



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KONSANTRASYONLARDA SÜTE EKLENEN  
FLUOKSETİNİN POLİKAPROLAKTON ESASLI VE  
İMMÜNSORBENT ÖZELLİKLİ FİLTRE ARACILIĞI İLE  
UZAKLAŞTIRILMASI**

HAVA DUDU TASLAK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Tuğba TUNALI-AKBAY

2018- İSTANBUL





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KONSANTRASYONLARDA SÜTE EKLENEN  
FLUOKSETİNİN POLİKAPROLAKTON ESASLI VE  
İMMÜNSORBENT ÖZELLİKLİ FİLTRE ARACILIĞI İLE  
UZAKLAŞTIRILMASI**

HAVA DUDU TASLAK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Tuğba TUNALI-AKBAY

2018- İSTANBUL

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)  
Tez Sahibi : Hava Dudu TASLAK  
Tez Başlığı : Farklı konsantrasyonlarda süte eklenen fluoksetinin polikaprolakton esaslı ve immünosorbent özellikli filtre aracılığı ile uzaklaştırılması  
Sınav Yeri : M.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı, Başbüyük, Maltepe- İstanbul  
Sınav Tarihi : 19 Aralık 2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Prof. Dr. Tuğba TUNALI-AKBAY

### Kurumu

### İmza

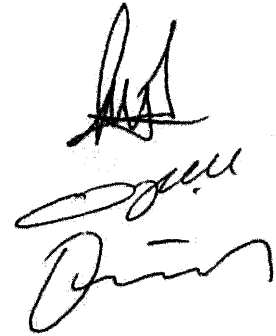


### Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Tuğba TUNALI-AKBAY

Prof. Dr. Ayşen YARAT

Prof. Dr. Ahmet Ata ALTURFAN



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26 Aralık / 2018 tarih ve 06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

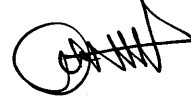


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hava Dudu Taslak



## TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans hayatım boyunca benden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bana verdiği destek ve tecrübelerinden faydalanma olanağı sayesinde akademik açıdan gelişmemde yardımcı olan, bu çalışmanın oluşmasını ve katkılarıyla şekillenmesini sağlayan, çalışmayı sabır ve titizlikle takip eden çok değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Tuğba Tunalı Akbay**'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan hocalarım Sayın **Prof. Dr. Ayşen Yarat**'a ve **Prof. Dr. Ebru Işık Alturfan**'a,

Çalışmamın gerçekleşmesindeki maddi desteklerinden dolayı **Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**'ne,

Tüm yüksek lisans hayatım ve akademik çalışmalarım sırasında yanımda olup benden yardımlarını, sonsuz hoşgörüsünü esirgemeyen, beni yüreklendiren **arkadaşlarıma**,

Hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve hep yanımda olup bana destek olan sevgili **anneme, babama ve kardeşlerime** sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Hava Dudu Taslak

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından **'SAG-C-YLP-120417-0152'** numaralı proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iv
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ .....	ix
1. ÖZET .....	1
2. SUMMARY .....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İmmobilizasyon .....	5
4.1.1. İmmobilizasyon tarihçesi .....	6
4.1.2. İmmobilizasyon yöntemleri .....	6
4.2. Antikorlar ve Yapıları .....	12
4.2.1. Monoklonal Antikorlar .....	15
4.2.2. Poliklonal antikorlar .....	16
4.2.4. Antikor immobilizasyonu ve Uygulamaları .....	18
4.3. Keçi Sütü .....	19
4.3.1. Keçi sütünün fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	19
4.3.2. Keçi sütü karbohidrat içeriği.....	19
4.3.3. Keçi sütü yağ içeriği .....	21
4.3.4. Keçi sütü protein içeriği.....	23
4.3.5. Keçi sütü mineral içeriği.....	25
4.3.6. Keçi sütü vitamin içeriği.....	27
4.4. Doğum Sonrası Depresyonu.....	28
4.4.1. Doğum sonrası depresyonun tedavisi .....	28
4.5. Fluoksetin .....	29
4.5.1. Anne sütü ve fluoksetin ilişkisi.....	30

4.5.3. Fluoksetin metabolizması .....	31
4.6. Polikaprolakton .....	32
4.6.1. Polimerik malzemelere genel bakış .....	32
4.6.2. Polikaprolaktonun tarihçesi .....	33
4.6.3. Polikaprolaktonun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	34
4.6.4. Polikaprolakton biyomalzemelerin önemi ve tıpta kullanımı.....	35
<b>5. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	37
5.3. Gereç ve Yöntemin Aşamaları .....	38
5.3.1. Fluoksetin içeren keçi sütü örneklerinin hazırlanması .....	38
5.3.2. Polikaprolakton esaslı nanofibere antikor immobilizasyonu.....	39
5.3.3. Nanofiber üzerine antikor immobilizasyonu ve biyoaktif nanofiber eldesi .....	40
5.3.4. Biyoaktif nanofiber ile fluoksetin içeren süt örneklerinin inkübasyonu... 41	
5.3.3. Antikor immobilizasyonu ve süt inkübasyonu sonrası taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile nanofiber karakterizasyonu.....	42
5.3.5. Keçi sütü total protein tayini.....	42
5.3.6. Keçi sütü laktoz tayini .....	44
5.3.7. Keçi sütü yağ tayini .....	46
5.3.9. Keçi sütü pH ölçümü .....	48
5.3.10. Enerji değerinin hesaplanması .....	48
5.3.11. Biyoaktif Nanofiberin Verimliliğın Analitik Doğrulaması .....	48
5.3.12. İstatistiksel Değerlendirme .....	49
<b>6. BULGULAR .....</b>	<b>50</b>
6.1. Antikor immobilizasyonu ve süt inkübasyonu sonrası taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile nanofiber karakterizasyonunun değerlendirilmesi .....	50
6.2. Keçi sütünden fluoksetin uzaklaştırılmadan önce ve uzaklaştırıldıktan sonra süt bileşimi .....	51
6.3. 25 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar.....	51
6.4. 50 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar.....	51
6.5. 75 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar.....	52
6.6. 100 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar.....	53

6.7. Biyoaktif nanofiberin 25, 50, 75 ve 100 ng/mL fluoksetin içeren süt ile inkübasyonundan sonra elde edilen verim sonuçları.....	54
6.8. Süt örneklerinde nanofiber verimliliğın analitik doğrulaması.....	55
<b>7. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>56</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>75</b>
EK-1. Tez Konusu ile İlgili Poster Bildirisi .....	75
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>76</b>

## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

- AOAC:** Analitik Kimyacılar Derneği (Association of Official Analytical Chemists)
- CBB:** Coomassie Brilliant Blue
- CIA:** Kemilüminesans İmmünotest (Chemiluminescence Immunoassay)
- DEAE:** Dietil-Amino-Etil
- EI:** Elektrokemilüminesans İmmünotest (Electrochemiluminescence Immünoassay)
- ELISA:** Enzim Bağlı İmmunosorbent Test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- FDA:** Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
- FIA:** Floresan İmmünotest (Fluoro Immunoassay)
- Ig:** İmmünoglobülin
- KLA:** Konjuge Linoleik Asit
- KSCN:** Potasyum Tiyosiyanat Çözeltisi
- MHC:** Majör Histokompatibilite Kompleksi
- PA:** Poliamid
- PBS:** Fosfat Tamponu
- PCL:** Polikaprolakton
- PU:** Poliüretan
- PVA:** Polivinil Alkol
- RSD:** Göreceli Standart Sapma (Relative Standard Deviation)
- SA:** Selüloz Asetat
- SEM:** Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy)
- SPR:** Yüzey Plasmon Rezonans Tabanlı İmmünotest (Surface plasmon resonance immunoassay)
- SSRI:** Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors)
- TAG:** Triaçilgliserol

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Nanofibere antikor immobilizasyonu.....	5
Şekil 2. İmmobilizasyon yöntemleri.....	7
Şekil 3. Antikor sınıfları.....	13
Şekil 4. Antikor yapısı.....	14
Şekil 5. Fluoksetinin moleküler yapısı.....	28
Şekil 6. Polikaprolaktonun yıllara göre yayın sayısı dağılımı.....	32
Şekil 7. Polikaprolakton zincir görünümü.....	33
Şekil 8. Polikaprolakton esaslı nanofiber.....	37
Şekil 9. Biyoaktif nanofiber ile süttten nanofiberin uzaklaştırılması.....	39
Şekil 10. Laktoz tayini tepkimesi.....	42
Şekil 11. Nanofiber SEM götüntüleri.....	48
Şekil 12. Biyoaktif nanofiberin filtrasyon sonrası % verim sonuçları.....	52

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Ana besin öğelerinin keçi sütü, inek sütü ve anne sütündeki yüzde olarak dağılımları.....	20
<b>Tablo 2.</b> Keçi, inek ve anne sütündeki bazı minör protein içerikleri.....	22
<b>Tablo 3.</b> Keçi, inek ve anne sütünün 100 g'ındaki mineral ve vitamin içerikleri.....	25
<b>Tablo 4.</b> Polikaprolaktonun fiziksel özellikleri.....	34
<b>Tablo 5.</b> Kullanılan cihazlar ve markaları.....	35
<b>Tablo 6.</b> Kullanılan yöntemin aşamaları.....	36
<b>Tablo 7.</b> Total protein tayini yöntemi.....	41
<b>Tablo 8:</b> Laktoz tayini yöntemi.....	43
<b>Tablo 9.</b> Yağ tayini yöntemi.....	44
<b>Tablo 10.</b> Fluoksetinin ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmesi.....	45
<b>Tablo 11.</b> 25 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre öncesi ve sonrası süt bileşimi.....	49
<b>Tablo 12.</b> 50 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre öncesi ve sonrası süt bileşimi.....	50
<b>Tablo 13.</b> 75 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre öncesi ve sonrası süt bileşimi.....	50
<b>Tablo 14:</b> 100 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre öncesi ve sonrası süt bileşimi.....	51
<b>Tablo 15.</b> Biyoaktif nanofiberin filtrasyon sonrası % verim değerleri.....	52
<b>Tablo 16.</b> Sütte kullanılan biyoaktif nanofiberin geri kazanım ve tekrarlanabilirliği.....	53

## 1. ÖZET

### **Farklı Konsantrasyonlarda Süte Eklenen Fluoksetinin Polikaprolakton Esaslı ve İmmünosorbent Özellikli Filtre Aracılığı ile Uzaklaştırılması**

**Öğrencinin Adı:** Hava Dudu TASLAK

**Danışmanı:** Prof. Dr. Tuğba TUNALI-AKBAY

**Anabilim Dalı:** Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; anne sütü aracılığı ile bebeğe geçen ve bebekte uyku bozukluğu, ağlama krizi, beslenme yetersizliği ve kolik oluşumuna neden olan fluoksetinin, polikaprolakton esaslı biyoaktif nanofiber aracılığı ile süttten uzaklaştırılmasıdır. Çalışmanın ikincil amacı da; bu işlem sırasında süttün kompozisyonunun değişip değişmediğinin tespit edilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Polikaprolakton esaslı nanofibere fluoksetin antikoru immobilize edilerek biyoaktif nanofiber elde edilmiştir. 25, 50, 75, 100 ng/mL konsantrasyonlarda süt örneklerine eklenen fluoksetin biyoaktif nanofiber ile inkübe edilerek süttten uzaklaştırılmıştır. Biyoaktif nanofiberin fluoksetini süttten uzaklaştırma verimi süt örneklerinde ELISA yöntemi ile fluoksetin ölçümü yapılarak tayin edilmiştir. İnkübasyon öncesi ve sonrası süt örneklerinde total protein tayini, laktoz tayini ve yağ tayini sırasıyla Bradford, Khramov ve arkadaşları ve Lucas ve arkadaşlarının yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Süt örneklerinde ayrıca pH ölçümü yapılmış ve süttün enerji değeri hesaplanarak bulunmuştur.

**Bulgular:** Süte eklenen fluoksetinin ortalama % 93,6'sı biyoaktif nanofiber kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Çalışılan konsantrasyonlar arasında en yüksek verim 100 ng/mL fluoksetin örneğinde görülmüştür. İnkübasyon öncesi ve sonrası süt örneklerindeki total protein, laktoz, yağ , pH ve enerji değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

**Sonuç:** Anne sütüne geçen ilaçların ve kimyasal maddelerin uzaklaştırılmasına yönelik hazırlanan bu filtrenin endüstriyel üretiminin gelecek nesil sağlığının korunmasında önemli bir adım olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Fluoksetin, polikaprolakton, nanofiber, süt

## 1. SUMMARY

### **Added Fluoxetine in Different Concentrations by Polycaprolactone Based-Immunosorbent Filter**

**Student's Name:** Hava Dudu TASLAK

**Supervisor:** Prof. Dr. Tuğba TUNALI-AKBAY

**Department:** Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy

**Aim:** The aim of this study is to remove fluoxetine from milk by the polycaprolactone-based bioactive nanofiber which passes to the infant through the breastmilk and causes sleep disturbance, crying crisis, malnutrition and colic formation. Also, the secondary aim of the study is to determine whether the composition of the milk changes during this process.

**Materials and Methods:** Bioactive nanofiber was obtained by immobilizing fluoxetine antibody on to the polycaprolactone-based nanofiber. Fluoxetine added to the milk samples at concentrations of 25, 50, 75, 100 ng / mL was removed from the milk by incubating with bioactive nanofiber. The fluoxetine removal efficacy of the bioactive nanofiber was determined by ELISA in milk samples. Before and after the incubation; total protein, lactose and fat levels were determined in milk samples by the methods of Bradford, Khramov et al and Lucas et al respectively. In milk samples, pH was also measured and the energy value of milk was calculated.

**Results:** An average of 93.6 % fluoxetine that was added to the milk was removed from the milk by bioactive nanofiber. The highest efficiency was observed in 100 ng /mL fluoxetine samples. There was no statistically significant difference between the total protein, lactose, fat, pH and energy values of milk samples before and after the incubation.

**Conclusion:** It is thought that the industrial production of this filter, which is prepared for the removal of the drugs and chemical substances that pass into the breast milk, will be an important step in the protection of the next generation health.

**Key Words:** Fluoxetine, polycaprolactone, nanofiber, milk

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Biyosensör adı verilen algılayıcılar bir ortamdaki hedeflenen maddeyi yapılarında bulunan antikolar, enzimler, nükleik asitler, mikroorganizmalar, organeller veya biyolojik membranlara yerleştirilen kimyasal reseptörler aracılığı ile tanıyıp hedeflenen maddeye bağlanarak onun tespitinde ve ölçümünde kullanılırlar. Günümüzde *in vitro* şartlarda meydana gelen değişikliklerin algılanması ile değişikliğe neden olan etmenin ölçülmesi ve uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu çalışmanın temel amacı antikor içeren bir algılayıcı geliştirmek ve bu algılayıcıyı süte geçen maddelerin uzaklaştırılması için model olarak kullanmaktır. Antikolar yüksek spesiflikleri nedeniyle enzimlerden sonra en çok kullanılan biyoaktif algılayıcı bileşendir. Vücuda giren yabancı maddelere karşı üretilirler ve glikoprotein yapısındadırlar. *In vivo* şartlarda antikolar, bağladıkları yabancı maddeleri vücuttaki savaşçı hücreler için işaretleyip etkisiz hale getirirler. *In vitro* şartlarda ise antikolar bağladıkları yabancı maddenin tespitinde veya ölçümünde kullanılmaktadır (Metkar ve Girigoswami, 2019).

Antikolar organizmada membrana bağlı veya serbest şekilde bulunur. Bu çalışmamızda B lenfositlerin membranına bağlı antikolar model olarak alınmış ve polikaprolakton (PCL) esaslı nanofiberin üzerine antikor immobilize edilmiştir.

Polikaprolakton biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan polimerlerden biridir. Medikal malzeme üretiminden, ilaç üretime, doku iskelesi uygulamalarından, ilaç tekstil sanayisine ve boyalara kadar çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Toksik olmayan ve vücut ile uyumlu olduğu bilinen PCL, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi'nin (FDA) onay verdiği az sayıda polimerlerden biridir. İyi bir biyoyumlu polimer olması biyolojik amaçlı kullanım alanını çoğaltmıştır. Üretim maliyetinin düşük olmasının yanında biyoyumlu ve biyobozunur olması bu polimerin sahip olduğu avantajları arasında yer almaktadır (Mano ve ark., 2004). Çalışmamızda PCL esaslı nanofiber yüzeyine antikor immobilizasyonu yapılarak biyoaktif nanofiber elde edilmiş ve farklı konsantrasyonda süte eklenen fluoksetinin uzaklaştırılması için kullanılmıştır.

Fluoksetin, santral nöronlarda serotonin geri alımını inhibe ederek antidepresan etkinlik gösteren bir psikotropik ilaç ham maddesidir (Hussiena ve ark, 2011; Wong ve ark, 1995) ve doğumdan sonraki 2. ve 3. haftalarda sinsice başlayan ve iki yıla kadar uzayabilen depresif duygu durum bozukluğu olarak tanımlanan post-partum depresyon tedavisinde kullanılmaktadır (Erdem ve Bez, 2009). Anne sütüne geçen ilaçlar arasında yer alan fluoksektin, bebekte uyku bozukluğuna, ağlama krizine, beslenme yetersizliğine ve kolik oluşumuna neden olduğu için emzirme döneminde kullanımı kontrendikedir (Berle ve Spigset, 2011; Hendrick ve ark, 2001).

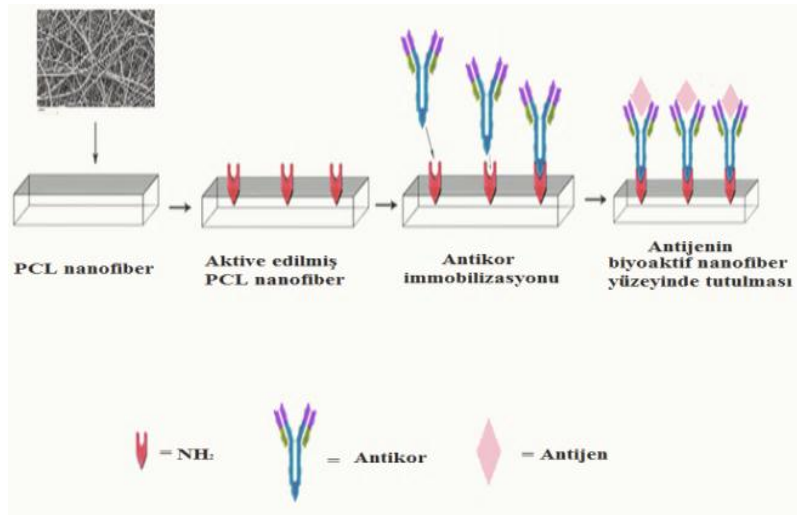
Bu bilgilerin ışığında çalışmamızın amacı; anne sütüne en yakın bileşime sahip olduğu bildirilen keçi sütüne, anne sütüne geçen konsantrasyon aralığında fluoksetin ekleyerek, bunu polikaprolakton esaslı biyoaktif nanofiber aracılığı ile uzaklaştırmak ve bu sırada süt kompozisyonunda değişiklik olup olmadığını tespit etmektir.

Son yıllarda emzirme ile ilgili birçok özendirici bilgilendirmeler yapılmasına rağmen anne sütüne geçen ilaçlar ve bunların bebek üzerindeki yan etkileri hakkındaki çalışmalar hala çok sınırlı sayıdadır. İlaçların anneler tarafından bilinçsizce kullanımının veya yan etkileri hakkında bilgi eksikliğinin neden olduğu birçok hastalık genç nesilleri etkilemekte ve sonraki yıllarda oluşabilecek birçok hastalığın temellerini atmaktadır. Sağlıklı bir nesil oluşumu için bu konu ile ilgili çalışmaların hızlanması günümüz yaşam şartları açısından önem taşımaktadır. Dünyada ve ülkemizde anne sütünü istenmeyen kimyasal maddelerden arındıran bir malzeme veya filtre henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada kullanılan yöntem ile birçok kimyasal madde veya ilaca spesifik biyoaktif nanofiber hazırlanarak bebek sağlığını tehdit eden her türlü kimyasal madde ve ilaç için devam niteliğinde yeni ürünler geliştirilebilir.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. İmmobilizasyon

Biyolojik olarak fonksiyonel olan bir molekülün veya hücrenin, taşıyıcı bir yüzey üzerinde sabitlenmesine immobilizasyon denir. Biyolojik olarak fonksiyonel olan yapılar enzim, antikor, DNA, olabildiği gibi hücre de olabilmektedir. İmmobilize kompleks yapı fiziksel olarak taşıyıcı yüzeyin özelliğini taşır, ancak immobilize edilen molekülün veya hücrenin temel aktivitesine sahip olur. İmmobilizasyon sonrası taşıyıcı yüzeye tutunan molekülün veya hücrenin yapısı veya karakteristiği değişime uğramamaktadır. İmmobilizasyon tekniğinin kullanıldığı teknolojik sistemlerde tıp, kimya, biyoloji ve mühendislik alanlarını içine alan multidisipliner çalışma olanakları ortaya çıkmaktadır. Günümüzde enzim, antikor ve hücre immobilizasyonu teknikleri biyoteknolojide sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Makaraviciute ve Ramanaviciene, 2013) (Şekil 1).



Şekil 1. Nanofibere antikor immobilizasyonu

#### 4.1.1. İmmobilizasyon tarihçesi

1916 yılında Nelson ve Griffin, odun kömürü üzerine adsorbe edilmiş olan maya invertaz enziminin sukrozun hidrolizini katalizlediğini gözlemlemişlerdir (Nelson ve Griffen, 1916). Bu gelişmenin ardından fizyolojik olarak aktif proteinlerin kovalent bağlanma ile çeşitli taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu konusunda çok sayıda rapor yayınlanmıştır. Buna rağmen immobilizasyon işlemi; 1953 yılında Grubhofer ve Schleith'in karboksipeptidaz, diastaz, pepsin ve ribonükleaz gibi enzimleri kovalent bağlanma metoduyla diazolanmış poliaminostiren reçinesi üzerine immobilize etmelerine kadar pratik olarak kullanılmamıştır. Daha sonra, 1956 yılında katalaz enziminin dietil-amino-etil (DEAE) selüloz üzerine iyonik bağlanmayla immobilizasyonu, 1963 yılında tripsin, papain, amilaz ve ribonükleazın, tutuklama yöntemiyle poliakrilamit jel içerisine immobilizasyonu, 1964 yılında karboksipeptidaz A enziminin gluteraldehit ile çapraz bağlanması ve karbonik anhidraz enziminin mikrokapsüllenmesi, 1971 yılında ise amiloglukosidaz içeren lipozomların hazırlanması çalışmaları yapılmıştır (Rao ve ark., 1998).

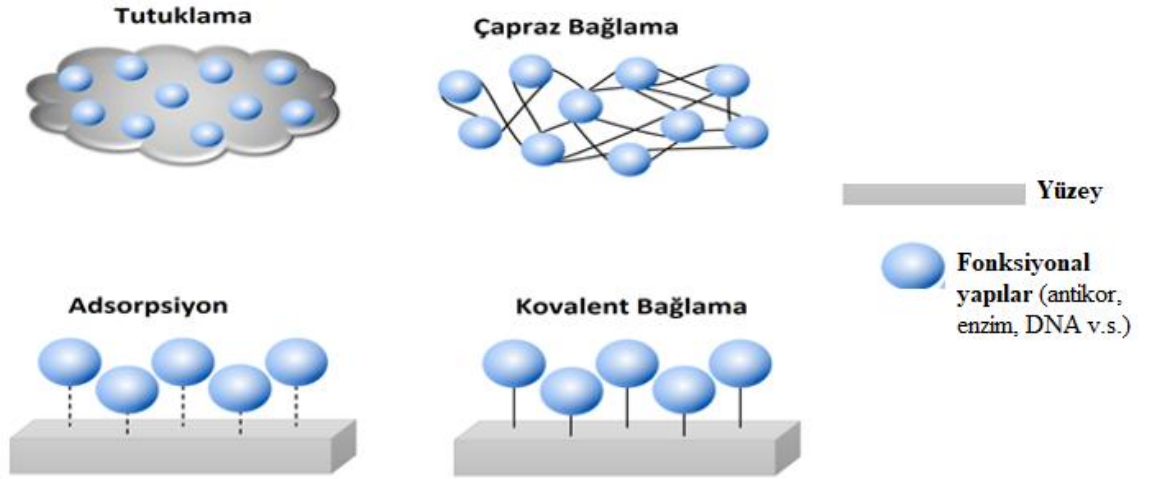
1969 yılında fungal amino açilaz enzimini DEAE Sephadex üzerine iyonik bağlanma metodu ile immobilize eden Chibata ve arkadaşları, immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamalarında başarılı olan ilk kişilerdir. 1973 yılında da Chibata ve arkadaşları mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunun ilk endüstriyel uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Yüksek aktiviteye sahip aspartaz içeren *Escherichia coli* hücrelerinin poliakrilamit jel içine tutuklanmasını sağlayarak, amonyum fumarattan L-aspartat üretmişlerdir (Rao ve ark., 1998)

#### 4.1.2. İmmobilizasyon yöntemleri

Katı taşıyıcı yüzeyler üzerine fonksiyonel molekülün veya hücrenin immobilizasyonu iki şekilde yapılmaktadır. Bunlardan biri elektrostatik kuvvetlerin etkisi altında gerçekleşen fiziksel adsorpsiyon ve diğeri fonksiyonel molekül ile taşıyıcı yüzey arasında meydana gelen kovalent bağlanma sonucu gerçekleşen immobilizasyondur. Katı taşıyıcı yüzeyler; silika yapılı gözenekli mikro boncuklar,

selüloz içerikli materyaller ve nanofiberler sayılabilir. Son yıllarda immobilizasyon işlemlerinde taşıyıcı yüzey olarak nanofiberlerin kullanımı artmıştır.

Şekil 2’de immobilizasyon yöntemleri görülmektedir. (Hartmeier, 1968; Telefoncu, 1986; Wiseman, 1975).



Şekil 2. Immobilizasyon yöntemleri

#### 4.1.2.1. Tutuklama yöntemi

Bu yöntem, polimerik matriks yapısında veya yarı geçirgen membranlarda mikrokapsülleme ve miseller ile immobilize edilecek molekülün hapsedilmesine dayanır (Arıca ve Hasırcı, 1987). Polimer oluşumu ve/veya çapraz bağlanma ısıyla, gama radyasyonu veya UV ışınları ile başlatılır ve oluşan hidrofilik polimer içinde immobilize edilecek olan molekül hapsedilir (Arıca ve Hasırcı, 1987). Bu yöntem, her çeşit enzimi, diğer biyokatalizörleri, bütün hücreleri veya farklı çaptaki mikroorganizmaları hapsedmek için kullanılabilir (Dumitriu, 1988). Tutuklama yönteminde sadece tek bir enzimin değil çoklu enzimlerin, hücreler de immobilize edilebilir. Bu yöntemde taşıyıcıların yeniden elde edilmesi oldukça zordur ve yüksek molekül ağırlığındaki substratların enzime tutunması zor olmaktadır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Tutuklama yöntemi beş ana grupta sınıflandırılabilir:

- **Kafeste (polimer matikste) Tutuklama;** Enzimler, polisakkarit, protein yapılı veya sentetik yapılı çeşitli polimerlerden birinin jel matrisi içine tutuklanır (Tanaka and Kawamoto, 1999). Enzim veya antikor molekülleri fiziksel olarak polimer matrisi içerisinde tutulur ve jel matrisin dışına çıkamaz, fakat substrat ve ürün bu matris yapısına sürekli olarak girip çıkabilirler.
- **Mikrokapsülasyon;** Bu yöntem enzimlerin çeşitli şekillerdeki yarı geçirgen membranlar içerisine konularak kaplanmalarıyla gerçekleştirilir. Mikrokapsülasyonda herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından enzim aktifliği serbest enzim aktifliğine yakındır (İnam et al., 2001).
- **Lipozom tipi;** Bu yöntemde enzim, fosfolipitlerden hazırlanan lipozom denilen sıvı membranlarda tutuklanırlar.
- **Membran tipi;** Enzimler, reaksiyon çözeltisinden mikroultrafiltrasyon membranlarıyla ayrılırlar (Tanaka and Kawamoto, 1999).
- **Ters misel tipi;** Ters misel tipinde biyokatalizör, yüzey aktif madde ile bir organik çözücü karışımı ile oluşturulan ters miseller içine tutuklanmıştır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

#### 4.1.2.2. Çapraz bağlama yöntemi

Biyomoleküllerin taşıyıcı yüzey üzerindeki fonksiyonel gruplara bağlanması sonucunda çapraz bağlanma meydana gelir. Çapraz bağlanma ile biyomoleküllerin (antikor, enzim v.s.) immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen biyomoleküllerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak

kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur (Sanjay ve Sugunan, 2006).

Çapraz bağlayıcı olarak immobilizasyonda kullanılan çok fonksiyonlu maddeler, diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, glutaraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları epiklorhidrinler, triklor-S-triazin, heksametilen diizosiyanat, 2,4-diizotiyosiyanotoluendir (Gürsel ve ark., 2003).

#### **4.1.2.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemi**

Taşıyıcı bağlama metodu en eski immobilizasyon yöntemidir. İmmobilize edilecek olan molekülü suda çözünmeyen taşıyıcılara kovalent bağ, iyonik bağ, fiziksel adsorpsiyon veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanmasına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde bağlanan enzimin miktarı ve immobilizasyon sonrası enzimin aktivitesi taşıyıcının yapısına bağlıdır. Taşıyıcı seçiminde; partikül büyüklüğü, toplam yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi ölçütler esas alınmaktadır (Tanaka and Kawamoto, 1999).

Molekülün bağlanmasına göre bu yöntem üç alt sınıfta incelenmektedir (Telefoncu, 1986):

- a) Fiziksel Adsorpsiyon
- b) İyonik Bağlanma
- c) Kovalent Bağlanma

##### **a) Fiziksel adsorpsiyon yöntemi**

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, immobilize edilecek olan molekülün katı matriks üzerinde fiziksel adsorpsiyonuna dayanır. Fiziksel adsorpsiyon yöntemi en eski ve basit immobilizasyon yöntemidir (Nelson ve Griffen, 1916). Suda çözünmeyen

taşıyıcılarda bu adsorpsiyon yöntemi immobilizasyon için kullanılmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon yönteminde; yüzeyi aktif suda çözünmeyen bir taşıyıcı immobilize edilecek molekülün çözeltisi ile karıştırılır ve enzimin bağlanmayan kısmı yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon yöntemi, proteinin yüklü grupları ile destek materyalinin karşıt yükleri arasındaki çekim kuvvetlerine dayanır. Bu yöntemde, immobilizasyondan sorumlu kuvvetler taşıyıcı ve enzim arasındaki hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerdir (Chen ve ark, 2015). Fiziksel adsorpsiyon yönteminde pH, çözücü, iyon siddeti, enzim adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörler etkilidir. En çok kullanılan taşıyıcılar; aktif karbon, nisasta, anyon ve katyon değiştiricili reçineler, sentetik polimerler, silikajel ve killer, alumina, gözenekli camlar ve seramiklerdir (Uhlig, 1998).

Adsorpsiyonun en büyük avantajı genellikle bağ yapıcı ekstra bir kimyasal maddeye ihtiyaç duymaması ve aktivasyon basamaklarının minimum olmasıdır. Bu immobilizasyon işlemi basit şekilde gerçekleşir ve moleküllerin aktiviteleri üzerine olumsuz etkileri olmamaktadır. Değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı sağlar. Uygun bir taşıyıcıyla bu metot basit ve ucuz bir şekilde uygulanabilir. Ayrıca bu yöntemde kullanılan taşıyıcı yenilenerek tekrar kullanılabilir (Bickerstaff, 1997).

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi bazı dezavantajlara sahiptir. Molekül taşıyıcıya zayıf bağlarla bağlanır ve bundan dolayı adsorbe olmayan molekül, reaksiyon ortamına kaçarak ürünü kontamine edebilir. Optimum immobilizasyon koşulların saptanması güç olabilir çünkü fiziksel etkileşimler iyonik bağlardan daha zayıftır ve protein yapılı moleküller, sıcaklık ve çözünen madde derişimi gibi çevresel faktörlere karşı daha duyarlı durumdadır. Fiziksel adsorpsiyonda bağlanma spesifik değildir, immobilizasyon esnasında protein olmayan maddeler ya da diğer proteinler de taşıyıcıya bağlanabilir. Bunun sonucunda immobilize molekülün özellikleri değişebilir (Bickerstaff, 1997).

#### **b) İyonik bağlama yöntemi**

İyonik bağlanma metodu, immobilize edilecek molekülün iyon değiştirici ajanlar içeren ve suda çözünmeyen bir taşıyıcıya iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. Yöntem çok basittir ve taşıyıcının yenilenmesi ve enzimin tekrar kullanılabilirliği

daha yüksektir. İmmobilizasyon koşulları konformasyonel yapısında ve aktif bölgelerinde çok az değişiklik gözlenir. İyonik bağlanmada enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlar; fiziksel adsorpsiyona göre daha güçlü, kovalent bağlanma yöntemindeki bağlara kıyasla daha zayıftır (Chibata ve ark, 1972).

### **c) Kovalent bağlama yöntemi**

Protein yapılı molekül ile suda çözünmeyen aktifleştirilmiş destek arasında kovalent bağ oluşumu molekülün immobilizasyonu için oldukça sık kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem enzimin veya antikorun suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Genellikle bağlanma, enzimin veya antikorun nükleofilik grubuyla taşıyıcının fonksiyonel grubu arasında gerçekleşmektedir. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH<sub>2</sub>), karboksil grubu (CO<sub>2</sub>H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur (Uhlig, 1998). Kovalent bağlanmada immobilize edilecek molekül ve taşıyıcı arasındaki bağlar diğer immobilizasyon yöntemlerindeki göre daha kuvvetlidir. Bu teknik enzim türevlerinin kararlı olmasını sağlar ve enzimin çözeltiliye geçmesini engeller (Carr and Bowers, 1980). Ayrıca enzim veya antikor taşıyıcının üzerine tutturulmuş olduğundan, immobilize edilmiş molekül substratla çok kolay bağlantı kurabilir.

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak taşıyıcının aktifleştirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağlanması şeklindedir. Taşıyıcı; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar taşımaktadır. Bu fonksiyonel grupların yapısına bağlı olarak epiklorhidrin, glutaraldehit, karbodiimit, siyanürik klorür gibi çeşitli aktifleyici maddeler kullanılabilir (Doğan, 2008).

İmmobilizasyon yönteminin seçiminde öncelikle enzimin veya antikorun bağlanacağı destek materyalinin yapısı dikkate alınmalıdır (D'Souza and Godbole, 2002). Başarılı bir immobilizasyon için aşağıdaki faktörler göz önünde bulundurulmalıdır:

- ✓ Destek materyalinin mekanik özellikleri
- ✓ Enzimin, reaksiyon koşullarında kararlı olması.
- ✓ Çapraz bağlayıcı ajanın, enzimin veya antikorun aktif ucuna nüfuz etmemesi için olabildiğince büyük olması.
- ✓ İmmobilizasyonda, bağlanmamış molekülü uzaklaştırmak için uygulanan işlemin molekülü etkilememesi,
- ✓ İmmobilize molekülün bazı kimyasal tepkimelerde devamlı katalizör olarak kullanılması durumunda immobilizasyon yöntemini seçmeden önce tepkimenin doğası göz önünde bulundurulmalıdır (Mosbach, 1976).

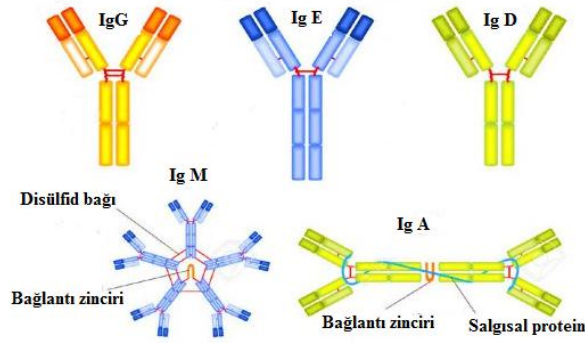
#### **4.2. Antikorlar ve Yapıları**

Antikorlar, antijenler olarak bilinen vücuda yabancı maddelere maruz kalmaya yanıt olarak omurgalılarda üretilen ve dolaşımda bulunan proteinlerdir. Antikorlar, humoral bağışıklığın araçlarıdır; yabancı moleküler yapıları tanıma konusunda çeşitlilik gösterirler ve spesifiktirler. Bu proteinler ilk olarak, difteri toksinine karşı koruma sağlayan serum molekülleri olarak keşfedildiğinden başlangıçta “antitoksin” olarak adlandırılmıştır. Benzer proteinlerin sadece mikrobik toksinlere değil birçok maddeye karşı üretilebileceği keşfedilince bu moleküllere genel olarak “antikor” ismi verilmiştir. Antikorun üretimine yol açan veya antikor tarafından tanınan madde daha sonra antijen olarak adlandırılmıştır (Abbas ve ark, 2014).

Plazma veya serum proteinleri elektroforezle ayrıldığında çoğu antikor gama globulinler adı verilen, globulinlerin üçüncü en hızlı göç eden grubunda yer alır. Antikor için kullanılan diğer bir isim olan “immünoglobülin (Ig)”, serumdaki gama globulin fraksiyonunun bağışıklık kazandırma bölümüne atıfta bulunan bir adlandırmadır. Ig ve antikor terimleri birbirlerinin yerine kullanılırlar (Abbas ve ark, 2014).

Antikorlar, üyeleri önemli yapısal ve işlevsel özellikleri paylaşan bir glikoprotein ailesidir.. İşlevsel olarak, hem antijenlere hem de bağışıklık sisteminin özel hücrelerine veya proteinlerine bağlanma yetenekleri ile karakterize edilebilirler. Yapısal olarak antikorlar, Y şekli olarak görülebilen karakteristik birimin bir veya

daha fazla kopyasından oluşur. Her Y dört polipeptid içerir; ağır zincir (H) olarak bilinen bir polipeptitin iki özdeş kopyası ve hafif zincir (L) adı verilen bir polipeptitin iki özdeş kopyası vardır (Harlow ve Lane, 1988) (Şekil 3). Monomerik ünite, zincirlerin kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede iki ağır zincir arasında (ki gövde zaten sadece ağır zincirlerden meydana gelir) oluşan disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmasıyla oluşur. Hafif zincirler  $\kappa$  (kappa) veya  $\lambda$  (lambda) olmak üzere sırasıyla 2. ve 22. kromozomlar üzerinden kodlanmaktadır. Ağır zincirin, tümü 14. kromozomda kodlanan  $\mu$  (mü),  $\delta$  (delta),  $\gamma$  (gama),  $\epsilon$  (epsilon) ve  $\alpha$  (alfa) olarak adlandırılan 5 tipi vardır (Bereli, 2010; Doan ve ark., 2012). Antikorlar, içerdikleri ağır zincir polipeptit türüne bağlı olarak beş sınıfa; IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD'ye ayrılır (Harlow ve Lane, 1988) (Şekil 3).



### Şekil 3. Antikor sınıfları

(<http://www.onlinebiologynotes.com/antibody-structure-classes-functions/>, Erişim tarihi : 04.12.2018)

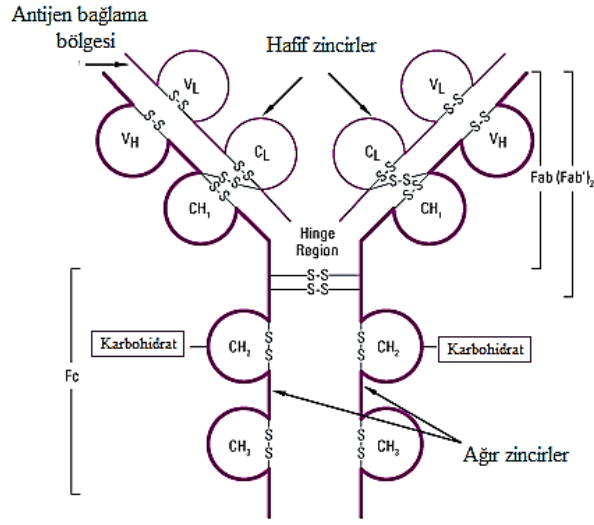
Hafif ve ağır zincirler değişken bölge (VH, VL) ve sabit bölgeye (CH, CL) ayrılırlar. Bir antikorun kollarında bulunan L ve H zincirlerinin bir uçları  $-NH_2$  ile (amin uçları) bir uçları  $-COOH$  ile (karboksil uçlar) sonlanır. Her polipeptit zincirinin amino ucuna yakın kısımları aminoasit sırası açısından zincirin kalan kısmına göre değişkenlik gösterdiğinden değişken bölge adını alır. Ig molekülünün üç boyutlu yapısı molekülün dümdüz olmadığını göstermektedir. Her zincir üzerinde disülfid bağlarıyla ilmiklenmek suretiyle oluşturulan bölgeler bulunur. Bu bölgeler domain (büklüm) olarak adlandırılır. Hafif zincir domainleri VL ve CL; ağır zincir domainleri ise VH ve birleşerek CH adı verilen sabit bölgeyi oluşturan CH1,CH2,

CH3'tür. IgM ve IgE globülinlerinde CH4 domaini de bulunur. Her domain yaklaşık 110 aminoasitten meydana gelmiştir (Bereli, 2010) (Şekil 4).

Hafif ve ağır zincirdeki değişken bükümler birlikte Ig'nin antijen bağlanma bölgesini meydana getirirler. 2 hafif ve 2 ağır zincir eş olduğundan, Ig'de bulunan iki antijen bağlanma bölgesi de eştir. Değişken bölgelerin aminoasit dizilerindeki çeşitlilik, bir B hücresinden diğerine oluşan ağır ve hafif zincirin rastgele eşleşmesi ile birlikte çok sayıda farklı epitoplara tanıyabilen bir bağlanma bölgesi havuzu oluşturur (Doan ve ark., 2012).

Antikorların önemli yapısal özelliklerinin birçoğunu, yalnızca bir yapısal Y birimi içeren ve aynı zamanda serumda en bol olan IgG antikorlarını göz önüne alarak tartışmak kolaydır (Harlow ve Lane, 1988). IgG molekülü, papain enzimi ile proteolitik olarak kesildiğinde kesim Y'nin kollarının gövdeye birleştiği yerden olur ve yaklaşık olarak eşit boyuttaki üç parçaya bölünür (Fab, Fab, Fc). Bu üç parçadan ikisi Fab (antijen bağlayan parça) olarak adlandırılan ve antikorun antijene spesifik olarak bağlanma yeteneğini taşıyan bölgedir. Fab, parça olarak tek başlarına çözüldükten antijen bağlayamaz; sadece bütün bir antikor molekülünde işlevseldir. Üçüncü fragman Fc (kristalize olabilen parça) antijen bağlayamaz; antikor molekülünün Fab bölümüne bağlanma gerçekleştikten sonra molekülün biyolojik işlevlerinden sorumludur. Fab parçalarında hem H hem de L polipeptit zincirleri bulunurken Fc parçasında yalnız H bulunur (Bereli, 2010; Coico ve Sunshine, 2009; Doan ve ark, 2012) (Şekil 4).

Pepsin enzimi ise Ig molekülünü kolların hemen altında bulunan menteşe adı verilen ve çok esnek olan bir bölgeden keser. Kesim sonucunda oluşan iki koldan ve küçük bir gövde parçasından oluşan dimerik yapı F(ab)' olarak adlandırılır (Şekil 1) (Bereli, 2010; Coico ve Sunshine, 2009; Doan ve ark, 2012; Edelman, 1970).



**Şekil 4.** Antikor yapısı

(<http://www.onlinebiologynotes.com/antibody-structure-classes-functions/>, Erişim tarihi 04.12.2018)

#### 4.2.1. Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar antijenin değişik determinantlarından belli bir epitopa özgül olarak bağlanabilen ve tek tip immüoglobülin yapısı gösteren moleküllerdir. Monoklonal antikorlar, hücre kültüründe üretilen aynı B hücre topluluğu (bir klon) tarafından sentezlenen antikorlardır. Monoklonal antikorlar homojendir ve hepsi aynı epitopu tanımaktadırlar (Harlow ve Lane, 1988).

Antikorların spesifik olarak antijenini bağlaması özelliği pratik uygulamalarda oldukça yağın olarak kullanıldığından günümüz teknolojisi ile istenilen miktarlarda sentezi yapılabilmektedir.

Monoklonal antikor teknolojisi ile antikorların saf halde ve oldukça büyük miktarlarda üretilmesi olanaklı hale gelmiştir. Bu yöntemde önce istenen antikorları doğal olarak üreten hücreler elde edilir. Daha sonra bu hücrelere sonsuz bölünme yeteneği kazandırılır ve kültür ortamında, istenen antikoru üretecek hibrid hücreler geliştirilir. Monoklonal antikor tekniğinde, seçilen hibrit hücreler tek bir tip spesifik antikor üretirler. Monoklonal antikorum epitopa özgüllüğü sayesinde, poliklonal

antikor ile tanımlanması mümkün olmayan antijenlerin tanımlanması sağlanabilmektedir (Bereli, 2010; Coico ve Sunshine, 2009; Doan ve ark., 2012).

#### **4.2.2. Poliklonal antikorlar**

Poliklonal antikorlar, bir hayvana enjekte edilen protein yapılı veya proteine bağlı olan antijene cevap olarak birçok farklı B lenfositleri tarafından üretilir. B lenfosit topluluğundaki hücreler, antijenin içindeki farklı epitoplara özgül olarak bağlanan antikorlar üretir. Böylece poliklonal preparasyonlar, proteinin farklı bölümlerini tanıyan bir antikor karışımını içerir. Serumda “poliklonal antikorlar” oluşur.

Hibridoma teknolojisinin ortaya çıkması ile poliklonal antikorların yarattığı problemler azaldığı gibi miktar ve duyarlılık yönünden daha verimli olan bu teknoloji immünoloji, biyoloji, tıp, veterinerlik sahalarındaki araştırmalara yeni bir boyut kazandırmaktadır.

Poliklonal antikorlar, vücutta B hücrelerinin yabancı bir antijenle uyarımları sonucu meydana gelen ve değişik aktivitelere sahip olan IgG, IgM ve IgA antikor izotipleri içeren heterojenik özelliklerinden dolayı spesifiteleri zayıftır. Poliklonal antikor kesimleri çapraz tepkime, düşük özgünlük gibi istenmeyen özelliklere sahiptir. Elde edilmişlerinde bir süreklilik olmaması ile birlikte bir canlıdan diğerine farklı özelliklerde poliklonal antikor karışımlarının oluşması pratik açıdan uygunluk göstermemektedir (Harlow ve Lane, 1988; Abbas ve ark, 2014).

#### **4.2.3. Antijen-antikor etkileşimi**

Bir antijenin bir antikora kovalent olmayan bağlarla bağlanma kabiliyeti “antijenite” olarak isimlendirilir. Antikor, makromoleküler bir antijene bağlandığında antijenin moleküler yüzeyinin yalnızca bir kısmıyla doğrudan bağ kurar. Antikorum veya T-hücresi reseptörünün antijenle bağ kuran kısmı “antijen bağlanma bölgesi” veya paratop olarak adlandırılır. Karşılık olarak paratop ile bağ kuran antijen bölgesine ise “antijenik determinant” veya epitop denir (Rich, ve ark., 2012).

Antijen ile antikor arasındaki bimoleküler ilişki, enzim substrat etkileşimindekine benzerdir; ancak bu etkileşim doğada tersinirdir yani antikor veya antijende geri döndürülemez bir kimyasal değişikliğe yol açmaz. Antijen-antikor etkileşimi kovalent değildir; iyonik bağ, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve Van der Waals etkileşimleri ile oluşturulur. Bütün bu etkileşimler bir kovalent bağdan zayıf olduğundan, çok küçük bir mesafe ( $1 \times 10^{-7}$  mm) içinde etkilidirler. Bu nedenle güçlü bir antijen-antikor etkileşimi, antijen ve antikor arasındaki yakınlığa bağlıdır. Antijen-antikor etkileşimlerinin tersinir olmasının sebebi de kovalent olmayan bağlar sonucunda meydana gelmeleridir (Bhattacharya, 2006).

Antijen-antikor birleşmesinde anahtar-kilit modeli geçerlidir. Antijen-antikor etkileşiminin X-ışını kristalografisi analizi, antijenik determinantın antikorda antijen bağlama bölgesi tarafından üretilen bir boşluğa yerleştiğini göstermiştir. Bu boşluğa 4-7 aminoasit veya şeker kalıntısı sığabilmektedir. (Bhattacharya, 2006). Antijen bağlama bölgesi antikorda ağır ve hafif zincirdeki değişken bölgeler tarafından oluşturulur. İki değişken bölge yakından ilişkilidir ve birbirleriyle kovalent olmayan etkileşim içindedirler. Ağır ve hafif zincirlerin geri kalanının oluşturduğu diğer bölgeler antijen bağlanmasına katılmaz. Antijen bağlanma bölgesini oluşturan aminoasitler, hem ağır hem hafif zincirlerin çok değişken bölgelerinin amino asitleridir. Çok değişken bölgeler, tamamlayıcılık belirleme bölgeleri olarak bilinir (Bhattacharya, 2006; Harlow ve Lane, 1988).

Antijen-antikor bağlanmasını tanımlamak için afinite ve avidite önemli iki belirleyicidir. Afinite, bir antikor üzerindeki tek bir antijen bağlama yeri (paratop) ile tek bir epitop arasındaki bağlanmanın gücüdür. Yüksek afiniteye sahip antikorlar, antijeni daha sıkı bağlarlar ve antijenle ayrışmazlarken düşük afiniteli antikor antijene zayıf bir şekilde bağlanır ve kolayca ayrışır. Avidite, çok sayıda antijenik determinanta sahip antijenlerle multideğerlikli antikorlar arasındaki bağlanmanın toplam gücüdür. Hem antijenin hem antikorun değeri aviditeyi etkiler. Avidite, bireysel afinitelerin toplamından daha büyüktür (Harlow ve Lane, 1988).

#### 4.2.4. Antikor immobilizasyonu ve Uygulamaları

Antijen ve antikor arasındaki etkileşimlerden yararlanılarak günümüzde immunolojik testler geliştirilmiştir. Bu testler antikorların ve antijenlerin moleküler tanınmasına dayanan; proteinler, hormonlar ve ilaçlar gibi biyomoleküllerin yanı sıra mikroorganizmaların da hassas şekilde algılanmasını sağlayan uygulamalardır. Son yıllarda bu yöntemlerin uygulama pratikliklerinde ve özgüllüklerinde gelişmeler kaydedilmiştir. Optik analizler, hızlı sinyal üretimi ve okunması ve optik sinyaller kullanmanın basitliği nedeniyle biyoanaliz için en popüler protokollerden biridir. Enzim bağlı immunosorbent testi (ELISA), kemilüminesans immünotesti (CIA), floresan immünotesti (FIA), yüzey plasmon rezonans tabanlı immünotest (SPR) ve elektrokemilüminesans immünotest (ECL) yaygın olarak kullanılan optik immünotestlerdendir. Bu immünolojik esasa dayalı testler güvenilirliği, duyarlılığı, seçiciliği ve optik sinyaller kullanmanın basitliği nedeniyle klinik immünoloji, gıda endüstrisi ve çevresel analiz alanlarında kullanılmaktadır (Yu ve ark, 2015).

Antikorum sağlam bir destek üzerine immobilizasyonu optik immünotestlerin uygulanmasında çok önemli bir adımdır. Tam işlevselliğe ulaşmak için, immobilizasyon sırasında antikorların konformasyonları değiştirilmemelidir ve aktif bölgeleri kapanmamalıdır. İmmobilizasyonda kuvars, cam, altın, demir oksit, silika ve polimerler gibi destek materyalleri kullanılmaktadır. Bu materyallerin yüzeyleri genellikle antikorların doğrudan bağlanabileceği yeterli aktif gruptan yoksundur. Bu yüzden, immobilizasyonu kolaylaştırmak için yüzeyde, antikorum Fab veya Fc kısmındaki spesifik kısımlarla reaksiyona girebilen organik bağlayıcı noktalar oluşturmak gerekir. Antikor immobilizasyonunda en önemli noktalardan biri, antikorların bağlanma bölgelerinin numune çözeltisi ile etkileşecek şekilde yönlendirilmesidir. Bu nedenle, antikor immobilizasyonundaki en hassas nokta antikorları üç boyutlu yapılarını, işlevlerini ve bağlanma yerlerini koruyarak immobilize etmektir (Yu ve ark., 2015).

Günümüzde antikor immobilizasyonunda kullanılan antikorların stabilitesini ve aktivitesini arttırdığı için nanofiberlere protein immobilizasyonunun avantajlı

olduğu belirtilmektedir (Demirkan ve ark, 2011). Elektroçekim (elektro eğirme, elektrospin) ile üretilen nanofiberlerin yüzeyine antikorlar immobilize edildiğinde bu avantaj daha da artmaktadır, bunun nedeni spesifik yüzey alanının fazla olması ve daha fazla antikorun yüzeye immobilize edilebilmesidir.

### **4.3. Keçi Sütü**

#### **4.3.1. Keçi sütünün fiziksel ve kimyasal özellikleri**

Yetiştirildiği ülke ve ırklara göre değişmekle birlikte keçi sütünün bileşimi inek ve anne sütü ile karşılaştırmalı olarak Tablo 1’de verilmiştir (Haenlein ve ark., 1984; Jenness ve ark.,1980). Keçi sütü laktoz, yağ ve protein içeriği açısından inek sütüne benzerken, anne sütü bu ikisine göre laktozdan zengindir ve daha düşük protein içermektedir (Haenlein ve ark., 1984; Jenness ve ark.,1980). Ancak keçi sütünün protein yapısı anne sütünün protein yapısına büyük benzerlik göstermektedir

Keçi sütünün yüzey gerilimi inek sütününkine yakın olmakla birlikte viskozitesi daha yüksektir. Özgül ağırlığı 1,0264-1,0425g/cm<sup>3</sup> arasında değişmektedir (Adam, 1980; Altun ve Sarıcı, 2017).

İnek ve keçi sütlerinde yağ, protein ve laktoz sırasıyla % 50, % 25 ve % 25 oranında enerji katkısı sağlarken, aynı besin öğeleri insan sütünde sırasıyla % 55, % 7 ve % 38 oranında enerji sağlamaktadır (Park, 2007).

#### **4.3.2. Keçi sütü karbohidrat içeriği**

Keçi sütünün karbohidrat içeriğinin büyük bir kısmını laktoz oluşturmaktadır. Bunun dışında oligosakkaridler de sütün karbohidrat içeriğinde yer almaktadır.

**Laktoz:** Süt şekeri olan laktoz sütün de temel karbohidratıdır. Laktoz meme bezinde süt proteini  $\alpha$ -laktoalbuminin aktif katılımı ile glukoz ve galaktozdan sentez edilen bir disakkarittir (Larson ve ark, 1994). Laktoz kalsiyum, magnezyum ve

fosforun bağırsaktan emilimine ve D vitamininin kullanımına yardım ettiği için değerli bir besindir (Campbell ve ark, 1975). Sütün sentezi ve alveolar lümen ile duktal sisteme sekresyonu boyunca, kan akımı ve meme bezindeki alveolar hücreler arasındaki osmotik denge korunur (Larson ve ark, 1994).

Foklar hariç tüm memelilerin sütünde değişik miktarlarda bulunmaktadır. Keçi sütünün laktoz içeriği inek sütünden yaklaşık % 0,2 - 0,5 daha azdır (Chandan ve ark, 1992). Keçi sütü laktoz dışında az da olsa diğer bazı karbonhidratları (oligosakkaritler ve nükleotid şekerleri) içermektedir (Larson ve ark, 1994). Fakat bunların fonksiyonel özelliklerine dair az sayıda çalışma bulunmaktadır. Süt oligosakkaritleri önemli antijenik özelliklere sahiptir ve yenidoğanın intestinal florasının büyüme ve farklılaşması için önemlidir (Park, 2007).

**Oligosakkaritler:** Memeli hayvanların süt içerikleri karşılaştırıldığında oligosakkarit içeriği en yüksek olan tür insandır (700-1200 mg/100 mL). Keçi sütü (25-30 mg/100 mL), inek sütüyle (2-3 mg/100 mL) karşılaştırıldığında oldukça yüksek oligosakkarit içeriğine sahip olup, bu özelliği bakımından anne sütüne daha yakın bileşime sahiptir. Keçi sütünde bulunan oligosakkaritler miktar olarak fazla olmalarının yanı sıra, çeşitlilik açısından da inek ve koyun sütüne göre daha zengindir (Martinez-Ferez ve ark, 2006).

**Tablo 1.** Ana besin öğelerinin keçi sütü, inek sütü ve anne sütündeki yüzde olarak dağılımları ( Hainlein, 1984; Jennes, 1980; Altun ve Sarıcı, 2017).

	Keçi sütü	İnek sütü	Anne sütü
<b>Laktoz (%)</b>	4,1	4,7	6,9
<b>Yağ (%)</b>	3,8	3,6	4
<b>Protein (%)</b>	3,4	3,2	1,2
<b>Kazein/whey</b>	80/20	80/20	40/60
<b>Protein olmayan azot (%)</b>	0,4	0,2	0,5
<b>Kalori (kcal/100 ml)</b>	70	69	68

### 4.3.3. Keçi sütü yağ içeriği

Yağlar süt ürünlerinin beslenme ve fiziksel özellikleri bakımından en önemli bileşenidir. Triaçilgliseroller (TAG) yaklaşık % 98 ile en büyük grubu oluşturur ve yüksek miktarlarda esterleşmiş yağ asitlerini içerir. Keçi sütünün lipit içeriği TAG ile birlikte diğer basit lipitler (monoaçilgliserol, diaçilgliserol, kolesterol esterleri), kompleks lipitler (fosfolipitler) ve yağda çözünen bileşiklerdir (steroller, kolesterol esterleri, hidrokarbonlar) (Haenlein ve ark, 2006). Keçi sütü ile inek sütündeki yağ küreciklerinin büyüklüğü aynı sınırlar arasında değişim göstermektedir. Fakat keçi sütünde küçük çaplı (<3.5 µm) yağ kürecikleri daha yüksek oranda bulunduğu için (% 63'e karşı % 43) daha homojen yapı kazanmakta ve sindirimi daha kolay olmaktadır (Coşkun ve Öndül, 2004). Ayrıca keçi sütü daha fazla yağ asidi içermekte, daha yüksek oranda kısa ve orta zincirli yağ asitleri (% 36) bulundurmaktadır, bu durum inek sütüne göre daha yoğun bir tat ve kokuya sahip olmasına katkıda bulunur. Lipaz bu yağ asitlerine daha kolay etki ettiğinden, keçi yağı diğerlerine göre daha kolay sindirilir. Ayrıca inek sütünden farklı olarak keçi sütü aglütinin içermediği için yüzeyinde yağ birikimi olmaz, bu durum da homojenize olmasına katkı sağlar, sindirimi ve emilimi kolaylaştırır (Haenlein ve ark, 2006).

Son yıllarda trans yağ asitlerinin fazla tüketimi koroner kalp hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Mevsime, annenin beslenmesine ve türe bağlı olmakla birlikte total yağ asitleri içerisinde trans yağ asidi oranı % 2,5 ile % 5 arasında değişmekte olup (keçi sütü % 2,7, inek sütü % 3,0, koyun sütü % 3,6), keçi sütü diğer sütlere göre nispeten daha düşük oranda trans yağ asidi içermektedir (Park, 2007).

Süt yağının içermiş olduğu yağ asitleri ve membran lipitlerinin direkt ya da parçalanma yoluyla açığa çıkan antimikrobiyal etkileri bulunabilmektedir. Sfingolipitler ve bunların aktif metabolitleri olan seramitler ve sfingozinlerin *Listeria monocytogenes* gibi bazı patojen bakteriler üzerine bakterisidal etkileri olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda deney hayvanlarında sfingolipit içerikli beslenmenin kolon kanserini geriletliğini, serum LDL kolesterol düzeyini

düşürdüğünü ve immun sistemi düzenlediğini ileri sürmüşlerdir (Akalin ve ark, 2006).

**Fosfolipidler:** Fosfolipidler metabolitler, iyonlar, hormonlar, antikorlar ve diğer hücrelerin alışverişini sağlayarak hücre membran işlevini yürütmektedirler (Weihrauch ve Son,1984; Park 2009). Keçi sütünde bulunan lipitlere ait fosfolipit fraksiyonlarının kantitatif analizinde bileşenler; % 35,4 fosfatidil ethanolamin, % 3,2 fosfatidil serin, % 4,0 fosfatidil inositol, % 28,2 fosfatidil kolin (lesitin) ve % 29,2 sfingomiyelin olarak tanımlanmıştır. Herhangi bir süt türünün fosfolipit içeriği memeli türüne, laktasyonun dönemine ve beslenme faktörlerine göre farklılık göstermekle birlikte tüm memeli sütleri birbirine yakın benzerlikte fosfolipit içeriğine sahiptir (Park, 2009).

**Konjuge Linoleik Asit (KLA) ve Butirik Asit:** Önemli doymamış yağ asitlerinden olan KLA, keçi sütünün önemli biyoaktif bileşenlerinden birisi olarak kabul edilmektedir. Koyun, inek ve keçi sütünde bulunan KLA oranlarını sırasıyla % 1,08, % 1,01 ve % 0,65 olarak bildirmişlerdir (Jahreis ve ark.,1999). Hayvan deneylerinde KLA'nın karsinogenez ve diyabeti geriletmediği, ateroskleroz oluşumunu azalttığı ve immün sistemi güçlendirdiği gösterilmiştir (Akalin ve ark., 2006). Kısa zincirli bir doymuş yağ asidi olan butirik asit, hücre büyümesi ve farklılaşmasını artırıcı, kolon kanserini geriletici etkiye sahiptir. Butirik asit oranları süt türleri içerisinde anlamlı farklılık göstermemektedir (Akalin ve ark., 2006).

**Kolesterol:** Keçi, inek ve insan sütünün kolesterol miktarı sırasıyla 11, 14 ve 14 mg/100 ml olarak bildirilmiştir (Weihrauch ve Son, 1984). Keçi sütü toplam lipit içeriği açısından inek sütünden daha yüksek değere sahip olmasına rağmen, kolesterol içeriği açısından inek ve diğer türlerin sütlerine göre daha düşük kolesterol oranına sahiptir (Weihrauch ve Son, 1984; Rodrigues ve ark, 2014). Ancak bu düşüklük, serum kolesterol düzeylerinin korunmasında çok daha dikkatli olunması gereken koroner arter hastalıklı bireylerde bile anlamlı etki oluşturacak düzeyde bir farklılık olarak görünmemektedir.

#### 4.3.4. Keçi sütü protein içeriği

Süt bileşenleri arasında, proteinler diyetin en önemli yapı taşlarından biri olarak önemli besinsel, biyolojik ve işlevsel özelliklere katkıda bulunurlar. Protein içeriği türler arasında oldukça değişkendir ve doğurma, laktasyon dönemi, beslenme, iklim, doğum sayısı mevsim ve memenin sağlık durumu gibi etmenlerden etkilenmektedir. Ortalama protein içeriği anne sütünde % 1,6, inek sütünde % 3,3 iken keçi sütünde % 4,6'dır (Adam, 1972).

Bu oran bir bebeğin günlük olarak gereksinim duyduğu enerjinin karşılanması için gerekli olan protein miktarından fazladır. Keçi, inek ve anne sütündeki minör proteinlerin karşılaştırılması Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Keçi, inek ve anne sütündeki bazı minör protein içerikleri (Qian ve ark, 1995; Baltzell ve Bazer, 1984; Altun ve Sarıcı, 2017)

	Keçi sütü	İnek Sütü	Anne Sütü
<b>Proteinler</b>			
Laktoferrin (µg/mL)	20-200	20-200	<2000
Transferrin (µg/mL)	20-200	20-200	<50
Prolaktin (µg/mL)	44	50	40-160
Folat bağlayan protein	12	8	-
<b>İmmünglobülinler</b>			
IgA (süt: µg/mL)	30-80	140	1000
IgA (kolostrum: mg/mL)	0,9-2,4	3,9	17,35
IgM (süt: µg/mL)	10-40	50	100
IgM (kolostrum: mg/mL)	1,6-5,2	4,2	1,59
IgG (süt: µg/mL)	100-400	590	40
IgG (kolostrum: mg/mL)	50-60	47,6	0,43
Protein-olmayan azot (%)	0,4	0,2	0,5

Her üç süt çeşidi de ihtiyaç duyulan amino asitleri Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Tarım Örgütü'nün önerdiği günlük alım düzeylerinin üzerinde içermektedir. Buna karşın keçi sütü protein bileşimi bakımından anne sütüne daha yakındır (Coşkun ve Öndül, 2004). Süt proteinleri iki farklı fazda oluşur. Birincisi kazeinlerden oluşan kararsız miseler faz; kalsiyum, fosfat ve az miktarda

magnezyum, sodyum, potasyum ve sitrat tarafından birleştirilir ve süte opak beyaz görünüm sağlayan kısımdır. Diğerleri ise serum (whey) proteinlerinden oluşan çözünebilir fazdır. Kazeinler oda sıcaklığında pH 4,6'da çökerken serum proteinleri aynı şartlar altında çözünebilir kalırlar (Coşkun ve Öndül, 2004).

Serum ve kazein proteinleri en yüksek biyolojik değere sahip, sindirimi kolay (% 98) ve hızlı emilip kullanılan kaliteli proteinler olarak adlandırılır. Özellikle de kazein dolaşıma yavaş ve devamlı amino asit salınımı sağladığı için beslenmede önemli bir role sahiptir (Posati ve Orr, 1976; Schaafsma, 2000). Anne sütündeki serum/kazein oranı 60/40 iken inek ve keçi sütünde bu oran 20/80'dir (Fox ve ark, 2000).

#### **4.3.4.1. Keçi sütü kazeinleri**

Keçi sütündeki temel kazeinler, inek ve koyun sütündekine benzer olmakla birlikte,  $\alpha_1$ -kazein,  $\alpha_2$ -kazein,  $\beta$ -kazein ve  $\kappa$ -kazein'den oluşmaktadır.. Amino asit yapısı ve dizilimi DNA analizi tarafından belirlenir (Martin ve ark., 2003). Kazein yapısı kazein türlerinin DNA üzerindeki yerinin genetik polimorfizmden etkilenir.  $\alpha_1$ -kazeinin polimorfizmi en ilgi duyulan ve büyük oranda çalışılmıştır. İlgili mutasyonların tipleri; tek nükleotid değişimi, delesyonlar veya geniş insersiyonlardır (Grosclaude ve ark, 1987; Roncada ve ark, 2002).

Keçi sütü kazein içeriği 16-26 gr/L arasındadır. İnek sütünde  $\alpha$ -kazeinler daha fazla bulunduğu halde, anne ve keçi sütlerinde  $\beta$ -kazeinler ana proteinlerdir. Keçi sütü daha az kazein içerir ve sıklıkla  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ 'den daha fazla oranlardadır (Mora-Gutierrez ve ark., 1991).  $\alpha_1$ -kazein protein olma özelliğinin yanı sıra peynir pıhtı oluşumunda önemli bir rol üstlenmektedir ve peynire acı bir tat verir. Keçi sütünün  $\alpha_1$ -kazein içeriği düşük olduğundan asitle pıhtılaştırmada daha kırılğan yapıda pıhtı oluşturmaktadır (Chandan ve ark.,1992). Buradan yola çıkılarak daha kırılğan yapıya sahip olan pıhtıya sindirim sistemi enzimleri tarafından daha etkin bir şekilde etki edileceği ve bu nedenle de daha kolay sindirilebilir özellikte olacağı sonucuna varılmaktadır (Telli ve Doğruer, 2014).  $\kappa$ -kazein ve özellikle  $\beta$ -kazein oranları keçi

sütünde daha yüksektir (Clark ve Sherbon, 2000). Böylece keçi sütünden yapılan peynirlerin sindirilebilirliği daha fazla olur.

İnek sütündeki kazeinlerin %55'i  $\alpha$ -kazein, %30'u  $\beta$ -kazein ve %15'i  $\kappa$ -kazein şeklindeyken, keçi sütünde %19  $\alpha$ s1-kazein, %21  $\alpha$ s2-kazein ve %60  $\beta$ -kazein bulunur. Keçi sütü kazeini inek sütüne göre en çok glisin aminoasidini, en az arjinini ve daha az sülfür içeren amino asitleri içermektedir (Clark ve Sherbon, 2000).

#### 4.3.5. Keçi sütü mineral içeriği

Keçi ve koyun sütünün mineral içeriği anne sütünden oldukça fazladır. 100 g keçi sütü yaklaşık 134 mg kalsiyum ve 121 mg fosfor içermektedir, insan sütü bu iki temel mineralin sırasıyla sadece 1/4 ve 1/8'ini içermektedir. Büyük minerallerin düzeyleri fazla değişmemekle beraber doğum, diyet, laktasyon evresi ve meme sağlığına bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (Park ve Chukwu, 1988).

Keçi sütü inek sütüne göre daha fazla kalsiyum, potasyum, magnezyum, fosfor, klor, bakır ve manganez içermektedir. Keçi ve anne sütü, inek sütüne göre daha fazla selenyum (13,3 ng/ml) içermektedir (Remeuf ve Lenoir, 1986). Fakat sodyum, demir, sülfür, çinko ve molibden yönünden inek sütüne göre fakirdir (Tablo 3).

Bu nedenle işlem görmeden doğrudan bebek beslenmesinde kullanımı uygun görülmemektedir. Ham keçi sütü ile beslenen yedi aylık bir bebekte ciddi elektrolit dengesizliği, hipernatremi (serum sodyum 176 mmol/L), azotemi ve renal disfonksiyon gelişimini tanımlamışlardır (Basnet ve ark, 2010). Keçi sütü 100 ml'de 50 mg sodyum ve 3,56 gr protein içermektedir (anne sütünün (17 mg ve 1,03 gr/100 mL) yaklaşık üç katı) (Kleinman, 2009). Altı aydan küçük bebekler için öngörülen sodyum ve protein ihtiyacı sırasıyla 100-200 mg/gün ve 9-11 g/gün'dür (Herd ve ark, 2007). Sodyum atılım kapasitesi glomerül filtrasyon hızından daha yavaş olgunlaşır ve hayatın ikinci yılına kadar tam kapasiteye çıkmaz (Aperia, 1975). Bundan dolayı ham işlenmemiş keçi sütü ile beslenen bebekler özellikle dehidratasyon varsa hipernatremi ve azotemi açısından risk altındadır. Bu durum diffüz ensefalopati, intraparakimal kanama veya trombozu içeren santral sinir sistemi bulguları ile

sonuçlanabilir (Basnet ve ark, 2010). Ayrıca dilüe edilmemiş keçi sütü ile beslenen bebeklerde metabolik asidoz geliştiği de bildirilmiştir (Jorquera ve ark, 1999; Pulina ve Becini, 2004). Keçi sütünün yüksek protein içeriğinin bu duruma katkı sağladığı üzerinde durulmaktadır.

Laktoz içeriği ile keçi ve diğer tür sütlerin sodyum ve potasyum toplam içeriği arasında yüksek düzeylerde bir ters ilişki vardır (Park ve Chukwu, 1988). Klorun potasyum ile pozitif, laktoz ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Keçi sütünün potasyum içeriğinin 1,5-1.8 gr/L olduğu ve sitrat düzeyi laktasyon süresince düşerken potasyum düzeyinin laktasyonun evresinden etkilenmediği bildirilmiştir (Konar ve ark., 1971). Keçi sütünün eser mineral içeriği ise diyet, doğum ve laktasyonun evresinden etkilenmektedir (Park ve Chukwu, 1988). Keçi sütündeki ortalama mangan, bakır, demir ve çinko düzeyleri Tablo 3'te verilmiştir. Eser mineraller içerisinde çinko daha fazla miktarlardadır, keçi ve inek sütü anne sütüne göre daha fazla çinko içermektedir (Park ve Chukwu, 1988). Keçi ve inek sütündeki demir içeriği anne sütünden belirgin düzeylerde daha düşük iken, iyot içeriği belirgin düzeylerde daha yüksektir (Tablo 3). Bu durum tiroid hormonlarının fizyolojik işlevlerinden dolayı önemlidir (Underwood, 1977).

**Tablo 3.** Keçi, inek ve anne sütünün 100 g'ındaki mineral ve vitamin içerikleri ( Park ve ark, 2007; Altun ve Sarıcı, 2017).

Mineral ve Vitaminler	Keçi sütü	İnek Sütü	Anne Sütü
<b>Mineraller</b>			
<b>Kalsiyum (mg)</b>	134	122	33
<b>Fosfor (mg)</b>	121	119	43
<b>Magnezyum (mg)</b>	16	12	4
<b>Potasyum (mg)</b>	181	152	55
<b>Sodyum (mg)</b>	50	58	17
<b>Klor (mg)</b>	150	100	60
<b>Sülfür (mg)</b>	28	32	14
<b>Demir (mg)</b>	0,07	0,08	0,20
<b>Bakır (mg)</b>	0,05	0,06	0,06
<b>Mangan (mg)</b>	0,032	0,02	0,07
<b>Çinko (mg)</b>	0,56	0,53	0,38
<b>İyot (mg)</b>	0,022	0,021	0,007
<b>Selenyum</b>	1,33	0,96	1,52
<b>Alüminyum (mg)</b>	-	-	0,06

Vitaminler			
A vitamini (IU)	185	126	190
D vitamini (IU)	2,3	2,0	1,4
Tiamin (mg)	0,068	0,045	0,017
Riboflavin (mg)	0,21	0,16	0,02
Niasin (mg)	0,27	0,08	0,17
Pantotenik asit (mg)	0,31	0,32	0,20
B <sub>6</sub> vitamini (mg)	0,046	0,042	0,011
Folik asit (µg)	1,0	5,0	5,5
Biyotin (µg)	1,5	2,0	0,4
B <sub>12</sub> vitamini (µg)	0,065	0,357	0,03
C vitamini (mg)	1,29	0,94	5,00

Sütte bulunan bazı enzimler, radikal oluşumunu engelleyebilmekte ya da radikalleri ve hidrojen peroksit ile diğer peroksitleri uzaklaştırabilmektedir. Ayrıca bu enzimler, enzimatik olmayan antioksidanların sentezi ya da yenilenmesi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Sütteki antioksidan etkiye sahip enzimlerden birisi olan glutatyon peroksidaz keçi sütünde daha fazla miktarlarda bulunur. Glutatyon peroksidaz ile ilişkili total peroksidaz aktivitesi keçi sütünde %65 olmasına karşın anne sütünde % 29, inek sütünde % 27'dir (Park ve ark, 2007).

#### 4.3.6. Keçi sütü vitamin içeriği

Keçi sütünde A vitamini miktarı inek sütüne göre daha fazladır (Tablo 3). Keçiler sütte bulunan bütün karoteni A vitaminine çevirdiğinden dolayı keçi sütü ve tereyağı inek sütünününe göre daha beyazdır. Keçi sütü bebek için yeterli miktarlarda A vitamini ve niasin desteği sağlayabilmesinin yanı sıra tiamin, riboflavin ve pantotenik asit için de fazlalığa sahiptir (Shetty, 2005). Bu nedenle bebek ilk altı ay yalnız keçi sütü ile beslenirse, protein, kalsiyum, fosfor, A vitamini, tiamin, riboflavin, niacin ve pantotenik asit açısından Dünya Sağlık Örgütü gereksinimlerine göre aşırı yüklenmiş olur. İnek sütü ile karşılaştırıldığında keçi sütü folik asit ve vitamin B12 açısından önemli düzeylerde yetersizdir. İnek sütündeki miktar keçi sütünden beş kat daha fazladır (Shetty, 2005).

Avrupa’da 1920-1930 yılları boyunca keçi sütü ile beslenen bebeklerde görülen makrositik hiperkromik megaloblastik anemi “keçi sütü anemisi” olarak adlandırılmıştır. Anne sütündeki folik asit düzeyi 50 µg/L iken keçi sütünde 6 µg/L’dir. Altı aydan küçük bebekler için günlük folat gereksinmesi 65 µg’dır ve bu miktar yaşla birlikte artmaktadır (Kleinman ve Ronald, 2009). Keçi sütü folik asitle zenginleştirilmediği veya bebeğe oral folik asit desteği verilmediği sürece, folik asit eksikliğine bağlı megaloblastik anemi gelişebilir. Hem keçi sütü hem de inek sütü piridoksin, vitamin C ve D açısından yetersizdir ve tüm bu eksik vitaminlerin bebek beslenmesi açısından desteklenmesi gereklidir (McClenathan ve Walker, 1982; Turck, 2013).

#### **4.4. Doğum Sonrası Depresyonu**

Doğum sonu dönem olarak tanımlanan süre, bebeğin doğumuyla başlayan ve gebelik sırasında kadın vücudunda oluşan değişikliklerin, gebelik öncesi duruma geri döndüğü 6-8 haftalık süreyi içermektedir (Tezel, 2005). Doğumdan sonra ilk 2-3 haftalarda sinsice başlayan ve iki yıla kadar uzayabilen depresif duygu durum bozukluğu doğum sonrası depresyon olarak tanımlanmaktadır (Kara ve ark., 2001). Doğum sonrası depresyon, kendini üzgün, endişeli, umutsuz ve yalnız hissetme gibi duygularla karakterize bir durumdur (Tezel, 2006). Doğum sonrası depresyonu “anneliği çalan bir hırsız” olarak tanımlanmıştır. Doğum sonrası depresyonunu yaşayan anneler bu durumu “yaşamaktan korkmak” ve “ölüme ısınma” dönemi olarak ifade etmişlerdir (Beck, 2002).

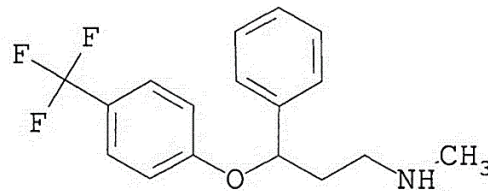
##### **4.4.1. Doğum sonrası depresyonun tedavisi**

Doğum sonrası depresyon tedavisinde psikoterapi, farmakoterapi, ya da elektrokonvulzif tedavi kullanılabilir. Seçimli serotonin geri alım inhibitörleri, trisiklik antidepresanlar ve bipolar hastalarda kullanılan lityum tedavisine en az 6 ay

devam edilir (Davidson ve ark, 2012; Wieland ve ark, 2006). Antidepresan kullanan annelerin emzirmeye devam etmeleri konusunda fikir birliği henüz sağlanmamıştır (Wieland ve ark, 2006). Çünkü bütün antidepresif ajanlar anne sütüne geçmektedir (Davidson ve ark, 2012). Emzirmenin sakıncalı olmadığını düşünenler, hem bebeğin büyüme ve gelişmesi hem de annenin iyileşmesi açısından faydalı olduğunu savunmaktadırlar (Bozkay ve Ünsal, 2006). Bunun yanı sıra, pek çok trisiklik antidepresanın, paroksetin, nortriptilin ve sertralin'in emzirme sürecinde güvenli olduğu bildirilmiştir (Bozkay ve Ünsal, 2006; Davidson ve ark, 2012; Kim ve ark, 2014). Karaciğerde metabolize edilen ilaçların hepatotoksik etkileri nedeniyle 10 haftadan büyük bebeklerde kullanılan ilaçların serum konsantrasyonları takip edilmektedir. (Bozkay ve Ünsal, 2006; Davidson ve ark., 2012; Kim ve ark, 2014). Oksepin ve fluoksetin yenidoğan sağlığı üzerine olumsuz etki gösterebilmektedir (Hendrick ve ark, 2001).

#### 4.5. Fluoksetin

N-metil-8-14-(trifluorometil) fenoksil benzen propanamin olan fluoksetin çok bilinen bir antidepresandır. Fluoksetin, majör depresyon, obsesif kompulsif bozukluk, sinirsel anoreksiya, bulimia, otizm, panik bozukluklar, obezite, alkolizm, geriatri ve kokainin deintoksasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Günlük 20-60 mg dozlarında kapsüller, tabletler veya oral solüsyonlar halinde verilir (Hussiena ve ark, 2011). Seçici serotonin geri alım inhibitörlerinden (SSRI) fluoksetinin kimyasal yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir (Jacob ve Leonard, 2003).



Şekil 5. Fluoksetinin moleküler yapısı

#### 4.5.1. Anne sütü ve fluoksetin ilişkisi

Anne sütü, bir bebeğin hayatının ilk ayları için en uygun ve mucizevi bir besindir (Beaudry, 1995). Dünyada emzirelemediği için her yıl bir milyondan fazla bebek hayatını kaybetmektedir. Türkiye’de ilk 6 ay sadece anne sütü verilme oranı 2008 yılında ise % 41,6’dır. Ancak 2013 yılında ise ilk 6 ay sadece anne sütü verilme oranı % 30 olarak bilinmektedir. Bu oranın dŐsnde annelerin tedavi amaçlı ilaç kullanmak zorunda olmalarının büyük rol oynadığı bilinmektedir (Tetik, 2017).

Emziren bir annenin kullandığı ilaçların büyük bir kısmı annenin plazmasına ve oradan da anne sütüne geçer. Anne sütüne geçen kısım süt proteinlerinin miktarına bağlıdır. Alınan ilacın süte geçmesini, ilacın iyonize olabilme özelliği etkilemektedir. İyonize olmayan ilaçların anne sütüne, iyonize olan ilaçlardan daha az miktarda geçtiği bilinmektedir. Plazmanın ve interstisyel sıvının ortalama pH değeri 7,4’tür. Zayıf asit ilaçlar, alkali sıvıda çok daha kolay çözündükleri ve proteinlere daha güçlü bir Şekilde bağlandıkları için plazmada sütte olduğundan daha yüksek konsantrasyonda kalırlar. Dolayısıyla zayıf alkali olan ilaçlar süte daha çok geçerler (Lawrence ve Lawrence, 2015).

İlaç molekülünün molekül ağırlığı ve büyüklüğü de ilacın süte geçiŐini etkileyen faktörlerdendir. Molekül ağırlığı 100 g/mol’n üzerindeki ilaçlar zardan süte geçemez. Örneğin; heparin ve insülin molekül büyüklükleri fazla olduğu için süte gememektedirler (Tetik ve Tekinemre, 2017).

Bir ilacın anne sütüne geçiŐini etkileyen faktörlerden birisi de molekülün çözünürlüğüdür. Lipit znrlĞ yüksek ilaçların sütten eliminasyonu plazmaya benzer Őekildedir. Ancak; lipit çözünürlüğü düşük olan ilaçların, anne sütü içinde eliminasyon hızı yavaŐtır ve daha uzun süre süt içinde kalmaktadır (Lawrence ve Lawrence, 2015).

Süte geçen ilacın bebeğe geçen miktarı, annenin hangi ilacı aldığı, ilacı ne Şekilde aldığı, a tok kullanım, bebeğin bağırsağındaki enzim aktivitesi gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Bebeğin ilaca olan toleransı böbrek ve karaciğerinin geliŐimine bağlı olarak değişmektedir. Çok düşük seviyede süte geçse de bazı ilaçlar,

bebekler tarafından iyi bir şekilde vücutta elimine edilemeyip organlarında birikebilir ve bu toksisite açısından oldukça önemlidir (Tetik ve Tekinemre, 2017).

Postpartum depresyonu olan birçok anne emzirme döneminde fluoksetin, sertralin ve sitalopram vb. antidepresanlar kullanmaktadır. Fluoksetin kullanan annelerin bebekleri özellikle ilk 6 ay beslenme güçlüğü, uyku bozuklukları, sinirlilik, aşırı ağlama, kusma, sulu dışkı, kolik, büyüme geriliği gibi olumsuz durumlarla karşı karşıya kalmaktadır (Hendrick ve ark, 2001).

#### **4.5.2. Fluoksetinin temel farmakolojisi**

Fluoksetin, birçok ülkede klinik olarak kullanıma sunulan ilk SSRI'dır (Preskorn, 1996). -enansiyomer ve R-enansiyomerin rasemik karışımıdır. Her iki bileşik de demetilizasyon ile aktif metabolitleri olan nor-fluoksetine çevrilirler (Gram, 1994). Fluoksetin ve norfluoksetin vücuttan yavaş yavaş atılırlar. Ana bileşiğin yarılanma ömrü 1 ile 10 gün, aktif metabolitin yarılanma ömrü ise 3 ile 30 gün arasında değişir. Fluoksetin, oral kullanımı sonrası iyi absorbe edilir ve 40mg'lık tek bir dozdan 6-8 saat sonra 1555 ng/ml arasında değişen maksimal plazma düzeyine ulaşır. % 94.5 oranında serum proteinlerine bağlanır. Sabit doz uygulamasıyla ilacın plazma kararlı durum konsantrasyonuna, tedaviye başlandıktan haftalar sonra ulaşılır. Diğer lipofilik ilaçlara benzer bir şekilde, fluoksetin 14 ile 100 L/kg arasında değişen geniş bir dağılım hacmine sahiptir ve bu da fluoksetinin dokularda yüksek oranda biriktiğini gösterir. (Catterson ve Preskorn, 1996).

#### **4.5.3. Fluoksetin metabolizması**

Fluoksetin, norfluoksetin ve çok sayıdaki diğer metabolitlerine dönüşebilmek için oldukça uzun bir yol ile önce karaciğerde metabolize edilerek aktif metaboliti nor-fluoksetine ve diğer tanımlanmamış metabolitlerine dönüşür. Sonra böbreklerden atılarak uzaklaştırılır. Fluoksetin, oral uygulamadan sonra temel olarak ürün şeklinde,

% 10'dan daha az bir kısmı değişime uğramadan veya fluoksetin N-glukuronid olarak atılır (Benfield ve ark,1986).

## **4.6. Polikaprolakton**

### **4.6.1. Polimerik malzemelere genel bakış**

Polimerler C, N, O, Si gibi atomların birbirleri ile kovalent bağ yapmaları ile meydana gelir (Baştan, 2012). Polimer biyomalzemelerin mekanik özellikleri çok düşük, süreklilik ve tokluk değerleri ise yüksektir (Bahadır, 2008).

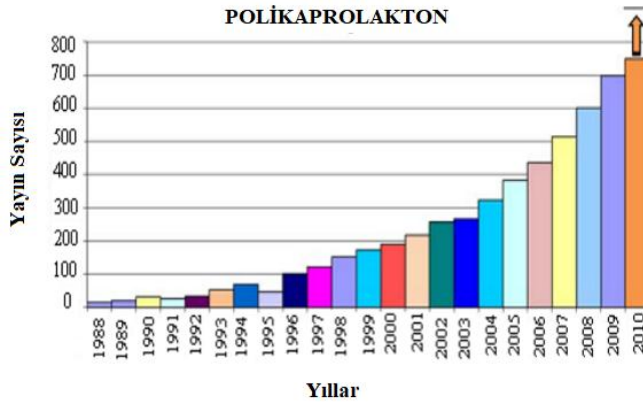
Biyomedikal amaçlı polimerlerin genellikle biyolojik ortamda bozunmadan kalmaları istenirse de bazı uygulamalarda bunun tam terside istenmektedir. Örneğin, kalça protezlerinin eklem bölgesindeki seramik ve metal kısımların birbirine zarar vermesini önlemek ve sürtünmeyi azaltmak amacıyla kullanılan polimerlerin biçim ve yapısını hastanın yaşamı boyunca koruması istendiği halde; kırık tedavisi amacı ile kullanılan polimer bir vidanın kırık iyileştikten sonra ya da vücuda uzun süreyle ilaç salmak amacıyla yerleştirilen kontrollü ilaç salınım sistemlerinin içerdikleri ilacın bitmesi ile işlevlerinin sona ermesinin ardından vücuttan çıkarılmadan oldukları yerlerde kontrollü bir biçimde parçalanması tercih edilmektedir. Bu sebeple kalça protezlerinde vücutta parçalanmayan, yüksek yoğunluklu polietilen kullanılır. Oysa diğer örneklerde poliaktid, poliglikolid, polihidroksibütirik asit gibi vücutta bozunan polimerler seçilir (Bahadır, 2008).

Çok çeşitli maddeler, hasarlı ya da tramvaya uğramış kemik dokularının tamir ve replasmanı için kullanılmıştır. Bu malzemeler, metaller, seramikler, polimerler (doğal ve sentetik) ve bunların kombinasyonlarını içerir. Metaller ve seramikler doku mühendisliği uygulamaları için iki önemli dezavantaja sahiptir: biyolojik ortamda parçalanabilme yetersizlikleri vardır ve işlenebilirlikleri çok sınırlıdır. Tersine, polimerler çok iyi tasarım esnekliğine sahiptir çünkü kompozisyonu ve yapısı özel ihtiyaçlara göre geliştirilebilir. (Liu ve Ma, 2004).

Polimerlerin olumsuzluğu ise bu malzemeler üretilirken vücut ortamında bozunmamaları için yapım ortamlarına ilave edilen kimyasalların yanı sıra üretim sırasında içlerinde kalan bazı reaksiyon başlatıcı malzemelerin ve üretim kolaylığı için kullanılan bazı maddelerin zamanla vücut ortamına sızabilmeleridir. Bunu önlenmek için biyomedikal polimerler ve onlardan yapılan cihaz ve sistemler biyoyumluluklarının tespit edilmesi amacıyla laboratuvar ortamında veya vücut sıvısı içerisinde klinik deneme protokollerine uygun olarak çeşitli koşullarda denenmektedir (Bahadır, 2008).

#### 4.6.2. Polikaprolaktonun tarihçesi

PCL, 1930'ların başında Carothers Group tarafından sentezlenen ilk polimerlerdendir (Van Natta ve ark., 1934). Ancak ticari olarak yaygınlaşması sentetik polimerlerin mikroorganizmalar tarafından bozundurulmasının ortaya çıkmasından sonra olmuştur. Özellikle de Şekil 5'de görüldüğü üzere son 20 yılda PCL üzerinde yapılan çalışmaların sayısında hızla bir artış meydana gelmiştir (Woodruff ve ark, 2010). Bu artışta PCL'nin iyi bir kopolimer veya karışım malzemesi olması da önemli rol oynamıştır.



Şekil 6. Polikaprolaktonun yıllara göre yayın sayısı dağılımı

PCL'nin biyoyumlu ve biyobozunur olması medikal uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır. Cerrahi amaçlı üretilen ipliklerde, ilaç salınım sistemi gibi biyolojik alanlar ve kolay şekil almasından dolayı naylon katkı malzemelerin

içinde ve ambalajlamada kullanılmaktadır. Ancak PCL, biyobozunurluğu çeşitli malzeme veya kopolimer yapılarıyla değiştirilebilir, kolay şekillenebilir ve farklı gözenek boyutunda üretilebilir olmasından dolayı diğer biyopolimerlere göre daha avantajlıdır (Woodruff ve ark., 2010).

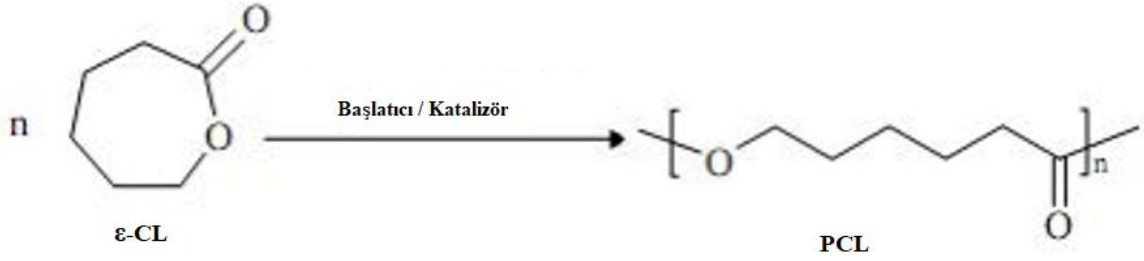
PCL, iki farklı monomerle ve farklı reaksiyonlarla sentezlenebilmektedir. Bunlardan birincisi ve en yaygın olan sentez mekanizması biyolojik veya kimyasal katalizörler yardımıyla halka açılması ve polimerizasyonu; diğeri ise 2-metil-1,3-dioksepan ile serbest radikal halka açılması ve polimerizasyonudur (Chasin ve Langer, 1990).

#### **4.6.3. Polikaprolaktonun fiziksel ve kimyasal özellikleri**

PCL monomeri  $\epsilon$ -kaprolakton olan, hidrofobik, yarı kristalin yapıda bir homopolimerdir ve camsı geçiş sıcaklığı - 60 °C, erime noktası 59 °C ile 64 °C arasındadır. Kristalin yapısı ve düşük erime sıcaklığı kolay şekil alabilir olmasını sağlamaktadır. Molekül ağırlığı 3.000 g/mol'den 100.000 g/mol'e kadar değişmektedir (Woodruff ve ark.,2010).

Molekül ağırlığına kristal yapı ters orantılı olarak etki etmektedir. Örneğin, PCL'nin % 40 kristal haldeyken molekül ağırlığı 100.000 g/mol iken kristal yapı % 80'e yükseldiğinde molekül ağırlığı 5.000 g/mol'e düşmektedir (Chasin ve Langer, 1990).

PCL oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, sikloheksan ve 2-nitropropan gibi çözücülerde yüksek çözünürlüğe; aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril gibi çözücülerde düşük çözünürlüğe sahipken; alkol, petrol eteri ve dietil eter gibi çözücülerde ise hiç çözünmemektedir (Woodruff ve ark.,2010). Yapısal olarak PCL zincirinin görünümü Şekil 7'de görünmektedir. Lineer zincir yapısı monomerdeki oksijen bağının koparak açılması sonucu oluşmaktadır.



**Şekil 7.** Polikaprolakton zincirinin görünümü

PCL'nin bir diğer önemli özelliği de birçok farklı polimerle karıştırılarak hibrid yapılar elde edilebilmesidir. Selüloz propiyonat, selüloz asetat, polilaktik asit ve polilaktik asit-ko-glikozit ile PCL harmanları gerilim ve kırılma direnci yüksek, boyanabilirliği arttırılmış ve adezyon kuvvet özelliği güçlendirilmiş yapılar olmaktadır. Bunların yanı sıra PCL-poliüretan (PU) karışımları kardiyovasküler uygulamalarda, PCL-kitosan karışımları doku mühendisliği ve ilaç taşınım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PCL'nin diğer fiziksel özellikleri Tablo 4'te verilmektedir.

**Tablo 4.** Polikaprolaktonun fiziksel özellikleri

<b>Yoğunluk (60 °C)</b>	1,1 g/cm <sup>3</sup>
<b>Viskozite (100 °C)</b>	1.500.000 mPa.s
<b>Erime Noktası (°C)</b>	59-64
<b>Parlama Noktası (°C)</b>	275
<b>Parçalanma Sıcaklığı (°C)</b>	200

#### 4.6.4. Polikaprolakton biyomalzemelerin önemi ve tıpta kullanımı

Polikaprolakton biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan biyoparçalanabilir polimerlerden biridir. Rölatif olarak düşük sıcaklıklarda ( $T_m = 60^\circ\text{C}$ ) düşük maliyet, yüksek dayanıklılık ve işlenebilmesinden dolayı son zamanlarda daha fazlakullanılmaktadır. PCL, toksik olmadığı ve osteoblastlarla oldukça uyumlu olduğu için uzun süreli implant uygulamalarında kullanılmaktadır (Mano ve ark., 2004). FDA tarafından medikal implantlar ve ilaç salım cihazları üretmek için

onaylanmış bir polimerdir. Bakteriyal enfeksiyon medikal cihazların kullanımı ile ilişkili major medikal komplikasyondur.

Polikaprolakton yüksek derecede kristallik ve hidrofobisite ile yarı-kristal alifatik poliesterdir. Hidrofobisitesi yüzey erezyonuna yol açabilir (Xu ve ark, 2006). Polimerin tamamen yıkılması kristallik derecesine bağlı olarak 2 yıllık bir periyod içinde meydana gelir (Prabhakar ve ark, 2005).

## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Randox, Alfa Aeser ve Bioo Scientific firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddelerden bazıları aşağıda belirtilmiştir.

- Norfluoksetin Antikoru (Randox, Cat. No: PAS 10027)
- Fluoksetin HCl (Sigma-Aldrich, Cat. No: PHR1394)
- Dimetilsüberimidat dihidroklorit (Alfa Aeser Cat. No: 43244)
- PCL nanofiber (Nanofiber Solutions, Z694509-6EA),
- Fluoxetine ELISA Test Kit (Bioo Scientific, Cat. No: 5051)

### 5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 5’de gösterilmiştir.

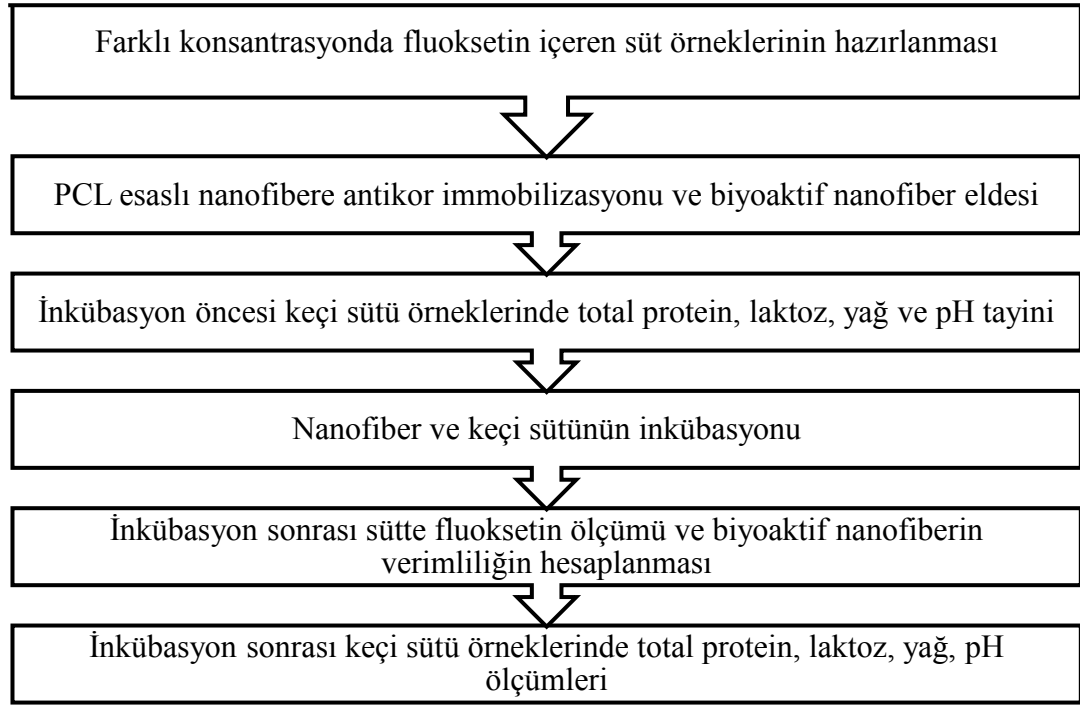
**Tablo 5.** Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Cihazlar	Markalar
Buzdolabı	Arçelik
Distile-deiyonize su cihazı	Elga, PURELAB Option Q DV25
Elektronik Terazi	Ohaus
Elisa	Rayto RT-2100C
Etüv	Nüve EN 400
Manyetik Karıştırıcı	Janke & Kunkel, IKA Labor Technic
Otomatik pipetler	Rainin
pH metre	Mettler Toledo
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Phenom World, Phenom Prox SEM
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Mikro 220 R Mikro Santrifüj
Spektrofotometre	Rayleigh-UV-1800
Su Banyosu (100 °C)	Nüve, BT 400
Vortex	Janke & Kunkel, IKA Labor Technic

### 5.3. Gereç ve Yöntemin Aşamaları

Çalışmamızın gereç ve yönteminin aşamaları Tablo 6’da verilmiştir.

**Tablo 6.** Kullanılan Yöntemin Aşamaları



#### 5.3.1. Fluoksetin içeren keçi sütü örneklerinin hazırlanması

Günlük keçi sütü örnekleri her gün Baltalı firmasından taze olarak temin edilmiştir. Keçi sütü örneklerine 25, 50, 75, 100 ng/ml olacak şekilde fluoksetin ilave edilerek 4 farklı konsantrasyon denemesi için numuneler hazırlanmıştır.

Keçi sütü örneklerinde; deneylere başlamadan önce, fluoksetin eklendikten sonra ve fluoksetin süttten biyoaktif nanofiber ile uzaklaştırıldıktan sonra total protein, laktoz, yağ ve pH tayinleri yapılmıştır ve süt örneklerinin enerji değeri hesaplanmıştır.

### 5.3.2. Polikaprolakton esaslı nanofibere antikor immobilizasyonu

PCL esaslı nanofiber, Nanofiber Solutions firmasından satın alınmıştır (Şekil 8).

Garcinuno ve arkadaşlarının immobilizasyon metodu temel alınarak nanofibere fluoksetin antikorunu immobilize edilmiştir. (Garcinuno ve ark., 2000).



Şekil 8. PCL esaslı nanofiber

#### Gerekli Çözeltiler

- **Stok Fosfat Tamponu (0,2 M PBS, pH=7,2) :** 9,36 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 19,87 g  $\text{NaHPO}_4$ , ve 87,75 g  $\text{NaCl}$  ayrı ayrı tartılır, biraz distile suda çözündürülür ve hacmi 1 litreye distile su ile tamamlanır. (Hacim 1 L'ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 7,2'ye ayarlanır).
- **Fosfat Tamponu (0,02 M PBS pH=7,2) :** Stok fosfat tamponundan 100 mL alınır ve distile su ile hacmi 1 litreye tamamlanır.
- **Borat Tamponu (0,1 M, pH=8) :** 5,87 g borik asit ve 1,91 g sodyum tetra borat ayrı ayrı tartılır, biraz distile suda çözündürülür hacmi 1 litreye distile su ile tamamlanır. (Hacim 1 L ye tamamlanmadan önce pH kontrol edilir, pH 8'e ayarlanır).
- **Dimetil Süberimidat Çözeltisi (0,02 M):** 0,5 g Dimetil süberimidat dihidroklorür tartılır ve hacmi 100 mL'ye borat tamponu ile tamamlanır.
- **Potasyum Tiyosiyanat Çözeltisi (0,05 M KSCN) :** 1,215g  $\text{KSCN}$  tartılır ve 250 mL'ye distile su ile tamamlanır.

### **5.3.3. Nanofiber üzerine antikor immobilizasyonu ve biyoaktif nanofiber eldesi**

İmmobilizasyonda kullanılan antikorun konsantrasyonu ön deneme çalışmaları ile belirlenmiştir.

#### **5.3.3.1. Nanofiber-antikor muamelesi**

Nanofiberin üzerinde 20 µg olacak şekilde antikor seyreltilerek eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.

#### **5.3.3.2. İki saat inkübasyon sonrasında yapılan yıkama işlemleri**

İnkübasyon süresi sona erdiğinde nanofiber yüzeyine bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için antikora fosfat tamponu ve daha sonra Borat Tamponu ile yıkanmıştır.

#### **5.3.3.3. Nanofiber-antikor bağlanmasını güçlendirme aşaması**

Dimetilsüberimidat çözeltisinden nanofiber üzerine eklenerek tüpler oda sıcaklığında 5 saat inkübe edilmiştir.

#### **5.3.3.4. İnkübasyon sonrasında yapılan yıkama işlemleri**

Beş saatlik inkübasyon sona erdiğinde nanofiber, antikora spesifik fosfat tamponu ile yıkanmıştır.

#### **5.3.3.5. Bağlanmayan antikorları uzaklaştırma aşaması**

İmmobilizasyon işlemleri sırasında bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak amacıyla nanofiberin üzerine KSCN çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir.

### 5.3.3.6. İnkübasyon sonrası yapılan yıkama işlemleri

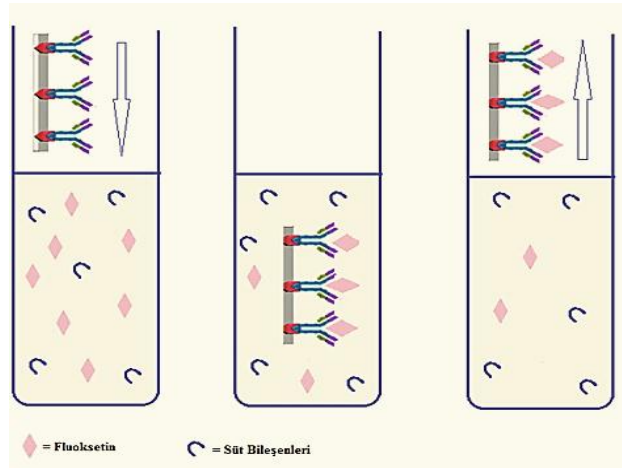
Yirmidört saatlik inkübasyon sona erdiğinde antikora spesifik fosfat tamponu ile nanofiber yıkanmıştır.

### 5.3.3.7. Hazırlanan biyoaktif nanofiberin saklanması

Yıkama aşamalarının ardından nanofiber antikora spesifik fosfat tamponu içinde +4°C saklanmıştır.

### 5.3.4. Biyoaktif nanofiber ile fluoksetin içeren süt örneklerinin inkübasyonu

25, 50, 75, 100 ng/mL olacak şekilde keçi sütüne eklenen fluoksetin, antikor immobilizasyonu yapılmış olan nanofiber ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi (Şekil 9).



Şekil 9. Biyoaktif nanofiber ile süttten fluoksetinin uzaklaştırılması

### 5.3.5. Bioaktif nanofiber kullanarak süttten fluoksetinin uzaklaştırılması

25, 50, 75, 100 ng/mL fluoksetin içeren süt örnekleri ve biyoaktif nanofiber oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra nanofiber süt çıkarılmış ve süt örneklerinde kalan fluoksetin konsantrasyonu, ELISA test kiti kullanılarak ölçülmüştür.

### 5.3.3. Antikor immobilizasyonu ve süt inkübasyonu sonrası taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile nanofiber karakterizasyonu

PCL esaslı nanofiberin karakterizasyonu antikor immobilize edilmeden önce, antikor immobilize edildikten sonra ve nanofiberin fluoksetin içeren süt ile inkübasyonundan sonra PhenomWorld marka, Phenom Prox model SEM sistemi ile belirlenmiştir.

### 5.3.5. Keçi sütü total protein tayini

Keçi sütü örneklerinde protein tayini inkübasyon öncesi ve sonrasında Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

**Prensip:** Bradford yönteminde; Coomassie Brilliant blue (CBB) boyasının proteinlere bağlanması ile 365-595 nm arasında maksimum absorban oluşmaktadır (Bradford, 1976). Asidik boya genel olarak arjinin ve lizin kalıntılarına bağlanır, serbest aminoasitlere bağlanmaz. Bu ölçümde oluşan renk bir saat kadar stabildir. Proteine boya bağlanma işlemi 2 dakika içinde tamamlanır. Bu yöntemin ölçüm aralığı: 5-1500 mg/L ve alt ölçüm sınırı: 5 mg/L'dir.

#### Gerekli çözeltiler:

- **Stok CBB Çözeltisi:** 1 g Brilliant Blue G-250 tartılır, biraz distile su ile çözülür ve hacmi 100 mL'ye tamamlanır.
- **CBB Çözeltisi Reaktif:** Stok CBB çözeltisinden 1 mL alınır. Üzerine 4,75 mL etanol (% 95), 10 mL o-fosforik asit (% 85) eklenip çözülür ve hacim 100 mL'ye distile su ile tamamlanır. Bu çözelti her protein tayini öncesinde taze hazırlanıp kullanılır. Tayin sırasında bu çözelti 1/5 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılır.
- **Serum fizyolojik (% 0,9 g NaCl):** 0,9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanır.

- **Stok Protein Standartı Çözeltisinin Hazırlanması (% 100 mg lık albumin çözeltisi):**100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye serum fizyolojik ile tamamlanır.
- **Protein çalışma standart çözeltileri:** Stok çözeltilerden uygun hacimler alınarak % 5, 10, 15, 20 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır.

Total protein tayini Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7:** Total protein tayini yöntemi

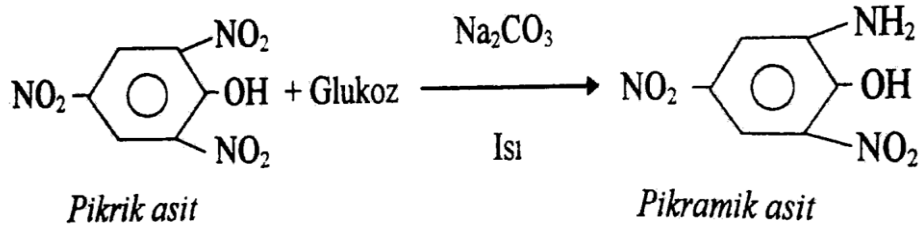
	Kör (K)	Numune (N)	St1 % 5 mg Albumin	St2 % 10 mg Albumin	St3 % 15 mg Albumin	St4 % 20 mg Albumin
Albumin (% 100mg)	-	-	5 µl	10 µl	15 µl	20
Keçi Sütü (1:200)	-	100 µl	-	-	-	-
Serum Fizyolojik	100 µl	-	95 µl	90 µl	85 µl	80 µl
CBB Reaktif (1:5)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Tüm çözeltiler eklendikten sonra 2 dk beklenir						
Vortekste karıştırılır						
Karanlıkta (benç dolabında) 5 dk bekletilir						
595 nm'de absorbans ölçülür. Standart grafiği çizilir ve sütteki protein miktarı hesaplanır						

\*Standart grafiği çizilerek hesaplama yapılır.

### 5.3.6. Keçi sütü laktoz tayini

Keçi sütü örneklerinde inkübasyon öncesi ve sonrası laktoz tayini Khramov ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Khramov ve ark, 2008).

**Prensip:** Bu test indirgeyici şekerlerin, sarı renkli pikrik asit çözeltisini koyu kırmızı renkli pikramik asite çevirmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. Laktoz tayini tepkimesi

#### Gerekli çözeltiler:

- **Sodyum Karbonat Çözeltisi (% 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):** 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> biraz suda çözülür hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.
- **Pikrit Asit Çözeltisi (% 5 g Pikrik Asit):** 5 g pikrik asit tartılır biraz suda çözülüp distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanır. Çözünmeyen kısım filtre edilir. Filtrat, oda sıcaklığında karanlıkta saklanır.
- **Laktoz Standartı Çözeltisinin Hazırlanması (% 10 mg'lık laktoz çözeltisi):** 10 mg laktoz bir miktar % 5 pikrik asit çözeltisinde çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanır.
- **Laktoz Çalışma Standart Çözeltileri:** Stok laktoz standartından çözeltilen uygun hacimler alınarak % 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 mg laktoz ihtiva edecek şekilde % 5 pikrik asit ile seyreltilerek hazırlanır.

- **Laktoz Tayini için süt numunesinin hazırlanması:** 0,1 mL süt tüpe alınır ve üzerine 9,9 mL % 5 pikrik asit çözeltisi ilave edilip 5 dk beklenir ve süzgeç kağıdı kullanılarak süzülür . Deney sırasında numune olarak hazırlanan bu filtrat kullanılır.

Laktoz tayini Tablo 8’de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** Laktoz tayini yöntemi

	<b>Kör (K)</b>	<b>Numune (N)</b>	<b>St1 % 1 mg Laktoz</b>	<b>St2 % 2 mg Laktoz</b>	<b>St3 % 4 mg Laktoz</b>	<b>St4 % 6 mg Laktoz</b>	<b>St4 % 8 mg Laktoz</b>	<b>St4 % 10mg Laktoz</b>
<b>% 5’lik Pikrik Asit Çözeltisi</b>	1000 µl	-	990 µl	980 µl	960 µl	940 µl	920 µl	900 µl
<b>Süt Numunesi</b>	-	1000 µl	-	-	-	-	-	-
<b>Laktoz Standartı (% 100 mg)</b>	-	-	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl
<b>% 20 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Su banyosunda 100°C’de 20 dk kaynatılır.								
Su banyosundan alınan tüpler soğutulur ve üzerine 8 mL distile su eklenir.								
520 nm’de absorbans ölçülür.								

\*Standart grafiği çizilerek hesaplama yapılır.

### 5.3.7. Keçi sütü yağ tayini

Keçi sütü örneklerinde yağ tayini inkübasyon öncesi ve sonrasında süte uyarlanmış Lucas ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Lucas ve ark, 1978).

**Prensip:** Süt örneklerinin yağ içeriğinin ölçümü için geliştirilen bu mikro metodun prensibi süt örneklerinin heparinsiz hematokrit tüpü içerisinde santrifüj edilmesine dayanmaktadır.

#### Deneyin Yapılışı

**Tablo 9.** Yağ tayini yöntemi

Süt örnekleri heparinsiz kılcal tüp içine alınır ve bir ucu kapatılır.
12000 rpm’de 40 dk boyunca santrifüj edilir.
Santrifüj sonunda tüpün ucundaki yağ tabakasının yüksekliği bir büyüteç yardımı ile ölçülür.

**Hesaplama:** % Krematokrit =  $\frac{\text{Krema tabakasının yüksekliği} \times 100}{(\text{Krema} + \text{Sıvı}) \text{ tabakasının yüksekliği}}$

### 5.3.8. Süt örneklerinin biyoaktif nanofiber ile inkübasyonu sonrasında yapılan fluoksetin tayini

İnkübasyon sonrası biyoaktif nanofiberin üzerine bağlanmayan fluoksetin süt örneklerinde ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

**Testin prensibi:** Fluoksetinin spesifik antikorlar tarafından tanındığı yarışmalı ELISA tekniğidir. Fluoksetin konsantrasyonu 450 nm’de elde edilen sinyalin miktarı ile orantılıdır.

Deneyin yapılışı Tablo 10’da gösterilmiştir.

### Ön Hazırlıklar

- 1X HRP-bağlı antikor 1:99 oranında Antikor seyreltme çözeltisi ile seyreltilir.
- 1 Hacim 10X PBS 9 hacim distile su ile 1X'lik PBS hazırlanır.
- 1 Hacim 20X'lik yıkama tamponu 19 hacim distile su ile seyreltilerek 1X yıkama tamponu hazırlanır.

### Standartların Hazırlanması

- 1X'lik PBS kullanılarak 1000 ng/ml'lik fluoksetin standart çözeltisinden gerekli miktarlarda alınarak 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 ve 20 ng/mL standartlar 1:5 seyreltilmiş günlük keçi sütüyle hazırlanır. 1:5 seyreltilmiş günlük keçi sütü kör olarak kullanılır.

**Tablo 10.** Fluoksetinin ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmesi

1-	100 µl hazırlanan fluoksetin standartları kuyucuklara konur.
2-	100 µl örnekler kuyucuklara yüklenir.
3-	100 µl fluoksetin antikorunu kuyucuklara eklenir ve 1 dk. çalkalanır.
4-	Oda Sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılır.
5-	3 kez 250 µl yıkama tamponu ile yıkama yapılır.
6-	150 µl 1X HRP-bağlı antikor eklenir.
7-	Oda Sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakılır.
8-	3 kez 250 µl 1X yıkama tamponu ile yıkama yapılır.
9-	100 µl TMB eklenir ve 1 dk karıştırıcıda çalkalanır.
10-	Oda Sıcaklığında 10-30 dk inkübasyona bırakılır.
11-	100 µl durdurma çözeltisi eklenir.
12-	450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusu kullanılarak absorbans değerleri okunur.

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametil benzidin, **HRP:** Horse Radish peroksidaz

### 5.3.9. Keçi sütü pH ölçümü

Süt örneklerinde pH ölçümü; Mettler Toledo marka pH ölçüm elektrodu kullanılarak yapılmıştır.

### 5.3.10. Enerji değerinin hesaplanması

Enerji veren maddelerin birer gramının oksitlendiğinde vücuda sağladığı ortalama enerji miktarları:

Protein : 4,0 kal, Karbonhidrat : 4,0 kal, Yağ : 9,0 kal

Süt örneklerinin enerji değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Baysal, 2009).

$$\text{Enerji (kcal)} = (\text{Yağ} \times 9) + (\text{Protein} \times 4) + (\text{Karbohidrat} \times 4)$$

### 5.3.11. Biyoaktif Nanofiberin Verimliliğın Analitik Doğrulaması

Biyoaktif nanofiberin etkinliğı, Analitik Kimyacılar Derneğı'nin (AOAC, Association of Official Analytical Chemists) kılavuzu doğrultusunda incelenmiştir. Biyoaktif nanofiberin bağıl standart sapması (%RSD ve tekrarlanabilirlik limiti (r)'nin hesaplanması için her fluoksetin konsantrasyonu (25, 50, 75, 100 ng/mL) başına 10 kez deneme yapılmıştır. Biyoaktif nanofiberin ortalama verim değerleri kullanılarak geri kazanım sonuçları belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik, laboratuvarımızda yapılan tekrar ölçümlerden elde edilmiş olup aynı gereç ve yöntem kullanılarak kısa bir zaman aralığında aynı kişi tarafından yapılmıştır.

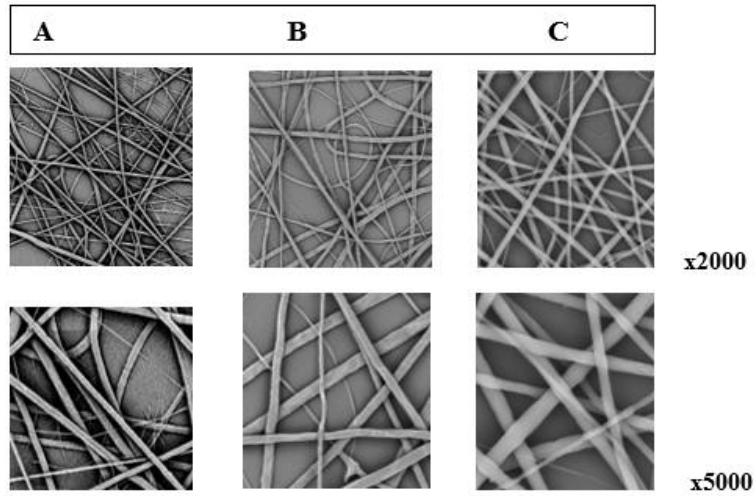
### **5.3.12. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Yazılımı, San Diego; CA; ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve tüm veriler ortalama ve standart sapma olarak sunulmuştur. Farklı fluoksetin konsantrasyonlarının süttten uzaklaştırılma verimleri ANOVA testi ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak yapılmıştır.  $p < 0,05$  olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Antikor immobilizasyonu ve süt inkübasyonu sonrası taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile nanofiber karakterizasyonunun değerlendirilmesi

Polikaprolakton esaslı nanofiberlerin çapı 700 nm'dir ve fiber yapıları %90'nın üzerinde poroziteye sahiptir. Fiber tabakasının kalınlığı ise 20 mikrondur. PCL esaslı nanofibere ait antikor immobilizasyonu sonrası ve süt inkübasyonu sonrasına ait SEM görüntüleri Şekil 8'de sunulmuştur. SEM görüntülerinden boncuksuz, rastgele kıvrımlı ve seyrek atımlı bir nanofiber olduğu gözlenmektedir. Fluoksetin antikorunun immobilizasyonu, PCL esaslı nanofiberin yüzey morfolojisini değiştirmemiştir (Şekil 10).



Şekil 11. Nanofiberin SEM görüntüleri

(A) orijinal PCL nanofiber (B) Antikor immobilizasyonu sonra PCL nanofiber (C) Fluoksetin içeren süt ile inkübasyon sonrası PCL nanofiber

## 6.2. Keçi sütünden fluoksetin uzaklaştırılmadan önce ve uzaklaştırıldıktan sonra süt bileşimi

Biyoaktif nanofiberin 25, 50, 75 veya 100 ng / mL fluoksetin içeren süt örnekleri ile inkübasyonu, sütün toplam protein, yağ, laktoz, enerji ve pH değerlerini istatistiksel olarak anlamlı derecede değiştirmemiştir (Tablo 11, 12, 13 ve 14).

## 6.3. 25 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar

25 ng/mL fluoksetin eklenen sütün total protein, laktoz, yağ, pH ve enerji düzeylerinde biyoaktif nanofiber ile inkübasyon öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 11).

**Tablo 11.** 25 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre ile inkübasyonu öncesi ve sonrası sütün kompozisyonu

Sütte Fluoksetin Konsantrasyonları (25 ng/mL)	Filtre Öncesi (n=10)		Filtre Sonrası (n=10)	
	Mean	SS	Mean	SS
<b>Protein (g/mL)</b>	2,56	0,08	2,54	0,11
<b>Laktoz (g/mL)</b>	4,65	0,07	4,67	0,10
<b>Yağ (g/mL)</b>	3,32	0,06	3,32	0,07
<b>Enerji (kcal/mL)</b>	58,7	0,80	58,6	0,07
<b>pH</b>	6,75	0,27	6,75	0,27

SS: Standart sapma

#### 6.4. 50 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar

50 ng/mL fluoksetin eklenen sütün total protein, laktoz, yağ, pH ve enerji düzeylerinde biyoaktif nanofiber ile inkübasyon öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 12).

**Tablo 12.** 50 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre ile inkübasyon öncesi ve sonrası sütün kompozisyonu

Sütte Fluoksetin Konsantrasyonları (50 ng/mL)	Filtre Öncesi (n=10)		Filtre Sonrası (n=10)	
	Mean	SS	Mean	SS
Protein (g/mL)	2,70	0,07	2,65	0,08
Laktoz (g/mL)	4,50	0,07	4,54	0,08
Yağ (g/mL)	3,31	0,08	3,31	0,08
Enerji (kcal/mL)	58,6	0,70	58,6	0,08
pH	6,92	0,20	6,83	0,26

SS: Standart sapma

#### 6.5. 75 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar

75 ng/mL fluoksetin eklenen sütün total protein, laktoz, yağ, pH ve enerji düzeylerinde biyoaktif nanofiber ile inkübasyon öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 13).

**Tablo 13.** 75 ng/mL fluoksetin eklenen süt örneklerinin biyoaktif filtre ile inkübasyonu öncesi ve sonrası sütün kompozisyonu

Sütte Fluoksetin Konsantrasyonları (75 ng/mL)	Filtre Öncesi (n=10)		Filtre Sonrası (n=10)	
	Mean	SS	Mean	SS
Protein (g/mL)	2,75	0,08	2,69	0,09
Laktoz (g/mL)	4,47	0,15	4,46	0,13
Yağ (g/mL)	3,33	0,06	3,33	0,06
Enerji (kcal/mL)	58,9	0,90	58,6	0,90
pH	6,92	0,20	6,92	0,20

## 6.6. 100 ng/mL fluoksetin eklenen sütün kompozisyonu ile ilgili sonuçlar

100 ng/mL fluoksetin eklenen sütün total protein, laktoz, yağ, pH ve enerji düzeylerinde biyoaktif nanofiber ile inkübasyon öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 14).

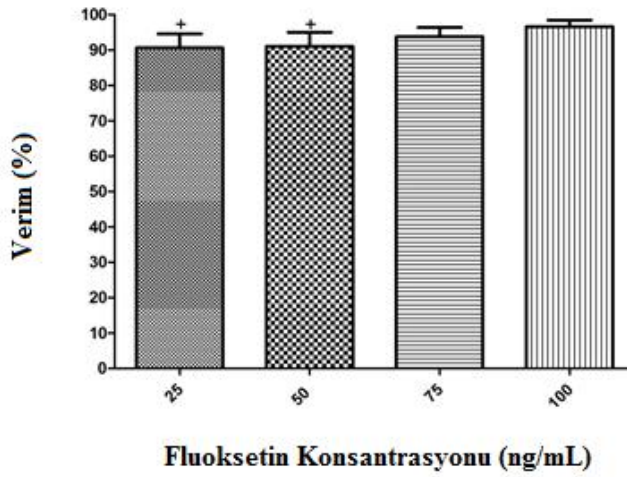
**Tablo 14:** 100 ng/mL fluoksetin eklenen sütün örneklerinin biyoaktif filtre ile inkübasyonu öncesi ve sonrası sütün kompozisyonu

Sütte Fluoksetin Konsantrasyonları (100 ng/mL)	Filtre Öncesi (n=10)		Filtre Sonrası (n=10)	
	Mean	SS	Mean	SS
Protein (g/mL)	2,23	0,07	2,27	0,11
Laktoz (g/mL)	4,13	0,24	4,23	0,15
Yağ (g/mL)	3,34	0,05	3,34	0,08
Enerji (kcal/mL)	55,4	0,9	55,4	0,91
pH	6,83	0,36	6,83	0,26

SS: Standart sapma

### 6.7. Biyoaktif nanofiberin 25, 50, 75 ve 100 ng/mL fluoksetin içeren süt ile inkübasyonundan sonra elde edilen verim sonuçları

Bioaktif nanofiber ile süte eklenen 25, 50, 75 ve 100 ng/mL fluoksetinin uzaklaştırılması ile elde edilen % verim sonuçları Şekil 12’da gösterilmiştir. Biyoaktif nanofiber kullanılarak süttten fluoksetinin ortalama uzaklaştırılma etkinliği % 93,6 olarak bulunmuştur. Biyoaktif nanofiber ile sütte 25 ve 50 ng/mL fluoksetinin uzaklaştırılması, 100 ng/mL fluoksetinin uzaklaştırılmasından anlamlı ölçüde daha düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ; Şekil 12, Tablo 15).



(+): 100ng/mL fluoksetin içeren süte göre anlamlı;  $p < 0.05$

Şekil 12. Biyoaktif nanofiberin filtrasyon sonrası % verim değerleri

Tablo 15. Biyoaktif nanofiberin filtrasyon sonrası % verim değerleri

Sütte Fluoksetin Konsantrasyonları (ng/mL)	25 ng/mL Fluoksetin n=10		50 ng/mL Fluoksetin n=10		75 ng/mL Fluoksetin n=10		100 ng/mL Fluoksetin n=10	
	Ort	SS	Ort	SS	Ort	SD	Ort	SD
% Verim	90,64	± 3,94	91,07	± 3,94	93,82	± 2,54	96,63	± 1,84

Değerler ortalama (Ort) ve standart sapma (SS) biçiminde verilmiştir.

## 6.8. Süt örneklerinde nanofiber verimliliğın analitik doğrulaması

Farklı konsantrasyonlarda süte eklenen fluoksetin biyoaktif nanofiber ile birlikte süttten uzaklaştırılmıştır. Sonuçların tekrarlanabilir olması için bağıl standart sapma yüzdesinin (% RSD) 20'nin altında olması ve tekrarlanan sonuçlar arasındaki farkın tekrarlanabilirlik limitinin (r) altında olması gerekir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda tekrarlanabilirlik kabul edilebilir sınırlar içerisinde bulunmuştur (Tablo 16).

Tablo 16 aynı zamanda % geri kazanım değerini göstermektedir. % geri kazanım değerleri biyoaktif nanofiberin çalışma etkinliğini gösteren verim yüzdesi değeri ile aynı değerdir.

**Tablo 16.** Sütte Kullanılan Biyoaktif Nanofiberin Geri Kazanım ve Tekrarlanabilirliğı

<b>Eklenen Fluoksetin Konsantrasyonu (ng/mL)</b>	<b>Tekrarlanabilirlik (RSD) %</b>	<b>Tekrarlanabilirlik limiti (r)</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>
25	4,35	17,7	91
50	4,33	17,7	91
75	2,70	11,4	94
100	1,90	8,3	97

RSD: Bağıl Standard Sapma, r: Tekrarlanabilirlik limiti, n= 10.

## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kimyasal ve biyokimyasal bileşiklerin tanınmasında kullanılan nano boyutlu malzemelerin geliştirilebilir özelliğe sahip oldukları belirtilmiştir. Bu nedenle nano boyutlu malzemelerin biyo-algılamada kullanılmak üzere sentezlenmesi, karakterizasyonu ve geliştirilmesi konuları öne çıkan araştırma alanları arasında kabul edilmektedir. Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler (Coulet, 2010; Mulchandani 1991; Yeğenoğlu 2013). Elektro çekim yöntemi kullanılarak hazırlanan nanofiberler ise esnek ve sağlam yapılı nano malzemelerdir. Bükülerek veya kıvrılarak yapıları bozulmadığı için istenilen boyut ve şekilde kullanılabilir. Ayrıca fiber kalınlığının ayarlanabilir olması nanofiberlerin uygulama kolaylığını artırmaktadır. Kim ve arkadaşları (2010) protein immobilizasyonu işlemlerinde 3 boyutlu nanoyüzeylerin düz yüzeylere göre daha pürüzsüz ve geniş bir alan oluşturduğunu ve bu yolla 5 kat daha fazla proteinin nanoyüzeye immobilize edilebileceğini belirtmişlerdir. Nanofiberlerin geniş yüzey alanına ve yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmasından dolayı üç boyutlu ağ yapı içerisinde antikorlar oldukça kuvvetli bir şekilde bağlanmaktadır. Çalışmamızda sütteki fluoksetini uzaklaştırmak için antikor immobilizasyonu yapılarak PCL esaslı nanofiber biyoaktif yüzey haline getirilmiştir.

PCL, son yıllarda özellikle kontrollü ilaç salınım sistemlerinde, biyomedikal alanlarda, emilime uğrayan cerrahi dikiş ipliklerinde, doku mühendisliğinde ve üç boyutlu (3-D) doku iskelelerinde kullanımı ile dikkat çeken bir sentetik alifatik bir poliesterdir (Dash ve Konkomella, 2012). PCL'nin FDA tarafından onaylanmış bir polimer olması tıbbi malzeme olarak kullanımını gün geçtikçe arttırmaktadır.

Bu çalışmamızda PCL esaslı nanofiberlere antikor immobilizasyonu Garcinuno ve arkadaşlarının metodu kullanılarak yapılmıştır. Gacinuno ve arkadaşları silika yapılı ve gözenekli küreciklerin üzerine antikor immobilizasyonunda kovalent bağlama ajanı olarak karbodiimid, dimetilpimelidat, dimetilsuberimidat ve glutaraldehid kullanmışlar ve en iyi antikor immobilizasyonunun suberimidat

kullanılarak yapılan antikor immobilizasyonu olduğunu belirtmişlerdir (Garcinuno ve ark., 2000).

Garcinuno ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer şekilde bu çalışmada PCL esaslı nanofibere antikor immobilizasyonunda dimetil süberimidat kovalent bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Tunali-Akbay ve arkadaşları (2018) polivinil alkol/poliakrilik asit esaslı nanofiber üzerine fluoksetin antikorunun immobilizasyonunda da dimetilsüberimidat kullanarak yüksek etkinliğe sahip biyoaktif nanofiber hazırlamışlardır. Tunalı ve arkadaşları aynı çalışmada fluoksetini inek sütünden % 94, anne sütünden % 98 oranında uzaklaştırmıştır. Tunalı ve arkadaşları bir başka çalışmalarında süt örneklerindeki teofilini gözenekli cam kürecikler üzerine immobilize ettikleri teofilin antikoru aracılığı ile % 96 oranında uzaklaştırmışlar ve daha sonra uzaklaştırdıkları teofilini spektrofotometrik olarak ölçmek için metot geliştirmişlerdir. (Tunalı-Akbay T, baskıda).

Saallaha ve arkadaşlarının çalışmasında PVA ile birlikte su içerisinde çözdürülmüş siklodekstrin glukano transferaz enzimlerinden elektro çekim yöntemiyle nanofiberler elde edilmiş ve nanofiberler gluteraldehit ile işleme tabi tutularak enzimlerin nanofiber içerisinde çapraz bağlanma yöntemiyle immobilize olması sağlanmıştır. Bu şekilde yapılan enzim immobilizasyonu ile enzimin aktivitesi % 31 oranında arttırılmıştır (Saallaha ve ark. 2016).

Elektro çekim yöntemi ile üretilen kitosan/PVA nanofiberlerinden, PVA 0.5 M sodyum hidroksit (NaOH) ile muamele edilerek nanofiberden ayrılmıştır. Elde edilen yüksek yüzey alanı ve gözeneğe sahip kitosan nanofiberlere lipaz enzimi, gluteraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda kitosan nanofiber yüzeylerinin enzim stabilizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Huang ve ark. 2011).

Poliamid (PA) 6,6 nanofiber yüzeyleri proteaz ile modifiye edildikten sonra lakkaz enzimi immobilize edilerek immobilizasyon verimliliği test edilmiştir (Silva ve ark. 2007). Kolay bulunabilir ve ucuz bir malzeme olan PA 6,6'dan elde edilen nanofiberlerin enzim immobilizasyonu için uygun bir malzeme olabileceği bildirilmiştir.

Song ve arkadaşları (2012) PCL nanofiberlere lipaz enziminin immobilizasyonu sonucunda enzim aktivitesinin su ve organik çözücüler içinde arttığını belirtmişlerdir.

Zhang ve arkadaşları (2016), gözeneksiz selüloz asetat (SA) nanofiber, organik montmorillonit katkı gözeneksiz SA nanofiber, gözenekli SA nanofiber ve organik montmorillonit katkı gözenekli SA nanofiber olmak üzere dört farklı tipte hazırladıkları nanofiberlerin enzim immobilizasyonunda kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Organik montmorillonit eklenmesinin gözenekli oluşan SA nanofiberlerde immobilize enzimlerin depolanma ve kullanım stabilitelerini arttırdığını belirtilmiştir.

Çalışmamızda PCL daha önceki kullanım alanlarının dışında, bir ilk olarak, süttten istenmeyen bir maddenin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Biyoaktif nanofiber ile inkübasyon süttün biyokimyasal kompozisyonunu değiştirmemiştir. Bu çalışma ile PCL esaslı biyoaktif nanofiber hazırlama metodunu geliştirilmiş ve süttten istenmeyen maddenin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süttten uzaklaştırılması istenen madde olarak kullanılan fluoksetin model ilaç olarak seçilmiştir, ancak süttten fluoksetinin uzaklaştırılması ayrıca klinik öneme de sahip bir bulgudur. Antikoru olan tüm kimyasal maddelerin veya ilaçların aynı yöntem kullanılarak süttten uzaklaştırılması mümkündür. Biyoaktif nanofiber denemelerinde ilk defa bu çalışmada kullanılan keçi süttü, anne süttüne en yakın bileşime sahip olduğu için tercih edilmiştir.

Emziren annelerin akut ve/veya kronik hastalığının tedavisi sebebiyle ilaç kullanması bebeklerinin sağlığı için bir risk oluşturmaktadır. Bununla birlikte annenin ilacı kullanmayı bırakması da kendisi ve dolayısıyla bebeğinin sağlığı için tehdit oluşturmaktadır (Lansa ve Wisner, 2009; Cornish ve ark., 2005). Anne süttü aracılığıyla bebeğe geçen fluoksetin bebekte uyku bozukluğu, ağlama krizi, beslenme yetersizliği ve kolik oluşumuna neden olmaktadır (Hendrick ve ark., 2001).

Yapılan literatür araştırmasında PCL'nin çeşitli özelliklerini ve uygulamalarını belirten çalışmalar olmasına rağmen, PCL esaslı nanofiberlerin süttteki kimyasal maddeleri uzaklaştırma etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biyoaktif PCL esaslı nanofiberin etkinliği antikorumun nanofiber yüzeye immobilazyonuna,

nanofiberin yeterli yüzey alanına sahip olmasına ve antijen yakalama potansiyeline bağlıdır.

Biyoaktif nanofiberin etkinliği, 25, 50, 75 ve 100 ng/mL fluoksetin içeren keçi sütü ile belirlenmiştir. Keçi süt örneklerine eklenen bu fluoksetin miktarları, antidepresan tedavisi altında anne sütünde bulunan fluoksetin konsantrasyon aralığı gözönünde bulundurularak belirlenmiştir.

Biyoaktif nanofiberin ortalama fluoksetin uzaklaştırma verimi % 93,6 olarak bulunmuştur ve fluoksetin konsantrasyonunun artmasıyla fluoksetinin süttten uzaklaştırılma veriminin arttığı tespit edilmiştir. Sütün biyokimyasal içeriğinin biyoaktif nanofiber ile inkübasyon sonrasında değişip değişmediğinin belirlenmesi için sütte total protein, yağ, laktoz, enerji ve pH değerleri tayin edilmiş ve biyoaktif PCL esaslı nanofiberin sütün biyokimyasal içeriğini değiştirmedığı gösterilmiştir.

Biyoaktif PCL esaslı nanofiberin süt ile inkübasyonu nanofiberin yüzey morfolojisini değiştirmemiştir. Yaptığımız ön denemelerde biyoaktif PCL esaslı nanofiber, 4 °C'de paketlenmeden saklandığında en az 3 ay boyunca etkinliğini kaybetmemektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda yapılan validasyon analizinde kabul edilebilir tekrarlanabilirlik (% RSD) çalışılan konsantrasyonlar için ortalama % 3,32 olarak bulunmuştur. Bu sonuç nanofiberin iyi bir tekrarlanabilirlik ile fluoksetin uzaklaştırılması için kullanılabileceğini göstermektedir. Biyoaktif nanofiberin doğruluk analizi; 25, 50, 75, 100 ng/mL'lik fluoksetin konsantrasyonlarında geri kazanım değerleri belirlenerek tespit edilmiştir. Biyoaktif nanofiberin ortalama geri kazanımı % 91 ile % 97 arasında bulunmuştur.

Sonuç olarak,

1. Çalışmamızda, fluoksetin antikoru kullanılarak süttten farklı konsantrasyonlarda fluoksetinin spesifik ve etkili bir şekilde uzaklaştırılması için, PCL esaslı biyoaktif nanofiber geliştirilmiştir.

2. Geliştirilen biyoaktif nanofiber sayesinde fluoksetin başarılı bir şekilde keçi sütünden uzaklaştırılmıştır.

3. Biyoaktif nanofiber kullanılarak fluoksetinin uzaklaştırılması sırasında sütün temel biyokimyasal bileşenlerinin konsantrasyonları değişmemiştir.

Çalışmamız bebek sağlığını tehdit eden her türlü istenmeyen kimyasallar ve ilaçlar için devam niteliğinde yeni araştırmalar için öncü niteliğinde olup, literatüre ışık tutmaktadır.

## 10. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th edition. Boston: Elsevier Saunders; 2014, p:87-107.

Adam RC. Keçi sütü. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir; 1972, s. 1-86.

Akalın S, Gönç S, Ünal G. Functional properties of bioactive components of milk fat in metabolism. Pak J Nutr. 2006; 5: 194-197.

Aktaş D. Doğum sonu dönemde depresyon görülme durumu ve depresyon gelişmesini etkileyen risk faktörleri. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Ankara (Danışman: Prof. Dr. F Terzioğlu).

Altun D, Sarıcı SÜ. Keçi sütü: Bebek beslenmesinde ilk tercih mi olmalı? Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2017; 60: 22-33

AOAC International. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Arlington: Association of Official Analytical Chemists; 2002, p:18-22.

Aperia A, Broberger O, Thodenius K, Zetterstrom R. Development of renal control of salt and fluid homeostasis during the first year of life. Acta Paediatr Scand. 1975; 64: 393–398.

Arıca MY, Testereci HN, Denizli A. Dye-ligand and metal chelate poly [2-hydroxyethylmethacrylate] membranes for affinity separation of proteins. J. Chromatogr. 1998; 799: 83-91.

Arslantaş H, Ergin F, Akdolun Baklaya N. Aydın il merkezinde doğum sonrası depresyon sıklığı ve ilişkili risk etmenleri. ADÜ Tıp Fak Der 2009;10:13-22.

Awaja F, Gilbert M, Kelly G, Fox B, Pigram PJ. Adhesion of polymers. Prog Polym Sci. 2009;34:948.

Aykut Y.enhanced field electron emission from electrospun co-loaded activated porous carbon nanofibers. ACS Appl Mater Interfaces. 2012; 4(7): 3405-3415.

Bahadır A. Gümüş Katkılı Kalsiyum Fosfat Malzemelerden Karmaşık Mimarili Skafolt Fabrikasyonu. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. İ Girgin).

Baltzell JK, Bazer FW, Miguel SG, Borum PR. The neonatal piglet as a model for human neonatal carnitine metabolism. J Nutr 1987; 117: 754-757.

Basnet S, Schneider M, Gazit A, Mander G, Doctor A. Fresh goat's milk for infants: myths and realities: A review. Pediatrics. 2010; 125: e973.

Baştan FE. Kimyasal Çöktürme Yöntemiyle Gümüş İlaveli Hidroksiapatit Üretimi Ve Spray Dryer İle Şekillendirilmesi. S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Sakarya (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özbek YY).

Baysal A. Beslenme. 9. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara; 2002, s:100-357.

Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. J Pediatr. 1995; 126: 191-7.

Benfield P, Heel RC, Lewis SP. Fluoxetine: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs*. 1986; 32: 481-508.

Bereli N. Monoklonal Antibadi Saflaştırılması İçin Eş Boyutlu Partiküllerin Hazırlanması. H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2010, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Denizli A).

Berle J.O, Spigset O. Antidepressant use during breast feeding. *Curr Womens Health Rev*. 2011; 7: 28-34.

Bickerstaff GF. Immobilization of enzymes and cells. New Jersey: Humana Press; 1997.

Bozkay H, Ünsal M. Kadın Hastalıkları ve Doğum Temel Bilgileri. Adana: Nobel Tıp Kitapevi; 2006: 372-394.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Campbell JR, Marshall RT. The Science of Providing Milk for Man. New York: McGraw-Hill; 1975, p:514-541.

Carr, PW. Bowers LD. Support considerations in chemical analysis of enzymes, New York: Academic Press, USA; 1980, p:117-123

Catterson ML, Preskorn SH. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance. *Pharmacol Toxicol*. 1996; 78: 203-208.

Chandan RC, Attaie R, Shahani KM. Nutritional aspects of goat milk and its products. In: Proceedings V. International Conference on Goats. New Delhi, India; 1992: 399-420.

Chasin M, Langer R. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker; 1990, p:1-41.

Chen Y, Zhou S, Yang H, Wu L. Structure and properties of polyurethane/nanosilica composites. J Appl Polym Sci. 2005; 95: 1032-1039.

Chibata I. Immobilized Enzymes, Research and Development. Tokyo; Halsted Press: 1978, p:284-296.

Chibata I, Tosa T. Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. Appl Biochem Biotechnol, 1978;1:329-357.

Clark S, Sherbon JW. Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. Small Rumin Res. 2000; 38: 123-134.

Coico R, Sunshine G. Immunology: A Short Course, USA: Wiley; 2009, p:125-144.

Cornish AM, McMahon CA, Ungerer JA, Barnett B, Kowalenko N, Tennant C. Postnatal depression and infant cognitive and motor development in the second postnatal year: the impact of depression chronicity and infant gender. Infant Behav Dev. 2005; 28: 407-417.

Coşkun H, Öndül E. Keçi sütü ve insan beslenmesindeki önemi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2004; 29: 411-418.

Coulet, P.R. 1991. "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Ed: Blum L J, Coulet PR., Marcel Dekker Inc., New York, (1-6).

Dash TK, Konkimalla KVB. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. J Controlled Release. 2012; 158: 15-33.

D'Souza SF, Godbole SS. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. J Biochem Bioph Meth. 2002; 52: 59-62.

Davidson M, London M, Ladewig P. Maternal-Newborn Nursing & Women's Health. 9th edition. New Jersey: Pearson Education; 2012.

Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. New Delhi: Wolters Kluwer Health; 2012.

Doğan G. Yeni Nesil Polimerik Yapıların Hazırlanması Ve Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılması. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Aydın, 2008, (Danışman: Doç. Dr. Akgöl S).

Dumitriu S, Popa M, Dumitriu M. Polymeric biomaterials as enzyme and drug carriers. J Bioact Compat Pol. 1998; 3: 243-312.

Erdem Ö. Bez Y. Doğum sonrası hüznü ve doğum sonrası depresyon. Konuralp Tıp Dergisi. 2009;1:32-37.

Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000, p:484-503.

Garcinuno RM, Fernandez P, Perez-Conde C, Guitierrez AM, Camara C. Development of a fluoroimmunosensor for theophylline using immobilised antibody. *Talanta*. 2000; 52: 825-832.

Gram LF. Fluoxetine. *N Engl J Med*. 1994; 331: 1354-1361.

Grosclaude F, Mahe MF, Brignon G, Di Stasio L, Jeunet R. A Mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha$ 1- casein. *Genet Sel Evol*. 1987; 19: 399-412.

Gürsel A, Alkan S, Toppare L. and Yagcı Y. Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *React Funct Polym*. 2003; 57: 57-65.

Haenlein GFW, Caccese R. Goat milk versus cow milk. In: Haenlein GFW, Ace DL eds. *Extension Goat Handbook*. Washington, DC: USDA Publ, 1984.

Haenlein GFW, Wendorff WL. Sheep milk -production and utilization of sheep milk. In: Park, YW, Haenlein GFW eds. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, and Ames, Iowa, USA; 2006, p:137-194.

Hendrick V, Stowe ZN, Alshuler LL, Mintz J, Hwang S, Hostetter A, Suri R, Leight K, Fukuchi A. Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. *Biol Psychiatry*. 2001; 50: 775-82.

Herd WC. Nutritional needs. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF eds. *Nelson Textbook of Pediatrics* (18th ed). Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, p:209-212.

Huang XJ, Chen PC, Huang F, Ou Y, Chen MR, Xu ZK. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B Enzym*. 2011;70:95-100.

Hussiena EM, Abdel-Gawada FM, Issa YM. Ion-selective electrodes for determination of fluoxetine in capsules and in biological fluids. *Biochem Eng J*. 2011; 153: 210-215.

Jacob SL. *Farmakoloji*. 4. Baskı, Nobel Tıp Yayınevi: 2003.

Jahreis G, Fritsche J, Kraft J. Species dependent, seasonal, and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. In: Yurawecz MP, Mossoba MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ eds. *Advances in Conjugated Linoleic Acid* Champaign, 1999, p:215-225.

Jenness R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. *J Dairy Sci* 1980; 63: 1605- 1630.

Johke T. Nucleotides of mammary secretions. In: Larson BL, Smith VR eds. New York; Academic Press: 1974, p:513-522.

Jorquera P, Wu J, Bockenhauer D. Nonanion gap metabolic acidosis in a newborn. *Curr Opin Pediatr*. 1999; 11: 169-173.

Khramov VA, Kolomeitseva AS, Papichev NV. Jaffe color test- based microtechnique for determination of milk lactose. *Gig Sanit*. 2008; 3: 86-87.

Kim S, Soekena TA, Cromera SJ, Martineza SR, Hardya LR, Strathearna L. Oxytocin and postpartum depression: Delivering on what's known and what's not. *Brain Res*. 2014;1580:219-232.

Kleinman RE. Selected nutrients in human milk, various forms of cow milk and goat milk. In: Pediatric Nutrition Handbook. 6th edition. Elk Grove Village, American Academy of Pediatrics: 2009, p:10-20.

Konar A, Thomas PC, Rook JAF. The concentration of some water-soluble constituents in the milks of cows, sows, ewes and goats. J Dairy Res. 1971; 38: 333-340.

Lansa DST, Wisner KL. Antidepressant medication use during breastfeeding. Clin Obstet Gynecol. 2009; 52: 483.

Larsen PB, Gould IA. A comparative study of three methods of determining the heat destruction of lactose in milk with special reference to the picric acid colorimetric procedure. J Dairy Sci. 1951; 34: 16.

Lawrence RA, Lawrence RM. Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession. Medications, Herbal Preparations, and Natural Products in Breast Milk. 8. edition. Philadelphia, Elsevier: 2015, p:364-404.

Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. Ann Biomed Eng. 2004; 32: 477-486.

Lucas A, Gibbs JA, Lyster RL, Baum JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. Br Med J. 1978; 1: 1018-1020.

Makaraviciute A, Ramanaviciene A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. Biosens Bioelectron. 2013; 50: 460-471.

Mano JF, Sousa RA, Boesel LF, Neves NM, Reis RL. Bioinert, biodegradable and injectable matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Comp Sci Technol.* 2004; 64: 789-817.

Martin P, Ferranti P, Leroux C, Addeo F. Nonbovine caseins quantitative variability and molecular diversity. 3. Baskı. In: Fox PF, Mc Sweeny eds. *Advances in Dairy Chemistry, Proteins*: 2003.

Martinez-Ferez A, Rudolff S, Guadix A, Henkel CA, Pohlentz G, Boza JJ, Guadix EM, Kunz C. Goat's milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *Int Dairy J.* 2006; 16: 173-181.

McClenathan DT, Walker WA. Food allergy. Cow milk and other common culprits. *Postgrad Med.* 1982; 72: 233-239.

Metkar SK, Girigoswami K. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* 2019; 17 : 271-288.

Mora-Gutierrez A, Kumosinski TF, Farrell HM. Quantification of alpha s1-casein in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds using reversephase high performance liquid chromatography. *J Dairy Sci.* 1991; 74: 3303-3307.

Mosbach K. *Methods in enzymology.* New York; Academic Press: 1976, p:620-635.

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

Nelson JM, Griffin EG. Adsorption of invertase. *J Am Chem Soc.* 1916; 38: 1109-1115.

Park YW, Chukwu HI. Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. *Small Rumin Res.* 1988; 1: 157-165.

Park YW, Juarez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res.* 2007; 68: 88-113.

Park YW. Bioactive components in goat milk. In: Park YW (ed). *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Georgia: Wiley-Blackwell, 2009:43-83.

Park YW, HI Chukwu. Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. *Small Rumin. Res.* 1988; 1: 157-166.

Posati LP, Orr ML. Composition of foods. *Agric. Handbook No. 8-1*. ARS, USDA, Washington, DC. 1976, p:137-341.

Prabhakar RL, Brocchini S, Knowles J. Effect of glass composition on the degradation properties and ion release characteristics of phosphate glass–polycaprolactone composites. *Biomaterials.* 26; 2209: 2005-2218.

Preskorn SH. Clinical pharmacology of selective serotonin reuptake inhibitors. *Caddo; Professionals Communications*: 1996, p:24-262.

Pulina G, Becini R. *Dairy Sheep Nutrition*. Wallingford, UK; CABI Publ: 2004, p:160-202.

Qian ZY, Jolles P, Migliore-Samour D, Schoentgen F, Fiat AM. Sheep kappa-casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1244: 411417.

Rodrigues R, Garcia H, Mederios M, Queiroga R. Goat milk fat naturally enriched with conjugated linoleic acid increase lipoproteins and reduced triacylglycerol in rats. *Molecules* 2014; 19(3): 3820-3831.

Rao, MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *microbiology and molecular biology reviews*. 1998; 62: 597-635.

Remeuf F, Lenoir J. Relationship between the physico-chemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Intl Dairy Bull*. 1986; 202: 68-72.

Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder H, Frew AJ, Weyand CM. *Clinical Immunology E-Book: Principles and Practice*, Elsevier Health Sciences: 2012, p:246-264.

Roncada P, Gaviraghi A, Liberatori S, Canas B, Bini L, Greppi GF. Identification of caseins in goat milk. *Protemics* 2002; 2(6): 723-6.

Saallaha S, Naim MN, Lenggoro IW, Mokhtar MN, Bakar NFA. Gen M. Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning. *Biotechnol Rep*. 2016;10:44-48.

Sanjay G, Sugunan S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chem*. 2006; 94: 573-579.

Schaafsma G. The protein digestibility–corrected amino acid score. *J Nutr*. 2000;130:1865-1867.

Shetty N. *Immunology: Introductory Textbook*, New Age International Limited: 2005.

Silva C, Silva CJ, Zille A, Guebitz GM, Paulo AC. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 41: 867-875.

Song J, Kahveci D, Chen M, Guo Z, Xie E, Xu X, Besenbacher F, Dong M. Enhanced catalytic activity of lipase encapsulated in PCL nanofibers. *Langmuir.* 2012; 28: 6157-6162.

Tanaka A, Kawamoto T. Cell and Enzyme Immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Demain AL, Davies JE eds. Washington; American Society for Microbiology: 1999, p:217-244.

Tetik BK, Tekinemre IG. Emziren annelerde ilaç kullanımı. *Jour Turk Fam Phy.* 2017; 8: 83-89.

Telefoncu A. İmmobilize enzimler ve immobilizasyon yöntemleri, temel ve uygulamalı enzimoloji notları. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1986.

Telli AE, Doğruer Y. Keçi sütünde biyoaktif bileşenler. *Animal Health Prod and Hyg.* 2014; 3: 264 -271.

Tezel A, Gözüm S. Postpartum dönemde kadınlarda görülebilen depresif belirtiler ve hemşirelik bakımı. *Hem Yüksekok Derg.* 2005; 1; 62-68.

Tezel A. Postpartum depresyonun değerlendirilmesinde hemşirelerin/ebelerin sorumlulukları. *New Symposium Journal.* 2006; 46: 184-187.

Tunali-Akbay T, Kahraman MV, Oktay B, İpekçi H, Kayaman-Apohan N. Development of Nanofiber Based Immunosorbent Surface for the Removal of Fluoxetine From Breast Milk. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2018; 1-9.

Tunali-Akbay T, İpekçi H, Yarat A. A validated immunosorbent surface based determination of theophylline in milk. *J Anal Chem* (in press).

Turck D. Cow's milk and goat's milk. *World Rev Nutr Diet*. 2013; 108: 56-62.

Uhlig H. *Industrial Enzymes and Their Applications*, USA; John Wiley & Sons: 1998, p:8-26.

Underwood EJ. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 4th edition. New York; Academic Press: 1977, p:459-478.

Van Natta FJ, Hill JW, Carruthers WH. Studies of polymerization and ring formation,  $\epsilon$ -caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc*. 1934; 56: 455-459.

Weihrauch JL, Son YS. The phospholipid content of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1984; 60: 1971-1978.

Wieland LPA, London ML, Davidson MR. *Contemporary Maternal Newborn Nursing Care*. 6 baskı. New Jersey; Prentice Hall: 2006, p:250-277.

Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymerpolycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010; 35: 1217-1256.

Xu XJ, Sy JC, Shastri VP. Towards developing surface eroding poly( $\alpha$ -hydroxy acids). *Biomaterials*. 2006; 27: 3021-3030.

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

Yu Q, Wang Q, Li B, Lin Q, Duan Y. Technological development of antibody immobilization for optical immunoassays: progress and prospects. Crit Rev Anal Chem. 2015; 45: 62-75.

Zhang L, Liu LG, Pan FL, Wang DF, Pan ZJ. Effects of heat treatment on the morphology and performance of psu electrospun nanofibrous membrane. J Eng Fiber Fabr. 2012; 7: 7-16.

## 9. EKLER

### EK-1. Tez Konusu ile İlgili Poster Bildirisi

#### **Bio-Active Polycaprolactone Nanofibers As a Potential Fluoxetine Filter**

P.07-051-Wed

**H. Taslak<sup>I</sup>, O. Özcan<sup>I</sup>, B. Gürel-Gökmen<sup>I</sup>, T. Tunali-Akbay<sup>I</sup>**

<sup>I</sup>*Marmara University, Istanbul, Turkey*

Fluoxetine is a widely used serotonin reuptake inhibitor for the treatment of postpartum depression. Adverse effects such as colic, fussiness, and drowsiness have been reported in some breastfed infants of fluoxetine using mothers. In this study, bio-active polycaprolactone nanofiber was developed for the removal of fluoxetine from the milk. The efficiency of the fluoxetine filter was tested by using spiked goat milk samples. Goat milk is used instead of breastmilk, as its content is nearly similar to the breastmilk. Fluoxetine was added to the goat milk in 25, 50, 75 and 100 ng/mL concentrations. Filter is incubated with the spiked milk samples for fluoxetine removal. Lactose, creatinocrit and protein levels were also measured to determine the milk composition before and after the incubation. Within-run repeatability was tested with the same branded goat milk for ten days. Fluoxetine levels were determined with ELISA method following incubation. The fluoxetine filter effectively removed fluoxetine from milk and did not significantly change the milk composition. As a conclusion, different types of bio-active nanofibers can be developed for the sensing of chemicals found in the breastmilk



## 10. ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Hava Dudu	<b>Soyadı</b>	TASLAK
<b>Doğum Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğum Tarihi</b>	11.06.1992
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>Tel</b>	
<b>E-mail</b>	havataslak@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	Marmara Üniversitesi-Biyokimya (Ecz)	Devam ediyor.
<b>Yüksek Lisans</b>	İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi-Organik Kimya (Müh.)	Devam ediyor
<b>Lisans</b>	Sakarya Üniversitesi (Kimya Bölümü)	2014
<b>Lise</b>	Erdem Bayazıt Anadolu Lisesi	2010

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	Orta	Orta	Orta

<b>Yabancı Dil Sınav Notu #</b>									
YDS	YÖKDİL	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	66,25								

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	69.48		

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office Programları	İyi
GraphPad Prism	İyi

### Katıldığı Seminer, Kurs, Sempozyum, Kongre Bilgileri

Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşımı Kursu, Marmara Üniversitesi DEHAMER,2015
GHP: İyi Hijyen Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi,2015
GMP: İyi Üretim Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi,2015
GLP : İyi Laboratuvar uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi,2015
İSO 22716: 2007 Kozmetik İyi Üretim Uygulamaları, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi,2015
43rd Federation of European Biochemical Societies Congress (FEBS), Çek Cumhuriyeti-Prag 2018
International Symposium on Graduate Researches in Science, İstanbul 2018

**EK:** Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

- Hava Taslak , Begüm Gürel, Ozan Özcan , Tuğba Tunali-Akbay, Bio-Active Polycaprolactone Nanofibers As A Potential Fluoxetine Filter, 43rd Federation of European Biochemical Societies Congress (FEBS), Çek Cumhuriyeti-Prag 2018 (**Poster sunumu**)