu bölümde daha önceden oluşturulan fibrinojen tabakasına Infasurf®'ün adsorpsiyon özelliği incelenmiştir.

550 ppm net konsantrasyonda olacak şekilde 200 mM'lık fosfat tampon fazına yayılan fibrinojen çözeltisi için yayılma anından itibaren zamanla basınç ölçümleri alınmış ve basınçta daha fazla değişim olmadığı tespit edildikten sonra, alt faza Infasurf® enjekte edilmiştir (Şekil 3.20). Elde edilen basınç – zaman izotermi iki madde için elde edilen izotermler ile karşılaştırılmıştır.

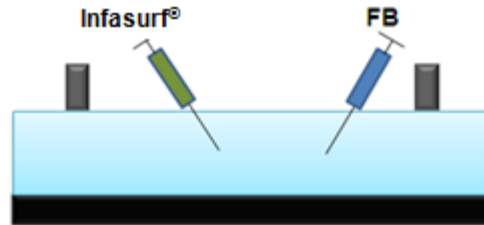


Şekil 3.20 Fibrinojen tabakasına Infasurf® adsorpsiyonunun incelenmesi için kurulan deney sisteminin şematik gösterimi

Ara yüzeydeki basıncın dengeye gelmesiyle birlikte, bariyerlerin sıkıştırılıp – genişletilmesiyle basıncın yüzey alanı ile değişimi ölçülmüş ve alınan sonuçlar yine Infasurf® ve fibrinojenin karakteristik döngüsel davranışları ile karşılaştırılmıştır.

#### 3.4.3.2.3. Hava/Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Infasurf® ve Fibrinojenin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Bu kısımda ise iki madde 200 mM'lık fosfat tampon yığın fazına aynı anda enjekte edilerek hava/tampon ara yüzeyine yarışmalı adsorpsiyon sistemi oluşturulmuştur (Şekil 3.21).



Şekil 3.21 Infasurf® ve Fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonunun incelenmesi için kurulan deney sistemi



Bu deney sistemi ile aynı alt faza enjekte edilen maddeler orada etkileşebilmekte ve alınan ölçümler hem etkileşimin sonucunu, hem de maddelerin birbirlerine göre adsorpsiyon hızları hakkında yorum yapılabilir. Diğer sistemlerde olduğu gibi bu deney sistemi için de enjeksiyon anından itibaren yüzey basıncı kaydedilmeye başlanmış ve basınç dengeye ulaştıktan sonra da ara yüzeydeki maddelerin döngüsel davranışı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar diğer sistemlerle karşılaştırılarak ara yüzeye fibrinojenin adsorbe olup olmadığı incelenmiştir.

#### **3.4.3.2.4. Hava/ Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Önceden Etkileştirilmiş Infasurf® - Fibrinojen Çözeltisinin Adsorpsiyonunun İncelenmesi**

Fibrinojenin Infasurf®'ün adsorpsiyon özelliklerini ve yüzey aktivitesini ne kadar ve nasıl etkilediğinin anlaşılabilmesi için hazırlanan bu deney setinde, Infasurf® ve fibrinojen, diğer bölümlerde kullanılan miktarları ile aynı olacak şekilde bir şişeye alınıp 1 saat kadar etkileştirilmiştir. Daha sonra bu karışım hava/tampon ara yüzeyine yayılarak, yayılım anından itibaren zamanla basınç değişimi kaydedilmiş ve elde edilen veriler her bir maddenin karakteristik basınç – zaman izotermi ile karşılaştırılmış ve etkileşimin hangi yönde olduğu konusunda incelemeler yapılmıştır. Daha sonra ise döngüsel davranış ara yüzeyin sıkıştırılıp – genişletilmesi ile incelenmiş ve bu sistem için alınan basınç – alan izotermi diğer sistemlerle karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

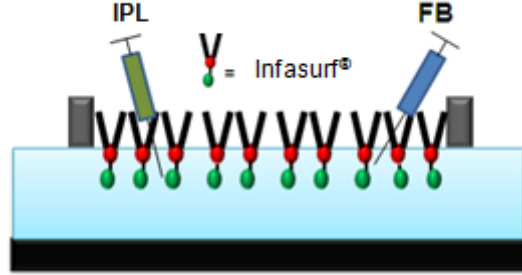
#### **3.4.4. Üçlü Sistemlerde Ara Yüzey Özelliklerinin ve Etkileşiminin Belirlenmesi**

Çalışma kapsamında kullanılan her bir maddenin birbiri üzerindeki etkisinin incelenmesi ve karşılaştırılmasından sonra, Infasurf®, IPL ve fibrinojen bu bölümde bir arada kullanılmıştır. Bu kısımda amaç, IPL molekülünün sistem üzerindeki etkisinin tam olarak anlaşılabilmesidir.

##### **3.4.4.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen ve IPL'nin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi**

IPL'nin fibrinojen ile önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasına yarışmalı adsorpsiyonunun incelenmesi, tez kapsamındaki kritik deney setlerinden biridir.

Akciğer ara yüzey modeli olarak kullanılan Infasurf<sup>®</sup>, hava/tampon ara yüzeyine yayılmış ve yüzey basıncının dengeye gelmesinden sonra, alt faza IPL ve fibrinojen aynı anda enjekte edilmiştir. Kurulan deney sistemi Şekil 3.22’de gösterilmiştir.



Şekil 3.22 Infasurf<sup>®</sup> tabakasına fibrinojen ve IPL'nin yarışmalı adsorpsiyonunun incelenmesi için kurulan deney sistemi

Zamana karşı basınç verileri alındıktan sonra ise ara yüzeydeki tabakanın dögüsel davranışı incelenmiştir. Kurulan bu sistem ile ara yüzeyin geldiği denge basıncından ve dögüsel davranıştan, hem IPL ile fibrinojenin adsorpsiyon kinetikleri karşılaştırılmış, hem de Infasurf<sup>®</sup> tabakasına adsorpsiyonun sağlanıp sağlanmadığı alınan verilerle saf Infasurf<sup>®</sup>, saf fibrinojen ve saf IPL izotermeleri ile karşılaştırılarak araştırılmıştır.

#### **3.4.4.2. Önceden Etkileştirilmiş Infasurf<sup>®</sup>/Fibrinojen Tabakasına IPL Adsorpsiyonunun İncelenmesi**

Bu kısımda Infasurf<sup>®</sup> ile fibrinojenin dışarıda etkileştirilip ara yüzeye yayıldıktan sonra karışımın oluşturduğu tabakaya IPL molekülünün adsorpsiyonu ve oluşan tabakanın ara yüzey özellikleri incelenmiştir. IPL'nin etkisinin araştırıldığı deney, aslında inaktivasyona uğramış ve özellikleri bozulmuş bir doğal akciğer yüzey aktif madde karışımının özelliklerinin IPL tarafından nasıl düzeltilebileceği hakkında yol gösterici olmuştur. Dolayısıyla ARDS hastalığı sonucu alveollerde oluşan ara yüzey bu sistem ile modellenmiştir. Önceden etkileştirilmiş karışım, hava/tampon ara yüzeyine yayılmış ve basınç dengeye geldikten sonra suda çözülmüş IPL, alt faza enjekte edilmiştir. Ölçülmeye devam eden basınç değeri dengeye geldikten sonra, bariyerler sabit hızda sıkıştırılıp – genişletilmiş ve böylece dögüsel davranışın incelenmesi için

basınç – alan değerleri elde edilmiştir. Bu bölümden elde edilen sonuçlar önceden etkileştirilmiş Infasurf®/Fibrinojen karışımının sonuçları ile kıyaslanmış ve IPL'nin ara yüzey özelliklerine sağladığı katkı incelenmiştir.

#### **3.4.5. Ara Yüzeye Adsorbe Olan Fibrinojen Miktarındaki Değişimin Belirlenmesi**

IPL molekülü yapısında PEO grubu içeren ve kan proteinlerinin ara yüzeye adsorpsiyonunu engelleme, ara yüzeydeki doğal karışım ile karışabilme ve karışımın adsorpsiyon özelliklerini zenginleştirebilme özelliklerine sahip bir yapı oluşturma amacıyla sentezlenen bir moleküldür. Çalışmanın bu bölümünde IPL molekülünün ara yüzeyde bulunduğu durumlarda, fibrinojenin adsorpsiyonu üzerindeki etkisi araştırılmış ve IPL'nin fibrinojen proteininin ara yüzeye adsorpsiyonunu ne kadar azalttığı incelenmiştir.

Bu kısımda, LB cihazında oluşturulan ara yüzeyler katı bir yüzeye transfer edilmiş ve kaplanan yüzey FT-IR analizi ile incelenmiştir. LB cihazında ara yüzeyin transfer edileceği madde kağıt olarak seçilmiştir. Boş kağıdın FT-IR cihazı (Nicolet 6700 Thermo Scientific) ile analizi sonucunda spektrumda proteinlerin varlığını belirten Amid I ve Amid II piklerinin oluşmadığı görüldükten ve bu sonucun literatüre de uygun olduğu anlaşıldıktan sonra (Feustel et al., 2009), LB cihazına tanktaki son konsantrasyonu 550 ppm olacak şekilde fibrinojen çözeltisi konulmuştur. Yüzey basıncının dengeye gelmesi beklenmiş ve oluşan tabaka kağıda transfer edilmiştir. Kaplanan kağıt 24 saat 37°C'de kurutulduktan sonra 5 farklı noktadan alınan FT – IR ölçümleri ile analiz edilmiştir. Elde edilen spektrumda 1650 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki % geçirgenlik değeri ölçülmüş ve ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunduğu durumdaki % geçirgenlik değeri için fibrinojen miktarı %100 olarak kabul edilerek bu değer referans alınmıştır. Bu yöntem kullanılarak, ara yüzeye adsorbe olmuş fibrinojen miktarındaki değişimin bulunması için fibrinojenin ara yüzeye etkisinin incelendiği sistemler oluşturulmuş ve bu ara yüzeyler, kağıtlara transfer edilmiştir. Çalışma kapsamında ara yüzeydeki fibrinojen miktarındaki değişimin incelendiği ara yüzeyler Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

LB ara yüzeyinde oluşturulan tabaka ile kaplanmış kağıtlar 24 saat 37°C'de kurutulmuştur. Kaplanan kağıt yüzeyleri, FT-IR ile analiz edilmiş, elde edilen spektrumdan 1650 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki % geçirgenlik değeri ölçülmüştür. Ölçülen % geçirgenlik değerindeki değişim kullanılarak, saf fibrinojen ara yüzeyde iken %100 olarak kabul edilen miktarın ne kadar azaltıldığı göreceli olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunun engellenmesinde IPL ve Infasurf<sup>®</sup>ün etkinlikleri kıyaslanmıştır.

Çizelge 3.1 Ara yüzeyde bulunan fibrinojen miktarının belirlendiği ara yüzeyler

---

**Saf fibrinojen**

**Saf DPPC**

**Molce %90 DPPC - %10 IPL tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonu**

**Molce %80 DPPC - %20 IPL tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonu**

**Molce %70 DPPC - %30 IPL tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonu**

**Saf IPL**

**Fibrinojen tabakasının alt fazına Infasurf<sup>®</sup> enjeksiyonu**

**Infasurf<sup>®</sup> tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonu**

**Infasurf<sup>®</sup> tabakasının alt fazına 0.005 mM IPL ile fibrinojenin aynı anda enjeksiyonu**

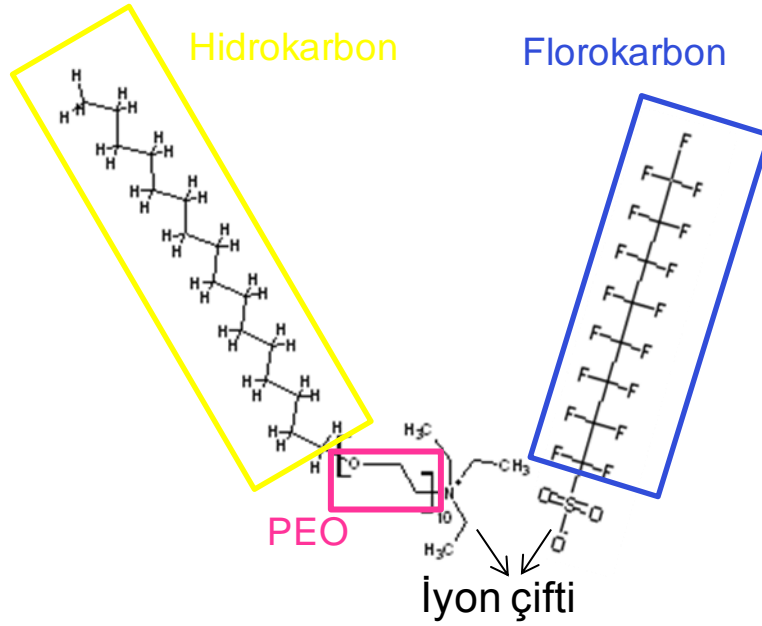
**Infasurf<sup>®</sup> tabakasının alt fazına 0.0002 mM IPL ile fibrinojenin aynı anda enjeksiyonu**

---

## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI

### 4.1. Molekül Yapısının Tasarımı

Çalışma kapsamında özel tasarlanmış florokarbon-hidrokarbon zincirleri içeren iyon çifti hibrit yüzey aktif madde, IPL, kullanılmıştır (Şekil 4.1). Sentezlenen molekülün kullanım amacı, akciğer yüzey aktif madde karışımının ortamdaki kan proteinleri tarafından inaktivasyona uğradığı durumdaki etkilerini giderebilecek ve serum proteinlerinin dinamik koşullarda ara yüzeye adsorpsiyonunu engelleyebilecek bir sistem elde edebilmektir. IPL molekülündeki her bir segment belirli bir amaca yönelik olarak tasarlanmıştır.



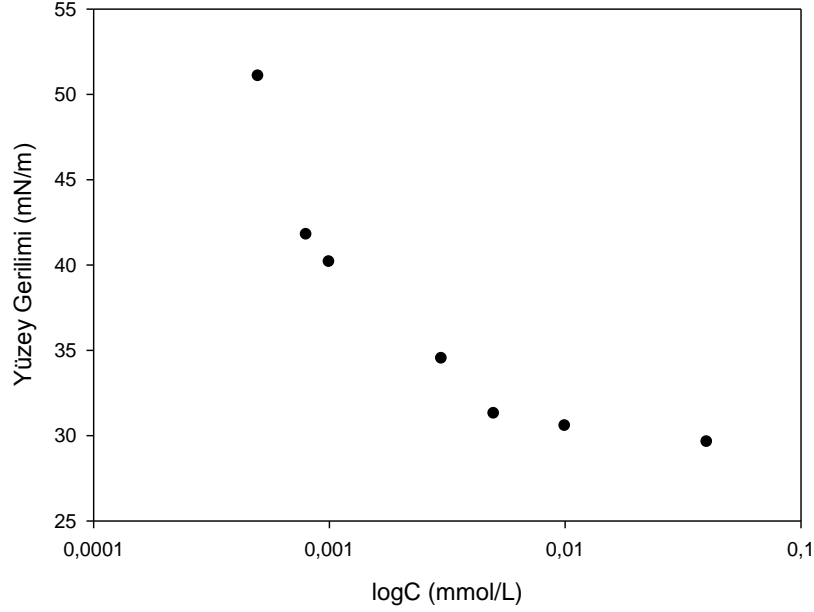
Şekil 4.1 IPL yüzey aktif maddesinin molekül yapısı

Molekül formülü  $C_{42}H_{88}NO_{10}^{+}C_8F_{17}O_3S^{-}$  olan IPL molekülü, değişik kısımlardan oluşmaktadır. Molekül, lipid sistemleri ile birlikte kullanılacağı için lipid tabakasıyla karışabilen ve bu tabakayla pozitif etkileşime girebilen bir yapıda olmalıdır. İyon – çifti olarak tasarlanan IPL'nin akciğer yüzey aktif maddesinde miktarca en çok bulunan lipid olan DPPC ile karışabildiği ve sinerjik etkileşim oluşturduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. IPL molekülü DPPC ile birlikte kullanıldığı sistemlerde akciğer yüzey aktif madde karışımında ara yüzeyden madde kaybını önleyen, ara

yüzeyin sıkıştırılabilirliğini ve dayanım basıncını arttıran SP-B proteinin görevini üstlenebilmektedir (Uslu, 2009). Bu önemli işlevinin yanında, sentezlenen IPL molekülünün ara yüzey ile uygun etkileşime girebilmesi, ve dinamik koşullarda kan proteinleri ile yarışmalı adsorpsiyona girerek hızlı bir şekilde ara yüzeye adsorbe olabilmesi beklenmektedir. IPL'nin yapısındaki hidrokarbon ve florokarbon kuyruk grupları moleküle yüksek hidrofobik özellik katmakta, yüksek hidrofobikliğin de adsorpsiyon hızını arttıracığı düşünülmektedir. Florokarbonlar ayrıca, dahil oldukları yapıya gaz geçirgenliği, akışkanlık, mekanik ve termal dayanıklılık gibi pozitif özellikler katmaktadırlar. Literatürden elde edilen bilgilere göre yapıda bulunan florokarbon zinciri, 8 karbondan daha uzun zincir uzunluğunda ise, vücut tarafından etkisiz olarak algılanmakta ve böylece molekül vücutta toksik etki göstermemektedir. Maddenin yapısındaki PEO grubunun, tezin asıl amacı doğrultusunda surfaktant inaktivasyonuna neden olan kan proteinlerinin ara yüzeye adsorpsiyonunu önleyebilecek bir sistem oluşturmada etkin olacağı düşünülmektedir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda PEO grubunun, proteinlerin ara yüzeye adsorpsiyonunu kısmi olarak önleyebildiği görülmüştür (Liu et al., 2007). Ayrıca bu özel tasarlanmış molekül, sadece sahip olduğu PEO grubu ile değil, yapısındaki her segmentin birbirini pozitif yönde etkilemesi sonucu bir bütün olarak gösterdiği hidrofobik özellik, dinamik adsorpsiyon özelliği, difüzyon hızı ve ara yüzeyde aldığı konformasyon ile kan proteinlerinin ara yüzeye adsorbe olmalarını engellemek amacıyla kullanılacaktır.

Yüzey aktif maddelerin hidrofobiklik derecesi, ara yüzeye adsorpsiyon hızlarını doğru orantılı olarak etkilemektedir. Dolayısıyla, tez kapsamında öncelikte yüksek saflıkta sentezlenen IPL molekülü için Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK) belirlenmiştir. Yapısal olarak yüzey aktif maddeler buldukları ortamlarda ara yüzeye adsorbe olma eğilimi taşımaktadırlar. Ancak, ortamda belirli bir konsantrasyonun üzerinde buldukları durumda, sistemin entropisine ve serbest enerjisine bağlı olarak kümeleşmeler oluşturabilmektedir. Misel adı verilen bu kümeleşmelerin oluşumu ara yüzey enerjisinin azaltılabilmesi nedeniyle adsorpsiyona alternatif bir mekanizmadır. Misel oluşumunun başladığı ilk konsantrasyon değeri o madde için kritik misel konsantrasyonu olarak belirlenmektedir. IPL için kritik misel konsantrasyonu maddenin sulu çözeltisinin değişik konsantrasyonları için yüzey gerilimi ölçümleri ile

bulunmuştur. Elde edilen verilerden kritik misel konsantrasyonunun belirlenebilmesi için her bir derişim değerine karşılık o derişimde ara yüzeyin sahip olduğu denge yüzey gerilimi değerleri grafiğe geçirilmiş (Şekil 4.2) ve grafikteki kırılma noktasından, IPL molekülünün KMK değeri 0.008 mM olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.2 IPL molekülü için sulu çözeltideki yüzey gerilimi (mN/m) – logC (mmol/L) grafiği

Literatürle yapılan karşılaştırmalara göre, 0.008 mM olarak elde edilen kritik misel konsantrasyonu, yapısındaki hidrofilik gruplara rağmen, IPL molekülünün oldukça hidrofobik olduğunu göstermektedir. Örneğin ticari olarak kullanılan ve molekül yapısındaki florokarbon zincir uzunluğu ve sulfonat grupları IPL'nin yapısındaki gruplar ile aynı olan perflorooktansülfonat (PFOS) yüzey aktif maddesinin KMK değeri 1.05 mM'dır (Gente et al., 2000). Ayrıca, IPL ile hava/su ara yüzeyinde ulaşılabilen minimum yüzey gerilimi 30 mN/m'dir ve bu değeri de, IPL'nin oldukça yüzey aktif bir molekül olduğunu göstermektedir. Sürfaktant inaktivasyonunun giderilebilmesi için molekülün yüksek hidrofobikliğe sahip olması en önemli ön koşullardan birisidir (Robertson and Halliday, 1998).

Tez kapsamındaki birincil amaç IPL'nin değişik koşullarda ve sistemlerde dinamik adsorpsiyon özelliklerinin belirlenmesidir. Etkili bir yüzey aktif maddenin yüzey gerilimini kısa sürede istenilen değerlere düşürebilmesi çok önemlidir. Moleküllerin bu özellikleri, ancak dinamik davranışlarının belirlenmesi ile anlaşılacaktır. Molekülün dinamik davranışını belirlemek için çalışmanın devamında çeşitli yöntemler ve sistemler kullanılarak dinamik adsorpsiyon ölçümleri alınmış ve yorumlanmıştır.

## **4.2. Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi**

Çalışmanın bu kısmında IPL molekülünün tek başına ve DPPC ile birlikte değişik oranlardaki karışımları için farklı sistemlerde ve farklı ara yüzeylerde dinamik adsorpsiyon ölçümleri alınmış ve molekülün ara yüzeyde meydana getirdiği değişiklikler yorumlanmıştır. Sürfaktant inaktivasyonuna neden olan başlıca serum proteini fibrinojenin de değişik konsantrasyonları için dinamik davranış belirlenmiş ve son olarak ARDS durumundaki bir akciğer ara yüzeyi modellenerek ortamda fibrinojen ve DPPC bir arada, fibrinojen ve IPL bir arada ve fibrinojen ve IPL/DPPC karışımları bir arada bulundurulurken, IPL'nin sistem üzerine etkisi araştırılmıştır. Dinamik adsorpsiyon çalışmaları kapsamında ayrıca, RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan ve buzağı akciğer lavajından elde edilen Infasurf<sup>®</sup>'ün adsorpsiyon özellikleri de tespit edilmiş ve daha sonra fibrinojen varlığındaki davranış karakterize edilmiştir. Dinamik adsorpsiyon özelliklerinin incelenmesi için Askıda Damla Cihazı kullanılmış ve farklı sistemlerde yüzey geriliminin zamanla değişim izotermi elde edilmiştir. İlk olarak kurulan çalışma sistemi ile alınan verilerin güvenilirliğinin tespit edilmesi adına, çalışmanın devamında kullanılacak olan ve akciğer yüzey aktif madde karışımında miktarda en çok bulunan DPPC lipidinin dinamik adsorpsiyon özellikleri belirlenmiş ve literatür çalışmalarıyla kıyaslanmıştır.

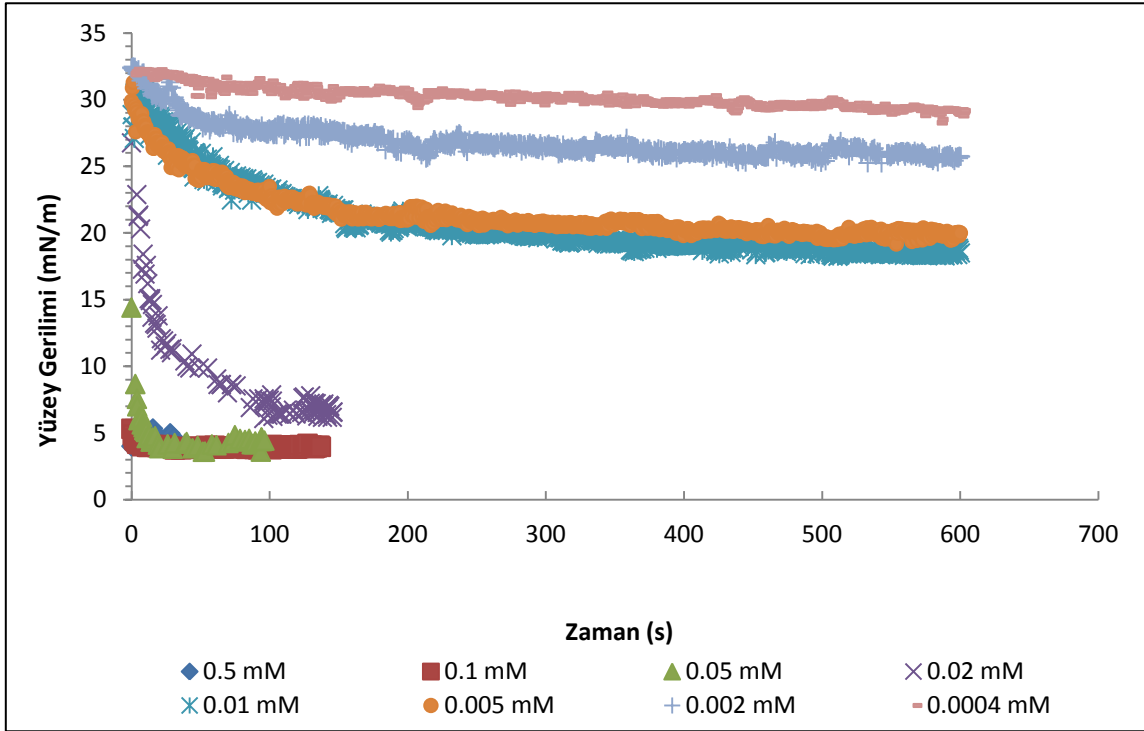
### **4.2.1. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi**

#### **4.2.1.1. DPPC'nin Dinamik Davranışının Belirlenmesi**

Literatürde fosfolipidlerin ve proteinlerin sıvı – sıvı ara yüzeylerindeki dinamik davranışları incelenirken genel olarak, birbiriyle karışmayan sulu çözelti / organik

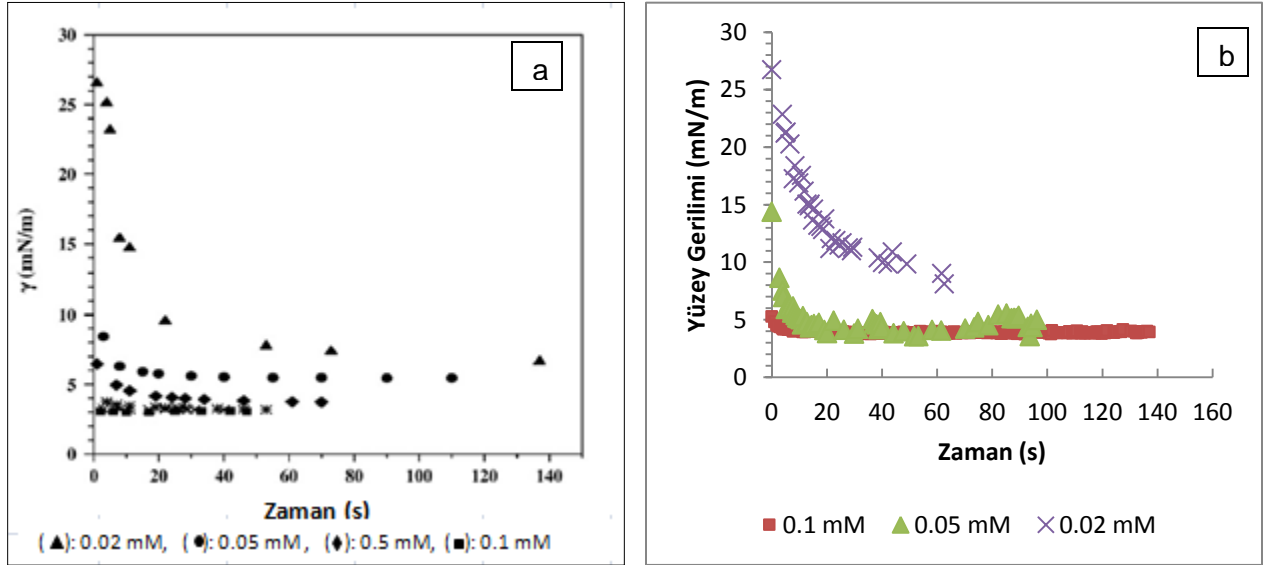


çözücü fazları arasındaki yüzey gerilimi değişimleri incelenmiştir. Proteinler sulu fazda, fosfolipidler ise yağ fazında yani organik fazda çözüneceği için bu sistemde çalışmak dinamik adsorpsiyon özelliklerinin belirlenebilmesi için çok uygundur. Bu şekilde yüzey aktif madde ve protein, farklı fazlardan ara yüzeye adsorbe olacak ve birbirleriyle etkileşime girmeden ara yüzeye taşınabileceklerdir. Dolayısıyla moleküllerin birbirleri ile temas edecekleri ve etkileşime girecekleri tek yer ara yüzey olacak ve böylece elde edilecek adsorpsiyon karakteristiği doğrudan lipid/protein etkileşimini yansıtacaktır (Li et al., 1999; He et al., 2008). Bu doğrultuda literatür çalışmalarının da ışığında lipidlerin çözüneceği faz kloroform olarak seçilmiş; sulu faz olarak ise pH'ı 7.4 olan fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Böylece hem akciğer sistemine uygun bir ortam yaratılacak, hem de çalışmanın ileriki kısımlarında surfaktant inaktivasyonunun taklit edildiği sistemlerde ortama fibrinojen proteini ekleneceğinden fibrinojenin çözünebileceği bir çözücü kullanılmış olacaktır.



Şekil 4.3 Değişik konsantrasyon değerleri için DPPC'nin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde dinamik yüzey gerilimi ölçümleri

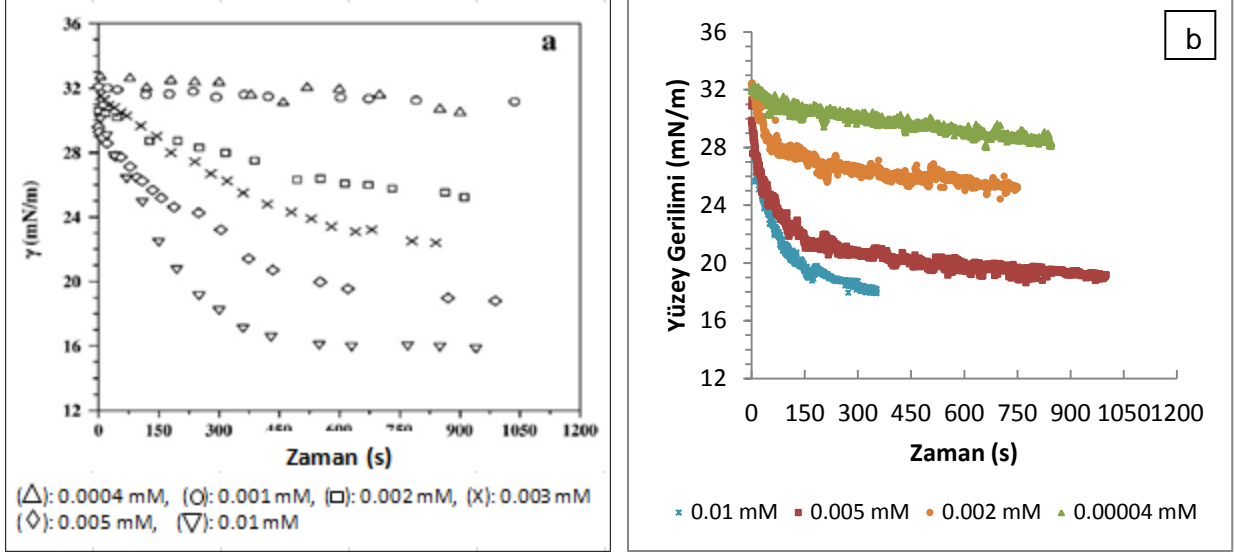
Şekil 4.3'te DPPC lipidi için geniş bir derişim aralığında fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde elde edilen dinamik yüzey gerilimi izotermi bulunmaktadır. Elde edilen profil literatürden elde edilen verilerle uyumludur. Ölçümler 32 mN/m değerinden başlamaktadır, çünkü ortamda hiç yüzey aktif madde yokken ölçülen fosfat tampon/kloroform fazlarının ara yüzey gerilimi literatürde de olduğu gibi 32.8 mN/m olarak elde edilmiştir (Zeppieri et al., 2001). He ve arkadaşları tarafından da elde edilen DPPC'nin yüzey gerilimi – zaman izotermi, daha iyi yorum yapabilmek adına yüksek konsantrasyon bölgesi ve orta/düşük konsantrasyon bölgesi olmak üzere iki bölgeye ayrılarak incelenmiştir. Bu bölgeler için literatür örnekleri ve bizim tarafımızdan alınan ölçümler Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.4 Yüksek konsantrasyon aralığında DPPC için  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi: (a) literatürde kloroform/su ara yüzeyinde verilen (He et al., 2008), (b) çalışma kapsamında kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilmiş

Yüksek konsantrasyon değerlerinde beklenildiği gibi DPPC, yüzey gerilimini çok kısa sürede çok düşük değerlere indirmektedir. Gerçek sistemde akciğer yüzey aktif madde karışımının yüzey gerilimini düşürmesinde en önemli rolün DPPC'nin olduğu düşünüldüğünde, bu sonuç beklenen bir sonuçtur (von Nahmen et al., 1997). 0.02 mM'in üzerindeki konsantrasyonlardaki çözeltiler neredeyse askıda damlanın oluşturulduğu anda doğrudan denge yüzey gerilimlerine ulaşmışlardır. Konsantrasyon

arttıkça denge yüzey gerilimine ulaşma süresi kısalmaktadır. 0.4 mM ve üzeri konsantrasyonlar için ise yüzey gerilimi zamandan bağımsız hale gelmiştir. Başka bir deyişle, damla oluşturulur oluşturulmaz sistem denge haline ulaşmıştır (He et al., 2008).



Şekil 4.5 Orta ve düşük konsantrasyon aralığında DPPC için  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi: (a) literatürde kloroform/su ara yüzeyinde verilen (He et al., 2008), (b) çalışma kapsamında kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen

Orta ve düşük dereceli konsantrasyonlar için alınan veriler yüksek konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında, izotermdeki farklılaşmayla beraber denge ara yüzey geriliminde dikkate değer bir artış olduğu görülmektedir. Yüzey gerilimindeki düşüş hızı yavaşlamış, sistem bu konsantrasyon aralığında daha geç dengeye ulaşmıştır. 0.01 mM ve daha düşük konsantrasyonlar için denge durumuna 700 saniye sonra ulaşılırken, 0.02 – 0.1 mM arasında bu süre maksimum 100 saniye olarak bulunmuştur. Süreler arasındaki bu farklılık, seçilecek konsantrasyon değerinin sistemi dengeye getirme süresi bakımından ne kadar kritik olduğunu göstermektedir.

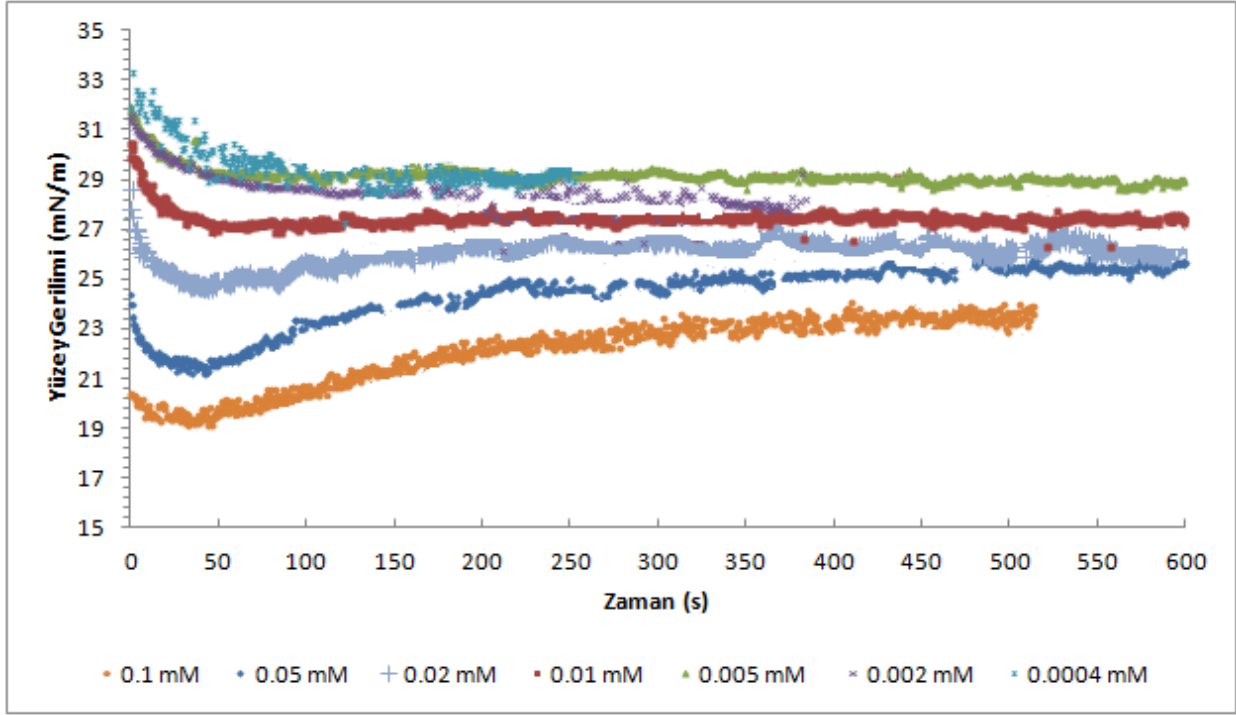
DPPC için literatürle uyumlu verilerin elde edilmesinden sonra, aynı sistem ile IPL molekülünün dinamik adsorpsiyon özellikleri karakterize edilmiştir.

#### **4.2.1.2. IPL Molekülünün Dinamik Davranışının Belirlenmesi**

IPL yapısındaki farklı gruplar sayesinde, değişik fazlarda çözünebilme özelliğine sahiptir. Bu kısımda, kloroform gibi hidrofobik bir çözücüde çözünebilirken, suda da çözünebilme özelliği olan IPL'nin iki farklı yığın fazdan kloroform/fosfat tampon ara yüzeyine adsorpsiyon davranışı incelenmiştir. Kloroform fazından ara yüzeye adsorpsiyon deneyleri IPL'nin DPPC ile farklı mol oranlarında karışımlar oluşturulabilmesi ve ara yüzey özelliklerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Farklı bir seçenek olan sulu fazdan ara yüzeye adsorpsiyon deneyleri ise, vücut ortamını yansıtan fosfat tampon çözeltisinde IPL'nin davranışının belirlenerek, ilaç sistemlerinde kullanım olasılığının incelenmesi açısından yol gösterici olmuştur.

##### **4.2.1.2.1. IPL Molekülünün Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi**

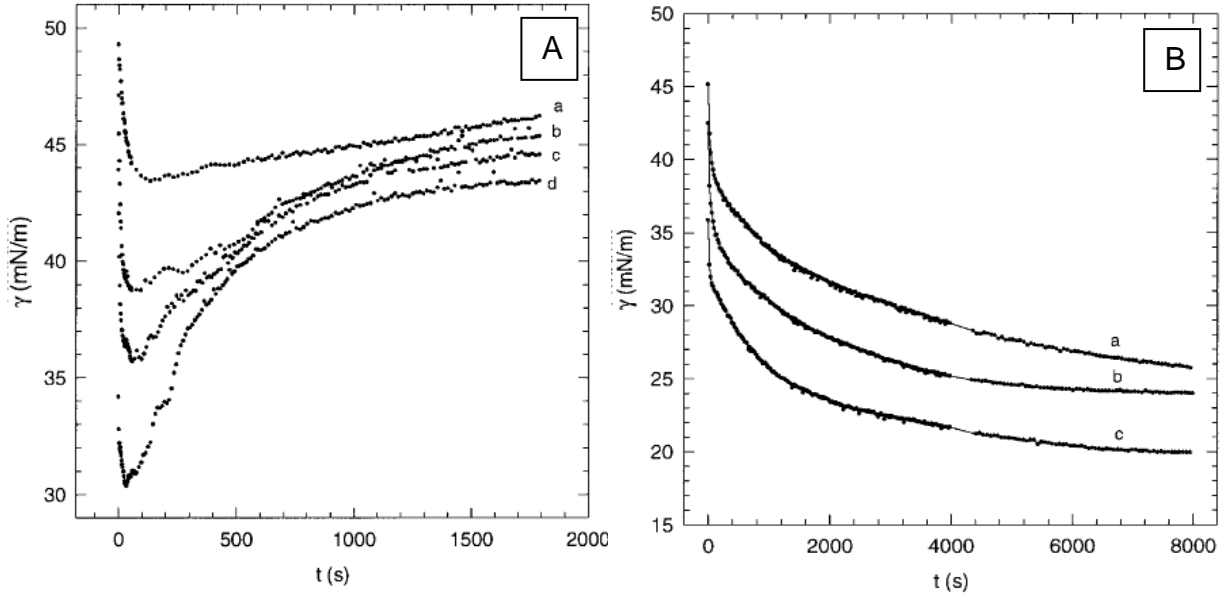
Bu kısımda DPPC için oluşturulan ölçüm sistemi ile aynı deneysel koşullarda, IPL molekülünün değişik konsantrasyonları için yüzey gerilimi - zaman ölçümleri alınmıştır. DPPC için elde edilen verilere bakıldığında, yüksek konsantrasyon aralığında 0.05 mM ve üzeri konsantrasyonlar için elde edilen denge yüzey gerilimi değeri aynı olmuştur. Bunun nedeni, belirli bir konsantrasyondan sonra, surfaktant monomerlerinin yüzeyi doymuş hale getirmeleridir. Bu durum göz önünde bulundurularak IPL'nin dinamik adsorpsiyon özelliklerinin inceleneceği en yüksek konsantrasyon 0.1 mM olarak seçilmiştir.



Şekil 4.6 IPL molekülü için fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde elde edilmiş  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

IPL için elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermi Şekil 4.6'daki gibidir. Bu izotermiye bakıldığında, yüksek konsantrasyon değerlerinde elde edilen veriler, yüzey aktif maddeler için beklenmeyen bir profili yansıtmaktadır. Özellikle 0.1 mM, 0.05 mM ve 0.02 mM'lık derişimlerin eğrilerindeki eğilim beklenenden çok farklıdır: grafikte öncelikle minimum değere doğru keskin bir düşüş görülmekte ve daha sonra yüzey gerilimi belirli bir miktar arttıktan sonra sabit kalmaktadır. Bu etki, konsantrasyon arttıkça daha net bir şekilde görülmektedir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda sıvı – sıvı ara yüzeylerindeki dinamik adsorpsiyon çalışmalarında, özellikle sulu çözelti/yağ fazları arasında lipidlerin benzer davranış gösterdiği anlaşılmıştır. Yüzey geriliminde oluşan bu değişimin sebebi “dağılım (ayrışma) etkisidir”. Çalışılan yüzey aktif madde, her iki fazda da kısmi olarak çözünebiliyorsa; kullanılan fazların hacimsel oranlarına ve molekülün ayrışma katsayısına bağlı olarak yüzey gerilimindeki ani düşüş ve daha sonraki artış, maddenin küçük hacimli fazdan büyük hacimli faza geçmesi şeklinde açıklanabilmektedir (Javadi, et al., 2010). Örneğin, literatürde iyonik olmayan C<sub>13</sub>DMPO molekülü ile su/n-hekzan ara yüzeyinde

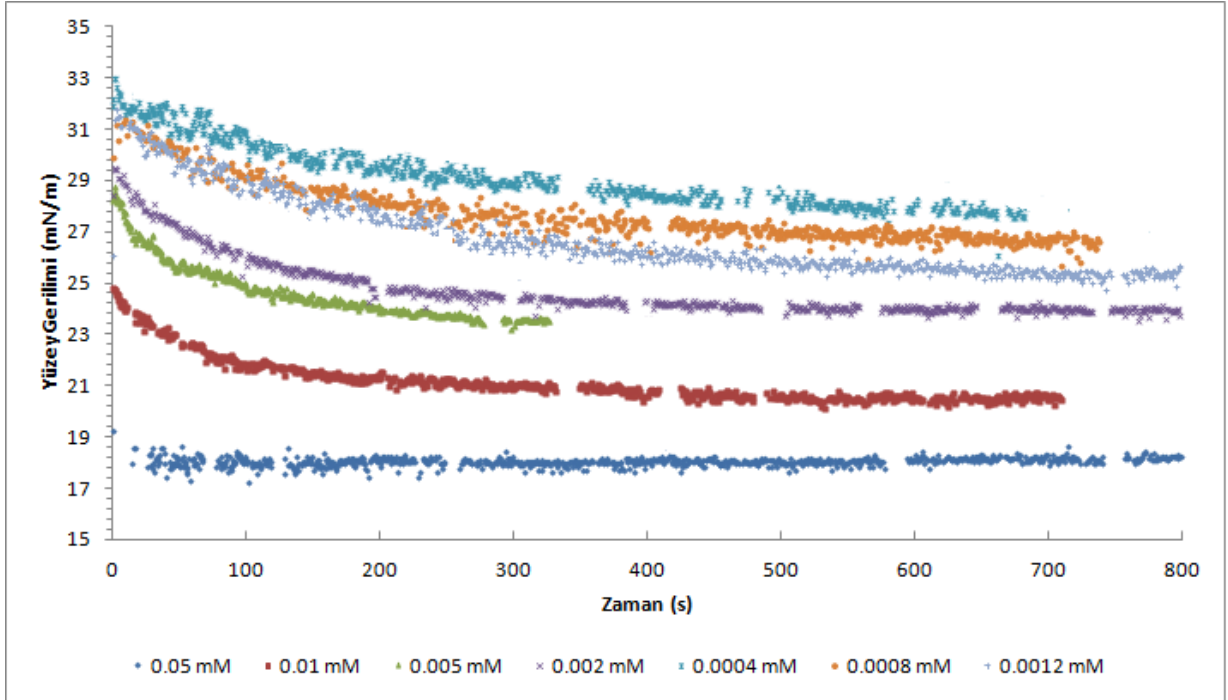
yapılan adsorpsiyon kinetiği çalışmaları hekzan ile doldurulmuş quartz küvete,  $C_{13}DMPO$ 'nun sulu çözeltisinden oluşan bir damla oluşturulmuş ve bu iki fazın hacim oranları (hekzan/su),  $Q$ , 1000 olacak şekilde ayarlanmıştır. Alınan ölçüm sonuçları Şekil 4.7 (a)'da gösterilmiştir. Aynı ölçümler, ikinci bir deney seti ile sistem ters çevrilerek tekrarlanmış, yani bu sefer sulu çözelti küvete doldurulmuş ve çözeltinin içinde hekzan damlası oluşturulmuştur. Fazların hacimsel oranının 0.001 olduğu bu ikinci deney seti ile elde edilen veriler ise Şekil 4.7 (b)'de gösterilmiştir (Ferrari et al., 1997). Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, aynı maddeleri içeren iki sistem için elde edilen profiller birbirlerinden oldukça farklıdır. Bunun nedeni kullanılan molekülün su fazından hekzan fazına geçmesidir. Bu geçiş miktarı, maddenin dağılım katsayısıyla doğru orantılıdır. Sistem ters çevrildiğinde, hacim oranlarının değişmesi sebebiyle molekül dağılmamış ve beklenen yüzey gerilimi – zaman izotermi elde edilmiştir (Şekil 4.7b). Aynı çalışmada  $C_{13}DMPO$  molekülü için Ravera ve arkadaşları tarafından geliştirilen prosedür ile dağılım katsayısı hesaplanmıştır.



Şekil 4.7  $C_{13}DMPO$ 'nun su/hekzan ara yüzeyinde  $Q = 1000$  (A),  $Q = 0.001$  (B) oranları için dinamik yüzey gerilimi ölçümleri: (a)  $1.0 \times 10^{-8}$  mol/cm<sup>3</sup>, (b)  $2.0 \times 10^{-8}$  mol/cm<sup>3</sup>, (c)  $3.0 \times 10^{-8}$  mol/cm<sup>3</sup>, (d)  $5.0 \times 10^{-8}$  mol/cm<sup>3</sup> (Ferrari et al., 1997).

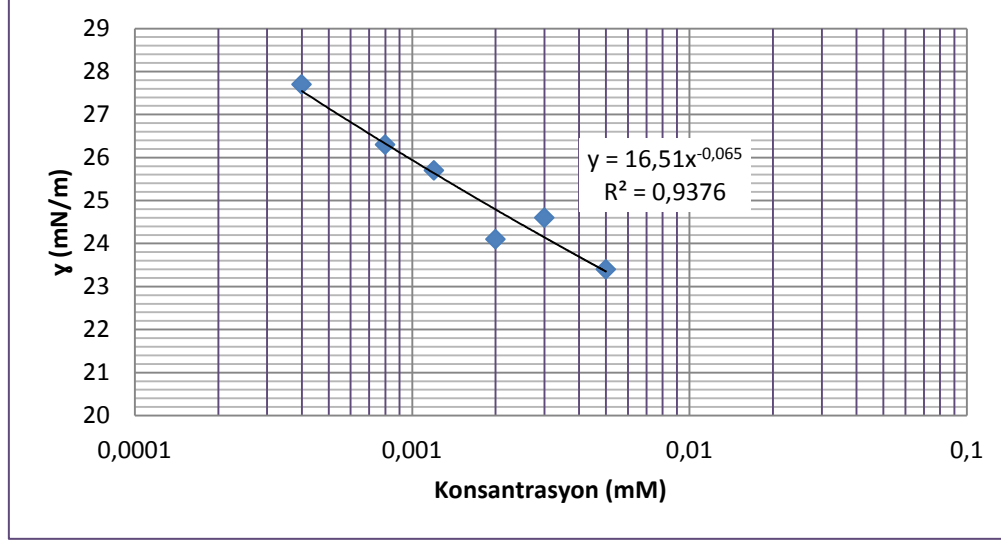
Yüzey aktif maddelerin dinamik adsorpsiyon özelliklerinin karakterize edilmesinde kullanılan parametrelerden biri olan maddenin dağılım özelliği ve katsayısı, IPL için de araştırılmıştır. Yukarıda anlatılan sistem, kendi sistemimize de uyarlanmış ve deney sistemi ters çevrilerek IPL molekülünün adsorpsiyon özellikleri geniş bir konsantrasyon aralığında tekrar incelenmiştir.

IPL, fosfat tampon fazında kısmi çözünürlüğü olan bir moleküldür ve oluşturulan ilk sistemde tampon/kloroform hacim oranı 1000'dir. Dolayısıyla, yüzey aktif madde hacimce az olan fazdan çok olan faza geçmeyi tercih etmiştir. Adsorpsiyon davranışında görülen ilk düşüş, moleküllerin ara yüzeye adsorbe olduğunu göstermekte ancak daha sonraki artış, diğer faza taşındıklarını göstermektedir. Sistem ters çevrildiğinde yani, kuartz küvet kloroform çözeltisi ile doldurulup bu çözeltinin içinde fosfat tampondan oluşan bir damla oluşturulduğunda elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermi, beklenen izoterme uygun olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 IPL molekülü için  $Q = 0.001$  olacak şekilde ayarlanmış sistemde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

IPL için Bölüm 2.4'te anlatılan yöntem izlenerek, referans yüzey gerilimi – konsantrasyon eğrisi (Şekil 4.9) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu referans grafiği ve Eşitlik 2.10 kullanılarak çeşitli konsantrasyonlarda IPL'nin dağılım katsayısı ( $k_p$ ) hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.9 IPL molekülünün kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen referans  $\gamma$  (mN/m) – konsantrasyon (mM) eğrisi

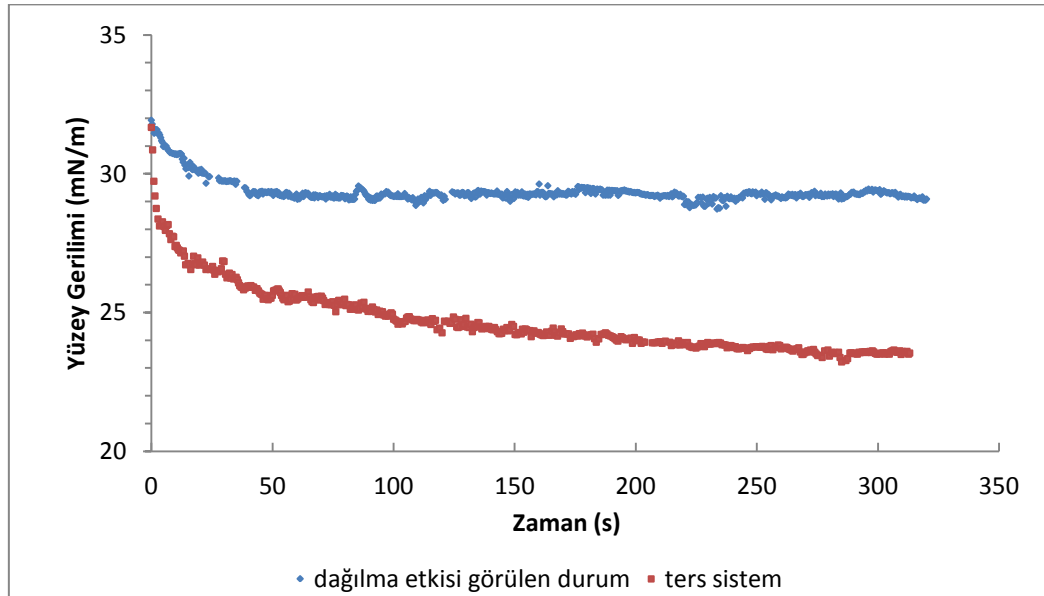
Çizelge 4.1 Hesaplanan dağılım katsayısı ( $k_p$ ) değerleri

Konsantrasyon (mM)	0,0004	0,0008	0,0012	0,002	0,003	0,005
Dağılım katsayısı, $k_p$	2.585	3.350	4.980	4.248	5.817	5.895

IPL için tampon çözelti/kloroform ara yüzeyi için hesaplanan dağılım katsayısı değerlerinin ortalaması 4.48 olarak bulunmuştur. Farklı konsantrasyon değerleri için dağılım katsayısının ortalamasının kullanılması, literatürde de rastlanan bir durumdur. Örneğin, Ferrari ve arkadaşlarının  $C_{13}DMPO$  için yaptıkları çalışmada 4 farklı konsantrasyon değeri için ortalama bir değer olarak dağılım katsayısı 34 olarak kullanılmıştır. Miller ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise, su – hekzan sisteminde yapısında değişik uzunlukta polioksietilen zinciri içeren yüzey aktif maddelerin dağılım katsayıları  $C_{10}EO_5$  maddesi için 1.65,  $C_{10}EO_8$  maddesi için 0.85



olarak hesaplanmıştır (Fainerman, Möbius and Miller, 2001). Yapısında hidrokarbon zinciri içeren  $C_{12}$ DMPO molekülü için yapılan bir çalışmada ise yine su-hekzan sisteminde elde edilen katsayı 7.7'dir.  $C_{13}$ DMPO için bu değer 34 olduğu düşünüldüğünde, maddenin molekül yapısının bu değeri çok fazla değiştirdiği açıktır. Ayrıca çalışılan ara yüzey de dağılım katsayısını doğrudan etkileyebilmektedir. Örneğin yine  $C_{12}$ DMPO için su/n-oktan ara yüzeyindeki dağılım katsayısı 10.8 olarak bulunmuşken, n-dekan için bu değer 8.3, n-dodekan için ise 6.6 olarak hesaplanmıştır (Catanoiu et al, 2011). Bütün bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, yapısında hem PEO, hem florokarbon zinciri hem de hidrokarbon zinciri bulduran IPL'nin kloroform – tampon çözelti ara yüzeyi için hesaplanan dağılım katsayısı literatür örnekleriyle kıyaslandığında merteye olarak mantıklı bulunmuştur. Dağılım katsayısının hidrokarbon zincirine sahip  $C_n$ DMPO bileşiklerine göre daha küçük olma nedeni PEO zinciri içermesidir. Daha önce değinildiği gibi PEO zinciri içeren moleküllerin dağılım katsayıları diğerlerine göre daha küçüktür. Şekil 4.10'da 0.005 mM derişimdeki IPL çözeltisi için, dağılma etkisi görülen durumda ve sistem ters çevrildiğinde elde edilen adsorpsiyon grafikleri görülmektedir.



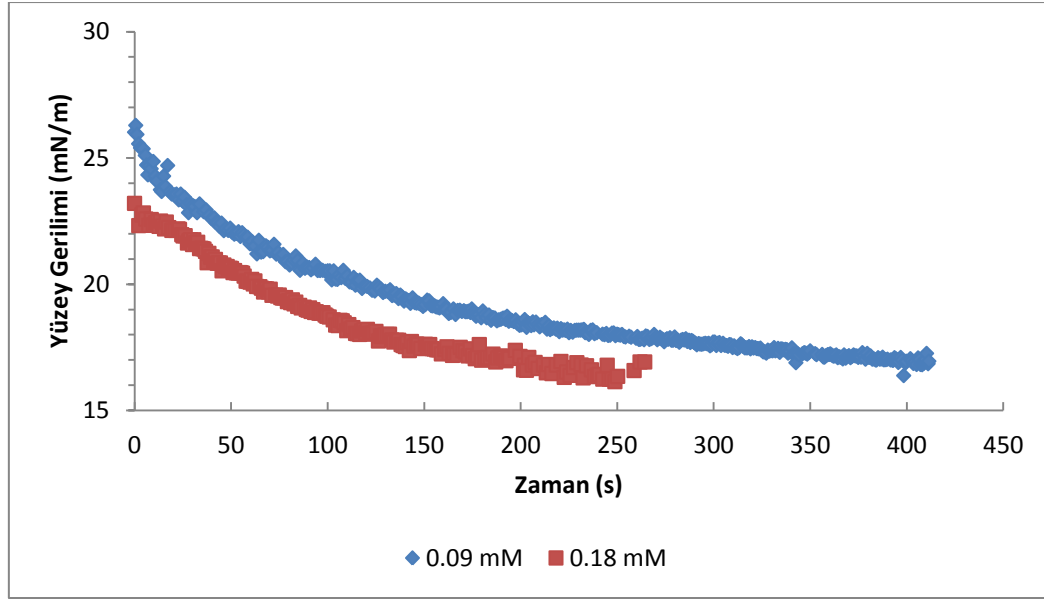
Şekil 4.10 0.005 mM IPL çözeltisi için dağılma etkisi görülen durumda ve sistem ters çevrildiğinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

İki sistemde de elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermine bakıldığında görülen sonuç oldukça çarpıcıdır. Kloroform fazındaki IPL sistemde damla fazındayken yüzey gerilimi ancak 29 mN/m'ye düşebilmektedir. Ancak sistem ters çevrildiğinde elde edilen adsorpsiyon izotermi, IPL'nin adsorpsiyon hızı yüksek ve yüzey gerilimini etkin olarak düşürebilen bir molekül olduğunu göstermektedir. Bu sistemin profiline bakıldığında, yüzey geriliminin ilk 100 saniye içinde 32 mN/m'den 25 mN/m'ye hızlı bir şekilde düştüğü görülmektedir.

#### **4.2.1.2.2. IPL Molekülünün Tampon Fazından Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi**

IPL, yapısında içerdiği segmentlerle özel tasarlanmış bir moleküldür ve her bir segment, belirli bir amaç doğrultusunda yapıya eklenmiştir. Yüksek yüzey aktivitesine sahip olması, içerdiği PEO zinciri ve dinamik özellikleri ile birlikte fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu kısmi olarak engellediği görülmüştür (Uslu, 2009). Bütün özelliklerinin yanı sıra, suda çözünebilme özelliği sayesinde, ilaç sistemlerinde kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır.

Çalışmanın bu kısmında, IPL'nin sulu fazdan fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine adsorpsiyon davranışı karakterize edilmiştir. Elde edilen verilerle birlikte, sulu fazdan sisteme verildiğinde, IPL'nin oldukça hızlı bir şekilde ara yüzeye adsorbe olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



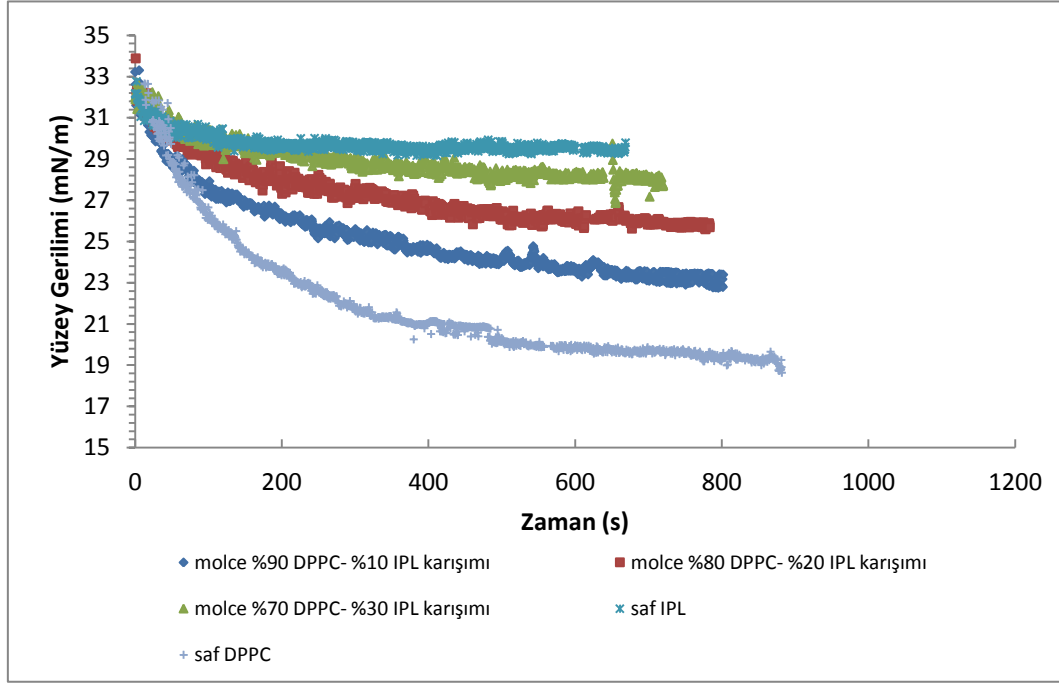
Şekil 4.11 IPL molekülü için kloroform / fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilmiş  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

0.09 mM ve 0.18 mM konsantrasyonlarında elde edilen izotermelere bakıldığında, iki izoterm birbirine yakın sonuç verdiği tespit edilmiştir. 0.18 mM'lık IPL çözeltisi beklenildiği gibi yüzey gerilimini daha hızlı düşürmekte ve sistemi daha çabuk dengeye getirmektedir ancak iki izoterm arasındaki farklılık çok büyük değildir. Bu durum da IPL'nin belirli bir konsantrasyonun üzerinde yüzey gerilimini derişimden bağımsız hale getirdiğinin bir göstergesidir.

#### 4.2.1.3. DPPC/IPL Karışımlarının Organik Fazdan Fosfat Tampon/Kloroform Ara Yüzeyine Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi

Çalışmanın bu kısmında, IPL molekülünün DPPC ile nasıl etkileştiğini anlamak ve DPPC'nin dinamik adsorpsiyon özelliklerine etkisini incelemek için iki madde belirli mol oranlarında karıştırılmıştır. Karışımların net konsantrasyonu 0.005 mM olacak şekilde seçilmiştir. Bunun nedeni, her iki madde için de bu konsantrasyon değerinde yüzey geriliminde dikkate değer bir fark olmasıdır. Literatürde de bu konsantrasyon değerinde DPPC'nin ara yüzey gerilimini önemli ölçüde düşürdüğü ve proteinler ile etkileşiminin net olarak incelenebildiği görülmektedir (He et al., 2008). Molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - 30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımları hazırlanmış ve her birinin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine

adsorpsiyon davranışı incelenmiştir. Her karışım için yüzey gerilimi zamana bağlı olarak ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12 Saf DPPC, saf IPL ve molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımlarının kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

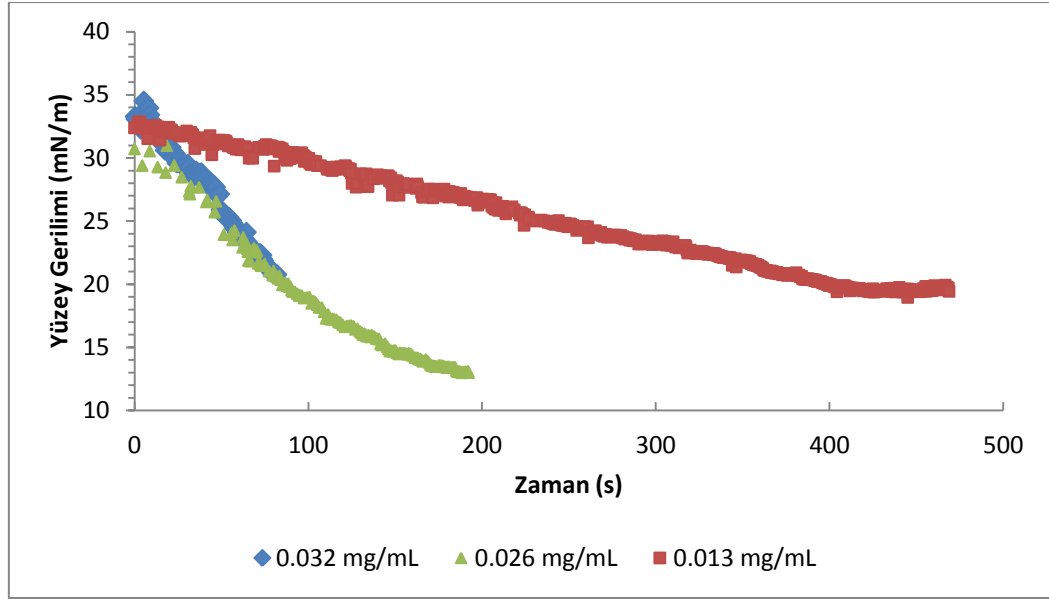
Elde edilen izotermi incelendiğinde, ortamda sadece DPPC bulunduğu durumda, yüzey geriliminin literatüre uygun olarak yaklaşık 400 saniyede minimum değerine ulaştığı ve bu noktadan sonra dengeye geldiği görülmektedir. IPL'nin ise, çalışılan konsantrasyonda fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde yüzey gerilimini DPPC kadar düşürmediği belirlenmiştir. Ancak, IPL'nin sentezlenmesindeki asıl amaç, yüzey gerilimini çok fazla değiştirmek değil, kullanılan sistemde tek başına bulunduğu ya da ortamdaki lipidlerle karışabilme özelliği kullanılarak kan proteinlerinin ara yüzeye adsorbe olmasını engellemektir. Ayrıca, yüksek adsorpsiyon hızı sayesinde kan proteinlerinden önce ara yüzeye adsorbe olabilmesi ya da ortamdaki diğer lipidlerle, örneğin doğal akciğer yüzey aktif maddesi ile etkileşerek lipidlerin adsorpsiyon hızının yükseltilmesi bir diğer hedeftir. IPL ile DPPC'nin her oranda karışabildiği daha önce yapılan çalışmayla belirlenmiştir (Uslu, 2009).

Şekil 4.12'ye bakıldığında karışımdaki IPL mol oranı arttıkça, ara yüzeyin ulaşabildiği minimum yüzey gerilimi değerinin de arttığı görülmektedir. IPL tek başına fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde yüzey gerilimini çok düşürmediği için bu durum beklenen davranışa uygundur. Ancak IPL'nin miktarı artırıldıkça yüzey geriliminin denge durumuna ulaşması için gereken sürenin önemli derecede kısalması dikkat çekici bir noktadır. IPL, DPPC ile sinerjik olarak etkileşmekte ve karışımın ara yüzeye hızlı şekilde adsorbe olmasını sağlamanın yanı sıra, moleküllerin optimum konformasyonlarını alma sürelerini de kısaltarak daha çabuk dengeye ulaşılmasını sağlamaktadır. Bu şekilde, adsorpsiyon hızının kan proteinlerine göre yavaş olduğu bilinen akciğer yüzey aktif madde karışımının hızlandırılmasında, ya da surfaktant inaktivasyonuna karşı hala yeterince etkili olmayan tedavi amaçlı karışımlara ek olarak IPL'nin kullanılabilirliği incelenmeye değer konu başlıklarındandır.

Çalışmanın amacı doğrultusunda DPPC ve IPL'nin değişik oranlardaki karışımları için kritik olan, fosfat tampon fazına fibrinojen eklendiğinde ulaşılan yüzey gerilimi değeri ve ara yüzeyin davranışdır. Dolayısıyla, ara yüzeyde sadece karışımlar bulunurken elde edilen veriler, diğer bölümler için temel niteliği oluşturmaktadır.

#### **4.2.1.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi**

Çalışma kapsamında RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan doğal akciğer yüzey aktif madde karışımı olan Infasurf®'ün de dinamik adsorpsiyon davranışı incelenmiştir. Bu aşama, gerçek karışıma benzer bir ara yüzey modeli elde edilebilmesi, Infasurf® ile fibrinojenin bir arada bulunduğu durumdaki sonuçların değerlendirilebilmesi ve daha sonra IPL ile Infasurf®'ün karşılaştırılabilmesi adına önem taşımaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda, öncelikle çalışmanın diğer aşamalarında kullanılacak optimum derişimin bulunabilmesi için üç farklı konsantrasyonda yüzey gerilimi - zaman izotermi oluşturulmuş ve alınan sonuçlar Şekil 4.13'te sunulmuştur.

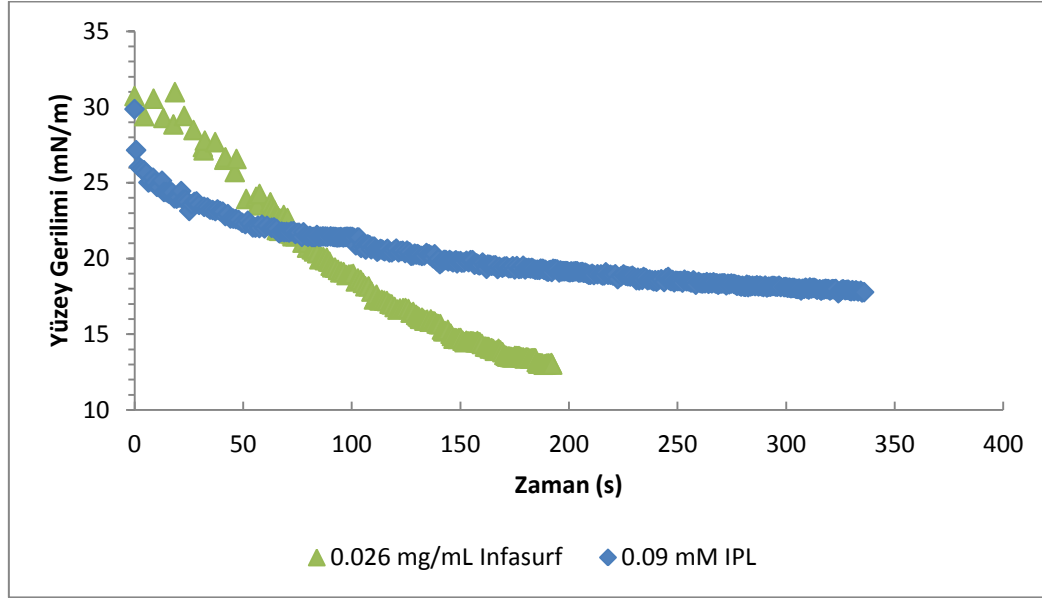


Şekil 4.13 Infasurf® için kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde, Infasurf® için yapılan denemeler sonucunda, yüzey geriliminde net olarak farklılık yaratabilen ilk konsantrasyon 0.013 mg/mL olarak belirlenmiştir. Daha sonra bu değerden daha düşük konsantrasyonlarla da çalışılmış; 0.026 mg/mL ve üzerindeki derişimlerde alınan sonuçların aynı olduğu görülmüştür. Fibrinojen için karşılaşılan durum burada da geçerlidir; elde edilen izoterm ve minimum yüzey gerilimi, belirli bir konsantrasyon değerinin üzerinde aynı kalmaktadır. Infasurf® için daha yüksek derişimlerde ölçüm almak teknik sebeplerden dolayı mümkün olamamaktadır. Dolayısıyla, çalışılacak optimum Infasurf® konsantrasyonu 0.026 mg/mL olarak belirlenmiş ve çalışmanın diğer basamaklarında bu konsantrasyon kullanılmıştır. Literatürde Infasurf® ile fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde yapılan bir çalışma bulunamamış, dolayısıyla alınan veriler için karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, hava – su ara yüzeyinde yapılan çalışmalarda, 0.075 mg/mL konsantrasyonunda 30 dakika sonunda yüzey gerilimini ancak 45 mN/m'ye düşürmüştür (Alexandrov et al., 2009). Infasurf® konsantrasyonu 1 mg/mL'ye çıkartıldığında ise, elde edilen denge yüzey gerilimi 20 mN/m olmuştur (Seurnyck et al., 2005).

#### 4.2.1.5. IPL ve Infasurf®'ün Dinamik Davranışlarının Kısa ve Uzun Zaman Aralığında İncelenmesi

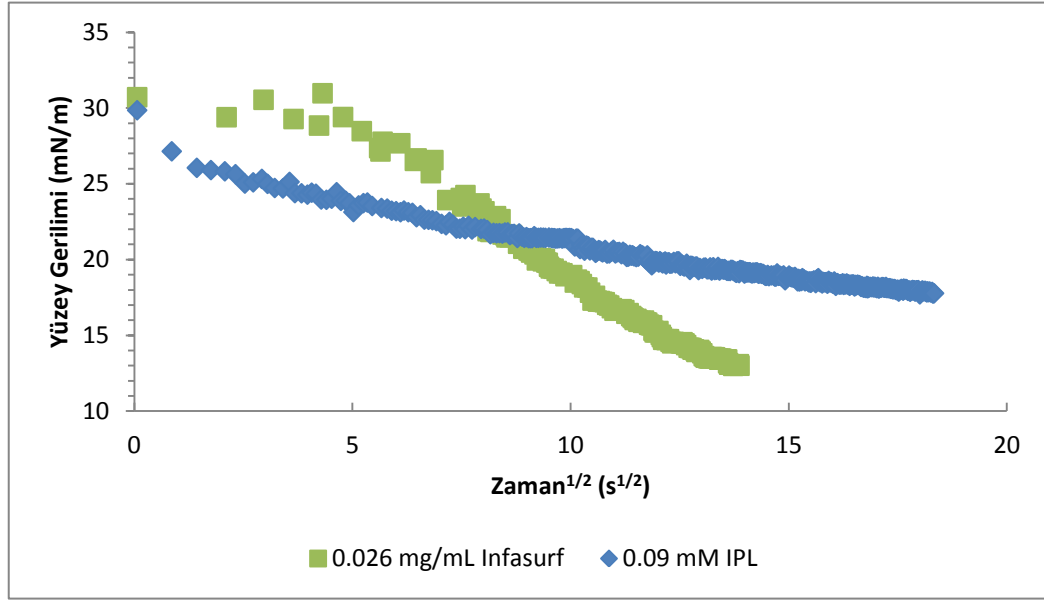
Çalışma kapsamında kullanılan malzemelerin dinamik adsorpsiyon özelliklerini belirlemek, yapılan çalışmanın hedeflerinden biridir. Bu amaçla IPL ve Infasurf®'ün yüzey gerilimi ölçümleri değerlendirilmiştir. Şekil 4.14'te IPL ve Infasurf® için elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermi bulunmaktadır. İzotermelere bakıldığında, IPL daha kısa sürede dengeye gelirken, Infasurf®'ün daha uzun sürede dengeye geldiği görülmektedir. Başka bir deyişle, sistem kısa süre bazında incelendiğinde IPL'nin yüzey gerilimini düşürme hızı, Infasurf®'ünkinden daha fazladır.



Şekil 4.14 IPL ve Infasurf®'ün fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine dinamik adsorpsiyonlarının karşılaştırılması

Infasurf®'ün veziküler yapıda bir karışım olduğu düşünüldüğünde, görülen bu durum normaldir (Fan et al., 2011). Kan proteinlerinin ara yüzeye adsorpsiyonunu engellemek için kullanılan ilacın kısa zamanda işlevini yerine getirmesi, hayati bir durumdur. RDS tedavisi için kullanılan Infasurf®, yeterli bir zaman diliminde aktifliğini gösterebilmektedir. Ancak kan proteinleri ile yarışmalı olarak ara yüzeye adsorbe olacak moleküllerin daha kısa sürede, özellikle proteinler arasında en çok problem yaratan fibrinojenden daha hızlı olarak, etkinliğini göstermesi gerekmektedir. Infasurf®'ün, ilk 50 saniyede yüzey gerilimini düşürme hızı, IPL'ye göre oldukça

yavaştır. Elde edilen izotermden Infasurf®'ün indüksiyon periyodunun yaklaşık 5 saniye sürdüğü görülmektedir. IPL ve Infasurf® için elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermelerinde, kısa süreli davranışın daha iyi anlaşılması ve difüzyon katsayılarının hesaplanabilmesi amacıyla Ward ve Tordai'nin önerdiği modele göre, zaman parametresinin kareköküne karşı yüzey gerilimi grafiği çizilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 IPL ve Infasurf® için kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman ( $s^{1/2}$ ) izotermeleri

Bu yöntemle kısa süreli dinamik adsorpsiyon çalışmaları için literatürde de sıkça rastlanmaktadır (Teipel and Aksel, 2001; Fainerman et al., 1997; Wu et al., 2000). Nefes alış – verişinin dinamik bir davranış olduğu ve bu prosesin çok kısa zamanda gerçekleştiği düşünüldüğünde, aslında sistemin uzun süreli davranışının değil, kısa süreli davranışının incelenmesinin daha kritik olduğu sonucuna varılmıştır. Infasurf®'ün sahip olduğu yaklaşık 5 saniyelik plato bölgesine karşın IPL, yüzey gerilimini kuvvette damlanın oluşturulduğu ilk andan itibaren düşürmektedir. İndüksiyon periyodu olarak 5 saniye kısa bir süre olarak gözükse de, üzerinde çalışılan solunum sistemi için 5 saniye yaklaşık 2 kere nefes – alıp verme süresine eşittir (Wüstneck et al., 2002).

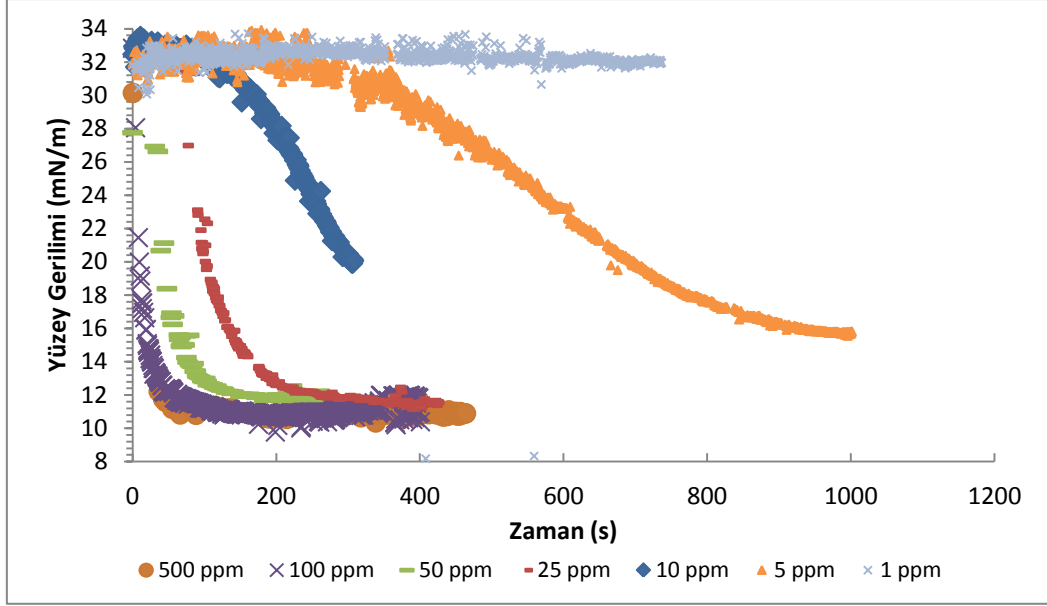


IPL'nin sulu tampon fazından kloroform damlaya adsorpsiyonu için kısa zamanlardaki difüzyon katsayısı Eşitlik 2.6 ve Şekil 4.15'de IPL'nin kısa zaman aralığında grafiğin eğimi ( $dy/d\sqrt{t}$ ) kullanılarak  $6.45 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak hesaplanmıştır. Aynı durumda Infasurf® için hesaplanan değer  $8.10 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 'dir. Bu değer, literatürde, yüzey aktif maddeler için elde edilen değerlere ile uyumludur. Örneğin, ticari olarak bulunan Tween 85 yüzey aktif maddesi ile yapılan dinamik adsorpsiyon çalışmasında, su/parafin ara yüzeyinde 0.05 mM'dan 100 mM'a kadar değişik konsantrasyonlar için difüzyon katsayıları hesaplanmış ve elde edilen değerlerin  $1.80 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  ile  $8.40 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  arasında değiştiği bildirilmiştir (Teipel and-Aksel, 2001). Yapılan başka bir çalışmada ise, PEO zinciri içeren  $C_{10}E_8$  için difüzyon katsayısı  $4.30 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $C_{12}E_8$  için  $4.80 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak hesaplanmıştır (Ferri and Stebe, 2000). Hesaplanan değer, Infasurf®'ün difüzyon katsayısı ile karşılaştırıldığında ise IPL'nin çok daha hızlı bir molekül olduğu belirlenmiştir. İki maddenin difüzyon katsayıları arasında ~80 katlık bir fark vardır ve bu durum, kısa zaman aralığı için moleküllerin adsorpsiyon davranışları arasındaki farklılığı açıklamaktadır. Infasurf® ile IPL'nin kısa zamanlardaki difüzyon katsayısı ayrıca hava/sıvı ara yüzeyi için de aynı yöntemler kullanılarak hesaplanmıştır. Hava/sıvı ara yüzeyinde, IPL'nin difüzyon katsayısı  $1.10 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak belirlenirken, Infasurf® için bu değer  $1.48 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak bulunmuştur (Ek 1). Bu değerlerden, iki maddenin dinamik adsorpsiyon katsayıları arasında ~85 katlık bir fark olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilerden, Aynı maddenin iki farklı ara yüzeye adsorpsiyonu için elde edilen difüzyon katsayıları birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Maddelerin dinamik adsorpsiyon davranışları incelenirken, eğer adsorpsiyon difüzyon kontrollü değil ise, uzun zamanlı dinamik davranışının da belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü bu eğer sistem difüzyon kontrollü değilse kısa ve uzun zamanlardaki difüzyon katsayıları arasında fark olması beklenmektedir. Bu farkın, yüzey aktif bir maddenin ara yüzeyin hemen alt fazına yerleştikten sonra ara yüzeye adsorbe olabilmek için yenmesi gereken enerji bariyerinin varlığından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Enerji bariyeri difüzyon kontrollü sistemler için sıfıra yakınken, difüzyon – kinetik kontrollü modeller için göz önünde bulundurulması gereken bir parametredir. Çalışma kapsamında kullanılan moleküllerin uzun zamanlı dinamik adsorpsiyon davranışları da incelenmiştir.

Hava/sıvı ara yüzeyinde alınan veriler Eşitlik 2.7'ye göre yüzey gerilimine karşı grafiğe geçirilmiş ve grafiğin eğiminden ( $d\gamma/d(1/\sqrt{t})$ ) IPL için  $D_a$  değeri  $3.30 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak bulunmuştur. Aynı yöntem kullanılarak Infasurf® için elde edilen değer,  $4.23 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 'dir. Elde edilen grafikler Ek 2'de gösterilmiştir. Bu değerlere göre, iki maddenin uzun ve kısa zamanlı difüzyon katsayılarında IPL için yaklaşık 3.3 katlık bir fark görülürken, Infasurf® için bu fark 3.5 kat olarak hesaplanmıştır. Difüzyon katsayıları arasında çok büyük bir fark görülmemesi, adsorpsiyon bariyerinin küçük olacağı anlamına gelmektedir. Bu iki madde için Eşitlik 2.5 ve Eşitlik 2.7 kullanılarak hava/sıvı ara yüzeyine adsorbe olabilmeleri için harcamaları gereken enerji hesaplanmış ve ( $\epsilon_a$ ) IPL için  $0.04 \text{ kJ/mol}$ , Infasurf® için  $0.06 \text{ kJ/mol}$  olarak belirlenmiştir. Bu değerler literatürle karşılaştırıldığında, difüzyon – kinetik kontrollü bir sistem için oldukça düşük değerler olarak görülmektedir (Eastoe et al., 1997; Jiang et al., 2006). Adsorpsiyonunun difüzyon kontrollü olduğu bilinen fibrinojen için de hesaplanan  $\epsilon_a$  değerinin  $0.054 \text{ kJ/mol}$  olması, IPL ve Infasurf®'ün de difüzyon kontrollü adsorpsiyon modeline uyduklarını göstermektedir.

#### **4.2.1.6. Fibrinojenin Dinamik Adsorpsiyon Özelliklerinin Belirlenmesi**

Serum proteinleri arasında, alveol ara yüzeyine adsorbe olarak yüzey aktif madde karışımının adsorpsiyonunu engelleyen ve alveolün işlevini kaybetmesine yol açan fibrinojen proteininin, incelenecek ara yüzeylere yapacağı etkinin belirlenebilmesi için, öncelikle kendisinin dinamik adsorpsiyon özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Fibrinojen tampon çözeltide çözüldüğü ve vücutta (pH 7) da bu şekilde bulunduğu için, kurulan deney sisteminde fosfat tampon fazına enjekte edilmiştir. Yapılan deneyler sonucu elde edilen adsorpsiyon izotermi geniş bir konsantrasyon aralığında Şekil 4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4.16 Fibrinojen için kloroform/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) izotermalleri

1, 5, 10, 25, 50, 100, ve 500 ppm konsantrasyonlarında elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermalleri incelendiğinde fibrinojenin düşük konsantrasyonlu çözeltilerinde (1 – 10 ppm) önce bir plato bölgesi gözlemlenmiştir. Yüzey gerilimi – zaman izotermallerinde plato bölgesi olarak görülen ve literatürde indüksiyon periyodu olarak tanımlanan bu süreçte, proteinler aslında ara yüzeye adsorbe olmuşlar ancak adsorbe olan miktar yüzey geriliminin düşürülebilmesi için yeterli olamamıştır. Belirli bir süreden sonra yeterli miktarda protein yüzeye yerleşmiş ve böylece yüzey gerilimi düşmüştür. Ayrıca, düşük konsantrasyon değerleri için ara yüzeyin ulaştığı denge yüzey gerilimi, diğer konsantrasyonlara göre daha yüksektir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, fibrinojenin oldukça yüzey aktif bir protein olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle 25 ppm'den daha derişik fibrinojen çözeltileri, yüzey gerilimi çok kısa sürede neredeyse 10 mN/m'ye kadar düşürmektedir. Derişim arttıkça, indüksiyon periyodunun da kısaldığını ve hatta 100 ppm'den daha yüksek derişimler için tamamen kaybolduğu görülmektedir. Bu da proteinler için literatürde yer alan sonuçlara uymaktadır (Yampolskaya and Platikanov, 2006). İndüksiyon periyodu, sistemin karakterize edilebilmesi için kritik bir parametredir çünkü, her konsantrasyon değeri için spesifiktir. Yapılan deneyler sonucunda bulunan indüksiyon periyotları Çizelge 4.2'deki gibidir.

Çizelge 4.2 Fibrinojenin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde konsantrasyona bağlı olarak indüksiyon periyotları

Konsantrasyon (ppm)	İndüksiyon Periyodu, saniye
1 ppm	$>800 \pm 1$ s
5 ppm	$\sim 250 \pm 1$ s
10 ppm	$100 \pm 1$ s
25 ppm	$60 \pm 1$ s
50 ppm	$25 \pm 1$ s
100 ppm	$4 \pm 1$ s

İndüksiyon periyodu belirli bir değerden sonra tamamen kaybolursa da, belirli bir eşik değerinden daha yüksek konsantrasyonlarda ulaşılan denge yüzey gerilimi daha fazla düşmemektedir. Fibrinojen için fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde bu eşik değeri 25 ppm olarak belirlenmiştir. 25 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda, adsorpsiyon süresi değişse de sistemin geldiği denge yüzey gerilimi aynıdır. Bu durum, fibrinojen adsorpsiyonunun artık konsantrasyondan bağımsız hale gelmesi olarak açıklanmaktadır. Literatürde de bu durumun örnekleri verilmiştir. Hernandez ve Franses'in yaptığı bir çalışmada, hava/sıvı ara yüzeyine değişik koşullarda fibrinojenin adsorpsiyonu incelenmiş ve 7.5 ppm derişimindeki fibrinojen'in adsorpsiyonunun 75 ve 750 ppm derişimindekilerden daha yavaş olduğu, ancak konsantrasyon artsa da 75 ve 750 ppm'lik çözeltilerin ulaştığı minimum yüzey gerilimi değerinin değişmediği gözlemlenmiştir (Hernandez and Franses, 2003).

Elde edilen adsorpsiyon izotermelerinden dinamik adsorpsiyon çalışmalarında kullanılacak derişimler 10 – 50 ve 100 ppm olarak belirlenmiştir. Bu derişimlerin karakteristik indüksiyon periyotları sayesinde, fibrinojen ile aynı ortamda bulunacak maddelerin, fibrinojen adsorpsiyonuna ne gibi bir etki sağlayacağı indüksiyon periyodundaki artıştan ve yüzey gerilimi – zaman profilinden incelenecektir. 100 ppm'in üzerindeki derişimlerde, adsorpsiyon özelliklerinin neredeyse aynı olması

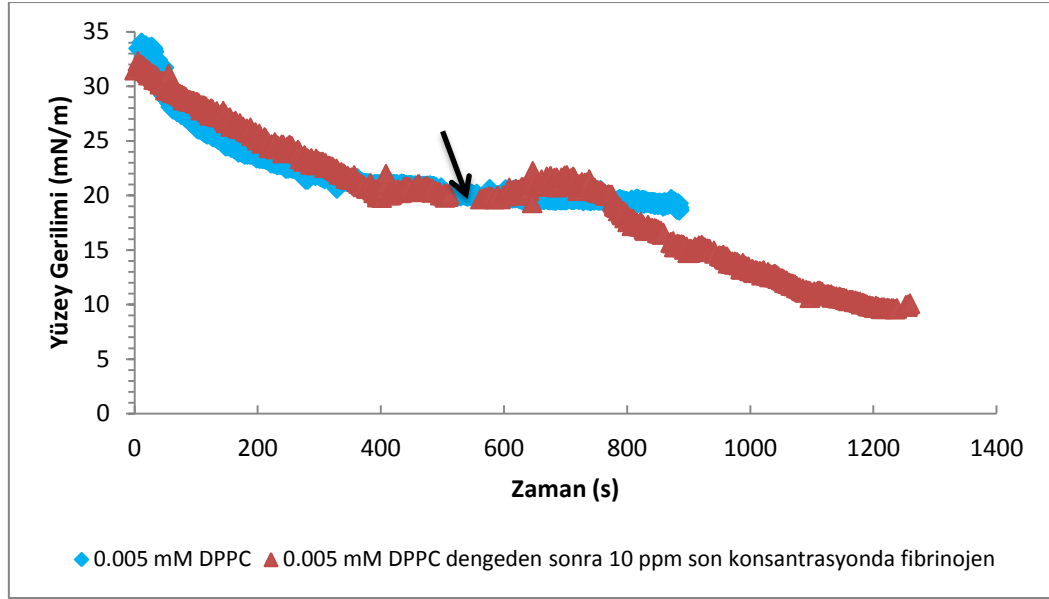
nedeniyle, daha yüksek bir değer seçilmemiştir. 10 ve 50 ppm'lik derişimler ise, diğer derişimlere oranla daha net sonuçlar vermiştir. Şekil 4.16'daki izoterm, daha sonra kurulacak sistemler için temel niteliği oluşturmuştur.

#### **4.2.2. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Yapılan tez çalışmasının amacı, fibrinojen proteininin dinamik koşullarda ara yüzeye etkisinin incelenmesi ve bu etkinin belirli bir molekül yapısı ve sistemle minimize edilmesidir. Bölüm 4.2.1'de elde edilen veriler, bu kısımda yorumlanacak veriler için ön çalışma niteliğinde olmuş ve her bir maddenin spesifik davranışı belirlenmiştir. Bu kısımda ise, DPPC ile fibrinojen, IPL ile fibrinojen ve DPPC – IPL karışımları ile fibrinojenin bir arada bulunduğu sistemler kurulmuş ve bu koşullarda fibrinojenin ara yüzeydeki etkisi incelenmiştir. Daha sonraki kısımda ise, IPL suda çözölerek fosfat tampon fazına enjekte edilmiş ve alternatif bir sistem olarak suda özünmüş IPL kullanılarak fibrinojenin bu durumdaki davranışı belirlenmiştir. Son olarak ise akciğer ara yüzey modeli olarak Infasurf<sup>®</sup> kullanılmış ve Infasurf<sup>®</sup> için de fibrinojenin davranışı araştırılmıştır.

##### **4.2.2.1. DPPC'nin Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Gerçek sistemde, surfaktant inaktivasyonu, ara yüzeyde akciğer yüzey aktif maddesi bulunurken gerçekleşmektedir. Bu durumun basit bir modellemesi olarak bu kısımda, akciğer yüzey aktif maddesinin kütlege büyük bir kısmını oluşturan DPPC ara yüzeyde bulunurken, ortama dışarıdan fibrinojen çözeltisi eklenmiştir. 1 ve 5 ppm konsantrasyonlarında fibrinojen yüzey gerilimini değiştirmediği için çalışmalara 10 ppm derişiminden başlanmıştır.



Şekil 4.17 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde DPPC bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde sadece fibrinojen olduğu durumda alınan sonuçlara göre, 10 ppm fibrinojen çözeltisinin indüksiyon periyodu yaklaşık 100 saniye olarak belirlenmiştir. Kurulan bu sistem için, saf DPPC'nin ara yüzeye adsorbe olması beklenmiş ve denge yüzey gerilimine ulaşıldıktan sonra, tampon faza yaklaşık 560. saniyede küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde fibrinojen enjekte edilmiştir. (Enjeksiyon anı, Şekil 4.17'de ok ile gösterilmiştir). Enjeksiyondan yaklaşık 110 saniye sonra (675. saniyede) yüzey geriliminde düşme görülmeye başlanmış ve ara yüzeyde fibrinojenin baskın olduğu belirlenmiştir. Başka bir deyişle, ara yüzeyde bulunan DPPC, fibrinojen dış faza eklendikten 110 saniye sonra, yerini fibrinojene bırakmaktadır. Fibrinojen boş ara yüzeyde optimum konformasyonunu 100 saniyede alırken, bu sistemde ara yüzeyde DPPC bulunduğu için bu süre 110 saniyeye çıkmıştır. Gerçek sistemde, net yükü eksi olan fibrinojen, bulunduğu ortamda çok hızlı bir şekilde ara yüzeyin hemen alt fazına difüze olmakta ve ara yüzeyde bulunan amfoterik yapıdaki DPPC ile etkileşmektedir (Miller et al., 2000). Literatürde, benzer deneysel sistemlerde 0.001 mM – 0.1 mM konsantrasyon aralığındaki DPPC'nin ve saf protein çözeltilerinin kloroform/su ara yüzeyinde homojen olmayan bir tabaka oluşturdukları belirtilmektedir. Bu bilgi her iki maddenin de ara yüzeyde bulunduğunu

göstermektedir. Ancak protein konsantrasyonunun artmasıyla birlikte ortamdaki DPPC'nin etkisi azalmakta ve yüzey, protein varlığı bakımından homojen hale gelmektedir (Li et al., 1999). Benzer başka bir çalışmada ise protein konsantrasyonu 0.1 ppm iken ve DPPC konsantrasyonu 0.005 mM'dan küçük iken sistemin adsorpsiyon davranışının protein tarafından kontrol edildiği bildirilmektedir. Protein konsantrasyonu 0.8 ppm'e çıkartıldığında ise ara yüzey davranışı DPPC konsantrasyonundan bağımsız hale gelmektedir (He et al. 2008). 10 ppm'lik fibrinojen derişimi DPPC'ye göre yüksek gelmiş ve ara yüzeyde DPPC tabakası varken bile fibrinojenin adsorpsiyon davranışının ara yüzeyde baskın olduğu tespit edilmiştir.

DPPC'nin fibrinojen varlığında ara yüzeyde kalmadığı belirlenmiş ancak bu davranışının daha iyi anlaşılması amacıyla, aynı çalışma küvetteki son konsantrasyon 50 ppm olacak şekilde tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar beklenen şekilde olmuştur ve tampon faza son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojenin enjekte edilmesinden yaklaşık 5 saniye sonra yüzey geriliminde hızlı bir düşüş görülmüştür. Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine 50 ppm konsantrasyonundaki saf fibrinojenin adsorpsiyon izotermine bakıldığında görülen profil ile, DPPC'li sistemde, yüzey geriliminin düşme anından sonra görülen profilin aynı olması, DPPC'nin fibrinojen varlığında yüzey aktivitesini gösteremediğini belirtmektedir.

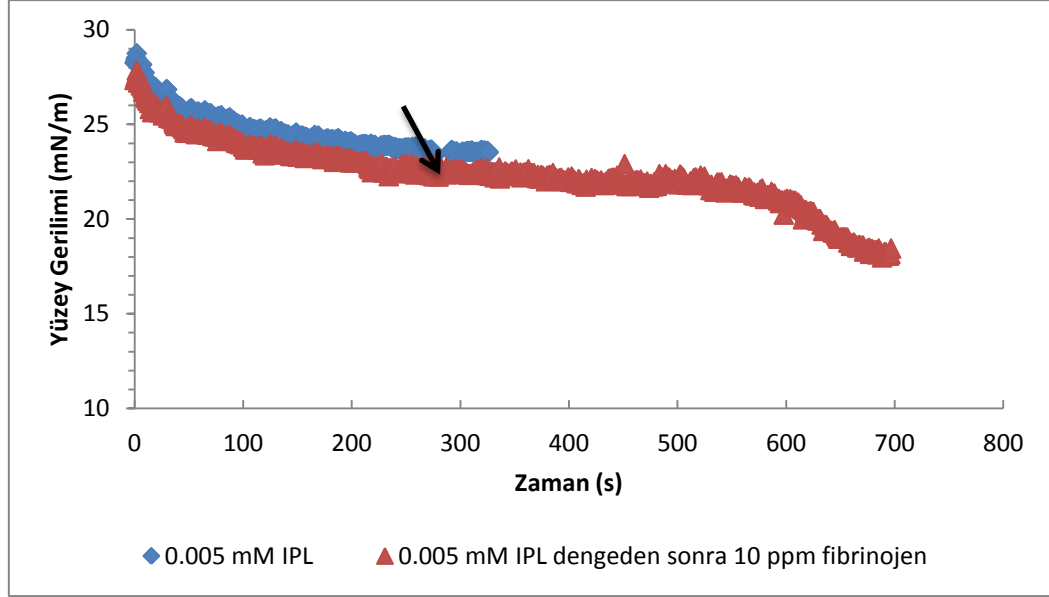
Bu deney sisteminde 10 ve 50 ppm fibrinojen çözeltileri ara yüzey davranışı üzerinde baskın olmaları sebebi ile daha yüksek konsantrasyonda fibrinojen ile çalışma yapılmamıştır.

#### **4.2.2.2. IPL Molekülün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

##### **4.2.2.2.1. Organik Fazdaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

DPPC ile yapılan çalışmalara eşlenik olarak, bu kısımda, aynı çalışmalar IPL molekülü ile tekrarlanmıştır. Kan proteinlerinin ara yüzeye adsorpsiyonunu önlemek ya da kısmi olarak engellemek amacıyla sentezlenen IPL ile 10 ppm son

konsantrasyondaki fibrinojen çözeltisi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.18’de sunulmuştur.

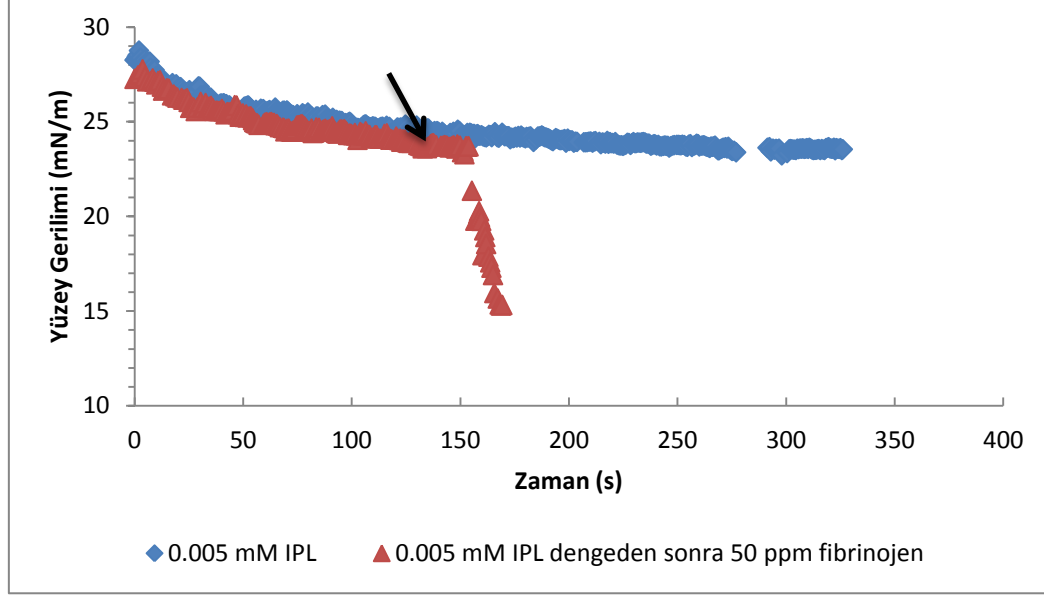


Şekil 4.18 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

Öncelikle kloroform fazındaki IPL'nin ara yüzeye adsorbe olması ve ara yüzeyin dengeye ulaşması beklenmiş; yüzey geriliminin daha fazla değişmediği noktaya (dengeye) ulaşıldıktan sonra, 300. saniyede fosfat tampon fazına küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olacak şekilde fibrinojen enjekte edilmiştir. Şekil 4.18'den de görüldüğü gibi yüzey gerilimi enjeksiyondan sonra yaklaşık 300 saniye kadar sabit kalmış ve daha sonra düşmeye başlamıştır. 10 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen çözeltisi için, fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde elde edilen indüksiyon periyodu 100 saniyedir. Bu 100 saniye, ara yüzeyde sadece protein bulunduğu durumda, fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olması ve yüzey gerilimini değiştirebilecek yüzey yoğunluğuna ulaşması için gerekli süreye eşittir. Ancak, ara yüzeyde önceden oluşturulmuş IPL tabakası bulunduğu durumda, fibrinojen enjeksiyonundan 300 saniye sonra yüzey gerilimi düşmeye başlamış ve düşüş sonrasında ölçülen minimum yüzey geriliminin de aslında, fibrinojen için elde edilen denge yüzey gerilimi olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu sonuçtan, son durumda ara yüzeyde sadece fibrinojenin değil, IPL'nin de bulunduğu çıkartılmıştır. IPL, 100 saniyelik indüksiyon periyodunu



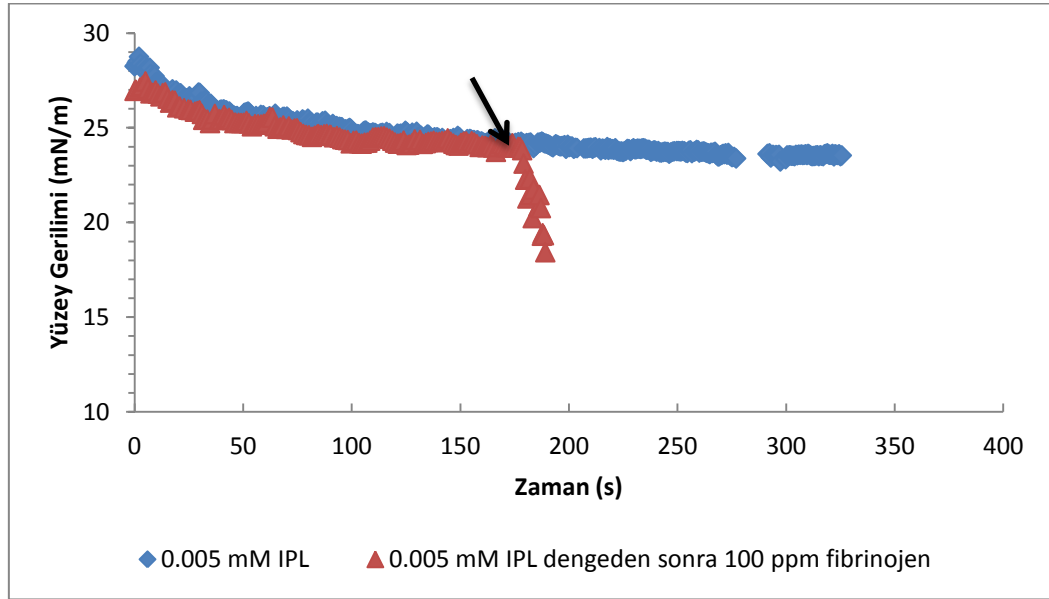
300 saniyeye çıkartmış, yani fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olmasını 3 kat geciktirmiştir. DPPC için görülen durumun tersine, 300 saniye sonra ise yüzeyde iki molekül beraber bulunmaktadır.



Şekil 4.19 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

IPL ile elde edilen sonuçlar, ortamda 10 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojenin ve DPPC'nin beraber bulunduğu durumdaki sonuçlardan daha olumlu olmuştur. Dolayısıyla protein konsantrasyonu 50 ppm'e çıkartılmıştır. 50 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen çözeltisi, yüzeyde IPL moleküllerinin yüzey gerilimini dengeye ulaştırmasından sonra 120. saniyede enjekte edilmiştir (Şekil 4.19). Enjeksiyondan yaklaşık 40 saniye sonra ise, yüzey geriliminde hızlı bir düşüş görülmektedir. Daha önce sadece 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen çözeltisinin indüksiyon periyodunun 25 saniye olduğu tespit edilmiştir. Bu sistem için ise, fibrinojenin sistemin yüzey geriliminde bir değişikliğe neden olabilmesi için yaklaşık 40 saniye geçmiştir. Bu durum, IPL moleküllerinin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu yavaşlattığını göstermektedir. 50 ppm'lik fibrinojen için sağlanan gecikme ~15 saniyedir. Normal koşullarda 15 saniye kısa bir süre gibi düşünülse de, üzerinde çalışılan sistem; yüzey özellikleri sürekli değişen alveoller gibi, dinamik bir sistemdir. Dinamik sistemler için ise yüzeyin kısa süreli davranışı kritiktir. Nefes alış

verişi çok kısa sürede gerçekleşen bir prosestir ve 15 saniye solunum açısından epey uzun bir zaman dilimidir. DPPC ile karşılaştırıldığında IPL'nin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonuna karşı engel oluşturduğu belirlenmiştir. Bu engel, IPL'nin yapısında bulunan PEO zincirlerinin ara yüzeyde aldığı konformasyon sayesinde, yarattığı sterik bariyerin etkisiyle oluşmaktadır. Adsorpsiyon süresinde sağlanan gecikme, fibrinojenin bu sistemde ara yüzeye sadece difüzyon kontrollü olarak adsorbe olmadığını, sistemde ara yüzeye adsorpsiyon için bir enerji bariyeri bulunduğunu kanıtlamıştır. Kurulan bu sistemde ara yüzeyin hemen alt fazına difüze olan fibrinojen molekülleri, ara yüzeye adsorbe olabilmek için bir enerji bariyerini yenmek zorunda kalmışlardır. Bu enerji bariyerinin ise, IPL'nin molekül yapısı ve ara yüzeydeki duruşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. DPPC'den farklı olarak IPL, proteinlerin ara yüzeye adsorpsiyonunu kısmi olarak engellemiş ve zorlaştırmıştır (Li et al., 1999). Elde edilen bu sonuç, proteinlerin adsorpsiyonunun kısa süreli olarak engellenmesi gereken durumlar için oldukça önemlidir.



Şekil 4.20 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 100 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

Dinamik sistemlerin çalışıldığı durumlar için 100 ppm, çok yüksek bir konsantrasyon olsa da, IPL'nin etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için bu derişimde de çalışılmıştır (Miller et al., 1998). 100 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen için, 10 ve 50 ppm

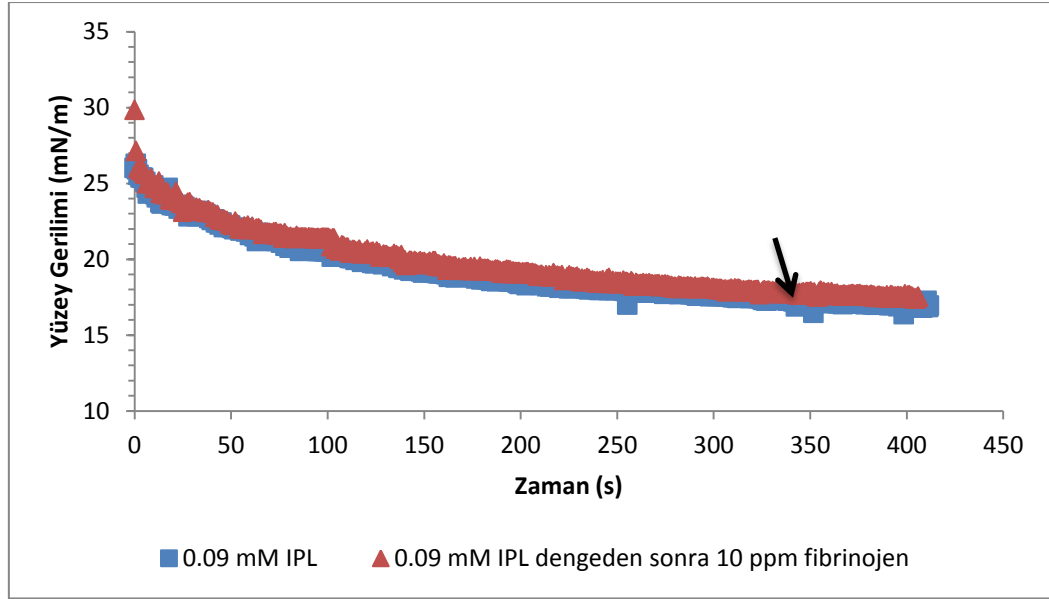
konsantrasyonlarında olduğu gibi öncelikle IPL'nin yüzeyde dengeye gelmesi beklenmiş ve 172. saniyede fosfat tampon fazına enjeksiyon yapılmıştır. Aynı koşullarda, ortamda sadece fibrinojen bulunduğu durumda yüzey gerilimindeki net düşüş yaklaşık 4 saniye sonra olmaktadır. IPL'nin ara yüzeyde bulunduğu bu sistem için ise, yüzey gerilimi, protein enjeksiyonundan 8 saniye sonra hızla düşmeye başlamıştır. Oldukça dikkat çeken ve önem arz eden bu sonuç, IPL'nin yüksek protein konsantrasyonunda bile, belirli bir süre için proteinlerin adsorpsiyonunu yavaşlattığını ve sistem üzerindeki etkilerinin baskılanabildiğini göstermiştir.

#### **4.2.2.2. Fosfat Tampon Fazındaki IPL Molekülünün Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Bu kısımda, IPL molekülünün fosfat tampon fazından enjekte edilmesi sonucu fibrinojen ile etkileşimi incelenmiştir. Bu amaçla 2 farklı deney sistemi oluşturulmuş ve böylece IPL'nin fibrinojen varlığındaki dinamik davranışı sistematik olarak araştırılmıştır.

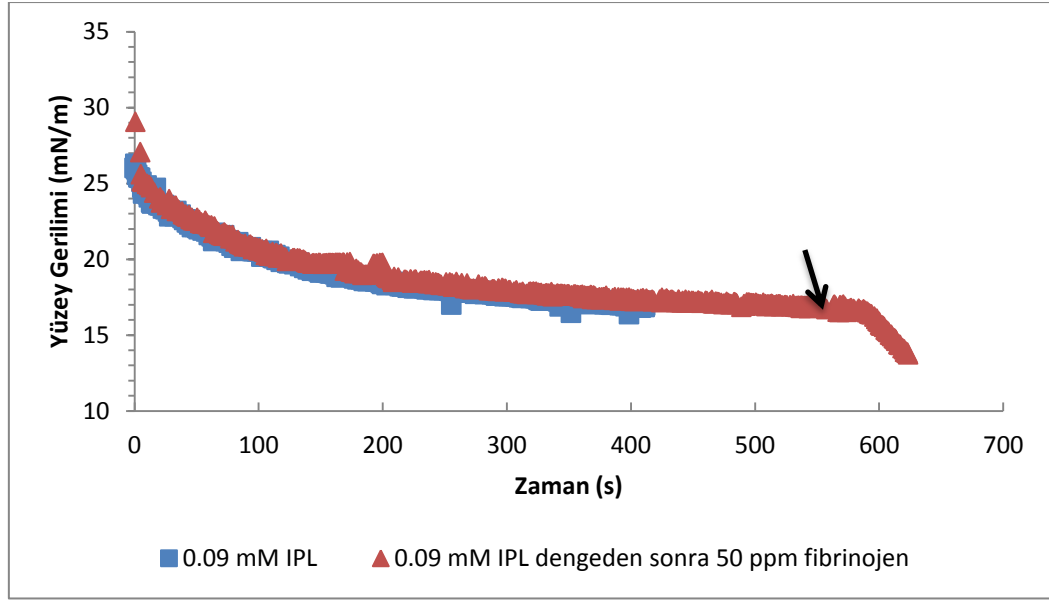
Deneylerin ilk kısmında IPL molekülü fosfat tampon fazından enjekte edilmiş ve yüzey geriliminin dengeye gelmesi beklendikten sonra küvetteki son konsantrasyonu sırasıyla 10, 50 ve 100 ppm olacak şekilde tampon faza fibrinojen çözeltisi enjekte edilmiştir. 10 ppm için elde edilen yüzey gerilimi – zaman grafiği Şekil 4.21'de sunulmuştur.

IPL molekülünün yüzeyde optimum şekilde yerleşmesiyle yüzey gerilimini dengeye ulaştırması beklenmiş ve denge durumundan sonra 250. saniyede sisteme fibrinojen çözeltisi enjekte edilmiştir. Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde 10 ppm konsantrasyonundaki fibrinojen çözeltisinin indüksiyon periyodu 100 saniye olarak bulunmuştur. Ara yüzeyde IPL olduğu durumda ise, fibrinojen enjeksiyonundan sonra 100 saniyeden fazla süre geçmesine rağmen, yüzey geriliminde bir değişiklik görülmemekte ve damlanın yüzey gerilimi IPL için spesifik olan denge yüzey geriliminde kalmaktadır. Bu durum, IPL varlığında fibrinojen moleküllerinin ara yüzeye adsorbe olamadığını göstermektedir.



Şekil 4.21 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

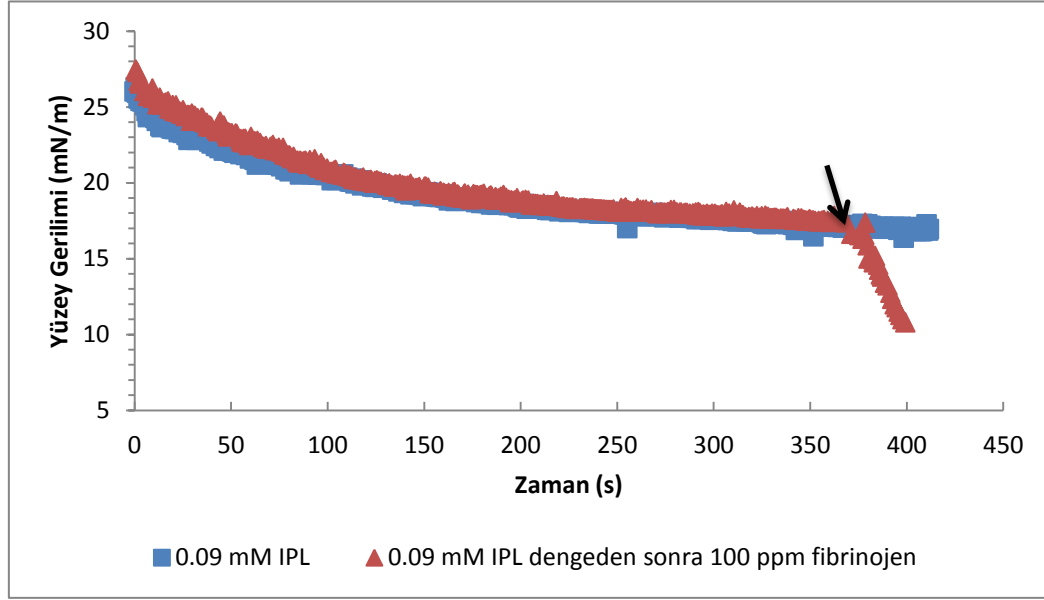
Şekil 4.21'de ayrıca ara yüzeyde sadece IPL molekülü bulunurken elde edilmiş yüzey gerilimi – zaman izotermi çizilmiştir. Bu grafikten de görüleceği gibi, fibrinojen alt faza dahil edilse bile IPL'nin adsorpsiyon davranışı, ortamda tek başına bulunurkenki davranışı ile aynı olmaktadır. Bu da, fibrinojen moleküllerinin yüzeye yerleşemediklerinin başka bir kanıtıdır. Eksi yüke sahip olan fibrinojenin, IPL'nin yapısında bulunan PEO zincirinin etkisi ve ara yüzeyde aldığı konformasyon sayesinde ara yüzeye ulaşamadığı ve böylece, yüzey geriliminde herhangi bir değişikliğe sebep olamadığı düşünülmektedir.



Şekil 4.22 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

10 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen varlığında başarılı bir sonuç elde edilmesiyle, fibrinojen konsantrasyonu 50 ppm'e çıkartılmıştır. Şekil 4.22'de gösterilen bu sistem için IPL yüzeye adsorbe olduktan sonra yaklaşık 550. saniyede fosfat tampon fazına fibrinojen enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyondan yaklaşık 50 saniye sonra, yüzey geriliminde düşüş görülmeye başlanmıştır. Daha önce 50 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen için fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde elde edilen sonuçlara bakıldığında, yüzey geriliminin düşmeye başlamasından önce yaklaşık 25 saniyelik bir indüksiyon periyodu görülmektedir. Bu durumda, IPL'nin, 50 ppm son konsantrasyondaki fibrinojenin adsorpsiyonunu yaklaşık 25 saniye geciktirdiği görülmektedir. Bu da IPL'nin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyon süresini 2 kat yavaşlattığı anlamına gelmektedir. Daha sonra yüzey gerilimindeki düşüş, fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olduğunu gösterse de, IPL ilk etapta fibrinojenin adsorpsiyon özelliklerini değiştirmiştir. Fibrinojenin adsorpsiyon süresini yavaşlatmak ve ara yüzeye yerleşmesini zorlaştırmak, IPL'nin sentezlenmesindeki hedeflerden birisidir. Bu hedefin gerçekleştirilmesinde daha incelenecek çok parametre olsa da bu basamakta alınan sonuçlar umut vericidir.

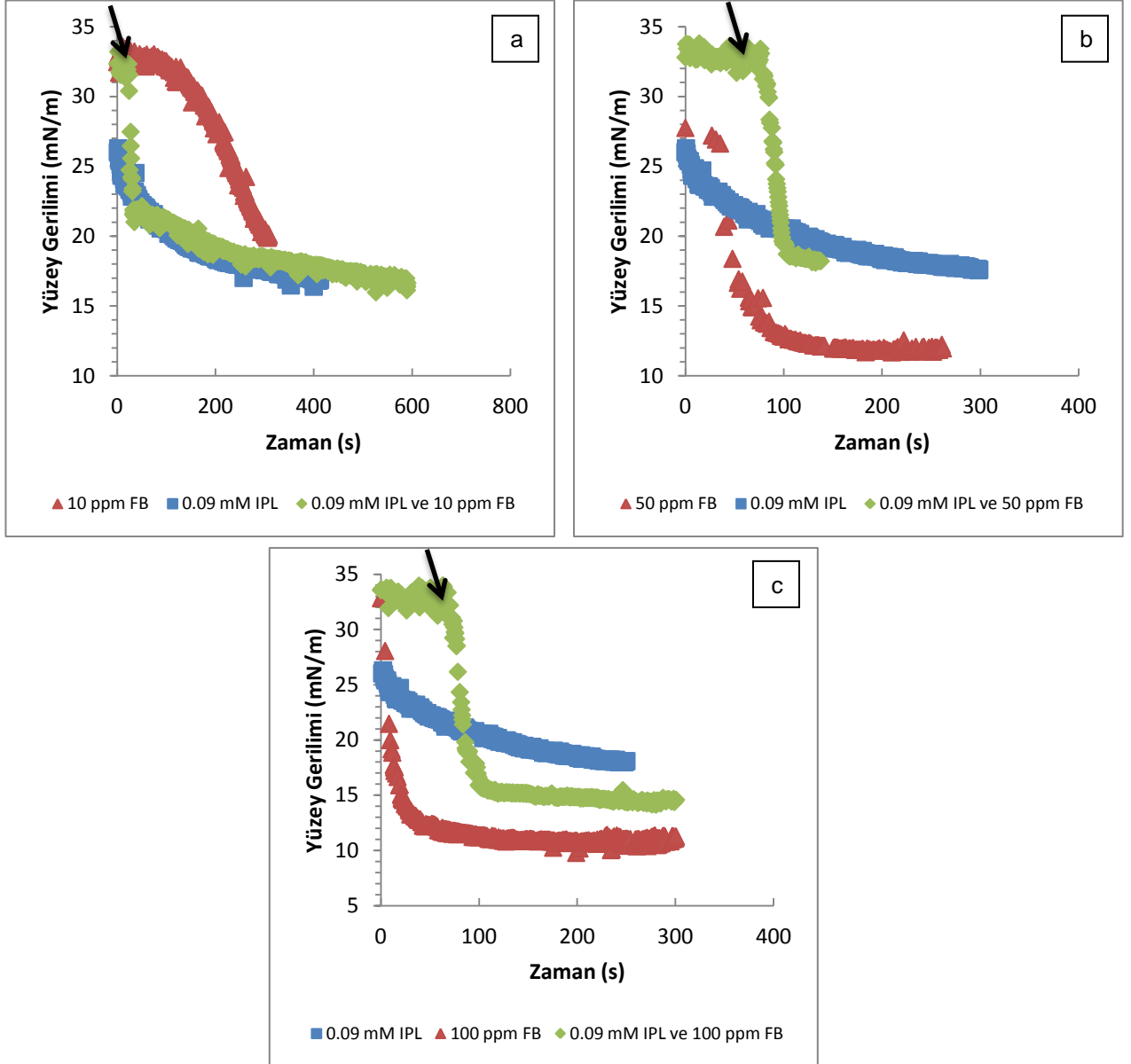
Bu kısımda son olarak, 10 ve 50 ppm için elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak fibrinojen konsantrasyonu 100 ppm'e çıkartılmıştır.



Şekil 4.23 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde IPL bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 100 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

100 ppm, literatürde bu yöntemle yapılan çalışmalara göre bir hayli yüksek bir konsantrasyon olsa da, IPL'nin etkisinin daha iyi anlaşılması amacıyla bu konsantrasyonla incelemeler tekrarlanmıştır. Normal koşullarda fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde 100 ppm'lik fibrinojen çözeltisinin indüksiyon periyodu 3 - 4 saniyedir. Bölüm 4.2.1.6'da alınan sonuçlara bakıldığında, 3 – 4 saniye sonra, yüzey gerilimi hızla düşmekte ve yaklaşık 10 mN/m değerinde dengeye ulaşmaktadır. Ara yüzeyde IPL bulunurken, tampon faza 100 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen çözeltisinin enjekte edilmesinden 6 saniye sonra yüzey geriliminde düşme görülmeye başlanmıştır. Bu kadar yüksek protein konsantrasyonunda IPL'nin 2 – 3 saniye de olsa fibrinojenin adsorpsiyonunu geciktirmesi oldukça etkileyici bir sonuçtur. Aynı konsantrasyonda çalışılan diğer maddeler için tampon faza fibrinojenin enjekte edilmesiyle aynı anda yüzey geriliminin düşmesi, IPL'nin göreceli olarak fibrinojenin adsorpsiyonunu yavaşlattığının bir kanıtıdır.

IPL ve fibrinojenin etkileşimlerinin dinamik açıdan incelenmesi amacıyla kurulan ikinci sistem ise, yarışmalı adsorpsiyon koşulunun modellenmesidir. Bu şekilde, aynı anda fosfat tampon fazına verilen iki maddenin birbirine kıyasla adsorpsiyon davranışları incelenecek, iki madde arasındaki etkileşim yorumlanabilecektir. Küvetteki son konsantrasyonu 10, 50 ve 100 ppm olan fibrinojen ile IPL'nin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine yarışmalı adsorpsiyon sonuçları Şekil 4.24'te sunulmuştur.



Şekil 4.24 0.09 mM IPL ile (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonunda fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafikleri: (◆) yarışmalı adsorpsiyon, (■) saf IPL, (▲) saf fibrinojen

Yarışmalı adsorpsiyon sistemi için alınan sonuçlar Şekil 4.24(a), (b) ve (c)' de gösterilmiştir. 10 ppm fibrinojen ile IPL tampon faza aynı anda verildiğinde, yüzey gerilimi enjeksiyonla birlikte hemen düşmeye başlamış ve elde edilen yüzey gerilimi – zaman izoterme, ara yüzeyde sadece IPL bulunduğu durumla aynı olmuştur. Fibrinojen varlığında IPL'nin adsorpsiyon özelliklerinin incelendiği bu bölümün ilk çalışmasıyla paralel olarak IPL, yarışmalı adsorpsiyon durumunda da 10 ppm miktarındaki fibrinojene karşı baskın gelmiştir. İki madde aynı anda alt faza verildiğinde, alınan izoterme göre, IPL molekülleri fibrinojene göre çok hızlı bir şekilde ara yüzeye adsorbe olup, optimum konformasyonlarını almışlardır. Fibrinojen moleküllerinin, yüzeyin hemen altına yerleşmeler bile, IPL'nin yarattığı sterik engelleme sayesinde ara yüzeye çıkamadıkları düşünülmektedir. Dolayısıyla bu miktar fibrinojen için IPL'nin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu engellediği belirlenmiştir.

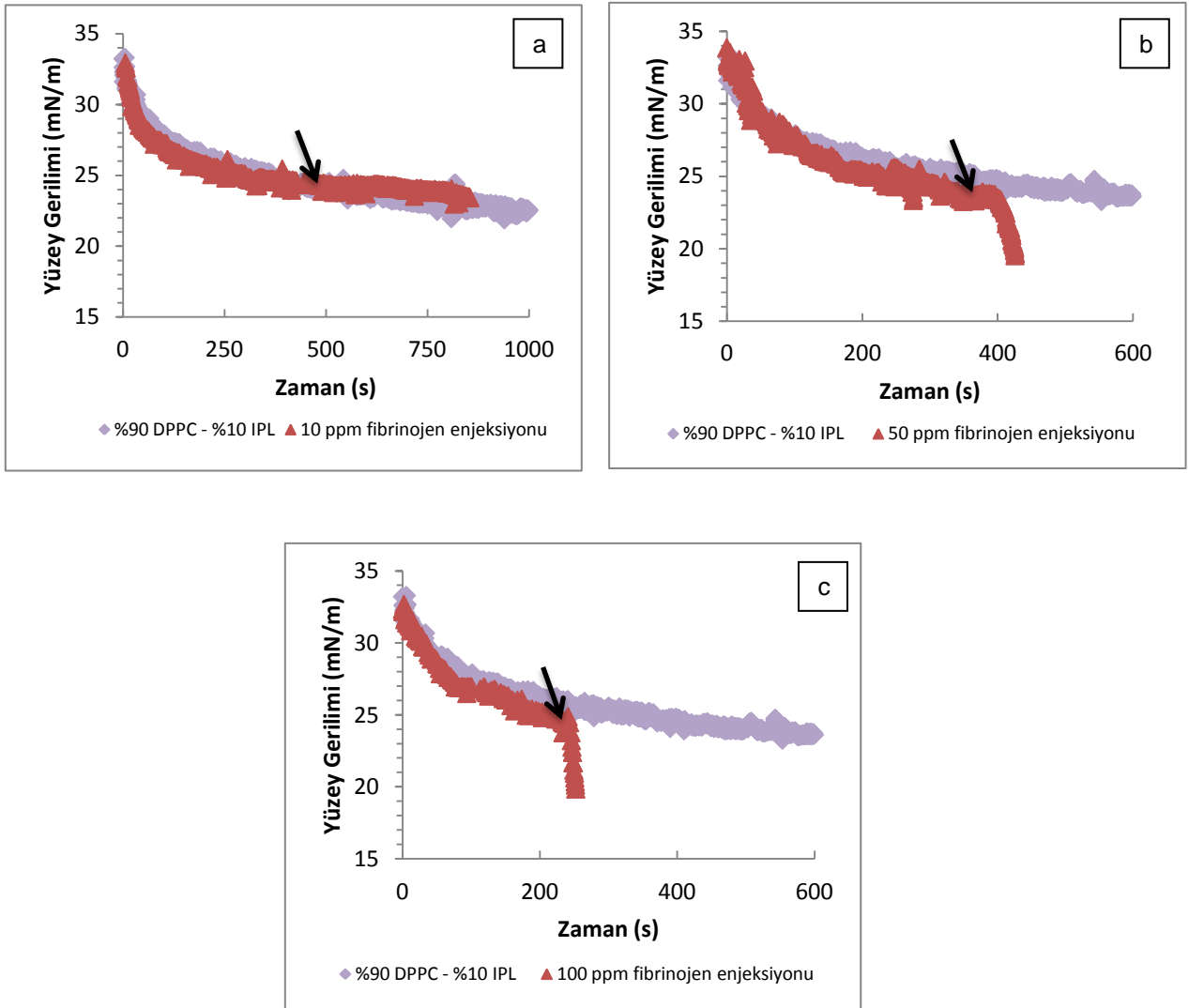
50 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen için elde edilen grafiğe bakıldığında önce küvette oluşturulan kloroform damlasının dengeye gelmesinden sonra 55. saniyede iki madde fosfat tampon fazına aynı anda enjekte edilmiş ve enjeksiyondan yaklaşık 25 saniye sonra yüzey gerilimi hızla düşmeye başlamıştır. 25 saniyelik plato, 50 ppm konsantrasyondaki fibrinojen için belirlenen indüksiyon periyodu ile aynı uzunluktadır. Ancak, hızlı düşmeyle birlikte damlanın dengeye ulaştığı yüzey gerilimi, IPL'nin tek başına ulaştığı denge değeriyle aynıdır. Her ne kadar yüzey geriliminin düşmeye başlaması için gereken süre fibrinojenin indüksiyon periyodu kadar olsa da, düşüş hızının ortamda sadece 50 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen bulunduğu durumdan çok daha hızlı olması ortamda başka bir maddenin de etkisi olduğunu göstermektedir. 50 ppm'lik fibrinojen ortamda tek başına bulunduğu anda, ara yüzeyin dengeye gelmesi 80 saniye almaktadır. Ancak bu sistemde bu süre 25 saniye olarak belirlenmiştir. Üstelik sistemin ulaştığı denge yüzey gerilimi saf IPL'nin denge yüzey gerilimi ile aynı olmuştur. Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, 50 ppm fibrinojen ve IPL'nin yarışmalı adsorpsiyonu sonucu IPL'nin ara yüzeye hızlı bir şekilde yerleşerek sistemi kontrol edebildiği anlaşılmıştır.



Fibrinojen konsantrasyonu 100 ppm'e çıkartıldığında ise alınan sonuçlar Şekil 4.24(c)'de sunulmuştur. İki madde tampon faza 62. saniyede aynı anda enjekte edilmiş ve yüzey gerilimi enjeksiyondan yaklaşık 8 saniye sonra düşmeye başlamıştır. Ara yüzeyde sadece 100 ppm fibrinojen bulunduğu durumda görülen indüksiyon periyodunun 4 saniye olmasına karşın bu sistemde plato bölgesinin yaklaşık 2 katına çıkması, ara yüzeyde sadece fibrinojenin etkisi olmadığını göstermiştir. Aynı fazdan verilen iki madde, alt fazda etkileşmiş ve elde edilen profile göre ne fibrinojen ne de IPL tek başına baskın gelememiş, iki madde de yüzeye adsorbe olabilmıştır. Yüzey geriliminin dengeye geldiği son değer iki maddeyle de aynı olmaması da bu durumun başka bir göstergesidir. Başka bir deyişle, 100 ppm fibrinojen için yarışmalı adsorpsiyon sisteminde IPL tam olarak fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu engelleyemese de, bu yüksek protein konsantrasyonunda kısmi olarak etki göstermiştir.

#### **4.2.2.3. DPPC/IPL Karışımlarının Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Sistemde sadece DPPC ve sadece IPL bulunurken ortama fibrinojen eklendiğindeki değişimler incelendikten sonra, DPPC ve IPL'nin farklı mol oranlarındaki karışımları için aynı deney sistemi kurularak, karışımların Bölüm 4.2.1.3'te belirlenen ara yüzey davranışlarına 10, 50 ve 100 ppm son konsantrasyonlarındaki fibrinojenin etkisi araştırılmış ve diğer sistemlerle karşılaştırılmıştır.

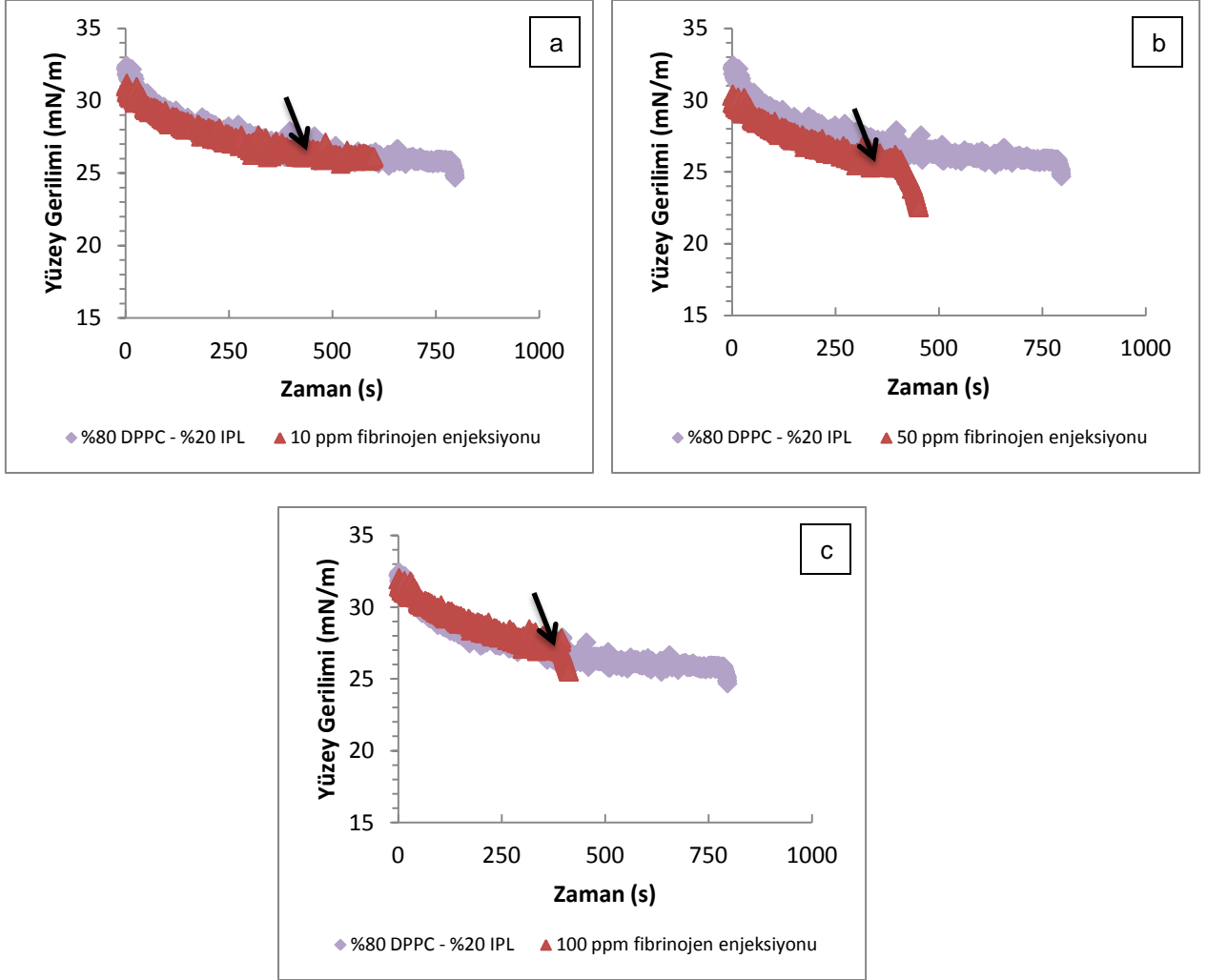


Şekil 4.25 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda molce %90 - %10 DPPC – IPL karışımı bulunurken (♦) alt faza (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonda fibrinojen çözeltisi (▲) eklendiğinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafikleri

Şekil 4.25(a)'da görülen izoterm, karışım ara yüzeyde denge yüzey gerilimine ulaştıktan sonra, 500. saniyede fosfat tampon fazına 10 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojenin enjekte edilmesi ile elde edilmiştir. Damla fazında sadece DPPC'nin bulunduğu durumda 10 ppm fibrinojen çözeltisinin dış faza enjeksiyonundan 110 saniye sonra, sistemin denge durumu bozulmuş, yüzey gerilimi hızlı bir şekilde düşmüştür. Ancak IPL'nin molce sadece %10 oranında bulunduğu bu

karışım için bu durum değişmiş; enjeksiyondan sonra ara yüzey davranışında bir değişiklik görülmemiştir. 10 ppm derişimindeki fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olamadığı ve yüzey gerilimini değiştiremediği sonucuna varılmıştır. Bu durumun DPPC ile IPL'nin etkileşiminin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Fibrinojen konsantrasyonu 50 ppm'e çıkartıldığında ise (Şekil 4.25b) enjeksiyondan 25 saniye sonra ara yüzeyde denge durumu değişmiş ve yüzey gerilimi hızla düşmüştür. Elde edilen sonuç sadece DPPC'nin bulunduğu durumdan daha başarılıdır, ancak fibrinojen konsantrasyonunun 5 kat artırılması, karışımın performansının yetersiz kalmasına sebep olmuştur. Son olarak protein konsantrasyonu 100 ppm'e yükseltildiğinde (Şekil 4.25c), enjeksiyondan 5 saniye sonra yüzey geriliminde ani azalma görülmektedir. Ortamda sadece IPL varken, aynı fibrinojen miktarı için bu süre 8 saniyeyi bulmuştur, ancak karışımın molce %90 oranında DPPC bulunması nedeniyle bu süre kısalarak 5 saniyeye düşmüştür. Daha önce belirtildiği gibi bu sonuç beklenen bir sonuçtur çünkü hem fibrinojen miktarı çok artırılmış, hem de karışımındaki DPPC oranı IPL'ye göre çok yüksek kalmıştır.

50 ve 100 ppm konsantrasyonlarında çok başarılı sonuçlar elde edilemese de, sistemin gösterdiği özellikler, DPPC'nin tek başına gösterdiği özelliklere göre net olarak iyileştirilmiştir. Bu iyileştirme IPL'nin sisteme eklenmesi ile sağlanmıştır. Ara yüzeyde az miktarda da olsa IPL'nin bulunmasıyla hem elde edilen yüzey gerilimi – zaman izotermi değişmiş, hem de tekli tabakanın fibrinojen varlığındaki davranışı pozitif yönde değişmiştir. Aralarında sinerjik bir etkileşim olduğu bilinen bu iki maddenin karışım oranları değiştirilerek fibrinojen etkisi incelenmeye devam edilmiştir (Şekil 4.26).



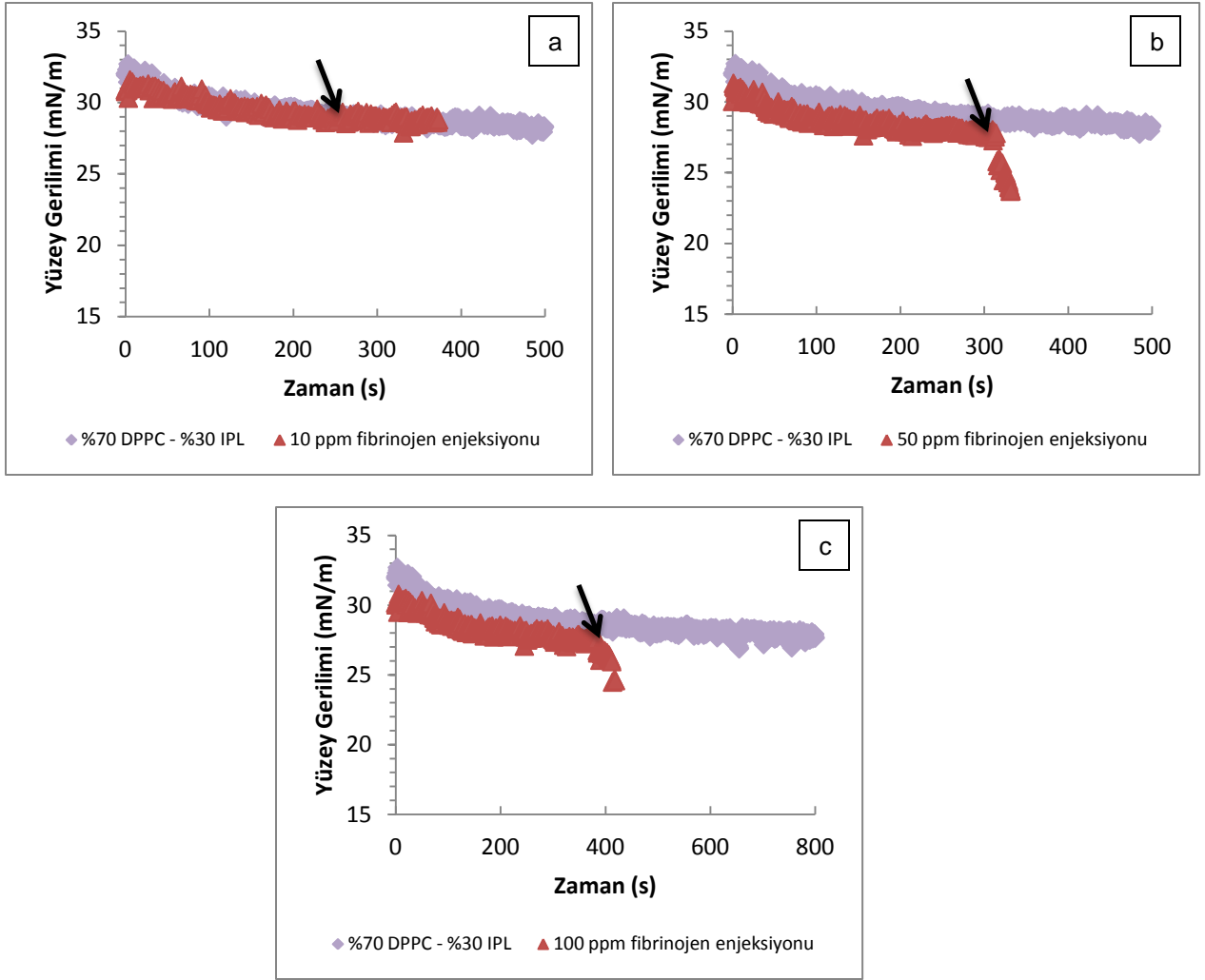
Şekil 4.26 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda molce %80 - %20 DPPC – IPL karışımı bulunurken (◆) alt faza (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonda fibrinojen çözeltisi (▲) eklendiğinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafikleri

IPL'nin mol oranının %20'ye çıkartılmasıyla, DPPC – IPL karışımının fibrinojen varlığındaki davranışlarında daha fazla iyileşme görülmektedir. IPL tek başına kloroform fazda bulunduğu gösterdiği yüzey özellikleri çok iyi olmasa da, tez kapsamındaki asıl hedefin fibrinojen moleküllerinin ara yüzeye adsorpsiyonlarının azaltılması olduğu düşünüldüğünde molce düşük miktarda IPL'nin karışıma katılması ile elde edilen sonuçların başarılı olduğu düşünülmektedir.

10 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen ile başlanan çalışmalarda, ilk karışım oranında olduğu gibi, dengeye gelmiş %80 DPPC - %20 IPL karışımının yüzey geriliminde bir farklılaşma görülmemiştir (Şekil 4.26a). Bu durum, IPL'nin varlığının DPPC'nin ara yüzey özelliklerini geliştirdiğinin bir belirtisidir. Daha yüksek fibrinojen konsantrasyonu için, ara yüzey dengeye geldikten sonra 348. saniyede 50 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edilmiştir. Yüzey gerilimindeki hızlı azalma enjeksiyondan 71 saniye sonra gerçekleşmiştir. 50 ppm derişimindeki saf fibrinojenin yüzey geriliminde bir değişiklik yaratmaya başlaması 25 saniye almaktadır. Dolayısıyla aradaki 46 saniyelik fark, ara yüzeyde dengede bulunan maddelerin davranışı ile alakalıdır. DPPC ve IPL, molce sırasıyla %80-%20 oranında karıştırıldığında elde edilen sonuç daha önceki sonuçlara kıyasla çok daha başarılıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda da bu iki maddenin ikili karışımları arasında en etkili sonuçlar bu karışım oranında alınmış, yine bu karışım oranında IPL, sisteme yaptığı pozitif etki ile gerçek sistemdeki SP-B molekülünü taklit edebilmiştir (Uslu, 2009). 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojenin enjeksiyonu sonucunda, 25 saniye sonra bozulması gereken ara yüzey 71 saniye boyunca kendi yapısını koruyabilmiş ve proteinin adsorpsiyonu net olarak 46 saniye kadar gecikmiştir. İki maddenin ara yüzeyde birbiri ile etkileşiminin yanı sıra fibrinojene karşı da bir adsorpsiyon bariyeri oluşturulmuş ve böylece, aslında ara yüzeyin hemen alt fazına çok hızlı bir şekilde difüze olabilen fibrinojen, ara yüzeye adsorbe olmakta gecikmiştir. Bu mol oranındaki karışım, ortamda sadece DPPC ya da sadece IPL'nin bulunduğu durumdan çok daha etkili bir sonuç vererek aralarındaki sinerjik etkileşimi bir kere daha kanıtlamıştır.

Son olarak, fosfat tampon fazına 100 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen çözeltisinin enjekte edilmesiyle ara yüzey davranışı incelenmiş ve enjeksiyondan yaklaşık 10 saniye sonra yüzey gerilimi değişmiştir. Normalde 3-4 saniye olan fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyon süresi 10 ve 50 ppm derişimlerinde olduğu gibi bu derişimde de uzamıştır.

Molce %80 - %20 DPPC – IPL karışımı için elde edilen parlak sonuçların, karışımındaki IPL oranı arttırıldığında ne yönde değişeceğinin incelenmesi adına, %70-30 DPPC – IPL karışımı ile çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'de sunulmuştur.



Şekil 4.27 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde kloroform fazda molce %70 - %30 DPPC – IPL karışımı bulunurken (  $\blacklozenge$  ) alt faza (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonda fibrinojen çözeltisi (  $\blacktriangle$  ) eklendiğinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafikleri

Diğer karışım oranlarındaki gibi, 10 ppm son konsantrasyondaki fibrinojen alt faza verildiğinde, ara yüzeyde denge bozulmamış ve ara yüzey süregelen davranışını devam ettirmiştir (Şekil 4.27a). Fibrinojen derişimi 50 ppm olduğu durumda ise, sisteme enjeksiyon 263. saniyede yapılmış ve yüzey geriliminde bir değişikliğin görülmesine kadar geçen süre 35 saniye olarak ölçülmüştür. 50 ppm saf fibrinojen için 25 saniye olan adsorpsiyon süresi bu karışım oranında da geciktirilmiş ve

fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonu, yaratılan bariyer sayesinde 10 saniye daha uzatılmıştır. Bu karışım oranında %80 - %20'lik karışım kadar başarılı sonuç elde edilemese de bulgular, ortamda sadece DPPC'nin bulunduğu durumdan ve molce %90 - %10 oranındaki karışım ile ulaşılan sonuçlarından daha iyidir. Kloroform fazında sadece IPL'nin bulunduğu durumda fibrinojenin adsorpsiyonu 15 saniye geciktirilmiştir, yani DPPC ve IPL bu karışım oranında da etkileşmiş, IPL'nin özellikleri korunmuş ancak bir önceki durum kadar etkili olamamıştır (Şekil 4.27b).

Ancak, alt faza 100 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen enjekte edildiğinde, enjeksiyondan 5 saniye sonra ara yüzeydeki denge durumu bozulmuştur. 100 ppm'lik fibrinojen, miktar olarak çok baskın gelmiş ve ara yüzeydeki karışım, enjeksiyondan hemen sonra fibrinojenin normal süresinde ara yüzeye adsorbe olmasını engelleyememiştir. Çizelge 4.3'de çalışılan sistemlere fibrinojen enjekte edilmesinden sonra yüzey geriliminin düşmesine kadar geçen süreler listelenmiştir.

Çizelge 4.3 DPPC, IPL ve DPPC-IPL karışımları için surfaktant inaktivasyonu modellemesi sonucu enjeksiyon anından itibaren yüzey geriliminin düşmeye başladığı ana kadar geçen sürelerin karşılaştırılması

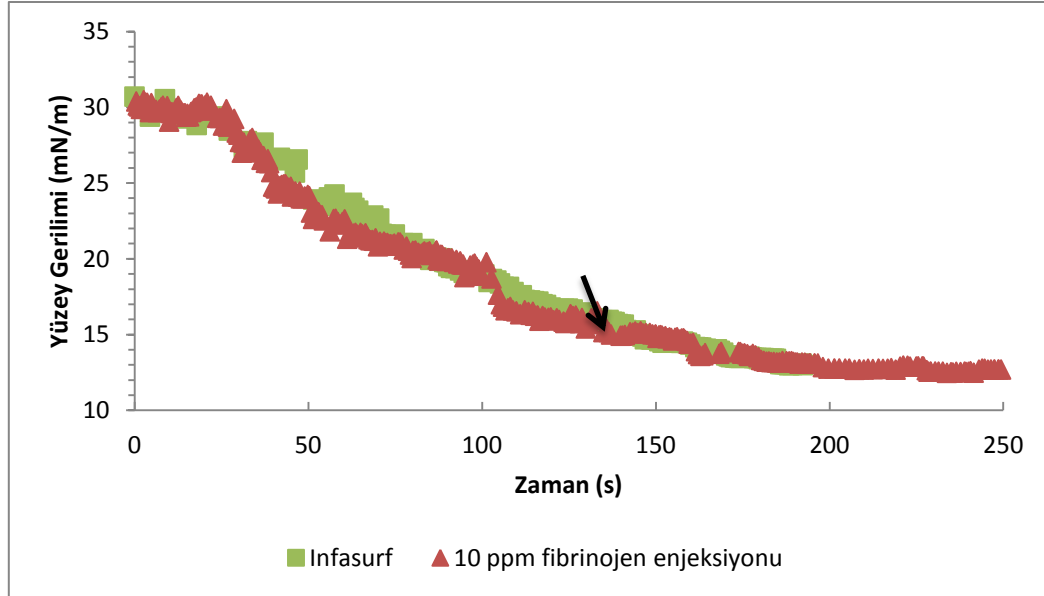
**Enjeksiyon anından yüzey geriliminin düşmesine kadar geçen süre, saniye**

<b>Madde</b>	<b>10 ppm fibrinojen</b>	<b>50 ppm fibrinojen</b>	<b>100 ppm fibrinojen</b>
<b>DPPC</b>	120 ± 1 s	5 ± 1 s	-
<b>IPL</b>	>100 ± 1 s	40 ± 1 s	8 ± 1 s
<b>DPPC-IPL karışımı</b>			
<b>%90 - %10</b>	>100 ± 1 s	25 ± 1 s	5 ± 1 s
<b>%80 - %20</b>	>100 ± 1 s	71 ± 1 s	10 ± 1 s
<b>%70 - %30</b>	>100 ± 1 s	35 ± 1 s	5 ± 1 s
<b>Fibrinojen</b>	100 ± 1 s	25 ± 1 s	4 ± 1 s

#### 4.2.2.4. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Dinamik Davranışına Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi

Bu kısımda Infasurf® ve fibrinojenin etkileşiminin daha net anlaşılabilmesi adına iki farklı deney sisteminde inceleme yapılmıştır. Infasurf® fosfat tamponda çözünebildiği için, fibrinojen ve Infasurf®'ü aynı fazdan sisteme vermek mümkün olmuş ve böylece daha önceki deneylere paralel olarak surfaktant inaktivasyonunun modellenenebilmesi dışında, iki maddenin birbirine göre yarışmalı adsorpsiyon davranışları belirlenebilmiştir.

İnceleme yapılan ilk deney koşulu, surfaktant inaktivasyonunun taklit edildiği, ara yüzeyde yüzey aktif madde bulunurken alt faza fibrinojen enjeksiyonunun yapıldığı durumdur. Bu koşulda, Infasurf® önce ara yüzeye adsorbe olacak ve böylece, ara yüzeyde doğal akciğer yüzey aktif maddesinin oluşturduğu ara yüzeye yakın bir yüzey elde edilebilecektir. Diğer kısımlarda olduğu gibi, bu kısımda da çalışılan ilk protein konsantrasyonu 10 ppm'dir.



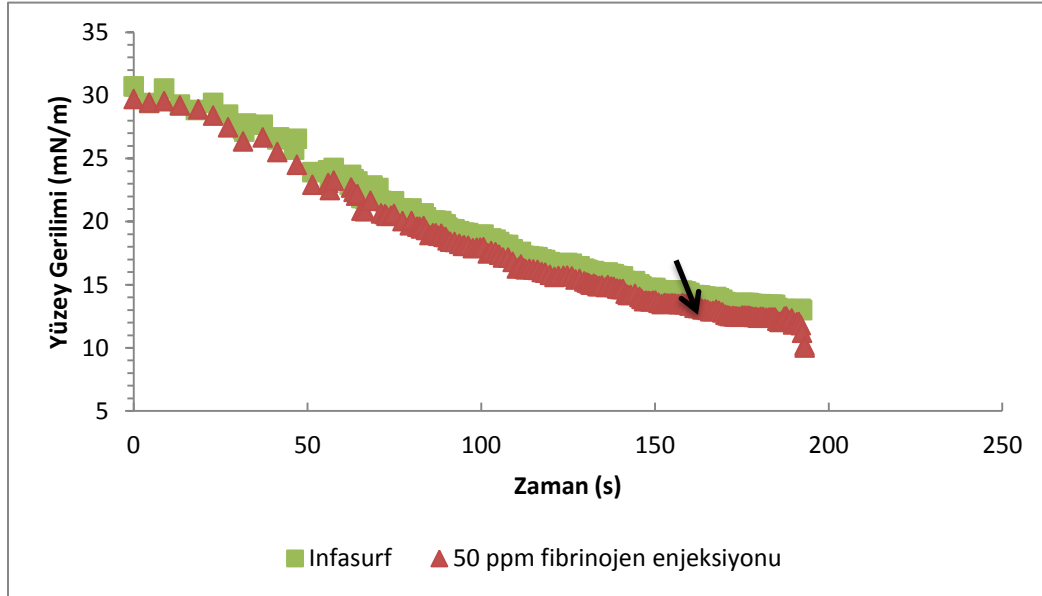
Şekil 4.28 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde Infasurf® bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

Fosfat tampon içerisinde oluşturulan damlanın yüzeyinde Infasurf® tarafından oluşturulmuş ve artık stabil hale gelmiş yüzey aktif madde tabakası bulunurken,



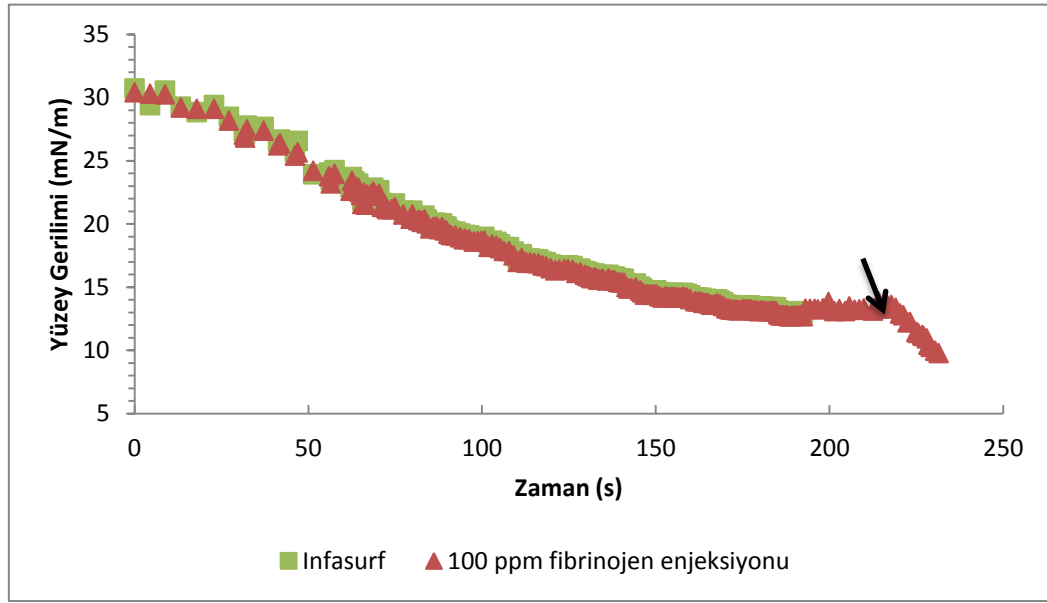
sisteme 130. saniyede küvetteki son konsantrasyonu 10 ppm olan fibrinojen  zeltisi enjekte edilmiştir. Şekil 4.28'de sonuçları verilen bu deney sisteminde, protein  zeltisi enjekte edildikten sonra yüzey geriliminde hiçbir değişme olmadığı belirlenmiştir. Başka bir deyişle, ara yüzeyde yayılmış ve dengeye gelmiş yüzey aktif madde karışımı, 10 ppm'lik fibrinojen  zeltisinin yüzeye adsorbe olmasını engellemiştir. Infasurf<sup>®</sup>' n RDS tedavisinde kullanılması ve 10 ppm'in çok da yüksek bir derişim olmaması sebebiyle, bu sonuç beklentilerle uyumludur.

Aynı koşullarda fibrinojen  zeltisi, net konsantrasyonu 50 ppm olacak Şekilde sisteme enjekte edildiğinde ise yüzey gerilimi 30 saniye kadar sabit kalmış ancak, 30 saniyenin sonunda düşmeye başlamıştır. 50 ppm fibrinojen  zeltisinin indüksiyon periyodu 25 saniye olmasına rağmen, yüzey geriliminin düşmesi normalden 5 saniye daha uzun sürmüştür (Şekil 4.29). Bu durumda, Infasurf<sup>®</sup>, kullanılan bu konsantrasyonu için fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu belirli bir miktar yavaşlatmaktadır. Ancak ara yüzeyde oluşturduğu adsorpsiyon bariyeri IPL kadar etkin olamamıştır.



Şekil 4.29 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde Infasurf<sup>®</sup> bulunurken alt faza küvetteki son konsantrasyonu 50 ppm olan fibrinojen  zeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

Ara yüzeyde dengeye ulaşmış Infasurf® bulunurken, 100 ppm son konsantrasyonunda fibrinojenin fosfat tampona enjekte edilmesiyle birlikte 3-4 saniye içinde yüzey gerilimi düşmüştür. Düştüğü nokta ise, diğer sistemlerde de olduğu gibi fibrinojen için elde edilen denge yüzey gerilimidir (Şekil 4.30). 3-4 saniye, ara yüzeyde hiçbir madde yokken 100 ppm fibrinojen için spesifik olan indüksiyon periyoduna eşittir. Dolayısıyla hem enjeksiyon sonrasında geçen sürenin 100 ppm'lik fibrinojenin indüksiyon periyoduna eşit olması, hem de ulaşılan değer fibrinojenin denge yüzey gerilimine eşit olması, ara yüzeyde fibrinojen olduğunun göstergesidir.



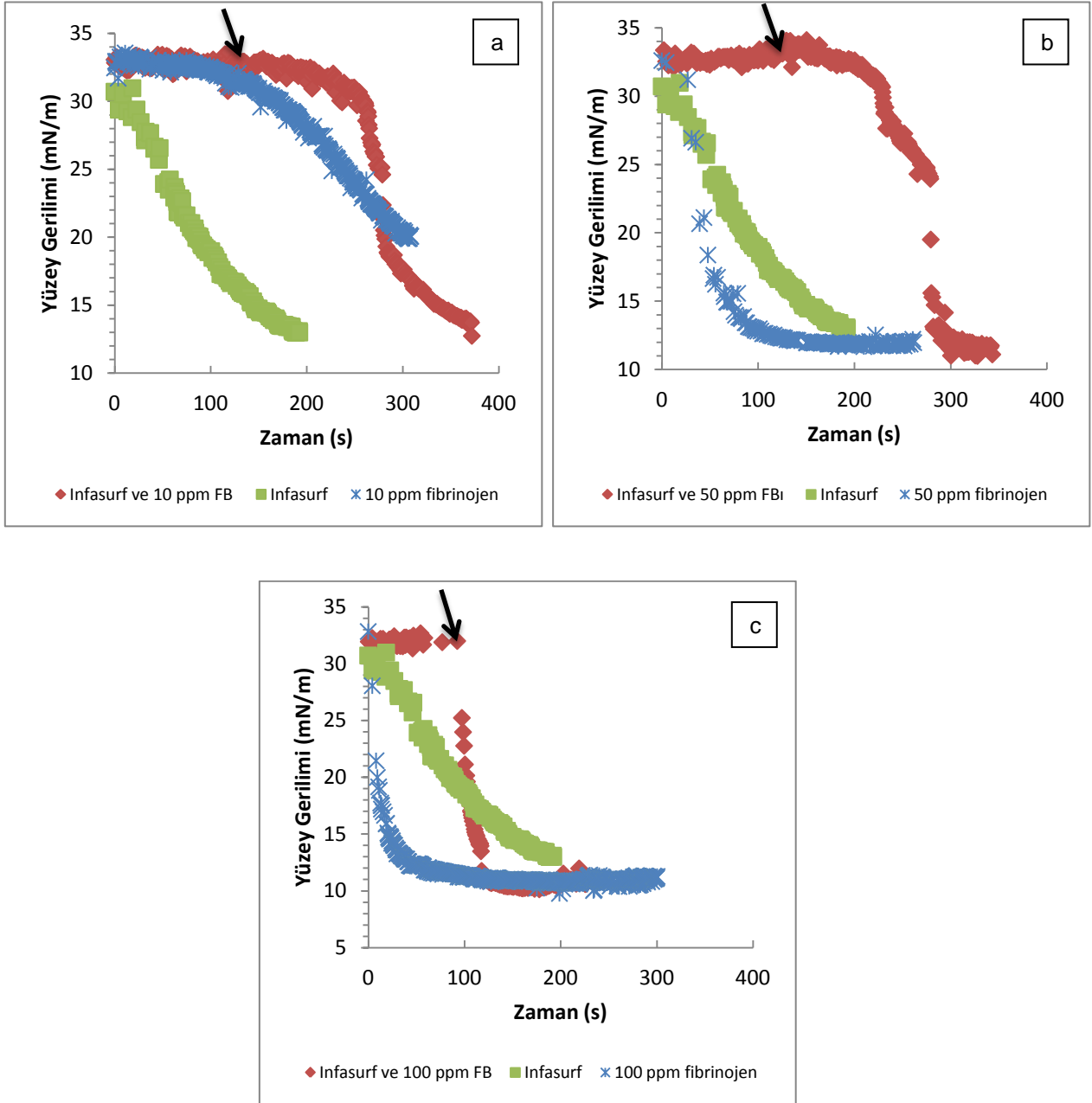
Şekil 4.30 Fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde Infasurf® bulunurken alt faza kuvetteki son konsantrasyonu 100 ppm olan fibrinojen çözeltisinin eklenmesi sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafiği

Çizelge 4.4'te surfaktant inaktivasyonu modellenmesi sonucu, ara yüzeyde yüzey aktif madde bulunurken, ortama değişik konsantrasyonlarda fibrinojen enjekte edilmesiyle birlikte yüzey geriliminin düşmeye başladığı nokta arasındaki süreler listelenmiştir.

Çizelge 4.4 Infasurf® ve fosfat tamponda çözünen IPL için surfaktant inaktivasyonu modellemesi sonucu enjeksiyon anından itibaren yüzey geriliminin düşmeye başladığı ana kadar geçen sürelerin karşılaştırılması

Enjeksiyon anından yüzey geriliminin düşmesine kadar geçen süre, saniye			
Madde	10 ppm fibrinojen	50 ppm fibrinojen	100 ppm fibrinojen
Infasurf®	>100 ± 1 s	35 ± 1 s	4 ± 1 s
IPL	>100 ± 1 s	50 ± 1 s	6 ± 1 s
Fibrinojen	100 ± 1 s	25 ± 1 s	4 ± 1 s

Bu çizelgeye göre, IPL ile 50 ve 100 ppm son konsantrasyonlarındaki fibrinojen çözeltisi için elde edilen sonuçların Infasurf®'e göre daha başarılı olduğu görülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar, Infasurf®'ün ARDS tedavisinde kullanılmaya çalışıldığını ancak yüksek protein konsantrasyonlarında, onun da doğal akciğer yüzey aktif maddesi gibi işlevini kaybettiğini göstermiştir. Bu durum, Infasurf®'ün özelliklerinin iyileştirilebilmesi amacıyla, IPL'nin kullanılabilirliğinin araştırılması fikrini doğurmuştur. Ancak daha net yorum yapılabilmesi için IPL ile yapılan çalışmalara paralel olarak yarışmalı adsorpsiyon sistemi kurulmuş ve aynı protein konsantrasyonu değerlerinde, fibrinojen ile etkileşimler incelenmiştir.



Şekil 4.31 Infasurf® ile (a) 10 ppm, (b) 50 ppm ve (c) 100 ppm son konsantrasyonunda fibrinojenin yarışmalı adsorpsiyonu sonucu elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s) grafikleri: (♦) yarışmalı adsorpsiyon, (■) saf Infasurf, (✱) saf fibrinojen

Yarışmalı adsorpsiyon koşulunun oluşması için öncelikle içi fosfat tampon çözeltisi ile doldurulmuş kuartz küvette kloroform damlası oluşturulmuş, daha sonra fosfat tampon fazına aynı anda Infasurf® ve fibrinojen enjekte edilmiştir. Yüzey gerilimi değerinin uzun süre sabit kalmasının nedeni kloroform damlasının dengeye

gelmesinin beklenmesidir. 10 ppm fibrinojen ile yapılan yarışmalı adsorpsiyon deneyinde, iki madde tampon faza 120. saniyede aynı anda enjekte edilmiştir (Şekil 4.31a). Elde edilen grafik incelendiğinde, oluşturulan damlanın yüzey gerilimi yaklaşık 210. saniyeden itibaren düşmeye başlamıştır. Aradaki yaklaşık 100 saniyelik fark, moleküllerin yüzeye yerleşmesi ve optimum konformasyonlarını almaları için gerekli süre olarak yorumlanmıştır. Bu süreç, aslında 10 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen için elde edilen indüksiyon periyodu ile aynıdır. Ancak, zamanla değişen izotermin profiline bakıldığında yüzey geriliminin ulaştığı son nokta yeşil ile gösterilen saf Infasurf<sup>®</sup>’ün geldiği nokta ile aynıdır ve yaklaşık 300. saniyeden sonra izotermin profili, saf Infasurf<sup>®</sup> ün profili ile aynı eğime sahiptir. Bütün bunlara ek olarak, yüzey gerilimi için 31 mN/m ve 28 mN/m değerleri referans noktalar olarak seçilmiş ve yarışmalı sistemde, yüzey geriliminin düşmeye başlamasından sonra ara yüzeyin 31 mN/m’den 28 mN/m’ye düşmesi 17 saniye sürerken, saf Infasurf<sup>®</sup> için bu süre 18 saniye olarak bulunmuştur. Bütün bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, enjeksiyondan sonra görülen 100 saniyelik sabit yüzey gerilimi boyut olarak Infasurf<sup>®</sup>’ten çok daha küçük ve adsorpsiyon hızı daha yüksek olan fibrinojene ait olsa da, 100 saniyeden sonra elde edilen adsorpsiyon izoterminin Infasurf<sup>®</sup>’e ait olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlardan 10 ppm fibrinojene karşı, uzun süre bazında bakıldığında Infasurf<sup>®</sup>’ün baskın olduğu görülmektedir. Ancak elde edilen 100 saniyelik periyot, yarışmalı adsorpsiyonun kısa zamanlı incelenmesinde Infasurf<sup>®</sup>’ün çok da etkin olmadığını göstermektedir. Bu durumun, Infasurf<sup>®</sup>’ün çözeltide veziküller halinde bulunmasından ve veziküllerin açılmasının fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olmasından daha uzun süre almasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.31(b)’de ise fibrinojen konsantrasyonu arttırılmış ve 50 ppm’e çıkartılmıştır. 10 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen için kurulan aynı sistemde, iki madde tampon faza 120. saniyede enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan yaklaşık 90 saniye sonra yüzey geriliminde düşüş görülmeye başlanmıştır. 50 ppm fibrinojen için daha önce elde edilen indüksiyon periyodu yaklaşık 25 saniyedir. Yarışmalı adsorpsiyon sonucunda elde edilen izoterm incelendiğinde, yüzey geriliminin 31 mN/m’den 15 mN/m’ye yaklaşık 70 saniyede düştüğü gözlenmektedir. Saf Infasurf<sup>®</sup> için bu süre 133 saniye, 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen için ise 38 saniyedir. Elde edilen

adsorpsiyon profili eğim olarak fibrinojeninkine çok benzese de, ara yüzeyin geldiği denge yüzey gerilimi saf Infasurf® ve 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen ile aynı olduğu için hangi molekülün ara yüzeyde baskın olarak kaldığının net olarak belirlenmesi mümkün olamamıştır.

Bu sistemdeki son çalışmada fibrinojen konsantrasyonu 100 ppm'e çıkartılmış ve aynı deney tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 4.31(c)'de gösterilmiştir. Alt faza iki maddenin de aynı anda verilmesiyle birlikte yüzey gerilimi düşmeye başlamış ve çok hızlı bir şekilde 100 ppm fibrinojenin tek başına sahip olduğu denge yüzey gerilim değerine saf protein ile aynı profili çizerek ulaşmıştır. Bu deney koşulu için 100 ppm son konsantrasyondaki fibrinojenin Infasurf®'e karşı baskın olduğu net olarak belirlenmiştir.

Fibrinojenin Infasurf®'ün adsorpsiyon özelliklerine etkisi 2 farklı deney sistemi için incelenmiş ve 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojenin bulunduğu sistemde, her iki maddenin de ortak olarak baskın olduğu gözlemlenmiş, ancak 100 ppm son konsantrasyon değeri için fibrinojenin net olarak ara yüzeyde bulunduğu ve Infasurf®'ün adsorbe olmasını engellediği belirlenmiştir. Infasurf® ile elde edilen sonuçlar kıyaslandığında IPL'nin yarışmalı adsorpsiyon sistemde de gösterdiği pozitif etki dikkat çekicidir.

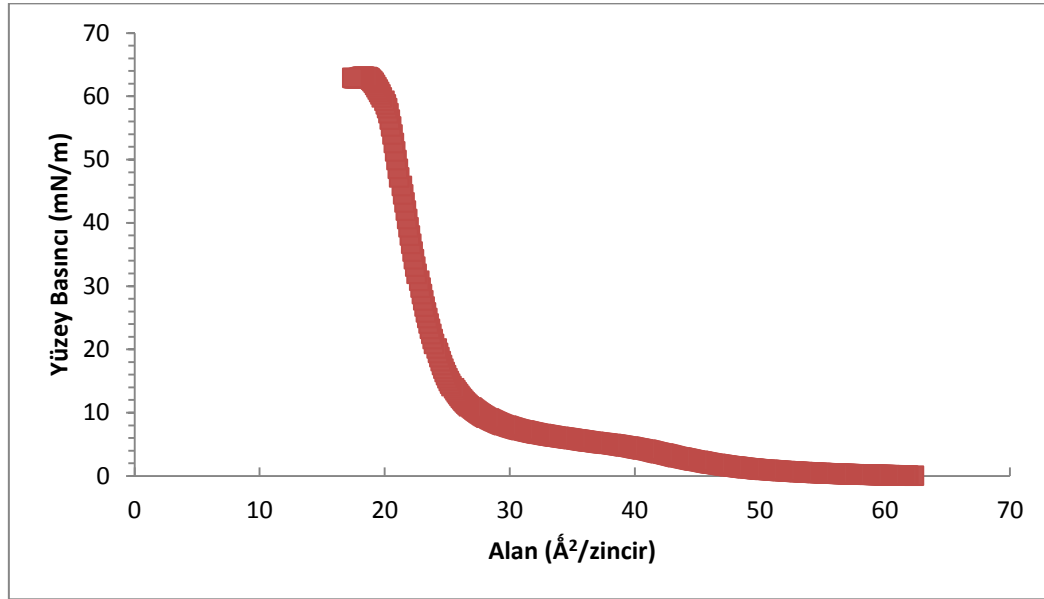
#### **4.3. Model Akciğer Yüzey Aktif Maddesinin Ara Yüzey Özelliklerinin İki Boyutlu Sistem ile İncelenmesi**

Askıda damla metodu ile dinamik adsorpsiyon özelliklerinin belirlendiği sistemler için oluşturulan ara yüzeylerin döngüsel davranışının belirlenmesi de önemlidir. Nefes alış veriş sırasında yüzey alanı sürekli olarak değişen alveollerde değişen yüzey alanına karşı yüzeydeki tabakanın davranışı da değişmekte, buna karşılık olarak da yüzey geriliminde de değişim görülmektedir. Bu sistemin simüle edilebilmesi için LB cihazında ara yüzey 2 boyutta modellenmiş ve yüzey sabit hızda sıkıştırılıp – genişletilerek ara yüzeyde bulunan tabakanın döngüsel davranışı incelenmiştir. Bu bölümde kullanılacak maddelerin her birinin kendi döngüsel davranışı belirlenmiş, ve elde edilen veriler, ikili sistemler kurulduğunda yorum yapılabilmesi amacıyla temel niteliğinde kullanılmıştır.

### 4.3.1. Akciğer Ara Yüzey Modellerinin Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

#### 4.3.1.1. DPPC, IPL, DPPC – IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

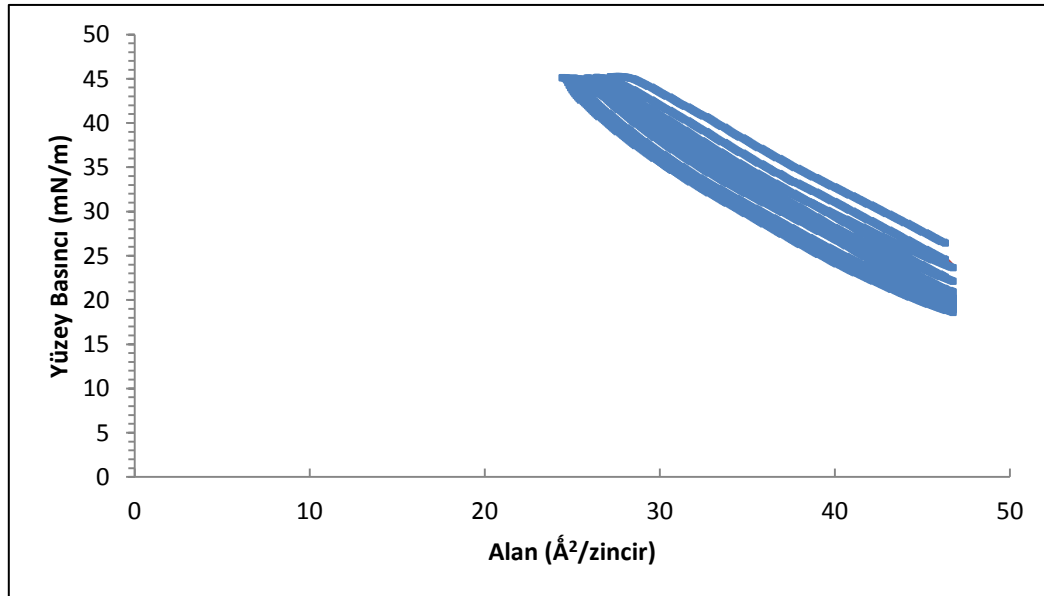
Çalışma kapsamında akciğer yüzey aktif madde karışımında miktarca en çok bulunan DPPC model lipid olarak kullanılmış ve IPL ile karışımlarının, fibrinojen varlığında gösterecekleri değişimlerin incelenebilmesi amacıyla öncelikle her maddenin spesifik ara yüzey özellikleri incelenmiştir. Çalışmalara öncelikle alınan verilerin geçerliliğinin kanıtlanabilmesi adına literatürde de örneği bulunan DPPC ile başlanmıştır.



Şekil 4.32 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde DPPC tekli tabakasının sıkıştırılması ile elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izoterminin grafiği

Şekil 4.32, fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş saf DPPC tekli tabakasının sabit hızla sıkıştırılması ile elde edilen basınç – alan izoterminin göstermektedir. Alt faz olarak fosfat tampon kullanılmasının nedeni vücut koşullarını taklit etmektedir. Ara yüzeyin sıkıştırılmasıyla birlikte farklı fazlara geçen DPPC molekülleri, başlangıç durumunda sıvı genleşmiş (LE) fazdadır. Azalan yüzey alanına karşılık belirli bir basınç değerine kadar sıkışan tekli tabaka, bir noktadan sonra daha yüzeyin sıkıştırılmaya devam etmesine rağmen, basıncı değiştirmemektedir. Bu basınç değeri, tekli tabakanın faz geçiş bölgesinin başladığı değerdir. İzoterme

bakıldığında, DPPC'nin literatürle uyumlu olarak, yaklaşık 5 mN/m'de faz geçiş platosu verdiği görülmektedir. Faz geçişi, ara yüzeyde bulunan moleküllerin sıvı genişmiş (LE) fazdan sıvı yoğunlaşmış (LC) faza geçtikleri basınç ve alan değerlerini ifade eder. Ara yüzeyde bulunan DPPC molekülleri birbirlerine daha çok yaklaşmakta, ve hidrofobik kuyruk gruplarının dikleşmesiyle ara yüzey daha sıkı ve düzenli hale gelmektedir. Bu bölgede ara yüzeydeki moleküllerin bir kısmı LE, bir kısmı LC fazındadır, diğer bir deyişle ara yüzey iki fazlıdır. Ancak sıkıştırılmayla birlikte LE durumundaki moleküllerin hepsinin LC durumuna geçmekte, faz geçişi sona ermekte, ve yüzey artık LC fazında bulunmaktadır (Wüstneck et al., 2005). Şekil 4.32'de faz geçişinin bittiği noktadan itibaren basıncın çok hızlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Akciğer yüzey aktif madde karışımında yüzey geriliminin düşürülmesinde en büyük rolü oynayan DPPC için bu durum normaldir. Bu artış yaklaşık 63 mN/m'ye kadar sürmekte ve bu noktadan sonra ara yüzeydeki lipid tabakası yıkılmakta, lipidler ara yüzeyden alt faza geçmektedir. Elde edilen izoterm literatürle karşılaştırılmış ve uygun olduğu tespit edilmiştir (Wüstneck et al., 2005). Çalışmanın devamında, IPL'nin ara yüzey davranışı aynı koşullarda belirlenmiştir. Fosfat tampon/hava ara yüzeyine yayılan IPL için elde edilen izoterm Şekil 4.33'te gösterilmiştir.

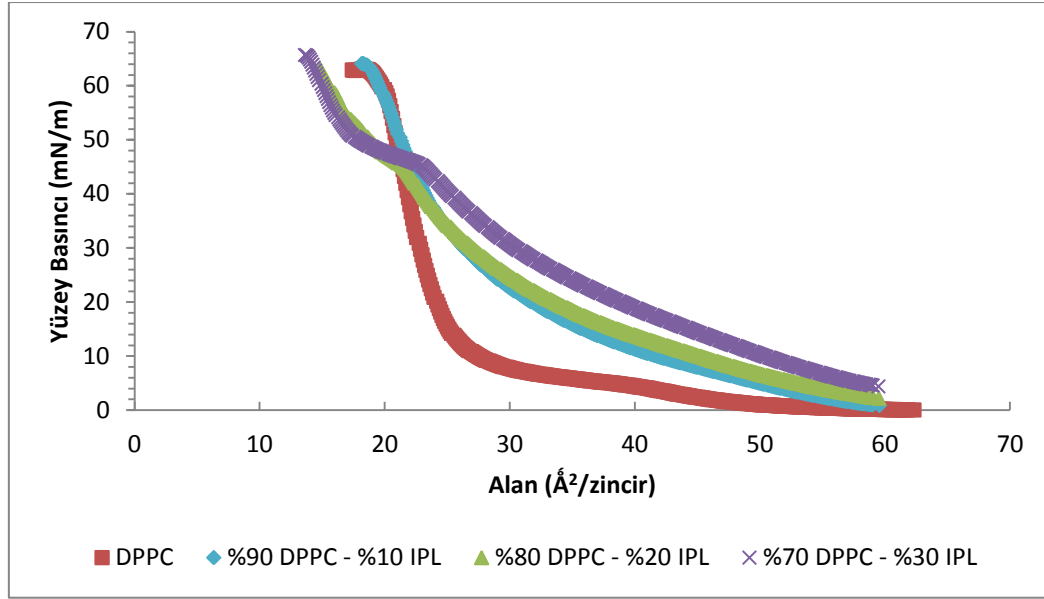


Şekil 4.33 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde IPL tekli tabakasının sıkıştırılması ile elde edilen basınç ( $\pi$ ) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi



IPL için elde edilen sıkıştırma izotermine bakıldığında, molekülün faz geçişine sahip olmadığı belirlenmiştir. Ara yüzeyde azalan yüzey alanına karşılık sıkıştığı her basınç değerinde madde sıvı genişlemiş (LE) fazda bulunmaktadır. Bu durum, maddenin her basınçta ara yüzeyde kararlı bir tabaka oluşturduğunu göstermektedir. Literatürde, tekli tabakaların kararlılığının hidrofobik kuyruk gruplarının birbirine yakın durmasından da kaynaklandığı belirtilmiştir (Wang et al., 2006). Bu bilgi ile maddenin hep sıvı genişlemiş fazda bulunma nedeni açıklanabilmektedir. IPL'nin fosfat tampon/hava ara yüzeyinde, yüzey basıncını çok yükseltmediği yani, yüzey gerilimini çok düşüremediği görülmektedir. Ara yüzeyde ulaşılabilen maksimum basınç yaklaşık 45 mN/m'dir. Ayrıca dögüsel davranışı incelendiğinde, maddenin her dögüde çıkabildiği maksimum basıncın değişmediği ve ara yüzeyden neredeyse hiç madde kaybolmadığı daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Uslu, 2009). Askıda damla yöntemi ile elde edilen verilerden de görüldüğü gibi, IPL ara yüzeyde tek başınayken çok iyi özellikler taşımamaktadır: Madde, sahip olduğu hidrofilik özellikteki PEO grubu ve hidrofilik baş grupları ile yüzey gerilimini çok fazla düşürememektedir. Ancak, IPL'nin tasarım ve sentezlenme amacı, yüksek yüzey aktivitesi göstermesi değil, ara yüzeyde birlikte bulunduğu lipidlerle pozitif yönde etkileşerek yüzey özelliklerini iyileştirmesi ve ayrıca kan proteinlerinin ortamda bulunduğu durumlarda onların ara yüzeye adsorpsiyonunu azaltması ya da engellemesidir.

IPL'nin ara yüzeyde DPPC ile karışarak tekli tabaka oluşturduğu bilinmektedir. Ancak, surfaktant inaktivasyonu durumunda, yani ara yüzeyde kararlı bir tekli tabaka varken ortama fibrinojen eklenmesi ile ara yüzeyin dögüsel davranışının incelenbilmesi ve askıda damla metodu ile incelenen sistemlerin iki boyutta ve değişen yüzey alanına karşılık değişen ara yüzey özelliklerinin incelenmesi çalışma için kritiktir. Molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımlarının sıkıştırma izotermi Şekil 4.34'te sunulmuştur.



Şekil 4.34 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL, %70 DPPC - %30 IPL oranlarındaki DPPC – IPL karışımları tekli tabakasının sıkıştırılması ile elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi

Şekil 4.34'e göre, DPPC ve IPL karışımları için elde edilen izotermeler, beklenildiği gibi DPPC izotermine benzemektedir. DPPC ile düşük mol oranında IPL'nin karışması ile birlikte, saf DPPC'nin sahip olduğu karakteristik faz geçiş davranışı değişmiştir. 5 mN/m'de görülen faz geçişi, IPL'nin karışımdaki mol oranı arttıkça, azalmaktadır. IPL faz geçişi olmayan bir moleküldür ve DPPC ile karışımlarında faz geçişinin azalması, iki maddenin ara yüzeyde karışabildiklerini ve ara yüzeyin genişlemiş fazda bulunduğunu göstermektedir (Lehmler and Bummer, 2005). Karışımlar için elde edilen alan değerlerinin, yaklaşık 45 mN/m'ye kadar aynı basınç için DPPC'ye göre sağa kayması ara yüzeyin özelliklerinin iyileştirildiğini, aynı yüzey basıncına gelebilmek için gereken sıkıştırmanın daha az olduğunu göstermektedir. Karışım izotermeleri, yaklaşık 45 mN/m basınçtan sonra ise, sıkıştırmanın neden olduğu etkiyle ara yüzeyden bir miktar madde kaybı olduğunu göstermektedir. Ancak, yine de çıkılan maksimum basınç sabit kalmıştır. Normal koşullarda saf IPL yüzey basıncını çok fazla yükseltmezken, DPPC ile karışımlarında çıkılabilen maksimum basınç değeri saf DPPC kadar yüksek değerlere ulaşmış ve artan IPL mol oranına rağmen değişmemiştir. Bu durum, iki madde arasındaki sinerjik etkileşimin bir diğer kanıtıdır. Taneva ve Keough'un SP-B ve DPPC'nin değişik oranlarda karıştırılması ile elde

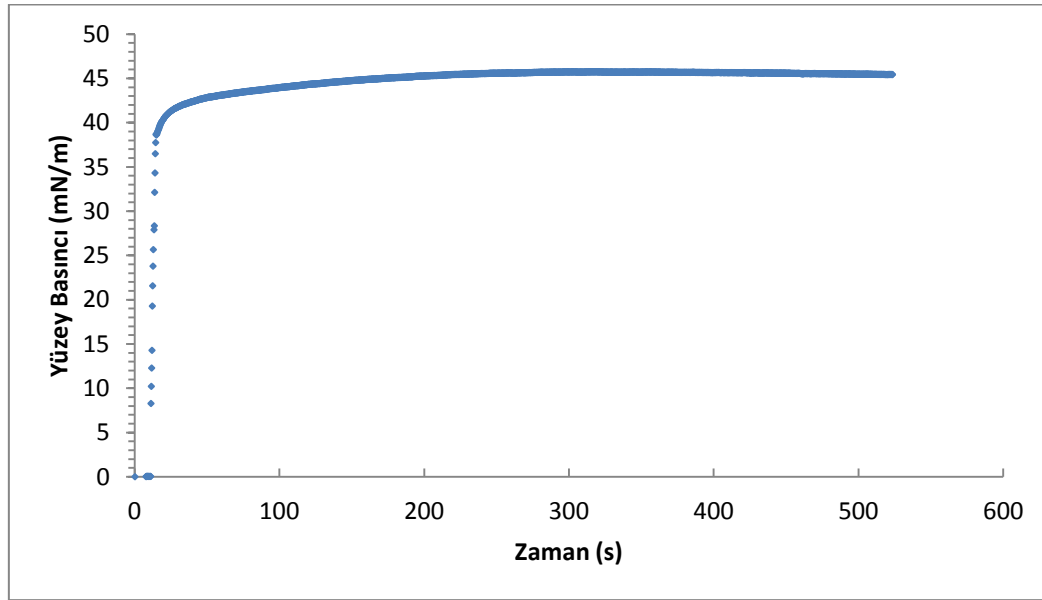
edilen izotermlerde de aynı sonuca ulaşılmıştır. SP-B oranının artmasıyla saf DPPC'nin faz geçişi azalmıştır. Ayrıca saf SP-B tabakasının çıkabildiği maksimum basınç sadece 30 mN/m iken, DPPC ile karıştığında belirli bir orana kadar ( $X_{SP-B}=0.57$ ) ulaşılan maksimum basınç, tıpkı IPL ile karıştığında olduğu gibi, DPPC tekli tabakasının ulaştığı maksimum basınca eşittir (Taneva and Keough, 1994). Daha önceki sonuçlarla birlikte IPL'nin sentetik bir molekül olarak gerçek sistemde bulunan SP-B proteinini taklit edebildiği ve elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği bir kere daha kanıtlanmıştır (Uslu, 2009). Literatürde, sinerjik etkileşimde bulunan bu karışımın özelliklerini gösteren başka bir sistem yoktur. Örneğin, yapılan bir çalışmada, Infasurf®'e özelliklerinin geliştirilmesi için hekzadekanol (HD) eklenmiştir. HD'nin Infasurf®'te bulunan DPPC ile etkileştiği belirtilmiş ve eklenen HD'nin karışımdaki miktarı arttırıldıkça, saf Infasurf® için 68 mN/m olarak bulunan yıkılım basıncının %23 oranında karıştırılan HD ile 56 mN/m'ye düştüğü bulunmuştur. Saf HD'nin sahip olduğu yıkılım basıncı ise 55 mN/m'dir (Alonso et al., 2005). DPPC/hekzadekanol ve DPPC/palmitik asit karışımları için de faz geçiş davranışının değişmesine rağmen elde edilen izotermden aynı basınca gelebilmek için yüzeyin daha fazla sıkıştırılması gerektiği görülmekte ve saf DPPC ile ulaşılan maksimum basınca diğer sistemler için ulaşamadığı belirlenmiştir (Lee et al., 2002). Aynı şekilde Survanta®'ya eklenen palmitik asit aynı sonucu vermiş, karışımın özellikleri DPPC-IPL arasındaki sinerjik etkileşim gibi performans artırıcı olmamıştır (Bernhard, Mottaghian, Gebert, et al., 2000).

Bu tez çalışmasında hedeflerden biri, fibrinojen proteininin inaktive edici etkisinin minimize edileceği bir sistem yaratmaktır. Bu amaçla ileriki bölümlerde ortama fibrinojen verildiğinde DPPC-IPL karışımları için elde edilen sonuçların ne yönde değişeceği incelenecek ve Infasurf® için elde edilen sonuçlarla karşılaştırma yapılacaktır.

#### 4.3.1.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Ara Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Doğal bir akciğer yüzey aktif maddesi olan Infasurf® RDS tedavisinde başarılı olarak kullanılsa da ortamda yüksek miktarda kan proteini bulunduğunda, inaktive olmaktadır. Çalışma kapsamında doğal akciğer modeli olarak kullanılacak Infasurf®'ün hava – sıvı ara yüzeyindeki özelliklerinin bilinmesi, daha sonra kan proteinlerinin varlığında yapılacak yorumlar için kritiktir.

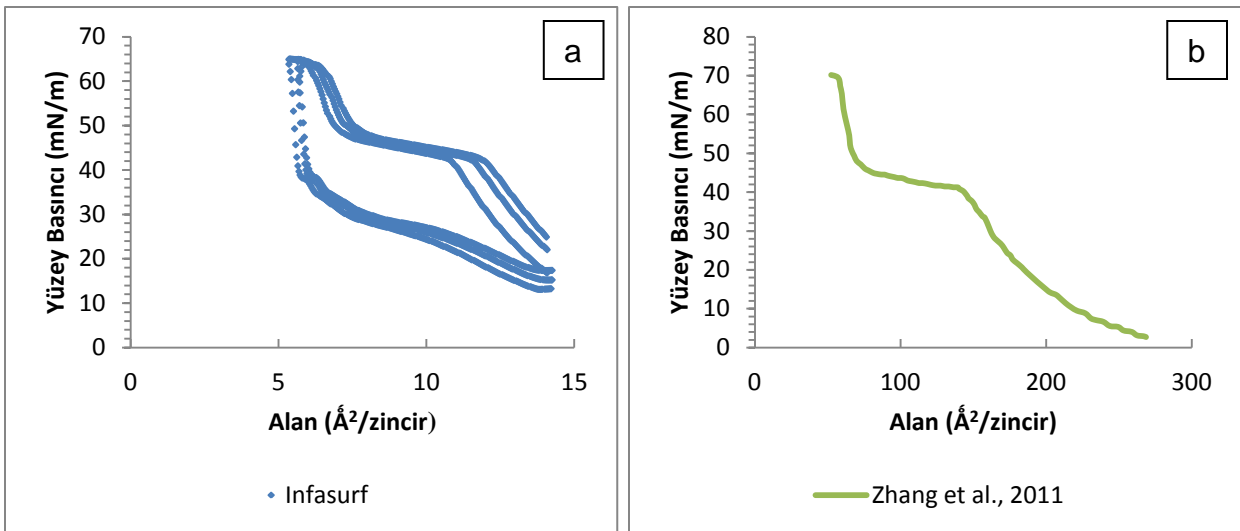
Maddenin yüzeye yayıldığı andan itibaren adsorpsiyon kinetiğinin ölçülebilmesi için zamanla yüzey basıncının değişimi incelenmiş ve karakterize edilmiştir. Literatürde Infasurf®'ün hava – sıvı ara yüzeyine adsorpsiyon özelliklerinin geliştirilmesi için yapılan bir çalışmada, Infasurf®'ün yüzeye yayıldıktan yaklaşık 50 saniye içinde 40 mN/m civarında dengeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu veri ile uyumlu olarak, saf Infasurf® için elde edilen basınç – zaman izotermi Şekil 4.35'teki gibidir (Taeusch, et al., 2005; Taeusch et al., 2008).



Şekil 4.35 Saf Infasurf® için elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

Görüldüğü gibi Infasurf®, fosfat tampon – hava ara yüzeyine yayıldığı andan itibaren çok hızlı bir şekilde ara yüzeye çıkmakta ve çok kısa sürede sistemi dengeye ulaştırmaktadır. Etkili bir yüzey aktif madde, yüzey gerilimini düşürmesinin yanında

bulunduğu ara yüzeye hızlı bir şekilde adsorbe olabilmelidir. Özellikle, akciğer sistemi gibi hayati önem taşıyan bir sistemde bulunan yüzey aktif madde karışımı için bu özellik kritiktir. Ortamda kan proteinleri gibi inhibitörler bulunduğunda, akciğer yüzey aktif maddesinin ara yüzeye adsorpsiyonu engellenmektedir. Dolayısıyla, bu karışımın adsorpsiyon özelliklerinin iyileştirilmesi gerekmektedir (Taeusch et al., 2008). Normal şartlarda ortamda başka bir madde bulunmazken Infasurf® ara yüzeye adsorpsiyon hızı yeterli gibi görünse de ortama eklenecek maddelerin özelliğine göre adsorpsiyon özellikleri ve döngüsel davranışı değişmektedir. Infasurf®'ün ara yüzey basıncında daha fazla değişiklik yapmadığı durumda yani, ara yüzey dengeye geldikten sonra yüzeyin sabit hızla sıkıştırılıp – genişletilmesiyle döngüsel davranışı elde edilmiştir.



Şekil 4.36 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde (a) saf Infasurf® için elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi, (b) elde edilen sıkıştırma izoterminin literatürle karşılaştırması (Zhang et al., 2011)

Şekil 4.36(a)'da Infasurf® için elde edilen basınç – alan grafiği görülmektedir. Maksimum basınç DPPC gibi 65 mN/m'ye ulaşmaktadır. Basınç yaklaşık 45 mN/m'ye ulaşana kadar hızlı bir şekilde çıkmakta, ara yüzeydeki tabaka kolayca sıkışabilmektedir. 40 - 45 mN/m'de literatürle uygun olarak basınçtaki artış hızı yavaşlamakta ve ara yüzeydeki tabaka faz değiştirmektedir. Faz geçiş bölgesi

yaklaşık 50 mN/m basınca kadar devam etmekte ve daha sonra fazı değişen tabakanın basıncı tekrar hızlı bir şekilde yükselebilmektedir. Infasurf® için elde edilen izoterm literatürdeki örnek ile uygundur (Zhang et al., 2011). Ancak literatürde aynı izotermi elde etmek için kullanılan LB cihazının yüzey alanı, tez kapsamında kullanılan cihazın 2 katından biraz daha fazladır. Dolayısıyla, elde edilen izoterm alan değerlerinde sapmalar meydana gelmiştir. Örneğin, yüzey alanı yeterince büyük olmadığı için sisteme verilen madde ara yüzeye yeterince yayılamamış, dolayısıyla izoterm başlangıçtaki yüzey basıncı yeterince düşük bir değerden başlayamamıştır. Aynı şekilde faz geçiş platosunun uzunluklarında da 2 katlık bir fark vardır. Ancak, Şekil 4.36b'den de görüleceği gibi, faz geçiş bölgesinin başlangıç ve bitiş basınçları dahil olmak üzere izoterm profilleri ve daha sonra basınç artışıdaki hız literatürle birebir uyumludur.

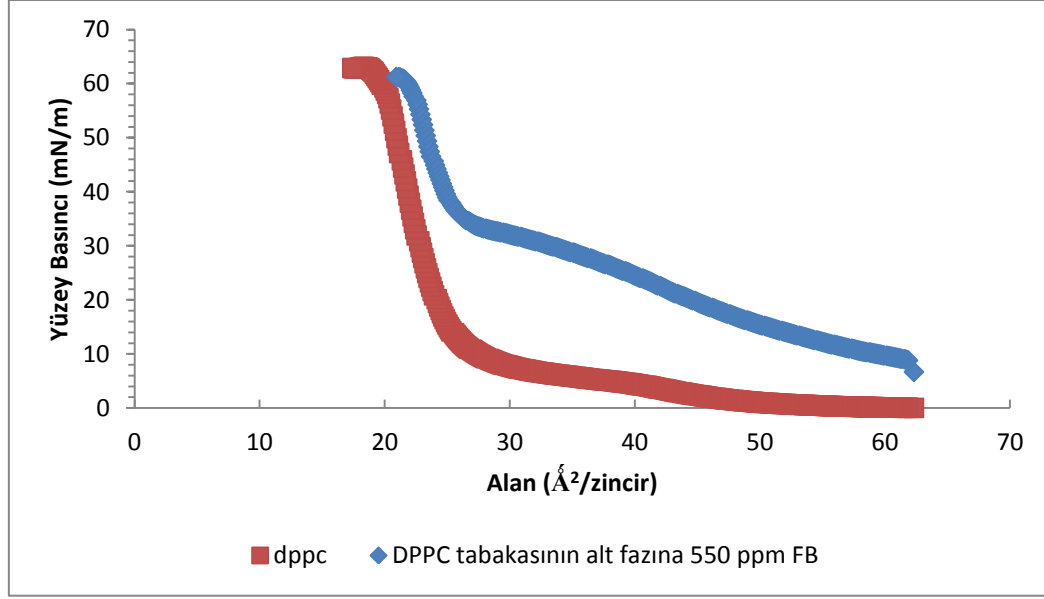
#### **4.3.2. Oluşturulan Ara Yüzey Modellerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Kullanılacak her bir bileşenin sahip olduğu spesifik izoterm elde edildikten sonra bu bölümde ortama alveoller için en çok problem yaratan kan proteini fibrinojen eklendiğinde gösterdikleri davranış incelenmiştir. Her bir sistem için öncelikle ara yüzeyde bir yüzey aktif madde tabakası oluşturulmuş ve oluşturulan bu tabakanın alt fazına fibrinojen enjekte edilerek belirli bir süre beklenmiş ve elde edilen yüzey basıncı – zaman izoterminden yüzeydeki değişim incelenmiştir. Daha sonra bozulan ara yüzey için döngüsel davranış incelenmiş ve böylece hangi sistemin en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir.

##### **4.3.2.1. DPPC'nin, IPL'nin ve DPPC/IPL Karışımlarının Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu azaltabilmek birçok uygulama için önemli bir durumdur. Bu uygulamalara özellikle akciğer yüzey aktif madde karışımının inaktivasyonu ve biyomalzeme uygulamaları da dahildir (Phang et al., 2005). Çalışmanın bu bölümünde, ilk olarak DPPC ve IPL'nin tekli tabakalarına fibrinojen adsorpsiyonu sonucunda izotermdeki farklılaşmalar araştırılmıştır.

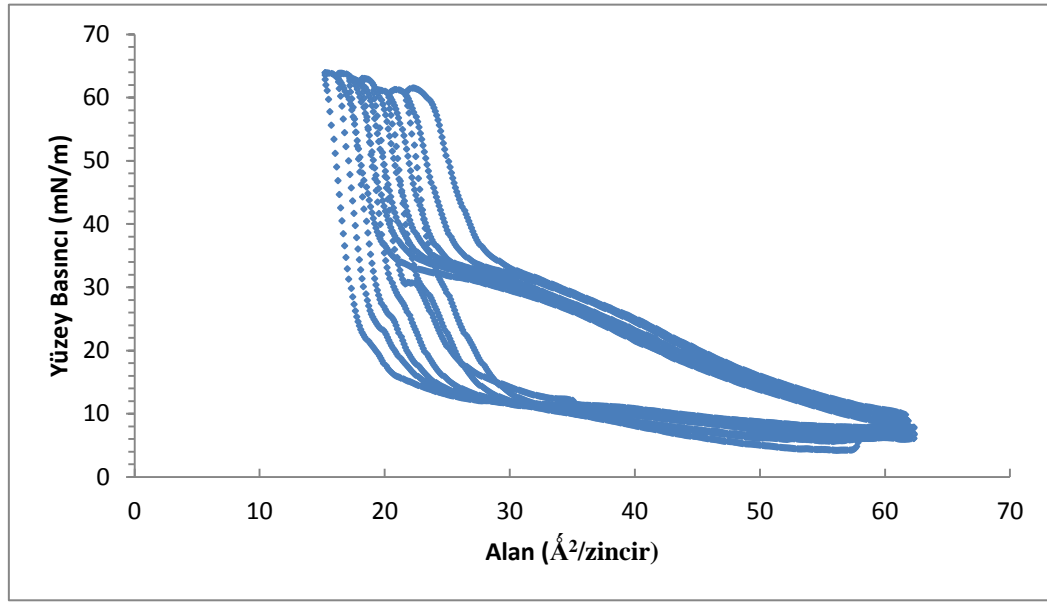
Organik çözücü ile çözdürülüp ara yüzeye yayılan DPPC tabakasının alt fazına fibrinojen enjekte edilip, yüzey basıncının dengeye gelmesinden sonra ara yüzeyin sabit hızla sıkıştırılması ile elde edilen sıkıştırma izotermi Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Aynı grafikte saf DPPC’nin de izotermi çizilmiş ve böylece sistemdeki farklılaşma daha iyi anlaşılmıştır.



Şekil 4.37 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş DPPC tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi

DPPC tekli tabakasının altına enjekte edilen fibrinojen, Şekil 4.39’a göre zamanla ara yüzeye adsorbe olmuş ve DPPC’nin izotermi ciddi şekilde değiştirmiştir. İzotermi sağa kayması ara yüzeye madde adsorpsiyonu olduğunun bir kanıtıdır. Aynı alan değeri için yüzey basıncının saf DPPC’ye göre daha yüksek bir değerde olması ara yüzeyde DPPC dışında başka bir maddenin de bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca DPPC’ye özgü olan faz geçiş platosu fibrinojenin ara yüzeye girmesiyle bozulmuştur. Bu durum da ara yüzeydeki moleküler dizilimin değiştiğini göstermektedir. Ara yüzeyin sıkıştırılmaya devam edilmesiyle basınç 30 mN/m’ye ulaşana kadar ara yüzeydeki madde miktarı ve izoterm profili saf DPPC ile elde edilen izoterminden çok farklıdır. Ancak, ulaşılabilen maksimum basıncın saf DPPC’ye yakın olması ortama enjekte edilen fibrinojenin tamamının ara yüzeyde olmadığını, ya da sıkıştırılmayla

birlikte yüzeyden ayrıldığıının göstergesidir. Çünkü saf fibrinojen izotermine ara yüzey bu kadar sıkışmamakta, tekli tabaka çökmektedir (Kuo et al., 2003). Dolayısıyla, ortamda bulunan DPPC fibrinojen tarafından kısmi olarak inaktive edilmektedir. Fibrinojen sıkıştırma ile birlikte yüzeyden ayrılırken beraberinde ara yüzeyde bulunan DPPC'nin de bir kısmını alt faza taşımaktadır. Bu durum, ardı ardına alınan sıkıştırma – genişletme izotermi ile desteklenmektedir (Şekil 4.38). Anyonik yapıdaki proteinlerin lipidleri alt faza çektiği ve ara yüzeyden lipid kaybına yol açtığı literatürde de bildirilmektedir (Kuo et al., 2003; Zasadzinski et al., 2005).

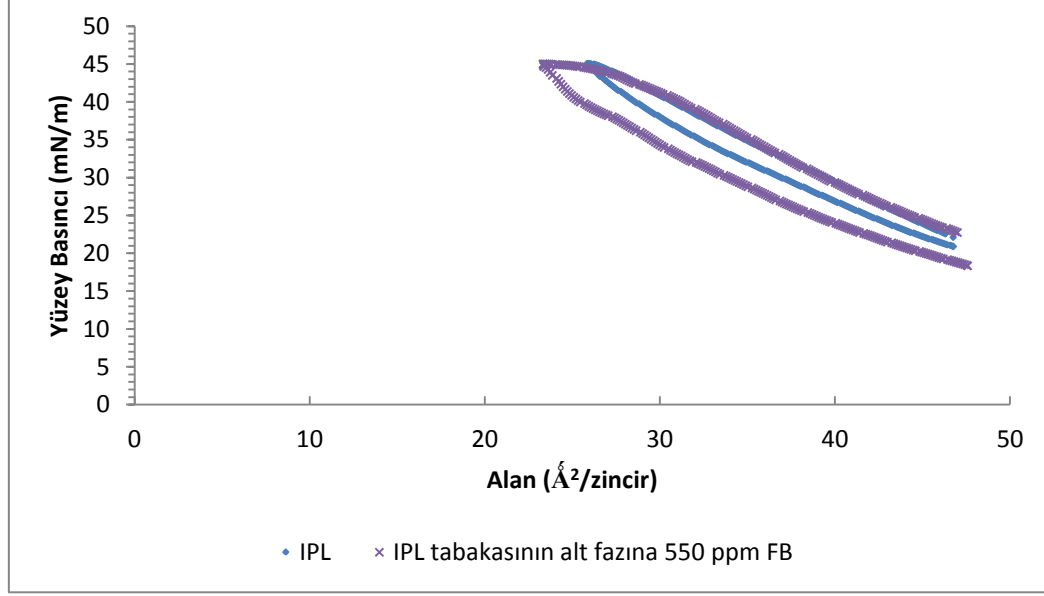


Şekil 4.38 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş DPPC tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen döngüsel davranış

Her sıkıştırma – genişletme çevrimi ile birlikte ara yüzeyden madde kaybolduğu, izotermi her seferinde biraz daha küçük alana kaymasından anlaşılmaktadır. Döngüler arasında alan değerleri arasındaki fark, ara yüzeyde bulunan DPPC tabakasının aynı basınca ulaşması için daha fazla sıkıştırılması gerektiğini göstermektedir. Alan değerlerindeki küçülmenin sebebi bu durumdur (Kuo et al., 2003). Fibrinojenin DPPC üzerindeki negatif etkisinin incelenmesinden sonra, aynı deney sistemi IPL ile de kurulmuştur.



Şekil 4.39’da saf IPL tabakasının alt fazına bir önceki sistem ile aynı miktar fibrinojen enjekte edilmiş ve yüzey basıncının dengeye gelmesinden sonra ara yüzeyin dögüsel davranışı gösterilmiştir.

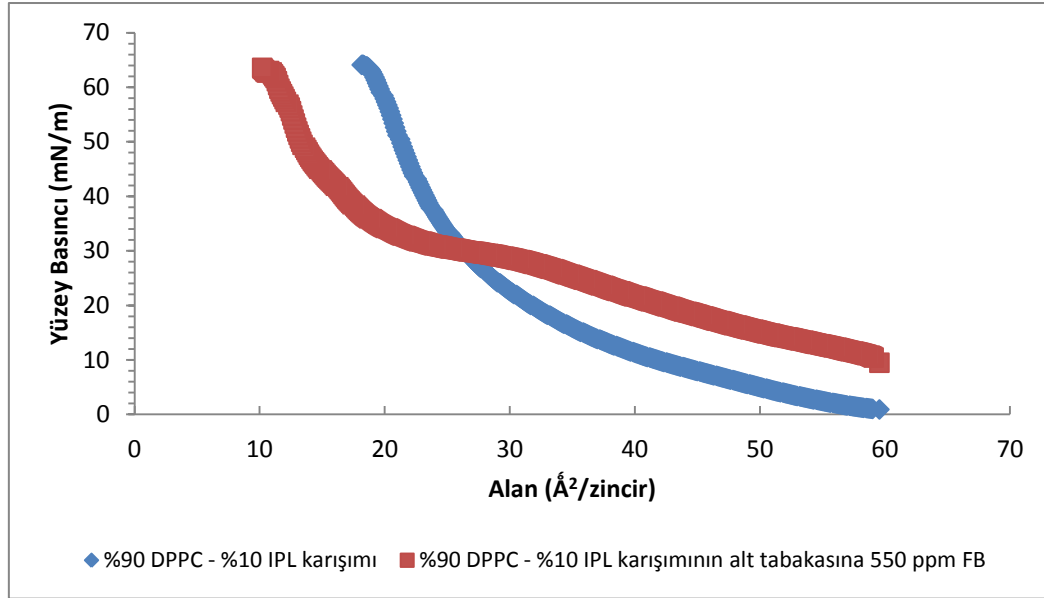


Şekil 4.39 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan izotermi

Ortamda fibrinojen bulunduğu durumdaki izoterm ile saf IPL’nin izotermi karşılaştırıldığında, yüzey sıkışmaya başlamadan önce iki sistemin de sahip oldukları başlangıç basıncının neredeyse aynı olduğu görülmektedir. Bu durum, yüzeyde daha önceden oluşturulmuş IPL tabakası bulunurken, alt faza fibrinojen enjekte edilse bile ara yüzeyde aynı miktar madde bulunduğunu göstermektedir. Başka bir deyişle, basıncın sabit kalması ara yüzeye fibrinojen moleküllerinin giremediğini göstermektedir. Ara yüzey sabit hızla sıkıştırıldığında ise iki sıkıştırma izotermi de aynı sonucu vermiştir. İki izoterm bu derece benzer olması, ara yüzeyde büyük oranda IPL’nin bulunduğunu, fibrinojen moleküllerinin ise, alt fazdan ara yüzeye çok fazla adsorbe olamadığını göstermektedir. Eğer ara yüzeyde fibrinojen bulunsaydı, elde edilen izoterm, DPPC ve fibrinojenin beraber buldukları duruma benzer olarak, saf IPL izotermine oranla sağa veya sola kayması gerekmekeydi (Şekil 4.38). Genişletme izoterminde ise, saf IPL’ye göre hafif bir sağa kayma gözlenmektedir. Bu durum, ara yüzeye çok az miktarda adsorbe olan fibrinojenden kaynaklanabileceği

gibi, IPL'nin yüksek sıkıştırılabilirlik özelliğine bağlı olarak ara yüzeyin fazla sıkıştırılmasından ve dolayısıyla genişletilmeye başlanan alan değerinin saf IPL'ye göre daha küçük olmasından da kaynaklanabilmektedir. Çünkü, genişletme izotermi karşılaştırıldığında profil olarak iki izotermin de birbiri ile aynı eğilimi gösterdiği görülmektedir. Bu durum, sağa kaymanın fibrinojenden kaynaklı olarak değil, ölçümden kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

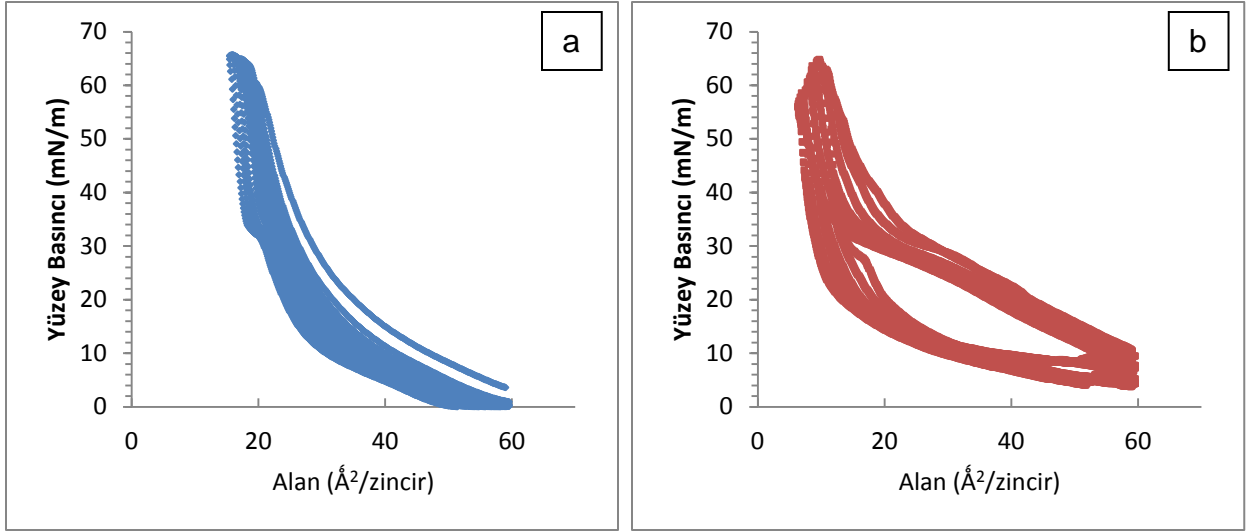
Alveol hava/sıvı ara yüzeyinde, büyük bir kısmı DPPC olmak üzere lipid karışımı bulunmaktadır. Dolayısıyla hava/sıvı ara yüzeyinde IPL ile DPPC'nin beraber buldukları durumlar incelenmiş ve önceden oluşturulmuş tekli tabakanın ara yüzey davranışı üzerine fibrinojenin etkisi araştırılmıştır.



Şekil 4.40 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş molce %90 DPPC - %10 IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi

Molce %90 DPPC ve %10 IPL içeren tekli tabaka, fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş ve yüzey basıncı dengeye geldikten sonra, alt faza fibrinojen enjekte edilmiştir. Fibrinojenin ara yüzeye adsorbe olabilmesi için gerekli süre (~30 dakika) beklendikten sonra, ara yüzey sabit hızla sıkıştırılarak basınç – alan izotermi elde edilmiştir. Şekil 4.40'ta ortamda fibrinojen bulunan ve bulunmayan durumlar için elde edilen sıkıştırma izotermi karşılaştırılmıştır. Sadece molce %90 DPPC - %10 IPL

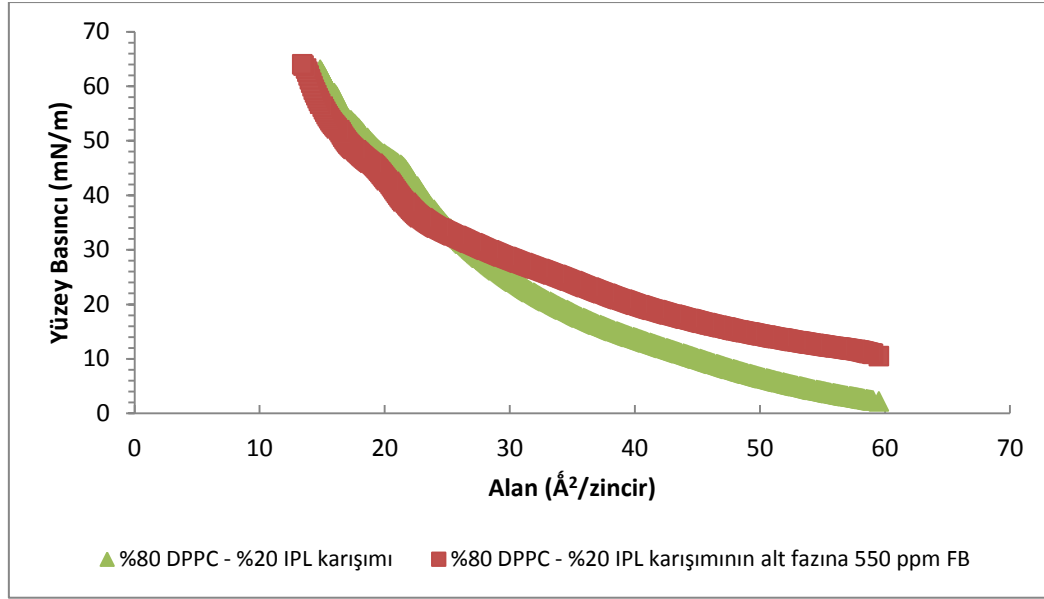
karışım oranında alınan izotermde ara yüzey sıkıştırılmaya başlamadan önceki basınç beklendiği gibi sıfıra yakındır. Bu karışım için ara yüzeydeki DPPC miktarının molce %90 oranında olduğu düşünüldüğünde başlangıç basıncının saf DPPC izotermde olduğu gibi sıfıra yakın çıkması, beklenen bir sonuçtur. Ortama fibrinojen eklendikten sonra ise başlangıç basıncı 10 mN/m'ye yükselmiştir. Yüzey basıncındaki artış, dengeye ulaşmış bir ara yüzeyin kalabalıklaştığını, yani yeni moleküllerin ara yüzeye yerleştiğini göstermektedir (Phang et al., 2005). Kurulan bu sistem için basınçtaki artışın, ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen moleküllerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Alt faza fibrinojen enjekte edilmesinden sonra elde edilen sıkıştırma izotermine, ara yüzeyde sadece karışım bulunduğu elde edilen izoterm göre belirli bir basınca kadar daha sağa kayması da, ara yüzeyde daha fazla madde bulunduğunu göstermektedir. Başka bir deyişle, aynı alan değeri için elde edilen basınç daha yüksektir, basıncın daha yüksek olması da ara yüzeydeki madde miktarının arttığını belirtmektedir. Ara yüzey sıkıştırılmaya devam edildiğinde ise, basınç 30 mN/m'ye ulaştıktan sonra, izoterm saf karışım izotermine göre sola kaymıştır. İzotermde görülen bu farklılaşma şu şekilde yorumlanabilir: saf karışım izotermi ile aynı basınç değerine ulaşmak için bu sistemin daha fazla sıkıştırılması gerekmiştir. Bu durum da ara yüzeyde normalde bulunması gerekenden daha az madde bulunduğunu göstermektedir. Alt faza enjekte edilen fibrinojen, ara yüzeye adsorbe olmuş ve ara yüzeydeki lipid tabakası ile etkileşime girmiştir. Saf fibrinojenin döngüsel davranışından fibrinojenin ara yüzeyi çok yüksek basınca çıkartamadığı bilinmektedir. Ara yüzey sıkıştırıldıkça kendisi yüzeyden kopmuş ve etkileşime girdiği lipidlerin de bir kısmını yüzeyden koparmıştır. Dolayısıyla, ara yüzeyde lipid kaybı oldukça ara yüzeyde kalan lipidler, basıncı ancak daha fazla sıkıştırıldıklarında arttırabilmişlerdir. Yani, maksimum basınca ulaşmak için yüzey daha fazla sıkıştırılmak zorunda kalmış ve alan değeri küçülmüştür. Şekil 4.41(a)'da ara yüzeyde sadece molce %90 DPPC – %10 IPL'den oluşan karışım bulurken ara yüzeyin arka arkaya sıkıştırılıp genişletilmesiyle elde edilen basınç – alan izotermi görülürken, Şekil 4.41(b)'de ara yüzeyde molce %90 – %10'luk karışımdan oluşan tekli tabakanın alt fazına fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen izoterm sunulmuştur.



Şekil 4.41 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı için elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermleri, (b) molce %90 DPPC - %10 IPL karışımının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermleri

İki izoterm arasındaki fark oldukça net olarak görülmektedir. Şekil 4.40'ta verilen sıkıştırma izotermine karşılık elde edilen tüm döngüler burada sunulmuştur. Ara yüzeye fibrinojen adsorbe olduktan sonra, karışımın döngüsel davranışı değişmiş, sıkıştırma – genişletme eğrileri arasındaki fark – histeresiz – artmıştır. Bu, normal solunum fonksiyonunda istenmeyen bir sonuçtur (Banerjee and Bellare, 2001). Ayrıca, fibrinojenin adsorbe olduğu sistemde alan değerlerinde de kayma görülmüş, her çevrim için ulaşılan maksimum basınç bir önceki çevrime göre daha küçülmüş ve yine her çevrimin maksimum basınca ulaştığı alan, bir önceki çevrime göre daha sola kaymıştır. Molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı DPPC miktarının fazla olması nedeniyle, fibrinojenin ara yüzeyde neden olduğu negatif etki karşısında çok başarılı sonuçlar verememiştir.

Karışımındaki IPL miktarı artırılarak ölçüm tekrarlanmış ve elde edilen sonuç Şekil 4.42'de verilmiştir.

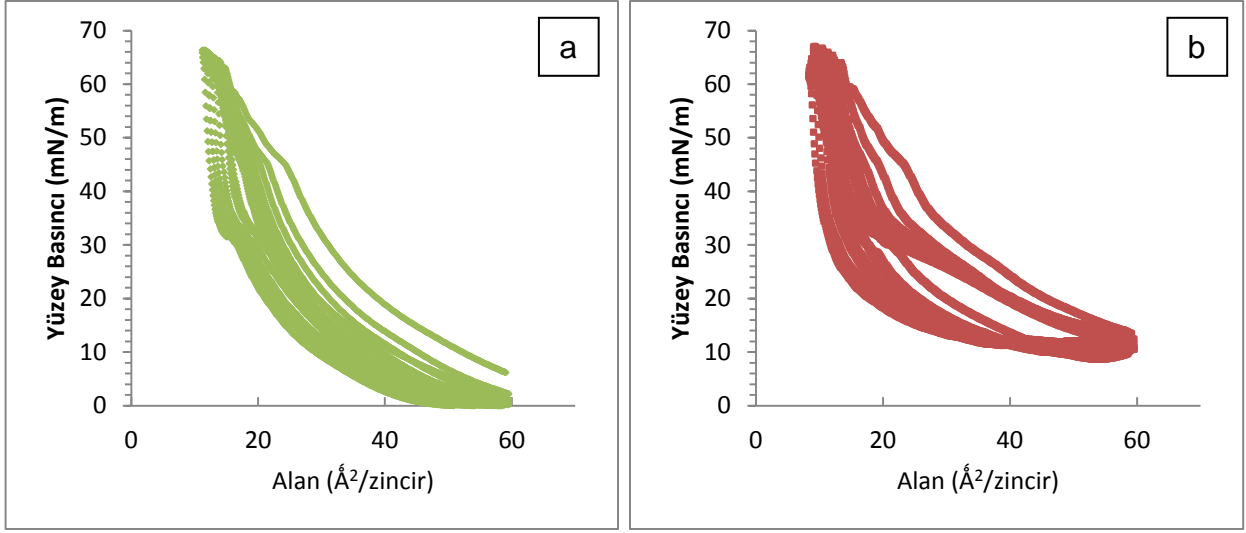


Şekil 4.42 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş molce %80 DPPC - %20 IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi

Molce %80 DPPC - %20 IPL içeren karışım hava/fosfat tampon ara yüzeyine yayıldıktan sonra alt faza fibrinojen enjekte edilmiş ve belirli bir süre beklendikten sonra sıkıştırma – genişletme izotermi alınmıştır. Şekil 4.42’de gösterilen sonuç saf karışım ve saf karışımın oluşturduğu tabakanın altına fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen sıkıştırma izotermidir. Ara yüzeyde sadece molce %80 DPPC - %20 IPL’den oluşan karışım bulunurken yüzey sıkıştırılmaya başlamadan önce sistemin basıncı sıfıra çok yakındır. Bu durum alt faza fibrinojen enjekte edilmesiyle birlikte değişmiş, başlangıç basıncında artış görülmüştür. Daha önce belirtildiği gibi ara yüzey sıkışmamasına rağmen basıncın artması, ara yüzeye madde adsorpsiyonu olduğunun bir göstergesidir, dolayısıyla bu sistem için görülen artışın nedeni fibrinojenin ara yüzeye bir miktar girmiş olmasıdır. Ancak, DPPC – fibrinojen ile molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı – fibrinojen sistemlerinden farklı olarak; alt faza fibrinojen enjekte edildikten sonra ara yüzeyin sıkıştırılmasıyla önce saf karışıma göre sağa kaymış olan izoterm, belirli bir basınçtan sonra neredeyse ara yüzeyde sadece molce %80-%20’lik karışım varmış gibi davranmıştır. Diğer sistemlerdeki küçük alana doğru kayış bu sistem için çok azalmıştır. Elde edilen izotermi göre, sıkıştırılmaya başlanıldığı durumdan 30 mN/m’ye kadar ara yüzeyde saf karışım dışında adsorbe

olan fibrinojen molekülleri de bulunmaktadır. Ancak yüzey sıkıştırılmaya devam ettirilip 30 mN/m basınca ulaşıldıktan sonra izoterm, molce %80-%20'lik karışımın izotermi ile neredeyse aynı alan değerinde aynı maksimum basınca ulaşmıştır. Dolayısıyla, başlangıçta ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen moleküllerinin 30 mN/m'lik yüzey basıncından sonra etkilerini yitirdikleri ve yüzeyden ayrıldıkları sonucuna varılmıştır. Sadece DPPC içeren sistem ile molce %90 DPPC - %10 IPL içeren sistemlerde fibrinojen yüzeyden ayrılırken beraberinde lipidleri de götürmüşken, molce %80 DPPC - %20 IPL karışımı için bu durum gerçekleşmemiştir. Ara yüzey davranışındaki bu iyileşmenin karışımdaki IPL'nin mol oranındaki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. IPL'nin yapısındaki özel olarak seçilmiş gruplar, ara yüzeyde DPPC ile sinerjik etkileşime girmekte ve bu etkileşim sonucu IPL sahip olduğu yüzey özelliklerini ara yüzeye yansıtmazken, DPPC de fibrinojen varlığında gösterdiği davranışı göstermemektedir. Askıda damla metodu ile dinamik adsorpsiyon özelliklerinin incelendiği bölümde elde edilen sonuçlar özellikle bu karışım oranında iki maddenin birbirleriyle etkileşimlerinin maksimuma çıktığını ve en iyi yüzey özellikleri gösteren karışımın bu oranda olduğunu, fibrinojen varlığında en iyi sonucun bu karışım oranında alındığını göstermektedir. Alınan sonuçlar birbiriyle uyumludur. Amaçlandığı gibi fibrinojen varlığında görülen ara yüzeyden madde kaybının IPL sayesinde azaltıldığı belirlenmiştir. IPL, sahip olduğu PEO grubu ve ara yüzeyde aldığı konformasyon sayesinde fibrinojen moleküllerinin belirli bir basınçtan sonra yüzeyden ayrılırken beraberinde lipidleri götürmesine engel olmuştur. Bu karışım oranında daha önce elde edilen sonuçlardan IPL'nin akciğer yüzey aktif madde karışımındaki SP-B proteinin gösterdiği davranışı gösterdiği bilinmektedir (Uslu, 2009). Elde edilen bu sonuçlar ile daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak IPL'nin ara yüzeyde DPPC'nin özelliklerini zenginleştirdiği görülmüştür.

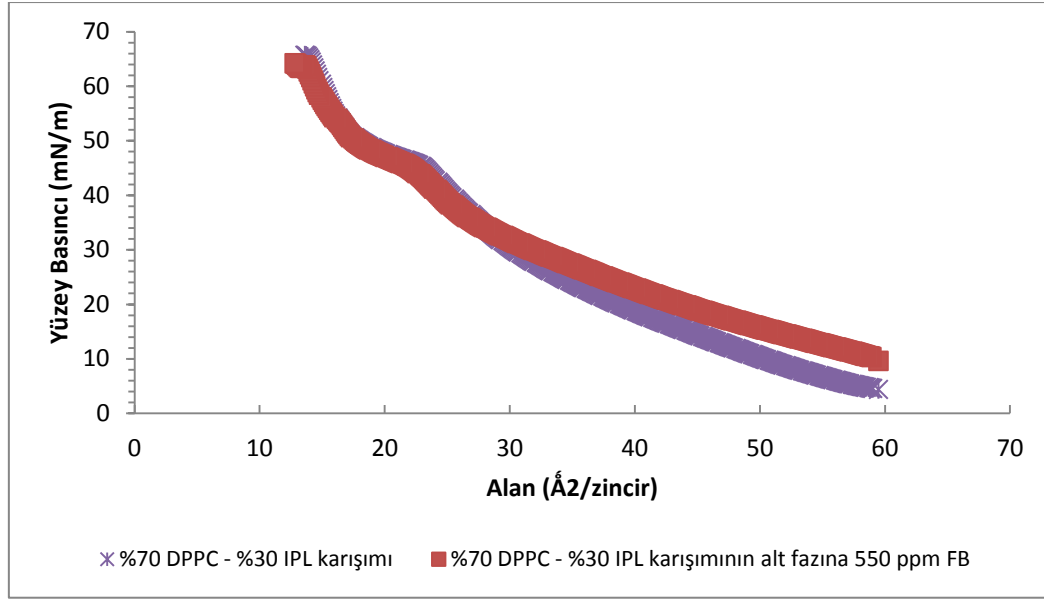
Şekil 4.43(a)'da ara yüzeyde sadece molce %80 DPPC – %20 IPL'den oluşan karışım bulurken ara yüzeyin arka arkaya sıkıştırılıp genişletilmesiyle elde edilen basınç – alan izotermi, Şekil 4.43(b)'de ara yüzeyde molce %80 – %20'lik karışımdan oluşan tekli tabakanın alt fazına fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen izoterm sunulmuştur.



Şekil 4.43 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %80 DPPC - %20 IPL karışımı için elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermleri, (b) molce %80 DPPC - %20 IPL karışımının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermleri

Alt faza fibrinojen enjekte edilen durum için alınan sonuçlar ile ara yüzeyde sadece karışımın bulunduğu durumda alınan sonuçlar birbirlerinden farklıdır. Ancak bu fark, molce %90 DPPC - %10 IPL içeren sistemdeki kadar büyük değildir. Bu karışım oranında da ara yüzeyin histeresiz davranışı kötüleşmiş, sıkıştırma – genişleme eğrileri arasındaki fark artmıştır. İzotermin karakteristiği değişse de ulaşılan maksimum basınç değeri, saf karışım için elde edilen maksimum basınca eşittir. Dolayısıyla, ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarının molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı olduğu durumda adsorbe olan fibrinojen miktarından daha az olduğu sonucuna varılmıştır. İki izoterm arasında alan değerlerindeki kayma yok denebilecek kadar azdır. Başka bir deyişle, ara yüzeyden kaybolan madde miktarı düşüktür. Ayrıca her çevrimde ulaşılan maksimum basınçta, bir önceki çevrime göre çok fazla düşüş görülmemektedir. Ara yüzeye fibrinojen adsorpsiyonu önlenebilmiştir sonucu net olarak çıkarılamasa da, elde edilen sonuç oldukça umut vericidir.

Son olarak karışımdaki IPL miktarı %30'a çıkartılmış ve aynı incelemeler bu karışım oranı için de yapılmıştır.

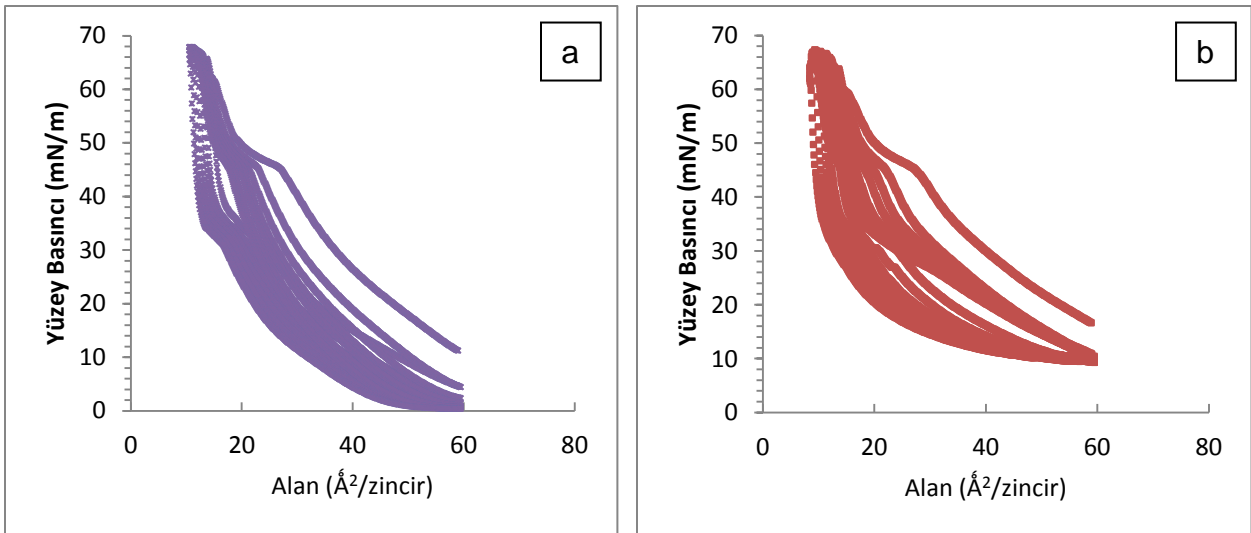


Şekil 4.44 Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde oluşturulmuş molce %70 DPPC - %30 IPL tekli tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonundan sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermi

Şekil 4.44, ara yüzeyde sadece molce %70 DPPC - %30 IPL karışımı bulunurken ve aynı karışımın alt fazına fibrinojen enjekte edildikten sonra ara yüzeyin sabit hızla sıkıştırılmasıyla elde edilen yüzey basıncı – zaman izotermelerini göstermektedir. İki izoterm başlangıç basınçları arasındaki fark, saf DPPC'ye ve diğer karışım oranlarına göre azalmıştır. Alt faza fibrinojen enjekte edildikten sonra basınç diğer sistemlerde 10 mN/m kadar artarken bu karışım oranı için artış 5 mN/m'ye düşmüştür. Elde edilen izoterm, ara yüzey sıkıştırılmasıyla birlikte yaklaşık 30 mN/m basınca ulaşılan kadar ara yüzeyde sadece karışımın bulunduğu izoterme göre biraz daha sağa kaymıştır. Saf DPPC ve diğer karışım oranlarında bu durumdaki sağa kayış çok daha fazla olmuştur. Bütün bu veriler göz önüne alındığında, molce %70 DPPC -%30 IPL karışımı ara yüzeyde iken, adsorbe olan fibrinojen miktarının diğer sistemlere göre çok daha az olduğu düşünülmektedir. 30 mN/m basınçtan sonra ara yüzey sıkıştırılmaya devam edildiğinde ise alt faza fibrinojen enjekte edilen durumdaki izoterm ile saf karışımdan oluşan ara yüzeyin izotermelerinin birebir uyuştugu görülmektedir. Bu durumda elde edilen izoterm ara yüzeyde neredeyse hiç fibrinojen yokmuş gibi davranmaktadır. Ulaşılan maksimum basınç, saf karışımın maksimum basıncı ile aynıdır. Maksimum basınçların eşit olmasının yanı sıra, aynı basınçta elde



edilen alan değerleri de eşittir. İki izoterm arasında basınç ve alan değerlerinde bir farklılık görülmemesi, ara yüzeyde madde kaybının olmadığını göstermektedir. 30 mN/m basınca kadar az miktarda da olsa ara yüzeyde bulunan fibrinojen molekülleri, bu basınç değerinden sonra ara yüzeyden ayrılmıştır. Ancak saf DPPC'nin ve molce %90 DPPC - %10 IPL karışımının fibrinojen varlığında yüksek basınçlarda ara yüzeyden fibrinojen ile birlikte ayrılmaları durumundan farklı olarak bu sistem için ara yüzeyden lipid kaybı neredeyse hiç yaşanmamıştır. Fibrinojen varlığında ara yüzeyden madde kaybının azaltılması karışımındaki IPL oranı artırılarak sağlanmıştır. İlk olarak %80 DPPC - %20 IPL içeren karışım ile madde kaybı azaltılmış; IPL'nin mol oranının artırıldığı %70 DPPC - %30 IPL karışımı ile daha da iyi sonuçlar alınmıştır. Şekil 4.45(a)'da ara yüzeyde sadece molce %70 DPPC – %30 IPL'den oluşan karışım bulurken ara yüzeyin arka arkaya sıkıştırılıp genişletilmesiyle elde edilen basınç – alan izotermi, Şekil 4.45(b)'de ara yüzeyde molce %70 – %30'luk karışımdan oluşan tekli tabakanın alt fazına fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen izoterm sunulmuştur.



Şekil 4.45 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyinde molce %70 DPPC - %30 IPL karışımı için elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{\AA}^2/\text{zincir}$ ) izotermi, (b) molce %70 DPPC - %30 IPL karışımının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{\AA}^2/\text{zincir}$ ) izotermi

Çıkılabilen maksimum basıncın saf DPPC ile ulaşılan maksimum basınca eşit olması, iki maddenin arasındaki pozitif etkileşim sayesinde. Karışımdaki DPPC yüzey basıncını arttırırken, IPL ise ara yüzeyden madde kaybolmasını engellemektedir. Şekil 4.45(a) ile Şekil 4.45(b) incelendiğinde, ulaşılan maksimum basınçtaki yüzey alanı değerlerinin, saf karışım izotermindeki alan değerleri ile örtüştüğü görülmektedir. Ayrıca her bir izotermde ulaşılan maksimum basınç, bir önceki izotermle karşılaştırıldığında basınç değerlerinde bir farklılık görülmediği tespit edilmiştir. Her bir izoterm için aynı basınç değerine ulaşılması ara yüzeyden madde kaybolmadığının bir belirteçidir. Ayrıca, Şekil 4.45(b)'de ardı ardına alınan izotermelerde sola kaymanın çok az olduğu belirlenmiştir. İzotermeler arasındaki sola kayma ara yüzeyden madde kaybolduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ara yüzeyde daha az madde olduğunda, bir önceki izotermle aynı basınca ulaşabilmek için sıkıştırma miktarının daha fazla olması gerekmektedir. Bu durum saf DPPC – fibrinojen ve molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı – fibrinojen sistemleri için görülürken, %80 - %20 oranındaki karışım ile %70 - %30 oranındaki karışım için sola kayma miktarları net olarak azalmıştır.

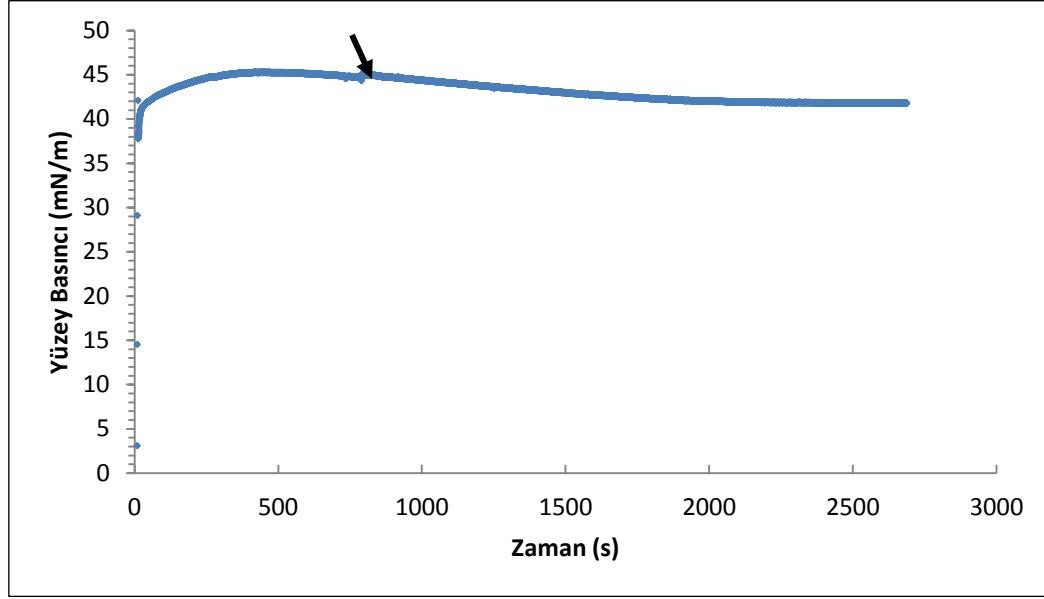
#### **4.3.2.2. Doğal Akciğer Yüzey Aktif Madde Karışımının (Infasurf®) Ara Yüzey Özelliklerine Fibrinojen Etkisinin İncelenmesi**

Günümüzde, hayvan ciğerlerinden özütlenen klinik surfaktantların hiç biri tam olarak etkin sonuç verememektedir. ARDS tedavisinin tam olarak bulunabilmesi, tedavi ve saflaştırma masraflarının azaltılabilmesi gibi amaçlarla, sentetik akciğer yüzey aktif maddelerini geliştirme çalışmaları hala devam etmektedir (Zasadzinski et al., 2010). RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan ve ölüm oranını önemli derecede azaltmış olan Infasurf®'ün fibrinojen varlığında göstereceği özellikler, ARDS'de kullanımının incelenmesi adına önem taşımaktadır. Infasurf® ve fibrinojenin etkileşimlerinin net olarak anlaşılabilmesi için bu bölümde çeşitli deney koşulları oluşturulmuştur.

##### **4.3.2.2.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen Adsorpsiyonunun İncelenmesi**

Infasurf® ile fibrinojen arasındaki etkileşimlerin net olarak belirlenmesi amacıyla ilk olarak hava/sıvı ara yüzeyinde Infasurf® tekli tabakası oluşturulmuş ve daha sonra alt faza fibrinojen enjeksiyonu yapılmıştır. Kurulan bu deney ile Infasurf®, doğal akciğer

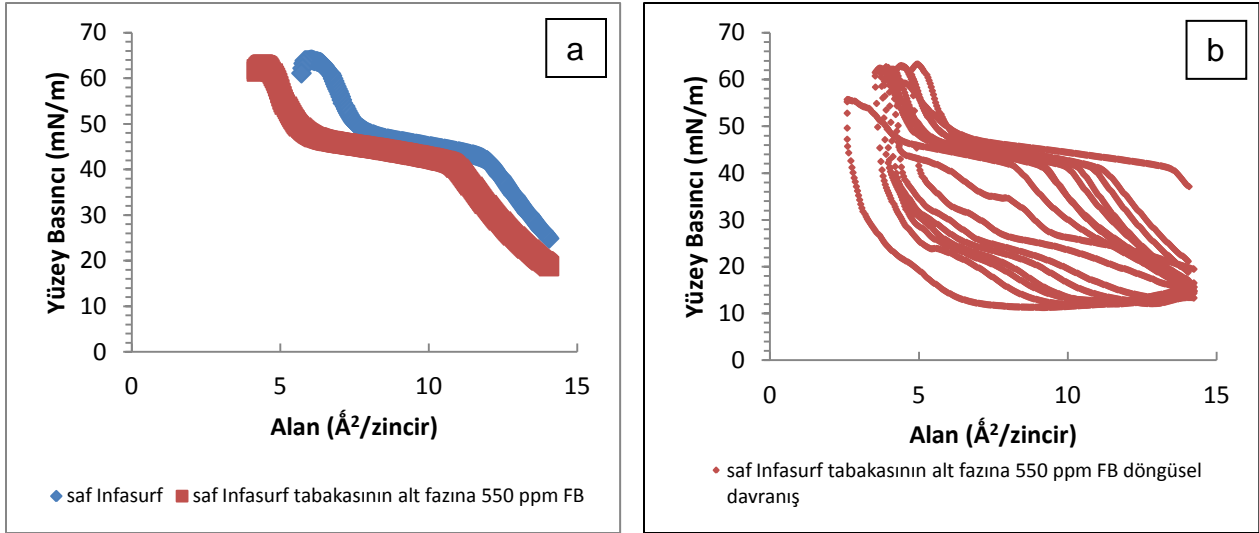
ara yüzeyi olarak kullanılmaktadır. Böylece, alt faza fibrinojen enjeksiyonu yapılarak ARDS'de görülen surfaktant inaktivasyonu durumu modellenmiştir. Ara yüzeyde tekli tabakanın oluşturulabilmesi amacıyla Infasurf<sup>®</sup>, 35 mg/mL'lik ilaç stoğundan 1.5 µL alınarak hava/fosfat tampon ara yüzeyine mikro şırınga ile yayılmıştır. Yayılmanın başladığı andan itibaren, zamanla yüzey basıncı kaydedilmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 Saf Infasurf<sup>®</sup> tabakasının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

Hava/fosfat tampon ara yüzeyinde dengeye ulaşmış Infasurf<sup>®</sup> tabakasına, ölçümün 800. saniyesinde LB tankındaki net konsantrasyonu 550 ppm olacak şekilde fibrinojen enjekte edilmiştir. Şekil 4.46'da fibrinojen enjeksiyonundan itibaren (enjeksiyon anı ok ile gösterilmiştir), yaklaşık 1200 saniyede yüzey basıncının 3 mN/m düştüğü ve 41 mN/m değerinde dengeye geldiği görülmektedir. Daha önce yapılan deney sonuçlarından, ara yüzeyde sadece Infasurf<sup>®</sup> varken, denge yüzey basıncının 45 mN/m de sabit kaldığı bilinmektedir (Şekil 4.35). Dolayısıyla, yüzey basıncındaki 3 mN/m'lik düşüşün alt faza enjekte edilen fibrinojenin etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Infasurf<sup>®</sup>'ün serum proteinleri varlığında adsorpsiyon özelliklerinin azaldığı literatürde de belirtilmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada, saf Infasurf<sup>®</sup>'ün hava/tampon ara yüzeyinde dengeye geldiği basınç yaklaşık 40 mN/m olarak ölçülürken, tampon fazında serum proteinleri bulunurken aynı miktar Infasurf<sup>®</sup>'ün yüzey basıncını ancak

30 mN/m'ye yükseltebildiği görülmüştür (Taeusch et al., 2005; Taeusch et al., 2008). Bu durumda, kan proteinlerinin Infasurf®'ün adsorpsiyon özelliklerini değiştirdiği yargısına varılabilmektedir. Infasurf®, lipid ve proteinlerden oluşan doğal bir karışımdır. İçinde katyonik akciğer proteinleri bulunduğu gibi büyük oranda amfoterik yapıdaki DPPC lipidi bulunmaktadır (Alonso et al., 2005). Fibrinojen ise vücut ortamındaki net yükü negatif olan ve serum proteinleri arasında en çok soruna yol açan serum proteini olarak bilinmektedir (Seeger et al., 1985; Fuchimukai et al., 1987; Hernandez et al., 2002). Fibrinojenin DPPC ile olan etkileşimi daha önce incelenmiş ve ara yüzeyde DPPC tabakası varken, fibrinojenin ara yüzeyden madde kaybına sebep olduğu belirlenmiştir. Ayrıca akciğer yüzey aktif madde karışımının plazma proteinlerinin etkisiyle ara yüzeyden ayrıldığı belirtilmektedir (Keough et al., 1988; Venkitaraman et al., 1991). Dolayısıyla ara yüzeyde Infasurf® bulunurken de, fibrinojenin hem DPPC ile hem de pozitif net yüke sahip SP-B ve SP-C proteinleri ile elektrostatik olarak etkileşime geçip, onların yüzeyden ayrılmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu etkileşimin daha iyi anlaşılması amacıyla, ara yüzey sabit bir hız ile sıkıştırılıp – genişletilmiş ve ara yüzeyin dögüsel davranışı incelenmiştir (Şekil 4.47).



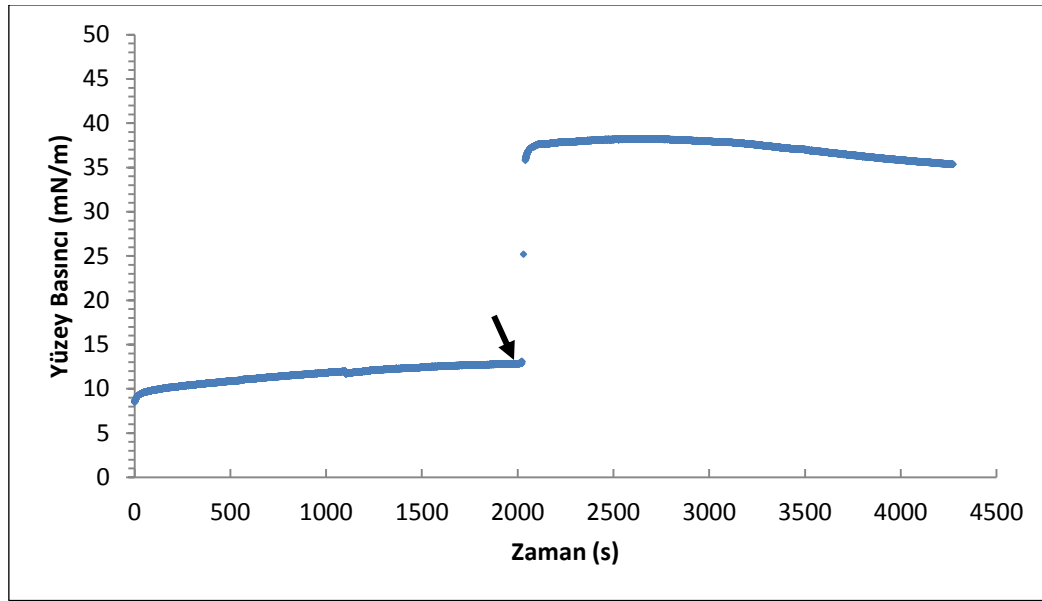
Şekil 4.47 saf Infasurf® tabakasının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonda fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) dögüsel davranış

Şekil 4.47(a)'da saf Infasurf<sup>®</sup> ile dengeye gelmiş Infasurf<sup>®</sup> tabakasının alt fazına fibrinojen enjekte edildikten sonra elde edilen sıkıştırma izotermi sunulmuştur. İki izoterm arasında profil olarak çok fazla fark görülmesi de, fibrinojenli sistem için elde edilen izoterm, saf Infasurf<sup>®</sup>'e göre oldukça farklı alan değerlerine sahiptir. Alan değerlerinin küçülmesi, ara yüzeydeki maddelerin normal durumla kıyaslandığında aynı basınca ulaşabilmek için daha fazla sıkışmaları gerektiğini göstermektedir. Bu durum da ara yüzeyde normalden daha az madde olduğunda ya da yüzeyden madde kayb olduğunda gözlenmektedir. Basınç – zaman izotermelerinde yüzey basıncının zamanla azalması durumuna paralel olarak, sıkıştırma eğrilerinden de fibrinojenin ara yüzeyden madde kaybına neden olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Şekil 4.47(b) ise, aynı ara yüzeyde arka arkaya alınan sıkıştırma – genişletme eğrilerini göstermektedir. Bu grafikten de görüldüğü gibi her bir çevrimde izoterm bir önceki çevrimin geldiği alan değerinden daha küçük alan değerine kaymıştır. Dolayısıyla, her sıkıştırma çevrimiyle birlikte ara yüzeyden belirli bir miktar Infasurf<sup>®</sup> alt faza geçmektedir. Ara yüzey genişletildiğinde ise, alt faza geçen Infasurf<sup>®</sup> karışımı tekrar aynı miktarda ara yüzeye çıkamamaktadır. İzotermelerdeki alan değerlerindeki küçülme bu nedenle görülmektedir. Ayrıca, her bir izoterm için ulaşılabilen maksimum basınç değeri de düşmektedir. Bu düşüş ilk birkaç çevrim için az gibi gözükse de, daha sonra ciddi seviyeye ulaşmaktadır. Elde edilen izoterm için Infasurf<sup>®</sup>'ün geri yayılım özelliğinin de azaldığı söylenebilir. Ara yüzeyden lipid ve protein kaybına neden olan fibrinojen belirli bir basınçtan sonra yüzeyden ayrılmaktadır. Fibrinojen ile birlikte yüzeyden ayrılan lipid ve proteinlerin yerini karışımda kalan lipid ve proteinler tutabilmişse de, birkaç çevrimin sonunda, ara yüzeydeki madde miktarı yüzey basıncını yeterince yükseltmeyecek kadar azalmıştır. Bu nedenle de ara yüzeyin ulaştığı yüzey basıncı sabit kalamamış ve Infasurf<sup>®</sup> ara yüzey özelliklerini kaybetmiştir.

Bu sistem için elde edilen sonuçlardan, doğal akciğer ara yüzey modelinin ARDS durumundaki gibi ortama fibrinojen sızdığına eski performansını gösteremediği deneysel olarak belirlenmiştir.

#### 4.3.2.2.2. Fibrinojen Tabakasına Infasurf® Adsorpsiyonunun İncelenmesi

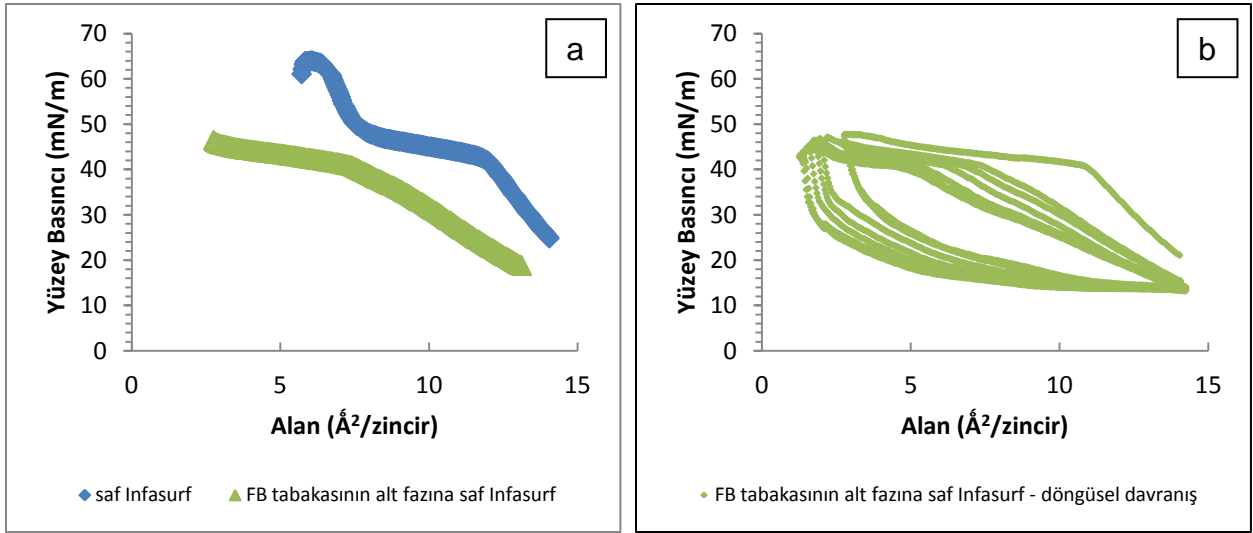
Bir önceki bölümde kurulan deney sistemine zıt olarak, bu bölümde, önceden oluşturulmuş fibrinojen tabakasının alt fazına Infasurf® enjeksiyonu yapılmıştır. Böylelikle ara yüzeyde serum proteinleri varken, Infasurf®'ün ara yüzeye adsorbe olup olmadığı incelenebilecek; dolayısıyla, teorik olarak oluşmuş ARDS durumunun ters çevrilip çevrilemediği araştırılacaktır. RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan Infasurf®'ün ARDS durumunda kullanım olasılığının deneysel ortamda daha iyi anlaşılabilmesi açısından bu sistem ile elde edilen sonuçlar oldukça önem taşımaktadır. Günümüzde ARDS tedavisinde Infasurf® kullanılmaktadır, ancak Infasurf® diğer surfaktant karışımlarına göre daha iyi sonuç verse de hala tedavide kesin bir çözüm niteliğinde değildir (Lewis and Veldhuizen, 2006).



Şekil 4.48 Fibrinojen tabakasının alt fazına Saf Infasurf® enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izoterminin grafiği

Şekil 4.48'de görüldüğü gibi fibrinojen hava/fosfat tampon ara yüzeyinde yaklaşık 12 – 13 mN/m yüzey basıncında dengeye ulaşmıştır ve bu değer literatürle uyumludur (Phang et al., 2005; Kim and Franses, 2006). 550 ppm net konsantrasyondaki fibrinojen dengeye ulaştıktan sonra yaklaşık 2000. saniyede alt faza Infasurf® enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun yapılmasıyla birlikte yüzey basıncında çok hızlı bir artış görülmüş ve 60 saniye gibi kısa bir sürede basınç 13 mN/m'den 35 mN/m'ye

ulaşmıştır. Ara yüzeye saf Infasurf® enjekte edildiğinde de basınçtaki artış çok hızlı olmuştur, yaklaşık 40 saniyede yüzey basıncı 35 mN/m'ye ulaşmıştır, ancak ara yüzeyin dengeye geldiği basınç 43 – 45 mN/m olarak ölçülmüş ve literatürle uyumlu olduğu görülmüştür. Ara yüzeyde fibrinojen bulunduğunda ise basınç en fazla 38 mN/m'ye yükselebilmştir. Dolayısıyla, elde edilen denge yüzey basıncından ara yüzeyde enjekte edilen miktardan daha az miktarda Infasurf®'ün ara yüzeye adsorbe olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ara yüzeyin bileşimi ve davranışının daha iyi anlaşılması amacıyla yüzey basıncı dengeye geldikten sonra döngüsel davranış incelenmiştir.

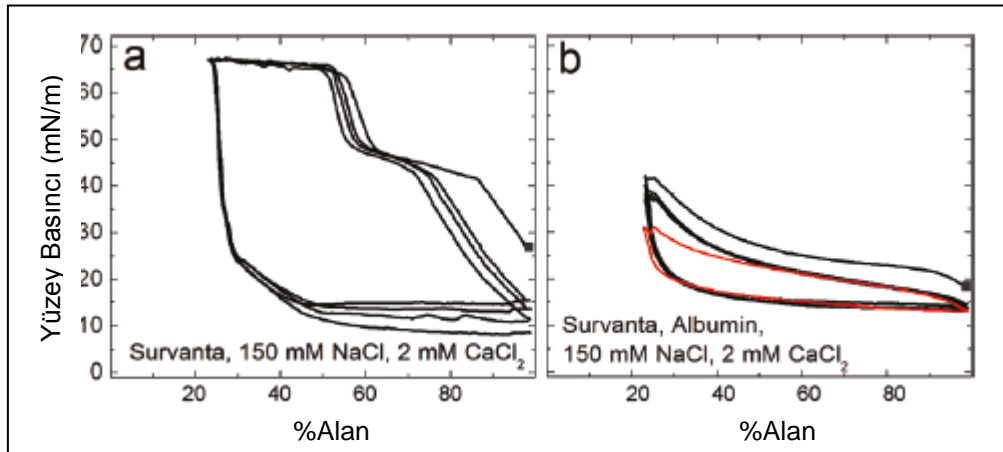


Şekil 4.49 Fibrinojen tabakasının alt fazına saf Infasurf® enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) döngüsel davranış

Şekil 4.49(a)'da saf Infasurf® ile dengeye gelmiş fibrinojen tabakasının alt fazına Infasurf® enjekte edildikten sonra elde edilen sıkıştırma izotermi sunulmuştur. Ara yüzeyde fibrinojen varken elde edilen sonucun saf Infasurf®'ten farklı olduğu net olarak görülmektedir. Şekil 4.48'de elde edilen basınç – zaman izotermi ara yüzeye bir miktar Infasurf®'ün adsorbe olduğunu göstermektedir. Şekil 4.49(a)'da ise bu veriye destek olarak, elde edilen sıkıştırma izotermde Infasurf®'ün karakteristik faz geçiş bölgesi bu izotermde de görüldüğü söylenebilir. Ara yüzeyde fibrinojen varken enjekte edilen Infasurf® ara yüzeye adsorbe olsa da, sistemin ara yüzey davranışına neredeyse hiç pozitif etkisi olmamıştır. Sıkıştırma izotermine ulaşabildiği maksimum basınç 47 mN/m'yi geçememiştir. Ayrıca ara yüzey bu basınca ulaşabilmek için saf

Infasurf®'e göre çok daha fazla sıkıştırılmak zorunda kalmıştır. Şekil 4.49(b)'ye bakıldığında elde edilen döngüsel davranışın saf Infasurf®'ün döngüsel davranışından çok farklı olduğu görülmüştür. Ulaşılan maksimum ara yüzey basıncı 47 mN/m'yi geçememiş ve her döngüde sıkışma miktarı artarken, ara yüzeyden biraz daha madde kaybolmuştur. Ara yüzeyde fibrinojen bulunurken elde edilen sonuç oldukça çarpıcıdır. Sistem, akciğer yüzey aktif madde karışımının hiçbir özelliğini yansıtmamaktadır. Infasurf® ara yüzeye belirli bir miktarda adsorbe olabilmeye bile bu miktar yüzey özelliklerini düzenlemeye yetmemiş ve fibrinojenin ara yüzey özellikleri sistemde baskın hale gelmiştir.

Literatürde sığır akciğerinden özütlenen ve SP-B içeriği Infasurf®'e kıyasla çok daha az olan Survanta® ile serum proteinlerinden albumin kullanılarak yapılan bir çalışmada; ara yüzeyde albumin bulunurken, Survanta® alt faza verilmiştir. Ara yüzey belirli bir hızla sıkıştırılıp genişletildiğinde elde edilen döngüsel davranış ortamda sadece albumin bulunduğunda elde edilen izoterm ile neredeyse aynı olmuştur. Bu çalışmada elde edilen basınç – alan izotermi Şekil 4.50(a) ve Şekil 4.50(b)'deki gibidir (Stenger et al., 2009).



Şekil 4.50 (a) saf Survanta için elde edilen döngüsel davranış, (b) alt fazda albumin bulunurken saf Survanta için elde edilen döngüsel davranış (Stenger et al., 2009).

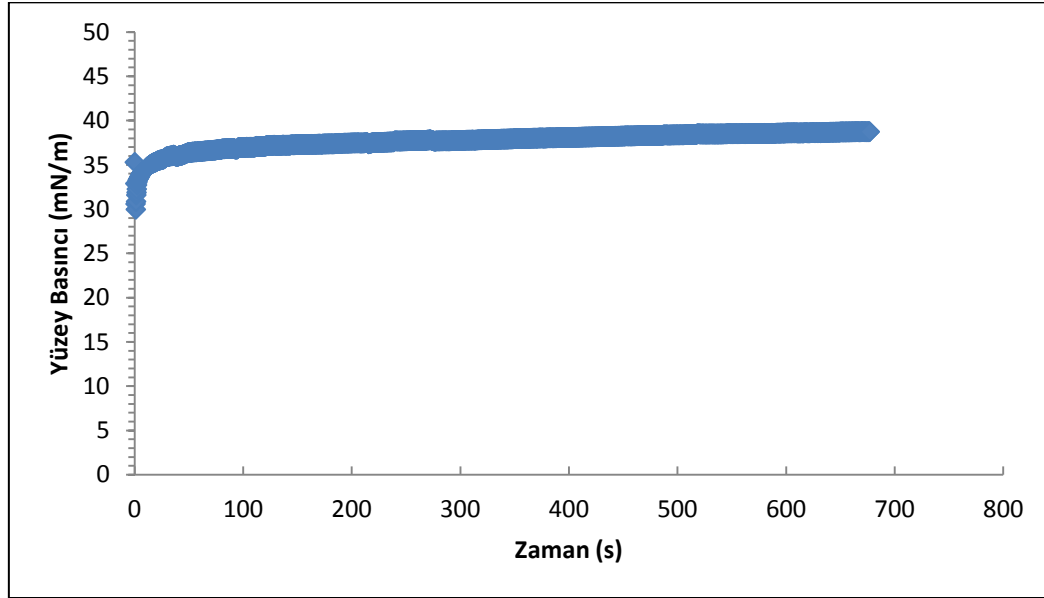
Şekil 4.50(a)'da saf Survanta®'nin döngüsel davranışı hava/tampon çözelti ara yüzeyinde incelenmiştir. Ulaşılan maksimum basınç 65 mN/m civarında olurken, sistemin histeresizinin çok fazla olduğu görülmektedir. Şekil 4.50(b)'de ise, ara



yüzeyde albumin varken elde edilen basınç – zaman izotermelerinin saf albumin'in izotermine çok benzediği, ara yüzey basıncının 42 mN/m'den daha yükseğe çıkamadığı görülmüştür. Survanta®'nın hiçbir özelliğini yansıtmayan bu ara yüzeyde de albuminin özellikleri baskın olmuştur. Infasurf®'ün SP-B oranı Survanta®'dan daha yüksek olsa da, ara yüzeyde oluşmuş fibrinojen tabakasının kararlı yapısını bozmadığı ve ara yüzeye bir miktar adsorbe olsa bile ara yüzey sıkıştırıldığında yapısındaki lipid ve proteinlerin ara yüzeyden ayrıldığı sonucuna varılabilmektedir (Stenger et al., 2009).

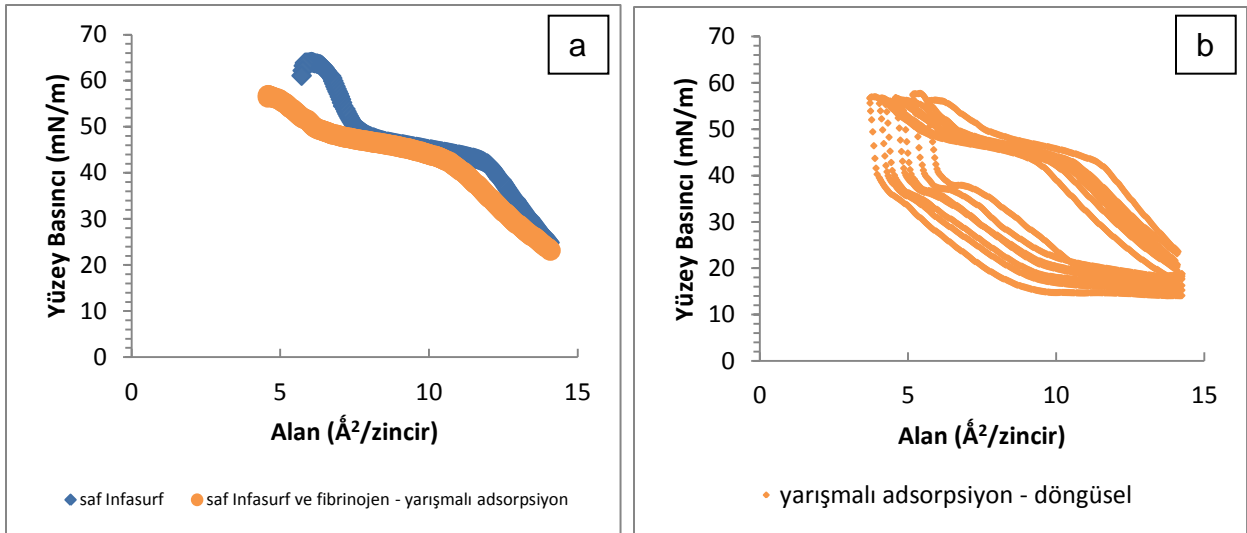
#### 4.3.2.2.3. Hava/Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Infasurf® ve Fibrinojenin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Bu kısımda, Infasurf® ve fibrinojenin aynı anda fosfat tampon fazına enjekte edilmesiyle iki maddenin adsorpsiyon özelliklerinin birbirine göre kıyaslaması yapılabilecektir. Ara yüzeyin ulaştığı spesifik basınç değerinden, alt faza simultane olarak verilen iki maddeden ara yüzeye hangi maddenin baskın olarak adsorbe olabildiği yorumu yapılabilmektedir (Uslu, 2009).



Şekil 4.51 Fosfat tampon fazına Saf Infasurf® ile 550 ppm fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

Şekil 4.51'de enjeksiyon anından itibaren elde edilen basınç – zaman izotermi görülmektedir. Yüzey basıncı çok kısa sürede 30 mN/m'ye ulaşmış ve daha sonra basıncın artış hızı düşerek 38 mN/m değerinde dengeye gelmiştir. Ara yüzeyde saf Infasurf® varken, bu değer 43 – 45 mN/m olmaktadır. Dolayısıyla, elde edilen bu değerden ara yüzeyde sadece Infasurf® bulunmadığı sonucu çıkartılmaktadır. Aynı anda enjeksiyon sonucunda, geline denge yüzey basıncından ara yüzeye baskın olarak Infasurf®,ün adsorbe olduğu görülmektedir ancak, kurulan bu sistemde ara yüzeye herhangi bir basınç uygulanmamaktadır. Ara yüzeye basınç uygulandığında, Infasurf® ve fibrinojenin etkileşimi hakkında daha net bir yorum yapılabilecektir. Ara yüzeyde bulunduğu düşünülen Infasurf®,ün, diğer sistemlerde olduğu gibi ara yüzey sıkıştırılıp – genişletildiğinde ara yüzeyde kalıp kalmayacağı döngüsel davranışın incelenmesiyle anlaşılacaktır. Solunum döngüsel bir prosestir ve bu sebeple döngüsel davranış göz önünde bulundurularak yorum yapılması daha doğru olacaktır.



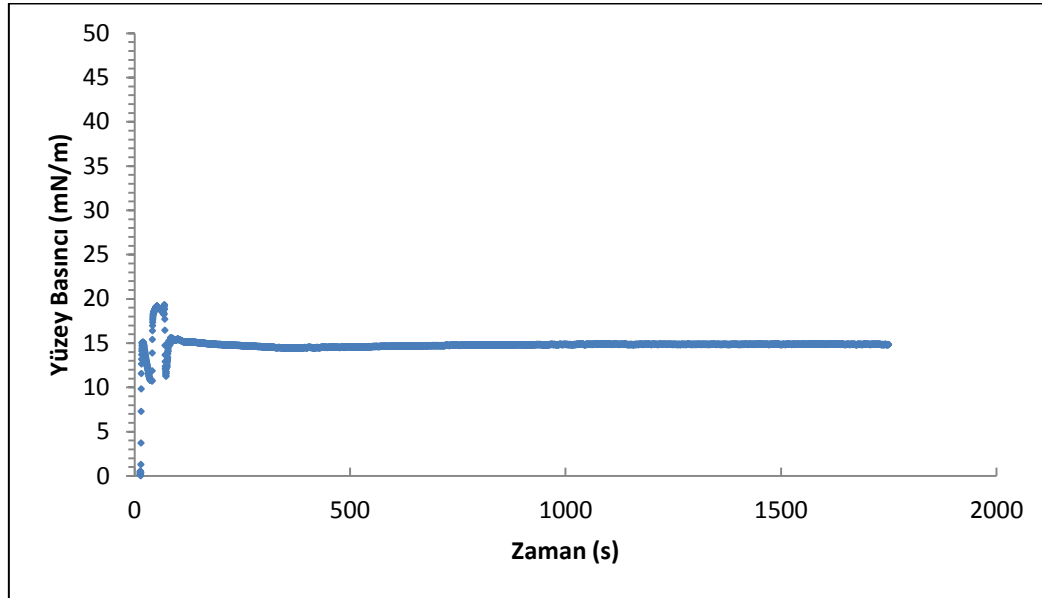
Şekil 4.52 Saf Infasurf® ile fibrinojen fosfat tampon fazına aynı anda enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) döngüsel davranış

Aynı alt faza aynı anda enjekte edilmeleri sonucu, Infasurf® ve fibrinojen ara yüzeye adsorbe olmadan önce alt fazda etkileşebilmektedir. Dolayısıyla yüzey basıncı dengeye geldikten sonra ara yüzeyin döngüsel davranışı daha önce kurulan sistemlerden farklı olmuştur (Şekil 4.52). Yarışmalı adsorpsiyon sonucu elde edilen basınç – zaman izotermi ara yüzeyde Infasurf®,ün miktar olarak baskın olduğu

ancak fibrinojen moleküllerinin de ara yüzeye adsorbe olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.52(a)'da saf Infasurf® ve yarışmalı adsorpsiyon sistemi için elde edilmiş sıkıştırma izotermi sunulmuştur. İki izoterm karşılaştırıldığında, izotermilerin başlangıç basınçlarının çok yakın olduğu görülmektedir. Saf Infasurf® için görülen faz geçiş platosu, bu sistemde de görülmüş ancak faz geçişinin başladığı ve bittiği basınç değerleri eşit olsa da, bu basınçlardaki yüzey alanı değerleri küçülmüştür. Bu küçülmenin nedeni ara yüzeyde Infasurf® dışında başka maddelerin de bulunmasıdır. Fibrinojen, ara yüzeye belirli bir miktarda adsorbe olmuş ve bunun sonucunda, Infasurf® karakteristik izotermine elde edilebilmesi için yüzey daha fazla sıkıştırılmak durumunda kalmıştır. Yaklaşık 40 mN/m basınca kadar yüzeyde kalabildiği bilinen fibrinojen bu basınçtan sonra yüzeyden ayrılmış ancak sahip olduğu negatif net yük ile, diğer sistemlerde de görüldüğü gibi Infasurf® ile etkileşerek ara yüzeyden belirli bir miktar Infasurf®'ün de kaybolmasına yol açmıştır. Alan değerlerinde görülen kaymanın sebebi bu durumdan kaynaklanmaktadır. Yarışmalı adsorpsiyon deneyi sonucunda ulaşılabilen maksimum basınç saf Infasurf®'ün maksimum basıncından daha düşüktür. Ara yüzey 56 mN/m'lik maksimum basıncına, daha küçük alanda yani, daha fazla sıkıştırılarak ulaşabilmiştir. Bütün bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, ara yüzeyde Infasurf® dışında fibrinojen de bulunduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.52(b), arka arkaya alınan ölçümler sonucu elde edilen basınç – alan izotermelerini göstermektedir. Ara yüzeyin döngüsel davranışı bu grafik üzerinden incelendiğinde, Infasurf® ve fibrinojenin beraber bulunduğu diğer sistemlere benzer olarak, her bir çevrimde alan değerlerinin sola kaydığını, yani aynı basınca ulaşmak için ara yüzeyin hep daha fazla sıkıştırılması gerektiği görülmektedir. Bu durum, ara yüzeyden madde kaybı olduğunu göstermektedir. Ara yüzeyin sıkıştırılması sonucu ulaşılabilen maksimum basınç, ara yüzeyden madde kaybı olsa bile her çevrimde aynı kalmıştır. Ara yüzey sıkıştırıldığında ara yüzeyin hemen altına yerleşen lipid ve protein karışımı, ara yüzey genişletildikten sonra aynı miktarda olmasa da geri yayılabilmiş ve yüzey gerilimini düşürebilmiştir. Elde edilen döngüsel davranışın her döngüde aynı sonucu verebilmesi kararlılık adına önemli bir parametredir. Ancak, ulaşılan maksimum ve minimum yüzey basıncı değerleri ve izoterm karakteristiği açısından Infasurf®'ün bu sistemdeki davranışı yeterli değildir.

#### 4.3.2.2.4. Hava/Fosfat Tampon Ara Yüzeyine Önceden Etkileştirilmiş Infasurf® - Fibrinojen Çözeltisinin Adsorpsiyonunun İncelenmesi

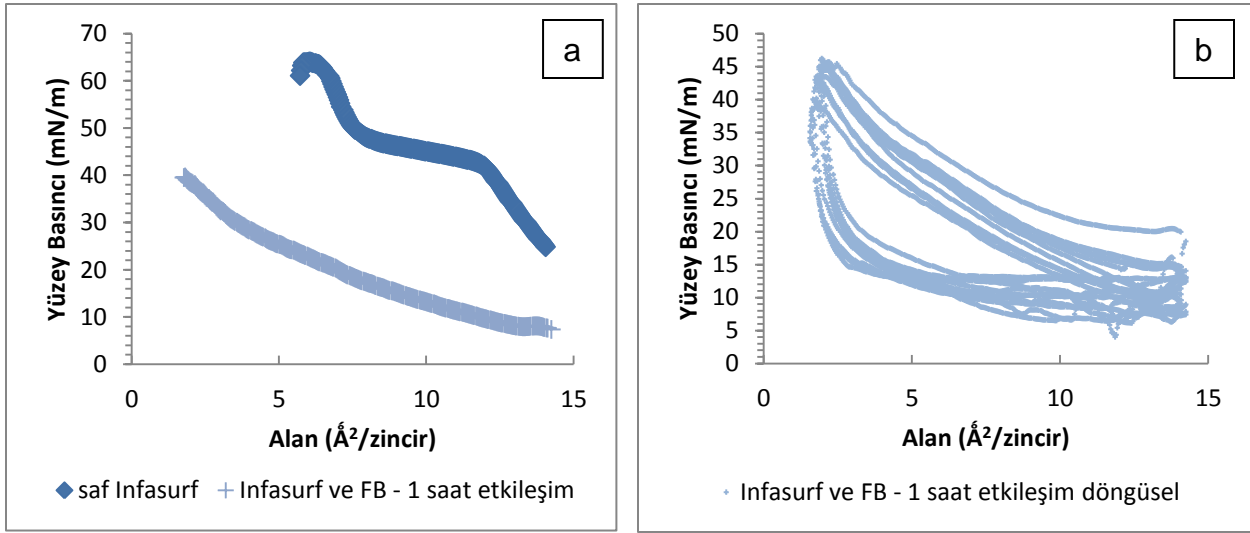
Infasurf® ile fibrinojen ara yüzeye farklı koşullarda verildikleri her durumda, Infasurf®'ün yüzey özelliklerinin negatif yönde etkilendiği tespit edilmiştir. Fibrinojenin Infasurf®'ü ara yüzeyden uzaklaştırmasının yanı sıra, yapısında bir bozukluğa yol açtığı düşünülmektedir. Bu durumun anlaşılabilmesi amacıyla, Infasurf® ve fibrinojen başka bir ortamda 1 saat etkileştirilmiş ve karışım daha sonra yüzeye yayılmıştır. Yayılma anından itibaren elde edilen yüzey basıncı – zaman izotermi Şekil 4.53'te verilmiştir.



Şekil 4.53 Fosfat tampon fazına 1 saat etkileştirilmiş Saf Infasurf® ile 550 ppm fibrinojen karışımının enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

Infasurf® ve fibrinojenin etkileşimlerinin incelendiği sistemlerde denge yüzey basıncı genel olarak saf Infasurf®'ün spesifik basıncına yakın olarak elde edilmiştir. Ancak iki maddenin bir arada bulundurulup ara yüzeye yayılması sonucu, Şekil 4.53'ten görüldüğü gibi yüzey basıncı, karışım yüzeye verildiği andan itibaren çok hızlı bir şekilde yaklaşık 15 mN/m'ye ulaşmış ve dengeye gelmiştir. 15 mN/m, saf fibrinojen için elde edilen yüzey basıncına çok yakındır (Phang et al., 2005; Kim and Franses, 2006). Sistem geldiği denge basıncı dolayısıyla ara yüzeyde sadece fibrinojen varmış gibi davranmaktadır. Infasurf® ara yüzeydeyken alt faza fibrinojen enjeksiyonu

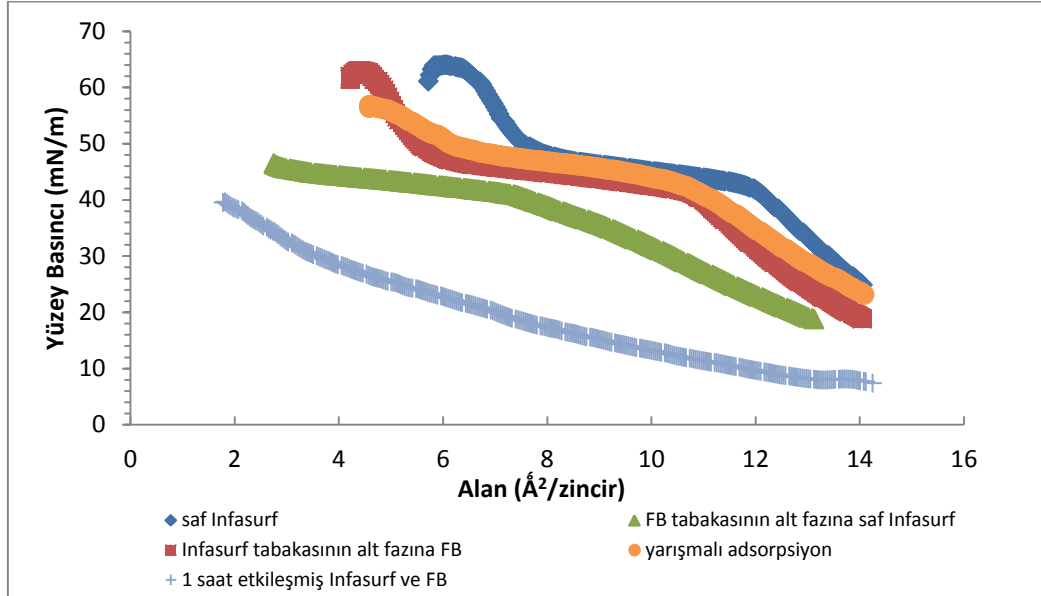
yapıldığında, ya da fibrinojen ara yüzeydeyken alt faza Infasurf® enjekte edildiğinde ara yüzeyin denge basıncı saf Infasurf®'e yakın olmaktadır. Ancak bu sistem için durum farklılaşmıştır. Infasurf®, veziküler bir karışımdır. Fibrinojen alt fazına enjekte edildiğinde, ya da ara yüzey boşken yüzeye yayıldığında fibrinojen ile veziküllerinin açılmış halleri etkileşmektedir. Denge yüzey basıncının fibrinojen denge yüzey basıncına yakın çıkması fibrinojenin Infasurf®'ün yapısını bozmasından kaynaklanabilir. Ara yüzeye yayılan karışımın döngüsel davranışı da incelenmiştir.



Şekil 4.54 1 saat etkileşmiş Saf Infasurf® ile 550 ppm fibrinojen karışımının fosfat tampon fazına enjekte edildikten sonra elde edilen (a) sıkıştırma izotermi, (b) döngüsel davranış

Şekil 4.54(a)'da saf Infasurf® ile 1 saat etkileştirilmiş fibrinojen ve Infasurf® karışımı için elde edilen sıkıştırma izotermi sunulmuştur. İki izoterm arasında oldukça büyük bir fark görülmektedir. Etkileşmiş karışım için basınç maksimum 40 mN/m'ye çıkabilmiştir. Saf fibrinojen için elde edilen döngüsel davranışta, ara yüzeydeki fibrinojen tabakasının 40 mN/m'den daha yüksek basınca çıkamadığı bilinmektedir (Kuo et al., 2003). Literatürle de yapılan karşılaştırmalar sonucunda, sıkıştırma izotermi sadece fibrinojenin özelliklerini taşıdığı belirlenmiştir. Bu sonuç, basınç – zaman izoterminden elde edilen sonuçla da uyumludur. Hem sıkıştırma izotermi, hem de basınç – zaman izotermi, ara yüzeyde sadece fibrinojen tabakası bulunuyormuş gibi sonuç vermişlerdir. Şekil 4.54(b)'de ara yüzeyin arka arkaya sıkıştırılıp

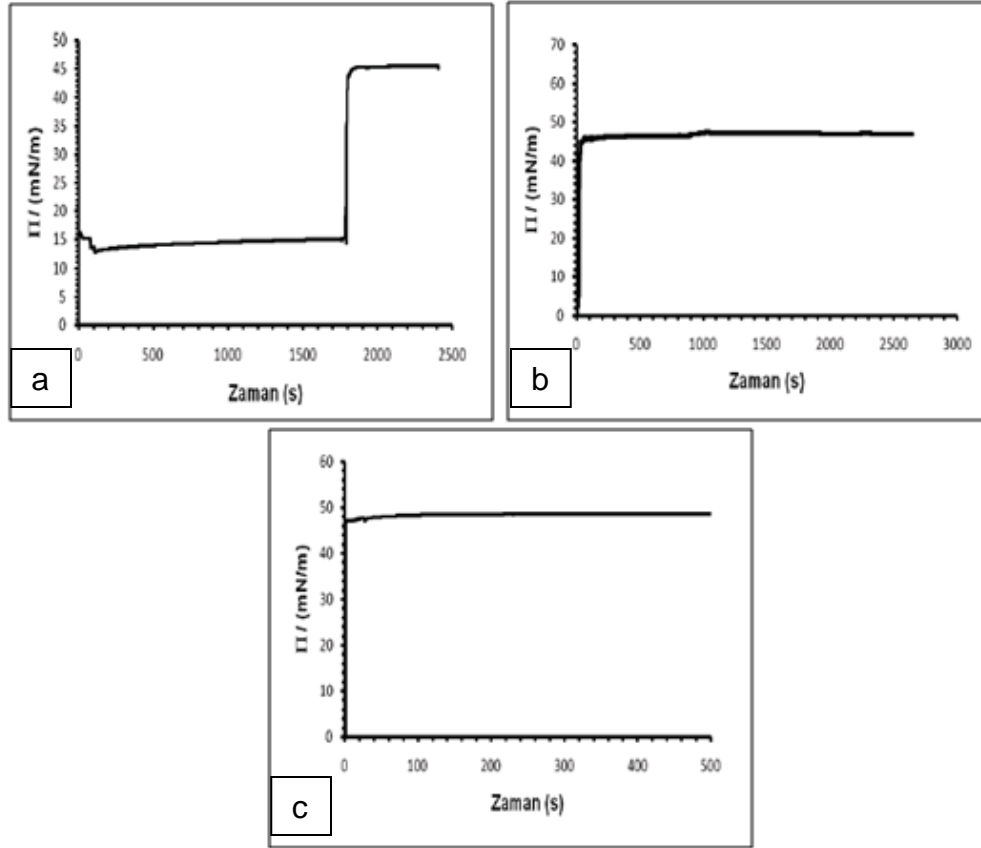
geniştirilmesiyle elde edilen döngüsel davranış görülmektedir. Basınç – alan izotermelerinde de ulaşılan maksimum basıncın çok yüksek olmadığı, elde edilen döngülerin diğer sistemlerden farklı olarak hiç faz geçişi göstermediği tespit edilmiştir. Bu tespitlerden yola çıkılarak, fibrinojenin Infasurf® ile çözelti halinde 1 saat etkileşmesi sonucu Infasurf®'ün yapısının kesin olarak bozulduğu ve dolayısıyla yüzey özelliklerinin değiştiği; ara yüzeyde fibrinojenin davranışının baskın olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.55'te fibrinojen varlığında Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla kurulan sistemlerden elde edilen sıkıştırma izotermeleri bir arada gösterilmiştir.



Şekil 4.55 Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerine fibrinojen etkisinin incelenmesi amacıyla kurulan sistemlerde elde edilen  $\pi$  (mN/m) – alan ( $\text{Å}^2/\text{zincir}$ ) izotermeleri

Bütün sıkıştırma izotermeleri bir arada değerlendirildiğinde; ara yüzey davranışı saf Infasurf®'e en çok yaklaşan sistemler; ara yüzeyde Infasurf® tabakası varken alt faza fibrinojen enjekte edilen sistem ile iki maddenin alt faza aynı anda verildiği sistem olmuştur. Bu iki deney düzeneğinde de elde edilen sonuçlar neredeyse aynıdır. Yarışmalı adsorpsiyon sonucunda ara yüzeyin sıkıştırılmasıyla ulaşılan maksimum basınç diğer sistemden biraz daha küçük olsa da faz geçiş platosunun başlangıç ve bitiş alan ve basınç değerleri iki sistem için de aynıdır ancak, faz platosunun saf Infasurf®'e göre biraz daha uzadığı görülmüştür. İki maddenin başka bir ortamda

etkileştirilip ara yüzeye yayılması sonucu elde edilen sonuçlardan Infasurf®'ün yapısının bozulduğu ve ara yüzeyde hiçbir etkinlik göstermediği belirlenmiştir. Ara yüzeyde fibrinojen tabakası bulunurken alt fazdan Infasurf® enjekte edilen sistem için ise göreceli olarak dışarıda etkileştirilen sistemden daha iyi ancak diğer sistemlerden daha kötü bir izoterm elde edilmiştir. Yüzey basıncı sıkıştırma sonucunda yeterince yükselememiş ve alan değerinde çok fazla kayma oluşmuştur. Bu izotermden de ara yüzeye adsorbe olmuş Infasurf® miktarının düzgün yüzey özellikleri elde edebilmek için yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Fibrinojen ile birlikte bulunduğu, IPL'nin ara yüzey özelliklerinin nasıl değiştiği benzer ara yüzeyler oluşturularak daha önce yapılan çalışmada incelenmiş (Şekil 4.56) ve fibrinojenin IPL'nin ara yüzey davranışı üzerinde neredeyse hiç etkisi olmadığı belirlenmiştir (Uslu, 2009).

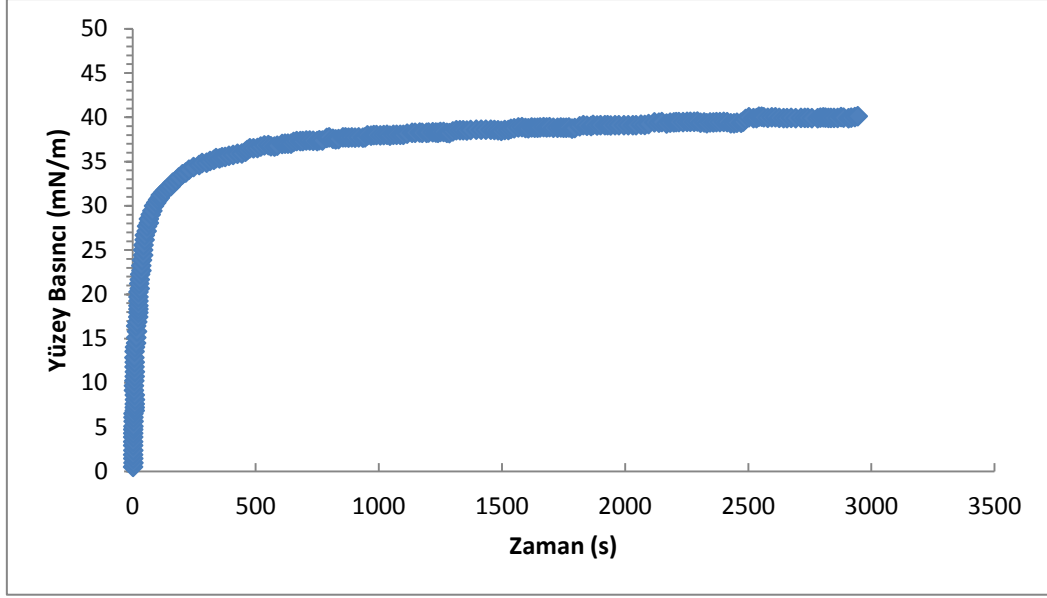


Şekil 4.56 (a) Fosfat tampon/hava ara yüzeyindeki fibrinojen tabakasının alt fazına IPL enjekte edilmesiyle, (b) fosfat tampon/hava ara yüzeyindeki IPL tabakasının alt fazına fibrinojen enjekte edilmesiyle elde edilen, (c) 0.005 mM IPL ile 550 ppm fibrinojenin fosfat tampon fazına aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi (Uslu, 2009).

Şekil 4.56(a), (b) ve (c)'de görüldüğü üzere, IPL her koşulda ara yüzeye adsorbe olmakta ve ara yüzey basıncını net olarak kendisi için spesifik olan 45 mN/m değerine ulaştırmaktadır. Infasurf® için elde edilen sonuçlarda ise fibrinojen ile birlikte bulunduğu, denge yüzey basıncı hiçbir sistemde tam olarak Infasurf®'ün spesifik denge yüzey basıncına ulaşmamıştır. Infasurf®, günümüzde ARDS tedavisinde kullanılmakta ancak hala verimli sonuçlar elde edilememektedir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlardan Infasurf®'ün fibrinojen varlığında özelliklerini yitirdiği gözlenmiştir. Diğer yandan, fibrinojen ile etkileşimler incelenirken, IPL ara yüzeye saf olarak verildiğinde suda çözündürülmekte ve tampon fazına enjekte edilmektedir. IPL suda çözünebilmesi, etkin adsorpsiyon hızı, ara yüzey özellikleri ve fibrinojen varlığında elde edilen etkileyici sonuçları ile surfaktant inaktivasyonunu önlemek açısından umut vadeden bir moleküldür. Dolayısıyla, Infasurf®'ün akciğer ara yüzeyinde kan proteinleri varlığında göstereceği özelliklerin iyileştirilmesi amacıyla IPL'nin kullanılabilirliği bir takım ön çalışmalar yapılarak incelenmiştir.

Bu amaçla ilk olarak IPL ile fibrinojenin ara yüzey dışında bir karışım olarak 1 saat etkileştirilmiş çözeltisinin yüzey özelliği belirlenmiştir. Bu deney sisteminin öncelikli olarak kurulma nedeni Infasurf®'ün fibrinojen ile dışarıda etkileşimi sonucu ara yüzey özelliklerini kaybetmesidir. IPL ile fibrinojen çözeltileri karıştırılıp 1 saat kadar beklendikten sonra karışım hava/fosfat tampon yüzeyine yayılmıştır. Yayılma anından itibaren zamanla ölçülen basınç değişimi Şekil 4.57'deki gibidir.





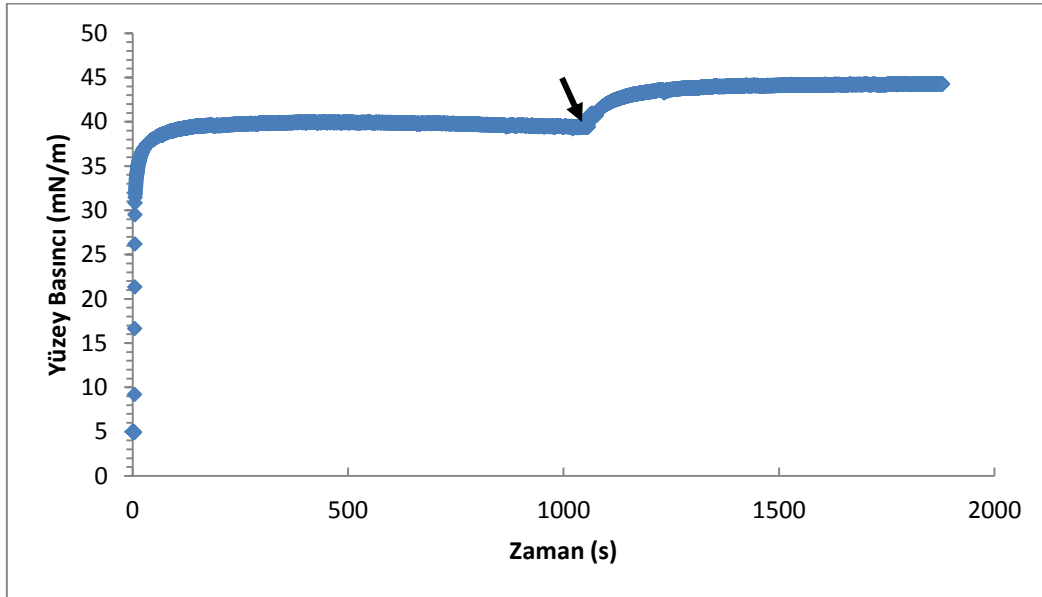
Şekil 4.57 Fosfat tampon fazına 1 saat etkileştirilmiş IPL ile 550 ppm fibrinojen karışımının enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

IPL ve fibrinojenden oluşan karışımın fosfat tampon fazına yayılmasıyla birlikte yüzey basıncı çok hızlı bir şekilde artmış ve yaklaşık 150 saniyede 30 mN/m'ye, 300 saniyede ise 35 mN/m değerine ulaşmıştır. Daha önce elde edilen verilerden IPL için spesifik yüzey basıncının ~45 mN/m olduğu belirlenmiştir. Ara yüzeyin geldiği denge yüzey basıncı 45 mN/m'ye ulaşmasa da elde edilen sonuç, Infasurf® ile fibrinojenin etkileştirildiği durumda elde edilen sonuçtan çok daha iyidir. Infasurf®'lü sistemde Infasurf®'ün ara yüzeyde bulunduğu dair bir sonuç elde edilememiş; yüzey basıncı – zaman izoterminde ara yüzey basıncı 15 mN/m değerinden daha yükseğe çıkamamıştır. Bu sonuç dikkate alındığında fibrinojenin IPL'nin yapısını bozmadığı düşünülmektedir. İki madde etkileştirilip ara yüzeye karışım olarak verildiğinde ulaşılan basınç değeri ara yüzeyde büyük oranda IPL bulunduğunu göstermektedir. Negatif yüklü fibrinojen ile katyonik ve anyonik karakterli iki baş grubuna ve proteinlerin ara yüzeye adsorpsiyonunu oluşturduğu enerji bariyeri ile engelleyebilen PEO zincirine sahip olan IPL'nin etkileşimi, fibrinojenin Infasurf® ile etkileşimi kadar negatif yönde olmamıştır.

### 4.3.3. Üçlü Sistemlerde Ara Yüzey Özelliklerinin ve Etkileşiminin Belirlenmesi

#### 4.3.3.1. Infasurf® Tabakasına Fibrinojen ve IPL'nin Yarışmalı Adsorpsiyonunun İncelenmesi

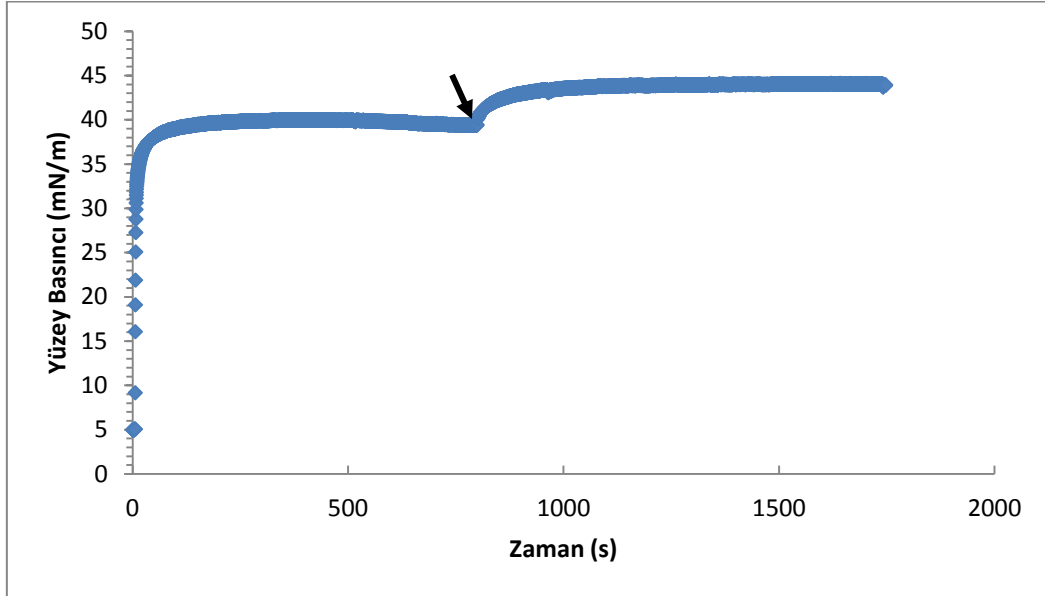
Bu kısımda önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına 550 ppm net konsantrasyonundaki fibrinojen ile iki farklı konsantrasyonda IPL aynı anda enjekte edilmiştir. IPL'nin fibrinojen varlığında Infasurf®'ün yüzey özelliklerinin düzenlenmesi ve geliştirilmesinde kullanılabilirliğinin araştırıldığı bu kısımda ilk olarak Infasurf®'ün içerdiği SP-B proteini miktarı araştırılmış ve 0.0002 mM olarak hesaplanmıştır (Zhang et al., 2011). SP-B akciğer yüzey aktif madde karışımının ara yüzey özelliklerinin düzenlenebilmesi için kritik rol oynayan yüzey aktif bir proteindir. IPL, sahip olduğu yüksek adsorpsiyon hızı, DPPC ile karıştığında kan proteinleri varlığında DPPC'nin ara yüzey özelliklerini iyileştirme gibi özellikleri ile SP-B proteininin bir takım özelliklerini taklit edebilmektedir. Yapılan ilk deneyde, Infasurf® içeriğindeki SP-B miktarı ile eşit konsantrasyonda IPL çözeltisinin etkisi incelenmiştir (Şekil 4.58).



Şekil 4.58 Saf Infasurf tabakasının alt fazına 0.0002 mM IPL ve 550 ppm fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

Ara yüzeye yayılan Infasurf® denge basıncına ulaştıktan sonra fosfat tampon fazına 0.0002 mM IPL ile 550 ppm net konsantrasyondaki fibrinojen yaklaşık 1050. saniyede

aynı anda enjekte edilmiştir. Şekil 4.58’de görüldüğü gibi, enjeksiyon anından itibaren yüzey basıncı artmış ve sistemin dengeye geldiği yüzey basıncı 45 mN/m olarak belirlenmiştir. Bu değer IPL için elde edilen spesifik denge yüzey basıncına eşittir. Fibrinojen ile Infasurf®’ün etkileşimi incelenirken elde edilen yüzey basıncı – zaman izotermelerinde fibrinojenin negatif etkisi gözlenirken, bu sistem için elde edilen yüzey basıncının saf IPL’nin yüzey basıncı ile aynı olması; ara yüzeye fibrinojenin değil, IPL’nin entegre olduğunu göstermektedir. Aynı çalışma IPL konsantrasyonu artırılarak tekrarlanmış ve beklenilene uygun olarak 0.0002 mM IPL derişimi ile aynı sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.59).

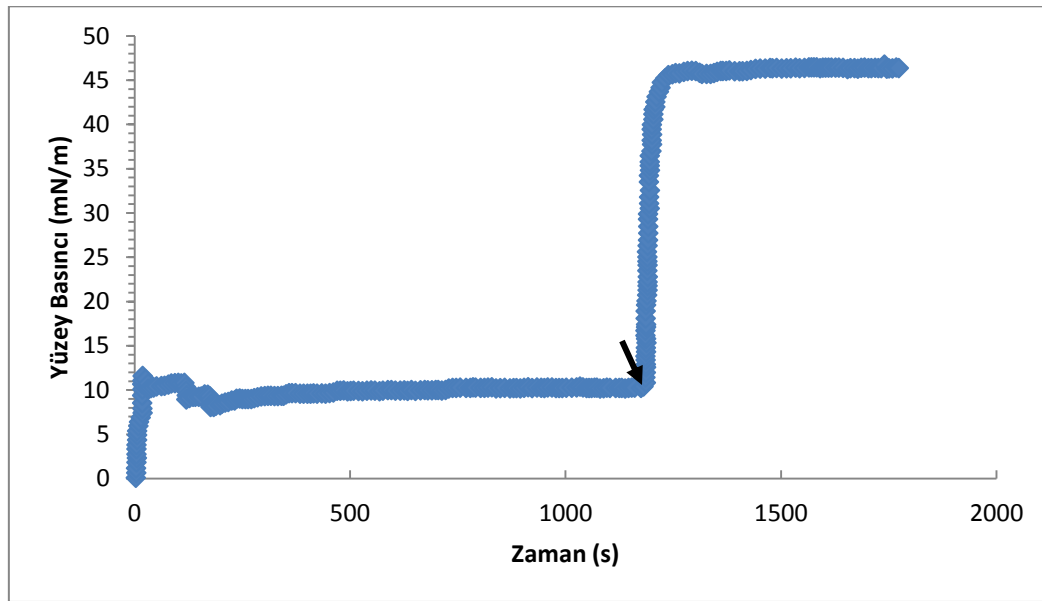


Şekil 4.59 Saf Infasurf tabakasının alt fazına 0.005 mM IPL ve 550 ppm fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

IPL ile fibrinojenin aynı anda Infasurf® tabakasının alt fazına verilmesi sonucu IPL molekülünün baskın olarak ara yüzeye adsorbe olduğu belirlenmiştir. Bir sonraki aşamada ise Infasurf®’ün yapısının bozulduğu tespit edilen durumda, başka bir deyişle Infasurf® ile fibrinojenin dışarıda etkileştirilip hava/fosfat tampon yüzeyine yayıldığı durumda alt faza IPL enjekte edilmiş ve IPL’nin ara yüzeye etkisi incelenmiştir.

#### 4.3.3.2. Önceden Etkileştirilmiş Infasurf®/Fibrinojen Tabakasına IPL Adsorpsiyonunun İncelenmesi

Çalışmanın bu kısmında, fibrinojenin ara yüzeyi bozduğu durumda IPL kullanılarak sistemin ara yüzey özelliklerinin düzenlenebilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla Infasurf® ile fibrinojen 1 saat etkileştirilmiş ve ara yüzeye yayılmıştır (Şekil 4.60). Denge yüzey basıncı daha önce de elde edildiği gibi ara yüzeyin proteinle kaplandığını, Infasurf®'ün inaktive olduğunu göstermektedir. Sistem dengeye ulaştığında yaklaşık 1200. saniyede alt faza IPL enjekte edilmiştir.



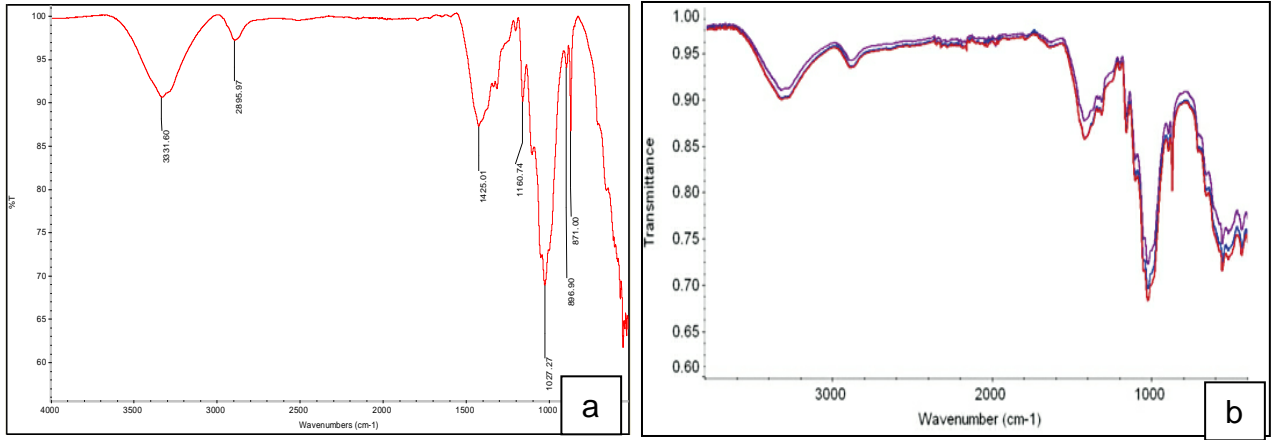
Şekil 4.60 1 saat etkileştirilmiş Infasurf® - fibrinojen karışımının alt fazına IPL enjekte edilmesiyle elde edilen  $\pi$  (mN/m) – zaman (s) izotermi

IPL'nin sisteme enjekte edilmesiyle neredeyse aynı anda ara yüzey basıncı 45 mN/m'ye yükselmiş ve bu değerde sabit kalmıştır. IPL çok hidrofobik bir moleküldür ve ara yüzeye adsorbe olma hızı yapısındaki hidrokarbon ve florokarbon grupları sayesinde yüksektir. IPL bulunduğu ortamda yüzeye çok hızlı bir şekilde adsorbe olabilirken, yapısındaki PEO grubu ve baş gruplarının ara yüzeyde elektrostatik etkileşim ile bir arada bulunmak istemeleri sayesinde fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu önlemektedir.

Elde edilen sonuçlar, IPL'nin Infasurf® ile birlikte kullanılabilirliği açısından önem taşımaktadır. Daha önce elde edilen verilerden, Infasurf®'ün fibrinojen varlığında gösterdiği ara yüzey davranışının, ara yüzeyde Infasurf®'ün saf halde bulunduğu durumdaki gibi olamadığı bilinmektedir. IPL ise fibrinojen varlığında inaktive olmamış ve tam tersine IPL eklendiği ara yüzeylerin yüzey özelliklerini iyileştirmiştir. Tasarlanma ve sentezlenme amacına uygun olarak IPL, ara yüzeyde lipidlerle karışabilmekte, karışma oranına göre yüzey özelliklerini zenginleştirmekte ve fibrinojenin negatif etkilerini gidermektedir. Dolayısıyla IPL'nin ARDS durumunda olduğu gibi kan proteinlerinin yüzey aktif madde karışımının özelliklerini bozduğu sistemlerde kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

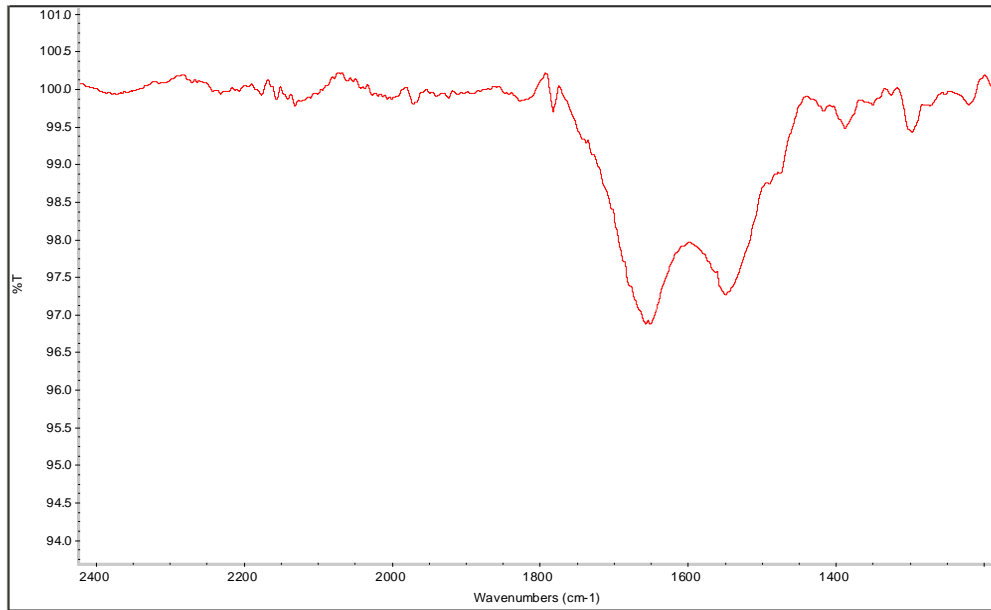
#### **4.4. Ara Yüzeye Adsorbe Olan Fibrinojen Miktarındaki Değişimin Belirlenmesi**

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar incelendiğinde, IPL'nin bulunduğu durumlarda fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunun ortamda Infasurf® ve DPPC'nin bulunduğu durumlara göre belirli ölçüde engellendiği sonucuna varılmıştır. Bu sonucun desteklenebilmesi için LB cihazında oluşturulan ara yüzeyler katı bir yüzeye transfer edilmiş ve kaplanan yüzey FT-IR analizi ile incelenmiştir. LB cihazında ara yüzeyin transfer edileceği madde kağıt olarak seçilmiştir. Bu yöntemle ara yüzeydeki protein varlığı belirleneceği için seçim yapılırken çalışılan yüzeyin yapısında proteinler için spesifik olan Amid I ve Amid II piklerinin bulunmamasına dikkat edilmiştir. Literatürde bu yönde araştırma yapılmış ve kağıt yapısında 1650 cm<sup>-1</sup> ve 1550 cm<sup>-1</sup> dalga boylarında görülen Amid I ve Amid II piklerinin bulunmadığı tespit edilmiştir. FT-IR analizinde kağıt kaplama yöntemi mürekkep yapılarının incelenmesinde de kullanılmaktadır (Feustel et al., 2009). Amid I piki proteinlerin yapısındaki C=O esneme titreşimlerinin varlığını gösterirken, Amid II piki ise N-H bağının bükülme titreşimleri ile ortaya çıkmaktadır. Kaplanacak kağıdın FT-IR analizi yapılmış, Amid I ve II bantlarının görülmediği belirlenmiş ve literatürle uyumluluğu kontrol edildikten sonra oluşturulan ara yüzeylerde kullanılmıştır. Şekil 4.61(a)'da boş kağıt için elde edilen FT-IR spektrumu görülmekte, Şekil 4.61(b)'de ise literatür örneği gösterilmektedir.



Şekil 4.61 (a) Boş kağıt için çalışma kapsamında elde edilen spektrum, (b) literatürde boş kağıt için elde edilen spektrum (Feustel et al., 2009).

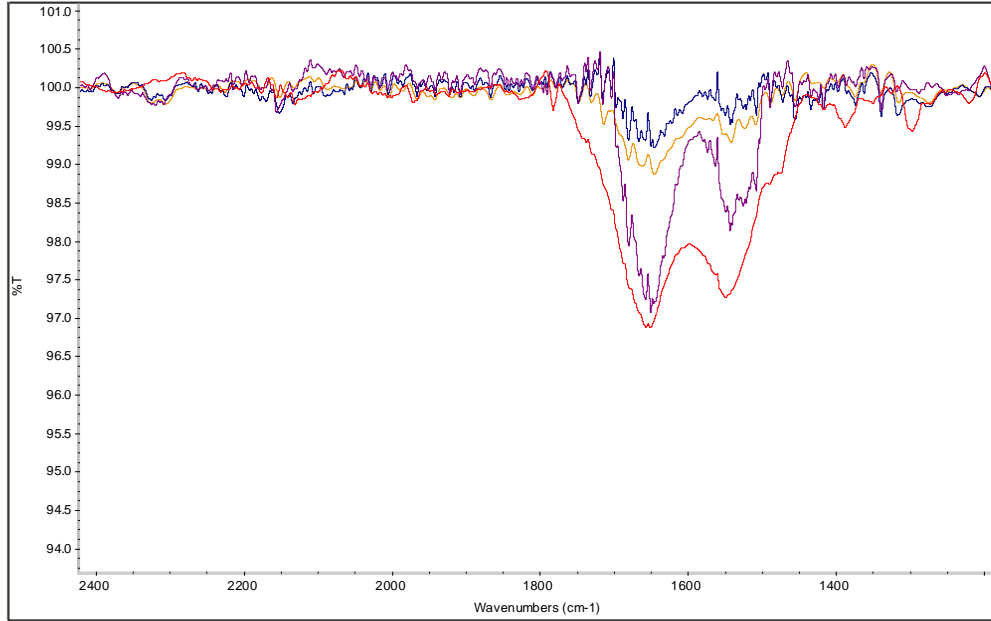
Boş kağıt için elde edilen spektrumun, literatürdeki örneği ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ara yüzeyde protein varlığının belirleyicisi olan Amid I ve Amid II bantlarının bulunduğu kısımda ise herhangi bir pik görülmemektedir. Fibrinojen miktarındaki değişimlerin incelenebilmesi için öncelikle LB cihazında hava/fosfat tampon ara yüzeyine fibrinojen çözeltisi yayılmış ve ara yüzey kağıda transfer edilmiştir. FT-IR analizi sonucunda fibrinojen için elde edilen spektrum Şekil 4.62'teki gibidir.



Şekil 4.62 Fibrinojen için elde edilen FT-IR spektrumu

Elde edilen spektrumda  $1650 \text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki % geçirgenlik değeri ölçülmüş ve ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunduğu durumdaki % geçirgenlik değeri için fibrinojen miktarı %100 olarak kabul edilmiş ve bu değer referans alınmıştır. Bölüm 3.4.5'te anlatılan yöntem kullanılarak saf fibrinojen ara yüzeyde iken %100 olarak kabul edilen miktarın ne kadar azaltıldığı göreceli olarak hesaplanmıştır.

İlk olarak DPPC'nin ara yüzey özelliklerini iyileştirdiği ve ortamda fibrinojen varken ara yüzeyden DPPC'nin kaybını azalttığı belirlenen IPL'nin DPPC ile karışımları incelenmiştir. Molce %90 DPPC - %10 IPL, %80 DPPC - %20 IPL ve %70 DPPC - %30 IPL karışımları ara yüzeyde bulunurken, alt faza fibrinojen enjeksiyonu yapılmış ve sistem dengeye ulaştıktan sonra ara yüzey kağıda transfer edilmiştir. Kaplanan kağıtlar için elde edilen FT-IR spektrumu Şekil 4.63'te gösterilmiştir. Şekil 4.63'te ayrıca ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunurken elde edilen spektrum sunulmuş, böylece ara yüzeydeki fibrinojen miktarları daha verimli bir şekilde karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.63 Ara yüzeyde sadece fibrinojen (---), molce %90 DPPC - %10 IPL (---), %80 DPPC - %20 IPL (---) ve %70 DPPC - %30 IPL (---) karışımları bulunurken, alt faza fibrinojen enjeksiyonu sonucunda elde edilen FT-IR spektrumları

Bu ara yüzeyler için elde edilen spektrumlardan Amid I ve Amid II bantlarının geçirgenlik yüzdesinin karışımdaki IPL oranı arttıkça küçüldüğü görülmektedir. Bu sonuç, daha önceki bölümlerde elde edilen sonuçlarla uyumludur. Çizelge 4.5'te ara yüzeyde saf IPL, saf DPPC, ve farklı mol oranlarındaki DPPC – IPL karışımları bulunurken ara yüzeyde bulunan fibrinojen miktarında, ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunduğu duruma göre % azalma oranları verilmektedir.

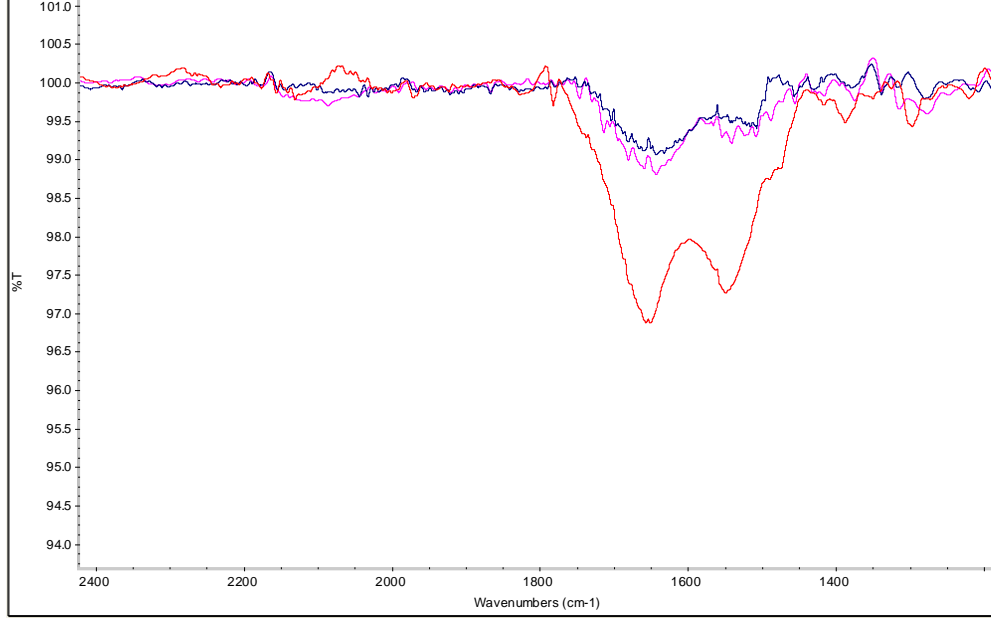
Çizelge 4.5 DPPC, IPL ve farklı mol oranlarında DPPC – IPL karışımları ara yüzeyde bulunurken, ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarındaki değişim

<b>Madde</b>	<b>Fibrinojen miktarında % azalma</b>
<b>DPPC</b>	7
<b>Molce %90 DPPC - %10 IPL karışımı</b>	19
<b>Molce %80 DPPC - %20 IPL karışımı</b>	73
<b>Molce %70 DPPC - %30 IPL karışımı</b>	79
<b>IPL</b>	86

Bölüm 4.4.1'de elde edilen izotermlerden de tespit edildiği gibi, IPL'nin ara yüzeyde bulunması sonucu ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarında önemli ölçüde azalma görülmektedir. Bu sonuç hem deney sistemlerinin birbirini desteklemesi açısından, hem de kan proteinlerinden fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonun azaltılması açısından önemli bir sonuçtur.

Infasurf® ara yüzeyde bulunurken alt faza fibrinojen enjekte edildiği durumda ve bu duruma ters olarak ara yüzeyde fibrinojen bulunurken alt faza Infasurf® enjeksiyonu yapıldığı durum için de kaplama yapılmış ve elde edilen FT-IR spektrumları Şekil 4.64'te sunulmuştur.



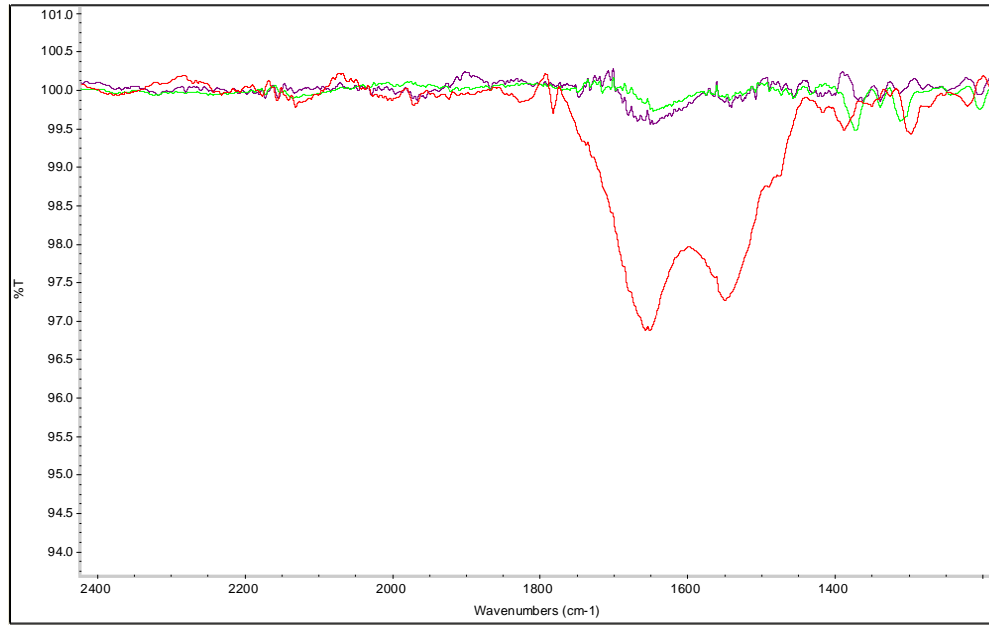


Şekil 4.64 Ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunurken (---), fibrinojen alt fazına Infasurf® enjeksiyonu (- - -), Infasurf® alt fazına fibrinojen enjeksiyonu (- - -) sonucunda elde edilen FT-IR spektrumları

Şekil 4.64'te görüldüğü gibi ara yüzeyde fibrinojen bulunurken alt faza Infasurf® enjekte edildiğinde ara yüzeydeki fibrinojen miktarı, ara yüzeyde Infasurf® bulunurken alt faza fibrinojen enjekte edildiği durumdan daha fazladır. Bu sonuç LB cihazı ile elde edilen izotermilerle uyum göstermekte ve beklentilere uymaktadır. Ara yüzeyde önceden oluşturulmuş fibrinojen tabakası varken, Infasurf® veziküllerinin açılarak ara yüzeye adsorbe olması ve ara yüzeydeki fibrinojen miktarını azaltması daha zordur. Ancak ara yüzeyde Infasurf® tabakası bulunurken alt faza fibrinojen enjekte edildiğinde ara yüzeye adsorbe olabilen fibrinojen miktarı %74 oranında azalmıştır. Bu azalma oranı, ara yüzeyde molce %80 DPPC - %20 IPL ve %70 DPPC - %30 IPL karışımları bulunurken alt faza fibrinojen enjekte edildiğinde görülen azalma oranlarına çok yakındır. Bu durum, IPL'nin kan proteinleri üzerindeki etkisini desteklemektedir. Ayrıca ara yüzeyde Infasurf®'ün içerdiği SP-B miktarı kadar (0.0002 mM) IPL bulunduğu durumda ara yüzeyde sadece fibrinojen olduğu duruma göre adsorbe olabilen fibrinojen miktarında yaklaşık % 78 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu azalma oranı, Infasurf® tabakasının alt fazına fibrinojen enjekte edildiğinde ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarındaki azalmadan daha fazladır.

Dolayısıyla, ortamda fibrinojen bulunurken Infasurf®'ün özelliklerinin iyileştirilmesinde IPL'nin kullanım olasılığı bulunmaktadır.

Bu amaçla Bölüm 4.3.3.1'de önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına fibrinojen ve IPL'nin yarışmalı adsorpsiyon davranışı incelenmiş ve elde edilen sonuçlar, IPL'nin ara yüzeye adsorbe olabilirken fibrinojenin ise olamadığı yönünde değerlendirilmiştir. IPL'nin bu özelliğine zıt olarak, ara yüzeyde sadece Infasurf® bulunurken alt faza fibrinojen enjekte edildiğinde yüzey basıncında azalma görülmüş ve döngüsel davranışta da Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerinin bozulduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın bu kısmında da IPL'nin ara yüzeye pozitif etkisi olduğu sonucunun desteklenmesi amacıyla aynı deney sistemi oluşturulmuş ve ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarlarındaki azalma belirlenmiştir. 2 farklı IPL konsantrasyonunda tekrarlanan ve kurulan ara yüzeylerin kağıda transfer edilmesi sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.65'te sunulmuştur.



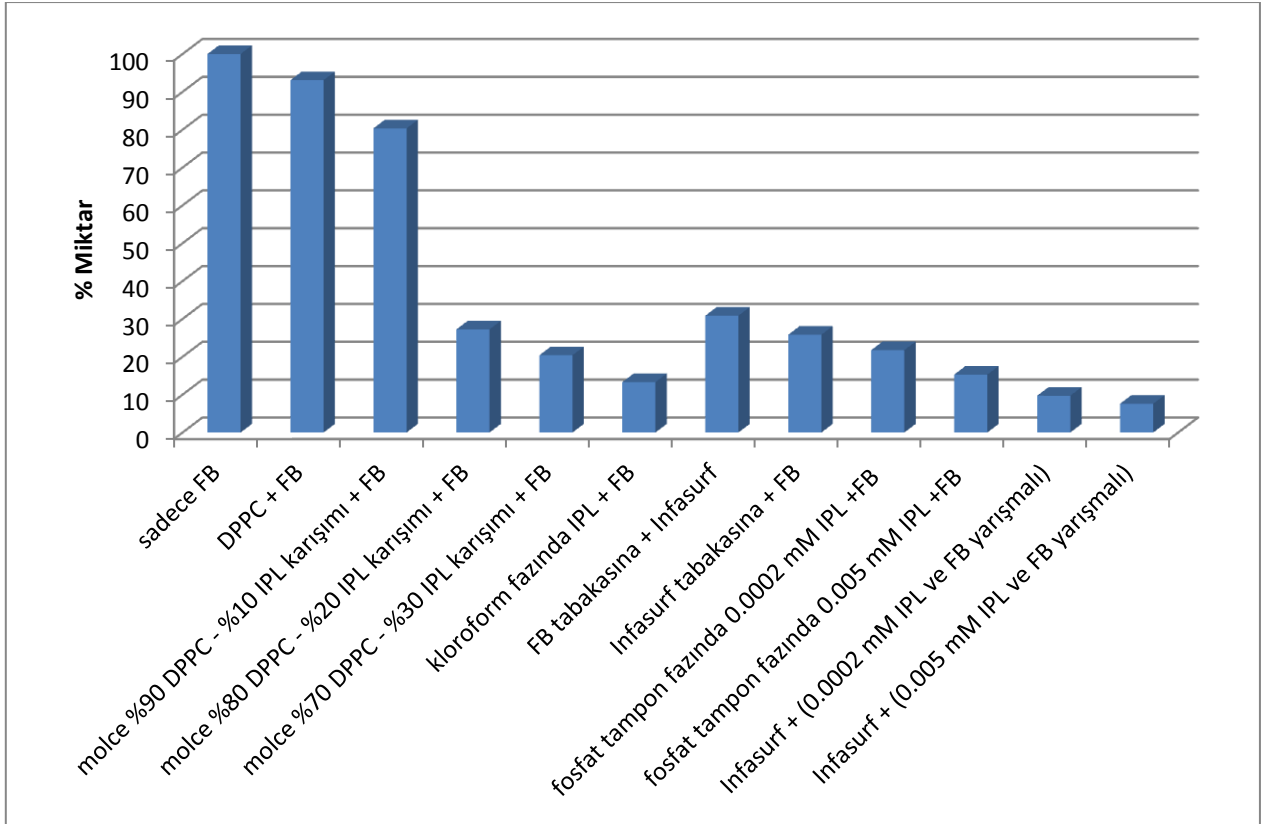
Şekil 4.65 Ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunurken (---), önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına yarışmalı olarak 0.005 mM IPL ve fibrinojen enjekte edilmesi sonucunda (---), önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakasının alt fazına yarışmalı olarak 0.0002 mM IPL ve fibrinojen enjekte edilmesi sonucunda (---) elde edilen FT-IR spektrumları

Elde edilen % geçirgenlik değerlerinin 0.005 mM ve 0.0002 mM konsantrasyonlarındaki IPL için çok az değiştiği görülmektedir. Bu durum, IPL'nin düşük konsantrasyonda bile ara yüzeyde baskın olduğunun göstergesidir. Çizelge 4.6'da kurulan bu deney sistemi için elde edilen sonuçlar listelenmiştir.

Çizelge 4.6 Ara yüzeyde Infasurf® bulunurken alt faza IPL ve fibrinojenin aynı anda enjekte edilmesiyle ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarındaki değişim

<b>Madde</b>	<b>Fibrinojen miktarındaki % azalma</b>
<b>Infasurf® tabakasının alt fazına fibrinojen enjeksiyonu</b>	74
<b>Infasurf® tabakasının alt fazına 0.0002 mM IPL ile fibrinojenin aynı anda enjeksiyonu</b>	90
<b>Infasurf® tabakasının alt fazına 0.005 mM IPL ile fibrinojenin aynı anda enjeksiyonu</b>	92

Çizelge 4.6'dan, ara yüzeyde saf Infasurf® bulunduğunda ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarında %74 oranında bir azalma olduğu ancak, IPL ile fibrinojenin alt faza aynı anda enjekte edilmesi durumunda ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarının önemli derecede azaltıldığı görülmektedir. IPL konsantrasyonunun 0.0002 mM olduğu durumda ara yüzeydeki protein miktarı, ara yüzeyde sadece fibrinojen bulunduğu duruma göre yaklaşık %90 oranında azaltılabilişken, konsantrasyonun 0.005 mM olduğu durumda bu oran %92'ye ulaşmıştır. Diğer bölümlerde alınan sonuçlara uygun olarak bu bölümde de IPL'nin, fibrinojen proteininin ara yüzeye ara yüzeye adsorbe olmasını kısmi olarak engellediği sonucuna varılmıştır. Şekil 4.66'da çalışma kapsamında ara yüzeyde bulunan fibrinojen miktarındaki değişimin belirlenmesi için oluşturulan bütün deney sistemleri ve sonuçları bir arada görülmektedir.



Şekil 4.66 FT-IR analizi ile incelenen deney sistemleri ve ara yüzeydeki % fibrinojen miktarları

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, IPL'nin kullanıldığı her durumda, % fibrinojen miktarının IPL'siz duruma göre azaldığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Elde edilen sonuçlar, IPL'nin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu engellemek amacıyla kullanılabilir nitelikte bir molekül olduğunu bir kere daha göstermektedir. Ayrıca ara yüzeyde saf Infasurf® bulunurken alt fazdan fibrinojen enjekte edildiği durumda ara yüzeydeki fibrinojen miktarı, ara yüzeyde sadece düşük konsantrasyonda IPL'nin (0.0002 mM) bulunduğu duruma göre daha yüksektir. IPL'nin bu konsantrasyonu, daha önce belirtildiği gibi Infasurf®'ün içeriğindeki SP-B proteini ile aynı miktardadır ve bu miktarda bile ara yüzeye hızlıca adsorbe olarak ara yüzeyde baskın hale gelmekte ve adsorbe olduğu ara yüzeyin özelliklerinin geliştirmektedir. Dolayısıyla yapılan bu çalışma ile IPL'nin kan proteinlerinin ara yüzeye adsorpsiyonunun engellenmesi amacıyla tek başına ya da Infasurf® ile birlikte kullanılma potansiyelinin bulunduğu belirlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR

Günümüzde kesin bir tedavisi bulunmayan ve ölüm oranının ~ %40 olduğu ARDS hastalığına karşı beklenen tedavi sentetik surfaktantların kullanılmasıdır. Yapılan çalışma kapsamında özel tasarlanmış hibrit yüzey aktif maddesi, IPL, yapısındaki florokarbon – hidrokarbon kuyruk grupları, katyonik ve anyonik baş grupları ve PEO zinciri ile kan proteinleri arasında en güçlü inhibitör olan fibrinojen ile yarışmalı adsorpsiyona girebilmesi ve fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu engellemesi amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca ARDS nedenlerinden biri olan surfaktant inaktivasyonuna karşı IPL'nin gösterdiği ara yüzey özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra, onun tek başına ya da doğal akciğer yüzey aktif maddesi olan Infasurf® ile kullanılabilirliği de incelenmiştir. Bu amaçlarla yapılan çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar listelenmiştir:

- Çalışmada kullanılan IPL molekülünün sulu fazda ve organik fazda dağılım özelliği incelenmiş ve kloroform fazından fosfat tampon fazına dağılım katsayısı 4.48 olarak belirlenmiştir. Bu özellikten yararlanılarak IPL'nin fosfat tampon fazındaki fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunun önlenebileceği tespit edilmiştir. Dağılım etkisinin görülmediği deney sistemi için IPL'nin adsorpsiyon hızının yüksek olduğu ve yüzey gerilimini etkin bir biçimde düşürebildiği belirlenmiştir. IPL'nin suda çözünbilme özelliği sayesinde dinamik adsorpsiyon davranışı sulu fazdan da belirlenmiş ve IPL'nin ara yüzeye hızlı bir şekilde adsorbe olarak yüzey gerilimini kısa sürede dengeye getirdiği görülmüştür.
- DPPC – IPL karışımlarının dinamik adsorpsiyon sonuçlarına göre, karışımdaki IPL miktarı arttırıldıkça yüzey geriliminin düşüş hızı artmakta ve ara yüzeyin dengeye ulaşma süresi kısalmaktadır. Bu özelliği ile IPL'nin adsorpsiyon hızının kan proteinlerine göre yavaş olduğu bilinen akciğer yüzey aktif madde karışımının hızlandırılmasında kullanılabileceği düşünülmektedir.
- RDS tedavisinde etkin olarak kullanılan doğal akciğer yüzey aktif madde karışımı Infasurf®'ün çalışma kapsamında kullanılacak konsantrasyonu 0.026

mg/mL olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyonda IPL ile karşılaştırıldığında IPL'nin Infasurf®'ten daha kısa sürede dengeye geldiği görülmüştür. Hem fosfat tampon/kloroform ara yüzeyinde, hem de hava/sıvı ara yüzeyinde kısa ve uzun zamanlı dinamik adsorpsiyon davranışları incelenmiştir. IPL'nin fosfat tampon/kloroform ara yüzeyindeki difüzyon katsayısı  $6.45 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak hesaplanırken, Infasurf® için bu değer  $8.10 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 'dir. İki madde arasında yaklaşık 80 katlık bir fark bulunmakta ve bu fark kısa zaman aralığı için moleküllerin adsorpsiyon davranışları arasındaki farklılığı açıklamaktadır.

- Hava/sıvı ara yüzeyinde kısa zamanlar için IPL'nin difüzyon katsayısı  $1.10 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak belirlenirken, Infasurf® için bu değer  $1.48 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  olarak bulunmuştur. Bu ara yüzeyde de iki maddenin difüzyon katsayıları arasında 85 katlık bir fark tespit edilmiştir. Maddelerin uzun zamanlı dinamik adsorpsiyon davranışları da incelenmiş, ve iki madde için de uzun ve kısa zamanlı difüzyon katsayılarında çok büyük bir fark görülmemiştir. Bu durum adsorpsiyon bariyerinin de küçük olduğu anlamına gelmektedir. Adsorpsiyon bariyeri IPL için  $0.04 \text{ kJ/mol}$ , Infasurf® için  $0.06 \text{ kJ/mol}$  olarak belirlenmiş ve bu değerlerle IPL ve Infasurf®'ün difüzyon kontrollü adsorpsiyon modeline uydukları görülmüştür.
- Fibrinojenin etkisinin anlaşılabilmesi amacıyla fibrinojen proteini için dinamik davranış incelenmiştir. Düşük konsantrasyonlu çözeltilerde (1 – 10 ppm) indüksiyon periyodu gözlenirken, konsantrasyon 25 ppm ile 100 ppm arasındayken indüksiyon periyodunun kısaldığı; 100 ppm'den sonra ise tamamen kaybolarak yüzey geriliminin aynı değerde dengeye geldiği tespit edilmiştir.
- Askıda damla tekniği ile DPPC ve fibrinojenin etkileşimi incelenmiş ve ara yüzeyde dengeye gelmiş DPPC tabakası bulunurken fosfat tampon fazına fibrinojen enjekte edildiğinde fibrinojenin ara yüzey davranışının DPPC'ye göre baskın olduğu görülmüştür.

- Kloroform fazından fosfat tampon/kloroform ara yüzeyine adsorbe olan ve dengeye gelen IPL molekülü için, küvette son konsantrasyonu 10, 50 ve 100 ppm olacak şekilde fibrinojen enjekte edildiğinde her konsantrasyon için IPL'nin fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunu geciktirdiği belirlenmiştir.
- DPPC – IPL karışımları için, en etkili sonuç molce %80 DPPC - %20 IPL oranında elde edilmiştir. Bu karışım oranı için, 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen çözeltisinin ara yüzeye adsorpsiyonu ~46 saniye geciktirilmişken, 100 ppm için ~6 saniyelik bir gecikme tespit edilmiştir.
- IPL'nin fosfat tampon fazından ara yüzeye adsorbe olduğu sistem için kullanılan her fibrinojen konsantrasyonu için IPL'nin fibrinojen adsorpsiyonunu yavaşlattığını görülmüştür. Yarışmalı adsorpsiyonun modellenmesi sonucunda IPL'nin 10 ve 50 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojene göre ara yüzeyde baskın olduğu belirlenmiş, 100 ppm'lik derişim için ise kısmi olarak etki göstermiştir.
- Fibrinojenin Infasurf®'ün dinamik adsorpsiyon özellikleri üzerindeki etkisi IPL'de olduğu gibi iki farklı sistem kurularak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar IPL'nin 50 ve 100 ppm fibrinojen konsantrasyonunda surfaktant inaktivasyonuna karşı Infasurf®'ten çok daha etkili sonuç verdiği görülmüştür.
- Akciğer ara yüzey modellerinin ara yüzey özellikleri Langmuir – Blodgett cihazı ile incelenmiştir. DPPC tabakasının alt fazına 550 ppm son konsantrasyonundaki fibrinojen enjekte edildiğinde fibrinojenin DPPC'nin ara yüzey özelliklerini bozarak, yüzeyden lipid kaybına yol açtığı tespit edilmiştir. Saf IPL tabakası için elde edilen sonuçlar IPL'nin ara yüzeyde bulunurken adsorbe olan fibrinojen miktarını azalttığını göstermektedir. DPPC – IPL karışımları için, askıda damla ile elde edilen deney sonuçlarına paralel olarak en iyi sonuca molce %80 DPPC - %20 IPL karışımı ile ulaşıldığı görülmüş, bu karışım oranında ortamdaki fibrinojenin, karışımın döngüsel davranışını etkileyemediği anlaşılmıştır.

- Infasurf® ile fibrinojenin hava/sıvı ara yüzeyindeki etkileşimleri farklı sistemler oluşturularak incelenmiştir. Bu sistemlerin hepsinde Infasurf®'ün ara yüzey özelliklerinin ve döngüsel davranışının ortamdaki fibrinojen varlığından negatif olarak etkilendiği belirlenmiştir. Ayrıca Infasurf® ile fibrinojenin 1 saat etkileştirilip bu karışımın ara yüzeye enjekte edilmesiyle elde edilen izotermelerden, fibrinojenin Infasurf®'ün yapısını bozarak onu inaktive ettiği tespit edilmiştir.
- IPL ile fibrinojen dışarıda etkileştirilip ara yüzeye yayıldığında elde edilen sonuç Infasurf® ile fibrinojenin etkileştirildiği durumda elde edilen sonuçtan çok daha iyidir. IPL ile fibrinojen etkileştirilip ara yüzeye karışım olarak verildiğinde ulaşılan basınç değeri ara yüzeyde büyük oranda IPL bulunduğunu göstermektedir. IPL'nin bulunduğu durumlarda fibrinojenin ara yüzeye adsorpsiyonunun ortamda Infasurf® ve DPPC'nin bulunduğu durumlara göre belirli ölçüde engellendiği sonucuna varılmıştır.
- IPL tabakasının alt fazına fibrinojen enjekte edilmesi sonucunda fibrinojen miktarı, normal koşullarda boş ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarına göre yaklaşık %86 oranında azaltılmıştır. DPPC-IPL karışımları için ara yüzeydeki % fibrinojen miktarı IPL oranı arttıkça azalmaktadır.
- Ara yüzeyde önceden oluşturulmuş Infasurf® tabakası bulunurken alt faza fibrinojen enjekte edildiğinde, ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarında %74 oranında bir azalma belirlenmiş iken, IPL'nin fibrinojen ile beraber alt faza enjekte edildiği durumda, 0.0002 mM IPL konsantrasyonu için, boş ara yüzeye adsorbe olan fibrinojen miktarına göre %90, 0.005 mM IPL için ise bu oran %92'ye ulaşmıştır. Oluşturulan ara yüzeylerin FT-IR ile analiz edilmesi sonucunda IPL'nin kullanıldığı her ara yüzeyde, % fibrinojen miktarının IPL'siz duruma göre azaldığı sonucu ortaya çıkmaktadır.
- Yapılan bu çalışma ile IPL'nin kan proteinlerinin ara yüzeye dinamik adsorpsiyonunun engellenmesi amacıyla tek başına ya da Infasurf® ile birlikte kullanılma potansiyelinin bulunduğu belirlenmiştir.



## KAYNAKLAR

- Alexandrov, S., Todorov, R., Jordanova, A., Lalchev, Z., Exerowa, D., 2009, Inactivation of pulmonary surfactant by lysophosphatidylcholine, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 23, 684 – 687
- Alonso, C., Bringezu, F., Brezensinski, G., Waring, A.J., Zasadzinski, J.A., 2005, Modifying calf lung surfactant by hexadecanol, *Langmuir*, 21, 1028 – 1035
- Aptel, J.D., Voegel, J.C., Schmitt, A., 1988, Adsorption kinetics of proteins onto solid surfaces in the limit of the interfacial interaction control, *Colloids and Surfaces*, 29, 359 – 371
- Aydogan, N., Uslu, B., Tanaci, H., 2011, Biophysical investigation of the interfacial properties of cationic fluorocarbon/hydrocarbon hybrid surfactant: Mimicking the lung surfactant protein C, *Journal of Colloid and Interface Science*, 360, 163 – 174
- Banerjee, B., Bellare, J.R., 2001, Scoring of surface parameters of physiological relevance to surfactant therapy in Respiratory Distress Syndrome, *Journal of Applied Physiology*, 90, 1447 – 1454
- Bastacky, J., Lee, C.Y., Goerke, J., Koushafar, H., Yager, D., Kenaga, L., Speed, T.P., Chen, Y., Clements J.A., 1995, Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung, *Journal of Applied Physiology*, 79, 1615 – 1628
- Bernhard, W., Mottaghian, J., Gebert, A., Rau, G.A., von der Hardt, H., Poets, C.F., 2000, Commercial versus native surfactants surface activity, Molecular Components, and the Effect of Calcium, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 1524 – 1533
- Beers, M.F., Lomax, C.A., Russo, S.J., 1998, Synthetic processing of surfactant protein C by alveolar epithelial cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 15287 – 15293
- Bloom, B.T., Kattwinkel, J., Hall, R.T., Delmore, P.M., Egan, E.A., Trout, J.R., Malloy, M.H., Brown, D.R., Holzman, I.R., Coghill, C.H., Carlo, W.A., Pramanik, A.K., McCaffree, M., Toubas, P.L., Laudert, S., Gratny, L.L., Weatherstone, K.B., Seguin, J.H., Willett, L.D., Gutcher, G.R., Mueller, D.H., Topper, W.H., 1997, Comparison of infasurf (calf lung surfactant extract) to survanta (beractant) in the treatment and prevention of Respiratory Distress Syndrome, *Pediatrics*, 100, 31 – 38

- Blanco, O., Perez – Gil, J., 2007, Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: Role of the different components in an efficient pulmonary surfactant, *European Journal of Pharmacology*, 568, 1 – 15
- Butt, H.J., Graf, K., Kappl M., 2003, *Physics and Chemistry of Interfaces*, Wiley – VCH
- Butt, H.J., Kappl M., 2010, *Surface and Interfacial Forces*, Wiley – VCH
- Camacho, L., Cruz, A., Castro, R., Casals, C., Perez – Gil, J., 1996, Effect of pH on the interfacial adsorption activity of pulmonary surfactant, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5, 271 – 277
- Catanoiu, G., Carey, E., Patil, S.R., Engelkirchen, S., Stubenrauch, C., 2011, Partition coefficients of nonionic surfactants in water/*n*-alkane systems, *Journal of Colloid and Interface Science*, 355, 150 – 156
- Creuwels, L.A.J.M., van Golde, L.M.G., Haagsman, H.P., 1997, The pulmonary surfactant system: Biochemical and Clinical Aspects, *Lung*, 175, 1 – 39
- Crouch, E., Wright J.R., 2001, Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense, *Annual Review of Physiology*, 63, 521 – 554
- Curley, A.E., Halliday, H.L., 2001, The present status of exogenous surfactant for the newborn, *Early Human Development*, 61, 67 – 83
- Daniels, C.B., Orgeig, S., 2003, Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing, *News in Physiological Sciences*, 18, 151 – 157
- del Rio, O.I., Neumann, A.W., 1997, Axisymmetric drop shape analysis: computational methods for the measurement of interfacial properties from the shape and dimensions of pendant and sessile drops, *Journal of Colloid and Interface Science*, 196, 136 – 147
- deMello, E.D., Heyman, S., Phelps, D.S., Floros, J., 1993, Immunogold localization of sp-a in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome, *American Journal of Pathology*, 142, 1631 – 1640
- Eastoe, J., Dalton, J.S., Rogueda, P.G.A., Crooks, E.R., Pitt, A.R., Simister, E.A., 1997, Dynamic surface tensions of nonionic surfactant solutions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 188, 423 – 430
- Eastoe, J., Dalton, J.S., 2000, Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air-water interface, *Advances in Colloid and Interface Science*, 85, 103 – 144

- Fainerman, V.B., Zholob, S.A., Miller, R., 1997, Adsorption kinetics of oxyethylated polyglycol ethers at the water – nonane interface, *Langmuir*, 13, 283 – 289
- Fainerman, V.B., Möbius, D., Miller, R., 2001, *Surfactants: Chemistry, Interfacial Properties, Applications*, Elsevier, Amsterdam, 13, 661 p.
- Fan, Q., Wang, Y.E., Zhao, X., Loo, J.S.C., Zuo, Y.Y., 2011, adverse biophysical effects of hydroxyapatite nanoparticles on natural pulmonary surfactant, *ACS Nano*, 5, 6410 – 6416
- Ferrari, M., Liggieri, L., Ravera, F., Amodio, C., Miller, R., 1997, Adsorption kinetics of alkylphosphine oxides at water/hexane interface, *Journal of Colloid and Interface Science*, 186, 40 – 45
- Ferri, J.K., Stebe, K.J., 2000, Which surfactants reduce surface tension faster? A scaling argument for diffusion-controlled adsorption, *Advances in Colloid and Interface Science*, 85, 61 – 97
- Fernsler, J.G., Zasadzinski, J.A., 2009, Competitive adsorption: a physical model for lung surfactant inactivation, *Langmuir*, 25, 8131 – 8143
- Feustel, M., Briggs, J.L., 2009, Rapid analysis of inks on paper by viewing FT-IR-ATR spectroscopy, *Spectroscopy*. <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/FT-IR+Spectroscopy/Rapid-Analysis-of-Inks-on-Paper-by-Viewing-FT-IRnd/ArticleStandard/Article/detail/618830>
- Frerking, I., Günther, A., Seeger, W., Pison, U., 2001, pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options, *Intensive Care Med.*, 27, 1699 – 1717
- Fuchimukai, T., Fujiwara, T., Takahashi, A., Enhorning, G., 1987, Artificial pulmonary surfactant inhibited by proteins, *Journal of Applied Physiology*, 62, 429 – 437
- Garber, B.G., Hebert, P.C., Yelle, J.D., Hodder, R.V., McGowan, J., 1996, Adult respiratory distress syndrome: a systemic overview of incidence and risk factors, *Critical Care Medicine*, 24, 687 – 695
- Gente, G., La Mesa, C., Muzzalupo, R., Ranieri, G.A., 2000, micelle formation and phase equilibria in a water – trifluoroethanol – fluorocarbon surfactant system, *Langmuir*, 16, 7914 – 7919
- Glasser, J.R., Mallampalli, R.M., 2012, Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection, *Microbes and Infection*, 14, 17 – 25
- Gregory, T.J., Longmore, W.J., Moxley, M.A., Whitsett, J.A., Reed, C.R., Fowler, A.A., Hudson, L.D., Maunder, R.J., Crim, C., Hyers, T.M., 1991, Surfactant chemical composition and biophysical activity in Acute Respiratory Distress Syndrome, *J. Clin. Invest.*, 88, 1976 – 1981

- Gupta M., Hernandez-Juviel, J.M., Waring, A.J., Bruni, R., Walther, F.J., 2000, Comparison of functional efficacy of surfactant protein B analogues in lavaged rats, *European Respiratory Journal*, 16, 1129 – 1133
- Günther A., Ruppert, C., Schmidt, R., Markart, P., Grimminger, F., Walmrath, D., Seeger, W., 2001, Surfactant alteration and replacement in Acute Respiratory Distress Syndrome, *Respiratory Research*, 2, 353 – 364
- Hernandez, E.M., Franses, E.I., 2003, Adsorption and surface tension of fibrinogen at the air/water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 214, 249 – 262
- Haagsman, H.P., Diemel R.V., 2001, Surfactant-associated proteins: functions and structural variation, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129, 91 – 108
- Haitsima, J.J., Lachmann, U., Lachmann, B., 2001, Exogenous surfactant as a drug delivery agent, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 197 – 207
- Hall S.B., Venkitaraman, A.R., Whitsett, J.A., Holm, B.A., Notter, R.H., 1992, Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 145, 24 – 30
- Halter, J.M., Steinberg, J.M., Gatto, L.A., DiRocco, J.D., Pavone, L.A., Schiller, H.J., Albert, S., Lee, H., Carney, D., Nieman, G.F., 2007, Effect of positive end-expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability, *Critical Care*, 11, R20
- He, Q., Zhang, Y., Lu, G., Miller, R., Möhwald, H., Li, J., Dynamic adsorption and characterization of phospholipid and mixed phospholipid/protein layers at liquid/liquid interfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, 140, 67 – 76
- Hernandez, E.M., Phang, T., Wen, X., Franses, E.I., 2002, Adsorption and direct probing of fibrinogen and sodium myristate at the air/water interface, *Journal of Colloid and Interface Science*, 250, 271 – 280
- Hernandez, E.M., Franses, E.I., 2003, Adsorption and surface tension of fibrinogen at the air/water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 214, 249 – 262
- Holter, J.F., Weiland, J.E., Pacht, E.R., Gadek, J.E., Davis, W.B., 1986, Protein permeability in the Adult Respiratory Distress Syndrome, *Journal of Clinical Investigation*, 78, 1513 – 1522
- Hofmann, A.F., Mysels, K.J., 1987, Bile salts as biological surfactants, *Colloids and Surfaces*, 30, 145 – 173

- Ikegami, M., Jobe, A., Surfactant protein C in ventilated premature lamb lung, *Pediatric Research*, 1998, 44, 860 – 864
- Ishizaka, A., Matsuda, T., Albertine, K.H., Koh, H., Tasaka, S., Hasegawa, N., Kohno, N., Kotani, T., Morisaki, H., Takeda, J., Nakamura, M., Fang, X., Martin, T.R., Matthay, M.A., Hashimoto, S., 2004, Elevation of KL-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286, 1088 – 1094
- Javadi, A., Mucic, N., Vollhardt, D., Fainerman, V.B., Miller, R., 2010, Effects of dodecanol on the adsorption kinetics of SDS at the water-hexane interface, *Journal of Colloid and Interface Science*, 351, 537 – 541
- Jiang, R., Ma, Y., Zhao, J., 2006, Adsorption dynamics of binary mixture of Gemini surfactant and opposite-charged conventional surfactant in aqueous solution, *Journal of Colloid and Interface Science*, 297, 412 – 418
- Keough, K.M.W., Parsons, C.S., Phang, P.T., Tweeddale, M.G., 1988, Interactions between plasma proteins and pulmonary surfactant: surface balance studies, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 66, 1166 – 1173
- Keough, K.M.W., Perez – Gil, J., 1998, Interfacial properties of surfactant proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408, 203 – 217
- Kim, S.H., Haimovich – Caspi, L., Omer, L., Yu, C., Talmon, Y., Wang, N.L., Franses, E.I., 2007, Stability and state of aggregation of aqueous fibrinogen and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid vesicles, *Langmuir*, 23, 5657 – 5664
- Kim, S.H., Franses, E.I., 2006, Competitive adsorption of fibrinogen and dipalmitoylphosphatidylcholine at the air/aqueous interface, *Journal of Colloid and Interface Science*, 295, 84 – 92
- Korfhagen T.R., Bruno, M.D., Ross, G.F., Huelsman, K.M., Ikegami, M., Jobe, A.H., Wert, S.E., Stripp, B.R., Morris, R.E., Glasser, S.W., Bachurski, C.J., Iwamoto, H.S., Whitsett, J.A., 1996, Altered surfactant function and structure in SP – A gene targeted mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93, 9594 – 9599
- Kuo, R.R., Chang, C.H., Yang, Y.M., Maa, J.R., 2003, Induced removal of dipalmitoyl phosphatidylcholine by the exclusion of fibrinogen from compressed monolayers at air/liquid interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 257, 108 – 115
- Lacaze-Masmonteil, T., 2003, Exogenous surfactant therapy: newer developments, *Seminars in Neonatology*, 8, 433 – 440

- Lalchev, Z., Georgiev, G., Jordanova, A., Todorov, R., Christova, E., Vassilieff, C.S., 2004, A comparative study of exogenous surfactant preparations and tracheal aspirate: interfacial tensiometry and properties of foam films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33, 227 – 234
- Lee, K.Y.C., Gopal, A., von Nahmen, A., Zasadzinski, J.A., Majewski, J., Smith, G.S., Howes, P.B., Kjaer, K., 2002, Influence on palmitic acid and hexadecanol on the phase transition temperature and molecular packing of dipalmitoylphosphatidyl-choline monolayers at the air-water interface, *Journal of Chemical Physics*, 116, 774 – 783
- Lehmler, H.J., Bummer, P.M., 2005, Interaction of a partially fluorinated long chain nicotinate with dipalmitoylphosphatidylcholine, *Journal of Lipid Research*, 46, 2415 – 2422
- Lewis, J.F., Veldhuizen, R.A.W., 2006, The future of surfactant therapy during ALI/ARDS, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 27, 377 – 388
- Li, J., Chen, H., Wu, J., Zhao, J., Miller, R., 1999, The structure and dynamic properties of mixed adsorption and penetration layers of  $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine/ $\beta$ -lactoglobulin at water/fluid interfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 15, 289 – 295
- Liu, G., Chen, Y., Zhang, G., Yang, S., 2007, Protein resistance of (ethylene oxide)<sub>n</sub> monolayers at the air/water interface: effects of packing density and chain length, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9, 6073 – 6082
- Lu, K.W., Taeusch, H.W., Robertson, B., Goerke, J., Clements, J.A., 2000, Polymer – surfactant treatment of meconium-induced acute lung injury, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162, 623 – 628
- Lyra, P.P.R., Diniz, E.M.A., 2007, The importance of surfactant on the development of neonatal pulmonary diseases, *Clinics*, 62, 90 – 181
- McCabe, A.J., Duncan, T.W., Holm, B.A. and Glick, P.L., 2000, Surfactant – A review for pediatric surgeons, *Journal of Pediatric Surgery*, 35, 1687 – 1700
- McIntyre, R.C., Pulido, E.J., Bensard, D.D., Shames, B.D., Abraham, E., 2000, Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome, *Critical Care Medicine*, 28, 3314 – 3331
- Miller, A.C., Neogi, P., 2008, *Interfacial Phenomena, Equilibrium and Dynamic Effects*, Hubbard, A. T. (ed), CRC Press, USA, 139, 501 p.

- Miller, R., Fainerman, V.B., Wüstneck, R., Kragel, J., Trukhin, D.V., 1998, Characterisation of the initial period of protein adsorption by dynamic surface tension measurements using different drop techniques, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 131, 225 – 230
- Miller, R., Kragel, J., Wüstneck, R., Wilde, P.J., Li, J.B., Fainerman, V.B., Loglio, G., Neumann, A.W., 1998, Adsorption kinetics and rheological properties of food proteins at air/water and oil/water interfaces, *Nahrung*, 42, 225 – 228
- Miller, R., Fainerman, V.B., Makievski, A.V., Kragel, J., Grigoriev, D.O., Kazakov, V.N., Sinyachenko, O.V., 2000, Dynamics of protein and mixed protein / surfactant adsorption layers at the water / fluid interface, *Advances in Colloid and Interface Science*, 86, 39 – 82
- Mingarro, I., Lukovic, D., Marcal, V., Perez – Gil, J., 2008, Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends, *Current Medicinal Chemistry*, 15, 393 – 403
- Mulugeta S., Beers, M.F., 2006, Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung, *Microbes and Infection*, 8, 2317 – 2323
- Myers, D., 2006, *Surfactant Science and Technology*, John Wiley and Sons, New Jersey, 380 p.
- Myers, D., 1999, *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*, John Wiley and Sons Inc., 493 p.
- Peetla, C., Labhasetwar, V., 2007, Biophysical characterization of nanoparticle – endothelial model cell membrane interactions, *Molecular Pharmaceutics*, 5, 418 – 429
- Perez – Gil, J., Serrano, A.G., 2006, Protein – lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system, *Chemistry and Physics of Lipids*, 141, 105 – 118
- Perez – Gil, J., Weaver, T., 2010, Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions, *Physiology*, 25, 132 – 141
- Persson, A., Chang, D., Rust, K., Moxley, M., Longmore, W., Crouch, E.C., 1989, Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein, *Biochemistry*, 28, 6361 – 6367
- Phang, T., McClellan, S.J., Franses, E.I., 2005, Displacement of fibrinogen from the air/aqueous interface by dilauroylphosphatidylcholine lipid, *Langmuir*, 21, 10140 – 10147
- Prutton, M., 1994, *Introduction to Surface Physics*, Oxford University Press

- Ravera, F., Liggieri, L., Steinchen, A., 1993, Sorption kinetics considered as a renormalized diffusion process, *Journal of Colloid and Interface Science*, 156, 109 – 116
- Ravera, F., Ferrari, M., Liggieri, L., 2000, Adsorption and partitioning of surfactants in liquid – liquid systems, *Advances in Colloid and Interface Science*, 88, 129 – 177
- Robertson, B., Halliday, H.L., 1998, Principles of surfactant replacement, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408, 346 – 361
- Robertson, B., Johansson, J., Curstedt, T., 2000, Synthetic surfactants to treat neonatal lung disease, *Molecular Medicine Today*, 6, 119 – 124
- Rooney, S.A., 2001, Regulation of surfactant secretion, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129, 233 – 243
- Rosen, M.J., 2004, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 444 p.
- Satulovsky, J., Carignano, M.A., Szleifer, I., 2000, Kinetic and thermodynamic control of protein adsorption, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 9037 – 9041
- Schramm, L.L., Stasiuk, E.N., Marangoni, D.G., *Annual Reports on the Progress of Chemistry Section C, Chapter 2 Surfactants and their applications*; 2003, 99, 3 – 48
- Schürch, S., Possmayer, F., Cheng, S., Cockshutt, A.M., 1992, Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant, *American Journal of Physiology*, 263, 210 – 218
- Schürch, S., Bachofen, H., Possmayer, F., 2001, Surface Activity in situ, in vivo, and in the Captive Bubble Surfactometer, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 129, 195 – 207
- Seeger, W., Stohr, G., Wolf, H.R., Neuhof, H., 1985, Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer, *Journal of Applied Physiology*, 58, 326 – 338
- Seurnyck, S.L., Brown, N.J., Wu, C.W., Germino, K.W., Kohlmeir, E.K., Ingenito, E.P., Glucksberg, M.R., Barron, A.E., Johnson, M., 2005, Optical monitoring of bubble size and shape in a pulsating bubble surfactometer, *Journal of Applied Physiology*, 99, 624 – 633
- Seurnyck-Servoss, S.L., Brown, N.J., Dohm, M.T., Wu, C.W., Barron, A.E., 2007, Lipid composition greatly affects the in vitro surface activity of lung surfactant protein mimics, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57, 37 – 55



- Shchukin, E.D., Pertsov, A.V., Amelina, E.A., Zelenev, A.S., 2001, Colloid and Surface Chemistry, Mobius, D., Miller R. (eds), Elsevier, Amsterdam, 12, 747 p.
- Shiffer, K., Hawgood, S., Haagsman, H.P., Benson, B., Clements, J.A., Goerke, J., 1993, Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study, *Biochemistry*, 32, 590 – 597
- Sieber, M., Galla, H.-J., Bourdos, N., von Nahmen, A., Amrein, M., 1998, The role of pulmonary surfactant protein C during the breathing cycle, *Thin Solid Films*, 327-329, 632 – 635
- Simatos, G.A., Forward, K.B., Morrow, M.R., Keough, K.M.W., 1990, Interaction between perdeuterated dimyristoylphosphatidylcholine and low molecular weight pulmonary surfactant protein SP-C, *Biochemistry*, 29, 5807 – 5814
- Stenger, P.C., Isbell, S.G., Zasadzinski, J.A., 2008, Molecular weight dependence of the depletion attraction and its effects on the competitive adsorption of lung surfactant, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 2032 – 2040
- Stenger, P.C., Isbell, S.G., St.Hillaire, D., Zasadzinski, J.A., 2009, Rediscovering the schulze-hardy rule in competitive adsorption to an air-water interface, *Langmuir*, 25, 10045 – 10050
- Stenger, P.C., Zasadzinski, J.A., 2007, Enhanced surfactant adsorption via polymer depletion forces: a simple model for reversing surfactant inhibition in acute Respiratory Distress Syndrome, *Biophysical Journal*, 92, 3 – 9
- Tadros, F.T., 2005, *Applied Surfactants*, Wiley – VCH, Weinheim, 634 p.
- Taeusch, H.W., de la Serna, J.B., Perez – Gil, J., Alonso, C., Zasadzinski, J.A., 2005, Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental, *Biophysical Journal*, 89, 1769 – 1779
- Taeusch, H.W., Dybbro, E., Lu, K.W., 2008, Pulmonary surfactant adsorption is increased by hyaluronan or polyethylene glycol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62, 243 – 249
- Takamoto, D.Y., Lipp, M.M. von Nahmen, A., Lee, K.Y.C., Waring, A.J., Zasadzinski, J.A., 2001, Interaction of lung surfactant proteins with anionic phospholipids, *Biophys. J.*, 81, 153 – 169
- Taneva, S. and Keough, K.M.W., 1994, Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: 1. monolayers of pulmonary surfactant protein SP-B and phospholipids, *Biophysical Journal*, 66, 1137 – 1148

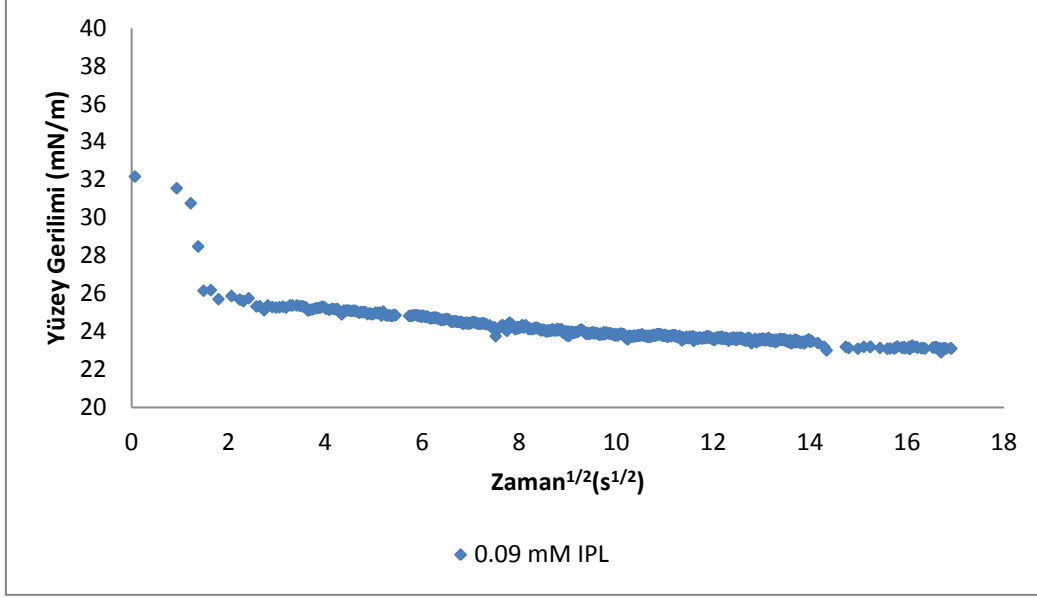
- Teipel, U., Aksel, N., 2001, Adsorption behavior of nonionic surfactants studied by drop volume technique, *Chemical Engineering & Technology*, 24, 393 – 400
- Unsal, H., Aydogan, N., 2009, A new strategy to form multicompartement micelles: fluorocarbon – hydrocarbon ion-pair surfactant, *Langmuir*, 25, 7884 – 7891
- Uslu, B., 2009, Akciğer Yüzey Aktif Maddeleri-Hibrit Yüzey Aktif Maddeleri Karışımlarının Kan Proteinleri Ile Etkileşimi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 230 s.
- van Golde, L.M.G., 1995, Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens, *Biology of the Neonate*, 67, 2 – 17
- von Nahmen, A., Schenk, M., Sieber, M., Amrein, M. 1997, The structure of a model pulmonary surfactant as revealed by scanning force microscopy, *Biophysical Journal*, 72, 463 – 469
- Venkitaraman, A.R., Baatz, J.E., Whitsett, J.A., Hall, S.B., Notter, R.H., 1991, Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein admixtures by plasma proteins, *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 49 – 57
- Vermette, P., Gauvreau, V., Pezolet, M., Laroche, G., 2003, Albumin and fibrinogen adsorption onto phosphatidylcholine monolayers investigated by Fourier transform infrared spectroscopy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 29, 285 – 295
- Voorhout, W.F., Veenendaal, T., Haagsman, H.P., Weaver, T.E., Whitsett, J.A., van Golde, L.M., Geuze, H.J., Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 263, 479 – 486
- Wang, Y., Pereira, C.M., Marques, E.F., Brio, R.O., Ferreira, E.S., Silva, F., 2006, Cationic surfactant films at the air – water interface, *Thin Solid Films*, 515, 2031 – 2037
- Wasilewska, M., Adamczyk, Z., Jachimska, B., 2009, Structure of fibrinogen in electrolyte solutions derived from dynamic light scattering (DLS) and viscosity measurements, *Langmuir*, 25, 3698 – 3704
- Weaver, T.E., Conkright, J.J., 2001, Function of surfactant proteins B and C, *Annual Review of Physiology*, 63, 555 – 578
- Whitsett, J.A., Weaver T.E., 2002, Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease, *The New England Journal of Medicine*, 347, 2141 – 2148

- Wu, J., Li, J.B., Zhao, J., Miller, R., 2000, Dynamic characterization of phospholipid/protein competitive adsorption at the aqueous solution/chloroform interface, *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 175, 113 – 120
- Wüstneck, R., Wüstneck, N., Moser, B., Karageorgieva, V., Pison, U., 2002, Surface dilatational behavior of pulmonary surfactant components spread on the surface of a pendant drop. 1. dipalmitoyl phosphatidylcholine and surfactant protein C, *Langmuir*, 18, 1119 – 1124
- Wüstneck, R., Perez – Gil, J., Wüstneck, N., Cruz, A., Fainerman, V.B., Pison, U., 2005, Interfacial properties of pulmonary surfactant layers, *Advances in Colloid and Interface Science*, 117, 33 – 58
- Xu, Z., Marchant, R.E., 2000, Adsorption of plasma proteins on polyethylene oxide-modified lipid bilayers studied by total internal reflection fluorescence, *Biomaterials*, 21, 1075 – 1083
- Yampolskaya, G., Platikanov, D., 2006, Proteins at fluid interface: Adsorption layers and thin liquid films, *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130, 159 – 183
- Yeow, Y.L., Pepperell, C.J., Sabturani, F.M., Leong, Y.K., 2008, Obtaining surface tension from pendant drop volume and radius of curvature at the apex, *Colloids and Surfaces A*, 315, 136 – 146
- Yu, S., Possmayer, F., Effect of pulmonary surfactant protein B (SP-B) and calcium on phospholipid adsorption and squeeze – out of phosphatidylglycerol from binary phospholipid monolayers containing dipalmitoylphosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, 1126, 26 – 34
- Zasadzinski, J.A., Ding, J., Warriner, H.E., Bringezu, F., Waring, A.J., 2001, The physics and physiology of lung surfactants, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6, 506 – 513
- Zasadzinski, J.A., Alig, T.F., Alonso, C., de la Serna, J.B., Perez – Gil, J., Taeusch, H.W., 2005, Inhibition of pulmonary surfactant adsorption by serum and the mechanisms of reversal by hydrophilic polymers: theory, *Biophysical Journal*, 89, 1621 – 1629
- Zasadzinski, J.A., Stenger, P.C., Shieh, I., Dhar, P., 2010, Overcoming rapid inactivation of lung surfactant: Analogies between competitive adsorption and colloid stability, *Biochimica et Biophysical Acta*, 1798, 801 – 828
- Zeppieri, S., Rodriguez, J., de Ramos, A.L.L., 2001, Interfacial tension of alkane + water systems, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 46, 1086 – 1088

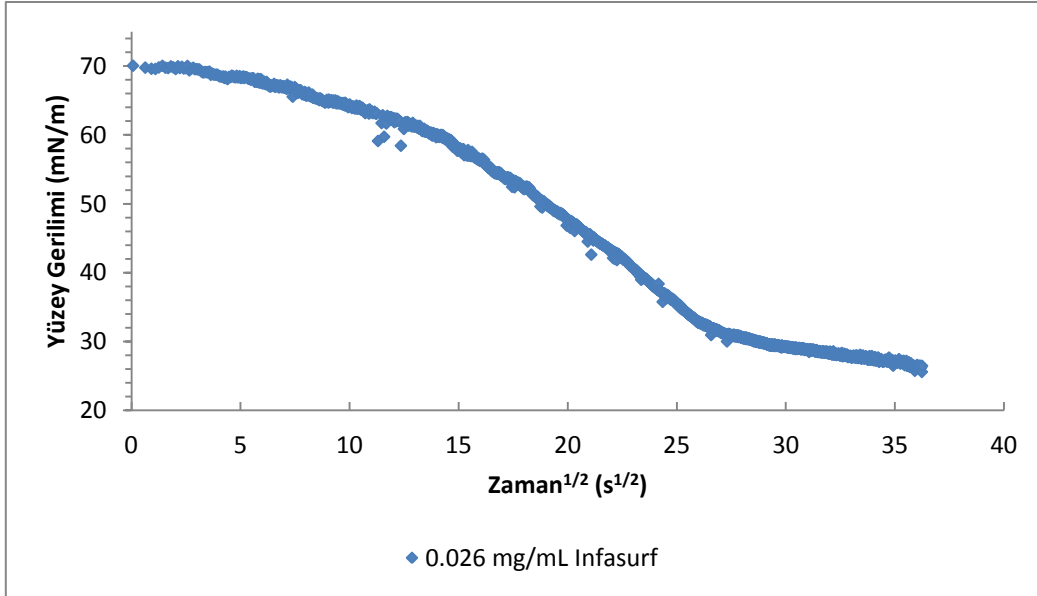
- Zhang, H., Fan, Q., Wang, Y.E., Neal, C.R., Zuo, Y.Y., 2011, Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 1832 – 1842
- Zuo, Y.Y., Veldhuizen, R.A.W., Neumann, A.W., Petersen, N.O., Possmayer, F., 2008, Current perspectives in pulmonary surfactant – inhibition, enhancement and evaluation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1947 – 1977
- Zuo, Y.Y., Fan, Q., Wang, Y.E., Zhang, H., 2011, On the Low surface tension of lung surfactant, *Langmuir*, 27, 8351 – 8358

## EKLER

### EK 1. IPL ve Infasurf®'ün hava/fosfat tampon ara yüzeyinde kısa zamanlarda difüzyon katsayısının hesaplanması için kullanılan grafikler

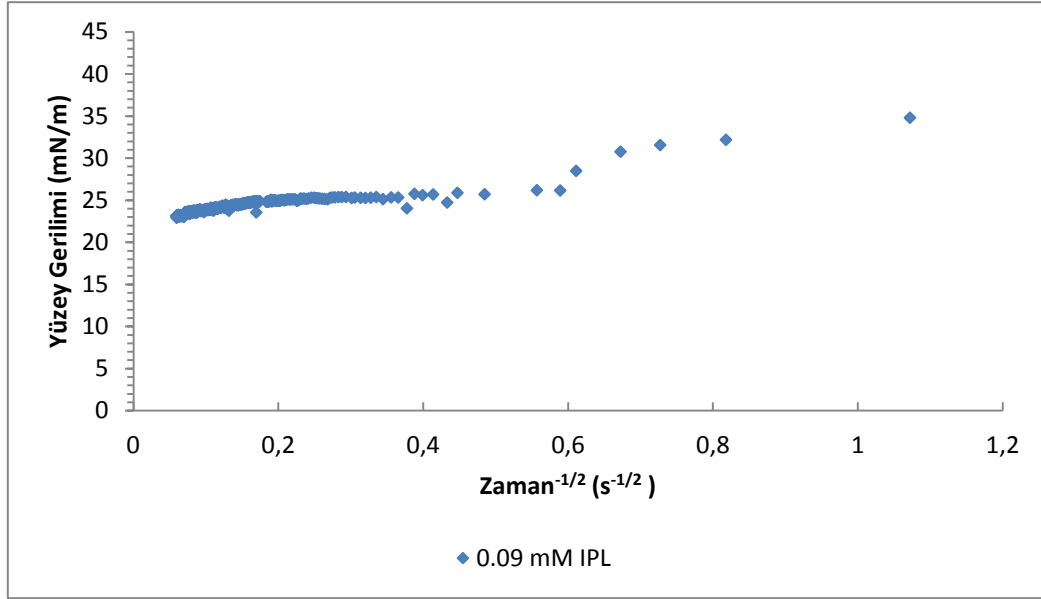


Şekil Ek 1.A. IPL için hava/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s<sup>1/2</sup>) izotermi

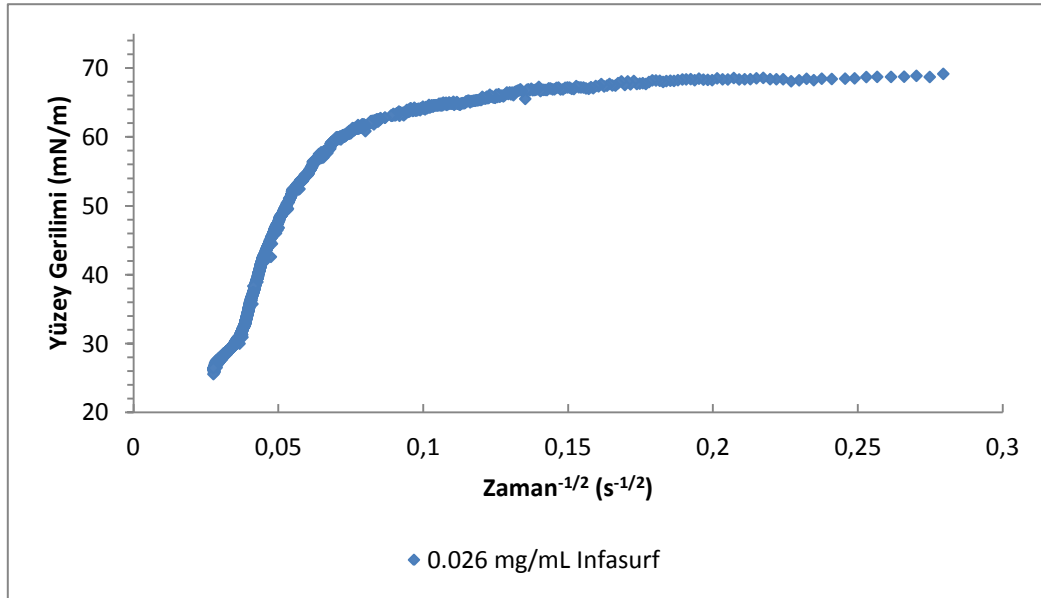


Şekil Ek 1.B. Infasurf® için hava/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman (s<sup>1/2</sup>) izotermi

**EK 2. IPL ve Infasurf®'ün hava/fosfat tampon ara yüzeyinde uzun zamanlarda difüzyon katsayısının hesaplanması için kullanılan grafikler**



Şekil Ek 2.A. IPL için hava/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman ( $s^{-1/2}$ ) izotermi



Şekil Ek 2.B. Infasurf® için hava/fosfat tampon ara yüzeyinde elde edilen  $\gamma$  (mN/m) – zaman ( $s^{-1/2}$ ) izotermi

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı :** Gökçe DİLLİ

**Doğum Yeri :** Ankara

**Doğum Yılı :** 1988

**Medeni Hali :** Bekar

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

**Lise:** 2002 – 2005, Ankara Atatürk Anadolu Lisesi

**Lisans:** 2005 – 2009, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü,  
Ankara, Türkiye

**Yabancı Dil :** İngilizce

Almanca

**İş Tecrübesi:** 2009 – 2010 Proje Asistanı, Hacettepe Üniversitesi, Kimya  
Mühendisliği Bölümü

2011 – 2012 Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya  
Mühendisliği Bölümü